



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO BIOLÓGICAS
LABORATORIO DE BIOQUÍMICA**

**“ PAPEL DEL ÓXIDO NÍTRICO Y LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO
EN MITOCONDRIAS DE RIÑÓN DE RATA DURANTE LA DIABETES ”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS EN
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

PRESENTA:

Q.F.B. EDGAR ROMUALDO ESQUIVEL GUTIÉRREZ

ASESOR:

DR. ALFREDO SAAVEDRA MOLINA

MORELIA, MICH. FEBRERO DE 2008.

ÍNDICE	Página
1. RESUMEN.....	04
2. NTRODUCCIÓN.....	06
2.1. DIABETES MELLITUS.....	06
2.1.1. NEFROPATÍA DIABÉTICA.....	07
2.2. LA MITOCONDRIA.....	09
2.3. ÓXIDO NÍTRICO.....	11
2.3.1. PEROXINITRITO (ONOO⁻).....	14
2.4. ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO.....	15
2.5. GLUTATIÓN.....	18
2.6. EL COMPLEJO MULTIENZIMÁTICO PIRUVATO	
DESHIDROGENASA.....	20
3. HIPÓTESIS.....	23
4. OBJETIVOS.....	23
4.1. OBJETIVO GENERAL.....	23
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
5.1. REACTIVOS.....	23
5.2. MATERIAL BIOLÓGICO.....	24
5.3. AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE LAS MITOCONDRIAS..	24
5.4. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE LA	
PROTEINA MITOCONDRIAL.....	25

5.5. DETERINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO MITOCONDRIAL.....	25
5.6. PERFIL DE NITROSILACIÓN DE LAS PROTEÍNAS MITOCONDRIALES.....	27
5.7. LIPOPEROXIDACIÓN MITOCONDRIAL.....	28
5.8. MEDICIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE GLUTATIÓN TOTAL EN MITOCONDRIAS DE RIÑÓN DE RATA.....	29
5.9. ACTIVIDAD DEL COMPLEJO MULTIENTZIMÁTICO PIRUVATO DESHIDROGENASA.....	30
5. 10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	33
6. RESULTADOS.....	33
6.1. CONCENTRACIONES DE GLUCOSA EN SANGRE Y PESO DE LOS ANIMALES.....	33
6.2. CONCENTRACIONES DE ÓXIDO NÍTRICO EN MITOCONDRIAS DE RIÑÓN DE RATA DURANTE LA DIABETES.....	35
6.3. PERFIL DE NITROSILACIÓN EN LAS PROTEÍNAS DE MITOCONDRIAS DE RIÑÓN DE RATA.....	37
6.4. LIPOPEROXIDACIÓN MITOCONDRIAL.....	38
6.5. CONCENTRACIONES DE GLUTATIÓN TOTAL.....	40
6.6. ACTIVIDAD DEL COMPLEJO MULTIENTZIMÁTICO PIRUVATO DESHIDROGENASA.....	42
7. DISCUSIÓN.....	43
8. CONCLUSIONES.....	51

9. PERSPECTIVAS.....	51
10. BIBLIOGRAFÍA.....	52

1. RESUMEN

La hiperglucemia genera muchas de las consecuencias patológicas en la diabetes mellitus, vía la formación de los radicales libres. El estrés oxidativo que provoca la hiperglucemia contribuye a la formación de patologías microvasculares a nivel renal, presentándose así la nefropatía diabética. Este desorden es causa de enfermedad terminal renal debido a una hiperfiltración glomerular inducida en parte por el óxido nítrico, el cual está involucrado en la formación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno las cuales causan daño a la mitocondria. Debido a que en la mitocondria se producen ambas especies reactivas, en este trabajo se estudió en mitocondrias aisladas de riñón de rata las concentraciones de óxido nítrico, así como el perfil de nitrosilación de proteínas y la peroxidación de lípidos como marcadores de estrés. También se evaluó la defensa antioxidante mitocondrial midiendo las concentraciones de glutatión total y la actividad del complejo multienzimático piruvato deshidrogenasa, ya que ésta última pudiera contribuir a la formación de especies reactivas de oxígeno al generarse equivalentes reductores durante la conversión del piruvato a acetil Co-A. Los resultados obtenidos mostraron que las concentraciones de óxido nítrico se incrementaron en etapas tempranas de la diabetes mellitus y disminuyeron conforme avanzó la patología, mientras que el perfil de nitrosilación de las proteínas no mostró cambios en ninguna etapa del estudio. La lipoperoxidación no mostró cambios, sin embargo, al evaluar la defensa antioxidante se encontró alterada. La actividad de la enzima piruvato deshidrogenasa se incrementó en la semana 1 y 16 postinducción de la

diabetes. Lo anterior nos sugiere que, la defensa antioxidante se activa en la diabetes mellitus y que el estrés oxidativo y nitrosativo no fue posible observarlo.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. DIABETES MELLITUS

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad crónica degenerativa que ocurre cuando el páncreas no produce suficiente insulina o cuando el cuerpo no puede usarla de manera eficiente. El resultado es una hiperglucemia, que junto con el desorden del metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas, conducen al daño de varios sistemas, principalmente a nivel de nervios y vasos periféricos (Ahmed, 2005; SSA, 2007; WHO, 2007).

La Organización Mundial para la Salud clasifica a la DM en tipo 1 y tipo 2, las cuales son enfermedades complejas causadas por mutaciones en más de un gen, así como por factores ambientales. La DM tipo 1 es de carácter autoinmune y la DM tipo 2 es multigénica y además hereditaria, siendo esta última la más común, con aproximadamente el 90% de los casos (WHO, 2007).

Actualmente, se sabe que alrededor de 180 millones de personas tienen DM en todo el mundo y se estima que para el año 2030 esta cifra se duplique (WHO, 2007). En México aproximadamente 12 millones de personas la padecen en cualquiera de sus tipos. Los costos económicos asociados al tratamiento y sus complicaciones representan una carga económica para los servicios de salud y para los pacientes (SSA, 2006).

Existen diversas complicaciones que se asocian a la DM, tales como la retinopatía diabética, la cardiopatía diabética, la neuropatía diabética, el pie diabético y por último la nefropatía diabética (ND), la cual se refiere al daño predominantemente de tipo glomerular, con compromiso intersticial; frecuentemente se asocia a hipertensión arterial y es la causa principal de enfermedad renal terminal (Kamijo, 2006; SSA, 2006).

2.1.1. NEFROPATÍA DIABÉTICA

El tejido renal experimenta considerables alteraciones estructurales y funcionales en la DM, observándose un engrosamiento de la membrana basal glomerular y daño a los riñones hasta llegar a la ND (Katyare y Satav, 2005). La ND es una de las complicaciones más graves de la DM y se define como la afectación renal en el paciente diagnosticado con DM con proteinuria >300 mg/24 h (Gross, 2005). Es la principal causa de enfermedad terminal renal con más del 40% de los casos de las enfermedades renales (Veelken, 2000). Aproximadamente el 25% de los pacientes con DM tipo 1 desarrollan ND, debido a que se asocia con un periodo de hiperfiltración, seguido del desarrollo de una microalbuminuria persistente (Steinke, 2005).

Al inicio de la DM no existen alteraciones morfológicas renales significativas, excepto un aumento del tamaño renal y glomerular. Los cambios patológicos renales se observan uno o dos años más tarde, por la expansión de la matriz mesangial y engrosamiento de la membrana basal glomerular (Kamijo,

2006). El crecimiento renal está asociado con una hiperfunción del riñón incluyendo un aumento en la tasa de filtración glomerular, reabsorción de Na^+ , agua y una alterada actividad en la bomba de Na^+/K^+ ATPasa (Katyare y Satav, 2005).

La ND se presenta en dos fases, una temprana y una tardía. Se ha demostrado que la ND temprana está asociada con un incremento en la producción de NO derivado de la óxido nítrico sintasa (NOS) endotelial (NOSe) y posiblemente por el NO derivado de la NOS neuronal (NOSn). Este efecto está relacionado a los cambios hemodinámicos intraglomerulares que causan hiperfiltración y microalbuminuria. Por el contrario, la nefropatía avanzada está caracterizada por hipertensión, insuficiencia renal progresiva, proteinuria, y una disminución en la producción de NO, especialmente el derivado de la NOS inducible (NOSi) (Katyare y Satav, 2005). Lo anterior y sumado a una resistencia a la insulina o a la hiperinsulinemia, contribuyen aún más a disminuir la producción de NO derivado de la NOSe y a incrementar el estrés oxidativo, los cuales están implicados en la progresión de la ND (Sarafidis, 2006). La producción alterada de NO y/o la disminución de su biodisponibilidad, causa una marcada disfunción endotelial y falla renal aguda (Sharma, 2004). Veelken y col. (2000) demostraron que la vasodilatación en el glomérulo renal está mediada por el NO proveniente de la enzima NOSe y que éste contribuye a una hiperfiltración y por consiguiente al daño renal en ratas diabéticas, por lo cual se

le ha considerado un importante factor en la patogénesis de la ND temprana en ratas.

Muchos estudios han sugerido que un incremento temprano en la producción del NO renal regula los cambios fisiopatológicos y morfológicos en la ND (Khamaisi, 2006).

2.2. LA MITOCONDRIA

Las mitocondrias son orgánulos subcelulares caracterizados por tener su propio ADN y ser desde el punto de vista metabólico importantes; sin embargo, su función es dependiente de la fisiología celular y completamente integrada a ella (Vázquez, 2002). Son ubicuas, encontrándose en todas las células nucleadas y son las principales generadoras de energía (Greaves y Taylor, 2006). Están compuestas por una membrana externa que rodea una membrana interna de gran área de superficie que, a su vez, rodea un centro rico de proteína denominado matriz mitocondrial (figura 1) (Logan, 2006). La membrana externa le permite el paso libre de metabolitos a diferencia de la membrana interna que es selectivamente permeable para aniones como el piruvato y para cationes como el calcio y protones. Esta propiedad de la membrana le permite establecer un gradiente de iones que es esencial para llevar a cabo la síntesis de ATP por medio de la fosforilación oxidativa y el consumo de oxígeno. La producción de ATP es a través del flujo de electrones derivados predominantemente de intermediarios del ciclo de Krebs, tales como

el dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD) y el dinucleótido de flavina y adenina (FAD).

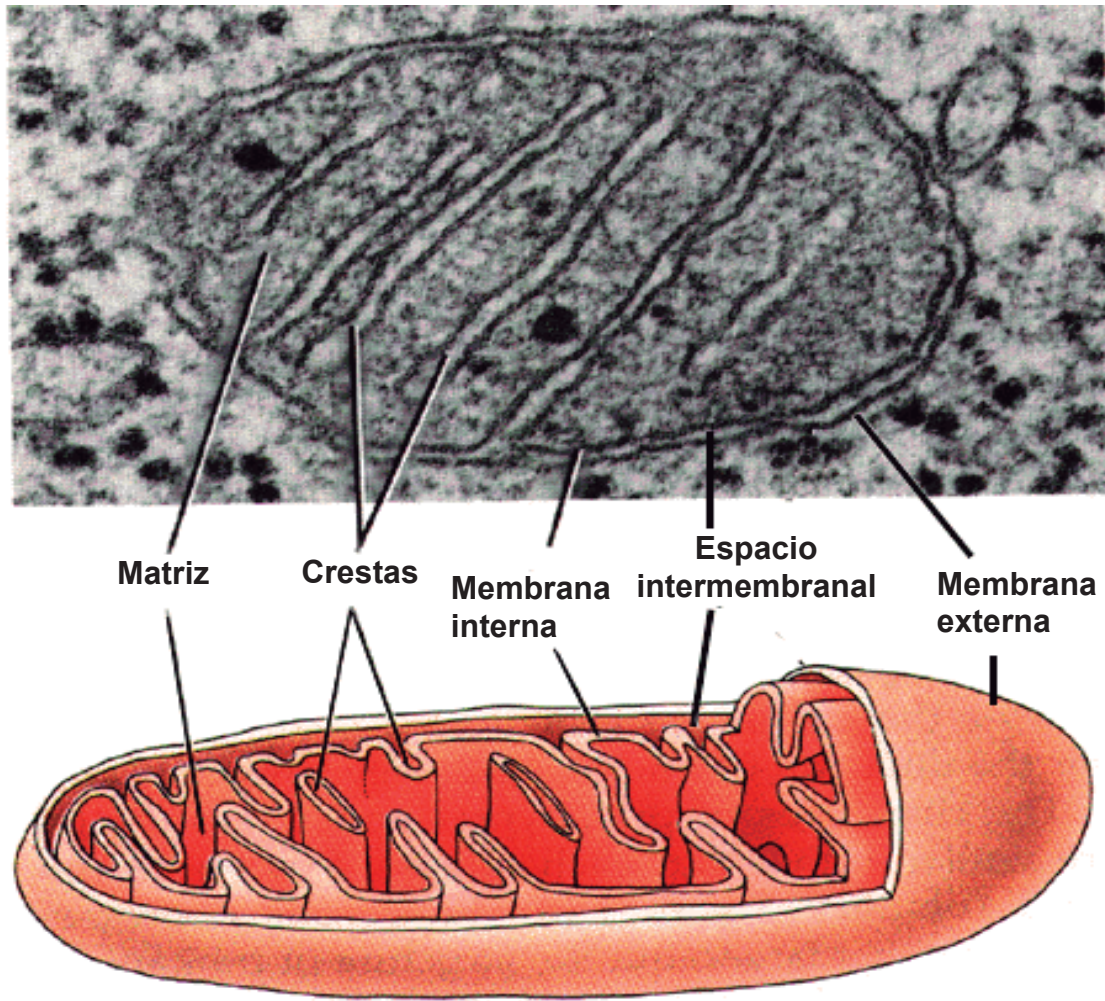


Figura 1. Representación esquemática y microfotografía de una mitocondria. Tomada y modificada de www.academic.brooklyn.cuny.edu

La mitocondria está íntimamente ligada a la homeostasis celular. Entre las funciones que desempeña está el metabolismo de los aminoácidos, lípidos, colesterol y nucleótidos. Además, participa en la señalización intracelular y apoptosis. La mitocondria tiene un papel fundamental en el metabolismo de la

energía celular, esto a través de la β oxidación de los ácidos grasos, el ciclo de la urea, la cadena transportadora de electrones, y finalmente la producción de ATP (Chinnery y Schon, 2003). Las células metabólicamente activas, tales como las de riñón, hígado, corazón, y cerebro, contienen cientos o miles de mitocondrias, las cuales conforman aproximadamente el 40% del citoplasma (Nisoil, 2006).

