



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLAS DE HIDALGO**

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO BIOLÓGICAS

**ESTRÉS OXIDATIVO Y NITROSATIVO EN MITOCONDRIAS DE RIÑÓN DE
RATA EN EDAD AVANZADA DURANTE LA
DIABETES MELLITUS EXPERIMENTAL**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
**MAESTRA EN CIENCIAS EN
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**PRESENTA
I.BQ. ROCÍO VIRIDIANA PÉREZ GALLARDO**

DIRECTOR DE TESIS:

D.C. ALFREDO SAAVEDRA MOLINA

MORELIA, MICHOACÁN.

MARZO DEL 2009.

ÍNDICE GENERAL

Páginas	
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
ÍNDICE DE TABLAS	vi
LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	vii
RESUMEN	ix
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Diabetes mellitus (DM): Definición, clasificación y diagnóstico	1
1.2 Alteraciones metabólicas de la DM	3
1.3 Epidemiología de la DM	5
1.4 Fisiopatología de la DM	7
1.5 Nefropatía diabética (ND)	9
1.6 La mitocondria	13
1.7 Estrés oxidativo y nitrosativo	16
1.7.1 Especies reactivas de oxígeno (ERO)	16
1.7.1.1 Radical superóxido	16
1.7.1.2 Peróxido de hidrógeno	17
1.7.1.3 Radical hidroxilo	18
1.7.2 Especies reactivas de nitrógeno (ERN)	18
1.7.2.1 Óxido nítrico	19
1.7.2.2 Peroxinitrito	23
1.7.3 Daño a biomoléculas por ERO y ERN	23
1.7.3.1 Daño a lípidos	25
1.7.3.2 Daño a proteínas	26
1.7.3.3 Daño de los ácidos nucleicos	26
1.8 Defensas antioxidantes mitocondriales	27
1.8.1 Antioxidantes enzimáticos	27

1.8.1.1 Superóxido dismutasa	27
2.8.1.2 Glutación peroxidasa	27
2.8.1.3 Glutación reductasa	27
1.8.2 Antioxidantes no enzimáticos	28
2.8.2.1 Glutación	28
1.9 La aconitasa	31
2. JUSTIFICACIÓN	34
3. HIPÓTESIS	34
4. OBJETIVOS	34
4.1 Objetivo General	34
4.2 Objetivos Específicos	34
5. MATERIALES Y MÉTODOS	35
5.1 Reactivos	35
5.2 Material biológico	35
5.3 Inducción de la diabetes	35
5.4 Aislamiento y purificación de mitocondrias de riñón de rata	36
5.5 Determinación de la proteína mitocondrial	36
5.6 Determinación de lipoperoxidación	37
5.7 Determinación de óxido nítrico	38
5.8 Análisis por Western Blot	39
5.9 Determinación la actividad de la glutación reductasa (GR)	40
5.10 Determinación del glutación reducido (GSH)	41
5.11 Determinación de la actividad de la aconitasa	43
5.12 Análisis estadístico	43

6. RESULTADOS	44
6.1 Niveles de glucosa en sangre	44
6.2 Peso de los animales postinducción	45
6.3 Análisis de los síntomas de la DM	46
6.4 Análisis por Western Blot de la citocromo c oxidasa y actina	48
6.5 Niveles de lipoperoxidación postinducción	50
6.6 Niveles de óxido nítrico postinducción	51
6.7 Perfil de nitrosilación de proteínas postinducción	52
6.8 Actividad de la glutatión reductasa y niveles de glutatión reducido postinducción	54
6.9 Actividad de la aconitasa postinducción	55
7. DISCUSIÓN	57
8. RESUMEN DE RESULTADOS	65
9. CONCLUSIÓN	65
10. BIBLIOGRAFÍA	66
11. APÉNDICE	79

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Activación de vías metabólicas por sobreproducción del anión superóxido mitocondrial como respuesta al incremento del flujo de glucosa	5
Figura 2.- Distribución porcentual de DM, por grupos de edad y sexo.	6
Figura 3.- Distribución porcentual de las primeras causas de daño renal	8
Figura 4.- Nefrona, unidad estructural y funcional del riñón	9
Figura 5.- Visión general del metabolismo	11
Figura 6.- Estructura mitocondrial	14
Figura 7.- Reacción general catalizada por las óxido nítrico sintasas (NOS)	19
Figura 8.- Excreción de $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ ($\mu\text{mol}/24\text{h}$) en ND temprana	21
Figura 9.- Excreción de $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ en ND tardía	21
Figura 10.- Representación esquemática de los cambios del óxido nítrico en nefropatía temprana y tardía, así como sus efectos patofisiológicos	22
Figura 11.- Diagrama de lipoperoxidación	25
Figura 12.- Estructura del glutatión	29
Figura 13.- Síntesis y ciclo redox del glutatión	30
Figura 14.- Reacción de la aconitasa	31
Figura 15a.- Estructura tridimensional de la aconitasa	32
Figura 15b.- Centro $[4\text{Fe}-4\text{S}]^{2+}$ unido al sustrato, el citrato	32
Figura 16.- Inactivación de la aconitasa mitocondrial de corazón de cerdo por peroxinitrito	33
Figura 17.- Diagrama de lipoperoxidación y formación del aducto Malondialdehído-ácido tiobarbitúrico (MDA-TBA)	37
Figura 18.- Determinación indirecta del óxido nítrico	38

Figura 19.- Reacción del GSH con Ácido 5,5-ditiobis(2-nitrobenzónico) (DTNB)	42
Figura 20.- Niveles de glucosa en sangre postinducción	44
Figura 21.- Efecto de la diabetes sobre el peso de los animales	45
Figura 22.- Fotografía que muestra el efecto de la diabetes sobre el peso de los animales	46
Figura 23.- Análisis de los síntomas de la DM	47
Figura 24.- Inmunodetección de la citocromo c oxidasa, como marcador mitocondrial	48
Figura 25.- Inmunodetección de actina como marcador citosólico	49
Figura 26.- Niveles de lipoperoxidación postinducción en mitocondrias de riñón de rata	50
Figura 27.- Niveles de óxido nítrico postinducción en mitocondrias de riñón de rata	51
Figura 28.- Perfil de nitrosilación de proteínas por peroxinitrito en mitocondrias de riñón de rata	53
Figura 29.- Actividad de la GR postinducción en mitocondrias de riñón de rata	54
Figura 30.- niveles de GSH postinducción en mitocondrias de riñón de rata	55
Figura 31.- Actividad de la aconitasa postinducción en mitocondrias de riñón de rata en edad avanzada	56
Figura 32.- Modelo propuesto de daño oxidativo y nitrosativo en mitocondrias de riñón de rata en edad avanzada. Sucesos representativos en las primeras tres semanas de DM	63
Figura 33.- Modelo propuesto de daño oxidativo y nitrosativo en mitocondrias de riñón de rata en edad avanzada. Sucesos representativos en la etapa final del estudio de la DM	64

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Valores de glucosa para el diagnóstico de DM	3
Tabla 2.- Enzimas presentes en distintas zonas mitocondriales	15
Tabla 3.- Medio 1 para el aislamiento de mitocondrias de riñón de rata	79
Tabla 4.- Medio 2 para el aislamiento de mitocondrias de riñón de rata	79
Tabla 5.- Mezcla de reacción para la determinación de proteína por el método de Biuret	80
Tabla 6.- Medio base para TBARS	80
Tabla 7.- Medio base para determinación de $\cdot\text{NO}$	80
Tabla 8.- Curva estándar de $\cdot\text{NO}$	81
Tabla 9.- Medio base para la determinación de la actividad de la aconitasa	81

LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

Acetil-CoA	Acetil-coenzima A
Acil-CoA	Acil-coenzima A
ADP	Adenosin difosfato
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AGE	Productos terminales de glucosilación avanzada
AGP	Ácidos grasos poliinsaturados
anti-3-NT	Anti-3-nitrotirosina
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Adenosin trifosfato
BH₄	Tetrahidrobiopterina
CAC	Ciclo del ácido cítrico
CO₂	Dióxido de carbono
CTE	Cadena transportadora de electrones
Cu²⁺	Catión cuprico
DAG	Diacilglicerol
DM	Diabetes mellitus
DTNB	Ácido 5,5-ditiobis(2-nitrobenzóico)
ERN	Especies reactivas de nitrógeno
ERO	Especies reactivas de oxígeno
FADH	Dinucleótido de adenina y flavina reducido
Fe²⁺	Catión ferroso
GLUT	Transportador de glucosa
GPx	Glutación peroxidasa
GR	Glutación reductasa
GSSG	Glutación oxidado
GSH	Glutación reducido
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
kDa	Kilodalton
L'	Radical lipídico
LM	Lanzadera de malato-aspartato
LOO	Peróxido lipídico
LOOH	Hidroperóxido
M	Marcador de masa molecular
MDA	Malondialdehído
Mn-SOD	Superóxido dismutasa mitocondrial
NAD⁺	Dinucleótido de nicotinamina y adenina
NADH	Dinucleótido de nicotinamina y adenina reducido
NADPH	Dinucleótido de nicotinamina y adenina fosfato reducido
ND	Nefropatía diabética
NED	N-1-naftiletildiamina
NO	Óxido nítrico
NO₂⁻/NO₃⁻	Nitritos/nitratos

NOS_e	Óxido nítrico sintasa endotelial
NOS_i	Óxido nítrico sintasa inducible
NOS_{mt}	Óxido nítrico sintasa mitocondrial
NOS_n	Óxido nítrico sintasa neuronal
O₂	Oxígeno
O₂⁻	Anión superóxido
OH[•]	Radical hidroxilo
OMS	Organización Mundial de la Salud
ONOO⁻	Peroxinitrito
Pi	Fosfato inorgánico
PKC	Proteína cinasa C
PTPm	Poro de la transición de la permeabilidad mitocondrial
rpm	Revoluciones por minuto
SD	Desviación estándar
STZ	Estreptozotocina
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico
TNB	Ácido 5-tio (2-nitrobenzoico).
TP	Transportador de piruvato
UDP	Uridil difosfato

