



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

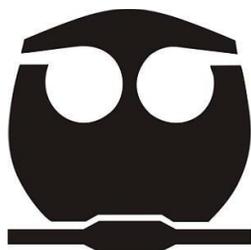
INTERVENCIÓN CON RESVERATROL EN LA OBESIDAD
MATERNA DE LA RATA: BENEFICIO EN EL
METABOLISMO DE LAS CRÍAS.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA DE ALIMENTOS

P R E S E N T A
ROMERO LOZA THALÍA MONSERRAT

MÉXICO, D. F. FEBRERO 2014





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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: M. EN C. LUCIA CORNEJO BARRERA

VOCAL: DRA. ELENA ZAMBRANO GONZÁLEZ

SECRETARIO: DR. GUILLERMO CELESTINO CARDOSO SALDAÑA

1er. SUPLENTE: DRA. RUTH BUSTAMANTE GARCÍA

2° SUPLENTE: DRA. ILIANA ELVIRA GONZÁLEZ HERNÁNDEZ

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN
(INNSZ).

DEPARTAMENTO DE BILOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN DR. CARLOS GUAL CASTRO

ASESOR DEL TEMA: DRA. ELENA ZAMBRANO GONZÁLEZ

SUSTENTANTE: THALÍA MONSERRAT ROMERO LOZA

ÍNDICE

RESUMEN	1
1. Introducción	2
1.1. Obesidad	2
1.1.1. Definición	2
1.1.2. Clasificación y tipos de obesidad	3
1.1.3. Prevalencia de obesidad y consecuencias en la salud	4
1.2. Nutrición durante el embarazo	5
1.3. Obesidad materna	5
1.4. Programación del desarrollo	6
1.4.1. Mecanismos de la programación del desarrollo	6
1.4.2. Alteración en la regulación del consumo de alimentos	6
1.4.3. Alteración en la fisiología de los adipocitos	7
1.5. Obesidad y estrés oxidante	8
1.6. Estrés oxidante	8
1.6.1. Ambiente oxidante	9
1.6.2. Los radicales libres	9
1.6.3. Daño inducido por radicales libres	10
1.7. Sistemas de defensa antioxidante	12
1.7.1. Sistemas antioxidantes enzimáticos	13
1.7.2. Sistemas antioxidantes no enzimáticos	15
1.8. Resveratrol	16
1.8.1. Fuentes y distribución en la naturaleza	17
1.8.2. Metabolismo	17
1.8.3. Biodisponibilidad y farmacocinética	19
1.8.4. Efectos benéficos del consumo de resveratrol	20
1.8.5. Mecanismo de acción	21
2. Planteamiento del problema	23
3. Hipótesis	23

4. Objetivos	24
4.1. Objetivo general	24
4.2. Objetivos particulares	24
5. Diseño experimental	25
6. Metodología	26
6.1. Animales experimentales	26
6.2. Dieta	26
6.3. Medición del peso corporal de las hembras F0	28
6.4. Intervención con resveratrol a las hembras F0	28
6.5. Apareamiento y determinación de la preñes de las hembras F0	28
6.6. Medición de peso corporal y determinación de la ingesta de las crías F1	28
6.7. Obtención del suero de las crías de 110 d	29
6.8. Extracción del hígado y tejido adiposo de las crías de 110 d	29
6.9. Determinación de la concentración de triglicéridos y colesterol en suero de las crías de 110 d	29
6.10. Homogeneización del hígado de las crías de 110 d	30
6.11. Cuantificación de proteínas por Bradford en el hígado de crías de 110 d	30
6.12. Determinación de estrés oxidante en hígado de las crías de 110 d	31
6.12.1. Determinación de MDA en suero e hígado	31
6.12.2. Determinación de ROS	32
6.12.3. Determinación de enzimas antioxidantes SOD y GPx	34
6.13. Análisis estadístico	35
7. Resultados	36
7.1. Peso corporal de las hembras experimentales F0	36
7.2. Peso corporal e ingesta de las crías de 110 d	37
7.3. Adiposidad y perfil lipídico de las crías de 110 d	37
7.4. Cuantificación de MDA en suero de la crías de 110 d	39
7.5. Peso y peso relativo del hígado de las crías de 110 d	40
7.6. Cuantificación de MDA en el hígado de las crías de 110 d	40
7.7. Determinación de ROS en el hígado de las crías de 110 d	41

7.8. Determinación de enzimas antioxidantes SOD y GPx en hígado de las crías de 110 d	41
8. Discusión	43
9. Conclusión	54
10. Referencias	55
ANEXOS	
I. Cuantificación de triglicéridos y colesterol	60
II. Especificaciones del resveratrol	62
III. Cuantificación de proteínas por el método de Bradford	63
IV. Determinación de malondialdehído (MDA)	64
V. Determinación de especies reactivas de oxígeno (ROS)	65
VI. Determinación de enzimas antioxidantes SOD y GPx	68

Abreviaturas

ACV	Accidentes cerebrovasculares	GPx	Glutación peroxidasa
AF	Ácidos grasos	GR	Glutación reductasa
AgRP	Péptido relacionado agouti	GSH	Glutación
AIN	American Institute of Nutrition	GSHpx	Glutación peroxidasa no dependiente de selenio
AMPK	Cinasa activa por adenin-monofosfato	GSSG	Glutación oxidado
ANOVA	Análisis de varianza	h	horas
ARC	Núcleo arqueado	HCL	Ácido clorhídrico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero	HEPES	Ácido 4 - (2-hidroxietyl)-1-piperazinetanosulfónico
ASB	Albúmina sérica bovina	HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia
ATGL	Adiposo triglicérido lipasa	HPO	Peroxidasa de rábano
BHT	Butilhidroxitolueno	HSL	Lipasa sensible a hormonas
°C	Grados Celsius	IMC	Índice de masa corporal
CAT	Catalasa	INNSZ	Instituto Nacional de Nutrición Salvador Zubirán
CE	Colesterol esterasa	INT	Cloruro de 2-(4-yodofenil)-3-(4nitrofenol)-5-fenil tretazolio
CINVA	Comité de Investigación de Animales	iNOS	Óxido nítrico sintasa
cm	centímetros	IOM	Instituto de Medicina
CO	Colesterol oxidasa	kg	kilogramo
CV	Coefficiente de variación	kcal	kilocaloría
d	días	kD	kilodalton
DCyTA	Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos	λ	Longitud de onda
DFC	2,7- diclorodihidrofluoresceína	L	litros
DFC-AC	2,7- diclorofluoresceíndiacetato	LDL	Lipoproteína de baja densidad
DHBS	Ácido 3,5-dicloro-2-hidroxibenceno	m	metros
DIEB	Departamento de Investigación Experimental y Bioterio	máx.	Máximo
dL	decilitros	MDA	Malondialdehído
ER-α,β	Receptores de estradiol α,β	MeOH	Metanol
EE	Error estándar	mg	miligramos
FAD	Flavín adenín dinucleótido reducido	mL	mililitros
FADH₂	Flavín adenín dinucleótido oxidado	μL	microlitros
g	gramos	mM	milimolar
GK	Glicerol cinasa	MnSOD	Superóxido dismutasa cofactor manganeso
GPO	Glicerofosfato oxidasa	NAD	Nicotidamida adenina dinucleótido oxidado

NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NAFLD	Enfermedad del hígado graso no alcohólico
nm	nanómetros
nmoles	nanomoles
NPY	Neuropeptido Y orexigénico
OMS	Organización Mundial de la Salud
PGC1-α	Peroxisoma activado por proliferador de receptor gamma coactivador 1-alfa
PKA	Cinasa A
PKC	Cinasa C
POMC	Proopiomelanocortina anorexigénica
PPAR	Peroxisoma proliferador activado del receptor
RNS	Especies reactivas de nitrógeno
ROS	Especies reactivas de oxígeno
rpm	revoluciones por minuto
SeGSHpx	Glutación peroxidasa dependiente de selenio
SIRT 1	Sirtuina 1 deacetilasa dependiente de NAD
SOD	Superóxido dismutasa
TA	Tejido adiposo
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Especies reactantes con TBA
TCA	Ácido tricloroacético
TRIS	Tris (hidroximetil) aminometano
U	Unidad de actividad enzimática
UV	Ultravioleta
XOD	Xantina oxidasa
4-AAP	4- Aminoantipirina

RESUMEN

La obesidad representa un proceso patológico el cual está dado por factores genéticos y ambientales, actualmente es un problema de salud mundial con consecuencias serias para la salud, incluyendo a mujeres en edad reproductiva. Tras la concepción, estas mujeres obesas se caracterizan por tener comprometida la salud propia y la del producto, ya que, se ha observado que las alteraciones nutricionales de un individuo durante periodos críticos del desarrollo como la gestación y lactancia pueden modificar su fisiología y metabolismo permanentemente aumentando su predisposición a enfermedades metabólicas en la vida adulta, lo cual se conoce como programación del desarrollo. Uno de los factores adversos de la programación del desarrollo por la obesidad materna es el aumento de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y peroxidación de lípidos, que acompañado con la deficiencia de los sistemas antioxidantes provoca estrés oxidante. De acuerdo a esta problemática, se han buscado distintas medidas que permitan prevenir los efectos adversos originados por la obesidad materna. Estudios en modelos animales muestran que moléculas biológicamente activas son altamente capaces de disminuir el estrés oxidante, además de tener otras funciones importantes en el organismo. El resveratrol, es una molécula con gran capacidad antioxidante y se ha observado que tiene efectos benéficos en las enfermedades cardiovasculares y metabólicas, tales como obesidad y diabetes. Sin embargo, actualmente no se han explorado los efectos en el metabolismo y el estrés oxidante de la descendencia (F1) de madres obesas (F0) que fueron intervenidas con resveratrol. Por lo tanto, en este estudio se evaluó el estrés oxidante en crías descendientes de madres obesas que fueron intervenidas con resveratrol.

Como madres experimentales se usaron ratas hembras (F0) recién destetadas de 21 días de edad (d), asignadas a 4 grupos de acuerdo a su patrón de alimentación. El grupo Control (C) alimentado con dieta control (comercial 4 kcal/g), el grupo Control intervenido con resveratrol (Cres) alimentado con dieta control, administradas desde un mes previo a la gestación (90 d) y durante la gestación con 20 mg/día/kg de peso de resveratrol, grupo de Obesidad Materna (OM) alimentado con dieta alta en grasa (preparada en el laboratorio 5 kcal/g), grupo de Obesidad Materna intervenido con resveratrol (OMres) alimentado con dieta alta en grasa, administradas desde un mes antes (90 d) y durante la gestación con resveratrol. Todos los grupos experimentales se aparearon a los 120 d con un macho sano. Una vez que nacieron las crías (F1), se asignaron al mismo grupo experimental de la madre, al destete (21 d) fueron alimentadas con dieta control hasta los 110 d, al llegar a esta edad las crías fueron sacrificadas, obteniéndose tejido adiposo, hígado y suero. Se midió el contenido de grasa total, concentración de triglicéridos, colesterol y malondialdehído (MDA) en suero y marcadores de estrés oxidante en hígado, tales como ROS y MDA; y la actividad de enzimas antioxidantes como superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa (GPx).

La dieta alta en grasa ocasionó una mayor ganancia de peso en las madres (F0) sin tener cambio en los grupos intervenidos con resveratrol. Por otra parte, la descendencia (F0) de las madres obesas presentó un mayor contenido de grasa total y triglicéridos en suero con respecto al grupo C, el cual se previno totalmente en las crías del grupo de obesidad materna que fue intervenido con resveratrol (OMres). De acuerdo al estrés, la concentración de MDA en el suero de las crías macho del grupo OM fue mayor, la cual se encontró disminuida en el grupo OMres, en el caso de las hembras los grupos Cres y OMres tuvieron menor concentración de MDA con respecto a sus controles. Las hembras OM tuvieron mayor concentración de MDA en el hígado comparado con el grupo C, sin obtener cambio en los grupos intervenidos, los machos del grupo OMres tuvieron menor concentración de MDA comparado con OM. Las ROS fueron menores en los machos del grupo OMres, sin obtener cambios en los demás grupos experimentales. La actividad de las enzimas antioxidantes no fue diferente en las hembras, sin embargo, la actividad de GPx en los machos se encontró aumentada en el grupo OM y disminuida en el grupo OMres y la actividad de la SOD se encontró disminuida en el grupo OMres. La intervención con resveratrol en madres obesas previene la acumulación excesiva de grasa y triglicéridos en las crías.

1. Introducción

La nutrición constituye un pilar fundamental en la vida humana, el mantenimiento de la salud y el adecuado desarrollo físico y mental a lo largo de todas las etapas de la vida. Durante el desarrollo fetal, periodo de lactancia, infancia, adolescencia, edad adulta y vejez, la correcta nutrición es esencial para garantizar la supervivencia, crecimiento, desarrollo mental, rendimiento, salud y sensación de bienestar.

En la actualidad, en las sociedades occidentales predominan los desequilibrios nutricionales por exceso debido a la adquisición de hábitos alimentarios inadecuados que conllevan un aporte excesivo de energía y/o diversos componentes nutricionales, lo cual constituye un factor de riesgo de primer orden para el desarrollo de la obesidad, diversos factores de riesgo cardiovascular y distintos tipos de cáncer (*Bellido, 2006*).

1.1. Obesidad

1.1.1. Definición

La obesidad y el sobrepeso se definen como una acumulación anormal o excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud. El índice de masa corporal, IMC, es una indicación simple de la relación entre el peso y la talla que se utiliza frecuentemente para identificar el sobrepeso y la obesidad en adultos, tanto a nivel individual como poblacional. El IMC se calcula como el peso en kilogramos dividido por el cuadrado de la altura en metros.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define el sobrepeso como un IMC igual o superior a 25, y la obesidad como un IMC igual o superior a 30.

La causa fundamental de la obesidad y el sobrepeso es un desequilibrio entre el ingreso y el gasto de calorías. Su aumento es atribuible a varios factores, entre ellos: la modificación mundial de la dieta, con una tendencia al aumento de la ingesta de alimentos hipercalóricos, ricos en grasa y azúcares, pero con escasas vitaminas, minerales y otros micronutrientes; y la tendencia a la disminución de la actividad física debido a la naturaleza cada vez más sedentaria de muchos trabajos, a los cambios en los medios de transporte y a la creciente urbanización (*Pastor, 2009*).

1.1.2. Clasificación y tipos de obesidad

La obesidad se puede clasificar de diferentes formas. De acuerdo al índice de masa corporal se clasifica como:

Normopeso: IMC 18,5-24,9 kg/m²

Sobrepeso: IMC 25-29 kg/m²

Obesidad grado I: IMC 30-34 kg/m²

Obesidad grado II: IMC 35-39,9 kg/m²

Obesidad grado III: IMC \geq 40 kg/m²

Obesidad de tipo IV (mórbida): IMC >50 kg/m²

Clasificación morfométrica:

Obesidad androide o central o abdominal (en forma de manzana): el exceso de grasa se localiza preferentemente en la cara, el tórax y el abdomen. Se asocia a un mayor riesgo de dislipemia, diabetes, enfermedad cardiovascular y de mortalidad en general.

Obesidad ginoide o periférica (en forma de pera): la grasa se acumula básicamente en la cadera y en los muslos. Este tipo de distribución se relaciona principalmente con problemas de retorno venoso en las extremidades inferiores (varices) y con artrosis de rodilla (genoartrosis).

Obesidad de distribución homogénea: es aquella en la que el exceso de grasa no predomina en ninguna zona del cuerpo.

Para saber el tipo de obesidad se tiene que dividir el perímetro de la cintura entre el perímetro de la cadera. En la mujer, cuando es superior a 0,9 y en el varón cuando es superior a 1, se considera obesidad de tipo androide (*Sociedad Española para el estudio de la obesidad, 2000, 2007*).

Clasificación histológica:

Obesidad hiperplásica: el aumento de la grasa corporal se debe al incremento en el número de adipocitos.

Obesidad hipertrófica: el aumento del volumen de la grasa corporal es a expensas del aumento del tamaño de los adipocitos, en los que se almacenan triglicéridos (*Hernández, 2010b*).

Clasificación etiológica:

Obesidad primaria, esencial o idiopática: es la forma más frecuente (95%) y realmente no suele ser tan idiopática, puesto que aunque puede haber una predisposición genética, casi siempre está presente un desbalance entre la cantidad de calorías ingeridas con la alimentación y el gasto energético.

Obesidad secundaria: sólo afecta a menos del 5% de la población obesa, las causas pueden ser variables, pueden ser de origen endocrino, origen genético y por fármacos (*Hernández, 2010b*).

1.1.3. Prevalencia de obesidad y consecuencias en la salud

La obesidad representa un proceso patológico en el ser humano. Dicho proceso ha perdurado durante siglos por factores genéticos y ambientales, hasta convertirse actualmente en una pandemia con consecuencias serias para la salud (*Aguilar, 2011*).

La obesidad es un problema de salud pública mundial en el cual aproximadamente 1, 700 millones de adultos padecen sobrepeso y 312 millones, obesidad.

En México, según la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012 (*ENSANUT*) la prevalencia de obesidad fue de 32.4% y la de sobrepeso de 38.8%. La obesidad fue más alta en el sexo femenino (37.5%) que en el masculino (26.8%), al contrario del sobrepeso, donde el sexo masculino tuvo una prevalencia de 42.5% y el femenino de 35.9%.

Por otra parte, las consecuencias de la obesidad alcanzan proporciones catastróficas. Entre ellas cabría destacar las enfermedades cardíacas y vasculares, alteraciones del metabolismo lipídico (dislipemias) y en consecuencia aterosclerosis; alteraciones en determinado tipo de hormonas con gran actividad metabólica como la insulina, originando problemas de resistencia celular a la misma (hiperinsulinemia); menor tolerancia a la glucosa, lo que origina riesgo de padecer diabetes mellitus tipo II; hipertensión arterial con el riesgo de accidentes cerebrovasculares (ACV) que ello supone; déficit de hormona de crecimiento e hiperleptinemia. Al conjunto de estos factores o alteraciones se le denomina síndrome

metabólico, y algunos pueden hacer ya su aparición a los 6 años de edad en niños y adolescentes obesos (*Juonala et al., 2011*).

1.2. Nutrición durante el embarazo

Las necesidades nutricionales durante el proceso reproductivo (gestación y lactancia) están incrementadas, en comparación con las de la mujer sana que no se encuentra embarazada, para permitir el crecimiento y desarrollo tanto del feto como del lactante, así como para sobrellevar los cambios adaptativos que el organismo materno puede sufrir en este periodo.

Uno de los aspectos destacados del control prenatal es el diagnóstico, la evaluación y el manejo de la condición nutricional de la embarazada. Es conocido el hecho de que el peso materno pregestacional y la ganancia ponderal durante el embarazo influyen directamente sobre el peso fetal. El bajo peso y la obesidad materna se relacionan con recién nacidos pequeños y grandes para la edad gestacional, respectivamente (*Gil et al., 2010*).

1.3. Obesidad materna

En las mujeres mexicanas en edad fértil, la prevalencia de obesidad es alta (32%) y no muestra signos de disminuir (*Hernández, 1996*). La obesidad durante el embarazo se ha asociado con una serie de complicaciones durante y después del embarazo, como la diabetes gestacional, preeclampsia, defectos de nacimiento, y un mayor riesgo de tromboembolismo y la distocia de hombro (*Huda et al., 2010, Watkins et al., 2003*).

En las mujeres de peso normal que viven en entornos saludables el aumento de peso de 11 a 16 kg durante la gestación se asocia con un desenlace satisfactorio. Las directrices emitidas por el Instituto de Medicina (IOM) recomienda que un aumento de peso de 11 a 16 kg en mujeres con peso normal (IMC de 18.5 a 24.9), 13 a 18 en mujeres con bajo peso (IMC<18.5) y 7 a 11 kg en las mujeres con sobrepeso (IMC 25 a 29.9). Dado que la crisis de obesidad también afecta a las mujeres en su embarazo, el aumento de peso óptimo de un lactante sano de una madre obesa se debe valorar teniendo en cuenta el aumento de riesgo potencial para la salud de la madre asociado a su propio aumento de peso (*Mahan et al., 2009*)

Por otra parte, se ha sugerido que la obesidad materna podría predisponer al feto a un mayor riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares en la vida adulta (*Forsen et al., 1997*).

1.4. Programación del desarrollo

Estudios recientes sugieren que el desarrollo de la obesidad podría tener su origen en las etapas más precoces de la vida, esto es, durante el período fetal. Según esto, en el período fetal tendrá lugar un mecanismo de programación, el cual activará numerosos procesos nutricionales, hormonales, físicos y psicológicos, los cuales van a actuar en períodos críticos de la vida configurando ciertas funciones fisiológicas (*Tounian, 2011*).

El ambiente nutricional materno juega un papel importante en la programación de la salud en los hijos, como la concentración de glucosa y el metabolismo de la insulina, el balance energético y la predisposición a los trastornos metabólicos. En particular, la obesidad materna se asocia con una elevada prevalencia de las enfermedades cardiovasculares en la descendencia.

La evidencia de los estudios en humanos y animales experimentales, incluyendo roedores y primates no humanos, ha indicado que la obesidad materna programa a su descendencia a un mayor riesgo de presentar obesidad en la vida adulta (*Dong et al., 2013*).

La obesidad materna o la exposición a una dieta rica en grasas predisponen la aparición y desarrollo de la obesidad, resistencia a la insulina, hipertrofia cardiaca y anomalías miocárdicas en la descendencia.

1.4.1. Mecanismos de la programación de la obesidad

Numerosos factores han sido implicados en la aparición de obesidad y diabetes tipo II en la descendencia en respuesta a la obesidad materna inducida. El uso de modelos animales ayuda a distinguir entre la causa y efecto, lo que a su vez puede ayudar a comprender la prevención o la intervención (*Alfaradhi, 2011*).

1.4.2. Alteración en la regulación del consumo de alimentos

El desarrollo de la hiperfagia en los hijos de madres obesas poco después del destete sugiere una alteración en la regulación de la alimentación/apetito. El hipotálamo es la región

del cerebro central que se encarga de la regulación de la ingesta dietética a corto y largo plazo a través de la síntesis de diversos neuropéptidos orexigénicos y anorexigénicos (Arora, 2006). El núcleo arqueado (ARC) actúa como un centro de control de alimentación que contiene poblaciones neuronales que expresa el neuropéptido Y orexigénico (NPY) y el péptido relacionado agouti (AgRP) y la proopiomelanocortina anorexígenica (POMC). El ARC se encuentra inmediatamente por encima de la eminencia media, la interfaz está especialmente modificada para permitir la entrada de péptidos y proteínas periféricas, por lo que es el sitio ideal para integrar las señales hormonales para la homeostasis de la energía.

