



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

Influencia de la deficiencia de hierro sobre los
niveles de estrés oxidativo en ratas Wistar
hembra y macho en diferentes grupos etáreos

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS QUÍMICAS

PRESENTA

Biol. MARIA DEL CARMEN RAMÍREZ MONTERO

DIRIGIDO POR:

DR. LEOBARDO MANUEL GÓMEZ OLIVÁN

DRA. PATRICIA VIEYRA REYES

DR. JORGE JAVIER RAMÍREZ GARCÍA



Toluca, Estado de México Noviembre 2013



UAEM | Universidad Autónoma
del Estado de México

3° (EV. DE GRADO)
OFICIO NO 483/2013

Toluca, México, 30 de octubre de 2013

**P. DE MAESTRIA EN CIENCIAS QUIMICAS
MARIA DEL CARMEN RAMIREZ MONTERO
FACULTAD DE QUIMICA
P R E S E N T E**

La que suscribe Directora de la Facultad de Química, dependiente de la Universidad Autónoma del Estado de México, comunica a Usted que el Jurado de su Evaluación de Grado estará formado por:

Dr. Jorge Javier Ramírez García
PRESIDENTE

Dra. Hariz Islas Flores
SECRETARIO

Dr. Leobardo Manuel Gómez Olivan
PRIMER VOCAL

Dr. Enrique Morales Ávila
SEGUNDO VOCAL

Dra. Miriam Verónica Flores Merino
TERCER VOCAL

Dr. Jonnathan Guadalupe Santillán Benítez
SUPLENTE

Dra. María Dolores Hernández Navarro
SUPLENTE

FIRMA

ATENTAMENTE
PATRIA, CIENCIA Y TRABAJO
"2013, 50 Aniversario Luctuoso del Poeta Heriberto Enríquez"

M. en A.P. **GUADALUPE OFELIA SANTAMARIA GONZALEZ**
DIRECTORA



c.c.p. Archivo

Este trabajo de investigación fue aprobado y registrado con el título “ Influencia de la deficiencia de hierro sobre niveles de estrés oxidativo en ratas Wistar hembra y macho de diferentes grupos etáreos” con número MACSQS-0212, por la Secretaría de Investigación y Estudios Avanzados de la Universidad Autónoma del Estado de México.

El proyecto se inscribe en la línea de generación y aplicación del conocimiento “Bioquímica, de Alimentos y Ambientales” del área de acentuación de Química Biológica del Posgrado en Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma del Estado de México.

DEDICADA....

A MIS PADRES

TERE Y RAFAEL

**Por estar a mi lado en cada paso, su confianza, comprensión y amor incondicional.
Y por que sin su apoyo en las decisiones tomadas, no hubiera sido posible llegar a
ésta meta.... Los quiero!**

A SERGIO

**Por ser mi mejor amigo, mi cómplice, mi confidente... por los consejos y por todas
las aventuras compartidas, Gracias por compartir tu vida... Te amo!!**

A MIS NIÑOS

RENATA Y MATÍAS

**Por ser la alegría en la tristeza, la luz en la oscuridad... los angelitos que me
ayudan a seguir luchando.... Los adoro!!**

A DIOS

PORQUE TÚ ERES MI ROCA Y MI CASTILLO (Sal 31:3)

AGRADECIMIENTOS

Al comité de becas del COMECyT Y CONACyT por el apoyo brindado a través de las becas otorgadas.

A mi comité tutorial por la confianza y apoyo para realizar el proyecto.

Agradezco especialmente al Dr. Bernardo Pliego, por brindarme las facilidades para realizar la parte experimental de este proyecto y por abrirme las puertas de su laboratorio.

A los Drs. Irazú Contreras y José Antonio Estrada, por su amistad incondicional, compartir sus experiencias y conocimiento, así como por los consejos, mil gracias!!

A mis amigas y compañeras Elizabeth, Marbella y Daniela porque siempre estuvieron ahí.... Apoyándome en momentos importantes, gracias por su invaluable amistad!!

A la M en CS. Adriana Torres Vega por todas las experiencias, la paciencia para explicarme, enseñarme, ayudarme, por ser el angelote que me cuidó durante el desarrollo de este proyecto, te admiro y te respeto... mil gracias amiga!!!

A todos mis amigos de laboratorio Tania, Chayis, Vero, Edgar, Gerardo, Nadia, Hariz, Enrique, Nely y Marlene, por las experiencias y conocimiento compartido, y por hacer la jornada de trabajo más amena... gracias!

A los Dres. Leobardo, Jorge, Lolita y Araceli por su apoyo incondicional en el camino para lograr esta meta.... Gracias!

CONTENIDO

Lista de abreviaciones.....	viii
Índice de tablas.....	viii
Índice de figuras	viii
1. RESUMEN.....	9
Abstract	10
CAPITULO I PROTOCOLO	11
2.ANTECEDENTES.....	12
2.1. Importancia del hierro.....	12
2.2. Curso temporal del hierro en el organismo.....	14
2.3. Hierro y estrés oxidativo.....	15
2.4. Relación deficiencia de hierro-estrés oxidativo	19
2.5. Consecuencias de la deficiencia de hierro.....	20
2.6. Relación de hierro-estrógenos.....	21
2.7. Requerimientos de hierro según grupo etáreo.....	21
3. JUSTIFICACION	25
4.HIPÓTESIS	26
5.OBJETIVOS	27
5.1.General	27
5.2. Específicos.....	27
6. METODOLOGÍA	28
6.1. Animales	28
6.2. Obtención de muestras	28
6.3. Determinación de estrés oxidativo.	29
6.4. Determinación de la cantidad de hierro.....	33
6.5. Análisis estadístico	33
CAPITULO II DISCUSIÓN	34
7.- RESULTADOS.....	35
7.1. Carta de aceptación	35

CAPITULO III REFERENCIAS.....	55
8.- REFERENCIAS	56

Lista de abreviaciones

ABREVIACIÓN	SIGNIFICADO
ADN	Ácido desoxirribonucleico
GABA	Ácido gammaaminobutírico
ERO	Especies reactivas de oxígeno
SOD	Superóxido dismutasa
CAT	Catalasa
GPX	Glutación peroxidasa
GSH	Glutación reducido
GSSG	Glutación oxidado
DFe	Deficiencia de Fe (hierro)
IRP	Proteína reguladora de hierro
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
DPN	Días post natales

Índice de tablas

TABLA 1. EJEMPLOS DE PROTEÍNAS FUNCIONALES QUE CONTIENEN FE EN EL ORGANISMO (75 KG) (10).....	13
TABLA 2. ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ERO) PRODUCIDAS EN EL ORGANISMO (18).....	16
TABLA 3. VALORES INTERNACIONALES DE REFERENCIA PARA HIERRO DIETÉTICO (MG/DÍA). (38).....	22
TABLA 4. CURVA DE CALIBRACIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES.....	32

Índice de figuras

FIGURA 1 . ESQUEMA GENERAL DE LA DISTRIBUCIÓN DEL HIERRO (4).....	14
FIGURA 2. MECANISMO DE PRODUCCIÓN Y NEUTRALIZACIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (17).....	17

1. RESUMEN

La deficiencia de hierro es un problema de salud pública, la principal causa de anemia y la deficiencia nutricional más prevalente a nivel mundial.

A pesar de que el hierro se encuentra en cantidades muy pequeñas dentro del organismo participa como cofactor en numerosos procesos biológicos indispensables para la vida, tales como el transporte de oxígeno, fosforilación oxidativa, metabolismo de neurotransmisores y la síntesis de ácido desoxirribonucleico.

Las propiedades químicas del hierro, lo convierte en un peligro potencial, ya que bajo condiciones aerobias fácilmente puede catalizar la formación de especies reactivas de oxígeno. Cuando el aumento en contenido intracelular de especies reactivas de oxígeno sobrepasa las defensas antioxidantes de la célula se produce el estrés oxidativo, situación a través de la cual se induce daño a moléculas biológicas como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. Ante esta situación la línea de defensa antioxidante efectiva es realizada mediante la acción enzimática de la superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa. Enzimas antioxidantes como catalasa y la peroxidasa, requieren como cofactor al hierro del grupo hemo y al no encontrarse suficiente cantidad de hierro para formar las cantidades necesarias de tales enzimas, sugerimos que se da un incremento en el daño a biomoléculas tales como lípidos y proteínas ya que no se puede contrarrestar el estrés oxidativo. Un punto a tomar en cuenta en nuestro estudio es que los requerimientos de hierro en el organismo dependen de la etapa del desarrollo, siendo en la niñez cuando hay mayor demanda. Además, los cambios se dan gradualmente hasta que comienza la diferenciación sexual y las hembras comienzan a tener alta demanda de este metal; a su vez, la edad está relacionada con la síntesis de hormonas, puesto que influyen en la expresión de proteínas regulatorias de este oligoelemento. Hasta la fecha, no hay reportes que indiquen el efecto de la deficiencia de hierro sobre el estrés oxidativo entre hembras y machos de diferentes grupos etáreos. Por tal motivo, el presente proyecto nos permitirá investigar en el modelo murino de rata Wistar deficiente de hierro las diferencias en los niveles de estrés oxidativo entre hembras y machos según el grupo etáreo en rata; equivalente a niñez, pubertad, adolescencia y adultez temprana en humanos.

Abstract

Iron deficiency (ID) is a public health problem, the main cause of anemia and the most prevalent nutritional deficiency worldwide. Although iron is found in very small amounts in the body, it participates like a cofactor in many biological processes essential for life, such as oxygen transport, oxidative phosphorylation, metabolism of neurotransmitters and deoxyribonucleic acid synthesis.

The chemical properties of iron, makes it a potential hazard because under aerobic conditions can easily catalyze the production of reactive oxygen species (ROS). When the intracellular content of ROS exceeds the antioxidant defenses, it produces oxidative stress which induces damage to biological molecules such as lipids, proteins and nucleic acids. In this situation the antioxidant defense is performed by the activity of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase. Specifically for catalase and peroxidasa, iron is required as cofactor on group heme, so if there is not enough iron to form the necessary amounts of these enzymes, we suggest that there is an increase in damage to biomolecules such as lipids and proteins and as a consequence is impossible to counteract the oxidative stress.

A point to consider in our study is that the requirements of iron in the body depend on the stage of development, still in childhood when there is greater demand. In addition, changes occur gradually until it begins sexual differentiation and the females begin to have high demand for this metal, in turn, is age-related hormone synthesis, since influence the expression of regulatory proteins of this trace. To date, there are no reports indicating the effect of iron deficiency on oxidative stress between males and females of different age groups. For this reason, this project will allow us to investigate in rat model of ID Wistar rat differences in oxidative stress levels between males and females by age group rat, equivalent to childhood, puberty, adolescence and early adulthood in humans.

CAPITULO I

PROTOCOLO

2. ANTECEDENTES

2.1. Importancia del hierro

El hierro (Fe) es un elemento que se encuentra en los metales de transición ocupando el lugar 26 (1), posee la capacidad de donar y aceptar electrones, motivo por el cual participa en procesos bioquímicos, mediante reacciones oxido-reducción, tales como la respiración celular a través de los citocromos, enzimas que contienen Fe en su cadena estructural básica (2, 3). También lo encontramos en el transporte de oxígeno debido a su unión con la proteína hemoglobina a nivel sistémico y a la mioglobina en músculo (4) como se observa en la Tabla 1.

Participa en la síntesis de ADN ya que es cofactor de la enzima ribonucleótido reductasa, así como de las enzimas antioxidantes peroxidasa y catalasa, en la formación de eritrocitos, proliferación celular y transporte de electrones (4). Es vital para el desarrollo cerebral ya que participa en la mielinización, metabolismo energético glial y síntesis de neurotransmisores como serotonina, dopamina, epinefrina y ácido gamma aminobutírico (GABA) (2, 3, 5-9).

En sistemas biológicos el Fe es comúnmente encontrado en tres estados de oxidación Fe^{2+} , Fe^{3+} y en menor medida Fe^{4+} . A pH fisiológico, mientras el Fe^{2+} precipita como polímero oxihidroxido, Fe^{2+} es soluble. Por otro lado el Fe^{2+} es inestable en medio acuoso y tiende a reaccionar con oxígeno molecular para formar Fe^{2+} y superóxido (1).

Alrededor del 65% del Fe se encuentra unido a hemoglobina, 10 % es constituyente de la mioglobina, citocromos y enzimas que contienen Fe y cerca del 25% está unido a proteínas de almacenamiento como la ferritina y la hemosiderina (4).

Tabla 1. Ejemplos de proteínas funcionales que contienen Fe en el organismo (75 Kg) (10).

