



UNIVERSIDAD MICHUACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
QUÍMICO-BIOLÓGICAS

**“EFECTOS DEL RESVERATROL SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO
INDUCIDO POR CALCIO, EN MITOCONDRIAS DE CORAZÓN DE
RATA”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRÍA EN CIENCIAS

EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

PRESENTA:

Q.F.B. Areli Gutiérrez Pérez

Asesor:

D. C. ALFREDO SAAVEDRA MOLINA

COMITÉ TUTORIAL:

D. C. CARLOS CERVANTES VEGA
D. C. RAFAEL SALGADO GARCIGLIA
D. C. JOSÉ LÓPEZ BUCIO
D. C. SALVADOR MANZO ÁVALOS

Morelia, Mich. Agosto de 2007.

DEDICATORIA

A mis padres Héctor Gutiérrez López y Yolanda Imelda Pérez Villaseñor que construyeron unos cimientos fuertes y que con su cariño tanto terrenal como divino me han apoyado siempre en la realización de mis sueños.

A todas las personas (familiares, amigos, compañeros) que me han acompañado en el camino, a veces arduo, a veces exquisito de esta maestría.

In memoriam de mi madre que nunca me ha abandonado porque en mi corazón siempre vivirá.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Alfredo Saavedra Molina por la asesoría y el apoyo prestados para la realización de este trabajo, además de la amistad que surgió en su compañía.

A los Doctores en Ciencias: D.C. Salvador Manzo Ávalos, D.C. Carlos Cervantes Vega, D.C. José López Bucio, D.C. Rafael Salgado Garciglia; por su participación como parte del comité tutorial y como sinodales, así como por los aportes y sugerencias hechas para la realización del presente trabajo.

A mis compañeros de maestría: Sonia, Lupita, Yesenia, León, Arnoldo, Idolina, Rosenda, Juan Carlos, Alí, Briseida.

Y muy especialmente a: Luz María, Paty y César que conformaron conmigo los fieles de siempre, nunca me abandonaron e hicieron de esta travesía, una experiencia maravillosa e inolvidable.

A mi clon por ser mi hermana, mi amiga, mi confidente, mi brazo derecho, mi departamento de logística y muchas cosas más, por las que le estaré eternamente agradecida.

A mis compañeros de laboratorio: Christian, Elizabeth, Edgar, José Luis, Evangelina, Sacnité, Viridiana, Ruth, Mirella y Rosalía. Una familia grande que dará grandes frutos a la ciencia.

A Alberto Flores García, por su asesoría en el procesamiento estadístico de los datos.

Al D.C. Víctor Manuel Baizabal Aguirre del CIDEM, por su disposición y ayuda técnica al realizar los experimentos de Glutación.

Este trabajo se realizó gracias al apoyo parcial de CONACyT (43705); Fondos Mixtos CONACyT-Gobierno de Michoacán (64277); CIC-UMSNH (2,16); y mediante la beca de maestría CONACyT con número de registro: 188680.

INDICE**PÁGINAS**

1 RESUMEN	2
2 INTRODUCCIÓN	3
2.1 ANATOMÍA Y FISIOLOGÍA DEL CORAZÓN	3
2.2 DESÓRDENES CARDIOVASCULARES	5
2.2.1 INFARTO AGUDO DEL MIOCARDIO	6
2.3 LA MITOCONDRIA.....	7
2.3.1 MITOCONDRIAS CARDIACAS.....	9
2.4 EL CALCIO.....	12
2.4.1 TRANSPORTE DE CALCIO MITOCONDRIAL	12
2.5 RADICALES LIBRES Y ESPECIES REACTIVAS	15
2.6 ÓXIDO NÍTRICO	16
2.6.1 ÓXIDO NÍTRICO SINTASA.....	17
2.6.1.1 ÓXIDO NÍTRICO SINTASA MITOCONDRIAL.....	20
2.7 DEFENSAS ANTIOXIDANTES	21
2.8 EL RESVERATROL.....	22
2.9 EL PORO DE LA TRANSICIÓN DE LA PERMEABILIDAD MITOCONDRIAL.....	24
2.10 EL GLUTATIÓN.....	26
3 HIPÓTESIS	28
4 OBJETIVOS	28
4.1 OBJETIVO GENERAL.....	28
4.1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
5 MATERIALES Y MÉTODOS	29
5.1 REACTIVOS.....	29
5.2 ANIMALES.....	29
5.3 AISLAMIENTO DE LAS MITOCONDRIAS.....	29
5.4 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA MITOCONDRIAL.....	30
5.5 CÁLCULO DE LAS CONCENTRACIONES DE CALCIO	30
5.6 MEDICIÓN DE LA RESPIRACIÓN MITOCONDRIAL MEDIANTE OXIMETRÍA.....	31
5.7 EVALUACIÓN DE LA PERMEABILIDAD MITOCONDRIAL.....	31
5.8 DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DEL ÓXIDO NÍTRICO MITOCONDRIAL	32
5.9 MEDICIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE GLUTATIÓN TOTAL	34
5.10 DETERMINACIÓN DE LA LIPOPEROXIDACIÓN MITOCONDRIAL.....	35
6 RESULTADOS	36
6.1 EFECTO DEL RESVERATROL SOBRE LOS NIVELES DE GLUTATIÓN TOTAL EN LA MITOCONDRIA.....	36
6.2 EFECTO DEL RESVERATROL EN LA LIPOPEROXIDACIÓN MITOCONDRIAL.....	38
6.3 EFECTO DEL RESVERATROL EN LA RESPIRACIÓN MITOCONDRIAL.....	39
6.4 EFECTO DEL RESVERATROL SOBRE LA PRODUCCIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO.....	43
6.5 EFECTO DEL RESVERATROL SOBRE LA TRANSICIÓN DE LA PERMEABILIDAD MITOCONDRIAL	46
7 DISCUSIÓN	49
8 CONCLUSIÓN	55
9 BIBLIOGRAFÍA	55