La expresión desregulada de neuropéptidos hipotalámicos se asocia con la obesidad. La síntesis y la secreción de NPY se han encontrado aumentada en comparación con los controles en varios modelos de obesidad con animales experimentales (Beck et al., 1990, Wilding et al., 1993), así como la reducción de expresión de POMC y su producto α -MSH (Kim et al., 2000). Estos cambios pueden deberse a alteraciones en los péptidos que regulan su producción y liberación, es decir, la leptina y la insulina. Niveles inapropiados o un cambio en estas hormonas durante una ventana crítica del desarrollo neuronal pueden tener consecuencias estructurales permanentes.

1.4.3. Alteración de la fisiología de los adipocitos

La exposición a la obesidad materna puede estar asociada con alteraciones programadas en los genes importantes para la diferenciación y la función de los adipocitos. La composición corporal alterada y el exceso de depósitos de grasa en la progenie se observan con frecuencia en respuesta a la sobrealimentación materna. En un estudio se observó que a los 3 meses de edad, los descendientes de madres obesas mostraban hipertrofia de adipocitos con el aumento de PPAR así como la reducción en los receptores β_2 - β_3 -adrenérgicos y la expresión de ARNm, indicativa de un aumento de la lipogénesis y la disminución en la regulación de la lipólisis (Samuelsson et al., 2008).

Sin embargo, el aumento de la adiposidad en sí mismo es un factor causal de la resistencia a la insulina a partir de la liberación de varias adipocinas y citocinas inflamatorias. Por lo tanto, la programación de la expresión génica puede ser un mecanismo a través del cual, la exposición a la sobrealimentación durante el desarrollo conduce a la adiposidad en la vida adulta (Alfaradhi, 2011).

1.5. Obesidad y estrés oxidante

Como ya se ha mencionado, la obesidad es un problema de salud que puede provocar el síndrome metabólico y el incremento de varias enfermedades, incluyendo diabetes, hipertensión, dislipidemia, aterosclerosis y cáncer. Se han propuesto diferentes mecanismos que asocian la obesidad con este tipo de enfermedades.

Uno de los candidatos es el estrés oxidante, que ha sido implicado en las complicaciones vasculares de la diabetes e insuficiencia pancreática. Usualmente las personas que presentan obesidad, también presentan un aumento de estrés oxidante sistémico.

El estrés oxidante resulta de un incremento en la producción de radicales libres y especies reactivas de oxígeno y/o la disminución en las defensas antioxidantes, este estrés causa daño severo en las macromoléculas biológicas y provoca desregulación del metabolismo y la fisiología normal.

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son bien reconocidas por ser una espada de doble filo. A una moderada concentración éstas pueden ser benéficas contra diversos agentes infecciosos, no obstante, una sobreproducción se traduce en estrés oxidante, este proceso de oxidación puede provocar daño a las estructuras celulares, incluyendo los lípidos de la membrana, proteínas y el DNA (*Valko et al., 2007*).

Diversos estudios han mostrado una extensa relación de marcadores de estrés oxidante con la obesidad, resistencia a la insulina y la diabetes (*Urakawa et al., 2003*).

Estudios recientes sugieren que la producción de ROS puede ser el comienzo de la resistencia a la insulina y la obesidad en respuesta a la nutrición materna (*Radaelli et al., 2003*). Además, la obesidad materna contribuye al anormal ambiente en el cual se desarrollan los embriones y fetos; se sugiere que el estrés oxidante puede desencadenar mecanismos en la descendencia, los cuales pueden ser cambios en la expresión de los genes (*Alfaradhi, 2011*).

1.6. Estrés oxidante

Las macromoléculas de importancia biológica (proteínas, ácidos nucleótidos, hidratos de carbono y lípidos) son moléculas nucleofílicas que tienen electrones susceptibles de compartir, es decir, pueden ser capturados (oxidación).

Los oxidantes son compuestos electrofílicos que tienen afección por los electrones y que tienen afinidad para reaccionar con macromoléculas nucleofílicas, muchas de ellas de importancia biológica (*Halliwell, 2007*).

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno (NOS), son un subgrupo de moléculas oxidantes, que como su nombre lo indica son altamente reactivas.

Otro subgrupo son los radicales libres que no sólo tienen alta reactividad y capacidad oxidativa, sino que adicionalmente pueden generar reacciones oxidativas en cadena. Los radicales libres en particular y las especies reactivas en general, participan en algunas funciones biológicas (proliferación celular, diferenciación celular, fagocitosis, metabolismo, reacciones inflamatorias) y se encuentran involucradas en diversas patologías (*Konigsberg, 2008*).

1.6.1. Ambiente oxidante

La mayoría de las células y organismos de nuestro planeta se enfrentan a ambientes con agresores oxidativos. Todo inicia con el empleo del oxígeno como la molécula oxidante final del metabolismo aeróbico y oxidativo. Ello hace que las células mantengan una alta concentración de productos oxidantes del metabolismo, especies reactivas de oxígeno y en muchas ocasiones radicales libres. Numerosas reacciones en las células implican oxidaciones, en principio todas las degradaciones para obtener energía y muchas reacciones del metabolismo intermedio (*Winterbourn, 2008*).

1.6.2. Los radicales libres

En forma general, un radical libre es un átomo que tiene uno o más electrones desapareados en sus orbitales externos y es capaz de tener una existencia independiente; sin embargo, es muy reactivo ya que tiende a reducirse, es decir, sustrae un electrón de átomos o moléculas estables, a las cuales oxida, con el fin de alcanzar su propia estabilidad.

Una vez que el radical libre ha conseguido el electrón que necesita para aparear a su electrón libre, la molécula estable que pierde el electrón se oxida y deja a otro electrón desapareado, lo que la convierte a su vez en un radical libre, iniciándose y después propagándose de la misma manera, generando así una reacción en cadena (*Torres, 2002*).

Los radicales libres de importancia biológica pueden clasificarse como:

Especies reactivas de oxígeno (ROS): Las principales son el oxígeno molecular (O_2), el ozono (O_3) y el oxígeno singulete (O_2^1), así como las especies de oxígeno que están parcialmente reducidas; como, el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el hidroperoxilo (HO_2^{\cdot}) y el radical hidroxilo ($\cdot OH$). Estas especies son producto de la ruptura o de la excitación del O_2 y son más reactivos que el O_2 en su estado basal.

Estas ROS son moléculas altamente reactivas que atacan constantemente al organismo mediante reacciones bioquímicas de óxido- reducción, que ocurren como parte normal del metabolismo celular o por factores patológicos.

Metales de transición: tienen la característica de llegar a ser estables (Fe, Mn, Co, Ni y Cu) por si mismos sin necesidad de reaccionar con otro elemento. La mayoría de los metales de transición tienen electrones desapareados y precisamente gracias a esta transición pueden existir en forma de radicales libres.

Otros radicales libres: dentro de este grupo se encuentran las especies reactivas de nitrógeno (NOS); tales como, el óxido nítrico (NO^{\cdot}) y el dióxido nítrico (NO_2^{\cdot}). El NO^{\cdot} es un radical muy reactivo y de importancia fisiológica, puede oxidar y dañar, pero es esencial en funciones biológicas complejas como son la neurotransmisión y neuroregulación del sistema nervioso, así como en procesos de agregación plaquetaria y coagulación sanguínea, con el O_2 genera NO_2^{\cdot} y con el $O_2^{\cdot-}$ forma peroxinitrito ($ONOO^-$). Las NOS son capaces de generar daño oxidativo y muerte celular.

La reactividad química de los diferentes tipos de radicales es variable pero siempre elevada y de baja especificidad. La vida media biológica de los radicales libres es de no más de microsegundos, ya que puede reaccionar rápidamente con todo lo que esté a su alrededor, pudiendo provocar un gran daño a macromoléculas y a estructuras supramoleculares como las membranas (*Rendón, 2005*).

1.6.3. Daño inducido por radicales libres

Los radicales libres producidos en cantidades moderadas en los organismos pueden ser neutralizados por el propio sistema. Ante un determinado insulto oxidativo, los organismos suelen adaptarse rápidamente, en general, una agresión oxidante de baja intensidad hace que una célula pueda resistir posteriormente condiciones más oxidantes.

Sin embargo, las ROS que se producen y escapan a los sistemas de defensa, producen continuamente irremediables daños a los hidratos de carbono, al DNA, proteínas y a los lípidos.

Daño al DNA: los radicales libres pueden causar entrecruzamiento de proteínas-DNA, intercambio de cromátidas hermanas, daño estructural de la desoxirribosa-fosfato, oxidación de las bases nitrogenadas, conversión de bases, aperturas de anillos, liberación de bases, rompimiento de cadenas.

Los radicales libres y en general las agresiones oxidativas modifican las bases nitrogenadas, lo que induce mutaciones y carcinogénesis, ya sea por la pérdida de expresión o por la síntesis de una proteína alterada.

Daño a las proteínas: las ROS pueden provocar la fragmentación de proteínas, pero además existe una serie de alteraciones que pueden modificar notablemente su función, modificando con ello el metabolismo, la estructura, el transporte, los receptores, las proteínas reguladoras y los inmunorreguladores, entre otros.

Daño a los hidratos de carbono: son dañados en menor proporción que otras moléculas. Azúcares tales como glucosa, manitol o ciertos desoxiazúcares pueden reaccionar con el radical hidroxilo para producir sustancias reactivas. Así mismo, los polisacáridos pueden sufrir el ataque de los radicales, en este caso, fragmentándose en unidades más sencillas como en el caso de la despolimerización del ácido hialurónico.

Daño a los lípidos: la oxidación de los lípidos membranales provoca la pérdida de la fluidez y la integridad de las membranas. Los ácidos grasos polinsaturados de las membranas celulares y las lipoproteínas son particularmente susceptibles al ataque del radical hidroxilo $\cdot\text{OH}$, el oxígeno singulete (O_2^1) y del hidroperoxilo ($\text{HO}_2\cdot$). Con esta reacción se forma un radical lipídico que después de un rearrreglo, puede reaccionar con el oxígeno para originar el radical peroxilo ($\text{R-OO}\cdot$). Este a su vez puede reaccionar con otros ácidos grasos de la membrana, formando otros radicales lipídicos, transformándose en hidropéroxido (R-OOH).

El hidropéroxido, en presencia de varios complejos metálicos, se puede descomponer en más radicales libres, lo que provoca un fenómeno de expansión del daño y propagación de la peroxidación.

En ausencia de iones metálicos, los hidroperóxidos se pueden acumular en la membrana y con esto alterar su función. También se pueden transformar en hidrocarburos volátiles, alcoholes o aldehídos (malondialdehído, entre otros), los cuales pueden difundir lejos del lugar de origen, ocasionando daño a otras macromoléculas.

A este fenómeno se le llama lipoperoxidación y, en ausencia de algún proceso que la inhiba, puede provocar la rápida destrucción de la estructura lipídica de las membranas (*Escorza, 2009*).

El malondialdehído (MDA), un importante indicador de la peroxidación lipídica, es un aldehído bifuncional que puede reaccionar con los grupos sulfidrilo y amino de las proteínas y producir entrecruzamiento y agregación de éstas. El malondialdehído puede también unir el grupo amino de la fosfatidiletanolamina y otras moléculas de fosfatidiletanolamina, de fosfatidilserina o a proteínas. Además, puede difundir y reaccionar con las bases nitrogenadas del DNA.

Su determinación es muy simple, rápida y sensible. Este análisis se realiza por medio de la reacción con dos moléculas de ácido tiobarbitúrico (TBA), en solución ácida, formando un cromógeno rojo, medible por espectrofotometría a 532/535 nm.

Por otra parte, el TBA parece reaccionar, además, con los precursores lipídicos peroxidados del MDA y no sólo específicamente con él, es por eso que algunos autores proponen que esta técnica sea para especies reactantes con TBA.

1.7. Sistemas de defensa antioxidante

Para contrarrestar el efecto pernicioso de los radicales libres de oxígeno existen en los sistemas biológicos una gran diversidad de sustancias, de naturaleza enzimática y no enzimática, que constituyen los denominados sistemas de defensa antioxidante. Estos sistemas de defensa antioxidante funcionan muy eficientemente de forma coordinada y su misión es proteger la homeostasis celular frente a la alteración oxidativa causada por radicales libres y otras especies reactivas originadas durante el metabolismo del oxígeno.

1.7.1. Sistemas de defensa enzimáticos

Están presentes en los seres vivos y protegen de las ROS producidas durante el metabolismo. Dentro de éstos, se encuentran tres enzimas principales: la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GPx).

Superóxido dismutasa (SOD): esta enzima cataliza la dismutación del O_2^{\cdot} para producir H_2O_2 y O_2 . Su función catalítica fue descubierta por McCord y Fridovich. La velocidad de dismutación es 10^4 veces superior a la velocidad de la dismutación espontánea que se produce con pH fisiológico.

Existen varios tipos de superóxido dismutasa y se clasifican en función de los grupos prostéticos. La forma isoenzimática prevalente de las SOD es la CuZnSOD, una proteína dimérica 32 kD que se ha encontrado en casi todas las células eucarióticas. El átomo de cobre es esencial para la actividad catalítica de la enzima, mientras que el átomo de zinc le proporciona estabilidad.

Se ha encontrado otra CuZnSOD en los fluidos extracelulares. En este caso se trata de una proteína de 135 kD constituida por cuatro subunidades unidas no covalentemente.

Además de las anteriores, se ha identificado una SOD que contiene manganeso. Ésta es una proteína tetramérica de subunidades idénticas que posee un peso molecular de 88 kD y se encuentra en la mitocondria. Finalmente, se ha aislado una SOD que contiene hierro (FeSOD) en bacterias aerobias y plantas, pero no en animales.

La actividad de las SOD varía entre los tejidos. En general, se han encontrado los niveles más altos en hígado, glándulas suprarrenales, riñón y bazo. Estas enzimas se regulan en función de la oxigenación de los tejidos en los que se encuentran, la cual afecta a la síntesis de la proteína.

Catalasa (CAT): es una hemoproteína que cataliza la reducción del H_2O_2 a H_2O y O_2 . Esta enzima tiene constantes de velocidad relativamente elevadas, pero su afinidad es baja; de ahí que su papel resulte fundamental en condiciones de elevadas concentraciones de peróxido de hidrógeno. Tiene un peso molecular de 240 kD y está constituida por cuatro subunidades, cada una de las cuales contienen un grupo hemo que forma parte de su centro activo.

La mayoría de las células contienen catalasa, aunque en animales ésta abunda en el hígado, riñón y en los eritrocitos. En cuanto a su localización subcelular, la actividad catalasa de las células eucariotas se localiza fundamentalmente en los peroxisomas, orgánulos citoplasmáticos que, por otra parte, contiene muchas de las enzimas generadoras de H_2O_2 de las células aerobias.

Glutación peroxidasa (GPx): también contribuye a la eliminación del peróxido de hidrógeno pero, a diferencia de la CAT, que usa el peróxido de hidrógeno como dador de electrones, utiliza el glutati3n reducido. Existen dos formas: la selenio dependiente y la selenio independiente y, en vertebrados, se encuentran en el citosol y en las mitocondrias.

La enzima **glutati3n peroxidasa dependiente de selenio (SeGSHpx)** pertenece a la familia de las peroxidasas que cataliza la reducci3n del H_2O_2 y de hidroper3xidos orgánicos empleando el glutati3n (GSH) como cosustrato, el cual se oxida pasando a glutati3n oxidado (GSSG).

La SeGSHpx es una prote3na tetramérica de peso molecular 85 kD que contiene 4 átomos de selenio, unidos como selenociste3na, los cuales le confieren actividad catalítica. A diferencia de la catalasa, la glutati3n peroxidasa tiene una elevada afinidad por su sustrato pero baja actividad catalítica.

En cuanto a su distribuci3n en los tejidos humanos, hay una gran heterogeneidad, aunque la actividad más alta se encuentra en hígado,

La enzima **glutati3n peroxidasa no dependiente de selenio (GSHpx)** es la principal responsable de la reducci3n de los hidroper3xidos reactivos hasta sus correspondientes alcoholes. Esta enzima citos3lica, a diferencia de la SeGSHpx, no es dependiente de selenio, no metaboliza el H_2O_2 y sólo muestra especificidad por los hidroper3xidos orgánicos de bajo peso molecular.

La SeGSHpx tiene un requerimiento absoluto de GSH para funcionar. La principal enzima responsable de mantener elevada la relaci3n GSH/GSSG es la **glutati3n reductasa**. Esta enzima cataliza la reducci3n del glutati3n oxidado utilizando equivalentes redox en forma de NADPH.

Esta proteína enzimática, de peso molecular 120 kD, contiene subunidades, cada una de ellas con un grupo FAD en su centro activo. La distribución tisular de la glutatión reductasa es similar a la de la SeGSHpx (*Hernández, 2010a*).

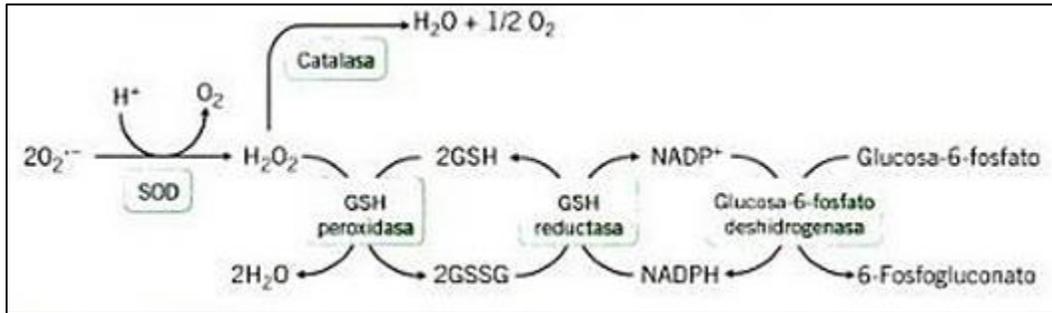


Figura 1.7.1. Sistemas enzimáticos de defensa antioxidante. GSH: glutatión; GSSG: glutatión oxidado; NADP: nicotinamida adenindinucleótico-fosfato; NADPH: nicotinamida adenindinucleótido-fosfato reducido; SOD: superóxido dismutasa (*Hernández, 2010a*).

1.7.2. Sistemas de defensa no enzimáticos

Existen dos formas de adquirir estas defensas antioxidantes, de forma endógena, es decir, que el organismo las sintetiza como en el caso del glutatión; o de manera exógena, es decir, están presentes en la dieta ingerida, sobre todo en frutas y verduras, por ejemplo, las vitaminas, resveratrol, etc. Entre sus principales características se encuentra su capacidad de neutralizar un único radical libre por molécula, sólo actúan a concentraciones elevadas, y tienen un papel despreciable frente a los anteriores.

Dentro de este grupo de secuestradores no enzimáticos se encuentran diversas proteínas y moléculas de bajo peso molecular como el glutatión, la vitamina C, vitamina E, distintos carotenoides, etc.

Glutatión (GSH): el tripéptido γ -glutamilcisteinilglicina, constituye el tior de bajo peso molecular más abundante de las células de mamíferos. Los fluidos corporales, como la bilis, el filtrado glomerular, el plasma sanguíneo y la cubierta de las células epiteliales contienen GSH.

El glutatión puede reaccionar con los radicales libres de oxígeno de diferentes maneras. Primero, mediante la acción de la glutatión peroxidasa puede reducir especies como el H_2O_2 y otros peróxidos orgánicos, oxidándose a GSSG. Segundo, puede reaccionar directamente con radicales libres como $O_2^{\bullet-}$, OH^{\bullet} y RO^{\bullet} , donando un átomo de hidrógeno (*Hernández, 2010a*).

Vitaminas (Vit): en la siguiente tabla se muestra un resumen de las defensas no enzimáticas, mostrando su papel ante el estrés oxidante.

Tabla 1.7.2. Acción y mecanismo de las sustancias antioxidantes.

Antioxidante	Acción
Vitamina A	Protección contra la oxidación de lípidos y DNA
Vitamina C	Inhibición de las especies reactivas de oxígeno. Estímulo de poder antioxidante de Vit E y selenio. Protección contra el daño causado por lipoproteínas de bajo peso.
Vitamina E	Protección contra la peroxidación de los ácidos grasos insaturados de la membrana celular y de las LDL. Convierte O ₂ y H ₂ O ₂ en formas menos reactivas.
Lycopeno	Protección contra oxidación de lípidos, LDL, proteínas y DNA. Secuestro e inactivación de radicales libres.
Polifenoles	Protección contra la oxidación de lípidos y DNA.

(Hernández, 2010a)

1.8. Resveratrol

El resveratrol (3,5,4'-trihidroestilbeno) es un polifenol que fue descubierto en 1940, cuando fue aislado de las raíces de la planta de eléboro blanco. Más tarde, en 1963 se aisló de las raíces de *Polygonum cupsidatum*, una planta utilizada en la medicina tradicional china y japonesa. Sin embargo, el primer interés en este compuesto se produjo en 1992 cuando fue postulado para explicar algunos de los efectos cardio-protectores del vino tinto y fue sugerido como un factor importante de la llamada "paradoja francesa", un término utilizado para describir la observación de que la población francesa tiene baja incidencia de enfermedades cardiovasculares, a pesar de su dieta alta en grasas saturadas (Liu et al., 2007).

En 1997, Jang y colegas reportaron el papel del resveratrol como un agente quimioprotector, por su habilidad de inhibir la carcinogénesis en múltiples estados (Jang et al., 1997).

Además de sus propiedades de quimioprotector, se han detectado propiedades anti-inflamatorias y antioxidantes. El interés en el resveratrol alcanzó su punto máximo después de 2003, cuando Howitz y colegas (Howitz et al., 2003) demostraron que el resveratrol podría ser un potente activador de SIRT1, una enzima codificada por el gen SIRT1, encargada de regular el gasto metabólico y la regulación de la longevidad.

Se han realizado distintos estudios donde se logró extender la vida de organismos inferiores como gusanos, moscas y peces de corta duración.

1.8.1. Fuentes y distribución de resveratrol en la naturaleza

El resveratrol es un potente antioxidante producido por más de 70 especies de plantas en respuesta a situaciones estresantes (radiación ultravioleta, infecciones fúngicas, etc.). Está presente en varios frutos que forman parte de la dieta humana. Tales como los arándanos, grosella, moras y cacahuets. Otro alimento rico en resveratrol es el vino tinto, el cual es el que aporta un mayor contenido de éste a la dieta mediterránea (Soleas *et al.*, 1997).

El isómero más abundante del resveratrol es el *trans*-resveratrol y, aunque también se ha identificado el *cis*-resveratrol en el vino, este no se ha encontrado en el extracto de uva, por lo que es probable que la síntesis de *cis*-resveratrol tenga lugar durante el proceso de vinificación o mediante la acción de la luz ultravioleta. En cualquier caso, el contenido en forma *trans* es mayoritario. El *cis*-resveratrol se puede obtener a partir del *trans*-resveratrol mediante la fotorreacción que se produce cuando se le somete a luz UV (Elíes-Gómez, 2009).