La mitocondria también produce NO vía la óxido nítrico sintasa mitocondrial (NOSmt). La asociación de la NOSmt con la membrana interna mitocondrial permite que el NO producido inhiba la actividad del citocromo c oxidasa, también localizada en la membrana interna mitocondrial, o reaccionar con el O_2^- para generar peroxinitrito ($ONOO^-$) (Ghafourifar y Sen, 2007).

2.3. ÓXIDO NÍTRICO

Existen evidencias que sugieren la participación del NO, superóxido y peroxinitrito en la patogénesis de la DM y sus complicaciones (Pacher, 2007). El óxido nítrico es un radical libre de vida media corta (~ 1 s), generado por varias células en respuesta a un estímulo (Blantz y Munger, 2002; Giulivi, 2006). Debido a su bajo peso molecular (30 Da) y a su naturaleza hidrofóbica, difunde rápidamente a través de las membranas ($\sim 140\mu m$) y paredes celulares de los organismos para desempeñar diversas funciones fisiológicas (Busconi y Michel, 1993).

El óxido nítrico es sintetizado por las isoenzimas de la óxido nítrico sintasa (NOS; EC 1.14.13.39) en dos pasos que comprende la oxidación de cinco electrones del nitrógeno guanidino de la L-arginina como sustrato, con la formación de la N-hidroxi-L-arginina como intermediario (figura 2) (Ghafourifar y Saavedra-Molina, 2006).

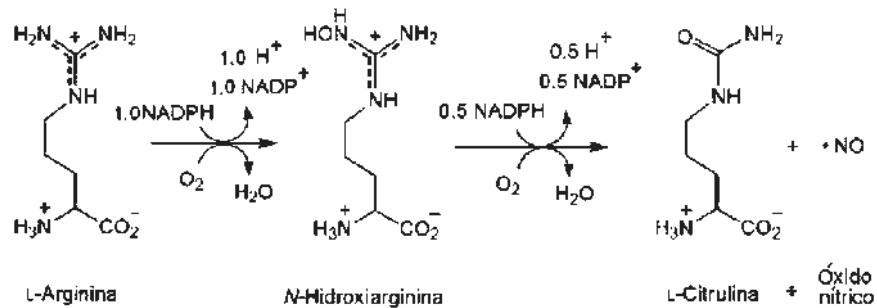


Figura 2. Síntesis del NO por la NOS. La reacción consume oxígeno (O_2), requiere 1.5 moles de NADPH y produce L-citrulina como co-producto final. (Tomado de Ghafourifar y Saavedra-Molina, 2006).

La familia de las NOS conocidas hasta 1995, comprendía a la NOS neuronal (NOSn), la NOS inducible (NOSi) y la NOS endotelial (NOSe) (Alderton, 2001; Brookes, 2006; Ghafourifar y Saavedra-Molina, 2006). Entre 1995 y 1996, en los laboratorios de Kobzik y Stamler, y Hellsten y Bates, fue descubierta simultáneamente una enzima de la NOS localizada en la mitocondria, la NOS mitocondrial (NOSmt) (Kanai, 2001). Todas las NOS usan diversos cofactores, como la tetrahidrobiopterina (BH_4), FAD, flavin mononucleótido (FMN) y NADPH (Ghafourifar y Saavedra-Molina, 2006).

Cada NOS es codificada por un gen diferente y los análisis del genoma mitocondrial no revelan la presencia de un gen específico para la NOSmt, por lo que, después de varios estudios con mutantes para cada una de las NOS, se sugiere que es una modificación post-traducciona l de la NOSn que consiste en una miristilación y fosforilación en la región C terminal que le confiere anclaje a la membrana interna mitocondrial (Valdez, 2005). La NOSmt se ha encontrado en mitocondrias de cerebro, de riñón, de hígado y músculo esquelético y cardíaco (Kanai, 2001).

Debido a sus efectos en la neurotransmisión, vasodilatación y respuesta inmune, el NO juega un importante papel en la fisiología y patología (Giulivi, 1998). Además el NO regula la respiración mitocondrial al inhibir de manera reversible a la citocromo c oxidasa de la cadena respiratoria (Ghafourifar y Saavedra-Molina, 2006), también se le involucra en la apoptosis a través de la nitrosilación de proteína, principalmente del citocromo c (Schonhoff, 2003).

La producción del NO en la mitocondria es regulado por mecanismos a través del tiempo y el espacio. La señal del calcio es central para la regulación temporal. Sobre la estimulación de la liberación de calcio del retículo endoplásmico, el calcio entra a la mitocondria vía un uniportador electrogénico y activa la NOSmt produciendo NO. El mecanismo de regulación espacial del NO permite una producción localizada cercano a su sitio blanco (Giulivi, 2006).

2.3.1. PEROXINITRITO (ONOO^-)

La vida media del NO se encuentra en el rango de ~ 1 s (Giulivi, 2006) y debido a que contiene un electrón desapareado, rápidamente reacciona con el O_2^- para formar ONOO^- (Beckman, 1990). El ONOO^- es extremadamente reactivo y su tiempo de vida media es relativamente corta (10 – 20 ms), por lo que no permite que el ONOO^- formado en el citoplasma difunda hacia la mitocondria, sin embargo, proteínas, lípidos y ácidos nucleicos modificados por el ONOO^- existen en la mitocondria, sugiriendo su formación en la misma (Ghafourifar y Sen, 2007).

La nitración de residuos de tirosina en proteínas constituye la sustitución de un hidrógeno por un grupo nitro ($-\text{NO}_2$) en la posición 3 del anillo fenólico lo cual representa una modificación postraducciona producida por oxidantes derivados del NO tales como el ONOO^- y el radical dióxido de nitrógeno ($\cdot\text{NO}_2$). La mitocondria produce dos reactantes para la formación de ONOO^- , el anión superóxido, producido durante la transferencia de electrones a través de la cadena respiratoria en la membrana interna mitocondrial, y el NO $\cdot$, el cual es producido por la NOSmt también a nivel de la membrana interna mitocondrial (Bartesaghi, 2007). Muchas de las reacciones del ONOO^- en la mitocondria, están mediadas por el radical carbonato y el dióxido de nitrógeno (figura 3).

El ONOO^- causa la nitración tanto en residuos de tirosina como en residuos de triptofano formando 3-nitrotirosinas, 5- y 6-nitrotriptofano,

Durante la transferencia de electrones, algunas veces un electrón se escapa y resulta en la reducción de un solo electrón del oxígeno molecular para formar anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$). El $O_2^{\cdot-}$ puede conducir a la producción del peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el cual puede, en presencia de hierro (Fe^{2+}), vía la reacción de Fenton, formar el radical libre hidroxilo ($\cdot OH$) altamente reactivo. Alrededor del 2 al 3% del oxígeno consumido por una célula es convertido a ERO y posteriormente, reacciona rápidamente con biomoléculas vecinas, dando como resultado lipoperoxidación, oxidación de proteínas y del DNA (Shigenaga, 1994; Praticó, 2002).

La evidencia para el daño oxidativo en DM ha sido reportada desde 1979 por Sato y colaboradores. El estrés oxidativo está definido como la pérdida del balance normal entre las ERO y las sustancias antioxidantes del organismo (Sharma, 2004; Sarafidis, 2006). Las condiciones de hiperglucemia incrementan la entrada de sustratos metabólicos hacia el interior de la mitocondria y saturan la cadena transportadora de electrones, resultando en una sobreproducción de EROs (Yu, 2005).

Está bien establecido que el $O_2^{\cdot-}$ es el primer radical formado por la reducción del O_2 y que dirige a la formación de radicales secundarios como el H_2O_2 y el radical $\cdot OH$ (Ahmed, 2005). La cadena respiratoria mitocondrial es el principal sitio de producción de las EROs dentro de la célula, ya que la mitocondria consume alrededor del 98% de O_2 que se inhala (Duchen, 2004).

Parte de ese O_2 se convierte en $O_2^{\cdot -}$ que es producido continuamente como un subproducto normal de la respiración (figura 4) (Chen, 2003; Green, 2004).

Los principales sitios de producción de las ERO han sido localizados en los complejos I y III de la cadena transportadora de electrones. Estos complejos pueden transferir electrones al O_2 y dar como resultado la producción del $O_2^{\cdot -}$. Cuando la cadena transportadora de electrones es inhibida río abajo del complejo III, los electrones de la oxidación del succinato pueden generar $O_2^{\cdot -}$ por revertir el transporte de electrones del complejo II al complejo I. La producción de las EROs se incrementa cuando el transporte de electrones es reducido, lo cual ocurre a bajas tasas de respiración o en situaciones patológicas (Hervouet, 2007).

Si las EROs sobrepasan los sistemas de defensa enzimática y no enzimática mitocondrial, el daño oxidativo y la muerte celular pueden ocurrir (Fariss, 2005). El estrés oxidativo incrementado y una defensa antioxidante alterada han sido implicadas en ambos tipos de DM experimental. Durante la hiperglucemia, rasgo característico de la DM, se incrementan las ERO y disminuyen las defensas antioxidantes incrementándose la lipoperoxidación. La acumulación de lipoperóxidos, el 4-hidroxinonenal y el malondialdehído en la mitocondria, también se han reportado en pacientes diabéticos (Raza, 2004).

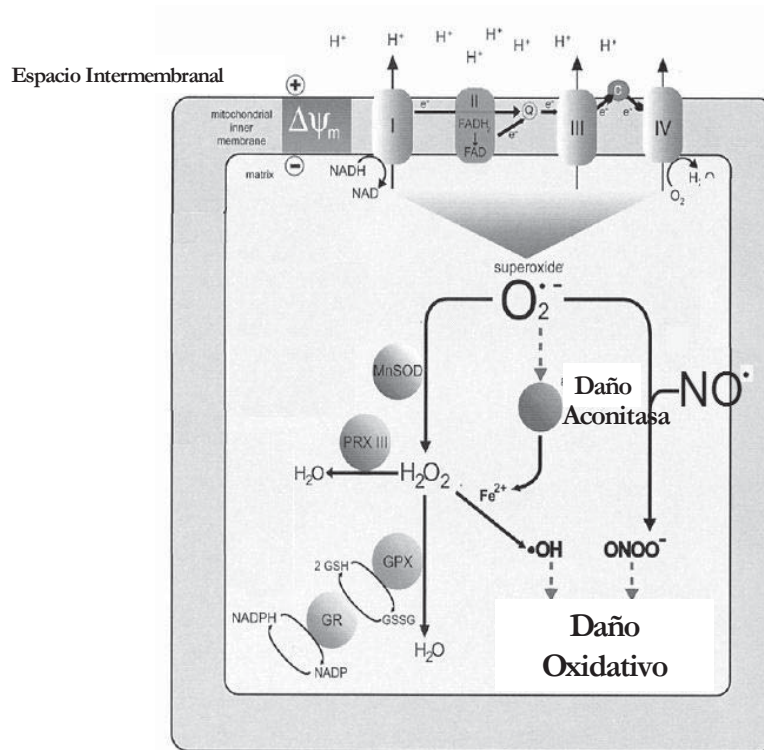


Figura 4. **Modelo para el daño oxidativo mitocondrial.** La cadena de transporte de electrones mitocondrial produce ERO de manera normal. Las ERO son neutralizadas por el sistema antioxidante presente en la mitocondria. Cuando hay un desbalance entre las ERO y la defensa antioxidante se produce daño oxidativo. Tomada de K Green y col. (2004).