Proteína conteniendo Fe	Función	Localización	Contenido de Fe(mg)
<i>Proteínas Hemo</i>			
Hemoglobina	Transporte de oxígeno	Almacén de	Eritrocitos
Mioglobina	oxígeno		Músculo
			3000
			400
<i>Enzimas Hemo</i>			
Citocromos (Cit) a, b, c	Transferencia de electrones a oxígeno molecular al final de la cadena respiratoria (también requiere Cu)	Transferencia de electrones	Todos los tejidos
Cit C oxidasa	Función mixta de oxidasas microsomales		30
Cit P450+b ₅	Fase I de biotransformación de Xenobióticos		
Dcytb	Ferrireductasa (enterocitos duodenales)		
Catalasa	Descomposición de H ₂ O ₂		
Peroxidasa	Descomposición de O ₂ ⁻²		
Mieloperoxidasa	Neutrófilos		
Sulfito oxidasa	Sulfitos a sulfatos		
Tri 2,3-dioxigenasa	Metabolismo de la Piridina		
Iodasa	Iodito a Iodato		
Enzimas no-hemo	Ribonucleotidos →2'-deoxiribonucleótido		Todos los tejidos
Ribonucleótido reductasa	Fase S de la división celular		30
<i>(Proteínas Fe-S)</i>			
Aconitasa	Ciclo del ácido cítrico y fases iniciales de la fosforilación oxidativa		
Isocitrato dehidrogenasa			
Succinato dehidrogenasa			
NADH dehidrogenasa			
Aldehído oxidasa	Aldehídos a ácidos carboxílicos		
Xantin oxidasa	Hipoxantina-ácido úrico		
Fenilalanina Hidroxilasa	Catecolaminas, neurotransmisores y síntesis de mielina		
Tyrosina hidroxilasa			
Tryptofano hidroxilasa			
Proil hidroxilasa	Síntesis de colágeno, ambas dependen de ácido ascórbico.		
Lysil hidroxilasa			

2.2. Curso temporal del hierro en el organismo

El Fe de los alimentos se encuentra básicamente en dos formas: hemo (protoporfirina+Fe²⁺) y no hemo (Fe³⁺). Para la absorción digestiva de Fe no-hemo, es preciso que éste se encuentre en la forma ferrosa Fe²⁺, para lo cual utiliza el transportador de metales divalentes 1 (DMT1) presente en enterocitos duodenales. El Fe²⁺ se transforma en Fe³⁺ por la acción de la proteína citocromo B dependiente de ascorbato (Dcyt B) mientras que la absorción del Fe hemo es mediada por la proteína transportadora de hemo (HCP1) (2) (Fig. 1).

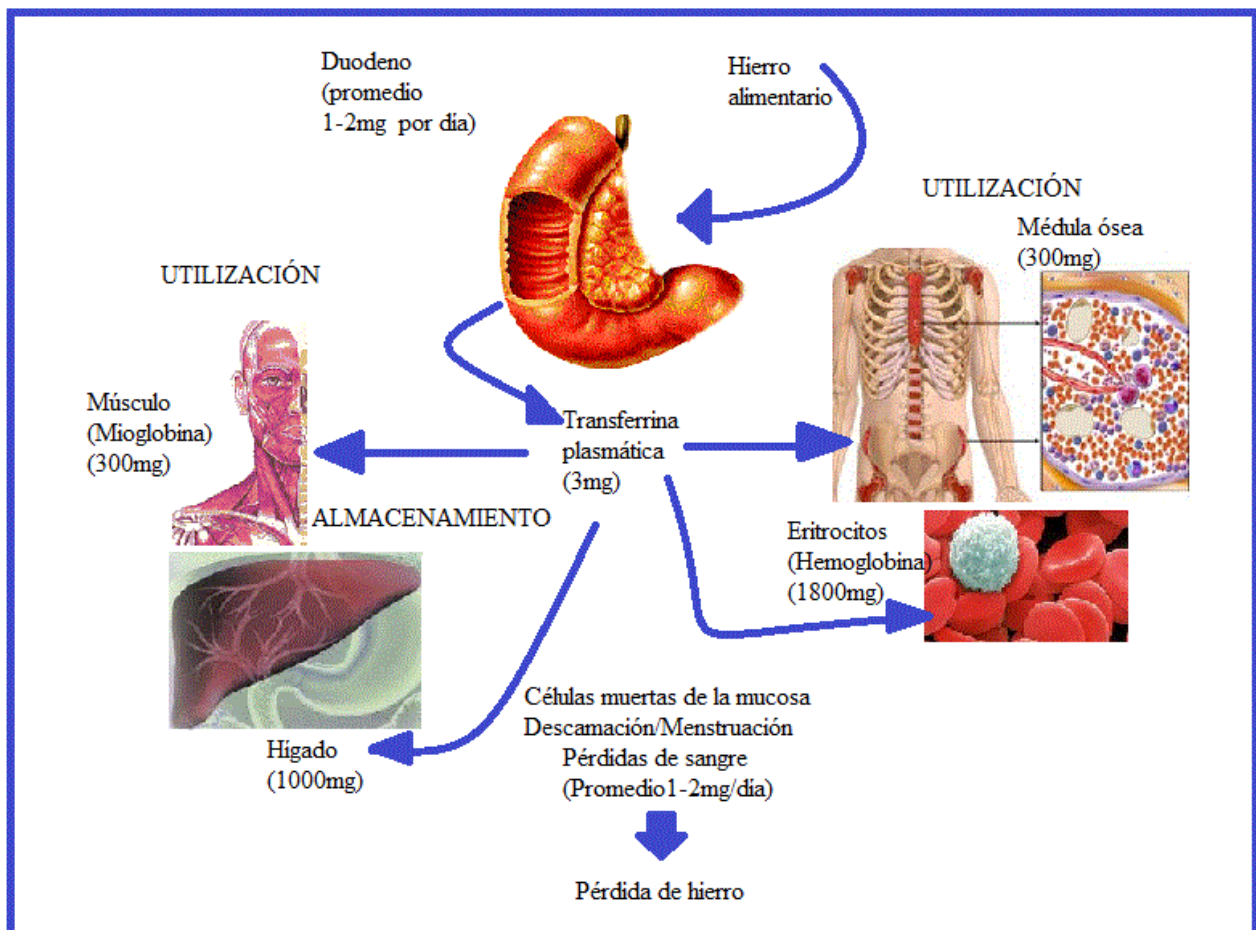


Figura 1 . Esquema general de la distribución del hierro (4).

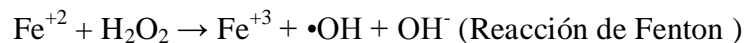
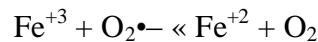
Una vez dentro de los enterocitos el hierro Fe^{2+} es oxidado a Fe^{3+} mediante la ceruloplasmina, proteína con capacidad ferroxidasa; de esta manera el Fe^{3+} se une a la proteína transferrina (Tf), la cual se encarga de distribuir al metal a nivel sistémico por todo el organismo (6, 10, 11). Si no es así entonces el Fe^{2+} se almacena mediante la unión con la ferritina y hemosiderina dentro del sistema retículo endotelial del parénquima hepático, bazo y médula ósea (3, 6).

La excreción o pérdida de Fe se efectúa principalmente por medio del recambio de células epiteliales intestinales y de piel, por el sudor, las heces (en parte procedente de la bilis), la orina y en mujeres, durante el sangrado menstrual (12).

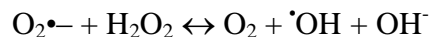
2.3. Hierro y estrés oxidativo

La eficiencia del hierro Fe^{3+} para ceder electrones y la del Fe^{2+} para aceptarlos, es una propiedad fundamental para muchas reacciones bioquímicas del organismo, sin embargo, ésta característica lo convierte también en un peligro potencial, ya que bajo condiciones aerobias fácilmente puede catalizar la formación de especies reactivas de oxígeno (2,6).

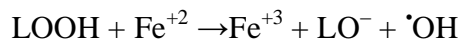
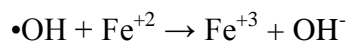
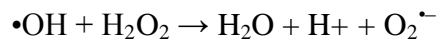
La toxicidad del hierro se basa en las reacciones de Fenton y Haber-Weiss, donde pequeñas cantidades del mineral son suficientes para formar radicales hidroxilo (OH^{\bullet}) a partir de superóxido ($O_2^{\bullet-}$) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2), conocidos como reactivos intermediarios de oxígeno (13), los cuales forman radicales libres (3).



La reacción general de los pasos combinados se llama reacción de Haber- Weiss



Siendo subsecuentes las siguientes reacciones



Los radicales libres son moléculas que poseen un electrón desapareado en su último nivel energético, lo que les permite reaccionar con un elevado número de moléculas de todo tipo, primero oxidándolas y después atacando su estructura a través de isomerías (8)(14). Las especies reactivas de oxígeno (15) son un término global que incluye tanto formas reducidas como no reducidas de oxígeno y peróxido de hidrógeno (H₂O₂) (16).

Tabla 2. Especies Reactivas de Oxígeno (ERO) producidas en el organismo (18).

<i>Especies reactivas de oxígeno</i>	
Radicalarias	No Radicalarias
Superóxido O₂^{•-}	Peroxido de hidrógeno H ₂ O ₂
Hidroxilo OH[•]	Ácido hipocloroso HOCl
Peroxilo RO₂[•]	Ozono O ₃
Alcoxilo RO[•]	Oxígeno singlete ¹ Δg
Hidroperoxilo HO₂[•]	Ácido hipobromoso HOBr

Cuando el aumento del contenido intracelular de EROs sobrepasa las defensas antioxidantes de la célula se produce el estrés oxidativo, reacciones a través de las cuales se induce daño a moléculas biológicas como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (17).

El estrés oxidativo se presenta en diversos estados patológicos en los cuales se altera la funcionalidad celular, contribuyendo o retroalimentando el desarrollo de enfermedades degenerativas como la aterosclerosis, cardiomiopatías, enfermedades neurodegenerativas y cáncer (10, 17).

Los biomarcadores de estrés oxidativo se miden mediante la determinación de subproductos del ataque oxidativo a lípidos, oxidación protéica y daño a ADN. Para minimizar este daño, la célula cuenta con sistemas de defensa frente a las EROs para neutralizar los radicales libres, mediante enzimas antioxidantes (3).

La primer línea de defensa antioxidante intracelular funciona eliminando $O_2^{\bullet-}$ y H_2O_2 antes de que interactúen para formar el OH^{\bullet} . Los mecanismos de inactivación de las EROs incluyen etapas sucesivas. El proceso se inicia con la dismutación, reacción en la que el mismo elemento actúa como agente oxidante y reductor, donde el anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$) reacciona para formar peróxido de hidrógeno (H_2O_2) bajo la influencia de la enzima superóxido dismutasa (SOD). Posteriormente la enzima catalasa (CAT) o glutatión peroxidasa (GPX) reduce H_2O_2 a O_2 y H_2O (16) (Fig 2).

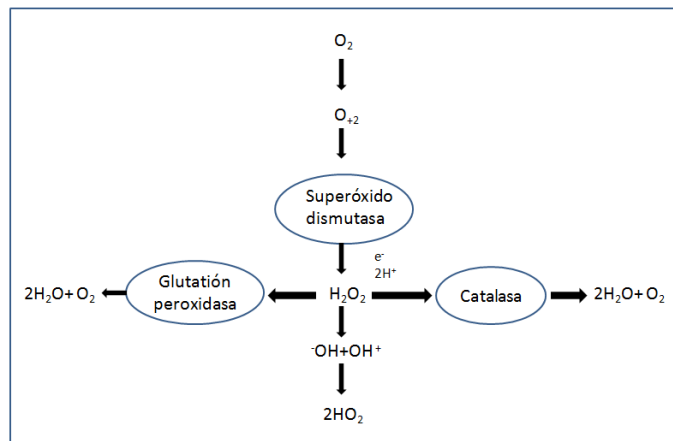


Figura 2. Mecanismo de producción y neutralización de especies reactivas de oxígeno (17).

La SOD pertenece al grupo de las metaloenzimas que catalizan la conversión de aniones superóxido reactivos ($O_2^{\bullet-}$) para originar H_2O_2 . Las SODs se encuentran presentes en todos los organismos aeróbicos por lo que se considera fundamental en la ruta antioxidante. Además la velocidad de SOD para catalizar el $O_2^{\bullet-}$ dismutado, cerca de limitar la inadecuada función, la hace una de las enzimas más activas (18).

La CAT es una enzima que se encuentra en la hemantia, facilita la remoción de H_2O_2 y es metabolizado a O_2 y H_2O . Estas enzimas se localizan en los peroxisomas de la mayoría de las células involucradas en el metabolismo de los ácidos grasos mientras que las peroxidases reducen

una variedad de peróxidos a sus correspondientes alcoholes (19). La GPX cataliza el metabolismo de H_2O_2 en agua, involucrando una concomitante oxidación de GSH reducido a su forma oxidada (GSSG). La GPX es considerada importante en la protección de membranas a daño debido a lipoperoxidación, cuya función radica en la terminación de la cadena de propagación de radicales por reducción rápida para generar radicales opuestos (18).