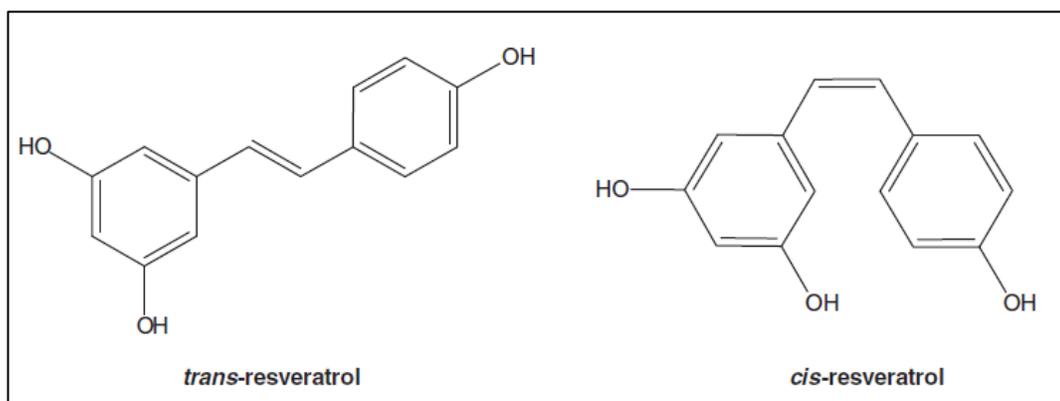


Ilustración 1.8.1. Estructura química del *trans*-resveratrol y *cis*-resveratrol.

1.8.2. Metabolismo

Estudios en humanos y animales revelan que el resveratrol es principalmente metabolizado a glucurónido y sulfatos conjugados, los cuales podrían tener alguna actividad biológica. Algunas propiedades fisicoquímicas del resveratrol están involucradas en su capacidad de ser absorbido y la función que lleva a cabo en el organismo.

Solubilidad: La estructura química del resveratrol hace que tenga poca solubilidad en agua, lo cual puede afectar la absorción. La esterificación de grupos hidroxilo con moléculas alifáticas puede ser empleada como herramienta para incrementar su absorción intestinal y permeabilidad celular, como por ejemplo, la acetilación del resveratrol aumenta su absorción e incrementa su captación celular sin perder su actividad (*Colin et al., 2009, Marel et al., 2008*).

Reacciones redox: Como muchos otros polifenoles, el resveratrol puede sufrir un proceso de autooxidación, lo cual conlleva a la producción de O_2^- y H_2O_2 y una mezcla compleja de semiquinonas y quinonas que pueden llegar a ser citotóxicas. La molécula de resveratrol oxidado puede generar complejos con el cobre capaces de fragmentar el ADN (*Hadi et al., 2010*).

Papel de los transportadores en la absorción: A nivel intestinal, el resveratrol se absorbe, o bien por difusión pasiva o formando complejos con transportadores de membrana, como las integrinas. Una vez en sangre, el resveratrol se encuentra básicamente en tres formas distintas: como glucurónido, sulfatado y libre. La forma libre puede ser transportada unida a la albumina y a lipoproteínas como la LDL (lipoproteína de baja densidad). Estos complejos, a su vez, pueden ser disociados en membranas celulares que dispongan de receptores para la albumina y LDL, dejando libre el resveratrol y permitiendo que este penetre en las células (*Delmas et al., 2011*).

Debido a las características químicas, el resveratrol es capaz de interactuar con ácidos grasos, los cuales permiten un entorno lipofílico favorable para la unión del resveratrol. Normalmente, son utilizados como vectores por su alta afinidad por el hígado y por su eficiente captación celular, resultante de interacciones específicas con transportadores transmembrana (*Urpi-Sarda et al., 2007, Urpi-Sarda et al., 2005*).

Interacciones del resveratrol con receptores celulares: La absorción del resveratrol en células de hepatoma y hepatocitos implica principalmente a la difusión pasiva, aunque también podría estar mediada por la unión a receptores.

El resveratrol es capaz de unirse a receptores de estradiol alfa y beta (ER-alfa y ER-beta) con afinidades parecidas, pero esta interacción es 7,000 veces menos potente que la correspondiente al estradiol (*Bowers, 2000*).

Metabolitos del resveratrol: Una vez que se encuentran en el torrente sanguíneo, los metabolitos pueden ser sometidos a la fase II del metabolismo con las conversiones que se producen en el hígado, donde el transporte entero-hepático en la bilis puede resultar en algunos ciclos de vuelta al intestino delgado (*Crozier et al., 2009*). Además, el resveratrol es capaz de inducir su propio metabolismo, aumentando la actividad de las enzimas hepáticas detoxificantes de la fase II (*Lancon et al., 2004*).

Posee un alto metabolismo que conduce a la producción de sulfatos, glucurónidos y hasta cinco metabolitos distintos presentes en la orina: monosulfato de resveratrol, dos formas isoméricas de monoglucurónido de resveratrol, dihidroresveratrol monosulfato y dihidroresveratrol monoglucurónido. Sin embargo, la naturaleza y la cantidad de metabolitos varían entre sujetos.

1.8.3. Biodisponibilidad y farmacocinética

Uno de los puntos clave de la efectividad del resveratrol es su biodisponibilidad. Si bien los estudios *in vitro* demuestran una alta eficacia del resveratrol en las células, hoy se sabe que su distribución en los tejidos es muy baja y, por lo tanto, podría no tener las acciones deseadas descritas en los estudios *in vitro*.

La biodisponibilidad y la farmacocinética del resveratrol han sido ampliamente estudiados tanto en seres humanos, como en animales experimentales. En los seres humanos, el resveratrol es rápidamente metabolizado encontrando un pico de concentración en suero a los treinta minutos de haber ingerido una dosis baja (*Goldberg et al., 2003*). Se ha encontrado que hasta un 70% del resveratrol ingerido puede ser biodisponible en el ser humano (*Walle et al., 2004*), basado en los niveles encontrados en el suero, en el caso de las ratas se han encontrado valores similares, hasta un 50% del resveratrol es biodisponible (*Marier et al., 2002*).

Tanto en ratas, como en seres humanos, se sugiere que el resveratrol se somete al ciclo enterohepático, donde después de ser ingerido es tomado rápidamente por los enterocitos, quienes lo metabolizan a conjugados de glucurónidos y sulfatos, los cuales son secretados de nuevo al intestino donde pueden ser desconjugados y reabsorbidos para posteriormente ser excretados en las heces (*Gambini et al., 2013*).

También hay que tener en cuenta que la presencia de grupos hidroxilo permite a los polifenoles asociarse con proteínas e hidratos de carbono, reduciendo la disponibilidad de estos macronutrientes. La solubilidad de estos compuestos va a determinar sus efectos fisiológicos. Por ello, los complejos formados que mantengan la solubilidad tendrán la capacidad de ser absorbidos en el intestino delgado, mientras que los complejos insolubles serán simplemente eliminados con las heces (*Gambini et al., 2013*).

Dos de los primeros estudios en humanos de la absorción y la biodisponibilidad del resveratrol emplearon dosis orales únicas de 25 mg, las cuales corresponden a un consumo moderado de vino tinto. Los cálculos aproximados muestran concentraciones máximas de 10 ng/mL, 0.5 a 2 h después de la dosis oral. Las estimaciones de las concentraciones plasmáticas de resveratrol más los metabolitos totales fueron considerablemente más altas, alrededor de 400 a 500 ng/mL, lo cual indica una biodisponibilidad oral muy baja para el resveratrol libre (*Goldberg et al., 2003*).

La excreción urinaria de los metabolitos totales después de una dosis radiomarcada, la absorción oral de resveratrol pareció ser, al menos, de un 75%. Lo cual también se deduce de una comparación de los datos tras las dosis orales o intravenosas. Esta absorción es inusualmente alta para un polifenol dietético. Así pues, la absorción del resveratrol es bastante eficaz, sin embargo la biodisponibilidad por los tejidos es muy poca.

1.8.4. Efectos benéficos del consumo del resveratrol

El resveratrol tiene propiedades cardioprotectoras, muchos investigadores han demostrado que el resveratrol puede prevenir o retardar la progresión de una variedad de enfermedades en modelos animales y en los seres humanos. El mecanismo de acción de este compuesto aún no ha sido descrito, ya que, es muy complejo, por lo que, ha sido de gran interés para investigadores en la rama de la biología básica, la nutrición, la farmacología y la medicina clásica.

Actualmente se sabe que el resveratrol lleva a cabo diferentes funciones en el organismo, tales como, potente antioxidante, antiinflamatorio, vasodilatador, antiagregante plaquetario, efectos antitumorales, efectos estrogénicos, anticancerígeno y antimicrobiano. También se le conocen efectos que pueden prevenir enfermedades metabólicas, como obesidad y diabetes (*Rendón, 2005*).

Efecto del resveratrol en la obesidad: Algunos estudios han sugerido que el resveratrol puede tener efectos beneficiosos en la obesidad. Por ejemplo, el resveratrol parece inhibir la proliferación de adipocitos *in vitro*, y por lo tanto puede suprimir la producción de nuevas células de grasa (Hsu, 2006). Además, el resveratrol parece inhibir la lipogénesis, así como la acumulación de lípidos en las células hepáticas humanas y adipocitos maduros (Shang et al., 2008).

Varios estudios *in vivo* proponen que el resveratrol protege contra la obesidad inducida por la dieta en modelos murinos. Por ejemplo, el aumento de peso corporal y acumulación de grasa fueron menores en ratones alimentados con una dieta alta en grasas e intervenidos con una dosis de resveratrol de 400 mg/kg/día durante 15 semanas. En estos ratones alimentados con dieta alta en grasa presentaron un silenciamiento del gen SIRT1, que es un regulador clave de la energía y la homeostasis metabólica (Lagouge et al., 2006).

Mientras que los resultados de estudios celulares sugieren que el resveratrol puede suprimir la producción de nuevas células de grasa y evitar la acumulación de grasa en las células del hígado y los adipocitos, los efectos del resveratrol en la obesidad *in vivo* han sido mucho menos claros, por lo que, es un tema que requiere de más investigación.

Efectos del resveratrol en el hígado: Específicamente en el hígado, el resveratrol regula la expresión de genes glucogénicos mediante la atenuación de la señalización de insulina y desacetilación de la FOXO1 (Park et al., 2010). El resveratrol parece que disminuye la fibrosis y promueve la regeneración de hepatocitos, lo que aumenta la supervivencia de los ratones durante la lesión hepática colestásica (Chan et al., 2011).

1.8.5. Mecanismo de acción

El mecanismo exacto a través del cual el resveratrol ejerce la amplia gama de efectos benéficos, no es claro. Al igual que en la mayoría de los otros polifenoles, el resveratrol posee una capacidad intrínseca antioxidante, sin embargo, también está implicado en la inducción de la expresión de un número de enzimas antioxidantes, probablemente ambos mecanismos contribuyen a una reducción general en el estrés oxidante.

El resveratrol interactúa con un gran número de receptores, cinasas y otras enzimas que plausiblemente podrían hacer una contribución importante a sus efectos biológicos.

Howitz y sus colegas, propusieron que el resveratrol es capaz de estimular la familia de genes SIRT1, que codifican las sirtuinas (histonas deacetilasas NAD-dependientes), y por lo tanto, poner en marcha los procesos metabólicos relacionados con la duración de la vida, que son los mismos que se desencadenan con regímenes hipocalóricos, mimetizando por ello la restricción calórica (*Howitz et al., 2003*).

El resveratrol también incrementa el gasto de energía en ratones, mediante el aumento de la activación de SIRT1, y durante condiciones de alta disponibilidad de grasa, el resveratrol es capaz de prevenir la obesidad inducida por la dieta y la aparición de enfermedades metabólicas relacionadas con la obesidad, lo que en última instancia, protege a los ratones frenando los efectos asociados con la ingesta alta en calorías (*Baur et al., 2006, Lagouge et al., 2006*).

El mecanismo molecular que subyace a estos efectos beneficiosos parecen depender del aumento inducido por el resveratrol en el contenido mitocondrial, lo que se explica por el aumento de la señalización a través del eje de la SIRT1 / PGC1 α (*Lagouge et al., 2006*).

Además varios informes demuestran que el resveratrol también puede activar la AMPK (*Baur et al., 2006*). En la actualidad se sabe que, la activación de AMPK parece ser un blanco importante de las acciones de resveratrol, proporcionando una explicación plausible para una gran parte de los beneficios para la salud observados en los informes publicados hasta la fecha.

Sin embargo, definir plenamente las acciones del resveratrol que son biológicamente relevantes es una tarea enorme, siendo más difícil definir si los efectos son directos o indirectos.

2. Planteamiento del problema

La obesidad se ha convertido en un problema de salud mundial, actualmente México ocupa el segundo lugar con una prevalencia de obesidad del 32.4% y de sobrepeso del 38.8%, estas cifras alarmantes incluyen a mujeres en edad reproductiva. Tras la concepción, estas mujeres obesas se caracterizan por tener comprometida su salud y la del producto, ya que, se ha observado que las alteraciones nutricionales de un individuo durante periodos críticos del desarrollo como la gestación y lactancia pueden modificar permanentemente su fisiología y metabolismo aumentando su predisposición a enfermedades metabólicas en la vida adulta, lo cual se conoce como programación del desarrollo.

Se ha propuesto que durante la obesidad materna gestacional existe una sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y lipoperoxidación de lípidos, el cual es acompañado con una deficiencia de los sistemas antioxidantes ocasionando estrés oxidante. Este estrés oxidante es uno de los factores relacionados con la programación del desarrollo. De acuerdo a esta problemática, se han buscado distintas medidas que permitan prevenir los efectos adversos originados por la obesidad materna.

Estudios muestran que el resveratrol es una molécula biológicamente activa, que además de poseer una gran capacidad antioxidante, tiene efectos biológicos importantes en enfermedades cardiovasculares y metabólicas, tales como la obesidad y diabetes.

3. Hipótesis

La intervención con resveratrol previa y durante la gestación en madres obesas disminuirá en su descendencia, los daños metabólicos y en el sistema antioxidante debido a la obesidad materna.

4. Objetivos

4.1. Objetivo general

Determinar en las crías de madres obesas, el efecto de la intervención materna con resveratrol en algunos parámetros metabólicos, marcadores de oxidación y actividad de enzimas antioxidantes.

4.2. Objetivos particulares

- Generar obesidad experimental en ratas hembras Wistar con una dieta alta en grasa y preñarlas con un macho control a los 120 días de edad (d)
- Administrar resveratrol (20 mg/día/kg de peso) en las hembras experimentales desde un mes previo y durante la gestación.
- Determinar el peso corporal de las ratas hembras experimentales durante su crecimiento, gestación y lactancia.
- Determinar si el resveratrol tiene un efecto en el peso corporal de la hembra experimental.
- Obtener crías de las ratas hembras experimentales.
- Determinar la ingesta de alimento de las crías durante diez días comenzando el día 100 de edad.
- Después de los 110 días de edad, obtener suero, hígado y tejido adiposo de las crías.
- Obtener un perfil lipídico de las crías de 110 d.
- Determinar lipoperoxidación en suero e hígado, cuantificando la concentración de malondialdehído (MDA).
- Determinar especies reactivas de oxígeno (ROS) en hígado.
- Determinar estrés oxidante en hígado, determinando la actividad de las enzimas superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa (GPx).
- Determinar si la intervención materna con resveratrol, tuvo beneficios en el metabolismo y estrés oxidante de la cría.

5. Diseño Experimental

Se emplearon ratas hembras (F0) de 21 d (recién destetadas), que a los 120 d fueron apareadas con un macho adulto de la misma cepa. Previamente, las ratas experimentales fueron asignadas a 4 grupos experimentales (evitando incluir hermanas en un mismo grupo) según su patrón de alimentación, ya sea con dieta Alta en Grasa (previamente preparada en el laboratorio) o con dieta Control (alimento comercial especial para roedor) a partir del destete, el cual se describe a continuación:

- **Grupo Control (C):** ratas alimentadas con dieta control desde el destete hasta el final de la lactancia de sus crías (n=8).
- **Grupo de Obesidad Materna (OM):** ratas alimentadas con dieta alta en grasa desde el destete hasta el final de la lactancia de sus crías (n=8).
- **Grupo control intervenido con resveratrol (*resVida*®, ver anexo B) previo y durante la gestación (Cres):** ratas alimentadas con dieta control desde el destete hasta el final de la lactancia de sus crías, pero que desde un mes previo y durante la gestación fueron tratadas con 20 mg/kg/día de resveratrol (n=8).
- **Grupo de obesidad materna intervenido con resveratrol previo y durante la gestación (OMres):** ratas alimentadas con dieta alta en grasa desde el destete hasta el final de la lactancia de sus crías, pero que desde un mes previo y durante la gestación fueron tratadas con 20 mg/kg/día de resveratrol (n=8).

Se obtuvieron las crías (F1) de las hembras experimentales (F0) descritas anteriormente. Las crías fueron alimentadas desde el destete (21 d) con una dieta control, identificándolas con la misma nomenclatura de grupo asignado a la madre.

El peso de las crías fue registrado desde el nacimiento hasta el final del experimento, así como también fue registrada su ingesta de alimento durante 10 días a partir del día 100. A los 110 días de vida se llevó a cabo la eutanasia, obteniendo sangre, hígado y tejido adiposo visceral y subcutáneo los cuales fueron pesados.

El método descrito anteriormente se esquematiza en la figura 5.1:

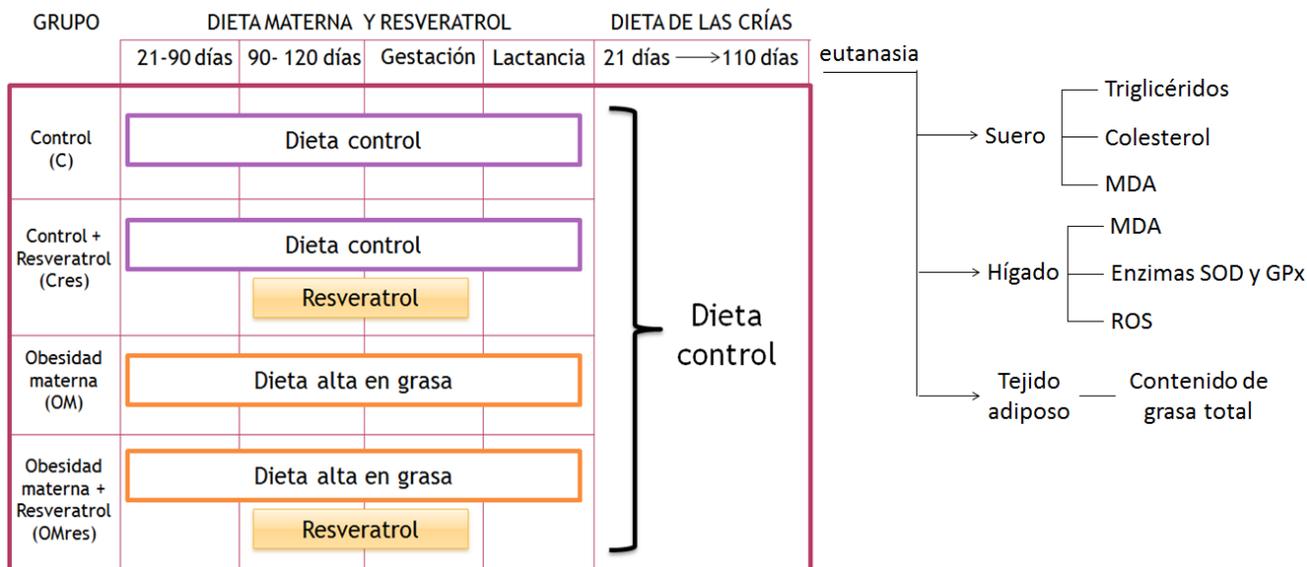


Figura 5.1. Esquema general del diseño experimental

6. Metodología

6.1. Animales experimentales

Se utilizaron ratas albinas de la cepa Wistar, provenientes de la colonia mantenida en el Departamento de Investigación Experimental y Bioterio (DIEB) del Instituto Nacional de Nutrición Salvador Zubirán (INNSZ), realizando todos los procedimientos aprobados por el Comité de Investigación de Animales (CINVA) del mismo instituto.

Durante el estudio los animales tuvieron libre acceso a la dieta y agua. Los machos empleados para el apareamiento de las hembras fueron alimentados con dieta control. Todas las ratas permanecieron en las instalaciones del bioterio del DIEB a una humedad relativa de 75% y una temperatura controlada de 22 ± 2 °C, respetando los ciclos de luz/oscuridad de 12 horas.

En grupos de 3 a 4 animales fueron alojados en cajas estándar de acrílico con una cama de aserrín de madera virgen, que era cambiada periódicamente. Los animales permanecieron de esta forma hasta el día del apareamiento, cuando fueron separadas una por cada caja.

6.2. Dieta

La dieta control consistió en alimento comercial para roedor Rodent RQ 22-2 de Zeigler®, formulada para mantenimiento, crecimiento, reproducción y lactancia de ratas y ratones

convencionales conteniendo 5% (p/p) de grasa y un contenido energético de 4 kcal/g (Tabla 6.2.1). La dieta Alta en Grasa fue preparada en la planta piloto del Departamento de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (DCyTA) del INNSZ, la cual tenía un contenido de grasa del 20% (p/p) y un contenido energético de 5 kcal/g (Tabla 6.2.1), cuya formulación fue diseñada con base a la recomendación AIN-93 del American Institute of Nutrition (*Reeves et al., 1993*), así como modificaciones hechas a esta, por la Dra. Elena Zambrano y colaboradores (*Zambrano et al., 2010b*) (Tabla 6.2.2). Para su elaboración se utilizó una mezcladora de paletas Hobart modelo A-200 de 20 L de capacidad, potencia de 1/3 HP y 1425 rpm.

Tabla 6.2.1 Composición Nutricional de las Dietas.

Nutriente	Dieta control	Dieta Alta en Grasa
	(p/p)*	(p/p)**
Proteína	22.0	23.4
Grasa***	5.0	25.0
Polisacáridos	31.0	20.3
Azúcares simples	31.0	20.3
Fibra dietética	4.0	5.0
Minerales	6.0	5.0
Vitaminas	1.0	1.0
Contenido energético	4 Kcal/g	5 Kcal/g

*Datos obtenidos del análisis garantizado de la dieta Rodent RQ 22-5 por el fabricante.

**Datos calculados a partir de la formulación (ver tabla 7.2).

*** Manteca de cerdo.

Tabla 6.2.2. Formulación de la Dieta Alta en Grasa.