2.5. GLUTATIÓN

El mecanismo por el cual se inactivan los radicales libres incluye una variedad de enzimas antioxidantes tales como la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa y la glutatión reductasa dependiente de glutatión. El glutatión (GSH) o γ -glutamyl-cistein-glicina (figura 5), es un tripéptido ampliamente distribuido en los tejidos de animales, plantas y microorganismos. Está presente en concentraciones altas (0.1-10mM) y es el compuesto tiol más abundante en la

célula. El GSH protege de los efectos tóxicos de las ERO, ya que funciona como un antioxidante (Meister, 1988).

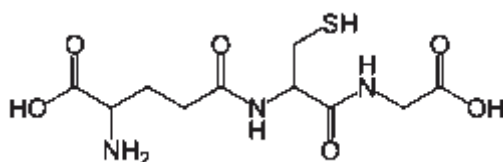


Figura 5. Estructura del tripéptido γ -glutamil-cisteín-glicina.

El GSH cumple múltiples funciones en el metabolismo, tales como ser el sustrato de la glutatión peroxidasa y estar involucrado en el metabolismo del ácido ascórbico. La función principal es mantener un ambiente reductor previniendo la oxidación de los grupos $-SH$ de los aminoácidos en las proteínas. Se le involucra también en el transporte intracelular del cobre al funcionar como un agente quelante. Participa en la degradación de proteínas, y promueve la formación de la cisteína intracelular (Halliwell, 1985). La oxidación de dos grupos tioles de la cisteína forma un puente disulfuro, que es muy importante en la estructura y función de muchas proteínas; sin embargo, cuando se forma inapropiadamente puede ser dañino. El GSH también puede reducir puentes disulfuro en una forma no enzimática (Wang y Ballatori, 1998).

El GSH es utilizado por la glutatión peroxidasa, la cual reduce el peróxido de hidrógeno y forma agua, oxígeno molecular y glutatión oxidado (GSSG). Por medio de este mecanismo se protegen las proteínas y membranas contra la oxidación. El GSH es regenerado por la glutatión reductasa que requiere

NADPH como cofactor, por lo que cualquier desequilibrio en las concentraciones del mismo induce un profundo efecto debido a que disminuye la capacidad de la célula para lidiar con el estrés oxidativo (Meister, 1988).

Además de contar con una defensa enzimática, la mitocondria también posee una defensa no enzimática que remueven radicales libres e incluye al citocromo c, la tioredoxina, la coenzima Q, y a la vitamina E en sus formas reducidas (Hervouet, 2007).

2.6. EL COMPLEJO MULTIENZIMÁTICO PIRUVATO DESHIDROGENASA

Green y col. (2004) propusieron un modelo para explicar la producción de las ERO a partir de la hiperglucemia (figura 6). Explican que a elevadas concentraciones de glucosa se incrementan los niveles de los equivalentes reductores, tales como el NADH y el FADH dentro de la mitocondria. Esto también ocurre a través de la entrada de equivalentes reductores del citoplasma hacia la mitocondria por varias lanzaderas mitocondriales, y porque se incrementa la entrada del piruvato a través del transportador de piruvato. Estos procesos elevan el gradiente de protones, reducen los acarreadores de electrones, y se incrementan las ERO por la cadena respiratoria. La disminución del potencial de membrana (ψ_m) por desacoplantes artificiales o por las proteínas desacoplantes (UCPs) puede prevenir la formación de ERO, además de que estas pueden ser degradadas por las defensas antioxidantes presentes en la mitocondria. El complejo multienzimático piruvato deshidrogenasa (PDH)

se encarga de catalizar la reacción de piruvato a acetil CoA, CO_2 y NADH, uniendo así a la glucólisis con el ciclo de Krebs.

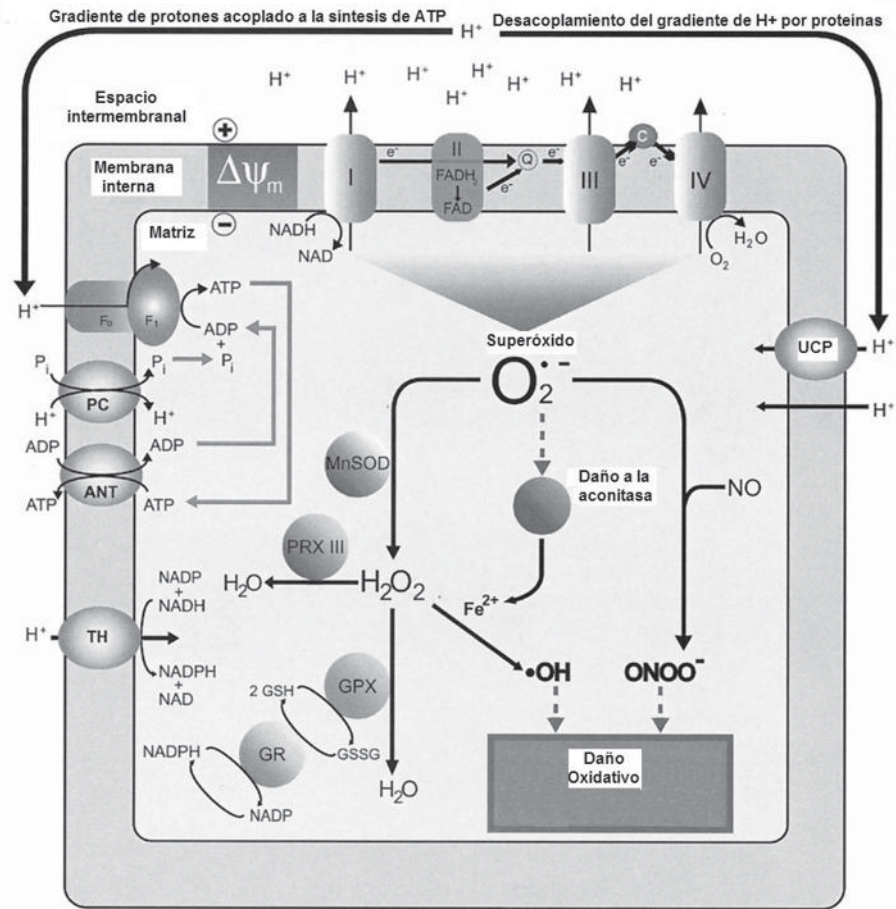


Figura 6. Modelo para la producción de EROs en la mitocondria. Tomado y modificado de Green y col. (2004).

La PDH está compuesta por tres diferentes enzimas llamadas piruvato deshidrogenasa o E_1 , dehidrolipoamida acetiltransferasa o E_2 y dehidrolipoamida deshidrogenasa o E_3 (Margineantu, 2002). El complejo, contiene los componentes regulatorios que incluyen a una proteína de unión a E_3 , una cinasa y una fosfatasa (Smolle, 2004).

Se ha reportado que el gen que codifica para la subunidad β del componente E1 de la PDH se desregula en el músculo esquelético de rata durante la DM y como consecuencia hay una inactivación de la enzima y disminución de la oxidación de la glucosa (Yecheor, 2002). Además, en hígado la PDH sufre daño, disminuyendo su actividad (Katyare y Satav, 2005). Esto pudiera causar múltiples desórdenes en el metabolismo de los carbohidratos, sobre todo en aquellos órganos que no requieren transportadores de glucosa dependientes de insulina, por ejemplo, el cerebro y las células mesangiales del glomérulo renal (Brownlee, 2004). En el riñón, la actividad de la PDH no disminuye, lo cual pudiera contribuir a la producción activa de equivalentes reductores que alimentan a la cadena respiratoria y por consiguiente a la producción de ERO, lo que se traduce en daño oxidativo (Yecheor, 2002). Lo anterior sugiere que es posible que el piruvato pudiera ocasionar parte del daño oxidativo.

La actividad de la PDH en eucariontes es regulada en gran parte por la interconversión del componente E1 entre una forma activa (no fosforilada) y una forma inactiva (fosforilada). La interconversión es catalizada por una piruvato deshidrogenasa cinasa (PDK) y por una piruvato deshidrogenasa fosfatasa (PDP) específica para la PDH. Tres residuos de serina han sido identificados como sitios de fosforilación en la subunidad E1 α , en humanos, en la Ser264, en la Ser271 y en la Ser203 (Patel, 2001).

3. HIPÓTESIS

La producción del óxido nítrico y las especies reactivas de oxígeno se alteran durante la diabetes mellitus en mitocondrias de riñón de rata.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Estudiar el papel que tiene el óxido nítrico y las especies reactivas de oxígeno en mitocondrias de riñón de rata durante la diabetes mellitus.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Cuantificar las concentraciones de NO en mitocondrias de riñón de rata durante la DM.
2. Evaluar el perfil de nitrosilación en proteínas mitocondriales de riñón de rata durante la DM.
3. Evaluar la lipoperoxidación en mitocondrias de riñón de rata durante la DM.
4. Cuantificar el GSH total en mitocondrias de riñón de rata durante la DM.
5. Medir la actividad de la PDH en mitocondrias de riñón de rata durante la DM.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. REACTIVOS

Todos los reactivos y sustancias empleadas fueron grado reactivo y de la más alta pureza disponible en el mercado.

5.2. MATERIAL BIOLÓGICO

Se emplearon ratas macho Wistar de 280 a 380 g de peso mantenidas bajo condiciones de bioterio con agua y alimentación *ad limitum*. Se dividieron en dos grupos a los animales, a un grupo se le denominó control o no tratado, y al otro DM o tratado. El grupo tratado recibió una sola dosis (45 mg/kg de peso) de estreptozotocina (STZ) vía intraperitoneal para inducir la hiperglucemia. El grupo control solamente recibió el vehiculo (agua desionizada) bajo las mismas condiciones.

5.3. AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE LAS MITOCONDRIAS

El aislamiento de las mitocondrias se realizó de acuerdo al método modificado por Saavedra-Molina y Devlin (1997). Las ratas macho Wistar, tanto control y DM-STZ, se sacrificaron por decapitación a los diferentes tiempos de tratamiento. Se extrajeron los riñones mediante una incisión en el abdomen; se colocaron en medio 1 (220 mM de manitol, 70 mM de sacarosa, 1 mM de EGTA (ácido etilén glicol-bis(beta-aminoetil éter N, N', N'-tetraacético) y 2 mM de MOPS (ácido 3-[N-morfolino]propano sulfónico), a un pH de 7.4). Todo el proceso de aislamiento se realizó a 4°C. Los riñones se cortaron en trozos pequeños y se lavaron 3 veces con medio 1. Posteriormente se homogeneizaron a 1500 rpm en un tubo de vidrio con un vástago de teflón. Posteriormente, se centrifugó a 2500 rpm (centrífuga Beckman J2-MC) durante 10 min a 4°C. Se desechó el sedimento y el sobrenadante se centrifugó a 7500 rpm por 10 min a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y el sedimento se

resuspendió cuidadosamente en 2 ml de medio 2 (220 mM de manitol, 70 mM de sacarosa y 2 mM de MOPS, a un pH de 7.4). Se le adicionaron 160 µl de albúmina de suero de bovino (10 mg/ml) y se dejó a 4°C por 10 min. Esta solución se colocó sobre una suspensión de Percoll al 20% v/v empleando el medio 2. Se centrifugó a 19300 rpm por 10 min a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió cuidadosamente en un volumen de 7 ml de medio 2, y por último se centrifugó a 9000 rpm durante 10 min a 4°C, se eliminó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió cuidadosamente en 1 ml del medio 2. Las mitocondrias se mantuvieron a 4° C hasta el momento de su utilización.

5.4. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE LA PROTEÍNA MITOCONDRIAL

La concentración de la proteína mitocondrial se determinó por el método de Biuret (Gornall *et. al.*, 1949). Posteriormente se realizaron los cálculos correspondientes para ajustar el volumen que tuviera una concentración de 1 mg/ml, que fue empleada en todos los experimentos, excepto donde se indique.

5.5. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO MITOCONDRIAL

El óxido nítrico (NO) se determinó de acuerdo al método de Griess modificado y reportado por Green y col. (1982). Este método cuantifica de manera indirecta las concentraciones de NO mitocondrial. Este ensayo depende

de la reacción de diazotización que fue originalmente descrito por Griess en 1879. El reactivo de Griess se basa en la siguiente reacción química como se muestra en la figura 7 el cual usa sulfanilamida y dihidrocloruro de N-1-naftiletilendiamina (NED) bajo condiciones ácidas para formar un compuesto azo colorido que se lee espectrofotométricamente a 546 nm.