RESUMEN

Estudios recientes sugieren que la diabetes mellitus (DM) está relacionada con una sobreproducción de especies reactivas de oxígeno y/o de nitrógeno causada por la hiperglucemia, y que este evento es clave en la patogénesis de las complicaciones asociadas a la diabetes. Estadísticas muestran que el grupo más afectado por estas complicaciones son las personas en edad avanzada. La cadena respiratoria de las mitocondrias es la principal fuente de las especies reactivas de oxígeno (ERO), por lo que se sugiere que es el paso inicial y principal acontecimiento involucrado en la nefropatía diabética, una de las complicaciones más frecuentes, así como la primera causa de daño renal y responsable de más del 35% de las muertes dentro de la población diabética. Con el objetivo de evaluar el estrés oxidativo y nitrosativo durante la DM, en el presente trabajo se realizaron determinaciones de lipoperoxidación, óxido nítrico (NO), perfil de nitrosilación de proteínas por peroxinitrito ($\text{ONOO}^\cdot$), actividad de la glutatión reductasa (GR), niveles de glutatión reducido (GSH), así como la actividad de la aconitasa como marcadores de estrés oxidativo y nitrosativo en mitocondrias de riñón de rata en edad avanzada durante la DM, estas se realizaron a las 1, 3, 6, 9 y 12 semanas posterior a la inducción de la DM experimental. Los resultados registraron un aumento en los niveles de lipoperoxidación en función del tiempo de DM (0.340 ± 0.022 nmoles/mg de proteína vs. DM 0.688 ± 0.013 nmoles/mg de proteína a la 1ª semana postinducción y al final del análisis 0.479 ± 0.055 nmoles/mg de proteína vs. DM 0.941 ± 0.051 nmoles/mg de proteína). De igual manera, se incrementaron los niveles de NO en la 1ª semana, de 0.549 ± 0.045 $\mu\text{moles/mg}$ de proteína a 1.003 ± 0.003 $\mu\text{moles/mg}$ de proteína, pero posteriormente se observó una tendencia a disminuir a la 12ª semana, obteniéndose niveles de NO de 0.359 ± 0.039 $\mu\text{moles/mg}$ de proteína vs. DM de 0.262 ± 0.026 $\mu\text{moles/mg}$ de proteína. En el perfil de nitrosilación, también se observó un incremento durante el tiempo de diabetes y en la actividad de la aconitasa, se registró un aumento a la 1ª semana, de 0.0232 ± 0.006 mmoles *cis*-aconitato/mg de proteína/min. a 0.0360 ± 0.006 mmoles *cis*-aconitato/mg de proteína/min en la DM. Estos valores disminuyeron de 0.0219 ± 0.002 mmoles *cis*-aconitato/mg de proteína/min a 0.011 ± 0.001 mmoles *cis*-aconitato/mg de proteína/min en la DM. Respecto a las defensas antioxidantes, la actividad de la GR permaneció indistinta hasta la

3^a semana, posteriormente, disminuyó de 0.009 ± 0.00012 μ moles TNB/mg de proteína/min a 0.007 ± 0.0002 μ moles TNB/mg de proteína/min en la DM, mientras que los niveles de GSH a la 3^a semana incrementaron de 0.032 ± 0.003 μ moles TNB/mg de proteína a 0.051 ± 0.003 μ moles TNB/mg de proteína en la DM; sin embargo, se observó una disminución de 0.019 ± 0.002 μ moles TNB/mg de proteína a 0.008 ± 0.003 μ moles TNB/mg de proteína en la DM. Estos resultados sugieren que la hiperglucemia durante la DM promueve el estrés oxidativo y nitrosativo en mitocondrias de riñón de rata en edad avanzada.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Diabetes mellitus

El término diabetes mellitus (DM) describe diferentes trastornos metabólicos que resultan de alteraciones en la secreción de la insulina, en la respuesta periférica a la misma o en ambas; lo que conduce a un síndrome caracterizado por hiperglucemia crónica y alteraciones del metabolismo de carbohidratos, proteínas y lípidos.

Los efectos de la DM incluyen daño a largo plazo, que se manifiestan como disfunción y falla en varios órganos. Presenta síntomas característicos, los cuales consisten en una producción excesiva de orina (poliuria), sed (polidipsia), hambre constante, pérdida de peso, alteraciones visuales y fatiga. En un estado más severo puede desarrollarse cetoacidosis y sin un tratamiento adecuado, puede conducir a un coma diabético y finalmente a la muerte (OMS, 1979).

Clasificación

Hasta el momento, se han descrito por lo menos cuatro variedades de la enfermedad (OMS, 1997), pero la gran mayoría de los casos corresponde a dos clases principales: la DM tipo 1 y la tipo 2.

En la **DM tipo 1**, la característica más relevante es la destrucción de las células beta del páncreas, de manera que la producción de insulina es nula o insignificante. Sin la administración diaria de insulina exógena, este tipo de diabetes lleva rápidamente a la muerte.

En la **DM tipo 2**, el rasgo principal es la resistencia de los tejidos periféricos a la acción de la insulina, como resultado de alteraciones en los eventos bioquímicos posteriores a la unión de la hormona con su receptor, y en casos menos frecuentes a alteraciones en el receptor, que se debe en gran parte a la inactividad física y al peso corporal excesivo de un individuo.

Hasta hace poco este tipo de diabetes sólo se observaba en los adultos, pero ahora también empieza a presentarse en niños obesos. La DM tipo 2 es la más frecuente en la población mexicana, al igual que en la población mundial.

Otros tipos específicos de diabetes, en estas categorías se incluyen diferentes formas de diabetes derivadas principalmente de defectos genéticos en la función de las células beta, defectos genéticos en la acción de la insulina y pancreopatías.

La **diabetes gestacional** es la hiperglucemia que se identifica por vez primera durante el embarazo. Sus síntomas son similares a los de la diabetes de tipo 2, pero suele diagnosticarse por las pruebas realizadas durante los exámenes prenatales, más que por la manifestación de síntomas. Las alteraciones de la tolerancia a la glucosa y de la glucemia en ayunas son trastornos de transición entre la normalidad y la DM. Los pacientes con estos trastornos tienen mayor riesgo de progresar hacia la DM de tipo 2, aunque esto no es inevitable.

Existen grupos de individuos que tienen glucemias anormales que condicionan un alto riesgo de desarrollar diabetes.

Intolerancia a la glucosa y glucemia de ayuna alterada

La intolerancia a la glucosa se caracteriza por una respuesta anormal a una sobrecarga de glucosa suministrada por vía oral. Este estado se asocia a una mayor prevalencia de patología cardiovascular y a riesgo de desarrollar diabetes clínica (5-10% por año).

Glucemia de ayuno alterada se caracteriza por el hallazgo de una glucemia de ayuno entre 110 y 125 mg/dl. Su identificación sugiere realizar una prueba de sobrecarga de glucosa oral, para clasificación definitiva.

En un estudio de sobrecarga oral a la glucosa (75 g), las glucemias normales son:

Basal < 110, a los 30, 60 y 90 minutos < 200 y los 120 minutos post sobrecarga < 140 mg/dL

Diagnóstico

El diagnóstico de la DM se realiza en base a valores ya establecidos por la Organización Mundial de la Salud (Tabla 1).

Tabla 1. Valores de glucosa para el diagnostico de DM.

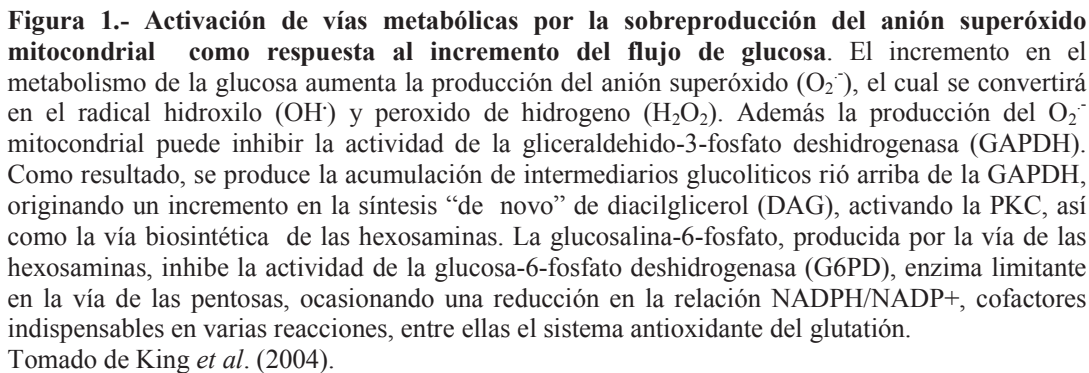
Concentración de glucosa, mmol l ⁻¹ (mg dL ⁻¹)			
	Sangre total		Plasma
	Venosa	Capilar	
Ayuno	≥6.1 (≥110)	≥6.1 (≥110)	≥7.0 (≥126)
2 h posterior a una carga de glucosa	≥10.0 (≥180)	≥11.1 (≥200)	≥11.1 (≥ 200)

Tomado y modificado de OMS (1997).