1 RESUMEN

El resveratrol es un polifenol que se encuentra presente en el vino tinto además de otras fuentes como cacahuates, moras, uvas, etc. Se ha demostrado su carácter cardioprotector, acción antiinflamatoria, anticancerígena, así como también su capacidad antioxidante en modelos biológicos tales como: líneas celulares cancerígenas, células normales, órgano completo, y otros.

Debido a que la mitocondria es el principal orgánulo productor de radicales libres, el objetivo del trabajo fue conocer los efectos del resveratrol sobre las principales funciones mitocondriales, en condiciones de estrés oxidativo inducido por las concentraciones de 0.5, 1.0 y 5.0 μM de calcio. También se buscó relacionar el daño cardíaco causado por el estrés oxidativo, así que se utilizaron mitocondrias de corazón de rata como modelo experimental.

Los resultados de este trabajo muestran que el resveratrol per se, aumentó el consumo de oxígeno en un 30% provocando desacoplamiento mitocondrial, disminuyó los índices de lipoperoxidación en un 50% aún con la adición del sistema oxidante Fe/Asc, mantuvo los niveles de glutatión total a concentraciones fisiológicas y aumentó la producción de óxido nítrico en un 91%. Con base en todos los resultados obtenidos, se concluye que el resveratrol actúa protegiendo desde el nivel mitocondrial, induciendo mecanismos que desencadenan el preconditionamiento cardíaco en condiciones patológicas que cursan con estrés oxidativo y elevación de las concentraciones de calcio.

2 INTRODUCCIÓN

2.1 ANATOMÍA Y FISIOLOGÍA DEL CORAZÓN

El corazón es un órgano que se encuentra en el mediastino (cavidad limitada por los pulmones, el esternón, la columna vertebral, el diafragma y la base del cuello), tiene la forma de un cono truncado, con su vértice hacia abajo y a la izquierda y su base dirigida hacia arriba, atrás y a la derecha. El interior del corazón está dividido en cavidades: las dos superiores o atrios (aurículas), están separadas entre sí por un tabique llamado septo interatrial (tabique interauricular); las dos cavidades inferiores o ventrículos están separadas entre sí por medio de un tabique llamado septo interventricular (tabique interventricular). (1)

De los ventrículos salen dos arterias, del lado izquierdo sale la arteria aorta que queda separada del ventrículo por medio de una válvula aórtica y del ventrículo derecho sale la arteria pulmonar separada del ventrículo por la válvula pulmonar. La aurícula derecha tiene dos orificios donde desembocan la vena cava superior y la vena cava inferior y la aurícula izquierda tiene cuatro orificios donde desembocan las venas pulmonares. El corazón tiene también, como cualquier órgano, vasos sanguíneos propios que le llevan oxígeno y sustancias nutritivas y recogen dióxido de carbono; son las arterias y venas coronarias del corazón. (1) Las principales partes del corazón se detallan en la Fig. 1.

Las fibras musculares cardiacas están constituidas por células musculares conectadas en serie. Así que, desde el punto de vista funcional, los iones fluyen con relativa facilidad siguiendo el eje de las fibras musculares cardiacas, de manera que los potenciales de acción pasan de una célula muscular cardiaca a otra; por lo tanto, el músculo cardiaco es un sincitio funcional, en el cual las células están tan estrechamente unidas que cuando una es excitada el potencial de acción se difunde a todas pasando de célula a célula, lateralmente, a través de las

interconexiones en forma de red. El corazón está constituido principalmente por dos sincitios funcionales separados, el sincitio auricular y el sincitio ventricular. Estos se hallan separados uno de otro por tejido fibroso que rodea los anillos valvulares, pero un potencial de acción puede ser conducido desde el sincitio auricular al ventricular por vía de un sistema especializado conductor, el haz A-V (1).

El corazón bombea la sangre contrayendo las aurículas para que pase a los ventrículos; éstos se contraen y envían la sangre al organismo a través de las arterias. La fase de contracción se llama sístole y la fase en que los músculos están relajados y las cavidades se llenan de sangre, se llama diástole (2).