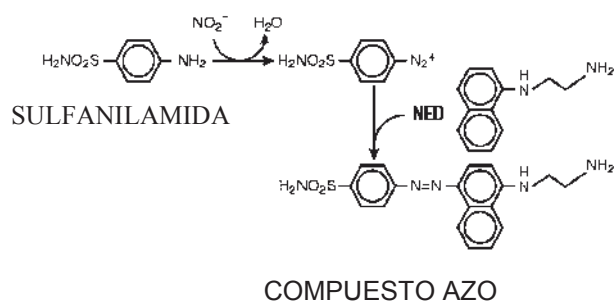


Figura 7. Reacción de diazotización para la detección de nitritos.

Las mitocondrias se incubaron por 10 min y a temperatura ambiente en una solución que contiene 220 mM de manitol, 10 mM de MOPS, 5 mM de KH₂PO₄, 15 mM de KCl, 3 mM de MgCl₂, 1 mM de EGTA, a pH de 7.4, con 10 mM de succinato y 2 µM de rotenona en un volumen final de 2 ml en agitación suave y constante. La reacción se detiene con la adición de ácido perclórico al 0.4%. Posteriormente se centrifuga a 5000 rpm durante 10 min y a 1500 µl del sobrenadante se le adicionan 100 µl del reactivo de Griess y se dejan incuban por 30 min a temperatura ambiente y en oscuridad. Pasado este tiempo se determinó la absorbencia a 546 nm en un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 18. Se corrió un blanco y una curva estándar de óxido nítrico. La concentración del NO se obtuvo mediante la siguiente fórmula:

$$\text{NO} = \frac{\text{lectura del problema a 546 nm} (\text{estándar } 8 \mu\text{M})}{\text{lectura del estándar a 546 nm}} = \mu\text{mol de NO}$$

Curva estándar para la determinación del NO por el método de Griess.

Tubos	Medio (μl)	Stock NaNO ₂ (μl)	Concentración final (μM)	Reactivo de Griess (μl)
1 (Blanco)	1400	-----	-----	100
2	1398.5	1.5	1	100
3	1395.5	4.5	3	100
4	1392.5	7.5	5	100
5	1388	12	8	100
6	1385	15	10	100

5.6 PERFIL DE NITROSILACIÓN DE LAS PROTEÍNAS MITOCONDRIALES

El perfil de nitrosilación se analizó mediante inmunodetección. La proteína mitocondrial se separó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE al 10%) de acuerdo al protocolo de Laemmli y col. (1970). Posteriormente, las proteínas fueron transferidas a membranas de PVDF (fluoruro de polivinildieno) de acuerdo al protocolo descrito por Towbin y col. (1979). Las membranas con las proteínas transferidas se lavaron con TBST-T (Tris-HCl 10 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 0.05%, pH 7.6) y posteriormente se incubaron con TBS-T-gelatina (5%) por 1 h en agitación constante para bloquear sitios inespecíficos. Después de lavar con TBS-T, las membranas se incubaron en presencia del anticuerpo policlonal anti-3NT (1:2000) (Molecular Probes) en TBS-T-gelatina (5%) por 1h con agitación

constante y moderada. Las membranas se lavaron 3 veces con TBS-T para remover el anticuerpo unido inespecíficamente, y después se incubaron por 1 h con el anticuerpo secundario IgG acoplado a peroxidasa (1:4000) (Southern Biotech) en TBS-T-gelatina (5%). La interacción antígeno-anticuerpo se determinó mediante quimioluminiscencia.

5.7. LIPOPEROXIDACIÓN MITOCONDRIAL

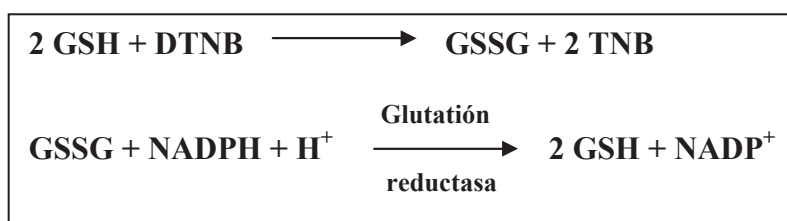
Para la determinación de los niveles de oxidación de lípidos, como medida indirecta del estrés oxidativo, se utilizó una modificación del método reportado por Buege y Aust. (1978), para determinar las especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS, por sus siglas en inglés) entre las que se encuentra el malondialdehído (MDA), el principal producto de la lipoperoxidación por radicales libres.

La proteína mitocondrial se transfirió a un tubo con buffer de fosfatos 0.15 M (Na_2HPO_4 y KH_2PO_4), pH 7.0, con el propósito de prevenir interferencias debido a la reacción del ácido tiobarbitúrico (TBA) con alguno de los componentes del medio de aislamiento mitocondrial como el manitol o la sacarosa. Después de 30 min en agitación constante y a 37°C, se le adicionaron 2 ml de una solución ácida recién preparada que contenía TBA 0.02M, ácido tricloroacético 0.9 M y HCl 0.25N. Posteriormente, los tubos se sometieron a un calentamiento en baño de agua hirviendo y después de 15 min los tubos fueron enfriados en hielo para después centrifugarlos a 7500 rpm por

5 min. Se tomaron 1.5 ml del sobrenadante para determinar la absorbencia a 535 nm en un espectrofotómetro Perkin-Elmer Lambda 18. Para los cálculos se empleó el coeficiente de extinción molar para el malondialdehído $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Buege y Aust, 1978) y fueron expresados en nanomolas de TBARS/mg de proteína.

5.8. MEDICIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE GLUTATIÓN TOTAL EN MITOCONDRIAS DE RIÑÓN DE RATA

Para medir las concentraciones de glutatión total (GSH) se empleó el “Glutathione Assay Kit” de Sigma Aldrich. Antes de la determinación, la muestra se precipitó con una solución al 5% de ácido sulfosalicílico y posteriormente se centrifugó para remover la proteína precipitada. La medición de GSH usa un ensayo cinético en el cuál cantidades catalíticas (nmoles) de GSH causan una continua reducción del ácido 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzónico) (DTNB) a ácido 5-tio-2-nitrobenzónico, y el glutatión disulfuro (GSSG) formado es reciclado por la glutatión reductasa y el NADPH. El GSSG presente también reacciona para dar un valor positivo en esta reacción.



La velocidad de reacción es proporcional a la concentración del GSH. El producto amarillo, TNB, es medido espectrofotométricamente a 412 nm. El ensayo usa una curva estándar de GSH para determinar las concentraciones del GSH presente en la muestra. Las mediciones se realizaron en un lector de ELISA BIO-RAD Benchmark.

5.9. ACTIVIDAD DEL COMPLEJO MULTIENTZIMÁTICO PIRUVATO DESHIDROGENASA

El complejo multienzimático piruvato deshidrogenasa (PDH) cataliza la conversión del piruvato a acetil Co-A y CO₂ usando NAD⁺ como co-sustrato. El siguiente protocolo describe un ensayo acoplado para medir la actividad piruvato deshidrogenasa (Payne y Morris, 1969; Szutowicz *et. al.*, 1981).

Soluciones requeridas.

0.25 M de Tris-HCl Buffer (pH 8.0). Preparar un Stock y almacenar a 4°C.

0.2 M de piruvato de sodio. Preparar un stock y almacenar a 20°C.

4 mM de Co-A de sodio. Preparar en fresco sobre hielo.

40 mM NAD⁺. Preparar en fresco sobre hielo.

40 mM de Tiamina pirofosfato (TPP). Preparar en fresco sobre hielo.

10 mM MgCl₂. Preparar un stock y almacenar a temperatura ambiente.

200 mM de Ditioneitol (DTT). Preparar en fresco sobre hielo.

25 mM de oxaloacetato (OAA). Preparar un stock y almacenar a temperatura ambiente.

0.05g de 5,5,ditiobis(2-ácido nitrobenzónico) (DTNB) en 10 ml de etanol al 100%.

Citrato sintasa. La solución se obtiene de sigma (250 U/ml).

1. Para cada ensayo, preparar la siguiente mezcla de reacción en tubos Ependorf.

	Volumen (µl)	
	Experimental	Control
H ₂ O desionizada	325	275
Tris-HCl	200	200
Piruvato de Na	50	50
Co-A Na	0	50
NAD ⁺	50	50
TPP	50	50
MgCl ₂	100	100
DTT	50	50

2. A cada mezcla de reacción adicionar 1 mg de proteína mitocondrial y e incubar a 37° C en baño de agua por 15 min.
3. Una vez pasado este tiempo adicionar 50 µl de OAA y 25 µl de DTNB a ambos tubos y agitar ligeramente. Transferir el contenido a cubetas de cuarzo, colocando la cubeta control en la posición 1 y la experimental en la posición 2 del espectrofotómetro. Esperar 10 min para que las mezclas se equilibren y leer el blanco con la cubeta control y después a la muestra adicionar 5 U de citrato sintasa.
4. Leer a 412 nm.

La actividad fue calculada como sigue:

Una unidad (U) de actividad de piruvato deshidrogenada está definida como la cantidad de enzima requerida para producir 1.0 μmol de Acetil Co-A en un minuto.

$$1. \text{dA/dt}(\text{min.}^{-1}) = \text{rate}_{\text{experimental}} - \text{rate}_{\text{control}}$$

$$2. \text{Actividad} = (1000 \times \text{TV} \times \text{dA/dt}) / (\epsilon \times \text{V} \times \text{CF})$$

Actividad: actividad volumétrica (U/L)

TV: volumen total en la cubeta (1000 μl)

V: volumen de homogenado mitocondrial usado (μl)

ϵ : coeficiente de extinción molar para reducir DTNB (13.6 mM^{-1} por unidad de longitud de trayectoria).

CF: factor de concentración del homogenado mitocondrial (por ejemplo, si una muestra de 100 ml esta concentrada en un volumen de 5 ml. $\text{CF} = 100/5 = 20$).

$$3. \text{Actividad especifica} = (\text{actividad}/\text{concentración de proteína}).$$

Actividad: Actividad volumétrica (U/L)

$$\text{Actividad} = (1000 \times \text{TV} \times \text{dA/dt}) / (\epsilon \times \text{V} \times \text{CF})$$

Concentración de proteína: mg/L

Actividad especifica: U/mg proteína

5.10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos fueron sometidos a la prueba t de Student para determinar la significancia de la diferencia entre los valores promedio ($p < 0.05$), respecto al control dentro de cada tratamiento.

6. RESULTADOS

6.1. CONCENTRACIONES DE GLUCOSA EN SANGRE Y PESO DE LOS ANIMALES

Antes de aislar las mitocondrias de riñón, se monitorearon las concentraciones de glucosa en sangre para asegurar que la DM se había establecido en aquellos animales que recibieron la STZ, y que los grupos controles fueran normoglucémicos. Solo aquellos animales diabéticos cuya concentración de glucosa en sangre fue entre 300 y 600 mg/dl, se usaron en este trabajo.

Antes de inducir la DM se registraron las concentraciones de glucosa en sangre en ayuno de 12 – 14 hrs para asegurar que no existiera una hiperglucemia en algunos de los animales (datos no mostrados), el resultado fue que todos los individuos presentaron normoglucemia. En la figura 8 se muestran las concentraciones de glucosa en sangre tanto en animales control como en el grupo DM. Como se puede observar, en todos los tiempos, el grupo control se mantuvo normoglucémico (75 a 115 mg/dl) no siendo así para el grupo tratado con STZ, donde a partir de la primera semana postinducción se

registraron lecturas superiores a los 400 mg/dl , que se mantuvieron al término de las 16 semanas donde se alcanzaron valores de 500 mg/dl. Estos valores son indicativos de que los animales son hiperglucémicos y por lo tanto, adecuados para el desarrollo experimental.