1.2 Alteraciones metabólicas

Cuatro vías metabólicas son activadas en condiciones de hiperglucemia las cuales producen daños celulares: (1) aumento en el flujo de la vía de los polioles. (2) incremento de los productos de glucosilación avanzada (AGE). (3) la activación de las isoformas de la proteína cinasa C (PKC) y (4) aumento de la vía de la hexosamina. La elevada hiperglucemia produce la conversión enzimática de glucosa a sorbitol, que es metabolizado por la sorbitol deshidrogenasa a fructosa, con un incremento en la relación de NADH/NAD. Este modelo metabólico favorece la oxidación de triosas fosfato y promueve la formación “de novo” de diacilglicerol (DAG) (Brownlee, 2001), el cual es un potente activador de la PKC. El metabolismo de la glucosa puede dar origen a la síntesis de ácidos grasos y a la generación de moléculas señal derivadas de lípidos, tales como ácidos grasos de cadena larga, por sus siglas en inglés LC-FA acil CoA y el DAG. El aumento en la producción de oxígeno en las células beta del páncreas en respuesta al elevado metabolismo de la glucosa,

puede dar lugar a la activación de la NADPH oxidasa a través de un aumento de DAG y la posterior activación de PKCas (Morgan *et al.*, 2007). Los azúcares reductores (glucosa, glucosa-6-fosfato y fructosa) pueden reaccionar con un grupo amino libre para generar una base de Schiff. La formación de la base de Schiff es relativamente rápida siendo altamente reversible. Sin embargo, el ordenamiento es mucho más rápido, originando un producto Amadori (Ulrich y Cerami, 2001). Estos productos tienden a ser acumulados en proteínas originando los productos de glucosilación avanzada (AGE), provocando modificaciones en las proteínas glucosiladas y por lo tanto, pérdida de función de las mismas (Yan *et al.*, 1994). La biosíntesis de la hexosamina es una vía adicional al metabolismo de la glucosa que puede mediar algunos de los efectos tóxicos de este monosacárido (Du *et al.*, 2000). Bajo condiciones metabólicas usuales, de 2-5% de la glucosa que entra a la célula se dirige a la vía de la hexosamina, a partir de la conversión de fructosa 6-fosfato a glucosamina 6-fosfato por la glutamina fructosa 6-fosfato amidotransferasa (James *et al.*, 2002). La hiperglucemia lleva a la sobreproducción de superóxido el cual inhibe significativamente la actividad de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (Du *et al.*, 2000) y activa las vías relacionadas con los daños inducidos por la hiperglucemia esto por el desvío de metabolitos glucolíticos a la síntesis de hexosaminas. El producto final de esta vía, la UDP-N-acetilglucosamina, es el sustrato para la glucosilación de proteínas intracelulares (McClain y Crook, 1996), que incluyen factores de transcripción afectando la expresión de varios genes (Gabriely *et al.*, 2002; Goldberg *et al.*, 2002). Es posible que la sobreproducción de superóxido inducida por la glucosa pueda regular los flujos metabólicos a través de estas vías (Fig.1).



En la actualidad, la DM plantea un grave problema mundial de salud pública, debido a que ha aumentado su incidencia y prevalencia, en particular en los países en vías de desarrollo o de reciente industrialización.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) calcula que en el mundo hay más de 180 millones de personas con diabetes y es probable que esta cifra aumente a más del doble en el 2030. Casi la mitad de las muertes por diabetes ocurren en pacientes de menos de 70 años, de las cuales el 55% son mujeres. La OMS calcula que las muertes por diabetes aumentarán en más de un 50% en los próximos 10 años si no se toman medidas urgentes. Es más, se prevé que entre el 2008 y el 2015, las muertes por diabetes aumenten en más de un 80% en los países de ingresos medios altos.

En México, el registro realizado por la Federación Mexicana de Diabetes en el 2007, estimó que existen alrededor de 6.5-10 millones de mexicanos que padecen DM; con una prevalencia del 25%, siendo ligeramente mayor en las mujeres que en los hombres a partir de los 50 años. En 1980 ocupó el noveno lugar como causa de muerte, para colocarse a finales de los 90, en el tercer y primer lugar en el grupo de pacientes de 55 a 64 años. Estas alarmantes cifras se asocian a un cambio en la alimentación y disminución de la actividad física cotidiana.

Las complicaciones de la DM son las responsables de la mayor parte del gasto económico sanitario directo (hospitalizaciones, visitas ambulatorias, tratamiento farmacológico, tiras reactivas e instrumentos para la automonitorización); sin embargo, en cuanto al gasto social derivado de la enfermedad, las complicaciones contribuyen más a los costos indirectos que llevan asociados, como pérdida de la productividad, jubilación anticipada, muerte prematura antes de la jubilación, entre otros. Por otra parte, la DM presenta un costo intangible considerable por el estrés, dolor y ansiedad que la enfermedad porta, y que puede reducir la calidad de vida, tanto de enfermos como de familiares (Rubio y Álvarez, 1998).

Las estadísticas muestran que la población más afectada (90%) son personas en edad avanzada, tanto a nivel mundial, como a nivel nacional (INEGI, 2005), por tal motivo nuestro modelo biológico fue realizado con ratas en edad equiparable a los seres humanos (Fig. 2).

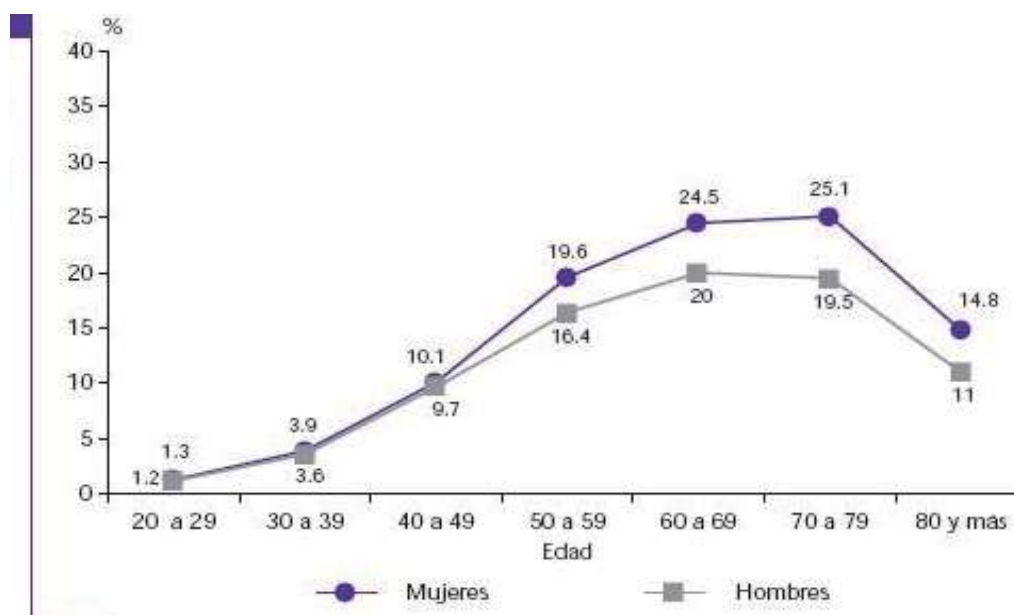


Figura 2.- Distribución porcentual de DM, por grupos de edad y sexo. En la grafica se observa que la mayor incidencia (superior al 25%) de la población diabética son personas de 50 a 70s años de edad. (INEGI, 2005).

1.4 Fisiopatología

Las manifestaciones clínicas de la DM son variadas y en muchas ocasiones inespecíficas, aunque la mayoría de los signos y de los síntomas están relacionados con la hiperglucemia sostenida o con la resistencia a la insulina.

Las complicaciones en los pacientes con diabetes pueden ser agudas o crónicas. Es poco frecuente que la primera manifestación sea un cuadro agudo de descompensación (cetoacidosis o coma hiperosmolar). Al paciente diabético se le identifica cuando manifiesta alguna complicación crónica de la enfermedad. Estas complicaciones, dependiendo de si afectan los vasos capilares sanguíneos, pequeños o de mayor calibre, se clasifican en micro y macrovasculares, respectivamente. Las primeras se relacionan principalmente con daño al endotelio y el músculo liso de la microvasculatura y se

manifiesta como nefropatía, retinopatía y neuropatía diabética. Este tipo de complicaciones surgen por influencias genéticas sobre las cuales se yuxtaponen trastornos metabólicos y hemodinámicos, que tienen como característica anatómica el engrosamiento de las membranas basales de los vasos capilares, lo que posteriormente conduce a angiopatía oclusiva, hipoxia y daño del tejido. El aumento de estas complicaciones se correlaciona en la mayoría de los casos con la severidad y duración de la hiperglucemia crónica. Por ejemplo, niveles postprandiales de glucosa superiores a 11 mM (200 mg/dL), se asocian frecuentemente con las complicaciones renales, de retina y neurológicas. (Turner *et al.*, 1999). En gran medida las complicaciones de la diabetes inducida por la hiperglucemia, se originan por cambios químicos y funcionales de las proteínas, alteración en la expresión de los genes y daño del endotelio (De Vriese *et al.*, 2000). La nefropatía es una de las complicaciones más frecuentes durante la diabetes y es la primera causa de daño renal (Fig. 3). También, es responsable de más del 35% de las muertes dentro de la población diabética (OMS, 2007).

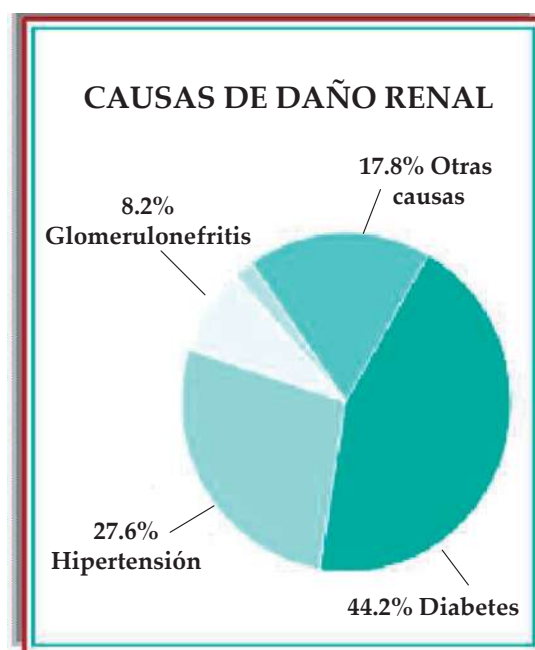


Figura 3.-Distribución porcentual de las principales causas de daño renal. La figura muestra la nefropatía diabética (ND) como la causa más importante de insuficiencia renal a nivel mundial (44.2%). (OMS, 2007).