Componente	Concentración (g/100g de Dieta)
Caseína	11.7
Caseinato de calcio	11.7
L- Cistina, diclorohidrato	0.3
Mezcla de minerales AIN-76	5.0
Mezcla de vitaminas AIN-93 VX	1.0
Colina, clorhidrato	0.17
α- Celulosa	5.0
Almidón de maíz	20.065
Glucosa anhidra	20.065
Aceite de soya	5.0
Manteca de cerdo	20.0

6.3. Medición de peso corporal de las hembras F0

A partir del día 21, semanalmente se registró el peso corporal de cada hembra hasta el final del experimento, es decir, al final de la lactancia de sus crías.

6.4. Intervención con resveratrol de las hembras F0

Al llegar al día 90 de edad, se inició el tratamiento con resveratrol vía oral con una dosis de 20 mg/kg de peso/día, la mitad de las hembras del grupo C (n=16) y la mitad de las hembras del grupo OM (n=16) fueron tratadas con el compuesto, el cual se preparó a la dosis indicada tomando en cuenta el peso de las ratas y usando como vehículo carboximetilcelulosa al 0.5% (*ver anexo B*). La administración con resveratrol se mantuvo durante el periodo de gestación y se suspendió al iniciar la lactancia.

6.5. Apareamiento y determinación de la preñez de las hembras F0

Cuando las hembras alcanzaron 120 d, fueron colocadas en cajas de manera individual, en la misma caja se colocó un macho sano de edad adulta de fertilidad probada a fin de que se llevara a cabo el apareamiento.

Para comprobar que se realizó el apareamiento se llevó a cabo un frotis vaginal cada 24 horas. La observación de espermatozoides se consideró como resultado positivo para el apareamiento (tomando el día del hallazgo como día cero de gestación), momento en el cual el macho fue retirado de la caja de la hembra. Las ratas negativas para esta prueba por más de cinco días consecutivos fueron descartadas del experimento. Los frotis fueron teñidos con solución de Lugol (obtenida de la Farmacia del Área de Hospitalización del INNSZ) y observados a 100x con un microscopio fotónico (*Axiostar Plus de Carl Zeiss®*).

6.6. Medición de peso corporal y determinación de ingesta de las crías (F1)

A los 21 días de edad las crías fueron destetadas y separadas de la madre, a partir de ese día fueron alimentadas con una dieta control hasta el final del experimento. Las crías fueron identificadas con el mismo nombre del grupo experimental de la madre. El peso corporal fue registrado desde los 21 d hasta los 110 d, la ingesta de alimento se cuantificó a partir del día 100 y durante 10 días consecutivos, se registró la cantidad inicial de alimento y 24 horas después se registró la cantidad de alimento final presente en el comedero.

6.7. Obtención del suero de las crías de 110 d

Cuando las crías llegaron a la edad de 110 d y después de un ayuno de 6 horas, se llevó a cabo la eutanasia por medio de decapitación rápida, con una guillotina para roedor (*Thomas Scientific*), recolectándose la sangre de la región cervical, se dejó formar el coágulo a temperatura ambiente y se centrifugó a 2000 rpm por 15 minutos (*Sorval®*, *RT7*), se recolectó el suero en tubos *Eppendorf®* de 1.5 mL. Las muestras de suero fueron conservadas a -20°C hasta su análisis.

6.8. Extracción de hígado y tejido adiposo de las crías de 110 d

Al terminar la extracción de sangre se procedió a la disección del cuerpo, se extrajo el hígado y el tejido adiposo de diferente localización anatómica incluyendo: esternón, páncreas, retro-peritoneal, ovárico y uterino (en hembras) y además del epidídimo (en machos), todos éstos fueron pesados individualmente en una balanza analítica *BP 310S de Sartorius®* (Cap. máx.= 320 g, d= 0.001 g). Después de pesar el hígado se colocó inmediatamente en nitrógeno líquido y posteriormente se guardaron a -70 °C en un ultracongelador (*Revco®*) para su análisis.

6.9. Determinación de triglicéridos y colesterol en suero de crías de 110 d

Las muestras de suero conservadas a -20 °C, fueron descongeladas a temperatura ambiente durante 15 minutos previos al análisis.

La medición de la concentración sanguínea de colesterol total, y triglicéridos, fue realizada con el sistema automatizado *SYNCHRON CX® 5 Delta* de Beckman-Coulter el cual utiliza el multicalibrador *MULTI™ SYNCHRON CX* (CV intra e inter-ensayo de <6%) diseñado para este sistema (que incluye los parámetros que nos interesan entre otros), también se analizaron las muestras de control de calidad correspondientes. Las determinaciones se llevaron a cabo con reactivos diseñados especialmente para este sistema y los parámetros antes mencionados fueron programados en el equipo, el cual básicamente realiza un análisis espectrofotométrico a partir de ensayos enzimáticos (*Ver ANEXO I*).

6.10. Homogeneización del hígado de las crías de 110 d

Se tomaron aproximadamente 0.1 g de hígado (previamente descongelado en un baño de hielo) y se colocaron en tubos de ensayo que contenían 1 mL de solución salina isotónica. Con la ayuda de un pistilo de teflón sujetado a un rotor eléctrico, se homogeneizó el tejido en un baño de hielo.

Una vez que todas las muestras de tejido estuvieron homogeneizadas, se transfirieron a tubos *Eppendorf*® de 1.5 mL colocándose en un baño de hielo.

De esta forma se tomaron alícuotas para cada determinación, el número y la cantidad de homogeneizado se ejemplifica a continuación:

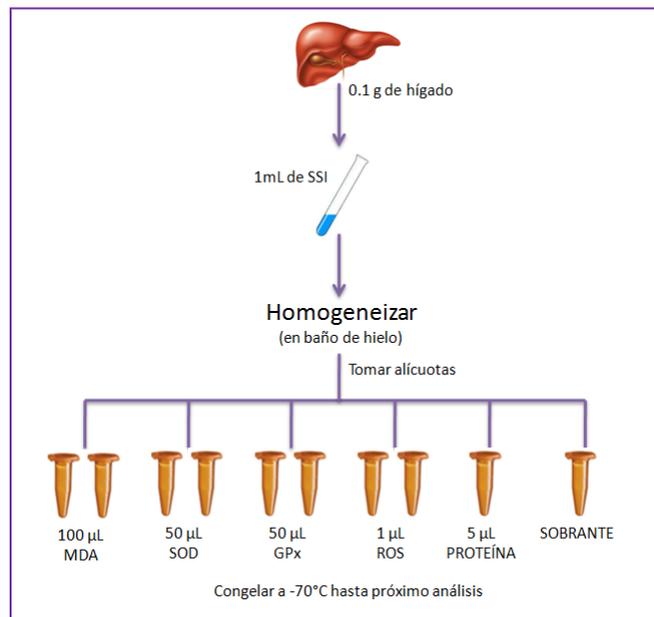


Ilustración 6.10. Toma de alícuotas para cada análisis.

Todas éstas alícuotas y el sobrante fueron inmediatamente congeladas a -70°C para su posterior análisis.

6.11. Cuantificación de proteína por Bradford en el hígado de las crías de 110 d

Preparación de la curva patrón de albúmina sérica bovina (ASB):

De la solución stock de ASB con una concentración de 1 mg/mL se tomaron 20 µL y se agregaron 80 µL de agua desionizada. Se agitó en vórtex y se pipeteó en una placa de 96 pozos la cantidad indicada en la siguiente tabla:

Tabla 6.11. Curva estándar de albúmina sérica de bovino (BSA)

Volumen de Stock de ASB (μL)	Cantidad de BSA (μg)	Reactivo Bradford (μL)	A (595 nm)
0	0	200	0.0
2	0.4	200	0.139
5	1.0	200	0.130
10	2.0	200	0.410
15	3.0	200	0.469
20	4.0	200	0.702
30	5.0	200	0.943

Preparación de la muestra:

Se descongeló la alícuota de proteína conservada a -70°C y se le agregaron $495 \mu\text{L}$ de agua desionizada mezclando bien.

Se colocaron $5 \mu\text{L}$ de la muestra diluida en una placa de 96 pozos y se agregaron $200 \mu\text{L}$ del reactivo de Bradford, preparado previamente tomando 1 volumen de reactivo de Bradford más 4 volúmenes de agua desionizada. Se incubó por 5 minutos y se leyó la absorbancia en el lector multimodal a una longitud de onda de 595 nm .

6.12. Determinación de estrés oxidante en hígado

6.12.1. Determinación de malondialdehído (MDA) en hígado y sueros de las crías de 110 d

Preparación de la mezcla de ácidos:

Se prepararon 102.4 mL de una mezcla de ácido tiobarbitúrico (TBA), ácido clorhídrico (HCl) y ácido tricloroacético (TCA), para esto:

Solución 1: Se pesaron 1.024 g de TBA y se disolvieron en 4.096 mL de HCL.

Solución 2: Se pesaron 16.38 g de TCA disolviéndose en 51.2 mL de agua desionizada.

Se mezclaron las soluciones (1) y (2) agregando 52.2 mL del volumen faltante de agua desionizada lavando el vaso que contenía el TCA, esta solución se dejó en agitación magnética.

Preparación de una solución de butilhidroxitolueno (BHT):

En un tubo eppendorf se pesaron 5 mg de BHT y se disolvieron en 800 μ L de MeOH.

Preparación de la muestra:

Los sueros e hígados fueron descongelados a temperatura ambiente 15 minutos previos al análisis. Se tomaron 100 μ L de suero (o 100 μ L del homogeneizado de hígado) y se colocaron en tubos *Eppendorf*[®] de 1.5 mL de capacidad, a cada tubo se les agregó 400 μ L de la mezcla de ácidos y se agitó en un vórtex (*Vortex-Genie*[®] 2) durante unos segundos, posteriormente se les añadieron 5 μ L de BHT y se agitó nuevamente. Todas las muestras fueron incubadas durante 30 minutos a una temperatura de 96°C en un horno de hibridación (*HYBAID*[®], *HS9320*). Es importante señalar que todo el procedimiento se realizó en un baño de hielo. Después de la incubación, las muestras fueron colocadas en hielo y al estar frías se centrifugaron a 8000 rpm, 15 minutos a 4°C en una microcentrifuga (*eppendorf*[®], *5417R*).

Al terminar la centrifugación, se transfirieron 300 μ L del sobrenadante a una placa de 96 pozos y se leyó la absorbancia ($\lambda = 532$ nm) en un lector multimodal (*Sinergy HT*, *BIOTEK*[®]).

6.12.2. Determinación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en hígado de crías de 110 d

Se requirió preparar un amortiguador TRIS-HEPES en una proporción de 18:1 y 9:1.

Preparación de la curva patrón:

Solución estándar 1: Se pesaron 4.0 mg de 2,7- Diclorofluoresceína (DFC) en un tubo eppendorf y se agregaron 0.998 mL de MeOH grado HPLC.

Solución estándar 2: A 50 mL de amortiguador 9:1 se le quitaron 500 μ L y se le agregaron 500 μ L de MeOH, mezclándose. Nuevamente se quitaron 5 μ L y agregándose 5 μ L de la solución estándar 1 y se mezcló bien.

Solución estándar 3: En un eppendorf se tomaron 100 µL de la solución estándar 2 y se agregaron 900 µL de amortiguador 9:1.

Se pipeteo en una placa de 96 pozos la cantidad indicada en la tabla 6.12.2:

Tabla 6.12.2. Volumen utilizado de solución estándar 3 y amortiguador 9:1 para la construcción de la curva patrón para determinar ROS.

Patrón/Blanco	[DFC] (ng/200 µL)	Amortiguador 9:1 (µL)	Solución estándar 3 (µL)
0	0	198	2 MeOH
1	0.16	198	2
2	0.2	195	5
3	0.4	190	10
4	0.8	180	20
5	1.6	160	40
6	2.4	140	60
7	3.2	120	80
8	4.0	100	100
9	4.8	80	120

Preparación de la muestra:

Se descongeló la alícuota de 1 µL previamente conservada a -70°C en un baño de hielo y protegiendo que no le dé la luz. Se le agregaron 149 µL de amortiguador 18:1 y se agitó en el vórtex. Todos los tubos eppendorf fueron cubiertos con papel aluminio para evitar que le diera la luz.

Preparación del 2,7- diclorofluoresceindiacetato (DFC-AC):

Solución 1: Se pesaron 4.87 mg de DFC-AC y se agregó 1 mL de MeOH (cubierto de la luz).

Solución 2: En otro tubo se tomaron 50 µL de la solución 1 y se agregaron 950 µL de MeOH (cubierto de la luz).

Solución 3: Se tomaron en un tubo de ensayo cubierto de la luz 600 µL de la solución 2 y se agregaron 5400 µL de amortiguador 18:1.

Lectura:

Se pipetearon 150 μL de la muestra en una placa de 96 pozos y se agregaron 50 μL de la solución 3. Posteriormente se llevó a cabo la incubación durante 1 hora a 37°C, haciendo lecturas cada 15 minutos a una emisión de 480 nm y una excitación de 525 nm.

6.12.3. Determinación de las enzimas antioxidantes: superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa (GPx) en hígado de crías de 110 d

La determinación de la actividad de la enzima superóxido dismutasa se llevó a cabo por medio del kit RANSOD de RANDOX® (Cat. No. SD125).

Preparación de la curva patrón:

Se realizó por diluciones seriadas, se etiquetaron 5 tubos comenzando por el (S6) que lleva 600 μL de patrón neto (solución de la enzima SOD de origen bovino a una concentración conocida de 4.15 U/mL), se tomaron 500 μL del (S6) y se coloca al tubo etiquetado como (S5) y se agregaron 500 μL de muestra diluyente (0.01 mol/L de un amortiguador de fosfato, pH 7.0) se agitó en un Vórtex, del tubo (S5) se tomaron 500 μL y se colocaron en el tubo etiquetado como (S4), agregándose 500 μL de muestra diluyente, así sucesivamente como se muestra en la tabla 6.12.3.

Tabla 6.12.3. Volumen de solución patrón y muestra diluyente para la construcción de la curva patrón para determinar SOD.

Tubo	U SOD/mL	Volumen de Solución Patrón (μL)	Volumen de muestra diluyente (μL)
S6	4.15	600	-
S5	2.08	500 (S6)	500
S4	1.04	500 (S5)	500
S3	0.52	500 (S4)	500
S2	0.16	300 (S3)	600
S1	-	-	100

Preparación de la muestra:

Se descongeló la alícuota para SOD previamente conservada a -70°C, ya descongelada, en una placa de 96 pozos, se pipetearon 300 μL de la curva patrón y 7 μL de la muestra, se

agregaron 212.5 μL del sustrato mixto que contiene Xantina y cloruro de 2-(4-yodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-fenil tetrazolio (I.N.T) y 31.3 μL de Xantina oxidasa. Se mezcló bien y se leyó la absorbancia inicial al cabo de 30 segundos (A_1 a $\lambda = 505 \text{ nm}$). Pasados 3 minutos se leyó la absorbancia final A_2 . La actividad de la SOD se midió por el grado de inhibición de esta reacción, los cálculos se muestran en el anexo E.

La determinación de la actividad de la enzima glutatión peroxidasa (GPx) se llevó a cabo por medio del kit RANSEL de RANDOX® (Cat. No. RS504).

Se descongelaron las alícuotas previamente conservadas a -70°C , se tomaron 7 μL de la muestra y se colocaron en una placa de 96 pozos, se adicionaron 250 μL de reactivo 1a que contiene el glutatión, la glutatión reductasa y el NADPH. En seguida se agregaron 10 μL de hidroperóxido de cumeno. Se mezcló y se leyó la absorbancia inicial de la muestra ($\lambda = 340 \text{ nm}$) y del reactivo blanco. Se realizaron dos lecturas al cabo de 1 y 3 minutos. Restar el valor obtenido para el blanco de la muestra.

6.13. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó por medio del análisis de varianza de una vía (ANOVA) y las diferencias entre medias se determinaron con la prueba de Tukey post hoc.

Un valor de $P < 0.05$ se consideró como significativo. Todos los valores reportados son expresados como Media \pm EE, $n=8$.

El (*) denota diferencia significativa entre grupos de diferente dieta materna pero misma intervención, (a) denota diferencia significativa entre grupos de misma dieta materna pero diferente intervención.

7. Resultados

7.1. Peso corporal de las hembras experimentales F0.

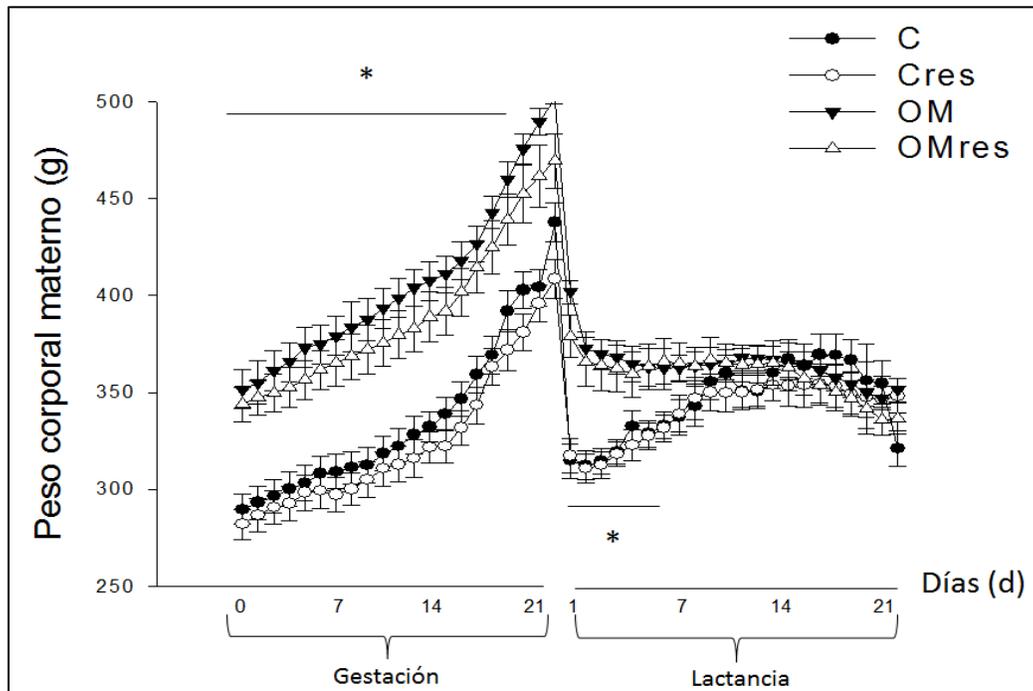


Figura 7.1. Peso corporal de las hembras experimentales (F0) durante la gestación y la lactancia. Se muestra Media \pm EE, n=8. (*) Denota diferencia significativa entre diferente dieta experimental pero misma intervención, ($p < 0.05$). C= ratas alimentadas con dieta control, Cres= ratas alimentadas con dieta control e intervenidas con resveratrol, OM= ratas alimentadas con dieta alta en grasa y OMres= ratas alimentadas con dieta alta en grasa e intervenidas con resveratrol.

En la figura 7.1. se muestra la ganancia de peso corporal de las hembras experimentales (F0). La ganancia de peso corporal a partir del día 21 en los cuatro grupos es similar (no se reportan datos). Al día 68 de edad, 47 días después de comenzar la alimentación con dieta alta en grasa, el peso corporal del grupo OM fue significativamente mayor del grupo C. Durante el periodo de gestación se observa que el peso del grupo OM es mayor con respecto al grupo C, se observa que los grupos tratados con resveratrol (Cres y OMres), también son menores con respecto a los grupos C y OM. El peso ganado durante el embarazo no fue diferente en los cuatro grupos. Al inicio del periodo de lactancia, el peso corporal del grupo OM era mayor con respecto al C, sin embargo, al terminar el periodo de lactancia el peso corporal se igualó en los cuatro grupos.

7.2. Peso corporal e ingesta de las crías (F1) a los 110 d

A los 110 d, se observa que tanto para machos como para hembras, el peso corporal, la ingesta por día y la ingesta relativa (g de alimento/100 g de peso corporal) no fue diferente entre los cuatro grupos experimentales, pero se observa que los machos tienen mayor peso corporal y mayor ingesta relativa que las hembras.

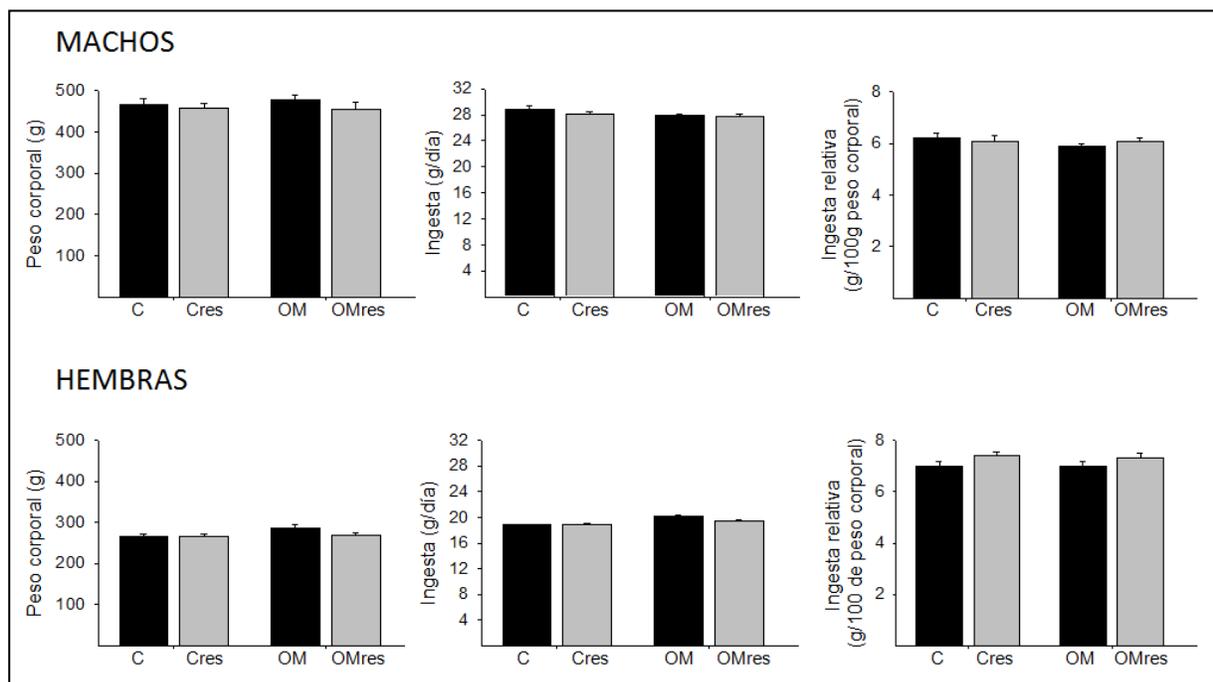


Figura 7.2. Peso corporal (g), ingesta (g/día) e ingesta relativa (g/100g de peso corporal) de las crías de ambos sexos correspondientes a los cuatro grupos experimentales. Se muestra Media \pm EE, n=8. C= crías de madres alimentadas con dieta control, Cres= crías de madres alimentadas con dieta control e intervenidas con resveratrol, OM= crías de madres alimentadas con dieta alta en grasa y OMres= crías de madres alimentadas con dieta alta en grasa e intervenidas con resveratrol.