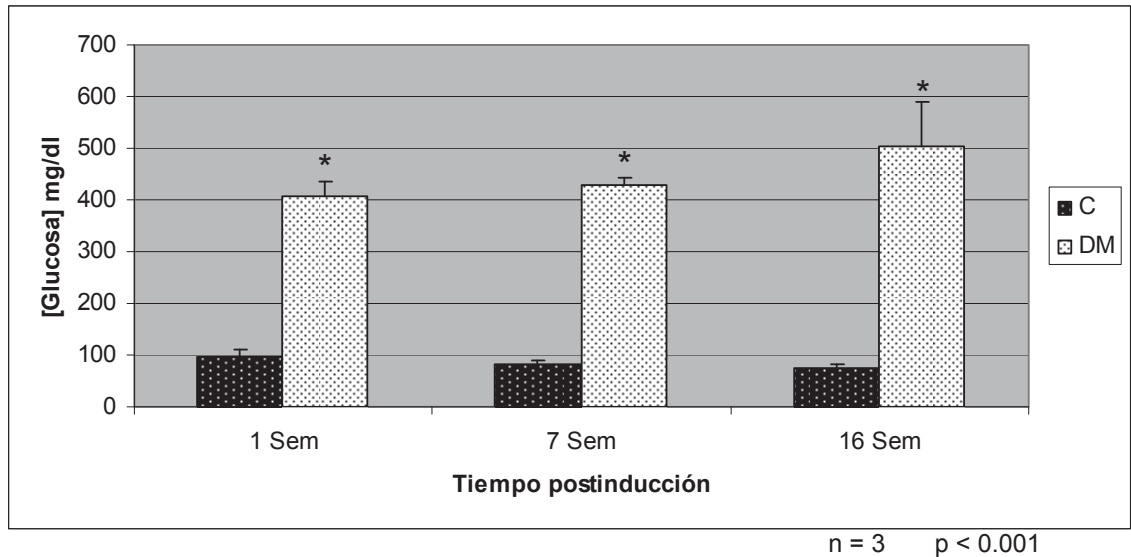


Figura 8. Concentración de glucosa en sangre. Determinados en animales control (C) y tratados con STZ (DM) a 1, 7 y 16 semanas. Los datos representan una media $\pm$ la desviación estándar de una $n=3$.

A la par del registro de glucosa en sangre, se obtuvo el peso de los animales, ya que, un rasgo característico de los pacientes diabéticos es la tendencia a perder peso sin causa aparente, lo cual sugiere el establecimiento del modelo para DM. Como se observa en la figura 9, previo a la inducción de la DM se tuvo un grupo de animales (indicado como 0 semanas) cuyos pesos oscilaban entre 280 y 380 gramos. Una semana después de haber inducido la DM el grupo tratado mantuvo el peso y su tendencia fue a perder hasta un 13 y 6 % al término de 7 y 16 semanas respectivamente, no siendo así para el grupo

control, el cual ganó un 23, 40 y mas del 80 % del peso al término de 1, 7 y 16 semanas, respectivamente.

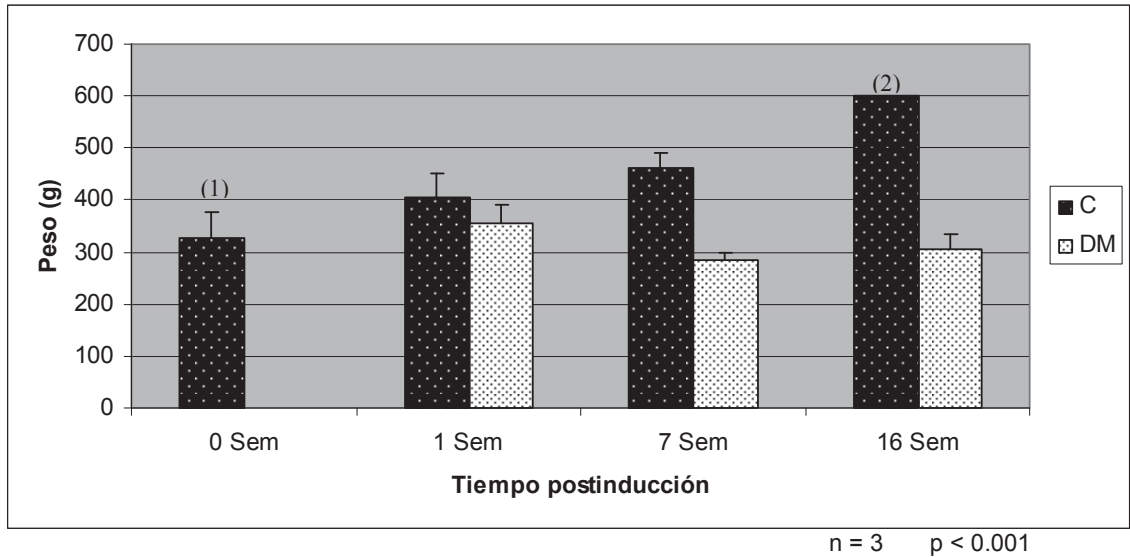


Figura 9. Peso de los animales. Los pesos fueron registrados a animales control (C) y tratados con STZ (DM). Los datos representan una media $\pm$ la desviación estándar de una n=3. (1) A las 0 semanas se cuenta con una n=30 del cual se partió para seleccionar al grupo control y DM. (2) A las 16 semanas en el grupo control no se muestra barra de error porque la mayoría de los animales pesaron más de 600 g.

6.2. CONCENTRACIONES DE ÓXIDO NÍTRICO EN MITOCONDRIAS DE RIÑÓN DE RATA DURANTE LA DIABETES

Una medida para investigar la formación de NO es midiendo las concentraciones de nitrito (NO_2) el cual es un producto generado por el rompimiento del NO, además, de que es estable y no volátil. Las concentraciones de NO en mitocondrias de riñón de rata control y DM se muestran en la figura 10. Se observó en ambos grupos una tendencia a ir disminuyendo las concentraciones de NO conforme avanza el tiempo en los tratamientos. La disminución va desde ~50% hasta ~90% en el grupo control

de 7 y 16 semanas respectivamente, comparados con su grupo de 1 semana. En el grupo DM se observa una disminución de más del 70% para el grupo de 7 semanas, y más de los 85% para el grupo de 16 semanas, comparados con su grupo de 1 semana. Sin embargo, a la primera y dieciséis semanas postinducción de la DM las concentraciones del NO fueron más del 50% en el grupo DM que en el grupo control, no siendo así al hacer las determinaciones a las siete semanas donde no se observaron diferencias significativas entre los grupos, sugiriendo que probablemente el animal responde para mantener su homeostasis y evitar o evadir los efectos del NO, pero después de cierto periodo donde persiste la hiperglucemia, este equilibrio se pierde. No obstante, los resultados nos permiten concluir que la actividad de la NOSmt disminuye conforme avanza la edad en los animales.

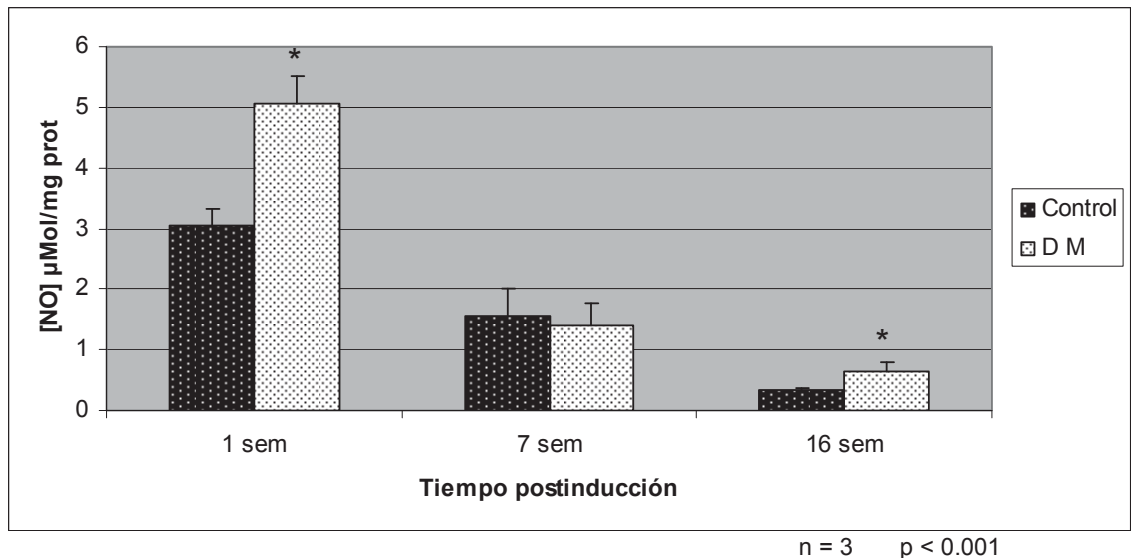
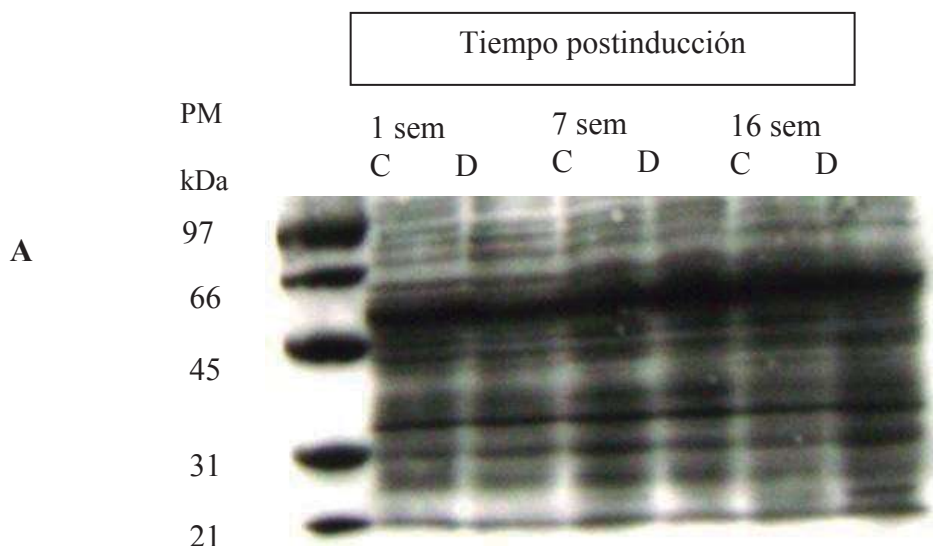


Figura 10. Concentración de NO en mitocondria de riñón de rata durante la DM. El gráfico muestra los resultados obtenidos como un promedio $\pm$ la desviación estándar de tres repeticiones de una n=3.

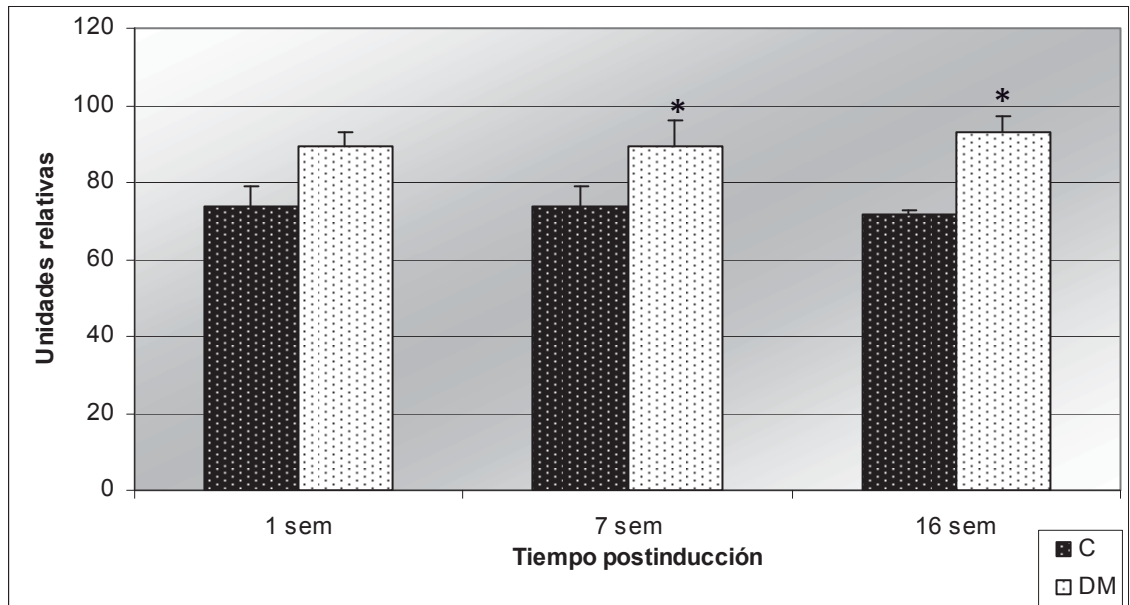
6.3. PERFIL DE NITROSILACIÓN EN LAS PROTEÍNAS DE MITOCONDRIAS DE RIÑÓN DE RATA

El NO interactúa rápidamente con el O_2^- para formar el $ONOO^-$, el cual es un potente oxidante que puede modificar los residuos de tirosina para formar 3-nitrotirosinas. Debido a su relativa estabilidad, este producto se ha vuelto un marcador de especies derivadas del NO involucrado en procesos patológicos. Se empleó el anticuerpo anti 3-NT para el análisis tipo Western blot. Los resultados obtenidos mostraron ligeros cambios en el perfil de nitrosilación de las proteínas mitocondriales (figura 11).

El análisis densitométrico revela que en las semanas 7 y 16 existe un ligero incremento en el perfil de nitrosilación, sin embargo, el estudio no permite discernir cual de las proteínas mitocondriales son más susceptibles de ser nitrosiladas por el $ONOO^-$ por lo que, queda por evaluar el perfil de nitrosilación de proteínas específicas que pudieran ser blanco del $ONOO^-$ y además clave en la función mitocondrial.