1.5 Nefropatía diabética

El riñón tiene como principal función el filtrado de la sangre de forma selectiva y altamente eficiente, para permitir eliminar sustancias indeseables manteniendo otras en sus niveles adecuados y un volumen de líquido corporal correcto. El agua sobrante y el resto de desechos son eliminados por la orina de la sangre que le llega por la arteria renal. Cada riñón tiene en su corteza alrededor de un millón de minúsculas unidades llamadas nefronas, y es en ellas donde se lleva a cabo la filtración. Las nefronas están formadas por una pequeña bolsa llamada cápsula de Bowman. En el interior de esta bolsa se agrupa un entramado de capilares sanguíneos, que en su conjunto se denomina glomérulo (Fig. 4).

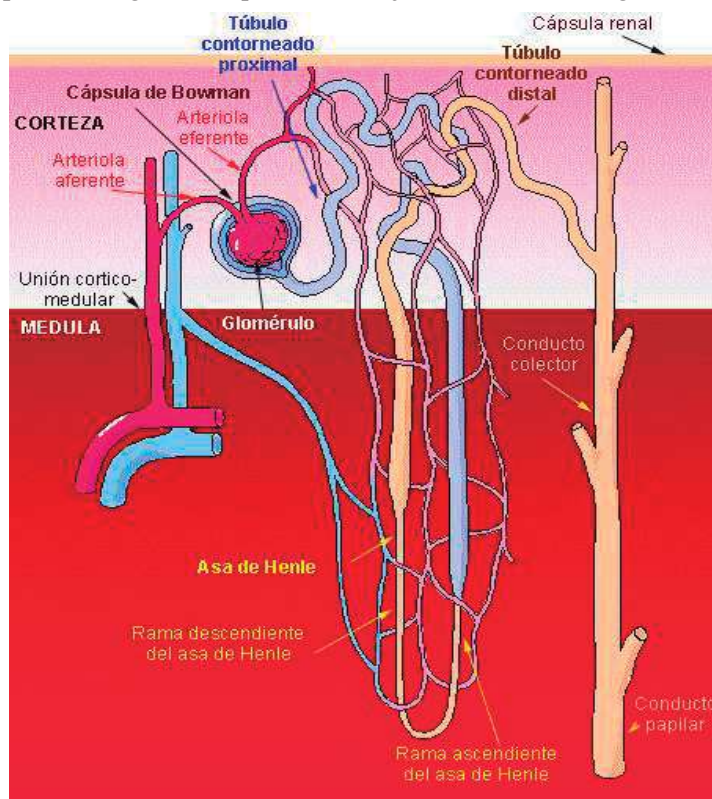


Figura 4.- Nefrona, unidad estructural y funcional del riñón.

La sangre entra en el corpúsculo renal a través de la arteriola aferente y sale por la arteriola eferente. La filtración de la sangre se verifica en la cápsula de Bowman, saliendo la orina producida por un conducto o túbulo especial. La pared exterior o capa parietal de la cápsula de Bowman está separada de la pared interior o capa visceral por el llamado espacio capsular o espacio de Bowman. A medida que la sangre fluye a través de los capilares de los glomérulos, el agua y algunos solutos se filtran pasando al espacio de Bowman. Tomado de <http://www.iqb.es/CBasicas/Fisio/cap26/figuras/rinon1.jpg>.

En los vasos del glomérulo se produce la filtración y el producto de esta filtración es depositado en el espacio de la cápsula de Bowman; éste se comunica con unos conductos tubulares, donde tras sufrir diversos procesos de concentración, llega a los uréteres.

Las lesiones fundamentales de la nefropatía diabética se producen en el glomérulo al producirse alteraciones en estas arteriolas, dando lugar a pérdida de proteínas que alteran la función renal debido a la acumulación de productos derivados de la glucosa en los pequeños vasos y cambios en la presión con que llega la sangre al glomérulo renal.

Por la función que tiene el riñón, consume bastante energía en la reabsorción de nutrientes de la orina y por lo tanto, es activo en gluconeogénesis (formación de nueva glucosa) en caso de ayunas. La glucosa utilizada por el riñón ingresa a las células renales vía transportadores insulina-independientes en donde es fosforilada y metabolizada mediante la ruta de la glucólisis produciendo piruvato, el cual entra a la mitocondria vía transportadores de piruvato, en donde es convertido en acetil-CoA, y posteriormente en el ciclo del ácido cítrico (CAC) es oxidado a CO_2 y H_2O , generando a su vez equivalentes reductores, los cuales alimentan la cadena respiratoria sintetizando así ATP (Fig. 5).

La estructura del riñón está profundamente alterada en prácticamente todos los pacientes diabéticos, incluso en aquellos no destinados a desarrollar nefropatía diabética establecida, la cual se define como albuminuria mayor de 300 miligramos por día y progresiva disminución en el filtrado glomerular (Gross *et al.*, 2005). Uno de los primeros cambios que ocurre a los pocos meses del diagnóstico de la diabetes, es el engrosamiento renal causado por la hipertrofia celular dentro de los túbulos y glomérulos. Casi todos los pacientes desarrollarán engrosamiento de la membrana basal glomerular y tubular a los 2 ó 3 años del diagnóstico de la diabetes. Sin embargo, sólo algunos llegarán a desarrollar expansión del mesangio glomerular y fibrosis intersticial, las marcas patológicas de la nefropatía diabética progresiva (Ziyadeh y Goldfarb, 1991).

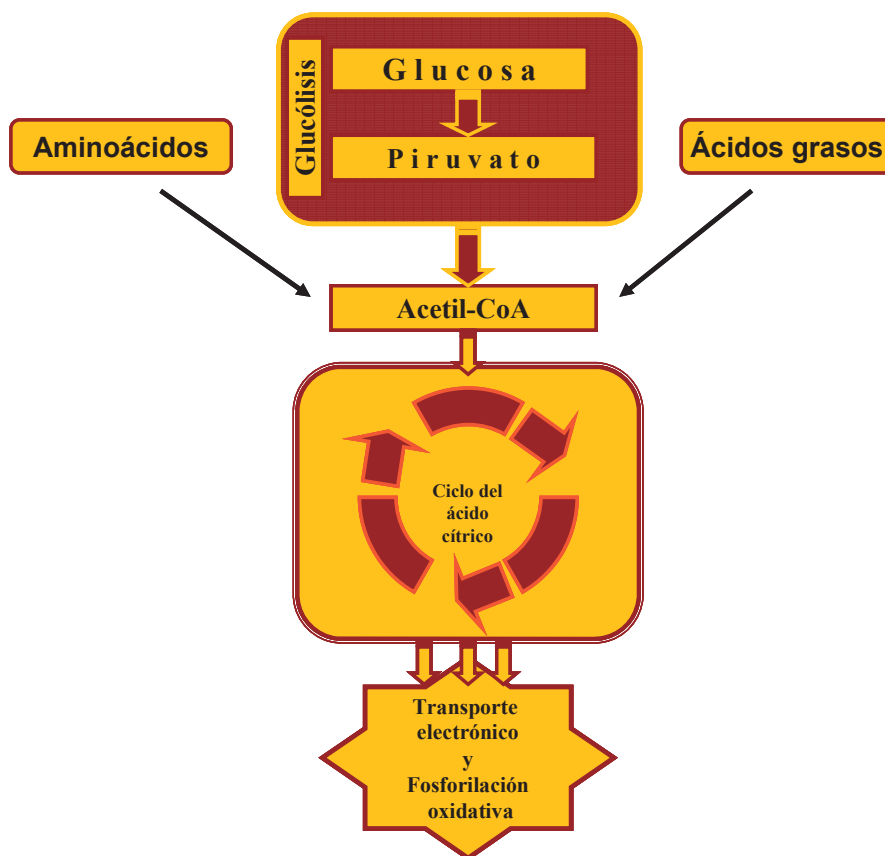


Figura 5.- Visión general del metabolismo. Los carbonos de los combustibles metabólicos se incorporan a la acetil-CoA. Posteriormente en el ciclo del ácido cítrico, la oxidación del carbono produce CO_2 , transportadores electrónicos reducido y una pequeña cantidad de ATP. Por ultimo, los transportadores electrónicos se reoxidan, aportando energía para la síntesis de más ATP. Tomado y modificado de Mathews y Van Holde (2004).

La elevada concentración de glucosa en el espacio extracelular define el estado diabético, pero la tasa del metabolismo de la glucosa intracelular dicta el desarrollo de la nefropatía diabética. Las células renales no requieren de insulina para la captación de la glucosa, pues poseen transportadores transmembranales que mueven la glucosa a través de la membrana celular mediante transporte facilitado. La glucosa difunde debido a un gradiente menor de concentración y la captación, la fosforilación y el metabolismo de la glucosa incrementan en proporción a la concentración de glucosa circulante.