La segunda línea de defensa antioxidante extracelular está integrada por compuestos liposolubles obtenidos de la dieta como los α -tocoferoles, β -carotenos, ubiquinona y coenzima Q; mientras que los antioxidantes intracelulares son generalmente sistemas protéicos y compuestos hidrosolubles como ácido ascórbico, ácido úrico y bilirrubina (16, 17).

Las membranas fosfolipídicas de los organismos aerobios son continuamente sujetas a oxidación por fuentes endógenas y exógenas, mientras que las membranas peroxidadas y los productos de peroxidación lipídica representan un constante riesgo para las células (20, 21).

El proceso de peroxidación lipídica se compone de una cadena de reacciones, de iniciación, elongación, especialmente sobre los ácidos grasos poliinsaturados, que son muy sensibles a las reacciones de oxidación por ERO debido a los enlaces dobles que posee (1, (22)). Y la terminación de la lipoperoxidación se da como resultado de interacciones de radicales lipídicos y/o la formación de especies no-radicales por los radicales peroxil-lipídico. El LOOH resultante puede ser fácilmente descompuesto en varias especies reactivas incluidas radicales alcoxil lipído (LO), aldehídos (malondialdehído, $HOCO-CH_2-CH$), alcanos, epóxidos lipídicos y alcoholes. La mayoría de estos son productos tóxicos y mutagénicos activos (23, 24).

El daño oxidativo también puede llegar a afectar a proteínas de membrana, este tipo de reacciones dan como resultado rompimiento de las cadenas laterales de los aminoácidos, así como rompimiento de péptidos, contribuyendo a la adición de grupos carbonilo (1).

La oxidación de las proteínas es una de las principales consecuencias del estrés oxidativo y conduce a cambios conformacionales que pueden interferir en su función, producir su fragmentación química o incrementar la susceptibilidad al ataque proteolítico por los proteosomas (25).

2.4. Relación deficiencia de hierro-estrés oxidativo

Existe gran controversia sobre la susceptibilidad de células a la peroxidación lipídica en la anemia por deficiencia de hierro. Por un lado, hay teorías que afirman que la deficiencia de hierro no sólo afecta la producción de hemoglobina, sino que también afecta la producción de otras proteínas que contienen Fe^{2+} , tales como citocromos, mioglobina, catalasas y peroxidasas (6,7).

La reacción del Fe^{2+} con las unidades sulfhidrilo de las enzimas producen sistemas estables como es el R-S- Fe^{2+} -S-R. Este sistema modifica la estructura enzimática y altera su función, afectando la salud y supervivencia de los organismos (26). Este sistema experimenta ciclos de óxido-reducción favoreciendo la producción de EROs. Además, algunos estudios han demostrado que el Fe daña a las enzimas antioxidantes como la glutatión peroxidasa y la catalasa ya que requieren Fe unido a grupos hemo como cofactor. (27).

Se ha indicado que el debilitamiento del sistema de defensa antioxidante, reduce la inmunidad celular y la actividad mieloperoxidasa en pacientes con anemia por deficiencia de hierro (6,8). Isler y cols. en el 2002, determinaron que pacientes con anemia por deficiencia de hierro tenían alteraciones en la actividad antioxidante de enzimas eritrocíticas y que después del tratamiento oral y parenteral con hierro y vitamina E, se incrementaba la actividad de superóxido dismutasa y la actividad de glutatión peroxidasa se normalizaba (28).

Aslan y cols. en el 2006, realizaron un estudio cuyo objetivo fue correlacionar el daño en el ADN de linfocitos, la capacidad antioxidante total y el grado de anemia en mujeres con deficiencia de hierro, encontrando que se incrementaba el estrés oxidativo y el daño al ADN; respecto a esto sugieren que el incremento de estrés oxidativo puede ser una causa que contribuye en la patogénesis de la deficiencia de hierro, y que es un factor importante que induce daño al ADN (29). Por el contrario, autores como Díaz-Castro y cols. 2008, afirman que la anemia por deficiencia de hierro (30) es un factor que no afecta la estabilidad del ADN o la peroxidación lipídica en ratas; lo que sugiere que hay suficiente capacidad de compensación para mantener elevadas las defensas antioxidantes (31).

2.5. Consecuencias de la deficiencia de hierro

La deficiencia de hierro (DFe) produce como consecuencia alteraciones en la síntesis del grupo hemo, que por ende limita la síntesis de hemoglobina situación que lleva al padecimiento de anemia ferropénica. Este es un proceso patológico en el cual la concentración de hemoglobina en los eritrocitos está anormalmente baja. De la misma manera, el tiempo de vida de los glóbulos rojos en circulación se ve limitado mientras que su producción es imperturbable hasta que el almacén de hierro se ve agotado, reflejándose en niveles bajos de ferritina sérica (28, 32).

Los efectos deletéreos de la DFe se manifiestan como escaso crecimiento físico, alteraciones gastrointestinales, disfunción tiroidea, conduce a la alteración de la inmunidad y desestabilización de la temperatura. En Sistema Nervioso Central influye en alteraciones cognitivas, de memoria a corto y largo plazo y en enfermedades neurodegenerativas (33).

Las manifestaciones de la carencia de hierro derivan de aquellas propias de la anemia, falla en la movilización de la vitamina A hepática, mayor riesgo de parto prematuro y de morbilidad perinatal, menor transferencia de hierro al feto, disminución de la velocidad de crecimiento, alteraciones conductuales y de desarrollo mental y motor, velocidad de conducción más lenta de los sistemas sensoriales auditivo y visual y reducción del tono vagal (30).

Así mismo la pérdida de hierro está relacionada con desordenes neurológicos tales como mal funcionamiento cognitivo en general, en niños se ha reportado retraso en el desarrollo mental, problemas de aprendizaje y menor rendimiento escolar. En adultos deprime la actividad debido al cansancio producido, dificultad para mantener la temperatura corporal, disminución de la función inmune, en la producción de neurotransmisores, ácidos grasos así como de la síntesis de ADN. En mujeres embarazadas se incrementa la tasa de parto pre-termino, se presenta bajo peso al nacer y el niño está condicionado a padecer anemia (35,36,37) .

2.6. Relación de hierro-estrógenos

Se ha encontrado que hormonas estrogénicas pueden influenciar la expresión de proteínas reguladoras de hierro (IRP), principalmente IRP1 e IRP2. Borrás y cols, 1998 demostraron que en ratas ovariectomizadas tratadas con 17- β -estradiol (E_2), (34) hormona sexual esteroidea sintetizada en los ovarios, se da un aumento significativo de recaptura de hierro en intestino delgado y un subsecuente incremento de sus niveles séricos acompañados por un decremento en la capacidad de unión del hierro total; además de un aumento en los almacenes de hierro esplénico. Esto indica que las cantidades de este oligoelemento almacenado, dependen directamente de la circulación de estrógenos (35).

Raso y cols. 1999 documentaron que E_2 modula la actividad de unión del mRNA de IRP, afectando la expresión de la ferritina y el receptor de transferrina 1 (TfR-1) en tejido adiposo (33). La cantidad de hierro en el organismo es afectada por la presencia de hormonas estrogénicas, cuya función es incrementar, a nivel mRNA, la expresión de la proteína ferritina y del receptor de transferrina propiciando así un mejor aprovechamiento de hierro.

2.7. Requerimientos de hierro según grupo etáreo.

Los requerimientos de hierro en cada etapa de la vida están determinados por los cambios fisiológicos a que se enfrenta el organismo durante su desarrollo. Durante el primer año de la vida se estima que las necesidades de hierro son de 0,7 a 1,0 mg/kg/día (15 mg/d). Durante la infancia, las necesidades de hierro para el crecimiento son menores, alrededor de 10 mg/día. Durante el desarrollo puberal un adolescente aumenta unos 10 kg de peso, que debe acompañarse de un incremento de unos 300 mg de su hierro corporal para lograr mantener constante su hemoglobina, que en este período aumenta a razón de 50-100 g/L/año (Tabla 3.)

En consecuencia, un adolescente varón requiere alrededor de 350 mg de hierro por año durante el pico de crecimiento de la pubertad, no así para las mujeres, cuya demanda aumenta, pues aunque su velocidad de crecimiento es menor, se adicionan las pérdidas menstruales.

Así entonces, una adolescente en pleno pico de crecimiento requiere alrededor de 455 mg de hierro por año. Mientras que para las mujeres en edad fértil los requerimientos son similares a los de la adolescente, debido a las pérdidas menstruales, los embarazos y la lactancia (34).

Spear, 2000 refiere la categorización de edades de ratas equivalentes a etapas del desarrollo humano; considerando que en ratas, la edad de los 0 a los 21 días postnatales (DPN) equivale a la niñez en humanos; de los 22 a los 42 DPN inicia la adolescencia temprana, iniciándose la abertura vaginal y aumento del peso del útero a 150 mg / kg, inducido por un efecto estrogénico en hembras, mientras que los machos comienzan a delimitar su territorio a través de la orina. Entre los 42 a 56 DPN es el equivalente a la adolescencia tardía, cuando se da un cambio en cuanto a agresividad por parte de los machos. Finalmente de los 56 a 73 DPN se considera el inicio de la etapa adulta, donde se observa disminución en la ingesta de alimento y se establece la delimitación del territorio (36, 37).

Tabla 3. Valores internacionales de referencia para hierro dietético (mg/día) (38).

RU		EUA/Canadá		FAO/OMS			EU	
Edad	Ingesta recomen dada (basada en un 15% de absorción)	Edad	Ración dietética recomenda da (basada en un 18% de absorción)	Edad	Ingesta recomen dada (basada en un 15% de absorció n)	Ingesta recomenda da (basada en un 10% de absorción)	Edad	Referencia poblaciona l de ingesta (basado en un 15% de absorción)
0-3 m	1.7	-	-	-	-	-	-	-
4-6 m	4.3	0-6 m ¹	0.27	-	-	-	-	-
7-9 m	7.8	-	-	6-12m ⁵	-	9.3	6-12m ⁵	1-
10-12m	7.8	7-12m ²	11.0	1-3 a	6.2	5.8	3 a	4-6
1-3 a	6.9	1-3 a	7.0	4-6 a	3.9	6.3	a	7-10
4-6 a	6.1	4-8 a	10.0	7-10 a	4.2	8.9	a	4.2
7-10 a	8.7	-	-	-	5.9	-	-	5.9

Masculino								
11-14 a 15-	11.3	9-13 a	8.0	11-14 a	9.7	14.6	11-14 a	9.7
18 a 19-50 a	11.3	14-18 a	11.0	15-17 a	12.5	18.8	15-17 a	12.5
50 + a	8.7	19-50 a	8.0	18 + a	9.1	13.7	18 + a	9.1
	8.7	50+ a	8.0	-	-	-	-	-

Femenino

11-14 a 15-	14.8	9-13 a ³	8.0	11-14 a ⁶	9.3	14.0	11-14 a ⁶	9.3
18 a 19-50 a	14.8	14-18a ³	15.0	11-14 a	21.8	32.7	11-14 a	21.8
50 + a	14.8	19-50 a	18.0	15-17 a	20.7	31.0	15-17 a	20.7
	8.7	50 + a	8.0	18 + a	19.6	29.4	18 + a	19.6
		Gesta ción ⁴	27	post meno	7.5	11.3	post meno pausia	7.5
		Lactan cia (14- 18 a)	10.0	pausia lactan cia	10.0	15.0	lactancia	10.0
		Lactan cia (19- 50 a)	9.0					

m: meses ; a: años

¹no se han demostrado criterios funcionales que reflejen la respuesta a la ingesta dietética en niños pequeños. Por lo tanto la ingesta recomendada de hierro se basa en una ingesta adecuada (IA) que refleja la ingesta media de hierro observada de los lactantes alimentados con leche.

²basado en 10 % de absorción

³basado en el supuesto de que las niñas menores de 14 años no menstrúan y que todas menstruan a partir de los 14 años. Para las niñas menores de 14 años que han comenzado a menstruar, sería apropiado considerar una pérdida menstrual de 0.45mg/día de Fe. Por lo tanto el requerimento aumenta aproximadamente 2.5 mg/día de Fe.

⁴la biodisponibilidad en el primer trimestre es estimada como para mujeres no embarazadas, en el segundo y tercer trimestre se da un incremento del 25%

⁵la biodisponibilidad durante este periodo varía mucho

⁶no está menstruando . **Modificado de Geissler y cols, 2010.**

Con base en lo anterior se toma en cuenta la teoría del estrés oxidativo como causa del envejecimiento (39) dicha teoría se apoya en las siguientes observaciones i) los niveles de biomoléculas dañadas por oxidación aumentan con la edad, ii) los cambios en la dieta, manipulación farmacológica o genética que prolongan la vida se extienden también al reducir el nivel de moléculas dañadas por oxidación y iii) reducir el nivel de EROs aumenta el tiempo de vida (23).