B



n=3 p<0.05

Figura 11. Perfil de nitrosilación de las proteínas mitocondriales. El panel A muestra una autoradiografía representativa del análisis tipo Western blot de una n=3. El panel B muestra el análisis densitométrico realizado con el software ImageJ Ver 1.37v. Las unidades empleadas son relativas al análisis de una misma área determinada para todas las bandas y muestran una media $\pm$ la desviación estándar de una n=3 tanto para el grupo control como el grupo DM.

6.4. LIPOPEROXIDACIÓN MITOCONDRIAL

Para determinar si se presenta estrés oxidativo mitocondrial durante la DM, se evaluó el daño a lípidos en la mitocondria, ya que son blancos de los radicales libres. Se empleo una modificación al método de TBARS reportado por Buege y Aust (1978).

Para tener un control positivo de la lipoperoxidación, *in vitro* se empleó un sistema oxidante formado por ascorbato/hierro a una concentración de 0.5/0.25 mM, respectivamente. Las muestras se preincubaban con el sistema

oxidante durante 15 min con agitación lenta en un medio de fosfatos con una concentración de proteína mitocondrial de 1 mg/ml. Como se puede observar en la figura 12, tanto el grupo control como el grupo DM presentan el mismo perfil de lipoperoxidación empleando el sistema antioxidante, sugiriendo que efectivamente los lípidos pueden ser dañados por agentes oxidantes.

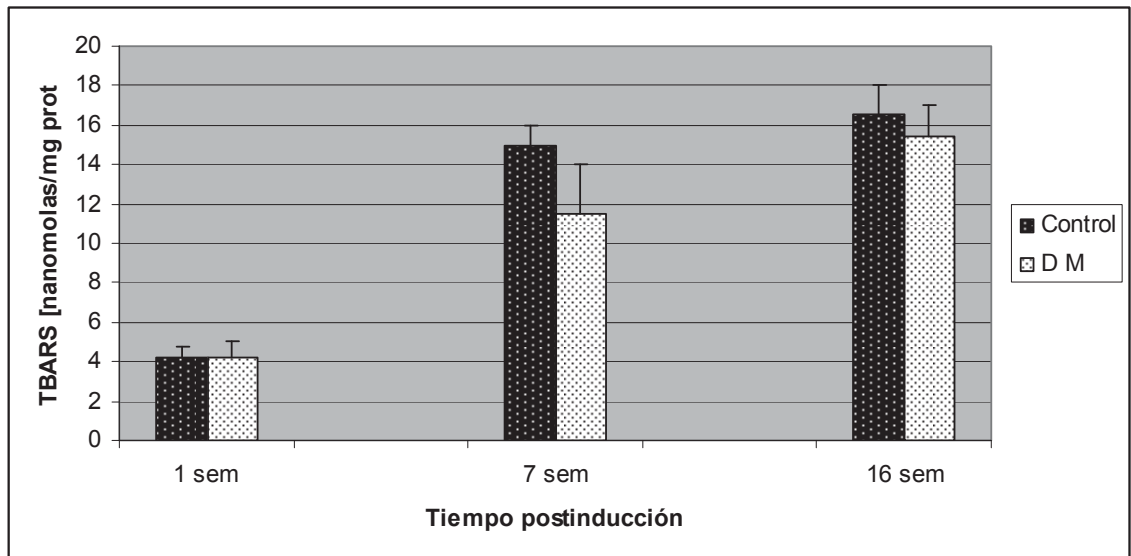


Figura 12. Lipoperoxidación mitocondrial inducida. Como control positivo de la lipoperoxidación se empleó un sistema oxidante compuesto por ascorbato y hierro (0.5/0.25 mM). El gráfico muestra los resultados obtenidos de una media $\pm$ la desviación estándar de tres repeticiones de una $n=3$.

Los resultados obtenidos para la peroxidación de lípidos sin el sistema oxidante se muestran en la figura 13, donde no se observan cambios significativos en la lipoperoxidación en el grupo control; sin embargo hay una ligera tendencia a disminuir la lipoperoxidación dentro de este grupo, sugiriendo que existen mecanismos de defensa ante el estrés provocado por el envejecimiento. En el grupo DM a etapas tempranas (1 semana) postinducción

no se observaron cambios significativos en la lipoperoxidación respecto a su control, pero a las 7 y 16 semanas hubo una disminución del 36.8 % y del 14.5 % respectivamente, comparados con su control en los mismos tiempos. Tanto en el grupo control como el DM se aprecia una ligera tendencia a reducir la lipoperoxidación, encontrando en el grupo DM un 33 % y un 26.5 % al término de las 7 y 16 semanas, respectivamente comparándolo con el grupo de 1 semana postinducción. Esto sugiere que en ambos grupos existen mecanismos de defensa que evitan el ataque a lípidos.

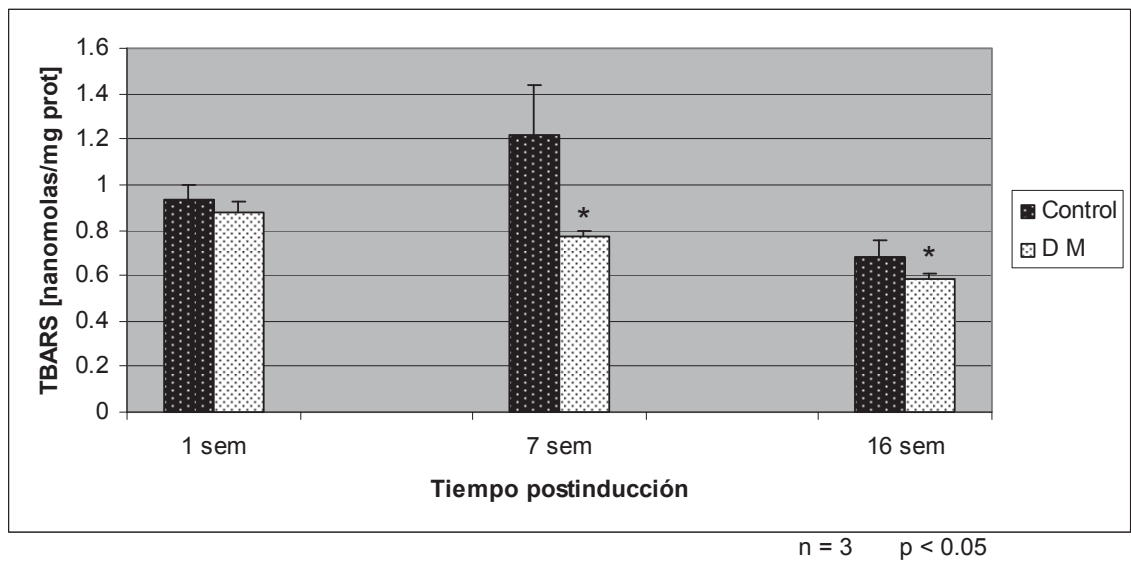
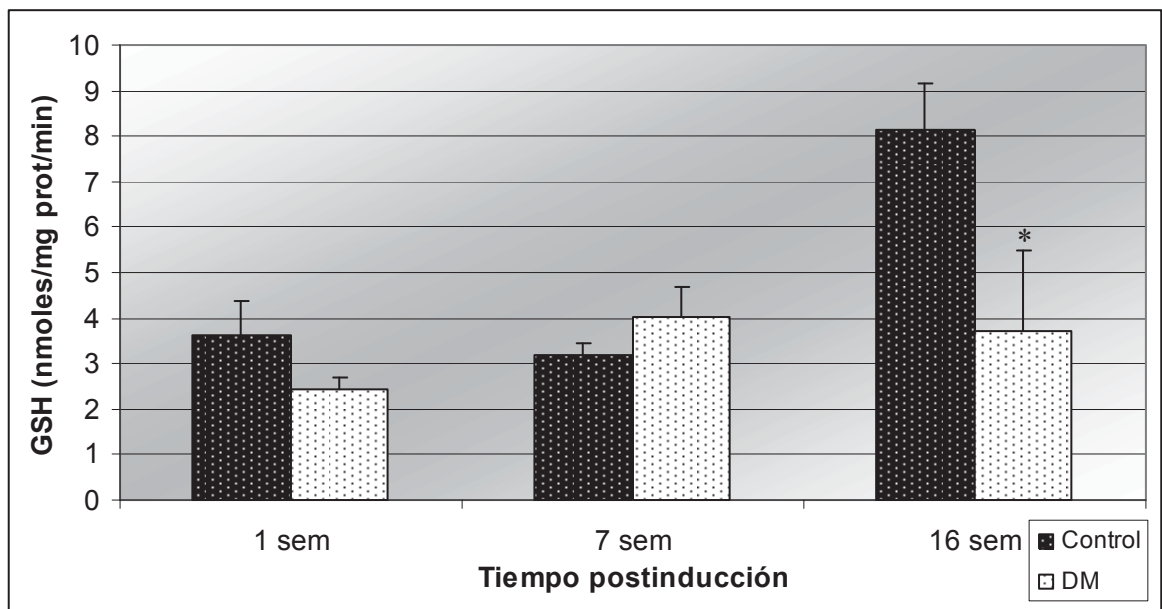


Figura 13. Lipoperoxidación mitocondrial. El gráfico muestra los resultados obtenidos como promedio $\pm$ la desviación estándar (n=3).

6.5. CONCENTRACION DE GLUTATIÓN TOTAL

Se determinaron las concentraciones de GSH total, ya que ni el perfil de nitrosilación y ni la lipoperoxidación indicaron estrés, por lo que sugiere que el

GSH esta involucrado en mitigar parte del estrés ocasionado en la DM. Para este ensayo se empleo el Glutathione assay kit de sigma, que mide las concentraciones totales de glutatión. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 14, donde se observa que tanto en el grupo control como en el grupo DM tiende a incrementarse el GSH, sin embargo, el grupo DM tiene menor GSH total respecto a los controles.



n=3 p<0.05

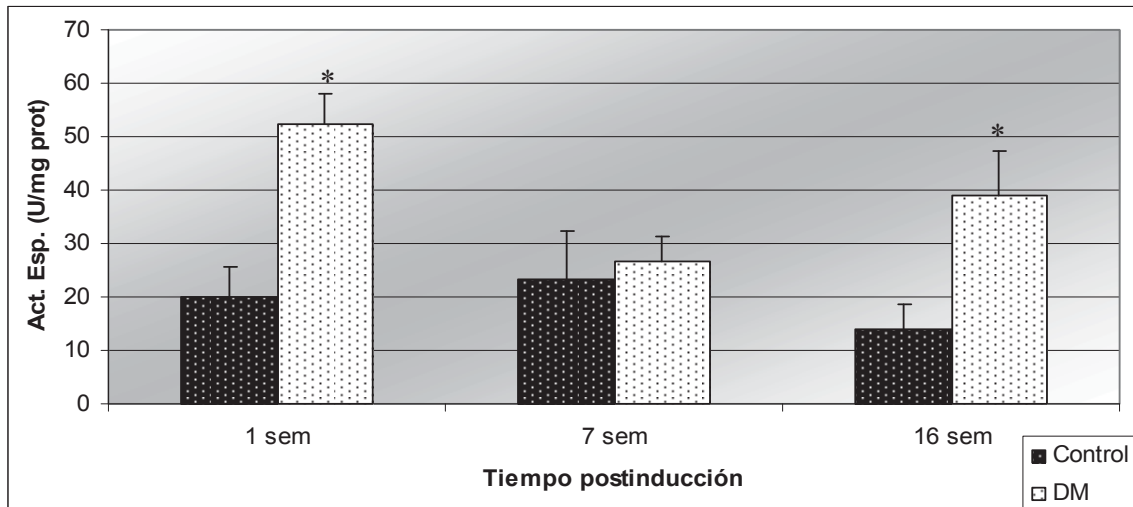
Figura 14. Concentración de GSH total en mitocondria de riñón de rata. Se empleó 1 mg/ml de proteína mitocondrial por cada muestra. El ensayo se hizo por triplicado en una n=3 y los resultados expresan la media $\pm$ la desviación estándar.

No obstante, cuando se comparan el grupo DM con su control en cada uno de los tiempos de tratamiento, se encontró que no existen diferencias significativas en los niveles de GSH total a la 1 y 7 semanas, no siendo así a las 16 semanas postinducción de la DM donde si se logra ver un cambio en el GSH total. Lo anterior indica, que bajo ciertas condiciones patológicas como la DM y

el mismo estrés ocasionado por el envejecimiento normal, activan mecanismos de defensa para resistir el daño oxidativo.