Entre las distintas isoformas de transportadores de glucosa (GLUT), las más ampliamente expresadas en el riñón son GLUT-1 y GLUT-2. Una peculiaridad del riñón en el estado diabético, es que un ambiente alto en glucosa regula positivamente la transcripción génica y la producción proteica de GLUT-1 en células mesangiales. Esto provoca mayor captación de glucosa y su utilización celular. Se ha mostrado que sobreexpresando GLUT-1 en células mesangiales de rata, la captación de glucosa se incrementó incluso cuando las células fueron cultivadas con concentraciones normales de glucosa, las células se comportaron como si estuvieran cultivadas en alta glucosa, manifestando un incremento en la síntesis de proteínas de la matriz extracelular (Heilig *et al.*, 1995). Por lo tanto, es el flujo incrementado de glucosa a través de múltiples vías metabólicas intracelulares el responsable de la acumulación de matriz extracelular en células mesangiales.

La nefropatía diabética (ND) no es solamente la causa principal de la enfermedad renal terminal, sino que es una de las complicaciones más importantes de la diabetes de larga evolución. Además, se ha observado que ha tenido un crecimiento más acelerado en la última década.

El exagerado incremento de la diabetes como causa de insuficiencia renal ha hecho que sea considerado por muchos autores como un proceso con características epidémicas y no parece presentar tendencia hacia la estabilización. En algunos países como Estados Unidos, más del 45% de los pacientes en diálisis son diabéticos (Digestive and Kidney Diseases, USA. 2000). La epidemiología de la ND ha sido estudiada mejor en pacientes con diabetes tipo 1, ya que el tiempo de comienzo es habitualmente conocido. Se ha sugerido que del 35% al 55% de los pacientes con este tipo de diabetes, desarrollarán enfermedad renal clínicamente evidente a lo largo de su vida. La incidencia real de la enfermedad es sin embargo, sustancialmente mayor, ya que al menos otro 20%-30% tiene microalbuminuria subclínica (Moreno *et al.*, 2000).

Las especies reactivas de oxígeno (ERO) y nitrógeno (ERN), juegan un papel primordial en el desarrollo de la ND. Existen evidencias que demuestran que el estrés oxidativo y consecuente daño oxidativo observado en condiciones de hiperglucemia

comienza en la mitocondria, por ser el principal productor de ERO. Estudios sugieren que esto puede ser la clave central en muchas de las patologías de la diabetes.

1.6 La mitocondria

Las mitocondrias son orgánulos celulares de forma globular, poseen un diámetro de 0.5 μm y mide alrededor de 7 μm de longitud. Se localizan en todas las células excepto en las bacterias, las arqueas y los eritrocitos maduros del organismo multicelular. Su número en las células del cuerpo humano varía de acuerdo a la cantidad de trabajo que la célula lleva a cabo. En el caso de las nefronas, la cantidad de mitocondrias es elevada, principalmente en el túbulo proximal debido al gran requerimiento energético (Loewy y Siekevitz, 1983). Ya que las mitocondrias son las estructuras celulares encargadas de producir la mayor parte de la energía celular en forma de adenosín trifosfato (ATP), energía contenida en los enlaces químicos de los macronutrientes, éstos sufren procesos de degradación, muchos de cuyos pasos involucran reacciones redox. En la figura 5 se muestra que después de algunas vías oxidativas específicas para cada macronutriente, los productos resultantes de las mismas, acaban convergiendo en el CAC. Los hidrógenos provenientes de la reducción de determinados compuestos de estas vías son conducidos mediante deshidrogenasas a la cadena transportadora de electrones (CTE), que como su nombre lo indica, va a ser la encargada del transporte de electrones procedentes del hidrógeno, lo cual lleva consigo graduales liberaciones de energía, que se utilizan para sintetizar ATP, a partir de adenosín difosfato (ADP) y fosfato inorgánico (Pi), mediante una reacción acoplada a la CTE, denominada fosforilación oxidativa. Por otra parte, al final de la CTE, H^+ , e^- y el oxígeno molecular, generan agua endógena.

Estructuralmente la mitocondria está constituida por una doble membrana, separando dos compartimentos (Fig. 6). La membrana externa es lisa y poco elástica, con un 40% de lípidos y un 60% de proteínas, presentando mayor cantidad de colesterol y fosfolípidos que la membrana interna. Esta membrana es permeable a moléculas de bajo peso molecular (no superiores a 10,000 Da). La membrana interna presenta una serie de pliegues, llamados crestas mitocondriales cuyo número está relacionado con la intensidad respiratoria del tejido; está constituida por 30% de lípidos y 70% de proteínas, presenta

poco colesterol y es muy rica en ácidos grasos insaturados, lo que explica su baja viscosidad y su susceptibilidad a la lipoperoxidación (Mathews y Van Holde, 2004).



Figura 6.- Estructura mitocondrial.

La mitocondria esta formada por cuatro subregiones diferentes: la membrana externa, la membrana interna, el espacio intermembranal y la matriz, situada dentro de la membrana interna, la cual es muy plegada, formando crestas que se proyectan hacia el interior de la mitocondria. Tomado de <http://www.monografias.com/trabajos48/respiracion-celular/respiracion-celular2.shtml>.

La estructura se completa con un espacio intermembranal y una matriz rodeada por la membrana interna; la matriz mitocondrial es una fase gelatinosa, donde tiene lugar el ciclo de Krebs o ciclo del ácido cítrico. La mitocondria dado su papel clave en la generación de energía celular, muestra una gran riqueza enzimática, fundamentalmente de vías oxidativas, biosintéticas, de transporte y las necesarias para la expresión del genoma mitocondrial, destacando de modo especial las que se muestran en la tabla 2.

Tabla 2.- Enzimas presentes en distintas zonas mitocondriales.

MEMBRANA EXTERNA	NADH-citocromo b ₅ reductasa Quinurenina hidroxilasa Glicerol fosfato acil transferasa Fosfolipasa A	Monoamino oxidasa A. fosfatidico fosfatasa Nucleosido difosfoquinasa	Citocromo b ₅ Lisofosfatidil acil transferasa Elongasa de los ácidos grasos
ESPACIO INTERMEMBRANA	Adelinato quinasa (miocinasa) Nucleosido monofosfoquinasa	Nucleosido difosfoquinasa	
MEMBRANA INTERNA	NADH-coenzima Q reductasa Ubiquinol-citocromo c reductasa β-hidroxibutirato deshidrogenasa Carnitina acil transferasa ATP sintetasa	Succinato-coenzima Q reductasa Citocromo c oxidasa Piridin nucleotido transhidrogenasa Ferroquelatasa ATP translocasa	
MATRIZ	Piruvato deshidrogenasa α-cetoglutarato deshidrogenasa Citrato sintasa Aconitasa Isocitrato deshidrogenasa (NAD) Isocitrato deshidrogenasa (NADP) Fumarasa Glutamato deshidrogenasa Piruvato carboxilasa	Aspartato aminotransferasa Ornitina Carbamiltransferasa Carbamil fosfato sintetasa Acil-CoA sintetasa Acil-CoA deshidrogenasa Enoil hidrasa β-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa β-cetoacil-CoA tiolasa Enzima activadora de los aminoácidos	ARN polimerasa ADN polimerasa

Tomada de Mataix (2005).

Las mitocondrias son la principal fuente intracelular de especies reactivas de oxígeno (ERO), las cuales se incrementan con la edad y estas son también uno de los principales blanco de las ERO.

El funcionamiento de las mitocondrias es especialmente susceptible al daño oxidativo, conduciendo a la disminución en la síntesis del ATP mitocondrial, pérdida de la homeostasis del calcio celular e inducción de la apertura del poro de transición de la permeabilidad mitocondrial (PTPm), los cuales predisponen a la célula a necrosis o apoptosis (Mataix, 2005).

Existen evidencias que demuestran que el incremento de estrés oxidativo y consecuente daño observado en condiciones de hiperglucemia comienza en la mitocondria, por ser el principal sitio productor de ERO (Giugliano y Ceriello 1996).

1.7 Estrés oxidativo y nitrosativo

Estudios recientes sugieren que la DM está relacionada con una sobreproducción de especies reactivas de oxígeno causada por la hiperglucemia y que este evento es clave en la patogénesis de las complicaciones asociadas a la diabetes, como ocurre particularmente en la retina y el glomérulo renal (Giugliano y Ceriello 1996; Feldman *et al.*, 1997; Ruggiero *et al.*, 1997; McDonagh y Hokama 2000; Vinik *et al.*, 2000; Kowluru y Kennedy, 2001; Chang *et al.*, 2003).

El estrés oxidativo puede producirse como consecuencia de un incremento de la exposición a oxidantes o del descenso de la protección contra estos oxidantes; ambos problemas pueden ocurrir simultáneamente (Davies, 1999). De hecho, se define el estrés oxidativo como un desequilibrio entre la producción de ERO y la protección antioxidante (enzimáticos y no enzimáticos) (Sies, 1985; Halliwell y Gutteridge, 1989). De la misma manera el estrés nitrosativo se refiere al desbalance entre especies reactivas de nitrógeno (ERN) y los sistemas antioxidantes. Tanto el estrés oxidativo como el nitrosativo, provocado por cualquiera de estas causas, puede causar daño a proteínas, lípidos, carbohidratos y ácidos nucleicos. De este modo, enzimas y proteínas estructurales, membranas, carbohidratos simples y compuestos, ADN y ARN, son todos ellos susceptibles de daño oxidativo (Sies, 1985; Fridovich, 1995; Davies, 1999).

1.7.1 Especies reactivas de oxígeno

1.7.1.1 Radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$)

Se trata de un radical cargado negativamente, formado como consecuencia de la reducción del oxígeno molecular.



Son variados los sistemas enzimáticos y no enzimáticos en donde se produce el radical superóxido, siendo la mitocondria el principal productor, ya que en la cadena respiratoria del 2 al 4 % del oxígeno consumido es reducido parcialmente por los electrones provenientes de los transportadores de dicha cadena (Green *et al.*, 2004). Así, los principales sitios productores del radical superóxido son los complejos I y III de la cadena transportadora de electrones.