3. JUSTIFICACION

La deficiencia de hierro es el padecimiento nutricional más frecuente y constituye un problema de salud pública de orden mundial y la principal causa de anemia incluso en los países desarrollados. Cerca del 80% de la población mundial padece deficiencia de hierro y más del 40% padece anemia por deficiencia de hierro. El hierro por sí mismo, es un agente altamente oxidante, capaz de producir radicales libres como EROs. Al existir una deficiencia, la probabilidad de la disfunción de enzimas antioxidantes, como catalasa y superóxido dismutasa aumenta, ya que ambas requieren como cofactor hierro unido al grupo hemo. Esto puede conllevar a fallos en la homeostasis celular debidos a la repercusión del estrés oxidativo generado por otras sustancias corporales.

Para poder estudiar los niveles de daño causado por estrés oxidativo en sujetos deficientes de hierro, es necesario tener un modelo animal. Para tal efecto se estudiará la influencia de la deficiencia de hierro sobre los niveles de estrés oxidativo en rata Wistar tomando en cuenta diferencias entre sexo y grupo etáreo, puesto que los requerimientos de hierro cambian en las diferentes etapas del desarrollo. Además de correlacionar los niveles de hierro circulatorio y almacenado a nivel central y hepático. Cabe recalcar que a la fecha no hay estudios al respecto.

4.HIPÓTESIS

La deficiencia de hierro induce estrés oxidativo en ratas hembra y macho que se verá incrementado a medida que avanza la edad, en diferentes grupos etáreos.

5.OBJETIVOS

5.1.General

Determinar la influencia de la deficiencia de hierro sobre los niveles de estrés oxidativo en ratas Wistar hembra y macho en diferentes grupos etáreos.

5.2. Específicos

Determinar los niveles de estrés oxidativo en muestras sanguíneas, de hígado, ovarios, testículos y cerebro de ratas hembra y macho, en diferentes grupos etáreos.

Determinar la concentración de Fe en cerebro y muestras sanguíneas de ratas hembra y macho por espectrofotometría de absorción atómica en diferentes grupos etáreos.

6. METODOLOGÍA

6.1. Animales

Se utilizaron ratas Wistar mantenidas bajo condiciones controladas, temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, fotoperiodo luz/oscuridad 12/12 horas, agua purificada y alimento *ad libitum* en el Bioterio de la Facultad de Medicina, UAEMex.

Se tomaron 20 ratas hembra de tres meses de edad, pesando de 250-300g, mismas que se dividieron en dos grupos ($n=10$), un grupo testigo A, mantenido con alimento conteniendo los niveles normales de hierro (Harlan Laboratories, 100 ppm Fe) (40) y el grupo B, experimental, con alimento deficiente en hierro (Harlan Laboratories, 10 ppm Fe) (41). Se colocaron 2 sementales adultos (4 meses de edad o 400-450g de peso) por cada 2 hembras, para preñarlas y así obtener las crías, después de 15 días sometidas a la dieta, misma que se mantuvo durante la lactancia para asegurar la deficiencia en las crías.

Las crías de cada grupo etáreo ($n=12$), fueron destetadas al día 21 después del nacimiento y se dividieron por sexo con una $n=6$ ratas (6 hembras y 6 machos) mismas que se sacrificaron al llegar a los días post-natales que fueron establecidos según el periodo correspondiente en humanos (36): Niñez (21 DPN), adolescencia temprana (42DPN), adolescencia tardía (56 DPN) y adulto joven (70DPN).

6.2. Obtención de muestras

Para la obtención de muestras, se realizó la eutanasia con pentobarbital sódico “anestésal” (1.5 ml/300-400 g de peso vivo) y se tomaron muestras de los siguientes tejidos: cerebro, sangre e hígado, enseguida se agregó buffer PBS pH 7.4, en relación 1ml:3g de peso de la muestra. Posteriormente se realizó el homogenizado de cerebro e hígado, mientras que la sangre se sometió a sonicación.

Todas las muestras se congelaron a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el siguiente proceso. Las unidades de las determinaciones están en relación al contenido de proteínas totales cuantificadas de acuerdo al método de Bradford (42).

Las muestras homogenizadas fueron procesadas para determinar las concentraciones de Hierro circulante en sangre y de hierro fijo en hígado y cerebro. Posteriormente se realizó la determinación de estrés oxidativo en las muestras ya homogeneizadas mediante la determinación del grado de lipoperoxidación y niveles de oxidación de proteínas, como biomarcador del daño provocado a lípidos y proteínas; así como de la actividad de las enzimas antioxidantes SOD, CAT y GPX, biomarcadores de adecuada funcionalidad celular.

6.3. Determinación de estrés oxidativo.

6.3.1. Nivel de lipoperoxidación

El grado de lipoperoxidación se determinó empleando el método modificado de Buege y Aust, 1979 (45). Se tomaron 100 μL del homogeneizado y fue aforado a 1 ml con solución reguladora tris-HCl 150 mM a pH 7.4, se agregaron 2mL de TCA-TBA (ácido tiobarbitúrico al 0.375% en ácido tricloroacético al 15%) se indujo un choque térmico con agua en ebullición a 95°C por unos segundos. Enseguida se incubó a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 min. Concluido el tiempo se centrifugó a 3500 rpm durante 10 min, en centrifuga Jouan B4i y se determinó la absorbancia a 535 nm en espectrofotómetro Bio Rad.

Los resultados se expresan en mM de malondialdehído / mg proteínas / g tejido, usando el coeficiente de extinción molecular (CEM) el cual es de $1.56 \times 10^5\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ empleando la siguiente ecuación (43).

$$\text{nM de malondialdehído / mg proteínas / g tejido} = \text{Abs} / \text{CEM}$$

6.3.2. Contenido de proteínas carboniladas

El nivel de proteínas oxidadas se determinó por el método modificado de Burcham, 2007 (44); Parvez y Raisuddin, 2005 (45) y Levine *et al*, 1994(46). A 100 µl del sobrenadante se le adicionaron 150 µl del 10mM de DNPH/2M HCl. Enseguida se incubó durante 1 hr en oscuridad. Transcurrido el tiempo se agregaron 500 µl de ácido tricloroacético al 20% y reposó por 15 min a 4°C. El precipitado obtenido se centrifugó a 11000 rpm durante 5 min. El precipitado fué lavado dos veces con etanol-acetato de etilo 1:1, posteriormente se disuvió el precipitado obtenido en 1 ml de guanidina 6M pH 2.3 con la cual se incubó a 37°C durante 30 min, posteriormente se determinó la absorbancia a 366 nm.

Los resultados se expresan en mM o nM de carbonilos reactivos (C=O)/mg proteínas, los resultados se calcularon mediante el coeficiente de extinción molecular (CEM) de 21 000 M⁻¹ cm⁻¹.

6.3.3. Actividad de la enzima superóxido dismutasa

Para la determinación de la actividad enzimática de SOD se empleó el método descrito por Misra y Fridovich, 1972 (47). Fueron colocados 40 µL del sobrenadante en una celda de cuarzo y se adicionaron 260 µL de la solución amortiguadora de carbonatos (50 mM de carbonato de sodio y 0.1 mM EDTA) a pH 10.2. Enseguida se agregaron 200 µL de adrenalina 30 mM, y se determinó la absorbancia a 480 nm, a los 0 seg, 30 seg y 5 min.

Los resultados se obtuvieron sustituyendo la absorbancia de 0 y 5 min en la siguiente fórmula:(47).

$$\text{Concentración de Adrenalina}=(A_0-A_5)/\text{CEM}$$

Donde el CEM para la adrenalina es de 21 nM-1 cm⁻¹; los datos son expresados en nM de Adrenalina/ mg PT/g de tejido húmedo.

6.3.4. Actividad de la enzima catalasa

La actividad de la enzima catalasa se determinó por el método de Radi *et al*, 1991 (48). 20 μ L del sobrenadante de la muestra fueron colocados en una celda de cuarzo, se agregaron 280 μ L de la solución amortiguadora de aislamiento (0.3 M sucrosa, 1 mM EDTA, 5 mM HEPES y 5 mM KH_2PO_4) y 200 μ L de la solución de H_2O_2 20 mM. Posteriormente se realizó la lectura en espectrofotómetro a λ 240 nm, a los 0 y 60 seg.

Los resultados se obtuvieron sustituyendo la absorbancia de 0 y 1 min en la siguiente fórmula sustituir los datos obtenidos en la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración de catalasa} = (A_0 - A_{60}) / \text{CEM}$$

Donde el CEM del $\text{H}_2\text{O}_2=0.04321 \text{ nM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; los datos son expresados en nM de H_2O_2 /mg PT/g de tejido húmedo

6.3.5. Actividad de la enzima glutatión peroxidasa

La actividad de la enzima glutatión peroxidasa se determinó por el método modificado de Paglia y Valentine, 1967 (49). Se colocaron 100 μ L del sobrenadante de la muestra en una celda de cuarzo y se adicionaron 290 μ L de la solución amortiguadora de reacción (K_2HPO_4 50mM, KH_2PO_4 50mM, glutatión reducido 3.5 mM, ázida de sodio 1 mM, NADPH 0.12mM, glutatión reductasa 2 U) y 100 μ L de H_2O_2 20 mM. Posteriormente se determinó la absorbancia a 340nm, a los 0 y 60 seg (50).

Se calculó la actividad de la GPX por medio del CEM del NADPH=6.22 $\text{mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

6.3.6. Concentración de proteínas (29)

De acuerdo al método de Bradford, 1976, a 25 μL del sobrenadante se agregaron 75 μL de agua desionizada y 2.5 mL del reactivo de Bradford (0.05 g de azul de Cummassi, 25 mL de etanol al 96% y 50 mL de H_3PO_4 en 500 mL de agua desionizada). Se agitaron los tubos y se dejó reposar por 5 min, a continuación se determinó la absorbancia a 595 nm. Los resultados se extrapolan en una curva estándar hecha con albúmina bovina, como se muestra en la tabla 2 (42).

Tabla 4. Curva de calibración para la determinación de proteínas totales.

Concentración Albúmina($\mu\text{L}/\text{mL}$)	Volumen Albúmina(μL)	Agua (μL)
0.01	10	90
0.025	25	75
0.05	50	50
0.075	75	25
0.1	100	0

6.4. Determinación de la cantidad de hierro

A 0.5 g de tejido se adicionaron 5 ml de HNO₃ concentrado, para hacer una digestión ácida en microondas a temperatura de 70 – 90°C, durante 2-4 hrs, enseguida se llevó a su correspondiente en el espectrofotómetro de absorción atómica y se determinó la absorbancia a 248.3 nm a condición de Aire-C₂H₂ oxidante azul.

6.5. Análisis estadístico

El análisis fue realizado mediante el paquete Stat View 5.0.1. A los datos obtenidos se les realizó un análisis multifactorial mediante la prueba no paramétrica Kruskal- Wallis. Las diferencias entre cada grupo fueron analizadas mediante la prueba U Man-Withnney, expresadas como medias \pm error estándar con nivel de significancia de $\alpha= 0.05$.

CAPITULO II

DISCUSIÓN

7.- RESULTADOS

7.1. Carta de aceptación

Dear Dr Vieyra-Reyes,

On Sep 10 2013 02:16PM, we received your Research Article entitled "IRON DEFICIENCY IN WISTAR RATS INDUCES OXIDATIVE STRESS DEPENDING ON AGE AND SEX" by María Ramírez-Montero; Leobardo Gómez-Olivan; Diana Millán-Aldaco; Marcela Palomero-Rivero; Isaac Túnez; Patricia Vieyra-Reyes.

Your manuscript has been assigned the manuscript number: PONE-D-15-37689. We will keep you informed about the progress of your manuscript or you can check the status by logging into your account.

Please be aware that you will NOT be required to complete the 'Open-Access Agreement' field until your manuscript is accepted for publication. You may also be asked to provide your article and figure files in a different format at this time (please see the 'Format Requirements' section of the [Manuscript Guidelines](http://www.plosone.org/static/guidelines.action#format) for more information: <http://www.plosone.org/static/guidelines.action#format>

Please visit everyONE (<http://blogs.plos.org/everyone>), the PLOS ONE community blog for authors who have published with us (as well as our readers), where you will be able to find out what the journal is thinking, changing and doing.

Thank you for submitting to PLOS ONE.

If you have any inquiries or other comments regarding this manuscript, please contact plosone@plos.org.

Thank you for choosing PLOS ONE.

Best wishes,

PLOS ONE

IRON DEFICIENCY IN WISTAR RATS INDUCES OXIDATIVE STRESS

DEPENDING ON AGE AND SEX.

Short Title: Iron deficiency induces oxidative stress.

MARIA DEL CARMEN RAMÍREZ-MONTERO¹, LEOBARDO GÓMEZ-OLIVAN²
DIANA MILLÁN-ALDACO³, MARCELA PALOMERO-RIVERO³, ISAAC TÚNEZ⁴,
PATRICIA VIEYRA-REYES^{1*}

^{1*}Laboratorio de Neurofisiología de la Conducta. Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de México. México.

²Laboratorio de Toxicología Ambiental, Facultad de Química, Departamento de Farmacia, Universidad Autónoma del Estado de México, México.

³División de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México DF, México.