7.3. Adiposidad y perfil lipídico de las crías de 110 d

Se realizó un perfil lipídico y se encontró que, aunque las crías de los cuatro grupos experimentales consumen la misma cantidad de alimento y tienen peso corporal similar, se observó que tanto hembras como machos del grupo OM, presenta un aumento en el contenido de grasa total, índice de adiposidad (g de grasa/100 g de peso corporal) y mayor concentración de triglicéridos en suero, con respecto al grupo C. En cambio, el grupo de obesidad materna intervenido con resveratrol (OMres) presenta una disminución en todos estos parámetros (figura 7.3.1).

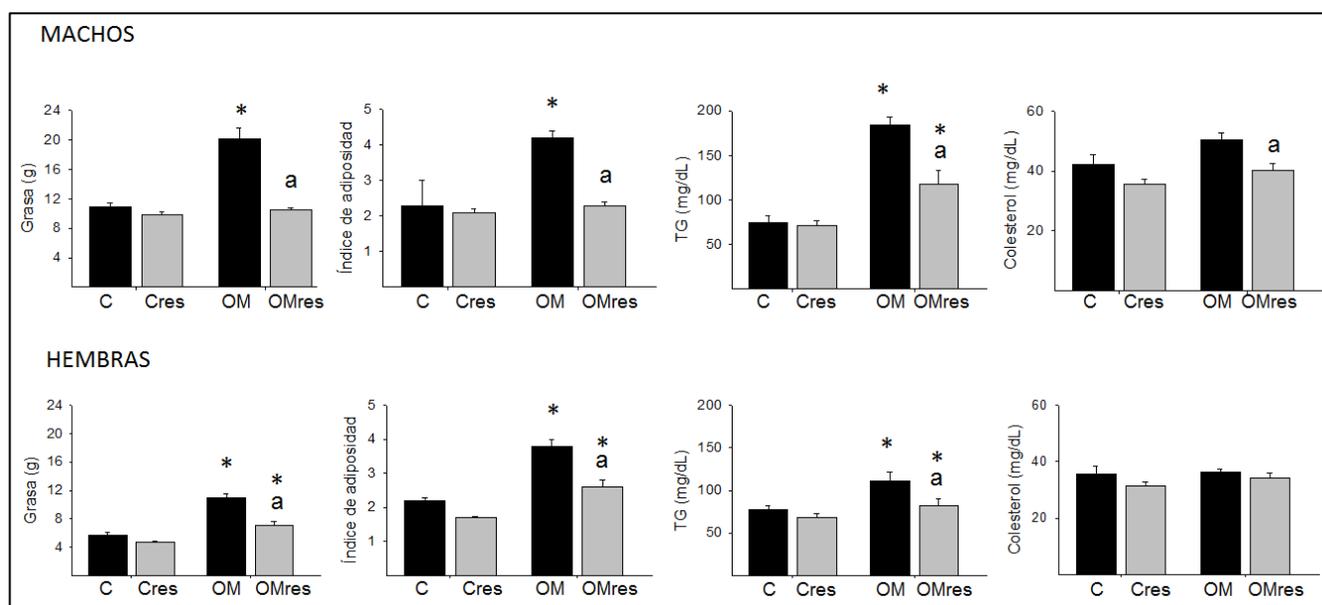


Figura 7.3.1. Adiposidad y perfil lipídico de las crías de 110 d, se reporta grasa total, índice de adiposidad, concentración de triglicéridos y colesterol en suero. Se muestra Media \pm EE, n=8. (*) Muestra diferencia significativa entre diferente dieta experimental pero misma intervención, ($p < 0.05$). (a) Muestra diferencia significativa entre misma dieta experimental pero diferente tipo de intervención. C= crías de madres alimentadas con dieta control, ($p < 0.05$). Cres= crías de madres alimentadas con dieta control e intervenidas con resveratrol, OM= crías de madres alimentadas con dieta alta en grasa y OMres= crías de madres alimentadas con dieta alta en grasa e intervenidas con resveratrol.

La distribución de grasa en las crías macho se muestra en la tabla 7.3.2.1. El tejido adiposo retroperitoneal, pancreático, esternón y epididimal son significativamente mayor en el grupo OM con respecto al grupo C, el cual se encontró disminuido en el caso del grupo OMres.

Tabla 7.3.2.1. Distribución de grasa en las crías macho.

	MACHOS			
	C	Cres	OM	OMres
T. A. Retroperitoneal (g)	5.1 \pm 0.3	4.2 \pm 0.3	10.2 \pm 0.8*	4.5 \pm 0.3 ^a
T. A. Pancreático (g)	0.9 \pm 0.1	0.8 \pm 0.1	1.3 \pm 0.2*	0.8 \pm 0.1 ^a
T. A. Esternón (g)	0.2 \pm 0.02	0.3 \pm 0.02	0.4 \pm 0.05*	0.3 \pm 0.03 ^a
T. A. Epididimal (g)	4.7 \pm 0.5	4.6 \pm 0.3	8.4 \pm 0.8*	5.1 \pm 0.1 ^a

Se muestra Media \pm EE, n=8. (*) Muestra diferencia significativa entre diferente dieta experimental pero misma intervención, ($p < 0.05$). (a) Muestra diferencia significativa entre misma dieta experimental pero misma intervención, ($p < 0.05$). C= crías de madres alimentadas con dieta control, Cres= crías de madres alimentadas con dieta control e intervenidas con resveratrol, OM= crías de madres alimentadas con dieta alta en grasa y OMres= crías de madres alimentadas con dieta alta en grasa e intervenidas con resveratrol.

La distribución de grasa en el caso de las hembras se encontró mayor el tejido retroperitoneal, esternón, grada ovárica y uterina, en el grupo OM con respecto al C, las cuales se encontraron disminuidas significativamente en el grupo OMres con respecto al grupo OM.

Tabla 7.3.2.2. Distribución de grasa en las crías hembra.

	HEMBRAS			
	C	Cres	OM	OMres
T. A. Retroperitoneal (g)	2.2 ± 0.3	1.6 ± 0.2	3.4 ± 0.2*	2.4 ± 0.3 ^a
T. A. Pancreático (g)	0.5 ± 0.1	0.4 ± 0.05	0.7 ± 0.1	0.5 ± 0.1
T. A. Esternón (g)	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.03	0.8 ± 0.5*	0.2 ± 0.03 ^a
Grasa ovárica (g)	1.7 ± 0.2	1.1 ± 0.1	3.1 ± 0.3*	2.2 ± 0.2 ^a
Grasa uterina (g)	1.2 ± 0.1	1.3 ± 0.1	3.0 ± 0.4*	1.8 ± 0.2 ^a

Se muestra Media ± EE, n=8. (*) Muestra diferencia significativa entre diferente dieta experimental pero misma intervención, (p<0.05). (a) Muestra diferencia significativa entre misma dieta experimental pero misma intervención, (p<0.05). C= crías de madres alimentadas con dieta control, Cres= crías de madres alimentadas con dieta control e intervenidas con resveratrol, OM= crías de madres alimentadas con dieta alta en grasa y OMres= crías de madres alimentadas con dieta alta en grasa e intervenidas con resveratrol.

7.4. Cuantificación de MDA en suero de crías de 110 d

El MDA en suero es un marcador de estrés general del organismo, se observa que para las crías macho hay una mayor lipoperoxidación en el grupo OM con respecto al grupo control, el cual se previno totalmente con la intervención con resveratrol en el grupo OMres. En el caso de las hembras, no hubo diferencia entre grupos de diferente dieta experimental, sin embargo, se observa que en los grupos intervenidos (Cres y OMres) disminuyó la lipoperoxidación con respecto a los controles (C y OM).

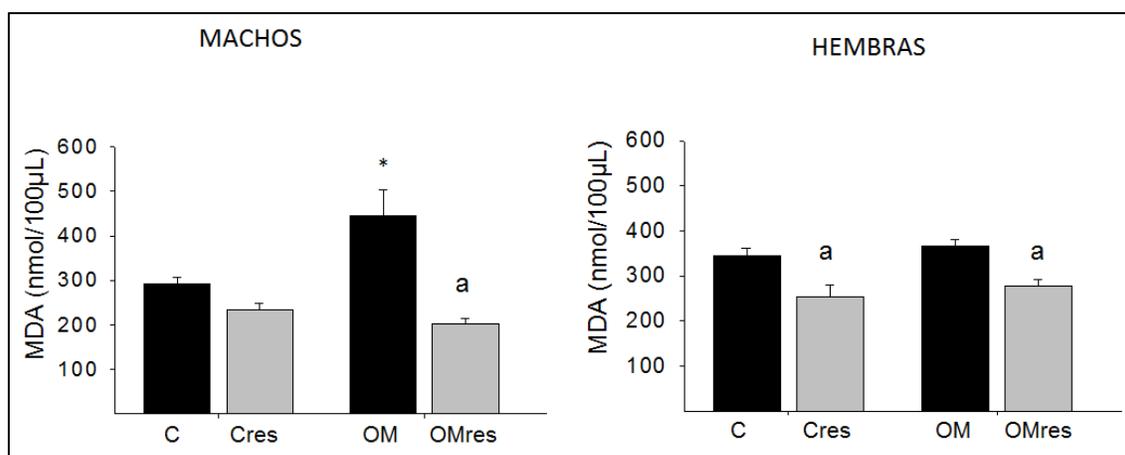


Figura 7.4. Determinación de MDA en suero de crías de 110 d. Se muestra Media ± EE, n=8. (*) Muestra diferencia significativa entre grupos de diferente alimentación materna y mismo tipo de intervención, (p<0.05). (a) Muestra diferencia significativa entre grupos de misma alimentación materna y diferente tipo de intervención, (p<0.05). C= crías de madres alimentadas con dieta control, Cres= crías de madres alimentadas con dieta control e intervenidas con resveratrol, OM= crías de madres alimentadas con dieta alta en grasa y OMres= crías de madres alimentadas con dieta alta en grasa e intervenidas con resveratrol.

7.5. Peso total y peso relativo del hígado de las crías de 110 d

Se observó que el peso del hígado de las crías macho no fue diferente en los cuatro grupos experimentales. En las crías hembra, se observa que el hígado es más grande en el grupo OM con respecto al grupo C; sin embargo, en el grupo OMres no se vio modificado con respecto al grupo OM.

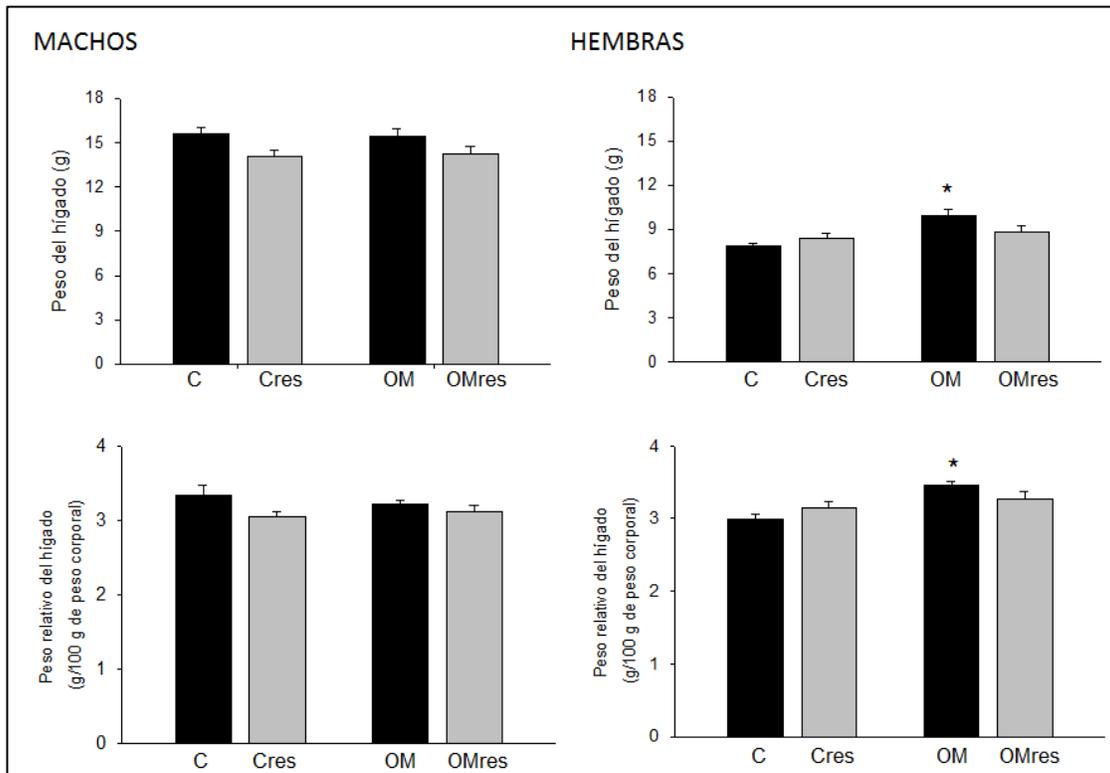


Figura 7.5. Peso del hígado y peso relativo del hígado de las crías de 110 d. Se muestra Media \pm EE, n=8. (*) Muestra diferencia significativa entre grupos de diferente alimentación materna y mismo tipo de intervención, ($p < 0.05$). C= crías de madres alimentadas con dieta control, Cres= crías de madres alimentadas con dieta control e intervenidas con resveratrol, OM= crías de madres alimentadas con dieta alta en grasa y OMres= crías de madres alimentadas con dieta alta en grasa e intervenidas con resveratrol.

7.6. Cuantificación de MDA en el hígado de las crías de 110 d

Existe una mayor lipoperoxidación en las crías hembras del grupo OM con respecto al grupo C, el grupo OMres no fue diferente con respecto al grupo OM. Para las crías macho no se encontró diferencia entre el grupo C y el grupo OM, sin embargo, se observa que el grupo OMres presentó menor lipoperoxidación con respecto al grupo OM.

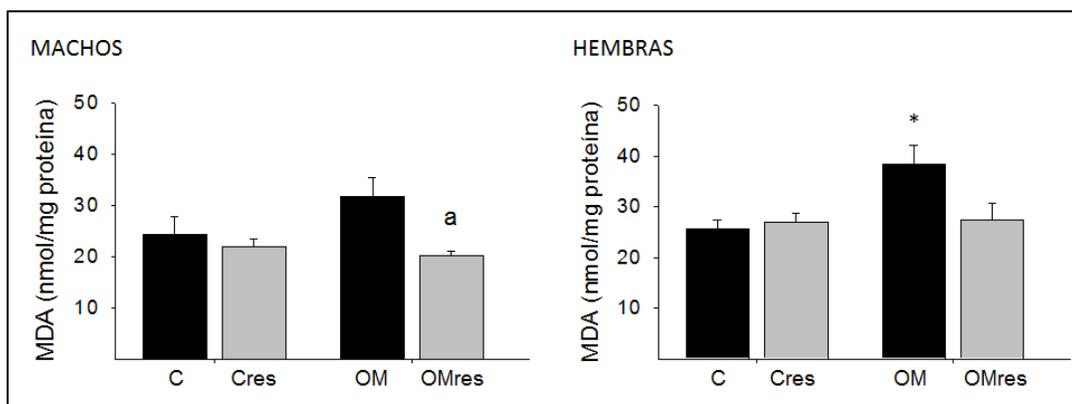


Figura 7.6. Determinación de MDA en hígado de crías de 110 d. Se muestra Media \pm EE, n=8. (*) Muestra diferencia significativa entre grupos de diferente alimentación materna y mismo tipo de intervención, ($p < 0.05$). (a) Muestra diferencia significativa entre grupos de misma alimentación materna y diferente tipo de intervención, ($p < 0.05$). C= crías de madres alimentadas con dieta control, Cres= crías de madres alimentadas con dieta control e intervenidas con resveratrol, OM= crías de madres alimentadas con dieta alta en grasa y OMres= crías de madres alimentadas con dieta alta en grasa e intervenidas con resveratrol.

7.7. Determinación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en hígado de crías de 110 d

La determinación de ROS no fue diferente en el grupo OM con respecto al grupo C, tanto en hembras como en machos. Sin embargo, se observa que en los machos del grupo OMres si se ve disminuida la concentración de ROS con respecto al grupo OM. En las hembras no fue diferente.

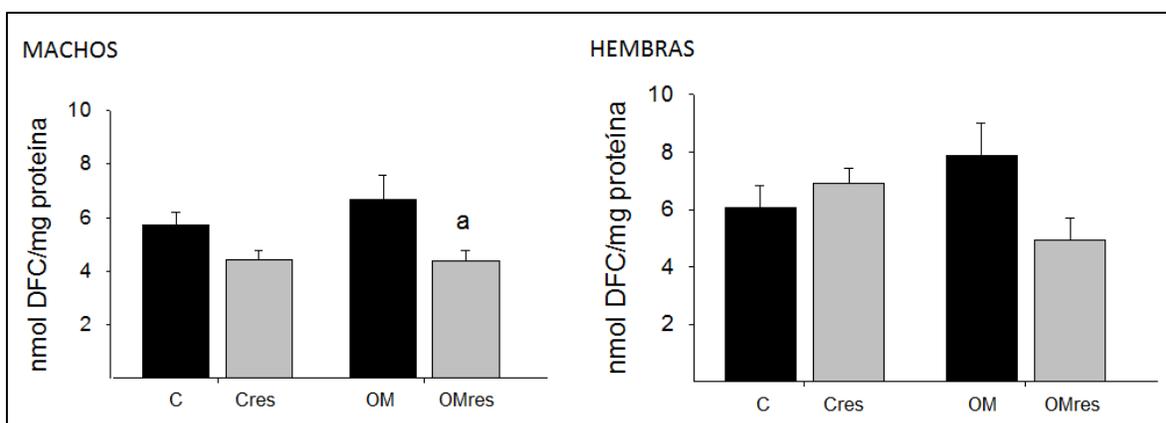


Figura 7.7. Especies reactivas de oxígeno (ROS) en hígado de crías de 110 d. Se muestra Media \pm EE, n=8. (a) Muestra diferencia significativa entre grupos de misma alimentación materna pero diferente tipo de intervención, ($p < 0.05$). C= crías de madres alimentadas con dieta control, Cres= crías de madres alimentadas con dieta control e intervenidas con resveratrol, OM= crías de madres alimentadas con dieta alta en grasa y OMres= crías de madres alimentadas con dieta alta en grasa e intervenidas con resveratrol.

7.8. Determinación de enzimas antioxidantes SOD y GPX en hígado de crías de 110 d

La actividad de las enzimas SOD y GPx se encontró modificada en las crías macho, la SOD no fue diferente en el grupo OM con respecto al grupo C, pero la actividad de la enzima se encontró disminuida en el grupo OMres con respecto al grupo OM. La actividad de la GPx

se vio aumentada en el grupo OM con respecto al grupo C, sin embargo, en el grupo OMres se observó disminuida con respecto al grupo OM. En el caso de las hembras no se modificó la actividad de las enzimas en los cuatro grupos experimentales (figura 7.8).

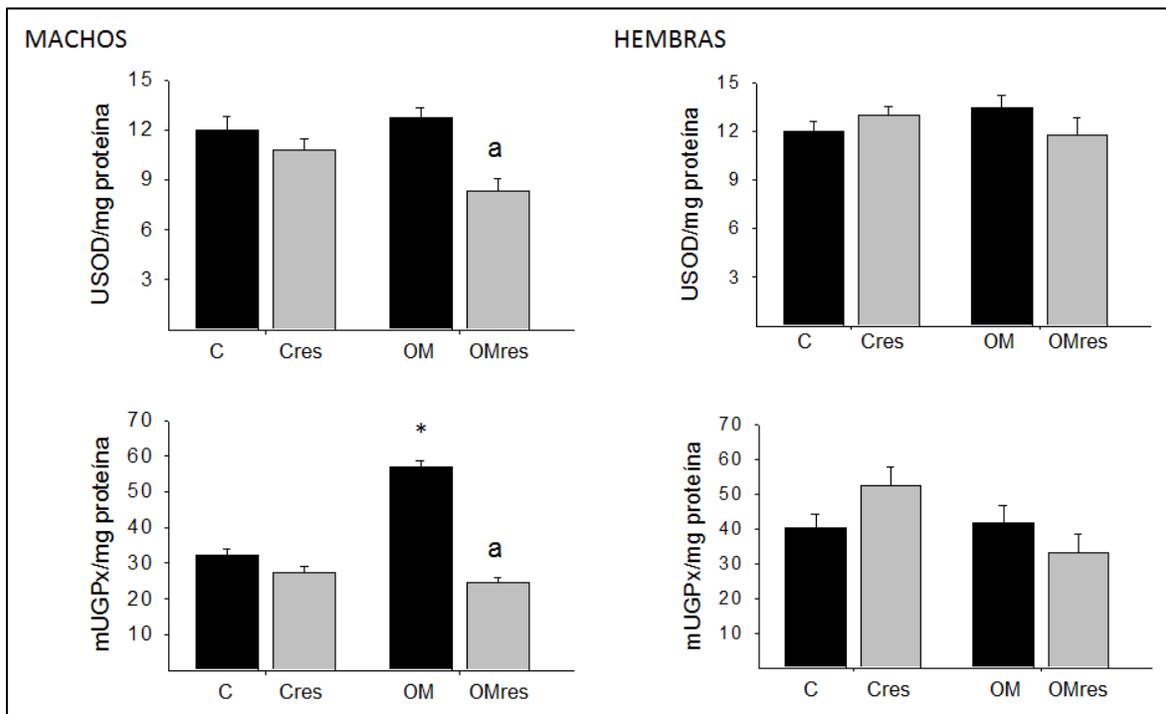


Figura 7.8. Actividad de las enzimas antioxidantes SOD y GPx en el hígado de crías de 110 d. Se muestra Media \pm EE, n=8. (*) Muestra diferencia significativa entre diferente dieta experimental pero misma intervención, ($p < 0.05$). (a) Muestra diferencia significativa entre grupos de misma alimentación materna y diferente tipo de intervención, ($p < 0.05$). C= crías de madres alimentadas con dieta control, Cres= crías de madres alimentadas con dieta control e intervenidas con resveratrol, OM= crías de madres alimentadas con dieta alta en grasa y OMres= crías de madres alimentadas con dieta alta en grasa e intervenidas con resveratrol.