El O_2^- puede reaccionar con una gran variedad de compuestos orgánicos e inorgánicos, tales como quinonas, metales de transición, ascorbato, alfa tocoferol, catecolaminas, tioles, hemoproteínas (Cortés *et al.*, 2004) y enzimas como la aconitasa, (Green *et al.*, 2004) entre otros. Además, este radical ha sido implicado en la fisiología y patología de varios trastornos como Alzheimer, Huntington y Parkinson, así como en el proceso de envejecimiento (Delaval *et al.*, 2004).

Entre otras fuentes de O_2^- encontramos el escape de electrones del P_{450} en el retículo endoplasmico hepático, como productos durante el proceso de fagocitosis en la respuesta inflamatoria, o reacciones como las catalizadas por la xantina oxidasa, etc., (McCord, 1989).

Es importante señalar que el O_2^- cuenta con efectos benéficos, pero a dosis moderadas e implican funciones fisiológicas. Entre sus actividades, se ha observado su función como vasoconstrictor en células de músculo liso (Laurindo *et al.*, 1991) o su actividad antibacteriana en células fagocitarias activadas (McCord, 1989).

A pH bajo el O_2^- podría protonarse (HO_2^-) siendo capaz de generar lipoperoxidación “*in vitro*” al poder reaccionar con los ácidos grasos insaturados, aunque “*in vivo*” se a demostrado su tendencia a reaccionar con lipoperóxidos ya formados (Cheeeman, y Sleter 1993).

1.7.1.2 Peróxido de hidrógeno

Es un metabolito del oxígeno formado por la dismutación del O_2^- catalizada por la superoxido dismutasa.



El H_2O_2 no es un radical libre puesto que no posee ningún electrón desapareado, pero se incluye dentro del término genérico “especies reactivas de oxígeno” por su alta reactividad en presencia de metales de transición generando un potente oxidante, el radical hidroxilo ($\text{OH}^\cdot$) (Fridovich. 1995).

1.7.1.3 Radical hidroxilo

Es el radical más reactivo entre las especies oxigénicas conocidas, capaz de reaccionar, de modo directo con casi cualquier molécula biológica, las reacciones ocurren a una velocidad muy elevada (Fridovich. 1995).

El mecanismo de producción del $\text{OH}^\cdot$ es principalmente por la descomposición del H_2O_2 en presencia de metales de transición, principalmente el ión ferroso (Fe^{2+}) y cúprico (Cu^{2+}), por la reacción de Fenton (Minotti *et al.*, 1987).



Este radical es el principal responsable del daño a los lípidos de membrana, generando así la lipoperoxidación, una de las principales consecuencias del estrés oxidativo.

1.7.2 Especies reactivas de nitrógeno

La producción de óxido nítrico (NO) promueve la generación de diversas especies reactivas de nitrógeno (ERN), las cuales son capaces de reaccionar con biomoléculas por medio de reacciones tales como oxidación, hidroxilación, nitrosilación y nitración. Esto puede ocurrir en condiciones fisiológicas normales, sin embargo, en ciertas condiciones donde se presente una elevada producción de ERN, la cual supere a las defensas antioxidantes, se establece una condición patológica conocida como “estrés nitrosativo”(Valko *et al.*, 2007; Guzmán *et al.*, 2006).

1.7.2.1 Óxido nítrico

El óxido nítrico ($\cdot\text{NO}$) es un radical libre diatómico, de vida media corta y sintetizado en los organismos vivos a partir de L-arginina, por una familia de enzimas denominadas óxido nítrico sintasas (NOS), cuya reacción se muestra en la Figura 7.

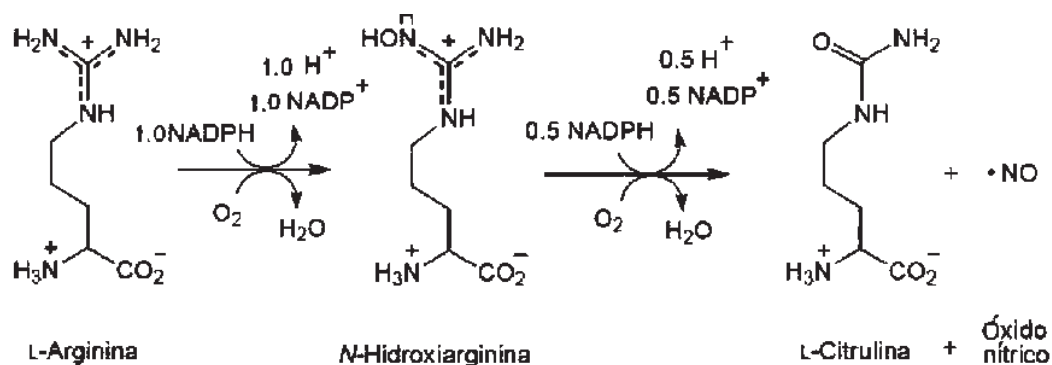


Figura 7.- Reacción general catalizada por la NOS. La óxido nítrico sintasa (NOS) cataliza la oxidación del amino guanidino de la L-arginina para generar óxido nítrico y L- citrulina, con la formación del intermediario N-hidroxi-L-arginina. En esta reacción se transfieren 5 electrones. Tomada y modificada de Ghafourifar y Saavedra-Molina (2006).

El $\cdot\text{NO}$ es importante en la fisiología de muchos organismos, ya que está implicado en diversos procesos, tales como la neurotransmisión, la vasodilatación, la respuesta inmune y en la mitocondria, regula el consumo de oxígeno. Diferentes isoformas de la NOS han sido caracterizadas: la NOSn y la NOSe (también denominadas NOS neuronal y endotelial, respectivamente), las cuales se expresan de manera constitutiva; la NOSi (NOS inducible) es sintetizada en respuesta a estímulos inmunológicos o inflamatorios; y por último la NOSmt (NOS mitocondrial), la cual se ha sugerido que es una modificación postraduccional de la NOSn. El $\cdot\text{NO}$ es capaz de reaccionar con metaloproteínas que contienen grupos hemo, con el oxígeno y con especies reactivas de oxígeno (ERO) (López-Figueroa *et al.*, 2000).

El óxido nítrico mitocondrial compite con el O_2 por el sitio de unión binuclear a_3 -Cu del complejo IV y el consumo de O_2 de una manera reversible. La inhibición del consumo de O_2 por el $\cdot NO$ disminuye el potencial transmembranal y el gradiente electroquímico (Ghafourifar, 1997). La regulación fisiológica del consumo de oxígeno representa un efecto benéfico, sin embargo, si la inhibición por óxido nítrico de la citocromo oxidasa es prolongada, ocasiona la generación del anión superóxido, el cual puede a su vez reaccionar con el óxido nítrico para formar el anión peroxinitrito (Koppenol *et al.*, 1992), el cual inhibe irreversiblemente diferentes componentes de la cadena respiratoria. Por lo tanto, la presencia del anión peroxinitrito en la mitocondria produce daños celulares irreversibles (Tórtora *et al.*, 2007).

Estudios han revelado que uno de los mediadores implicados en el desarrollo de la ND es el $\cdot NO$, ya que los cambios fisiológicos y morfológicos en la ND son debidos al incremento o disminución en la producción y/o actividad del $\cdot NO$ renal (Shoshana *et al.*, 2000; Khamaisi *et al.*, 2004).

Se han realizado varios estudios para evaluar los niveles de óxido nítrico en homogenados de riñón durante la diabetes, desafortunadamente hay una gran controversia con respecto a los resultados, ya que algunas investigaciones muestran un aumento en el metabolismo del $\cdot NO$ (NO_2^-/NO_3^-) (Cocenzi *et al.*, 2002), mientras que otras observan una disminución, (Trachtman *et al.*, 2002). Estas diferencias pueden ser explicadas en parte en base a si los estudios son *in vitro* o *in vivo*, al método utilizado y a las diferentes isoformas de las NOS involucradas. A pesar de estos conflictos, la razón generalizada puede ser hecha acerca del papel que juega el $\cdot NO$ en la nefropatía diabética, donde evidencias sugieren que a principios de la ND aumenta el $\cdot NO$ y posteriormente disminuye (Sharma, 2004), como podemos observar en las figuras 8 y 9.

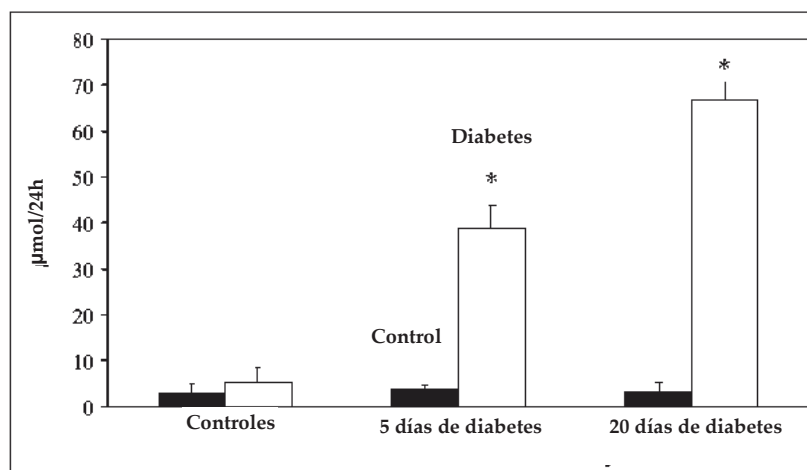


Figura 8.- Excreción de $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ ($\mu\text{mol}/24\text{h}$). La excreción de $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ fue determinada por el método de Griess. Ratas diabéticas (barras negras) y controles (barras blancas). * $P < 0.001$ (Cocenzi *et al.*, 2002).