⁴Dpto. Bioquímica y Biología Molecular. Facultad de Medicina, Instituto de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC)/Hospital Universitario Reina Sofía/Universidad de Córdoba, España.

*Corresponding author: *Patricia Vieyra-Reyes*, Neurofisiología de la Conducta, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de México, Paseo Tollocan esq, Jesús Carranza, Toluca 50180, Estado de México, México. e-mail: pvieya8@gmail.com

Abstract

Iron is a trace element and structural part of antioxidant enzymes; iron requirements vary according to age and sex. An excess of iron leads to the formation of free radicals, however the effects of iron deficiency (ID) have not been elucidated. In this study the influence of age and sex in Wistar rats with ID on oxidative stress in brain, blood and liver are analyzed. The studied ages roughly correspond to stages of human development: birth (0 postnatal-day “PND” in rats); childhood (21 PND), early-adolescence (42 PND), late-adolescence (56 PND) and adulthood (70 PND). The following biomarkers were determined: lipid peroxidation products (LPO); protein carbonyl content (PCC) and activity of the antioxidant enzymes; superoxide dismutase (SOD); catalase (CAT); and glutathione peroxidase (GPx).

In this study, we demonstrate that ID-subjects are born with high levels of LPO in brain and low antioxidant activity, being damage more severe in males. After birth, antioxidant defense focuses on the central level in ID-females and on peripheral level in ID-males; as from the 21 PND antioxidant defense from SOD increases in brain, blood and liver. Unfortunately, SOD can not prevent oxidative damage in the blood of ID-females; at hepatic level, ID-subjects, unlike the control subjects, show higher antioxidant protection at birth; being PCC controlled by GPx and CAT in the blood of the ID-subjects of both sexes. However, antioxidant defense in ID-subjects was insufficient to control LPO in brain at 56 PND. With these data we demonstrate that at two critical stages of development, birth and 56 PND, antioxidant protection is insufficient to counteract oxidative damage in ID-subjects. Moreover, we observe that the variability of results in the literature on oxidative stress and ID comes from the sex and age of the subjects under study. With this, we can establish patterns and exact moments to carry out studies or pertinent treatments.

Introduction

Iron is an essential trace element that takes part in oxidoreduction reactions and in numerous biological processes [1-4]. In its reduced form it joins protoporphyrin to make the hemo group which partakes tissue oxygenation; likewise, it is a structural part of antioxidant enzymes, such as: catalases, peroxidases and oxygenases [5]. Its control is necessary for it is a potentially toxic product; one of its most negative effects is the catalytic decomposition of hydrogen peroxide (Fenton's reaction) that leads to reactive oxygen species (ROS), such as the hydroxyl radical that damages the main bio-molecules: lipids, proteins and nucleic acids. Finally, unbalance between ROS production and antioxidant systems generates a phenomenon known as stress or oxidative damage that leads to cellular death [6,7]. ROS present in the process have the capacity to affect the lipid and protein bio- molecules in brain, blood and liver. Iron deficiency (ID) occurs when the requirements of this trace element are not met according to age and sex [8,9]. ID is a public health issue that affects more than 2 billion people worldwide [10-12], of which 30-50% are pregnant women [13].

Some studies have demonstrated that iron deficiency can affect the production of proteins containing Fe^{2+} , such as cytochromes, myoglobin, catalase (CAT) and peroxidase [2,14]. While others mention that young adult women with iron deficiency anemia (IDA) present lymphocytes with damaged DNA possibly from oxidative stress [14]. Isler *et al.* (2002) reported that patients treated with iron improved their IDA and recovered the activity of the superoxide dismutase (SOD) antioxidant enzyme in erythrocytes [15].

Up to present, there are no reports that indicate whether the variability in findings previously described comes for the influence of age, sex and sort of observed tissue. In the present study it was determined by age and sex, in Wistar rat, if ID favors the presence of oxidative stress by comparing three tissues: brain, blood and liver. The categorization by age was carried out on the basis of reports by Spear (2000), in which it is mentioned there is correlation between postnatal days (PND) in rat and stages of human development, corresponding childhood to 21 PND in rats, early adolescence up to 42 PND, adolescence up to 56 PND and finally young adulthood by the end of 70 PND [16,17].

Oxidative stress was determined based on the lipid peroxidation products (LPO) and protein carbonyl content (PCC); antioxidant capacity was evaluated by means of SOD, CAT and GPx activity.

Materials and Methods

Ethics statement

All studies were conducted in accordance with approved institutional protocols in agreement with the Principles and Procedures described by the National Institute of Health, Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the National Institutes of Health, in accordance with the Local Ethics Committee of Animal Experiments of the Autonomous University of the State of Mexico. In order to obtain the samples, the euthanasia was induced with sodium pentobarbital to minimize suffering.

Animals and Diet

Animals were housed under standard colony conditions: 12:12 light/darkness cycle (lights on at 7:00 a.m.), controlled room temperature (22 ± 2 °C), with free access to food and water. A total 10 nulliparous female Wistar rats (3 months of age and 300 g in weight approximately) were used for this study. Of these females, 5 rats were randomly assigned to the "ID" group with a diet supplemented with ferrous sulfate at a nominal dose of 10 ppm [18] (Lab Diets AIN-76w/10), and 5 rats in the control group "C" with a diet containing 100 ppm of ferrous sulfate [19] (Lab diets AIN-76w/100).

Two weeks later, for every 2 females, 2 males were introduced (of 4 months of age or of 400 g body weight) in a home cage for 2 weeks; then, these males were removed. The offspring were weaned at 21 PND, they were divided by sex and 6 pups were placed by home cage. The offspring continued with the same food supply regime as their mothers during the entire experimental process.

Fifteen female and fifteen male offspring from each group (ID or C) were evaluated at different moments, which are equivalent to some stages of human development: 0 PND, childhood (21 PND), early adolescence (42 PND), late adolescence (56 PND) and young adulthood (70 PND).

Sample collection

In order to obtain the samples, euthanasia was induced with sodium pentobarbital (Anestesal) at 1.5 ml/300-400 g live weight, and immediately brain and liver were extracted, being collected in a PBS buffer (pH 7.4) at a ratio of 1ml:3g of sample weight, they were homogenized. On its own, blood was collected in test tubes with EDTA; immediately, this blood underwent sonication (VibraCell, sonics and materials. INC, USA). All the samples were frozen at -70°C and saved for later analysis. The units of the determinations are expressed in relation to the content of total proteins (TP) [20] and the weight of wet tissue in milligrams.

Determination of oxidative stress

Determination of lipid peroxidation products

LPO was determined following Büege and Aust (1978) [21]. 500 μL of supernatant were added to Tris-HCl buffer (pH 7.4) to obtain a volume of 1 mL. This was incubated at 37°C for 30 min; 2 mL of a TCA-TBA reagent (0.375% thiobarbituric acid in 15% trichloroacetic acid) was added and the sample was shaken in a vortex, then placed in a bath of boiling water for 45 min, it was let to cool and the precipitate was removed by means of centrifugation at 3000 rpm for 10 min. Absorbance was read at 535 nm using a reaction blank. Results were expressed as nM malondialdehyde (MDA)/mg wet tissue (nM MDA/mg TP/mg WT) using the molar extinction coefficient of $1.56 \times 10^5 / \text{M} / \text{cm}$.

Determination of protein carbonyl content

PCC was determined by the method of Levine *et al.* (1994) [22]. Soluble proteins were obtained by centrifuging the samples at 10500 rpm for 30 min. 100 μ L of supernatant were added to 150 μ L of 10 mM dinitrophenylhydrazine in 2 M HCl (Sigma) prior to incubation at room temperature for 1 h in the dark. Next, 500 μ L of 20% trichloroacetic acid were added and the sample was allowed to rest for 15 min at 4°C, then centrifuged at 16000 rpm for 5 min. The bud was rinsed three times in 1:1 ethanol:ethyl acetate (Baker), dissolved in 150 μ L of 6 M guanidine (Sigma) pH 2.3, and incubated at 37°C for 30 min. Absorbance was read at 366 nm and results were expressed as nmols of reactive carbonyls formed (C=O)/mg wet tissue (nMC=O/mgTP/mg WT) based on their molar extinction coefficient of 21000 M/cm .

Determination of SOD activity

SOD activity was determined according to Misra and Fridovich. (1972) [23]. To 20 μ L of supernatant in a 1-cm cuvette were added 150 μ L of a carbonate buffer solution (50 mM sodium carbonate and 0.1 mM EDTA) pH 10.2 and 100 μ L adrenaline (30 mM). Absorbance was read at 480 nm, at 30 s and 5 min. SOD activity was determined by interpolating the data on a type curve. Results were expressed as μ M adrenalin/mg TP/mg WT.

Determination of CAT activity

CAT activity was determined according to Radi *et al.* (1991) [24]. To 20 μ L of supernatant were added 1 mL of an isolation buffer solution (0.3 M saccharose, 1 mM EDTA, 5 mM HEPES and 5 mM KH₂PO₄) and 0.2 mL of hydrogen peroxide (20 mM). Absorbance was read at 240 nm, at 0 and 60 s. Results were obtained by substituting the absorbance value of each reading in the formula: catalase concentration= (A₆₀ – A₀)/MEC, where the MEC of H₂O₂ equals 0.043 Mm/cm. Results were expressed as nM H₂O₂ /mg TP/mg WT.

Determination of GPx activity

GPx activity was determined following Paglia and Valentine (1967) [25]. To 100 μL of supernatant were added 900 μL of a buffer reagent solution (5 M K_2HPO_4 , 5 M KH_2PO_4 , 3.5 mM reduced glutathione, 1 mM sodium azide, 2 U glutathione reductase and 0.12 mM NADPH pH 7.0; Sigma) and 200 μL of H_2O_2 (20 mM). Absorbance was read at 340 nm at 0 and 60 s. Activity was estimated using the molar extinction coefficient of NADPH (6.2 mM/cm). Results were expressed as μM NADPH/mg TP/mg WT.

Determination of total protein

To 25 μL of supernatant were added 75 μL of deionized water and 2.5 mL of Bradford's reagent (0.05 g Coomassie Blue dye, 25 mL of 96% ethanol and 50 mL H_3PO_4 , in 500 mL deionized water) [20]. The test tubes were shaken and let to rest for 5 min prior to the reading of absorbance at 595 nm and interpolation on a bovine albumin curve.

Statistical analysis

For the statistical study the SPSS 20 software program, compatible with PC, was employed. The normality analysis of the sample distribution was carried out by means of the Kolmogorov-Smirnov test. Once the abnormality of the samples was valued, nonparametric tests were applied; for such end the Kruskal-Wallis nonparametric test was applied. The differences between each group were analyzed by means of a Man-Whitney U test. Data were reported as means \pm SEM. $p < 0.05$ values were considered statistically significant.

RESULTS

Assessment of oxidative damage

Lipid peroxidation products

In figure 1, one observes the degree of lipoperoxidation in brain, blood and liver in female and male rats, in both the control and ID groups. As it is seen, the heaviest effect of this biomarker took place in brain. In the case of the group control, there was an increment at 70 PND, both in females and males, being statistically higher ($p < 0.05$) in females.

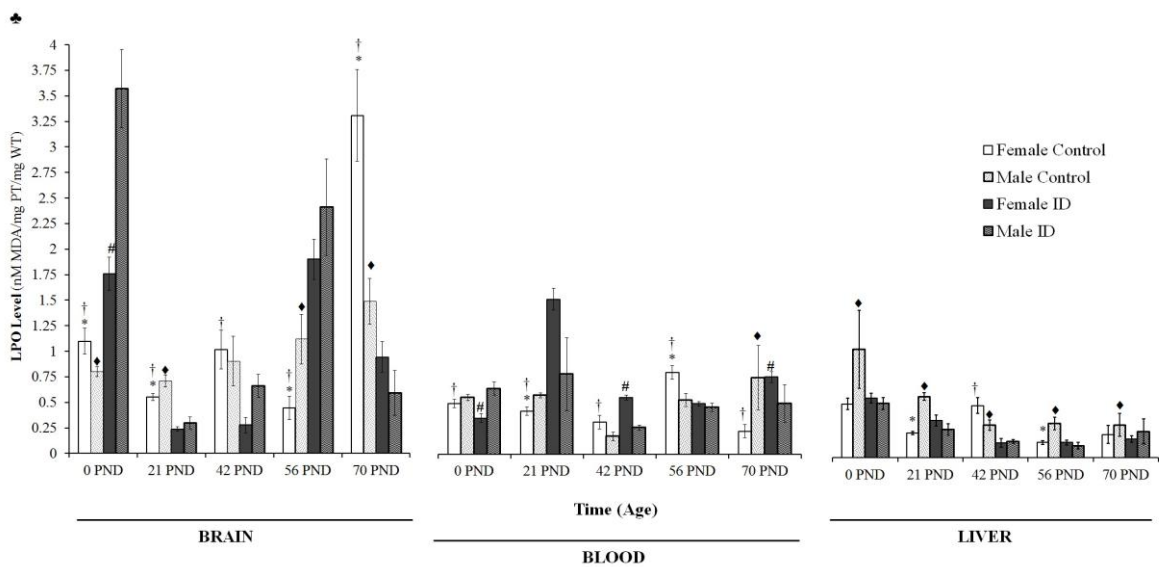


Figure 1. Lipid peroxidation products in iron deficient subjects. The oxidative damage is shown by means of the levels of lipoperoxidation products. All results are presented as mean \pm SEM; * $p < 0.05$ vs. control group males; # $p < 0.05$ vs. ID males; † $p < 0.05$ vs. ID females; □ $p < 0.05$ vs. ID males; □ blood units expressed in mg PT/ml.