8. Discusión

La obesidad es el resultado de un desequilibrio entre la ingesta de alimento y el gasto de energía, este desequilibrio a su vez, está dado por la sobrealimentación o por el alto consumo de grasa o hidratos de carbono en los alimentos. En este estudio se observó que las ratas hembras experimentales alimentadas con una dieta alta en grasa obtuvieron un aumento de peso significativo desde el día 68 de edad, con respecto al grupo control.

A los 120 d se observó que las ratas que fueron alimentadas con dieta alta en grasa (OM), son significativamente más pesadas con respecto al grupo control (C), sin embargo, se observó que al día final de la gestación, las ratas obesas que fueron intervenidas con resveratrol (OMres) pesaron significativamente menos que el grupo OM.

Este hecho puede atribuirse a que, como se mencionó, el resveratrol parece inhibir la proliferación de adipocitos *in vitro* (Hsu, 2006). Este efecto podría extrapolarse a los humanos, ya que, el resveratrol parece inhibir la lipogénesis, así como la acumulación de lípidos en las células hepáticas humanas y adipocitos maduros (Shang *et al.*, 2008).

En modelos de roedores con obesidad inducida, una alta dosis de resveratrol (400 mg/kg /d) mejora la sensibilidad a la insulina y reduce el peso corporal (Lagouge *et al.*, 2006). Sin embargo, la aplicación de una dosis más baja de resveratrol (~ 22,5 mg/kg/d) parece ser insuficiente para producir pérdida de peso, aunque mejora la tolerancia de la glucosa (Baur *et al.*, 2006).

De acuerdo a los resultados obtenidos, se observa que se logró una ganancia mayor de peso en las ratas alimentadas con dieta alta en grasa, estas ratas con obesidad inducida fueron apareadas con machos control y a los 21 días se obtuvieron las crías, de esta forma, se debe considerar que estas crías estuvieron expuestas a la obesidad materna, por lo que pueden estar afectadas, debido a una programación intrauterina.

Muchos estudios epidemiológicos y en animales experimentales han demostrado que la restricción materna de nutrientes o la sobrealimentación durante el embarazo predispone a la descendencia a una prevalencia mucho mayor de obesidad, intolerancia a la glucosa, resistencia a la insulina, hipertensión, disfunción vascular y las enfermedades del corazón

(*Bentham et al., 2010, Hales et al., 1991*). Este fenómeno se refiere a menudo como "programación fetal" (*Bouanane et al., 2010*).

Al registrar el peso de las crías al nacimiento, se observa que las crías macho de madres obesas pesan significativamente menos comparadas con el grupo control (no se muestran resultados). A diferencia de las hembras, donde las crías de los 4 grupos experimentales pesan lo mismo.

Sin embargo, en estudios pasados de nuestro grupo de trabajo, se ha demostrado que el peso corporal al nacimiento no es diferente significativamente entre grupos de diferente alimentación (*Zambrano et al., 2010a*), esto difiere en lo que se menciona en la literatura, donde hacen referencia a que el peso materno pregestacional y la ganancia de peso durante el embarazo influye directamente en el peso del producto, lo que significaría que las crías de madres obesas tendrían que ser más pesadas que las crías de madres con una dieta control (*Gil et al., 2010*). Además un bajo peso al nacer y una corta longitud del cuerpo al nacer se asocia con un elevado riesgo de obesidad, enfermedades cardiovasculares y la diabetes no dependiente de insulina en la vida adulta (*Risbridger et al., 2005*).

También es importante mencionar, que la obesidad afecta la tasa de fertilidad de las hembras, por lo que, puede que las crías de madres obesas pesen más que las crías de madres control, sin embargo, puede ser que tengan un menor número de crías.

En nuestro grupo de trabajo y otros investigadores se han demostrado los efectos de la alimentación materna en animales experimentales, las crías macho están más predispuestas a los resultados adversos resultantes de la exposición a los problemas como la mala nutrición de la madre y el estrés en la homeostasis de la glucosa y la insulina (*Zambrano et al., 2006*), así como los niveles de lípidos en la descendencia.

En diversos estudios se reporta que los descendientes de madres obesas, en la vida adulta tienen una mayor probabilidad de padecer enfermedades metabólicas como obesidad e hipertensión, resistencia a la insulina (*Samuelsson et al., 2008*), también se ha visto que niños con 11 años de edad, expuestos a obesidad materna, ya presentan síntomas del síndrome metabólico (*Boney et al., 2005*).

En los resultados obtenidos en este estudio, al llegar a la edad de 110 d, las crías de los cuatro grupos experimentales, C, Cres, OM y OMres, pesan lo mismo y su ingesta de alimento

tampoco muestra diferencia, estos datos no confirman que existan evidencias negativas que indiquen la influencia de la obesidad materna sobre el peso corporal.

Sin embargo, los resultados del contenido de grasa en los cuatro grupos experimentales si fueron diferentes, aunque las crías del grupo OM pesan y comen lo mismo, por lo que el peso no puede ser un único parámetro para evaluar el efecto materno.

En el grupo OM, tanto hembras como machos, presentan significativamente un mayor contenido de grasa con respecto al grupo C, lo que comprueba que si existe una consecuencia a la exposición de la nutrición materna. Efecto que no se observa en las crías de madres obesas que fueron intervenidas con resveratrol un mes previo y durante la gestación, ya que muestran una disminución significativa en el contenido de grasa total con respecto al grupo OM.

Para poder explicar el fenómeno antes mencionado, tenemos que considerar diferentes posibilidades. Por una parte la administración de resveratrol un mes previo a la gestación puede ayudar a mejorar los efectos adversos de la obesidad materna, y de esta forma atenuar los efectos de la programación del desarrollo de la cría, hablamos de un efecto indirecto del resveratrol. Por otra parte, la administración de resveratrol durante la gestación, puede tener un efecto directo en la cría, además del efecto materno.

Actualmente no existen estudios que demuestren si el resveratrol puede ser transmitido por la leche materna, pero de acuerdo a sus propiedades, se sabe que el resveratrol es lipofílico, la leche materna esencialmente está compuesta de grasa, por lo que es posible que se pueda encontrar resveratrol en leche materna, sin embargo, el resveratrol es rápidamente absorbido por el sistema, teniendo su pico máximo de concentración en suero de rata a los 30 minutos de haber consumido una dosis pequeña de 5 mg y se observa su pico mínimo a los 60 minutos, y en dosis muy pequeñas (0.3 mg/kg) aproximadamente el 50% de la dosis se encuentra en la orina a las 24 horas (*Soleas et al., 2001*). Por lo que es probable, que aunque pase por la leche materna, no sería posible que las crías tuvieran una fuente de resveratrol por esa vía.

En modelo experimental de ratas con hipoxia, se evaluó el efecto del tratamiento con resveratrol durante la gestación. Lo interesante de este estudio, fue que se demostró que el

resveratrol es capaz de traspasar la membrana placentaria, encontrándose una alta concentración de resveratrol en el plasma de los fetos (*Bourque et al., 2012*).

Además, en el estudio antes mencionado, se encontró que el peso de la placenta era mayor en las ratas que fueron tratadas con resveratrol y es posible que este sea un fenómeno de mal adaptación de la placenta en presencia de resveratrol, por lo cual sería interesante caracterizar los efectos del resveratrol sobre la placenta.

Con lo antes mencionado, es posible que las crías de nuestros dos grupos experimentales (Cres y OMres), puedan tener efectos tanto directos como indirectos (programación intrauterina) debido a la administración del resveratrol un mes previo y durante la gestación.

Como ya hemos comentado, la obesidad materna puede predisponer a la descendencia a padecer tanto enfermedades metabólicas (obesidad, diabetes), como enfermedades cardiovasculares (hipertensión, aterosclerosis); y una característica principal de estas enfermedades es la acumulación de grasa y el aumento en la concentración de triglicéridos en la sangre, además del aumento en el estrés oxidante (*Dong et al., 2013*).

En las figuras 7.3.1 se reporta el contenido de grasa total, índice de adiposidad y el contenido de triglicéridos en sangre en los 4 grupos experimentales. En el grupo OM, tanto en machos como en hembras, se observa que hay una acumulación de grasa significativamente mayor con respecto al grupo C, lo cual es atribuido a que las crías de madres obesas están predispuestas a la acumulación de grasa, normalmente esta acumulación es debido a la elevada ingesta de alimento, pero tomando en cuenta que las ratas de los 4 grupos experimentales comen lo mismo y que además fueron alimentadas con una dieta control desde su destete, este comportamiento es posible que se deba al efecto materno.

Observando el contenido de triglicéridos, también es mucho mayor en el grupo OM comparado con el grupo C. De tal manera, que las crías intervenidas con resveratrol tienen una disminución en estos parámetros (Cres y OMres) con respecto a su control.

Como ya se mencionó, el peso corporal de los cuatro grupos experimentales, tanto en machos como en hembras, no fue diferente, pero la acumulación de grasa sí es mayor en el grupo OM de ambos sexos. Una de las cuestiones a explicar es cómo se justifica que las crías de los 4 grupos pesen lo mismo si no contienen la misma cantidad de grasa. En la figura 7.3.2. se observa que la distribución de grasas es diferente en los 4 grupos experimentales, en el

caso de los machos del grupo OM tienen mayor cantidad de tejido adiposo retroperitoneal, epididimal y del esternón comparada con C, la cual se ve totalmente revertida en el grupo OMres. En las hembras del grupo OM se observa que tienen mayor cantidad de tejido adiposo retroperitoneal, grasa uterina y ovárica, la cual se ve disminuida en el grupo OMres.

También se puede suponer que las ratas obesas tienen menos masa muscular debido al mayor contenido de grasa, sin embargo, no se cuenta con ese dato. Aunque no se reporta, si se sabe que los órganos de las crías OM son de diferente tamaño con respecto al grupo C.

Uno de los más importantes efectos atribuidos al resveratrol es el observado en la regulación del acúmulo de triglicéridos y la regulación de la lipólisis en adipocitos murinos. Estudios realizados *in vitro* utilizando células, indican que la incubación de estas células con resveratrol, provoca una disminución de triglicéridos por un aumento de la lipólisis, aumentando la actividad de la triglicérido lipasa (*Lasa et al., 2012*).

La lipólisis es una de las vías metabólicas más importantes que regulan el peso del tejido adiposo y la obesidad. Las dos enzimas principales que catabolizan a los triglicéridos son la lipasa sensible a hormonas (HSL) y la adiposo triglicérido lipasa (ATGL) (*Jenkins et al., 2004, Villena et al., 2004, Zimmermann et al., 2004*), ambas enzimas son estimulados por la unión de catecolaminas a sus respectivos receptores β -adrenérgicos a través de eventos de fosforilación.

La fosforilación de la HSL por la proteína cinasa A (PKA) conduce a su translocación desde el citosol a la superficie de gotas de lípidos. La PKA también fosforilalaperilipina en las gotas de lípidos, lo que resulta en la estimulación de la lipólisis.

Pero además de esta vía clásica en función de la PKA, hay algunas otras vías de señalización alternativas que pueden activar la lipólisis, como por ejemplo, la vía de AMPK (cinasa activa por adenina-monofosfato). Los experimentos con adipocitos han sugerido que la AMPK inhibe la activación de HSL a través de la fosforilación. Por último, se ha propuesto que el resveratrol puede activar AMPK (*Zang et al., 2006*).

Este efecto también se puede observar en el grupo control que fue tratado con resveratrol, disminuyó su cantidad de grasa, aunque no se sabe si esto puede ser benéfico o perjudicial para la salud de los animales.

La concentración de triglicéridos, constituye el principal almacenamiento de los productos intermediarios de lípidos, suelen ser empleados como indicadores de la acumulación intracelular de lípidos. No es sorprendente que los niveles de triglicéridos están estrechamente relacionados con el peso materno y el excesivo peso fetal. La concentración elevada de lípidos puede provocar un estado de lipotoxicidad, que a su vez puede alterar el metabolismo de la glucosa y los mismos lípidos.

Por ejemplo, los ácidos grasos intracelulares (AF) y ácidos grasos de cadena larga como el Acil-CoA pueden inhibir a las enzimas hexocinasa y la glucógeno sintasa (*Ellis et al., 2000*). Por otro lado, los diacilgliceroles son capaces de interrumpir la señalización de insulina a través de la fosforilación de la proteína cinasa C dependiente de serina/treonina (*Yu et al., 2002*).

El exceso de AF o lipotoxicidad libre también pueden producir un efecto desfavorable en el desarrollo fetal. La obesidad o la exposición dietética de grasa durante el embarazo se asocian con un exceso de ácidos grasos y la acumulación de grasa ectópica en el corazón, el hígado, el páncreas y la placenta.

El consumo crónico de una dieta materna alta en grasas, independiente de la obesidad materna o la diabetes, aumentó significativamente el riesgo de enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD) en fetos primates no humanos en desarrollo, esta enfermedad persistió en el periodo postnatal. La evidencia de hígado graso no alcohólico incluye un aumento de 3 veces el contenido de triglicéridos en el hígado, la activación de varios marcadores de estrés oxidativo, y la activación prematura de genes relacionado con la gluconeogénesis (*McCurdy et al., 2009*).

Además, la presencia de lipotoxicidad puede, a su vez, activar una serie de cascadas de estrés en las células incluyendo las citocinas pro-inflamatorias y el estrés oxidante. Estos mecanismos de señalización de estrés pueden predisponer mujeres obesas que están embarazadas a la desregulación metabólica y la inflamación.

Basándonos en que las crías de madres obesas están sometidas a un ambiente oxidativo intrauterino, lo que puede repercutir en su salud, y considerando que estas crías al nacer y crecer, metabólicamente ya vienen afectadas, de acuerdo al contenido de grasa total, su

propia acumulación de grasa, en sí, también puede provocar un alto nivel de estrés. Por lo que se evaluaron los niveles de lipoperoxidación en el suero y en el hígado de las mismas.

Los resultados muestran que en el caso de los niveles de lipoperoxidación en el suero de las crías de los 4 grupos experimentales, tanto machos como hembras, si es mayor en el caso del grupo OM, pero esta diferencia no llega a ser significativa, sin embargo, los grupos Cres y OMres lograron disminuir estos niveles con respecto a su control. En el caso del hígado, se observa que las crías hembras del grupo OM presentan un mayor nivel de lipoperoxidación comparado con el grupo control, a diferencia de los machos, donde si se observa un claro aumento pero no llega a ser significativo.

El resveratrol previene los altos niveles en el suero y el hígado de especies reactivas con tiobarbitúrico (TBARS) y es probable que esté relacionado con su capacidad antioxidante y sea una defensa en estos animales. El resveratrol previene el incremento de la lipoperoxidación de los lípidos.

El contenido de grasa es muy importante, ya que, esta se ha visto implicada en la producción de especies reactivas de oxígeno. Una forma de explicar este suceso es que cuando hay un aumento en el contenido de grasa, también hay un aumento de ácidos grasos libres, los que son susceptibles a la oxidación.

La oxidación de los ácidos grasos libres en la mitocondria genera donantes de electrones como el NADPH y FADH₂, los cuales son capaces de donar electrones al oxígeno molecular y así generar superóxido, por lo que hay una sobreproducción de ROS mitocondrial (*Brownlee, 2005*).

Por otra parte, la membrana plasmática contiene NADPH oxidasa, que es una enzima que convierte el oxígeno molecular a su radical superóxido y parece estar implicada en la generación de ROS a base de nutrientes.

Los ácidos grasos libres, especialmente palmitato, pueden estimular la síntesis de diacilglicerol y activar la proteína quinasa C (PKC), que conduce a la activación de la NADPH oxidasa (*Inoguchi et al., 2000*). Por lo tanto, el aumento de la liberación de ácidos grasos de grasa acumulada, que se asocia típicamente con la sobrealimentación o la obesidad, puede activar la NADPH oxidasa en células adiposas o en otras células e inducir o agravar la producción de ROS en personas obesas o en animales experimentales.

La cantidad de especies reactivas de oxígeno obtenidas en los resultados, tanto en machos como hembras, se observa una tendencia, el grupo OM presenta una mayor cantidad de ROS, sin embargo, en ninguno de los dos casos esta diferencia es significativa.

En cambio, para los machos del grupo OMres se observa una disminución en las ROS comparado con el grupo OM, y el en grupo Cres se observa la misma tendencia comparado con su grupo control. Esto podría explicarse, con evidencia en diversas investigaciones donde se han citado los posibles roles y efectos protectores del resveratrol contra ciertas formas de daño oxidante, a través de la donación de electrones de sus grupos hidroxilo. Las consecuencias de este hecho es la capacidad de secuestrar ROS, lo que provoca un efecto protector contra el daño al ADN y la peroxidación de lípidos de la membrana celular (*Leonard et al., 2003*). En las hembras se observa la misma tendencia, sin embargo, esta diferencia no es significativa.

Es importante mencionar que una creciente evidencia del incremento del estrés oxidante, está involucrado en la patogenia de muchas enfermedades cardiovasculares y en el síndrome metabólico (*Roberts, 2009*).

El estrés oxidante, puede ocurrir a consecuencia de un desbalance entre la producción de radicales libres y la capacidad de los sistemas de defensa antioxidantes, induciendo el daño celular y la desregulada producción de adipocitocinas que contribuyen a la obesidad asociada a la resistencia a la insulina, hipertensión, dislipidemia y esteatosis hepática (*Otani, 2011*).

El organismo produce antioxidantes de forma natural, tales como las enzimas catalasa, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, entre otras, y sustancias que también llevan a cabo un papel antioxidante, como el glutatión y el ácido úrico. Todas estas sustancias forman parte del sistema de defensa que actúa contra una excesiva producción de ROS, que da lugar a un incremento en el estrés oxidante y un desbalance redox.

De tal manera, que evaluamos el comportamiento de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa. Estudios han comprobado un decremento de la actividad de estas enzimas en el tejido adiposo de individuos obesos (*Furukawa et al., 2004, Okuno et al., 2008, Okuno et al., 2010*).

La obesidad ha sido relacionada con la modificación de la actividad de las principales enzimas antioxidantes. Así, algunas investigaciones con humanos han propuesto que en el

inicio del desarrollo de la obesidad en la población infantil tiene lugar un aumento de la actividad de la superóxido dismutasa (SOD) para intentar combatir el aumento en la formación de radicales libres producida por algunas complicaciones asociadas (*Erdeve et al., 2004*). No obstante lo anterior, otros datos publicados recientemente han comprobado que una vez establecida la obesidad se produce una disminución tanto de la actividad como de la expresión de ambas isoformas de la SOD.

Tomando en cuenta, que a la edad de las ratas a la que se realizaron los experimentos equivale a la vida pre-adulta y sabiendo que ya se tenía una acumulación considerable de grasa, los resultados obtenidos pueden deberse a lo antes mencionado. La actividad de la SOD en las ratas obesas, tanto en machos como en hembras con respecto al grupo control, no fue diferente, lo que podría explicarse con lo anterior, sin embargo, en investigaciones futuras se podría evaluar la actividad de la SOD a diferentes etapas de la vida, para comprobar si la actividad de la SOD cambia de acuerdo al aumento de peso, contenido de grasa y el establecimiento de la obesidad como tal.

En cambio, la actividad de la SOD en los machos del grupo OMres si fue significativamente diferente, si retomamos, uno de los papeles fundamentales del resveratrol, es su gran capacidad antioxidante, no obstante no hay mucha información que reporte el efecto que ejerce el resveratrol sobre la actividad de las enzimas, sin embargo, el resveratrol podría disminuir la actividad de estas enzimas, ya que, el resveratrol en primera instancia ayudaría a combatir el exceso en la producción de ROS.

Finalmente, Furukawa, et al. estudiaron la actividad de SOD, GPx y CAT en modelos animales de obesidad (ratón KKAy), ratificando la disminución tanto en la actividad como en la expresión de estas enzimas en el tejido adiposo blanco en el grupo de animales obesos (*Furukawa et al., 2004*).

Sin embargo, los resultados obtenidos con respecto a la actividad de la GPx en los machos, no concuerda con lo reportado en el estudio anterior. Se observa que los machos del grupo OM tiene una mayor actividad con respecto al grupo C, que esto también podría deberse a un estado de adaptación a la obesidad. En cambio, para el grupo OMres disminuyó la actividad de esta enzima. Para las hembras no se observaron cambios en la actividad de la enzima GPx.

Aunque se obtuvieron resultados con tendencias similares entre machos y hembras de los 4 grupos experimentales, los efectos de la obesidad y el estrés, no se muestra que sea igual en ambos casos. Se observa que los machos son más susceptibles a sufrir las consecuencias de la obesidad y la programación materna, de acuerdo a lo mencionado por *Zambrano et al, 2010*.

Lo antes mencionado se puede observar en los resultados obtenidos donde los machos presentaron un mayor índice de estrés oxidante, lo cual se vio reflejado tanto en la cantidad de ROS como en la modificación en la actividad de las enzimas.

Estos efectos diferentes que se observan entre machos y hembras, pueden deberse al dimorfismo sexual, lo cual indica que los daños provocados por una programación materna en la descendencia, se da de la misma manera entre machos y hembras.

La actividad del resveratrol se debe a distintas propiedades biológicas que posee, tales como: su capacidad de unirse a diferentes receptores como el de los estrógenos como un fitoestrógeno, su capacidad de unirse a otras moléculas o aniones como el cobre, su capacidad antioxidante, etc.

En los resultados obtenidos hemos observado que el daño oxidativo se ve con menos intensidad en las hembras y en los machos se observa un mayor daño.

Se debe de tener en cuenta, que las hormonas juegan un papel importante. Los estrógenos *per se*, son antioxidantes (*Thibodeau et al., 2002*), ya que poseen un anillo fenol, el cual puede actuar como un barredor de radicales libres y, a la vez, le permite donar un átomo de H⁺. Esta propiedad le posibilita al estrógeno intervenir en diferentes etapas de la oxidación lipídica. Eso podría explicar por qué existe una menor cantidad de ROS, la cual no fue distinta en los 4 grupos experimentales.

Los estrógenos no solo participan como antioxidantes *per se*, sino que también pueden modificar los niveles y capacidades de los mecanismos oxidativos y antioxidantes del cuerpo. *Strehlow*, logró mostrar que el estradiol disminuía la producción de radicales libres inducido por la angiotensina II en cultivos celulares de musculo liso (*Strehlow et al., 2003*).

Wassmann concluyó que el estradiol aumenta la transcripción, expresión y actividad de MnSOD y de SOD extracelular, sin afectar los niveles o la actividad de la Cu-ZnSOD, GSH-PX

ni catalasa (*Wassmann et al., 2005*), lo cual puede explicar que tanto las ROS como la actividad de las enzimas no se modificaran en las hembras, como se observa en los machos.

Además, el resveratrol además de ser un fitoestrógeno, se sabe que el resveratrol actúa bifuncionalmente, esto quiere decir que, actúa como un antioxidante y actúa activando vías que regulan la actividad de las enzimas.