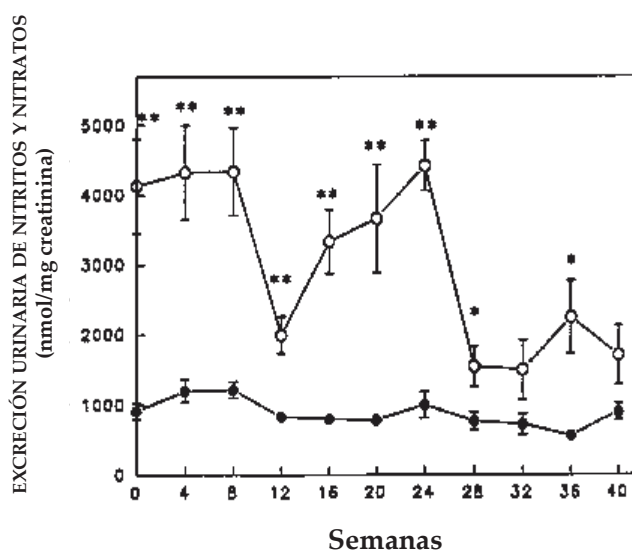


Figura 9.-Excreción de $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ (nmol/mg creatinine) en ND crónica. La excreción total de $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ urinaria (100 μl) fue cuantificada usando el método de Griess. Ratas diabéticas (círculos negros) y controles (círculos blancos). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control de la misma edad y (Trachtman *et al.*, 2002).

En la ND se presentan dos fases, una temprana y una tardía (Fig. 10); se ha demostrado que la ND temprana está asociada con un incremento en la producción de NO derivado de la óxido nítrico sintasa endotelial (NOS_e) y posiblemente por NO producido

por la óxido nítrico sintasa neuronal (NOSn). Estos efectos están relacionados con los cambios hemodinámicos intraglomerulares, los cuales causan la hiperfiltración y microalbuminuria. Por otra parte, la nefropatía avanzada se caracteriza por hipertensión, insuficiencia renal progresiva, proteinuria y una disminución en la producción de NO (Katyare *et al.*, 2005). La alteración en la producción de NO y/o la disminución de su disponibilidad, causa una marcada disfunción endotelial y falla renal aguda (Sharma, 2004). Veelken *et al.* (2000), demostraron que la vasodilatación en el glomérulo renal está mediada por el NO proveniente por la NOSe contribuyendo a una hiperfiltración y por consiguiente el daño renal en ratas diabéticas, por lo cual se le ha considerado un importante factor en la patogénesis en la ND temprana en ratas.

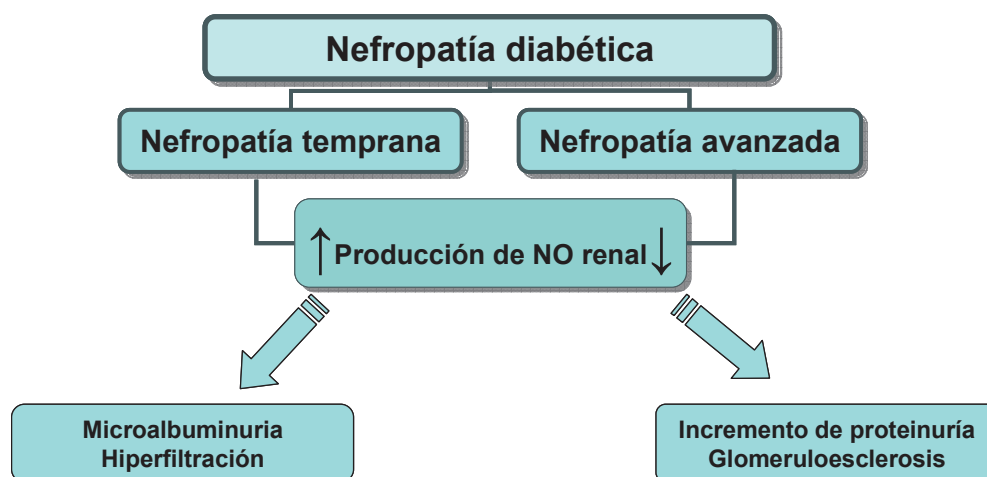


Figura 10.- Representación esquemática de los cambios del NO en nefropatía temprana y tardía, así como sus efectos patofisiológicos. En la nefropatía diabética se presenta una fase temprana caracterizada por un incremento en el NO y una fase tardía donde se observa una disminución del mismo. Tomada y modificada de Sharma (2004).

Recientemente, en nuestro laboratorio, se analizó el óxido nítrico mitocondrial, en animales jóvenes de 3 meses de edad y se observó la misma tendencia (Esquivel-Gutiérrez, 2008).

1.7.2.2 Peroxinitrito

El peroxinitrito (ONOO⁻) es un oxidante muy potente y dañino, producido por la reacción del anión superóxido y el óxido nítrico (Radi, 2000).



La mitocondria representa un blanco preferencial de las acciones tóxicas del peroxinitrito. Experimentos iniciales (Radi *et al.*, 1994) mostraron que el peroxinitrito afecta varios componentes de la cadena de transporte mitocondrial (los complejos I, II y III) y de la síntesis de ATP, así como la enzima ferro-sulfurada del ciclo de Krebs aconitasa, llevando a una inhibición de la respiración y una caída de la síntesis de ATP o dañar el ADN con la subsecuente activación de una enzima que consume energía, la poli (ADP-ribosa) sintetasa (Bolaños *et al.*, 1997). Estos efectos, a su vez, tienen un impacto sobre la homeostasis del calcio. Además, la interacción del peroxinitrito con las mitocondrias puede determinar la señalización de procesos de muerte celular programada. En este sentido, el peroxinitrito promueve la liberación mitocondrial del citocromo *c*, que puede interactuar en el citosol con proteínas pro-apoptóticas y disparar procesos de muerte celular programada. (Radi, 2000).

El ONOO⁻ tiene una vida media de 10-100 ms, por lo que su detección directa en sistemas biológicos es muy difícil, por lo cual se emplean mediciones indirectas para evaluar los niveles de ONOO⁻. Dentro de los métodos destaca la detección por técnicas inmunoquímicas de residuos de nitro-tirosina asociados a proteínas (Radi, 2000).

1.7.3 Daño a biomoléculas por ERO y ERN

Los principales efectos citotóxicos de las ERO y ERN son consecuencia de su interacción con los lípidos de las membranas celulares, las proteínas y los ácidos nucleicos. Estas alteraciones han sido implicadas en la muerte celular y otros procesos, tales como el envejecimiento y la apoptosis.

1.7.3.1 Daño a lípidos

Todas las membranas celulares, y especialmente las mitocondriales, son vulnerables a la oxidación debido a la alta concentración de ácidos grasos poliinsaturados (AGP). Éstos tienen sus dobles enlaces separados por grupos metileno, lo que hace que las uniones C-H sean extremadamente sensibles a la agresión por los ERO. La reacción en cadena (Fig. 11) se describen en los tres pasos siguientes:

1) Iniciación: El radical hidroxilo capta un átomo de hidrógeno de un doble enlace de un AGP. Entonces el AGP retiene un electrón y se estabiliza por reordenamiento de su estructura molecular transformándose en un radical lipídico (L').

2) Propagación: Cuando el oxígeno se encuentra en suficiente concentración en el medio, el radical L lo capta y se transforma en un peróxido lipídico (LOO'). Este compuesto es altamente reactivo, siendo capaz de extraer de una cadena insaturada vecina intacta un átomo de hidrógeno y transformarse en un hidroperóxido (LOOH) inestable, mientras que el radical lipídico (LOO') que se ha formado puede reiniciar un nuevo ciclo.

3) Terminación: La propagación puede dar lugar a la peroxidación de todos los AGP de una membrana. La cadena finaliza con la interacción de un LOO con otro radical o con un antioxidante. El hidroperóxido lipídico puede también fragmentarse en compuestos tales como el malondialdehído (MDA).

La reacción del MDA con el ácido tiobarbiturico se utiliza para cuantificar el grado de lipoperoxidación (Buege y Aust, 1978).

La consecuencia final de esta reacción en cadena es la alteración funcional de la membrana celular, así como la inhibición de la actividad de proteínas enzimáticas y estructurales asociadas a la misma, lo que condiciona una rápida muerte celular (Halliwell y Gutteridge, 1984).

La lipoperoxidación es un proceso degenerativo que afecta a los lípidos insaturados de membrana, por lo que la peroxidación lipídica aumenta en función de la edad, así como

en condiciones de estrés oxidativo y nitrosativo. Por lo que la cuantificación de los niveles de lipoperoxidación se emplea como marcador de estrés oxidativo.