In the ID group males were those with the heaviest damage, being statistically significant ($p < 0.05$) at 0 PND; at 56 PND damage statistically increased ($p < 0.05$) in both sexes, unlike in those of the control group. In blood the heaviest damage was observed in ID females at 21 PND.

In each of the studied ages, there were significant differences ($p < 0.05$) between control and ID females. Damage was statistically heavier ($p < 0.05$) in ID females at 21, 42, and 70 PND; in these three periods it was noticed that ID females presented heavier damage levels than ID males ($p < 0.05$).

Protein carbonyl content

In figure 2 the contents of carbonyl protein in brain, blood and liver of females and males of the ID and control groups are observed. In brain, it is noticed that control females present a statistically significant increase ($p < 0.05$) in carbonyl proteins at 56 and 70 PND, unlike control males and ID group.

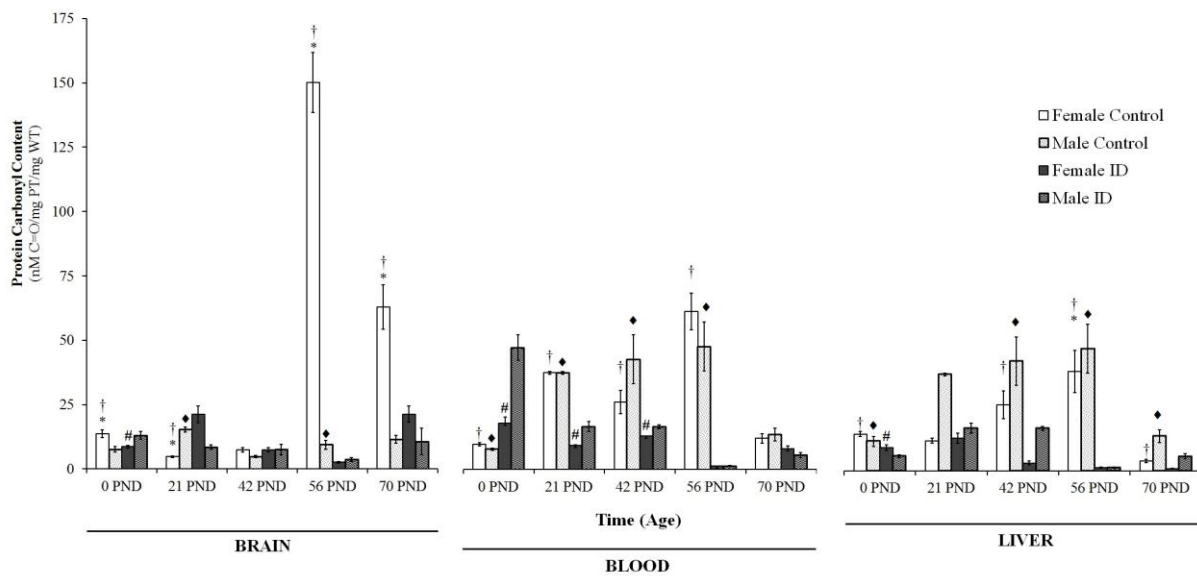


Figure 2. Carbonyl protein content in iron deficient subjects. The content of carbonyl proteins is shown. All results are presented as mean \pm SEM. * $p < 0.05$ vs. control group males; # $p < 0.05$ vs. ID males; † $p < 0.05$ vs. ID females; □ $p < 0.05$ vs. ID males; □ blood units expressed in mg PT/ml.

By and large, for blood the group with the highest level of this bioindicator was that of control, regardless of sex, gradually increasing from 21 to 56 PND. In ID group, males showed a higher content of carbonyl proteins ($p < 0.05$) at 0, 21 and 42 PND. In liver as in the other

tissues, the control group showed higher carbonyl protein content than the ID group. Said content increased gradually in control males at 21, 42 and 56 PND and in control females at 42 and 56 PND. Such increase was higher in males than in control females, presenting statistical differences ($p < 0.05$) at 42 and 56 PND.

Assessment of antioxidant activity

SOD activity

In figure 3, the results of the activity of SOD antioxidant enzyme in brain, blood and liver of female and male rats, in both ID and control are displayed. As noticed in brain, the behavior of control and ID groups was very homogeneous, it only modified SOD activity in ID group at 56 PND ($p < 0.05$). In control group, males, unlike females, showed higher SOD activity at 0 and 21 PND; said activity was statistically significant ($p < 0.05$). Later on, this effect was the opposite in females; they showed a higher SOD activity than males from 42 to 70 PND.

As for the ID group, SOD cerebral activity in males and females had a very homogenous behavior, however at 42 PND females presented higher SOD activity than males. Besides, SOD behavior in ID females increased from 21 to 70 PND, being more evident at 56 PND. In ID males SOD activity is lower than in deficient females, save at 56 PND, when there was a tendency to increase enzymatic activity. As for blood, control group showed a significant increase of this biomarker at 42 PND, remaining stable in the other assessed age groups; however, SOD activity tended to be higher in males than in females as from 21 PND. In the ID group, males presented higher SOD activity than females as from 42 PND; females significantly increased SOD levels at 21 PND, nevertheless. In liver, group control showed a significant increase in SOD at 42 PND, unlike group ID, regardless of sex. In ID group the levels of SOD significantly increased at 56 PND, unlike control group, regardless of sex. Besides, ID females at 70 PND showed a higher SOD activity, unlike the other groups.

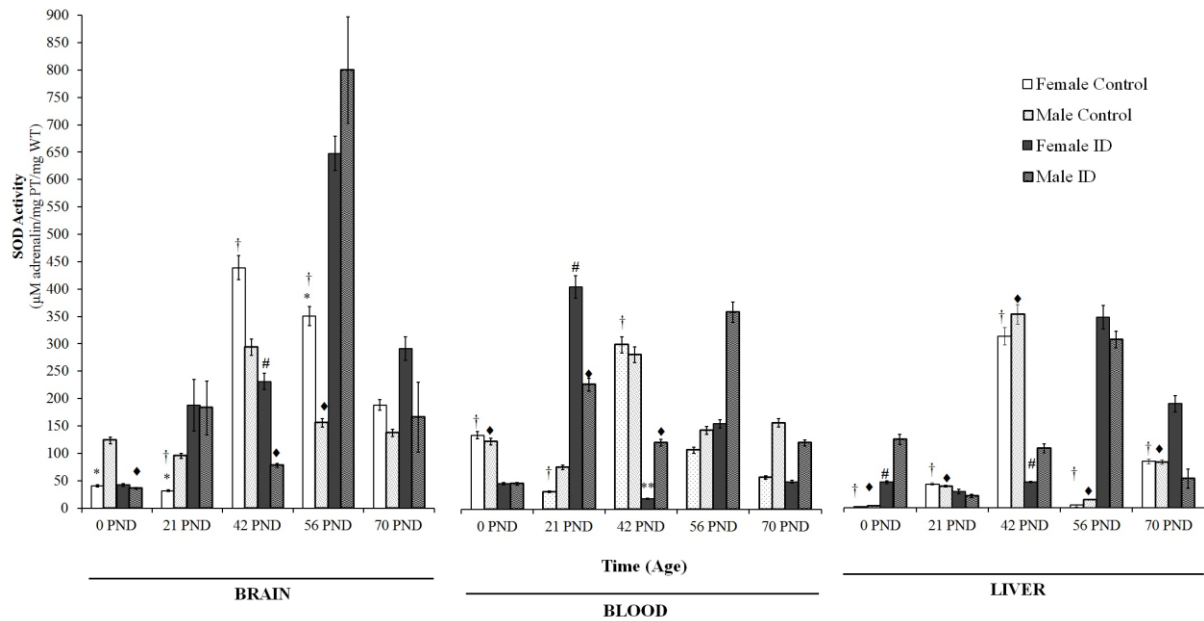


Figure 3. SOD Activity in iron deficient subjects. All results are presented as mean \pm SEM; * $p < 0.05$ between males and females of control group; # $p < 0.05$ between males and females of the ID group; † $p < 0.05$ between control and ID females; □ $p < 0.05$ between control and ID males; □ blood units expressed in mg PT/ml.

CAT activity

In figure 4 the results of the activity of catalase antioxidant enzyme in brain, blood and liver in male and female rats of control and ID groups are shown. In brain CAT activity was very homogeneous, therefore no statistically significant differences were observed between age groups and treatments. As for sex, control females and ID males statistically had higher CAT activity at 0 and 21PND than control males, however CAT activity tended to be higher in ID males than in control females of each age group.

In liver, CAT activity gradually decreased from 0 to 70 PND in all groups. It is worth mentioning that at day 0 the ID subjects presented higher CAT activity than control subjects, at later ages this effect changed, being CAT activity higher in control subjects than in ID ones, regardless of sex.

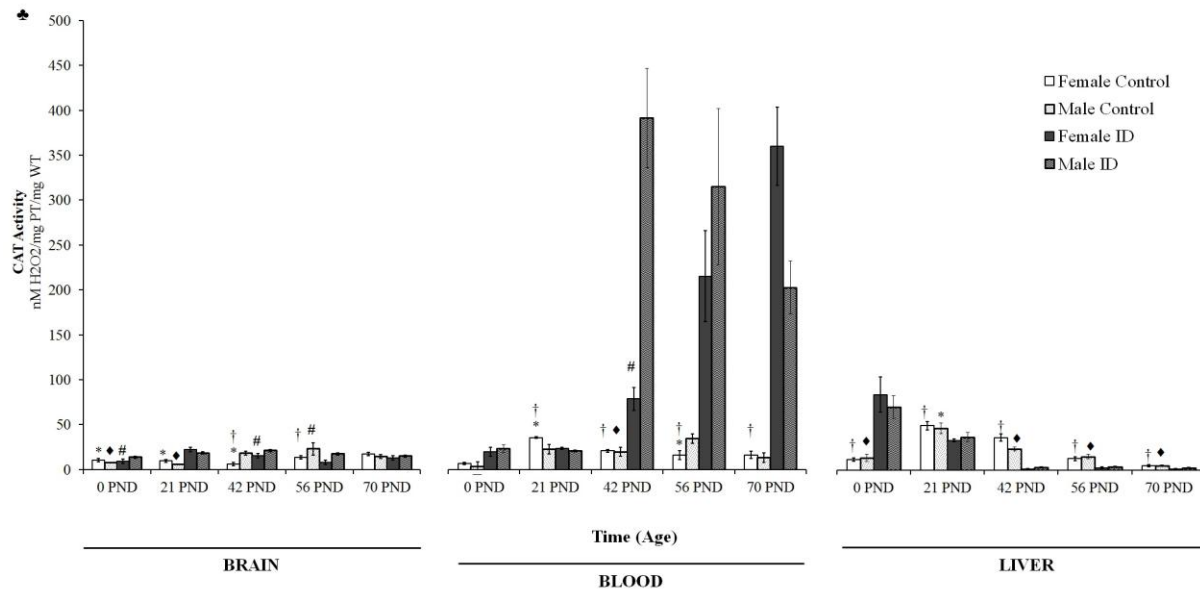


Figure 4. CAT activity in iron deficient subjects. All results are presented as mean \pm SEM; * $p < 0.05$ show statistically significant difference comparing control females and males; # $p < 0.05$ statistically significant difference comparing ID females and males. † $p < 0.05$ comparing control females and ID females; □ $p < 0.05$ comparison control males and ID males; □ blood units expressed in mg PT/mL.

Conversely, unlike other studied tissues, in blood CAT activity was the highest, being significantly higher in ID subjects as from 42 PND. In males, CAT activity decreased gradually from 42 to 70 PND. In females, CAT activity significantly increased from 42 to 70 PND. The behavior of CAT in control subjects was significantly lower than in ID subjects from 42 to 70 PND, regardless of sex, said activity was very homogenous in each age group.

GPx activity

In figure 5 the results of the Glutathione peroxidase antioxidant enzyme in brain, blood and liver in female and male rats of control and ID groups are presented. In brain, at 0 PND higher GPx activity was significantly observed ($p < 0.05$) in control subjects than in ID ones, regardless of sex, at later ages GPx activity decreased and was very homogenous as from 21 PND both in control females and males. In the ID female groups there were no modifications of this

biomarker in time; however, ID males showed an increment in GPx as from 42 to 70 PND. In blood, only a significant increment of this biomarker was observed at 0 PND in the males and females of ID group. Said behavior was similar in liver.