6.6. ACTIVIDAD DEL COMPLEJO MULTIENTZIMÁTICO PIRUVATO DESHIDROGENASA

La actividad de la PDH se determinó para inferir si la entrada de piruvato a la mitocondria y su posterior oxidación en el ciclo de Krebs, pudiera contribuir a la formación de ERO. Se empleo un ensayo acoplado a la medición de la piruvato deshidrogenasa descrito por Szutowicz y col. (1981). Los resultados que se observan en la figura 15, indican que la actividad de la PDH en los grupos controles se mantiene en un rango entre 13 y 23 U/mg de proteína.



n=3 p<0.05

Figura 15. ACTIVIDAD DEL COMPLEJO MULTIENTZIMÁTICO PIRUVATO DESHIDROGENASA EN MITOCONDRIAS DE RIÑÓN DE RATA. La actividad fue determinada en animales control y DM por triplicado en una n=3. Los resultados expresan la media $\pm$ la desviación estándar. Una unidad de actividad de PDH es definida como la cantidad de enzima requerida para producir 1 μ mol de acetil Co-A en un minuto.

Los grupos DM de 1 y 16 semanas postinducción muestran un incremento de más del doble de actividad, respecto a su control, no siendo así el grupo DM de 7 semanas, que presenta la misma actividad que su respectivo control. Estos resultados, sugieren que el piruvato generado en la glucólisis efectivamente entra a la mitocondria para su oxidación y que la actividad de la PDH si está involucrada en la generación de EROs. El resultado obtenido en la semana 7 postinducción pudiera reflejar lo que observamos en todos los ensayos para evaluar el estrés oxidativo, que efectivamente, la célula, activa mecanismos de defensa para evitar el daño.

7. DISCUSIÓN

La STZ (2-deoxi-2-(3-(metil-3-nitrosoureido)-D-glucopiranos)) es ampliamente usada para inducir diabetes experimental en animales. Se presume que es específicamente tóxica para las células β del páncreas debido a que el grupo glucosa que contiene, le permite ingresar hacia el interior de estas células por el transportador de glucosa GLUT2 (independiente de insulina para su función). Sin embargo, puede ser tóxico para otros tejidos que expresen este transportador, no obstante, se emplean concentraciones de STZ adecuadas para mitigar la citotoxicidad no específica, tal es el caso de la nefropatía diabética en donde se emplean dosis de 40 a 50 mg/kg de peso por vía intraperitoneal. De esta manera se logra observar solo el daño ocasionado por la hiperglucemia y no por efecto de la STZ (Breyer, 2005).

La acción citotóxica de la STZ como agente diabetógeno, es mediado vía alquilación del DNA de las células β del páncreas. Existen otras drogas empleadas para inducir DM, tal es el caso del alloxan, cuyo mecanismo de acción es vía la formación de radicales libres. Razón por la cual empleamos la DM-STZ como modelo ya que parte del trabajo se enfoca a evaluar niveles de ERO durante la DM. Como resultado de la acción de la STZ, las células β del páncreas son destruidas por necrosis (Szkudelski, 2001).

Una vez que se establece la hiperglucemia (figura 8), rasgo principal de la DM se desencadenan una serie de alteraciones metabólicas características y observables de la DM entre ellas, poliuria, polidipsia, polifagia y pérdida de peso (figura 9), que se sabe, causan daño a diferentes órganos incluyendo al riñón debido a que la DM daña células de manera selectiva, tales como las células endoteliales y mesangiales del glomérulo renal, cuya tasa de transporte de glucosa no declina rápidamente como resultado de la hiperglucemia por lo que se mantienen altas concentraciones de glucosa dentro de estas células (Brownlee, 2005).

Tanto en la DM clínica como en la experimental se caracteriza por un incremento en la tasa de filtración glomerular desde el inicio de la patología y en el curso de la misma, reflejándose por un incremento en el volumen urinario, excreción de sodio, potasio, glucosa, proteínas y una depuración de creatinina elevada (Khamaisi, 2006). El tejido renal sufre considerables alteraciones

funcionales y estructurales. Hay un progresivo engrosamiento de la membrana basal glomerular y daño a los riñones conforme la enfermedad avanza hasta llegar a una ND (Katyare y Satav, 2004).

La ND parece correlacionar con la severidad de la hiperglucemia, por lo que empleamos aquellos animales que se mantuvieran un rango similar de glucosa en sangre durante el desarrollo del trabajo (figura 8) para evitar discrepancias en los resultados obtenidos. En etapas tempranas y tardías de la DM, la mitocondria no se desacopla y las relaciones ADP/O se mantienen dentro del rango normal (Katyare y Satav, 2004). Esto permite evaluar diversos parámetros a partir de mitocondrias aisladas y purificadas de riñón.

Uno de los mediadores implicado en el desarrollo de la ND es el NO, que actúa como un mensajero vascular que activa la guanilato ciclasa soluble, resultando en elevados niveles de GMPc y la activación de múltiples vías intracelulares incluyendo la relajación dependiente del endotelio y la retroalimentación tubuloglomerular en el riñón induciendo disfunción endotelial (Khamaisi, 2006). La actividad de la NOSmt fue reconocida en mitocondria de corteza renal de rata por Boveris y col. (2003). El presente estudio confirma que la mitocondria aislada de riñón de rata-STZ muestra incrementados niveles de NO, asociado con una alterada defensa antioxidante en la DM tardía, en términos de GSH total. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Mastrocola y col., en el 2005 donde evaluaron la producción de óxido nítrico

mitocondrial en términos de oxidación de oxihemoglobina a metahemoglobina, y encontraron que, en cerebro de ratas-STZ la producción de NO fue más del doble que las del grupo control, sugiriendo que el NO mitocondrial está implicado en el daño oxidativo ya que el NO, a bajas y concentraciones fisiológicas, se une reversiblemente al centro Cu_B de la citocromo c oxidasa y puede parcialmente inhibir la transferencia de electrones al O_2 , actuando en competencia con el oxígeno.

En mitocondria de riñón de rata-STZ, la actividad de la NOSmt se incrementa, con consecuente hiperproducción de NO. El NO también actúa inhibiendo otros complejos de la cadena respiratoria a través de la nitrosilación, incluyendo a los complejos I, II, III y IV cuando es formado dentro de la mitocondria y no es removido por la defensa antioxidante (Ghafourifar y Sen, 2007), o puede ocasionar la oxidación de grupos tiol en las proteínas.

El NO interactúa rápidamente con el superóxido para formar peroxinitrito, un potente oxidante que modifica residuos de tirosina para formar 3-nitrotirosinas. Debido a que la vida media biológica del $ONOO^-$ esta en el rango de 10 – 20 ms, no puede ser medido directamente, por lo que se han desarrollado técnicas que nos permitan inferir sobre él (Radi, 2004).

Altos niveles de nitrotirosina son asociados con un gran número de enfermedades. La formación de peroxinitrito fue demostrado en biopsias de

riñón de pacientes con ND y en animales con DM (Pacher, 2007). A nivel de proteína, la nitración de tirosinas conduce a la pérdida o alteración de la función. Pruebas moleculares ofrecen un anticuerpo anti nitrotirosinas para la detección de péptidos y proteínas que contienen nitrotirosina. El anticuerpo se usa para el análisis tipo Western blot, y lo empleamos para evaluar el perfil de nitrosilación de proteínas mitocondriales. El ONOO^- puede modificar múltiples proteínas en la mitocondria, sin embargo, el perfil de nitrosilación no mostró cambios aparentes en las mitocondrias del grupo DM comparado con su control, observándose una nitrosilación basal en ambos grupos. No obstante, queda abierto para evaluar proteínas específicas e importantes para la función mitocondrial en riñón de rata-STZ. El ONOO^- también puede reaccionar con lípidos y contribuir aun más al daño mitocondrial y celular.

Debido a que los lípidos son los principales componentes de los organismos vivos y probablemente los primeros en ser atacados por los radicales libres, la lipoperoxidación puede jugar un papel importante en iniciar o mediar algunos aspectos relacionados con la edad y ciertas patologías. Los radicales libres realmente reaccionan con los ácidos grasos de las membranas para formar lipoperoxidos, los cuales pueden inducir un daño irreversible a la fluidez y plasticidad de la membrana y por consiguiente, daño irreversible a la integridad de la célula.

La oxidación de ácidos grasos poliinsaturados dirige a la formación de hidroperóxidos y endoperóxidos, los cuales a su vez pueden fragmentarse para producir un amplio rango de reactivos intermedios como los alquenes, hidroalquenes, malondialdehído (MDA) y 4-hidroxinonenal (HNE). Estos reactivos atacan grupos nucleofílicos en proteínas, una actividad que resulta en modificación irreversible en su función y estructura. Los productos finales de estas reacciones pueden ser aductos de MDA-lisina y de carboximetilisina por medios no enzimáticos (Praticó, 2002). En el presente estudio, no logramos medir el estrés oxidativo en términos de lipoperoxidación, probablemente porque el MDA y el HNE, dos de los productos principales del rompimiento de los lípidos dañados no reaccionen con el ácido tiobarbitúrico ya que el MDA es muy reactivo y como se mencionó antes, reacciona con los aminoácidos de las proteínas tales como la lisina, arginina y en general con el amino terminal de todos los aminoácidos (Slatter, 1999) antes de ser detectado por TBARS. Otra posible causa es que durante la DM, se presenten cambios en la composición de los lípidos, tal como fue demostrado por Qizhi Hu y col. (1994). Ellos analizaron la composición de los ácidos grasos en glicerofosfolípidos de colina (GFC) y glicerofosfolípidos de etanolamina (GFE) en diferentes órganos incluyendo el riñón y encontraron que en una DM de 8 semanas disminuyó la concentración de ácido araquidónico y aumentó la de ácido linoleico. Cabe mencionar que estos cambios fueron observados a partir de la tercera semana pero no a los 7 días de DM en GFC y GFE. Su estudio reveló que la reducción en la concentración de ácido araquidónico fue dependiente de la duración de la

DM. Estas observaciones ya se habían hecho en riñón de rata-STZ en 1993 por Holman y col., por lo que se sugiere que estos cambios en la composición de ácidos grasos de los fosfolípidos puede tener significantes efectos en la función celular y mecanismos de control para evitar el daño oxidativo, específicamente a lípidos en la DM. Lo anterior nos indica, que bajo ciertas condiciones patológicas como es la DM y el mismo estrés ocasionado por el envejecimiento normal activan mecanismos de defensa para resistir el daño oxidativo.

Sin embargo, persiste la teoría de que en la DM el estrés oxidativo es el rasgo principal de la DM, por lo que sugerimos un estudio más extensivo para detectar el estrés oxidativo, por ejemplo, evaluando la concentración de H_2O_2 o bien uno de los marcadores del daño oxidativo al DNA como es el 8-oxo-2'-deoxiguanosina (Shigenaga, 1994).

No obstante, la mitocondria, cuenta con una defensa antioxidante que involucra al GSH, el cual realiza una variedad de funciones metabólicas y fisiológicas en las células de los mamíferos, incluyendo la detoxificación de los radicales libres (Wang y Ballatori, 1998). El GSH es sintetizado en el citosol, importado a la mitocondria e involucrado en proteger contra del estrés oxidativo (Sarkela, 2001). Como consecuencia, el GSH es oxidado a GSSG, el cual a su vez se reduce rápidamente a GSH por la GSSG reductasa a expensas de NADPH formándose así un círculo cerrado.

Los principales grupos tiol en las mitocondrias son constituidos por el GSH (alrededor de 10mM) y bajo condiciones normales, la GSSG reductasa mantiene aproximadamente el 98% del GSH en su forma reducida. Motivo por el cual, evaluar la concentración de GSH total indica un buen estado antioxidante, ya que cuando la GSSG reductasa sufre daño o deterioro en su actividad, la habilidad para reducir el GSSG es pobre o nula y así dirigir una acumulación de GSSG y desproteger a la célula. El GSSG puede activar muchas enzimas como la glucosa-6-fosfatasa y fructosa 1, 6-bifosfatasa ambas involucradas en el metabolismo de carbohidratos, sin embargo, puede inhibir la piruvato cinasa, enzima involucrada en la regulación de la actividad de la PDH para el metabolismo del piruvato (Wang y Ballatori, 1998). La importancia de la PDH para el metabolismo de carbohidratos necesita la complejidad de su regulación por fosforilación en tres residuos de serina específicos. Cada uno de los tres sitios de fosforilación en E1 en mamíferos fueron encontrados ser importantes en la regulación de la enzima (Patel, 2001). La PDH también es inhibida por sus productos de reacción NADH y acetil-CoA (Hagg, 1976). Al evaluar la actividad de la PDH, se encontró una actividad incrementada tanto en etapas tempranas de la DM como en una etapa tardía, sugiriendo que la mayor parte del piruvato está desviado hacia el ciclo de Krebs y así, contribuir al estrés oxidativo.

8. CONCLUSIÓN

El estrés nitrosativo prevaleció sobre el estrés oxidativo y la actividad del complejo multienzimático piruvato deshidrogenasa se incrementó durante la diabetes mellitus en mitocondrias de riñón de rata diabética.