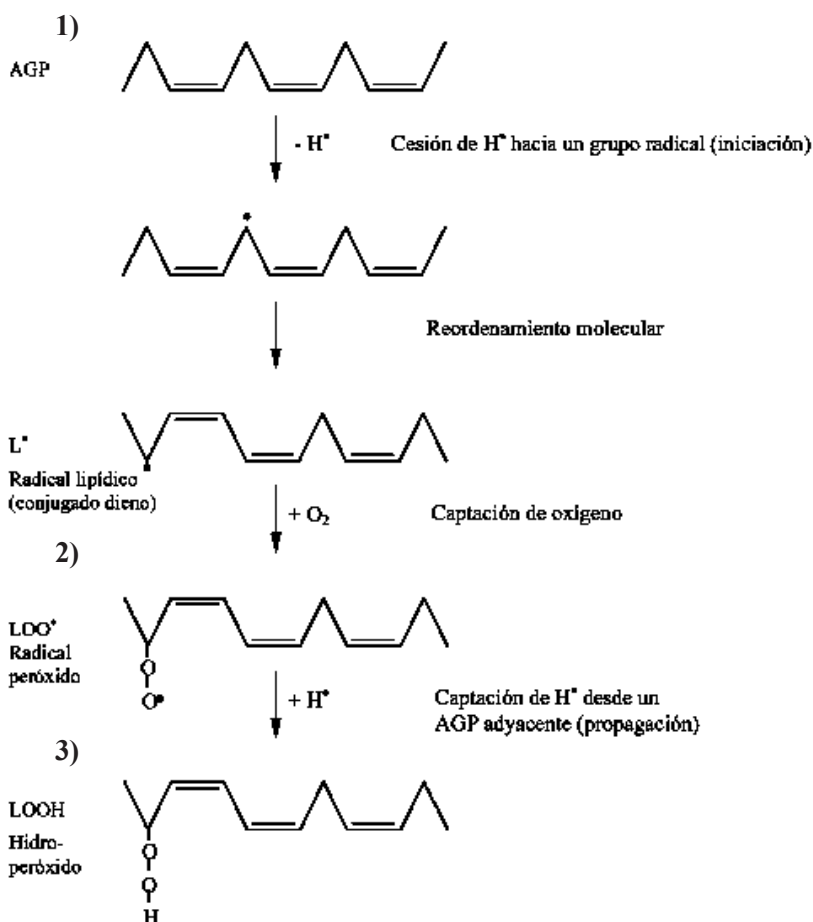


Figura 11.- Diagrama de lipoperoxidación. En la figura se muestra la reacción en cadena de la lipoperoxidación, **1) iniciación:** Una especie reactiva, principalmente el $OH^{\bullet}$ capta un átomo de hidrógeno de un doble enlace de un ácido graso poliinsaturado formando un radical lipídico ($L^{\bullet}$), **2) propagación:** El $L^{\bullet}$ en contacto con el oxígeno se transforma en un peróxido lipídico ($LOO^{\bullet}$) siendo capaz de extraer un átomo de hidrógeno de una cadena insaturada vecina intacta y transformándose en un hidroperóxido ($LOOH$), **3) terminación:** La cadena finaliza con la interacción de un $LOO^{\bullet}$ con otro radical o con un antioxidante, también el $LOOH$ puede fragmentarse produciendo compuestos como el malondialdeído. Tomado y modificado de Gutteridge (1995).

1.7.3.2 Daño a proteínas

Las ERO/ERN atacan a las proteínas, lo que conlleva a graves trastornos sobre el metabolismo y la arquitectura celular, induciendo su destrucción (Comporti, 1985; Stadtman, 1992). Pueden actuar sobre las proteínas de diferentes formas:

- Oxidación y nitrosilación de los aminoácidos aromáticos (triptófano, tirosina) al actuar a nivel de los enlaces insaturados, en los anillos aromáticos y en los grupos tiol (-SH) y produciendo cambios en otros aminoácidos tales como la prolina, arginina, lisina, fenilalanina, histidina, metionina y cisteína (dando lugar a aldehídos).

- Fragmentando proteínas mediante el radical hidroxilo, hipoclorito y peróxido en presencia de metales.

- Formando entrecruzamientos y agregación de proteínas producidos por la formación de puentes disulfuro intramoleculares.

1.7.3.3 Daño de los ácidos nucleicos

En el ser humano, se ha calculado que los radicales libres modifican aproximadamente diez mil bases del ADN por célula cada día. El principal agente dañino es el radical hidroxilo. Las ERO y ERN son capaces de dañar directamente las cadenas de ADN originando su fragmentación en un primer momento. Posteriormente, las ERO y ERN modifican las bases nitrogenadas que van a ser incorporadas al ADN, dando lugar a compuestos anómalos del tipo de la desoxiguanosina, capaz de provocar importantes mutaciones (Fraga *et al.*, 1990). Las enzimas reparadores del ADN son capaces de eliminar la mayoría de las lesiones oxidativas, pero no todas. El daño oxidativo en el ADN mitocondrial es unas 15 veces superior al del ADN nuclear. Esto se debe a la cercanía de dicho ADN al lugar principal de generación de radicales libres en la célula sana, la cadena transportadora de electrones (Fraga *et al.*, 1990). Estas alteraciones causan desde delecciones y mutaciones puntuales, hasta ruptura de cadenas y/o trastornos estructurales incluyendo aberraciones cromosómicas o pérdida de cromosomas.

1.8 Defensas antioxidantes mitocondriales

Como consecuencia de la producción continua de ERO/ERN y de sus efectos deletéreos, el organismo ha necesitado disponer de una amplia serie de sistemas de defensas antioxidantes. Éstos pueden clasificarse básicamente en:

1.8.1 Antioxidantes enzimáticos

La función de los antioxidantes enzimáticos es prevenir la iniciación de las oxidaciones en cadena, al eliminar las especies del oxígeno parcialmente reducidas ($O_2^{\cdot -}$ y H_2O_2) (Winston, 1990). En este grupo encontramos la participación de tres enzimas:

1.8.1.1 Superóxido dismutasa (SOD). Son un grupo de enzimas que catalizan la dismutación del radical superóxido para formar peróxido de hidrógeno (Weiss, 1986).

En el ser humano existen tres formas moleculares:

- Isoforma citosólica, que contiene cobre y zinc (el átomo de cobre es el que realiza directamente la dismutación).
- Isoforma mitocondrial que contiene manganeso
- Isoforma presente en líquidos extracelulares como el plasma, la linfa o el líquido sinovial. Esta última es irrelevante ya que posee muy baja actividad (Keller *et al.*, 1991).

1.8.1.2 Glutación peroxidasa (GPx). La GPx contiene cuatro cofactores de selenio que catalizan la ruptura del peróxido de hidrógeno y de hidroperóxidos orgánicos transformándolos en presencia de glutatión reducido (GSH) en agua y en glutatión oxidado (GSSG).

1.8.1.3 Glutación reductasa (GR). Es una flavoenzima dependiente del dinucleótido de nicotinamina y adenina fosfato reducido (NADPH) que cataliza la reducción del glutatión oxidado (GSSG) a glutatión reducido (GSH) (Lash, 2006).

Estas enzimas juegan un importante papel en la defensa antioxidante, permite a la célula mantener niveles adecuados de GSH celular.

1.8.2 Antioxidantes no enzimáticos

Además de los mecanismos enzimáticos anteriormente mencionados, la mitocondria dispone de un conjunto de mecanismos no enzimáticos que permiten contrarrestar la agresión oxidativa que causan las ERO/ERN. Los sistemas antioxidantes no enzimáticos más importantes están constituidos principalmente por vitaminas y micronutrientes (Sies y Stahl, 1995). El más importante es el glutatión.

1.8.2.1 Glutatión

El glutatión es un tripéptido ubicuo, γ -glutamyl-cisteinyl-glicina, descubierto por Hopkins en 1921. Es el tiol no proteico, soluble en el citoplasma, más abundante en la célula y juega un papel central en la defensa antioxidante. La molécula de glutatión puede encontrarse en dos estados de oxidación distintos: en forma reducida, como tiol (GSH) y en forma oxidada, compuesta por 2 moléculas unidas por un puente disulfuro (GSSG) (De Leve y Kaplowitz, 1991). Las células eucariotas poseen tres reservorios principales para el GSH. Casi el 90% del GSH celular está en el citosol, el 10% en la mitocondria y un pequeño porcentaje en el retículo endoplasmico (Meredith y Reed, 1982; Meister, 1988; Hwang *et al.*, 1992). Mientras que en este último compartimento la proporción GSH/GSSG es de 3:1, en el citoplasma y la mitocondria este cociente sobrepasa la proporción 10:1 (Meredith y Reed, 1982; Meister, 1988).

En la molécula de glutatión (Fig. 12), el enlace peptídico se establece entre el grupo α -carboxilo del glutamato y el grupo α -amino de la cisteína. Este enlace atípico es el responsable de su estabilidad intracelular, ya que resiste la degradación por peptidasas intracelulares, siendo hidrolizado específicamente por la enzima γ - glutamiltranspeptidasa

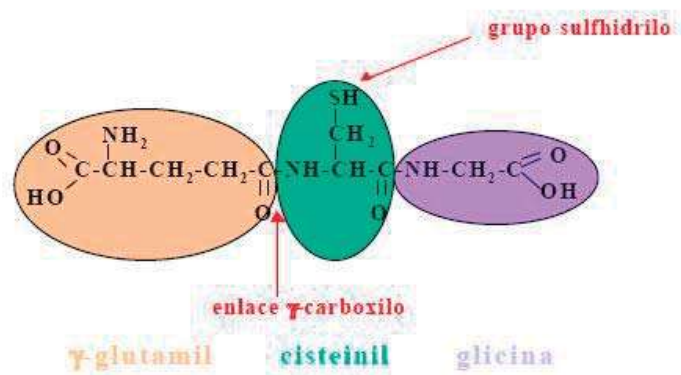


Figura 12.- Estructura del glutatión. En la figura se muestra el glutamato amino-terminal y la cisteína unidos a través del grupo γ -carboxilo del glutamato. Tomado de Morantes (2004).

(Meister, 1988; De Leve y Kaplowitz, 1991). El GSH posee varias funciones vitales incluyendo la destoxificación de electrófilos, el mantenimiento de los niveles esenciales de los tioles de las proteínas, la participación en los procesos de atrapamiento de radicales libres, reservorio de cisteína y modulador de procesos celulares críticos como son la síntesis de ADN, los procesos relacionados con los microtúbulos, y la función inmune (Viña *et al.*, 1986; Lu, 1999).

Dentro de síntesis del GSH, (Fig. 13) la primera reacción es el paso limitante y está catalizada por la γ -glutamilcisteína sintetasa (γ -GCS), también conocida como glutamato-cisteína ligasa. La segunda reacción está catalizada por la glutatión sintetasa.

La γ -GCS está regulada fisiológicamente por los niveles de GSH, por inhibición competitiva, mediante un mecanismo de retroalimentación negativa y por la biodisponibilidad de cisteína.