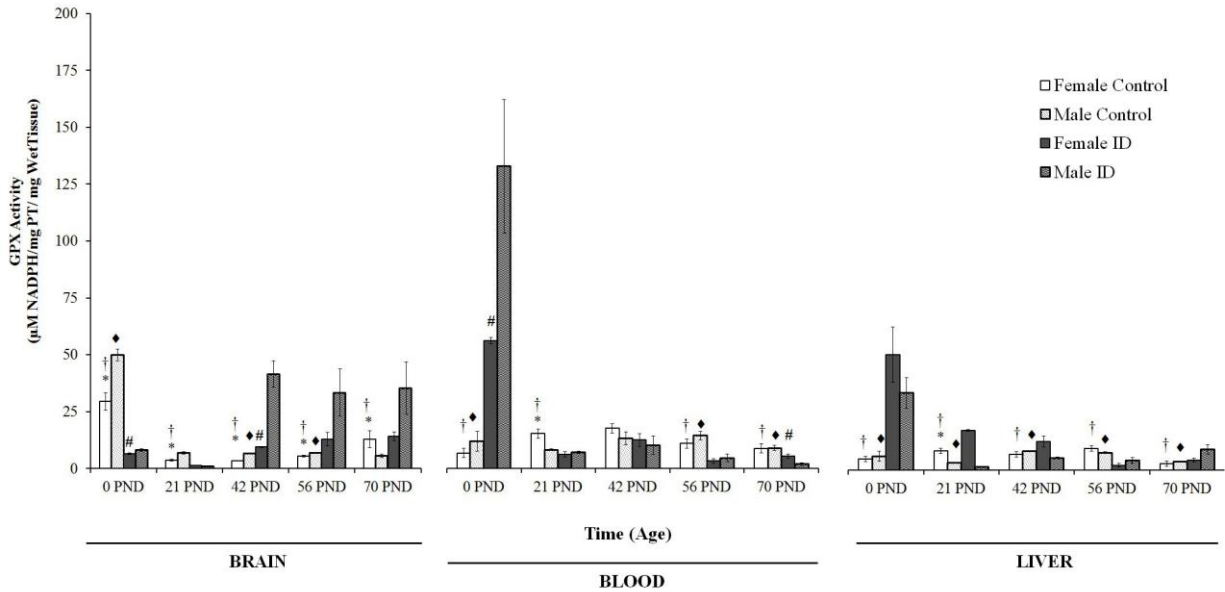


Figure 5. GPX activity in iron deficient subjects. All results are presented as mean \pm SEM; * $p < 0.05$ shows statistically significant comparing control females and males; # $p < 0.05$ statistically significant difference comparing ID females and males; † $p < 0.05$ comparing control females and ID females; □ $p < 0.05$ comparing control males and ID males; □ blood units expressed in mg PT/ml.

Discussion

Studies that associate oxidative stress with an ID situation are controversial as for the role of the antioxidative systems; being so, Isler *et al.* (2002) find a decrease in some antioxidant enzymes, while others do not register changes and others increase [26-30]. This situation may come from the different models resorted to and moments of study; it might be a consequence of a response to the situation faced by the organism.

The present study assesses for the first time the impact of age and sex on the changes in oxidative damage biomarkers unleashed by ID, using Wistar rat as a model. It revealed that both variables have an important role in the intensity and course of oxidative stress associated to ID. The first relevant fact shown by our results is the existence of oxidative stress in ID animals in relation to healthy animals; it is characterized by an increase in the oxidative damage biomarkers (LPO and PCC) and changes in the activity of the antioxidant enzymatic systems. It has been reported that in the presence of ID, the levels of LPO and PCC decrease [31,32]; moreover, self protection against *in vivo* LPO is promoted [33] as well as the production of hydroxyl radicals [31].

In our results we found that ID subjects display a heavy increase in LPO at birth in the three assessed organs. Said fact can be due to the fact that the ID induced in the mother allows the development of placental hyperplasia, therefore the increase of oxygen internalization that favors oxidation and lipid damage [34,35]. As a result from this lipid damage and since in the first PND the antioxidant answer is not fully developed, we find that brain is the most affected organ in ID subjects, regardless of sex. Besides, the especial sensitivity of nervous tissue to oxidative damage must be considered; this comes from its high content of polyunsaturated lipids and oxygen consumption, as well as its reduced antioxidant capacity.

It is worth mentioning that the patterns of enzymatic activity are determined by the levels of systemic iron. Being the requirements of the latter dependent on the physiological state (age and expression of sexual hormones) [36-38]. Since estrogens are excellent endogenous antioxidants, when ID females start the synthesis of sexual hormones, at 21 and 42 PND, they show a lower oxidative damage in brain.

Lipid damage is related to protein damage. In brain, PCC content is lower in ID group, with the exception of females of 56 and 70 days of age; such stages are key in development, since females become prepared for fertility, giving priority to reproductive functions compromising the homeostasis of brain cells, this phenomenon is also verified in blood and liver. In the case of ID males, the main antioxidant protection comes from GPx, being this protection higher than in females as from 42 PND.

The increase of PCC at 56 PND in control females and their later diminution at 70 PND can be associated to the deterioration in enzymatic functionality by aging, loss of antioxidant

vitamins, alpha-tocopherol and ascorbic acid [39], and reproductive stage [16]. However, in control females iron control on its own can be capable of producing oxidative damage [40] and unfortunately this damage could not be counteracted and compromised cell stability.

It is relevant to point out that blood cells have a highly effective antioxidant defense [15] mainly from SOD and GPx in comparison with other sorts of cells. In ID rats the increase of PLO in plasma and the decrease of the antioxidant system have been reported [31,40]; a fact that agrees with our findings at 21 PND, albeit we find that at later ages LPO levels decrease, being damage much lower in males, these data agree with those reported by Kumerova *et al.*, 1998, in IDA subjects. Such an effect can be due to the fact that circulating iron is sequestered, before storing, by hemoglobin and myoglobin; both required for better growing and body mass formation in males. What is more, this finding is related to reports which refer that in ID subjects erythrocytes are more susceptible to oxidation, but in virtue of their antioxidant defense they compensate the damage [41].

Since liver is the main biotransformer organ, it has a mixed-function oxidase complex composed of P450 cytochrome (CYP), a flavoprotein and NADPH. Especially CYP contains a large amount of enzymes with antioxidant activity; because of this it is the organ that showed the least oxidative damage. These data reinforce the idea that ID causes oxidative stress and agree with data from different studies, such as Akca *et al.* (2013) and Aslan *et al.* (2006) [14,27].

The latter reported that lymphocyte DNA damage and oxidative stress are increased in female patients with IDA, and increased oxidative stress seem to be an important factor that induces DNA damage in IDA patients [14]. On the contrary, authors such as Díaz-Castro *et al.* (2008) state that IDA neither affects DNA stability nor lipid peroxidation in male Wistar rats and suggest there is enough compensatory capacity to keep antioxidant defenses high [42]. Groper *et al.* (2003) found that neither non-anemic iron deficiency nor its treatment with daily oral iron supplements is associated with oxidative damage in the plasma of college-aged females [43].

Parallel data are shown by Bay *et al.* (2013) in relation to the antioxidant capability, oxidative state and levels of serumal selenium and zinc in patients with ID and pica [28]. All of this makes it interesting to approach this controversial point; mostly because ID is one of the main pathological processes in the world. Hence, the data here presented would endorse in this ID model and future research: i) the role of the oxidative damage in the pathogenesis of this

process; and, ii) the participation of agents such as age, and sex in the activity of antioxidant enzymes in ID.

Conclusions

Iron deficiency promotes the presence of oxidative stress mainly in brain in two key stages in development at 21 and 56 PND. Oxidative damage affects both sexes; however, in males damage is heavier. Blood and liver are the least affected tissues at birth, in virtue to protection from SOD and GPx. As from 21 PND, when the synthesis of sexual hormones begins, females develop better protection at central level and males at peripheral.

As from 42 PND, antioxidant defense improves, both central and peripheral in ID subjects. In ID males the synthesis of GPx in brain increases, and so does CAT in blood of ID subjects, regardless of sex. It is worth mentioning that in ID females as from 56 PND, when their reproductive functions begin, central protection from SOD decays and peripheral protection is favored, mainly by CAT in blood. On the basis of these observations we elucidate the reason for some of the controversial results in the literature in this respect and contribute with information for future research.

References

1. Crichton RR, Dexter DT, Ward RJ Brain iron metabolism and its perturbation in neurological diseases. *J Neural Transm* 118: 301-314.
2. MacKenzie EL, Iwasaki K, Tsuji Y (2008) Intracellular iron transport and storage: from molecular mechanisms to health implications. *Antioxid Redox Signal* 10: 997-1030.
3. Geissler C, Singh M Iron, meat and health. *Nutrients* 3: 283-316.
4. Torres-Vega A, Pliego-Rivero BF, Otero-Ojeda GA, Gomez-Olivan LM, Vieyra-Reyes P (2012) Limbic system pathologies associated with deficiencies and excesses of the trace elements iron, zinc, copper, and selenium. *Nutr Rev* 70: 679-692.
5. Forrelat B M GdDH, Fernández Delgado N. (2000) Iron metabolism. *Revista Cubana de Hematología e Inmunología* 16: 149-160.

6. Sies H (1997) Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol* 82: 291-295.
7. Halliwell B (2009) The wanderings of a free radical. *Free Radic Biol Med* 46: 531-542.
8. Golub MS, Hogrefe CE, Tarantal AF, Germann SL, Beard JL, et al. (2006) Diet-induced iron deficiency anemia and pregnancy outcome in rhesus monkeys. *Am J Clin Nutr* 83: 647-656.
9. Razmara A, Duckles SP, Krause DN, Procaccio V (2007) Estrogen suppresses brain mitochondrial oxidative stress in female and male rats. *Brain Res* 1176: 71-81.
10. Beard J, Erikson KM, Jones BC (2003) Neonatal iron deficiency results in irreversible changes in dopamine function in rats. *J Nutr* 133: 1174-1179.
11. Brotanek JM, Gosz J, Weitzman M, Flores G (2007) Iron deficiency in early childhood in the United States: risk factors and racial/ethnic disparities. *Pediatrics* 120: 568-575.
12. Zambello E, Zanetti L, Hedou GF, Angelici O, Arban R, et al. (2011) Neuropeptide Y-Y2 receptor knockout mice: influence of genetic background on anxiety-related behaviors. *Neuroscience* 176: 420-430.
13. Georgieff MK (2008) The role of iron in neurodevelopment: fetal iron deficiency and the developing hippocampus. *Biochem Soc Trans* 36: 1267-1271.
14. Aslan M, Horoz M, Kocyigit A, Ozgonul S, Celik H, et al. (2006) Lymphocyte DNA damage and oxidative stress in patients with iron deficiency anemia. *Mutat Res* 601: 144-149.
15. Isler M, Delibas N, Guclu M, Gultekin F, Sutcu R, et al. (2002) Superoxide dismutase and glutathione peroxidase in erythrocytes of patients with iron deficiency anemia: effects of different treatment modalities. *Croat Med J* 43: 16-19.
16. Spear LP (2000) The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. *Neurosci Biobehav Rev* 24: 417-463.
17. Stoker TE, Gibson EK, Zorrilla LM (2010) Triclosan exposure modulates estrogen-dependent responses in the female wistar rat. *Toxicol Sci* 117: 45-53.
18. Bourque SL, Iqbal U, Reynolds JN, Adams MA, Nakatsu K (2008) Perinatal iron deficiency affects locomotor behavior and water maze performance in adult male and female rats. *J Nutr* 138: 931-937.
19. Tanaka M, Kariya F, Kaihatsu K, Nakamura K, Asakura T, et al. (1995) Effects of chronic iron deficiency anemia on brain metabolism. *Jpn J Physiol* 45: 257-263.

20. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
21. Buege J. A. ASD (1979) Microsomal lipid peroxidation. *Meth Enzymol* 52: 302-310.
22. Levine RL, Williams JA, Stadtman ER, Shacter E (1994) Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 233: 346-357.
23. Misra HP, Fridovich I (1972) The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 247: 3170-3175.
24. Radi R, Turrens JF, Chang LY, Bush KM, Crapo JD, et al. (1991) Detection of catalase in rat heart mitochondria. *J Biol Chem* 266: 22028-22034.
25. Paglia DE, Valentine WN (1967) Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 70: 158-169.
26. Acharya J, Panchard NA, Taylor JA, Thompson RP, Pearson TC (1991) Red cell lipid peroxidation and antioxidant enzymes in iron deficiency. *Eur J Haematol* 47: 287-291.
27. Akca H, Polat A, Koca C (2013) Determination of total oxidative stress and total antioxidant capacity before and after the treatment of iron-deficiency anemia. *J Clin Lab Anal* 27: 227-230.
28. Bay A, Dogan M, Bulan K, Kaba S, Demir N, et al. (2013) A study on the effects of pica and iron- deficiency anemia on oxidative stress, antioxidant capacity and trace elements. *Hum Exp Toxicol*.
29. Coghetto Baccin A, Lauerma Lazzaretti L, Duarte Martins Brandao V, Manfredini V, Peralba MC, et al. (2009) Oxidative stress in older patients with iron deficiency anaemia. *J Nutr Health Aging* 13: 666-670.
30. Jansson LT PM, Willis WT, Refino CJ, Dallman PR. (1985) Red cell superoxide dismutase is increased in iron deficiency anemia. *Acta Haematology* 74: 218-221
31. Knutson MD, Walter PB, Ames BN, Viteri FE (2000) Both iron deficiency and daily iron supplements increase lipid peroxidation in rats. *J Nutr* 130: 621-628.
32. Rao J, Jagadeesan V (1996) Lipid peroxidation and activities of antioxidant enzymes in iron deficiency and effect of carcinogen feeding. *Free Radic Biol Med* 21: 103-108.
33. Chandler DB, Barton JC, Briggs DD, 3rd, Butler TW, Kennedy JI, et al. (1988) Effect of

- iron deficiency on bleomycin-induced lung fibrosis in the hamster. *Am Rev Respir Dis* 137: 85-89.
34. Walter PB, Knutson MD, Paler-Martinez A, Lee S, Xu Y, et al. (2002) Iron deficiency and iron excess damage mitochondria and mitochondrial DNA in rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:2264-2269.
35. Toblli JE, Cao G, Oliveri L, Angerosa M Effects of iron deficiency anemia and its treatment with iron polymaltose complex in pregnant rats, their fetuses and placentas: oxidative stress markers and pregnancy outcome. *Placenta* 33: 81-87.
36. Waxman DJ, Holloway MG (2009) Sex differences in the expression of hepatic drug metabolizing enzymes. *Mol Pharmacol* 76: 215-228.
37. Bokov A, Chaudhuri A, Richardson A (2004) The role of oxidative damage and stress in aging. *Mech Ageing Dev* 125: 811-826.
38. Tenorio-Laranga J, Mannisto PT, Karayiorgou M, Gogos JA, Garcia-Horsman JA (2009) Sex-dependent compensated oxidative stress in the mouse liver upon deletion of catechol O- methyltransferase. *Biochem Pharmacol* 77: 1541-1552.
39. Mecocci P, Polidori MC, Troiano L, Cherubini A, Cecchetti R, et al. (2000) Plasma antioxidants and longevity: a study on healthy centenarians. *Free Radic Biol Med* 28: 1243-1248.
40. Kurtoglu E, Ugur A, Baltaci AK, Undar L (2003) Effect of iron supplementation on oxidative stress and antioxidant status in iron-deficiency anemia. *Biol Trace Elem Res* 96: 117-123.
41. Chakraborty D, Bhattacharyya M (2001) Antioxidant defense status of red blood cells of patients with beta-thalassemia and Ebeta-thalassemia. *Clin Chim Acta* 305: 123-129.
42. Diaz-Castro J, Alferez MJ, Lopez-Aliaga I, Nestares T, Granados S, et al. (2008) Influence of nutritional iron deficiency anemia on DNA stability and lipid peroxidation in rats. *Nutrition*, 24: 1167-1173.
43. Gropper SS, Kerr S, Barksdale JM (2003) Non-anemic iron deficiency, oral iron supplementation, and oxidative damage in college-aged females. *J Nutr Biochem* 14: 409-415.

CAPITULO III

REFERENCIAS

8.- REFERENCIAS

1. Valko M, Morris H, Cronin MT. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem.* 2005;12(10):1161-208.
2. Buys Maria C. ING, Beatriz Martin, Carmen E. Miranda, Irma Torrejon, Teresa Garrot. prevalencia de anemia y deficiencia de hierro en escolares jujeños de 12 años. *medicina.* 2005;65:126-30.
3. Toxqui L, De Piero A, Courtois V, Bastida S, Sanchez-Muniz FJ, Vaquero MP. [Iron deficiency and overload. Implications in oxidative stress and cardiovascular health]. *Nutr Hosp.* 2010 May-Jun;25(3):350-65.
4. Andrews NC. Disorders of iron metabolism. *N Engl J Med.* 1999 Dec 23;341(26):1986-95.
5. Iyengar. KMNyV. Iron content, bioavailability & factors affecting iron status of Indias. *Indian Journal Med Research.* 2009;130:634-45.
6. Kohgo Y, Ikuta K, Ohtake T, Torimoto Y, Kato J. Body iron metabolism and pathophysiology of iron overload. *Int J Hematol.* 2008 Jul;88(1):7-15.
7. Moos T, Rosengren Nielsen T, Skjorringe T, Morgan EH. Iron trafficking inside the brain. *J Neurochem.* 2007 Dec;103(5):1730-40.
8. Lozoff B, Beard J, Connor J, Barbara F, Georgieff M, Schallert T. Long-lasting neural and behavioral effects of iron deficiency in infancy. *Nutr Rev.* 2006 May;64(5 Pt 2):S34-43; discussion S72-91.
9. Sura GR, Daubner SC, Fitzpatrick PF. Effects of phosphorylation by protein kinase A on binding of catecholamines to the human tyrosine hydroxylase isoforms. *J Neurochem.* 2004 Aug;90(4):970-8.
10. Kell DB. Iron behaving badly: inappropriate iron chelation as a major contributor to the aetiology of vascular and other progressive inflammatory and degenerative diseases. *BMC Med Genomics.* 2009;2:2.
11. Wang J, Pantopoulos K. Regulation of cellular iron metabolism. *Biochem J.* Mar 15;434(3):365-81.

12. Zivna H, Zivny P, Vokurkova D, Svejtkovska K, Palicka V. The effect of chronic iron losses on liver regeneration in male and female rats. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2010 Jun;154(2):153-8.
13. Lukowski AF, Koss M, Burden MJ, Jonides J, Nelson CA, Kaciroti N, et al. Iron deficiency in infancy and neurocognitive functioning at 19 years: evidence of long-term deficits in executive function and recognition memory. *Nutr Neurosci.* Apr;13(2):54-70.
14. Jomova K, Vondrakova D, Lawson M, Valko M. Metals, oxidative stress and neurodegenerative disorders. *Mol Cell Biochem.* Dec;345(1-2):91-104.
15. Toblli JE, Cao G, Oliveri L, Angerosa M. Effects of iron deficiency anemia and its treatment with iron polymaltose complex in pregnant rats, their fetuses and placentas: oxidative stress markers and pregnancy outcome. *Placenta.* Feb;33(2):81-7.
16. Abilés J. Estres oxidativo y su relacion con el aporte de antioxidantes nutricionales en el paciente critico. Tesis de Doctorado. 2007;Universidad de Granada.
17. Carney Almroth B, Albertsson E, Sturve J, Forlin L. Oxidative stress, evident in antioxidant defences and damage products, in rainbow trout caged outside a sewage treatment plant. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2008 Jul;70(3):370-8.
18. van der Oost R, Beyer J, Vermeulen NP. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2003 Feb;13(2):57-149.
19. Day BJ. Catalase and glutathione peroxidasa mimics. *Biochemical Pharmacology.* 2009;77:285-96.
20. Steinberg D. Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. *J Biol Chem.* 1997 Aug 22;272(34):20963-6.
21. Junqueira VB, Barros SB, Chan SS, Rodrigues L, Giavarotti L, Abud RL, et al. Aging and oxidative stress. *Mol Aspects Med.* 2004 Feb-Apr;25(1-2):5-16.
22. Knutson MD, Walter PB, Ames BN, Viteri FE. Both iron deficiency and daily iron supplements increase lipid peroxidation in rats. *J Nutr.* 2000 Mar;130(3):621-8.
23. Bokov A, Chaudhuri A, Richardson A. The role of oxidative damage and stress in aging. *Mech Ageing Dev.* 2004 Oct-Nov;125(10-11):811-26.
24. Comporti M, Signorini C, Buonocore G, Ciccoli L. Iron release, oxidative stress and erythrocyte ageing. *Free Radic Biol Med.* 2002 Apr 1;32(7):568-76.

25. Shacter E. Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. *Drug Metab Rev.* 2000 Aug-Nov;32(3-4):307-26.
26. Baird C. *Química Ambiental*. Editorial Reverté. 2001;México:391-429.
27. Stohs SJ, Bagchi D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic Biol Med.* 1995 Feb;18(2):321-36.
28. Isler M, Delibas N, Guclu M, Gultekin F, Sutcu R, Bahceci M, et al. Superoxide dismutase and glutathione peroxidase in erythrocytes of patients with iron deficiency anemia: effects of different treatment modalities. *Croat Med J.* 2002 Feb;43(1):16-9.
29. Aslan M, Horoz M, Kocyigit A, Ozgonul S, Celik H, Celik M, et al. Lymphocyte DNA damage and oxidative stress in patients with iron deficiency anemia. *Mutat Res.* 2006 Oct 10;601(1-2):144-9.
30. Olivares M. G. WTK. Consequences of iron deficiency. *Rev Chil Nutr.* 2003;30:226-33.
31. Diaz-Castro J AM, López-Aliaga I, Nestares T, Granados S, Barrionuevo M, Campos MS. Influence of nutritional iron deficiency anemia on DNA stability and lipid peroxidation in rats. *Nutrition.* 2008.;24:1167-73.
32. Martínez-Salgado Homero CE, Rivera-Dommarco Juan , Viteri Fernando E. , Bourgues-Rodríguez Héctor. Iron deficiency and anemia in Mexican children. Preventive and therapeutic interventions. *Bol Med Hosp Infant Mex.* 2008:86-99.
33. Raso Giuseppina M CI, Emanuela Esposito, Carmen Maffetone, Anna Iacono, Antonio Di Pascale, Rita Santamaria, Alfredo Colonna y Rosaria Meli. Ovariectomy and estrogen treatment modulate iron metabolism in rat adipose tissue. *Biochemical Pharmacology.* 2009;78:1001-7.
34. Forrellat B. M GH, Fernández N. Iron metabolism. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter.* 2000;16(3):149-60.
35. Borrás M. Hormone dependency of splenic iron stores in the rat: effect of oestrogens on the recuperation of reserves in ferropdeficient subjects. *Lab Anim.* 1998 Jul;32(3):290-7.
36. Spear LP. The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. *Neurosci Biobehav Rev.* 2000 Jun;24(4):417-63.
37. Stoker TE, Gibson EK, Zorrilla LM. Triclosan exposure modulates estrogen-dependent responses in the female wistar rat. *Toxicol Sci.* 2010 Sep;117(1):45-53.
38. Geissler C, Singh M. Iron, meat and health. *Nutrients.* Mar;3(3):283-316.

39. Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol.* 1956 Jul;11(3):298-300.
40. Bourque SL, Komolova M, Nakatsu K, Adams MA. Long-term circulatory consequences of perinatal iron deficiency in male Wistar rats. *Hypertension.* 2008 Jan;51(1):154-9.
41. Tanaka M, Kariya F, Kaihatsu K, Nakamura K, Asakura T, Kuroda Y, et al. Effects of chronic iron deficiency anemia on brain metabolism. *Jpn J Physiol.* 1995;45(2):257-63.
42. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976 May 7;72:248-54.
43. Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 1978;52:302-10.
44. Burcham PC. Modified protein carbonyl assay detects oxidised membrane proteins: a new tool for assessing drug- and chemically-induced oxidative cell injury. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2007 Jul-Aug;56(1):18-22.
45. Parvez S, Raisuddin S. Protein carbonyls: novel biomarkers of exposure to oxidative stress-inducing pesticides in freshwater fish *Channa punctata* (Bloch). *Environ Toxicol Pharmacol.* 2005 Jul;20(1):112-7.
46. Levine RL, Williams JA, Stadtman ER, Shacter E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 1994;233:346-57.
47. Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem.* 1972 May 25;247(10):3170-5.
48. Radi R, Turrens JF, Chang LY, Bush KM, Crapo JD, Freeman BA. Detection of catalase in rat heart mitochondria. *J Biol Chem.* 1991 Nov 15;266(32):22028-34.
49. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med.* 1967 Jul;70(1):158-69.

CONCLUSIONES GENERALES

La deficiencia de Fe incrementa los niveles de lipoperoxidación y contenido de proteínas carboniladas en los órganos evaluados existiendo diferencias significativas entre edad y sexo.

La actividad enzimática de SOD esta incrementada, es mayor en el grupo Dfe, disminuye con el progreso de la edad y difiere entre sexo.

Las Enzimas CAT y GPX, se encuentran disminuidas en ambos grupos.

CAT en sangre compensa el daño dentro del grupo deficiente de Fe, en hembras de 56DPN y 70 DPN.

GPX expresa mayor protección al nacimiento en el grupo deficiente Fe, en sangre sobre los machos y en hígado sobre las hembras.

El órgano con mayor protección es la sangre.

Las hembras y machos deficiente de Fe, logran compensar el daño oxidativo mediante la activación incrementada de SOD, y la propia Dfe actúa como protector.