9. PERSPECTIVAS

- Evaluar los parámetros medidos en este trabajo a las semanas 5, 9 y 12 para tener una visión más amplia en su comportamiento.
- Analizar el perfil de oxidación de proteínas.
- Evaluar la participación de agentes antioxidantes administrados a los animales, antes y durante la hiperglucemia.
- Ampliar el estudio con animales seniles para observar los efectos de la hiperglucemia en las mitocondrias de riñón de rata.

10. BIBLIOGRAFÍA

Ahmed, R.G. 2005. The physiological and biochemical effects of diabetes on the balance between oxidative stress and antioxidant defense system. *Med. J. Islam. World Acad. Sci.* 15:31-42.

Akerboom, T.P., y Sies, H. 1981. Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods Enzymol.* 77:373 – 382.

Alderton, W.K., Cooper, C.E. y Knowles, R.G. 2001. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem. J.* 357:593-615.

Bartesaghi, S., Ferrer S.G., Peluffo G., Valez V., Zhang H., Kalyanaraman B. y Radi R. 2007. Protein tyrosine nitration in hydrophilic and hydrophobic environments. *Amino Acids.* 32:501-515.

Beckman, J.S., Beckman T.W., Chen J., Marshall P.A. y Freeman B.A. 1990. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: Implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87:1620-1624.

Blantz, R.C. y Munger K. 2002. Role of nitric oxide in inflammatory conditions. *Nephron.* 4:373-378.

Boveris, A., Valdez L.B., Alvarez S., Zaobornyj T., Boveris A.D. y Navarro A. 2003. Kidney mitochondrial nitric oxide synthase. *Antiox. Red. Sign.* 5:265-271.

Breyer, M.D., Böttinger E., Brosius F.C., Coffman T.M. Harris R.C., Heilig C.W. y Sharma K. Mouse models of diabetic nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* 16:27–45.

Brookes, P.S., 2004. Mitochondrial nitric oxide synthase. *Mitochondrion* 3:187-204.

Brownlee, M. 2004. The pathobiology of diabetic complications. *Diabetes* 54:1615-1625.

Buege, J.A. y Aust S.D. 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 52:302-310.

Busconi, L. y Michel T., 1992. Endothelial nitric oxide synthase. *J. Biol. Chem.* 268:8410-8413.

Chen, Q., Vazquez, E.J., Moghaddas, S., Hoppel, H.L. y Lesnefsky, E.J. 2003. Production of reactive oxygen species by mitochondria. *J. Biol. Chem.* 38:36027–36031.

Chinnery, P.F. y Schon E.A. 2003. Mitochondria. *J. Neurol. Neurosurg. Psych.* 74:1188-1199.

Duchen, M.R. 2004. Roles of mitochondria in health and disease. *Diabetes* 53:S96 –S102.

Fariss, M.W., Chan, C.B., Patel, M., Van Houten, B y Orrenius S. 2005. Role of mitochondria in toxic oxidative stress. *Molecular interventions.* 5:94-111.

Ghafourifar, P., Asbury M.L., Joshi S.S. y Kincaid E.D. 2005. Determination of mitochondrial nitric oxide synthase activity. *Methods Enzymol.* 396:424-44.

Ghafourifar, P. y Saavedra-Molina A. 2006. Functions of mitochondrial nitric oxide synthase. En: *Nitric Oxide, Cell Signaling and Gene Expression*. Taylor and Francis. Boca Raton. USA. 4:77-98.

Ghafourifar, P. y Sen C.K. 2007. Mitochondrial nitric oxide synthase. *Front. Biosci.* 12:1072-1078.

Giulivi, C., Kato K. y Cooper C.E. 2006. Nitric oxide regulation of mitochondrial oxygen consumption I: cellular physiology. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 291:C1225-C1231.

Giulivi, C., Poderoso J.J. y Boveris A. 1998. Production of nitric oxide by mitochondria. *J. Biol. Chem.* 173:11038-11043.

Gornall, A.G., Bardwill, G.J. y David, M.M. 1949. Determination of serum protein by means of the biuret reaction. *J. Biol. Chem.* 177:751-760.

Greaves, L.C. y Taylos R.W. 2006. Mitochondrial DNA mutations in human disease. *IUBMB Life.* 58:143-151.

Green, K., Brand, M.D. y Murphy, M.P. 2004. Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. *Diabetes.* 53:S1.

Green L.C., Wagner, D.A., Glogowski, J., Skipper, P.I., Wishnok, J.S. y Tannenbaum, S.R. 1982. Analysis of nitrate, and [15 N] nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.* 126:131-138.

Gross, J.L., De Acevedo M.J., Silveiro, S.P., Canai, L.H., Caramori, M.L. y Zelmanovitz, T. 2005. Diabetic nephropathy: diagnosis, prevention, and treatment. *Diabetes Care.* 28:176-188.

Hagg, S.A., Taylos S.I. y Ruderman N.B. 1976. Glucose metabolism in perfused skeletal muscle. *Biochem. J.* 158:203-210.

Halliwell, B. 1985. Free radicals in biology and medicine. Third edition. Oxford Science Publications.

Hervouet, E., Simonnet H. y Godinot C. 2007. Mitochondria and reactive oxygen species in renal cancer. *Biochimie* XX:1-9.

Holman, R.T., Johnson S.B., Gerrard J.M., Maurer S.M., Sandberg S.K. y Brown D.M. 1993. Arachidonic acid deficiency in streptozotocin-induced diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 80:2375-2379.

Hu, Q., Ishii, E y Nakagawa, Y. 1994. Differential changes in relative levels of arachidonic acid in major phospholipids from rat tissues during the progression of diabetes. *J. Biochem*, 115:405-408.

Kamijo, H., Hguchi M. y Hora K. 2006. Chronic inhibition of nitric oxide production aggravates diabetic nephropathy in outsuka long-evans tokushima fatty rats. *Nephron. Physiol*. 104:12-22.

Kanai, A.J., Pearce, L.L., Clemens, P.R., Birder, L.A., VanBibber, M.M., Choi, S., de Groat, W.C. y Peterson, J. 2001. Identification of a neuronal nitric oxide synthase in isolated cardiac mitochondria using electrochemical detection. *Physiology*. 98:14126-14131.

Katyare S.S. y Satav, J.G. 2005 Effect of streptozotocin-induced diabetic on oxidative energy metabolism in rat kidney mitochondria. A comparative study of early and late effects. *Diabetes, Obesity Metabol.* 7:555–562.

Khamaisi, M., Keynan S., Bursztyn M., Dahan R., Reinhartz E., Ovadia H. y Raz I. 2006. Role of renal nitric oxide synthase in diabetic kidney disease during the chronic phase of diabetes. *Nephron Physiol.* 102:72-80.

Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227:680-685.

Lamas, S. y Cadenas E. 2006. Nitric oxide, cell signaling, and gene expression. Quijano C., Cassina A., Castro L., Rodriguez M y Radi R. Peroxynitrite: A mediator of nitric oxide-dependent mitochondrial dysfunction in pathology. *Taylor and Francis Group.* 5:99-143.

Logan, D.C., 2006. The mitochondrial compartment. *J. Experim. Bot.* 57:1225-1243.

Marc W.F., Catherine B.C, Manisha P, Bennett V H, y Sten O. 2005. Mitochondria in Toxic Oxidative Stress. *Molecular Interventions.* 5:94-111.

Margineantu, D.H., Brown, R.M., Brown, G.K., Marcus, A.H., y Capaldi, R.A. 2002. Heterogeneous distribution of pyruvate dehydrogenase in the matrix of mitochondria. *Mitochondrion* 1:327–338.

Mastrocola, R., Restivo, F., Vercellinatto, I., Danni, O., Brignardello, E., Aragno, M y Boccuzzi, G. 2005 Oxidative and nitrosative stress in brain mitochondria of diabetic rats. *J. Endocrinol.* 187:37-44.

Meister, A. 1988. Glutathione metabolism and its selective modification. *J. Biol. Chem.* 263:17205-17208.

Nair, S. 1991. Flow cytometric monitoring of glutathione content and anthracycline retention in tumor cells. *Cytometry* 12:336 – 342.

Nisoil, E. y Carruba, M.O. 2006. Nitric oxide and mitochondrial biogenesis. *J. Cell Sci.* 119:2855-2862.

Pacher, P., Beckman J.S. y Liaudet L. 2007. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev.* 87:315-424.

Patel, M.S. y Korotchkina L.G. 2001. Regulation of mammalian pyruvate dehydrogenase complex by phosphorylation: complexity of multiple phosphorylation sites and kinases. *Experim. Mol. Med.* 33:191-197.

Patricó, D. 2002. Lipid peroxidation and the aging process. *Sci. Aging Knowledge Environ.* 50:re5.

Payne, J. y Morris, J.G. 1969. Pyruvate carboxylase in *Rhodopseudomonas sphaeroides*. *J. Gen. Microbiol.* 59:97-101.

Radi, R. 2004. Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 12:4003-4008.

Raza, H., Prabu S.K., Robin M. y Avadhani N.G. 2004. Elevated mitochondrial cytochrome P450 2E1 and glutathione S-transferase A4-4 in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes.* 53:185-194.

Saavedra-Molina, A. y Devlin, T.M. 1997. Effect of extra- and intra-mitochondrial calcium on citrulline synthesis in rat liver. *Amino Acids.* 12: 293-298.

Sarafidis, P.S y Ruilope, L.M. 2006. Insulin resistance, hyperinsulinemia, and renal injury: Mechanism and implications. *Am. J. Nephrol.* 26:232–244.

Sarkela, T.M., Berthiaume J., Elfering S., Gybina A.A. y Giulivi C. 2001. The modulation of oxygen radical production by nitric oxide in mitochondria. *J. Biol. Chem.* 276:6945-6949.

Sato, Y, Hotta N, Sakamoto N, Matsuoka S, Ohishi N, y Yagi K. Lipid peroxide level in plasma of diabetic patients. *Biochem, Med*, 21:104, 1979.

Schonhoff, C.M., Gaston B. y Mannik J.B. 2003. Nitrosilation of cytochromo c during apoptosis. *J. Biol. Chem.* 278:18265-18270.

Sharma, SP. 2004. Nitric oxide and the kidney. *Indian J. Nephrol.* 14: 77-84.

Shigenaga, M.K., Hagen T.M y Ames B.N. 1994. Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91:10771-10778.

Slatter, D.A., Paul R.G., Murray M. y Bailey A.J. 1999. Reactions of lipid-derived malondialdehyde with collagen. *J. Biol. Chem.* 274:19661-19669.

Smolle, M., Prior, A.E., Brown, A.E., Cooper, A., Byron, O. y Lindsay, J.G. 2006. A new level of architectural complexity in the human pyruvate dehydrogenase complex. *J. Biol. Chem.* 281:19772-19780.

SSA (Secretaría de Salud y Asistencia México). 2006. Disponible en: <http://www.salud.gob.mx/>,

Steinke, J.M., Sinaiko, A.R., Kramer, M.S., Suissa, S., Chavers, B.M., y Mauer, M. 2005 The early natural history of nephropathy in type 1 diabetes. *Diabetes*. 54:2164–2171.

Szkudelski, T. 2001. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol. Res*. 50:536-546

Szutowicz, A. 1981. Determination of pyruvate dehydrogenase and acetyl CoA synthetase activities using citrate synthase. *Anal. Biochem*. 115:81-87.

Towbin, H., Staehelin, T., y Gordon, J. 1979. Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. *Proc Natl Acad Sci. USA*. 76:4350-4354.

Valdez, L.B., Zaoborny T. y Boveris A. 2005. Functional activity of mitochondrial nitric oxide synthase. *Cell Biol. Physiol*. 396:444-455.

Vázquez, M.M.E. y Tuena de Gomez P.M. 2002. Mitocondria. *Editorial Prado, S. A. de C. V.* Chávez E y Zazueta C. Transporte de metabolitos en mitocondrias. 3:49-64.

Veelken, R., Hilgers, K. F., Hartner, A., Haas, A., Böhmer, K. P., and Sterzel, R. B. 2000. Nitric oxide synthase isoforms and glomerular hyperfiltration in early diabetic nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* 11: 71–79.

Wang, W., y Ballatori N. 1998. Endogenous glutathione conjugates; Occurrence and biological functions. *Pharmacol. Rev.* 50:335-355

World Health Organization. 2006. Disponible:
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/>

Yechoor, V.K., Patti, M.E., Saccone, R. y Kahn, R. 2002. Coordinated patterns of gene expression for substrate and energy metabolism in skeletal muscle of diabetic rats. *Genetics.* 99:10587-10592.

Yu, T., Robotham, J.L. y Yoon, Y. 2006. Increased production of reactive oxygen species in hyperglycemic conditions requires dynamic change of mitochondrial morphology. *Proc. Natl. Acad. Sci.USA.* 103:2653-2658.