Por otra parte, los grupos intervenidos con resveratrol, lograron disminuir tanto contenido de grasa, concentración de triglicéridos en sangre, lipoperoxidación en suero e hígado, cantidad de ROS, como la actividad de las enzimas SOD y GPX.

Aunque actualmente el mecanismo de acción del resveratrol no está bien caracterizado, se supone que el resveratrol actúa a nivel genético e involucra la activación de una familia de enzimas llamadas Sirtuinas.

Una gran cantidad de datos indica que la activación de la SIRT1 es crucial para los efectos del resveratrol sobre la obesidad (*Lagouge et al., 2006*). Una vez que la SIRT1 se activa, induce genes de la gluconeogénesis y la producción hepática de glucosa por PGC-1 α , el cual es un receptor regulador de la biogénesis mitocondrial y el metabolismo energético celular en el músculo e hígado (*Rodgers et al., 2005*).

Lee et al. proporcionó evidencia adicional que apoya la importancia de la activación de SIRT1 en el mecanismo de acción del resveratrol. Revelaron que la sobreexpresión de SIRT1 previno completamente la citotoxicidad mediada por citocinas, la producción de NO y la expresión iNOS (*Lee et al., 2009*).

La activación de SIRT1 no es el único mecanismo propuesto por el cual el resveratrol ejerce su efecto de restricción de calorías. Recientemente, se informó de la AMPK actúa como un interruptor de energía que subyace a los efectos metabólicos del resveratrol. Varios grupos de investigación informaron que el tratamiento con resveratrol podría inducir un aumento sustancial en la fosforilación de la AMPK, tanto in vitro como in vivo (*Baur et al., 2006, Shang et al., 2008*), así como en ratas Zucker obesas (*Rivera et al., 2009*). Lo más importante, fue que el resveratrol aumentó la tasa metabólica y la reducción del contenido de grasa en los ratones normales, pero no en ratones knock-out para la AMPK, proporcionando una evidencia directa de que el efecto beneficioso metabólico del resveratrol está mediado a través de la señalización de AMPK (*Um et al., 2010*).

Estos efectos se vieron reflejados en los resultados obtenidos en este trabajo experimental, logrando disminuir las consecuencias de la obesidad materna en las crías que pudieron ser programadas negativamente. Es importante mencionar que aún no se sabe a ciencia cierta, la forma en que el resveratrol actúa dentro del organismo, sin embargo, se deben tener ciertas consideraciones de por qué se observan los cambios en los parámetros evaluados en el presente trabajo.

Se sabe que la nutrición materna afecta directamente el desarrollo del feto, también se sabe que la obesidad materna proporciona un ambiente estresante para las crías, lo cual provoca una susceptibilidad del feto a sufrir daños en su información genética, por lo cual podría activar o silenciar ciertos genes que pueden afectar irreversiblemente al producto. Una de las posibilidades de mecanismo de acción del resveratrol, es que éste, actúe silenciando genes o activando otros que puedan revertir el daño inducido por la obesidad materna.

Aunque las propiedades del resveratrol han sido altamente estudiadas en la actualidad, falta mucha investigación por delante que avale que efectivamente el resveratrol tiene estos efectos benéficos en la salud. Para que posteriormente toda esta información se pueda extrapolar a la vida cotidiana humana y pueda ser utilizada como un posible método de prevención.

9. Conclusión

La obesidad materna provoca resultados adversos en la descendencia, por lo que la intervención materna con resveratrol mejora el ambiente metabólico y oxidante en la madre.

La intervención materna con resveratrol disminuye totalmente los daños metabólicos en las crías, previniendo la acumulación excesiva de grasa y triglicéridos en las crías.

10. Referencias

- AGUILAR, C. M. J., E. GONZÁLEZ JIMÉNEZ, C.J. GARCÍA GARCÍA, P.A. GARCÍA LÓPEZ, J. ÁLVAREZ FERRE, C.A. PADILLA LÓPEZ ET AL. 2011. *Obesidad de una población de escolares de Granada : evaluación de la eficacia de una intervención educativa*, NutrHosp.
- ALFARADHI, M. Z., OZANNE, S. E. 2011. Developmental programming in response to maternal overnutrition. *Front Genet*, 2, 27.
- ARORA, S. 2006. Role of neuropeptides in appetite regulation and obesity--a review. *Neuropeptides*, 40, 375-401.
- BAUR, J. A., PEARSON, K. J., PRICE, N. L., JAMIESON, H. A., LERIN, C., KALRA, A., PRABHU, V. V., ALLARD, J. S., LOPEZ-LLUCH, G., LEWIS, K., PISTELL, P. J., POOSALA, S., BECKER, K. G., BOSS, O., GWINN, D., WANG, M. Y., RAMASWAMY, S., FISHBEIN, K. W., SPENCER, R. G., LAKATTA, E. G., LE COUTEUR, D., SHAW, R. J., NAVAS, P., PUIGSERVER, P., INGRAM, D. K., DE CABO, R. & SINCLAIR, D. A. 2006. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature*, 444, 337-342.
- BECK, B., BURLET, A., NICOLAS, J. P. & BURLET, C. 1990. Hyperphagia in Obesity Is Associated with a Central Peptidergic Dysregulation in Rats. *Journal of Nutrition*, 120, 806-811.
- BELLIDO, G. D., ROMÁN, L. 2006. *Manual de nutrición y metabolismo*, Madrid, Díaz de Santos.
- BENTHAM, J., MICHELL, A. C., LOCKSTONE, H., ANDREW, D., SCHNEIDER, J. E., BROWN, N. A. & BHATTACHARYA, S. 2010. Maternal high-fat diet interacts with embryonic Cited2 genotype to reduce Pitx2c expression and enhance penetrance of left-right patterning defects. *Hum Mol Genet*, 19, 3394-401.
- BONEY, C. M., VERMA, A., TUCKER, R. & VOHR, B. R. 2005. Metabolic syndrome in childhood: association with birth weight, maternal obesity, and gestational diabetes mellitus. *Pediatrics*, 115, e290-6.
- BOUANANE, S., MERZOUK, H., BENKALFAT, N. B., SOULIMANE, N., MERZOUK, S. A., GRESTI, J., TESSIER, C. & NARCE, M. 2010. Hepatic and very low-density lipoprotein fatty acids in obese offspring of overfed dams. *Metabolism*, 59, 1701-9.
- BOURQUE, S. L., DOLINSKY, V. W., DYCK, J. R. & DAVIDGE, S. T. 2012. Maternal resveratrol treatment during pregnancy improves adverse fetal outcomes in a rat model of severe hypoxia. *Placenta*, 33, 449-52.
- BOWERS, J. L., TYULMENKOV, V. V., JERNIGAN, S. C., KLINGE, C. M. 2000. Resveratrol acts as a mixed agonist/antagonist for estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology*, 141, 3657-3667.
- BROWNLEE, M. 2005. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes*, 54, 1615-25.
- COLIN, D., GIMAZANE, A., LIZARD, G., IZARD, J. C., SOLARY, E., LATRUFFE, N. & DELMAS, D. 2009. Effects of resveratrol analogs on cell cycle progression, cell cycle associated proteins and 5fluoro-uracil sensitivity in human derived colon cancer cells. *Int J Cancer*, 124, 2780-8.
- CROZIER, A., JAGANATH, I. B. & CLIFFORD, M. N. 2009. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Nat Prod Rep*, 26, 1001-1043.
- CHAN, C. C., CHENG, L. Y., LIN, C. L., HUANG, Y. H., LIN, H. C. & LEE, F. Y. 2011. The protective role of natural phytoalexin resveratrol on inflammation, fibrosis and regeneration in cholestatic liver injury. *Mol Nutr Food Res*, 55, 1841-1849.
- DELMAS, D., AIRES, V., LIMAGNE, E., DUTARTRE, P., MAZUE, F., GHIRINGHELLI, F. & LATRUFFE, N. 2011. Transport, stability, and biological activity of resveratrol. *Ann N Y Acad Sci*, 1215, 48-59.
- DONG, M., ZHENG, Q., FORD, S. P., NATHANIELSZ, P. W. & REN, J. 2013. Maternal obesity, lipotoxicity and cardiovascular diseases in offspring. *J Mol Cell Cardiol*, 55, 111-6.
- ELÍES-GÓMEZ, J. 2009. Efectos de los isómeros del resveratrol sobre la homeostasis del calcio y del óxido nítrico en células vasculares. *Servicio de Publicaciones e Intercambio Científico* Santiago de Compostela.
- ELLIS, B. A., POYNTEN, A., LOWY, A. J., FURLER, S. M., CHISHOLM, D. J., KRAEGEN, E. W. & COONEY, G. J. 2000. Long-chain acyl-CoA esters as indicators of lipid metabolism and insulin sensitivity in rat and human muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 279, E554-60.
- ERDEVE, O., SIKLAR, Z., KOCATURK, P. A., DALLAR, Y. & KAVAS, G. O. 2004. Antioxidant superoxide dismutase activity in obese children. *Biol Trace Elem Res*, 98, 219-28.

- ESCORZA, M. A. Q. 2009. La capacidad antioxidante total. Bases y aplicaciones. *REB* 28(3): 89-101.
- FORSEN, T., ERIKSSON, J. G., TUOMILEHTO, J., TERAMO, K., OSMOND, C. & BARKER, D. J. 1997. Mother's weight in pregnancy and coronary heart disease in a cohort of Finnish men: follow up study. *BMJ*, 315, 837-40.
- FURUKAWA, S., FUJITA, T., SHIMABUKURO, M., IWAKI, M., YAMADA, Y., NAKAJIMA, Y., NAKAYAMA, O., MAKISHIMA, M., MATSUDA, M. & SHIMOMURA, I. 2004. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *Journal of Clinical Investigation*, 114, 1752-61.
- GAMBINI, J., LOPEZ-GRUESO, R., OLASO-GONZALEZ, G., INGLES, M., ABDELAZID, K., EL ALAMI, M., BONET-COSTA, V., BORRAS, C. & VINA, J. 2013. [Resveratrol: distribution, properties and perspectives]. *Rev Esp Geriatr Gerontol*, 48, 79-88.
- GIL, Á., SÁNCHEZ DE MEDINA CONTRERAS, F., RUIZ LÓPEZ, M. D., MALDONADO LOZANO, J., MARTÍNEZ DE VICTORIA MUÑOZ, E., PLANAS VILÁ, M. & SOCIEDAD ESPAÑOLA DE NUTRICIÓN PARENTERAL Y ENTERAL 2010. *Tratado de nutrición*, Madrid etc., Médica Panamericana.
- GOLDBERG, D. M., YAN, J. & SOLEAS, G. J. 2003. Absorption of three wine-related polyphenols in three different matrices by healthy subjects. *Clin Biochem*, 36, 79-87.
- HADI, S. M., ULLAH, M. F., AZMI, A. S., AHMAD, A., SHAMIM, U., ZUBAIR, H. & KHAN, H. Y. 2010. Resveratrol mobilizes endogenous copper in human peripheral lymphocytes leading to oxidative DNA breakage: a putative mechanism for chemoprevention of cancer. *Pharm Res*, 27, 979-88.
- HALES, C. N., BARKER, D. J., CLARK, P. M., COX, L. J., FALL, C., OSMOND, C. & WINTER, P. D. 1991. Fetal and infant growth and impaired glucose tolerance at age 64. *BMJ*, 303, 1019-22.
- HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J. 2007. *Free radicals in biology and medicine*, Oxford, Oxford University Press.
- HERNÁNDEZ, A. G. 2010a. *Tratado de Nutrición. Tomo I Bases Fisiológicas y bioquímicas de la nutrición*, Madrid, España, Editorial Médica Panamericana.
- HERNÁNDEZ, A. G. 2010b. *Tratado de Nutrición. Tomo IV Nutrición Clínica* Madrid, España Ed. Médica Panamericana.
- HERNÁNDEZ, B. 1996. Sobrepeso en ujeres de 12 a 49 años y niños menores de 5 años en México. *Salud Publica De Mexico*, 38(3), 178-188.
- HOWITZ, K. T., BITTERMAN, K. J., COHEN, H. Y., LAMMING, D. W., LAVU, S., WOOD, J. G., ZIPKIN, R. E., CHUNG, P., KISIELEWSKI, A., ZHANG, L. L., SCHERER, B. & SINCLAIR, D. A. 2003. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature*, 425, 191-6.
- HSU, C. L., YEN, G. C. 2006. Induction of cell apoptosis in 3T3-L1 pre-adipocytes by flavonoids is associated with their antioxidant activity. *Mol Nutr Food Res*, 50, 1072-1079.
- [HTTP://WWW.FMVUBA.ORG.AR/GRADO/MEDICINA/CICLO BIOMEDICO/SEGUNDO A%3%B10/BIOQUIMICA/S_EMINARIO13/SEM13FILE3.PDF](http://www.fmvuba.org.ar/grado/medicina/ciclo_biomedico/segundo_a%3%B10/bioquimica/s_eminario13/sem13file3.pdf) (15 ABRIL 2013, P.
- HUDA, S. S., BRODIE, L. E. & SATTAR, N. 2010. Obesity in pregnancy: prevalence and metabolic consequences. *Semin Fetal Neonatal Med*, 15, 70-6.
- INOUCHI, T., LI, P., UMEDA, F., YU, H. Y., KAKIMOTO, M., IMAMURA, M., AOKI, T., ETOH, T., HASHIMOTO, T., NARUSE, M., SANO, H., UTSUMI, H. & NAWATA, H. 2000. High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C--dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. *Diabetes*, 49, 1939-45.
- JANG, M., CAI, L., UDEANI, G. O., SLOWING, K. V., THOMAS, C. F., BEECHER, C. W., FONG, H. H., FARNSWORTH, N. R., KINGHORN, A. D., MEHTA, R. G., MOON, R. C. & PEZZUTO, J. M. 1997. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science*, 275, 218-20.
- JENKINS, C. M., MANCUSO, D. J., YAN, W., SIMS, H. F., GIBSON, B. & GROSS, R. W. 2004. Identification, cloning, expression, and purification of three novel human calcium-independent phospholipase A2 family members possessing triacylglycerol lipase and acylglycerol transacylase activities. *J Biol Chem*, 279, 48968-75.
- JUONALA, M., MAGNUSSEN, C. G., BERENSON, G. S., VENN, A., BURNS, T. L., SABIN, M. A., SRINIVASAN, S. R., DANIELS, S. R., DAVIS, P. H., CHEN, W., SUN, C., CHEUNG, M., VIKKARI, J. S. A., DWYER, T. & RAITAKARI, O. T. 2011. Childhood Adiposity, Adult Adiposity, and Cardiovascular Risk Factors. *New England Journal of Medicine*, 365, 1876-1885.

- KIM, E. M., O'HARE, E., GRACE, M. K., WELCH, C. C., BILLINGTON, C. J. & LEVINE, A. S. 2000. ARC POMC mRNA and PVN alpha-MSH are lower in obese relative to lean Zucker rats. *Brain Research*, 862, 11-6.
- KONIGSBERG, F. M. 2008. *Radicales Libres Y Estrés Oxidativo. Aplicaciones Médicas*.
- LAGOUGE, M., ARGMANN, C., GERHART-HINES, Z., MEZIANE, H., LERIN, C., DAUSSIN, F., MESSADEQ, N., MILNE, J., LAMBERT, P., ELLIOTT, P., GENY, B., LAAKSO, M., PUIGSERVER, P. & AUWERX, J. 2006. Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1 alpha. *Cell*, 127, 1109-1122.
- LANCON, A., DELMAS, D., OSMAN, H., THENOT, J. P., JANNIN, B. & LATRUFFE, N. 2004. Human hepatic cell uptake of resveratrol: involvement of both passive diffusion and carrier-mediated process. *Biochem Biophys Res Commun*, 316, 1132-1137.
- LASA, A., SCHWEIGER, M., KOTZBECK, P., CHURRUCA, I., SIMON, E., ZECHNER, R. & PORTILLO, M. P. 2012. Resveratrol regulates lipolysis via adipose triglyceride lipase. *J Nutr Biochem*, 23, 379-84.
- LEE, J. H., SONG, M. Y., SONG, E. K., KIM, E. K., MOON, W. S., HAN, M. K., PARK, J. W., KWON, K. B. & PARK, B. H. 2009. Overexpression of SIRT1 protects pancreatic beta-cells against cytokine toxicity by suppressing the nuclear factor-kappaB signaling pathway. *Diabetes*, 58, 344-51.
- LEONARD, S. S., XIA, C., JIANG, B. H., STINEFELT, B., KLANDORF, H., HARRIS, G. K. & SHI, X. 2003. Resveratrol scavenges reactive oxygen species and effects radical-induced cellular responses. *Biochem Biophys Res Commun*, 309, 1017-26.
- LIU, B. L., ZHANG, X., ZHANG, W. & ZHEN, H. N. 2007. New enlightenment of French Paradox: resveratrol's potential for cancer chemoprevention and anti-cancer therapy. *Cancer Biol Ther*, 6, 1833-6.
- MAHAN, L. K., ESCOTT-STUMP, S. & KRAUSE, M. 2009. *Krause dietoterapia*, Barcelona etc., Elsevier Masson.
- MAREL, A. K., LIZARD, G., IZARD, J. C., LATRUFFE, N. & DELMAS, D. 2008. Inhibitory effects of trans-resveratrol analogs molecules on the proliferation and the cell cycle progression of human colon tumoral cells. *Mol Nutr Food Res*, 52, 538-48.
- MARIER, J. F., VACHON, P., GRITSAS, A., ZHANG, J., MOREAU, J. P. & DUCHARME, M. P. 2002. Metabolism and disposition of resveratrol in rats: extent of absorption, glucuronidation, and enterohepatic recirculation evidenced by a linked-rat model. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 302, 369-73.
- MCCURDY, C. E., BISHOP, J. M., WILLIAMS, S. M., GRAYSON, B. E., SMITH, M. S., FRIEDMAN, J. E. & GROVE, K. L. 2009. Maternal high-fat diet triggers lipotoxicity in the fetal livers of nonhuman primates. *Journal of Clinical Investigation*, 119, 323-335.
- OKUNO, Y., MATSUDA, M., KOBAYASHI, H., MORITA, K., SUZUKI, E., FUKUHARA, A., KOMURO, R., SHIMABUKURO, M. & SHIMOMURA, I. 2008. Adipose expression of catalase is regulated via a novel remote PPARgamma-responsive region. *Biochem Biophys Res Commun*, 366, 698-704.
- OKUNO, Y., MATSUDA, M., MIYATA, Y., FUKUHARA, A., KOMURO, R., SHIMABUKURO, M. & SHIMOMURA, I. 2010. Human catalase gene is regulated by peroxisome proliferator activated receptor-gamma through a response element distinct from that of mouse. *Endocr J*, 57, 303-9.
- OTANI, H. 2011. Oxidative stress as pathogenesis of cardiovascular risk associated with metabolic syndrome. *Antioxid Redox Signal*, 15, 1911-26.
- PARK, J. M., KIM, T. H., BAE, J. S., KIM, M. Y., KIM, K. S. & AHN, Y. H. 2010. Role of resveratrol in FOXO1-mediated gluconeogenic gene expression in the liver. *Biochem Biophys Res Commun*, 403, 329-334.
- PASTOR, M. R. T. A. 2009. *Obesidad: problemas y soluciones*, San Vicente, España, EDUCA.
- RADAELLI, T., VARASTEHPOUR, A., CATALANO, P. & HAUGUEL-DE MOUZON, S. 2003. Gestational diabetes induces placental genes for chronic stress and inflammatory pathways. *Diabetes*, 52, 2951-8.
- REEVES, P. G., NIELSEN, F. H. & FAHEY, G. C. 1993. 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. *Journal of Nutrition*, 123, 1939-1951.
- RENDÓN, A. 2005. *Tesis de Doctorado: El daño oxidativo y la respuesta antioxidante durante la intoxicación con plomo en una población expuesta y los efectos del tratamiento con antioxidantes*. Instituto Politécnico Nacional

- RISBRIDGER, G. P., DRUMMOND, A. E. & WLODEK, M. 2005. Reproduction, development, and the early origins of adult disease. *Cell Tissue Res*, 322, 3.
- RIVERA, L., MORON, R., ZARZUELO, A. & GALISTEO, M. 2009. Long-term resveratrol administration reduces metabolic disturbances and lowers blood pressure in obese Zucker rats. *Biochem Pharmacol*, 77, 1053-63.
- ROBERTS, C. K., SINDHU, K. K. 2009. Oxidative stress and metabolic syndrome. *Life Sciences*, 84, 705-12.
- RODGERS, J. T., LERIN, C., HAAS, W., GYGI, S. P., SPIEGELMAN, B. M. & PUIGSERVER, P. 2005. Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1 α and SIRT1. *Nature*, 434, 113-8.
- SAMUELSSON, A. M., MATTHEWS, P. A., ARGENTON, M., CHRISTIE, M. R., MCCONNELL, J. M., JANSEN, E. H., PIERSMA, A. H., OZANNE, S. E., TWINN, D. F., REMACLE, C., ROWLERSON, A., POSTON, L. & TAYLOR, P. D. 2008. Diet-induced obesity in female mice leads to offspring hyperphagia, adiposity, hypertension, and insulin resistance: a novel murine model of developmental programming. *Hypertension*, 51, 383-92.
- SHANG, J., CHEN, L. L., XIAO, F. X., SUN, H., DING, H. C. & XIAO, H. 2008. Resveratrol improves non-alcoholic fatty liver disease by activating AMP-activated protein kinase. *Acta Pharmacologica Sinica*, 29, 698-706.
- SOLEAS, G. J., ANGELINI, M., GRASS, L., DIAMANDIS, E. P. & GOLDBERG, D. M. 2001. Absorption of trans-resveratrol in rats. *Methods Enzymol*, 335, 145-54.
- SOLEAS, G. J., DIAMANDIS, E. P. & GOLDBERG, D. M. 1997. Resveratrol: a molecule whose time has come? And gone? *Clin Biochem*, 30, 91-113.
- STREHLOW, K., ROTTER, S., WASSMANN, S., ADAM, O., GROHE, C., LAUFS, K., BOHM, M. & NICKENIG, G. 2003. Modulation of antioxidant enzyme expression and function by estrogen. *Circ Res*, 93, 170-7.
- THIBODEAU, P. A., KACHADOURIAN, R., LEMAY, R., BISSON, M., DAY, B. J. & PAQUETTE, B. 2002. In vitro pro- and antioxidant properties of estrogens. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 81, 227-36.
- TORRES, W. H. 2002. *Biología de las especies reactivas de oxígeno.*, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., Mensaje Bioquímico
- TOUNIAN, P. 2011. Programming towards childhood obesity. *Ann Nutr Metab*, 58 Suppl 2, 30-41.
- UM, J. H., PARK, S. J., KANG, H., YANG, S., FORETZ, M., MCBURNEY, M. W., KIM, M. K., VIOLLET, B. & CHUNG, J. H. 2010. AMP-activated protein kinase-deficient mice are resistant to the metabolic effects of resveratrol. *Diabetes*, 59, 554-63.
- URAKAWA, H., KATSUKI, A., SUMIDA, Y., GABAZZA, E. C., MURASHIMA, S., MORIOKA, K., MARUYAMA, N., KITAGAWA, N., TANAKA, T., HORI, Y., NAKATANI, K., YANO, Y. & ADACHI, Y. 2003. Oxidative stress is associated with adiposity and insulin resistance in men. *J Clin Endocrinol Metab*, 88, 4673-6.
- URPI-SARDA, M., JAUREGUI, O., LAMUELA-RAVENTOS, R. M., JAEGER, W., MIKSITS, M., COVAS, M. I. & ANDRES-LACUEVA, C. 2005. Uptake of diet resveratrol into the human low-density lipoprotein. Identification and quantification of resveratrol metabolites by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 77, 3149-55.
- URPI-SARDA, M., ZAMORA-ROS, R., LAMUELA-RAVENTOS, R., CHERUBINI, A., JAUREGUI, O., DE LA TORRE, R., COVAS, M. I., ESTRUCH, R., JAEGER, W. & ANDRES-LACUEVA, C. 2007. HPLC-tandem mass spectrometric method to characterize resveratrol metabolism in humans. *Clin Chem*, 53, 292-9.
- VALKO, M., LEIBFRITZ, D., MONCOL, J., CRONIN, M. T. D., MAZUR, M. & TELSER, J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39, 44-84.
- VILLENA, J. A., ROY, S., SARKADI-NAGY, E., KIM, K. H. & SUL, H. S. 2004. Desnutrin, an adipocyte gene encoding a novel patatin domain-containing protein, is induced by fasting and glucocorticoids: ectopic expression of desnutrin increases triglyceride hydrolysis. *J Biol Chem*, 279, 47066-75.
- WALLE, T., HSIEH, F., DELEGGE, M. H., OATIS, J. E., JR. & WALLE, U. K. 2004. High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. *Drug Metab Dispos*, 32, 1377-82.
- WASSMANN, K., WASSMANN, S. & NICKENIG, G. 2005. Progesterone antagonizes the vasoprotective effect of estrogen on antioxidant enzyme expression and function. *Circ Res*, 97, 1046-54.
- WATKINS, M. L., RASMUSSEN, S. A., HONEIN, M. A., BOTTO, L. D. & MOORE, C. A. 2003. Maternal obesity and risk for birth defects. *Pediatrics*, 111, 1152-8.

- WILDING, J. P., GILBEY, S. G., BAILEY, C. J., BATT, R. A., WILLIAMS, G., GHATEI, M. A. & BLOOM, S. R. 1993. Increased neuropeptide-Y messenger ribonucleic acid (mRNA) and decreased neurotensin mRNA in the hypothalamus of the obese (ob/ob) mouse. *Endocrinology*, 132, 1939-44.
- WINTERBOURN, C. C. 2008. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. *Nat Chem Biol*, 4, 278-86.
- YU, C. L., CHEN, Y., CLINE, G. W., ZHANG, D. Y., ZONG, H. H., WANG, Y. L., BERGERON, R., KIM, J. K., CUSHMAN, S. W., COONEY, G. J., ATCHESON, B., WHITE, M. F., KRAEGEN, E. W. & SHULMAN, G. I. 2002. Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1)-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity in muscle. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 50230-50236.
- ZAMBRANO, E., BAUTISTA, C. J., DEAS, M., MARTINEZ-SAMAYOA, P. M., GONZALEZ-ZAMORANO, M., LEDESMA, H., MORALES, J., LARREA, F. & NATHANIELSZ, P. W. 2006. 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*, 571, 221-30.
- ZAMBRANO, E., MARTINEZ-SAMAYOA, P. M., RODRIGUEZ-GONZALEZ, G. L. & NATHANIELSZ, P. W. 2010a. Dietary intervention prior to pregnancy reverses metabolic programming in male offspring of obese rats. *J Physiol*, 588, 1791-9.
- ZAMBRANO, E., MARTINEZ-SAMAYOA, P. M., RODRIGUEZ-GONZALEZ, G. L. & NATHANIELSZ, P. W. 2010b. Dietary intervention prior to pregnancy reverses metabolic programming in male offspring of obese rats. *Journal of Physiology-London*, 588, 1791-1799.
- ZANG, M., XU, S., MAITLAND-TOOLAN, K. A., ZUCCOLLO, A., HOU, X., JIANG, B., WIERZBICKI, M., VERBEUREN, T. J. & COHEN, R. A. 2006. Polyphenols stimulate AMP-activated protein kinase, lower lipids, and inhibit accelerated atherosclerosis in diabetic LDL receptor-deficient mice. *Diabetes*, 55, 2180-91.
- ZIMMERMANN, R., STRAUSS, J. G., HAEMMERLE, G., SCHOISWOHL, G., BIRNER-GRUENBERGER, R., RIEDERER, M., LASS, A., NEUBERGER, G., EISENHABER, F., HERMETTER, A. & ZECHNER, R. 2004. Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. *Science*, 306, 1383-6.

ANEXO I. Cuantificación de triglicéridos y colesterol por medio de SYNCHRON CX® 5

I.1. Triglicéridos

Para esta determinación se utiliza el reactivo GPO (ref.: 445850), mediante un método de punto final a tiempo fijo el Sistema dispensa automáticamente los volúmenes en proporción de 1 parte de muestra por cada 100 partes de reactivo.

El reactivo se compone de: lipasa 68 U/L, ATP 2,56 mM, glicerol cinasa (GK) 4 KUI/L, glicerofosfato oxidasa (GPO) 1,1 KUI/L, 4-AAP 0,71 mM, ácido 3,5-dicloro- 2-hidroxibenzeno sulfónico (DHBS) 1,56 mM, peróxidasa de rábano (HPO) 9 KUI/L, además de otras sustancias no reactivas necesarias para el funcionamiento óptimo del sistema.

Los triglicéridos de la muestra por la adición del reactivo son hidrolizados a glicerol y ácidos grasos libres por medio de la lipasa.

Se da así una secuencia de tres pasos enzimáticos justamente, por la GK, el glicerol se transforma en glicerol-3-fosfato, y este por acción de la GPO se transforma en dihidroxiacetona y H_2O_2 y así la HPO causa el acoplamiento oxidante a partir del peróxido de hidrógeno generado junto con el DHBS y la 4-AAP forman un colorante rojo de quinoneína (Figura I.3).

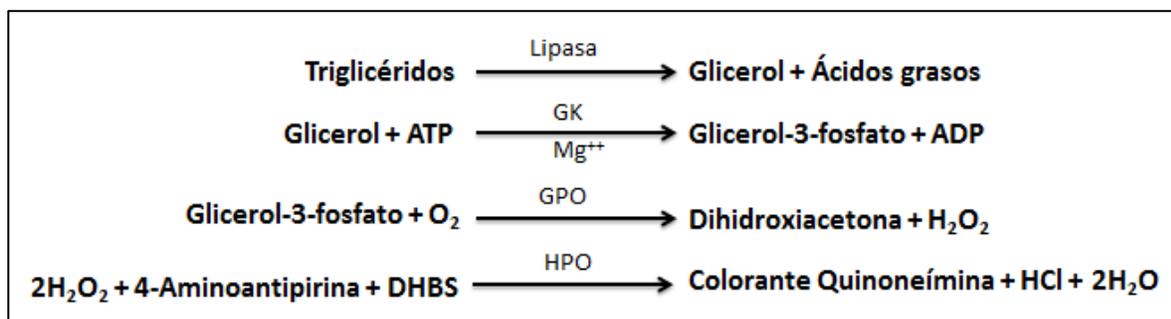


Figura I.1. Reacciones empleadas para la cuantificación de triglicéridos.

I.2. Colesterol

Se utiliza un método de punto final a tiempo fijo empleando el reactivo CHOL (No. Ref.: 467825) el cual se compone de 4-aminoatirpirina (4-AAP) 0.28 mM, fenol 8,06 mM, colesterol esterasa (CE) 211 UI/L, colesterol oxidasa (CO) 216 UI/L, peróxidasa 6667 UI/L, además de otras sustancias no reactivas necesarias para el funcionamiento óptimo del sistema. El

SYNCHRON CX® dispensa en forma automática los volúmenes apropiados de muestra y reactivo en una cubeta, en proporción de 1 parte de muestra a 100 partes de reactivo.

En las reacciones efectuadas (Figural.2) en el equipo la CE hidroliza los ésteres de colesterol a colesterol libre y ácidos grasos, el colesterol libre es oxidado a colestén-3-ona y peróxido de hidrógeno por medio de la CO, la peroxidasa cataliza la reacción del peróxido de hidrógeno con 4-AAP y fenol produciendo quinoneína, un producto de color.

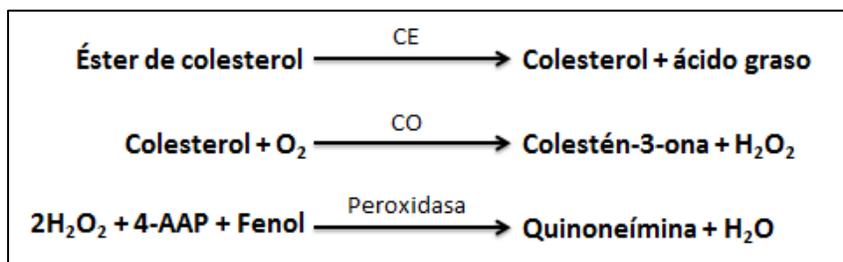


Figura I.2.. Reacciones empleadas para la determinación de colesterol en suero.

Así, el sistema determina el cambio de absorbancia a $\lambda=582$ nm, ya que este es proporcional a la cantidad de colesterol en la muestra, de este modo el sistema puede calcular y expresar la concentración de colesterol en mg/dL.

Tanto la concentración de triglicéridos y colesterol es dada automáticamente por el equipo expresadas en mg/dL.

ANEXO II. Especificaciones del Resveratrol (resVida®)

Extracto de Resveratrol 100% puro, presentación en 300 cápsulas que contienen 400 mg.

Ingredientes: Maltodextrina, celulosa microcristalina, *trans*-resveratrol, estearato de magnesio, carbonato de calcio, dióxido de silicio y talco.

Tabla II. Información nutricional del Resveratrol (resVida®) utilizado para este estudio.

INFORMACIÓN NUTRIMENTAL		
Tamaño de la porción: 1 cápsula de 400 mg		
Porciones por envase: 30		
Cantidad	Por 100g	Por porción
Contenido energético	296.24 kcal	1.185 kcal
	1239.46 Kj	4.74Kj
Proteínas	0.0 g	0.0 g
Grasas (lípidos)	0.0 g	0.0 g
de las cuales grasas saturadas	0.0 g	0.0 g
Carbohidratos	46.46 g	185.84 mg
de los cuales azúcares	0.0 g	0.0 g
Fibra dietética	27.6 g	110.4 mg
Sodio	0.0 g	0.0 g
Calcio	1.2 g	0.048 g
Trans-Resveratrol	7.5 g	30 mg

Este producto es elaborado en México por *Grupo Rostenberg S.A. de C.V.* y hecho en México para *Vitalix de México S.A. de C.V.*

Dosis diaria: 20 mg/kg/día usando como vehículo una solución de carboximetilcelulosa al 0.5%.

ANEXO III. Cuantificación de proteínas por el método de Bradford

Fundamento: consiste en la unión del colorante azul de Coomasie G-250 con las proteínas. El colorante azul de Coomasie existe en dos formas, una que es de color rojo y otra que es de color azul. La forma roja se convierte en azul tras la unión del colorante con la proteína. El complejo proteína-colorante tiene un alto coeficiente de extinción lo que conduce a una gran sensibilidad en la medición de la proteína. La unión del colorante a la proteína es un proceso muy rápido de aproximadamente dos minutos y el complejo puede permanecer disperso en solución durante un tiempo relativamente largo (aproximadamente 1 h), lo que hace el procedimiento muy rápido y no requiere de tiempo crucial para el ensayo. Esta unión provoca un desplazamiento en el máximo de absorción del colorante de 465 a 595 nm, lo que se monitoriza es el aumento de la absorbancia a 595 nm.

La determinación del contenido proteico de una muestra requiere la comparación del valor de absorbancia de la muestra con los obtenidos a partir de cantidades conocidas de proteínas, con los que se construye una curva de calibración: a mayor cantidad de proteínas, mayor color desarrollado y por lo tanto, mayor absorbancia. Recordar que esta proporcionalidad es sólo lineal hasta un cierto límite de concentración.

Para construir la curva de calibración se requiere contar con un solución testigo de proteína de concentración conocida (generalmente se utiliza albúmina sérica bovina o inmunoglobulina G). Se preparan por lo menos 4 tubos testigos con distintas cantidades de proteínas y otro tubo denominado blanco (en el cual el volumen de la solución de proteínas se reemplaza por agua). En forma simultánea, se procesan las muestras incógnitas. Luego se agrega la misma cantidad del reactivo de Bradford a cada tubo (dado que en definitiva se compara el color desarrollado evidenciado por la absorbancia de la solución en cada tubo, sus volúmenes finales deben ser iguales).

Cálculos: $y = mx + b$; donde:

$y =$ absorbancia

$x =$ concentración de proteína ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)

$$\text{Concentración de proteína} \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right) = \frac{\text{Absorbancia} - b}{m} \times \text{Factor de dilución} \left(\frac{100\mu\text{L}}{5\mu\text{L}} \right)$$

(http://www.fmvuba.org.ar/grado/medicina/ciclo_biomedico/segundo_a%C3%B1o/bioquimica/Seminario13/Sem13file3.pdf (15 abril 2013)).

ANEXO IV. Determinación de malondialdehído (MDA)

El malondialdehído (MDA) es uno de los muchos productos finales de bajo peso molecular procedente de la descomposición de productos primarios y secundarios de la peroxidación de lípidos. Para la determinación de MDA se utiliza la reacción con ácido tiobarbitúrico, que a un bajo pH y altas temperaturas, el MDA participa en una adición nucleofílica con el ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), generando un compuesto rojo, fluorescente, en una proporción de 1:2 MDA:TBA. Este compuesto absorbe a 530 nm. Es importante tomar en cuenta que el ensayo de TBA no es específico para MDA y puede reaccionar con dialdehídos y pirimidinas que producen espectros de absorbancia similares. Por lo tanto, se puede decir que se miden especies reactantes con el ácido tiobarbitúrico.

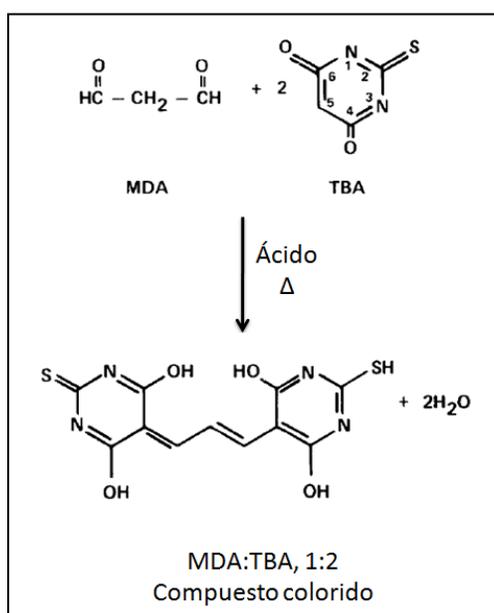


Figura IV. Formación del compuesto colorido entre el MDA y TBA a través de un mecanismo de adición nucleofílica catalizada por ácido. La formación del compuesto en ácido, es probablemente iniciada en el carbono 5 del TBA y el carbono 1 del MDA, seguido por una reacción de deshidratación y posteriormente la intervención de la segunda molécula de TBA.

Las especies reactantes con el ácido tiobarbitúrico se cuantificaron utilizando el coeficiente de extinción molar del MDA que corresponde a $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ y los resultados se expresan como nmoles/mg de proteína en caso del hígado y nmoles en caso del suero.

ANEXO V. Determinación de enzimas antioxidantes: Superóxido dismutasa (SOD) y Glutación peroxidasa (GPx)

V.1. Superóxido dismutasa

La función de la superóxido dismutasa (SOD) es acelerar la dismutación de un radical tóxico, el radical superóxido (O_2^-), producido durante un proceso oxidativo energético, en peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular.

Este método emplea Xantina y Xantin oxidasa (XOD) para formar radicales superóxido, los cuales reaccionan con cloruro de 2-(4-yodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazolio (I.N.T) para formar un colorante formazán rojo.

Se mide la actividad de la superóxido dismutasa por el grado de inhibición de esta reacción (*Kit RANDOX®*)

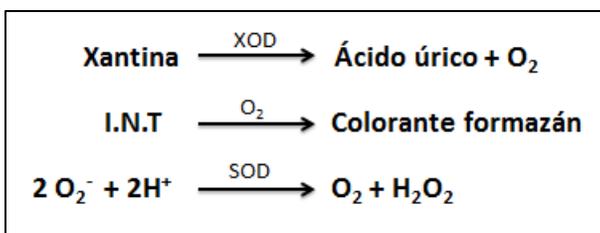


Figura V.1. Principio de la reacción para la determinación de la SOD.

Cálculos:

$$\frac{A_2 - A_1}{3} = DA / \text{min de patrón o de muestra}$$

El índice de muestra diluyente (S1) corresponde al índice de reacción sin inhibir, esto quiere decir que S1 corresponde al 100% de la reacción.

Todos los índices tanto de los patrones como de las muestras diluidas deben ser convertidos en porcentajes del índice del blanco y sustraídos del 100% para obtener el porcentaje de inhibición.

$$100 - \frac{\Delta A_{\text{patrón}/\text{min}} \times 100}{\Delta A_{S1/\text{min}}} = \% \text{ inhibición}$$

$$100 - \frac{\Delta A_{\text{muestra/min}} \times 100}{\Delta A_{S1/min}} = \% \text{ inhibición}$$

Representar el porcentaje de inhibición para cada patrón frente a Log 10 (concentración de patrones en unidades SOD/mL).

Utilizar el porcentaje de inhibición de la muestra para obtener las unidades SOD de la curva patrón.

Unidades SOD/mL de la muestra total= Unidades SOD de la curva patrón/mL X factor de dilución.

Las unidades SOD se expresan por mg de proteína= USOD/mg de proteína.

V.2. Glutación peroxidasa (GPx)

Este método está basado en el trabajo de Plagia and Valentine. La Glutación Peroxidasa (GPx) cataliza la oxidación de Glutación (GSH) por el hidroperóxido de cumeno. El Glutación oxidado (GSSG) en presencia de Glutación Reductasa (GR) y NADPH es inmediatamente convertido en su forma reducida con una oxidación concomitante de NADPH en NADP⁺. Se mide la disminución de la absorbancia a 340 nm (*Kit RANDOX®*).

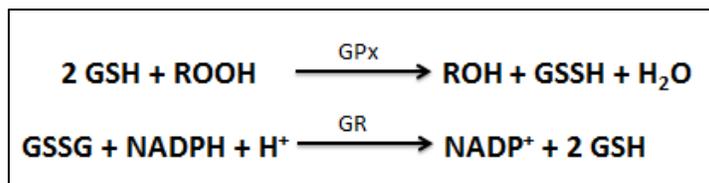


Figura V.2. Principio de la reacción para determinación de GPx.

La concentración de glutación peroxidasa puede calcularse a partir de la siguiente formula:

$$\text{mUGPx/mg de proteína} = [(\Delta A_{340\text{nm/min}}) \times \text{coeficiente de extinción molar NADH (6220 M}^{-1} \text{ cm}^{-1}) \times \text{factor de dilución / mg de proteína}] \times 1000$$

ANEXO VI. Determinación de especies reactivas de oxígeno (ROS)

Este método se basa en la oxidación del 2,7-diclorodihidrofluoresceína (DCFH) originando 2,7-diclorofluoresceína (DCF), un compuesto fluorescente ($\lambda_{\text{excitación}} = 498 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{emisión}} = 522 \text{ nm}$) que inicialmente se pensaba que era útil como marcador específico para H_2O_2 . Sin embargo, ya fue demostrado que el DCFH es oxidado por otras especies reactivas de oxígeno (ROS), tales como HO^\bullet y ROO^\bullet , y también por especies reactivas de nitrógeno (RNS) como $^\bullet\text{NO}$ y ONOO^\bullet .

La forma DCFH diacetato (DCFH-DA) puede ser aplicado a estudios celulares, debido a su capacidad para difundirse a través de la membrana celular, siendo entonces enzimáticamente hidrolizado por esterasas intracelulares a DCFH.

El DCF puede sufrir fotoreducción, ya sea en presencia de luz visible o por la acción de radiación UV. Se supone que el mecanismo de esta reducción involucra la generación del radical semiquinona de DCF (DCF^\bullet) que por reacción con el O_2 , se origina $\text{O}_2^{\bullet-}$. A su vez, la dismutación de $\text{O}_2^{\bullet-}$ genera H_2O_2 , lo que conduce a un aumento artificial de la oxidación de DCFH, y en consecuencia una amplificación de la fluorescencia de DCF. Debido a la existencia de varias sustancias que interfieren con la formación de DCF, se debe tener cuidado cuando se utiliza.

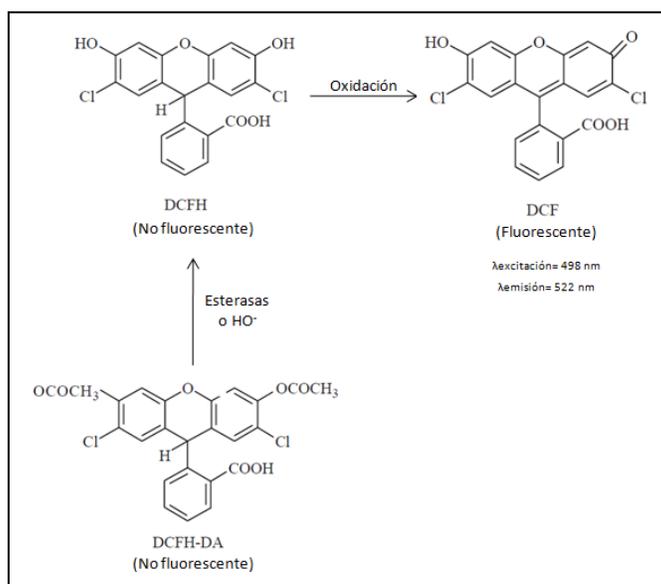


Figura VI. Mecanismo de reacción de esterificación del 2,7- diclorodihidrofluoresceína diacetato a 2,7-diclorofluoresceína, y la posterior oxidación por ROS y NOS para dar el compuesto fluorescente diclorofluoresceína,