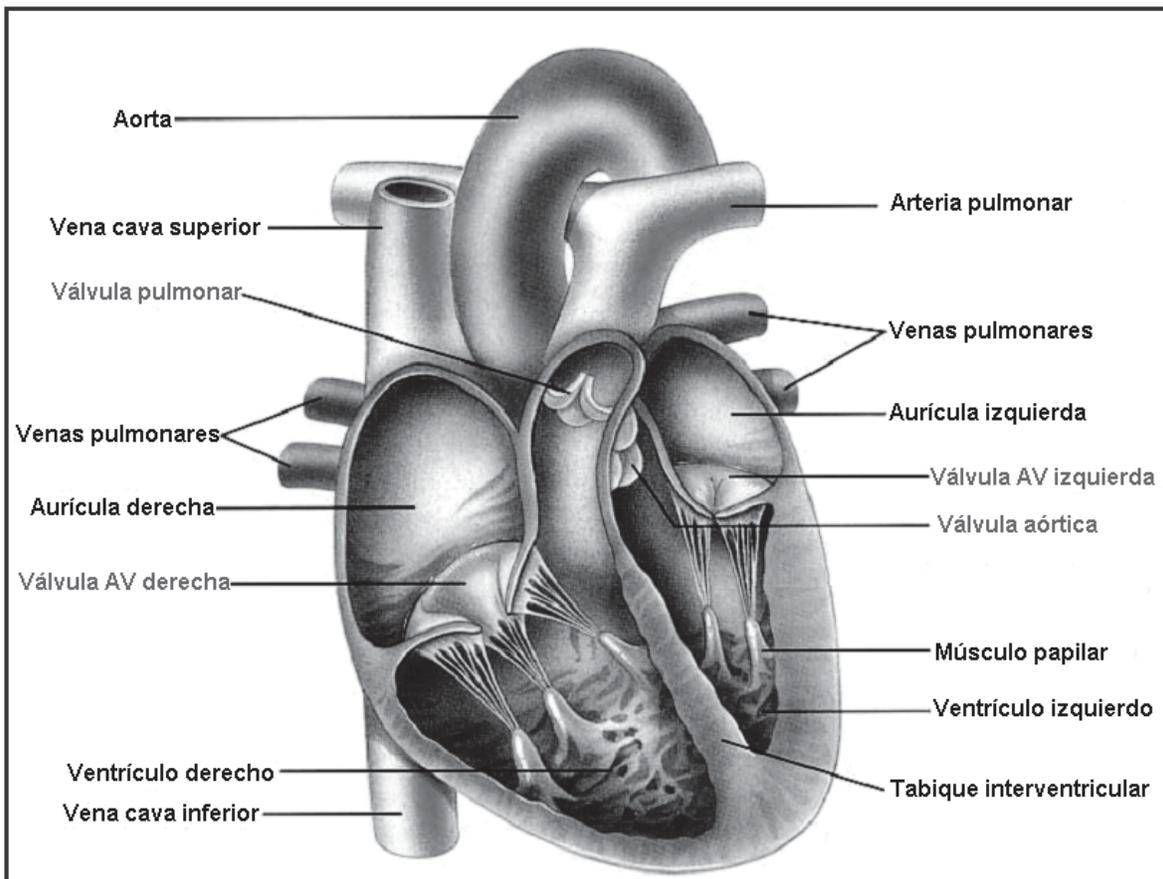


Figura 1. Anatomía del corazón humano. Tomado y modificado de www.colorado.edu/kines/Class/IPHY3430-200/09cardio.html .

2.2 DESÓRDENES CARDIOVASCULARES

Se considera factor de riesgo cardiovascular a aquellos hábitos, antecedentes o situaciones que desempeñan un papel importante en la predisposición a desarrollar una enfermedad cardiovascular. Entre más factores de riesgo tenga un individuo, mayores serán sus probabilidades de padecer una enfermedad (3).

Entre los principales factores de riesgo tenemos: tabaquismo, colesterol elevado, hipertensión arterial, dieta rica en grasa, factores trombogénicos, diabetes, sedentarismo, obesidad, estrés, depresión, consumo excesivo de alcohol, pertenecer al sexo masculino, historia familiar de enfermedad coronaria precoz, triacilglicéridos elevados y edad avanzada (3).

Entre las enfermedades cardiovasculares más frecuentes están: angina de pecho, aterosclerosis, hipertensión arterial, hipertrofia ventricular izquierda y las arritmias severas, entre otras, que pueden desembocar en infarto agudo del miocardio (3).

Muchas de las enfermedades cardiovasculares cursan con episodios intermitentes de isquemia y reperfusión, durante los cuales se observa estrés oxidativo y un desequilibrio de las concentraciones de calcio, que trae como consecuencia un descontrol en el potencial electrofisiológico de contracción y dilatación de los miocitos. Esto se observa sintomáticamente como arritmias, taquicardias y si el daño en el tejido es masivo se produce el infarto agudo del miocardio que es letal para el individuo en cuestión (4).

Durante la reperfusión se favorece un efecto combinado entre la sobrecarga de calcio y las especies reactivas de oxígeno (ERO), que incide sobre la actividad de las proteínas que regulan los movimientos de calcio en el retículo sarcoplásmico, aumentando el contenido del calcio intracelular y en consecuencia el mitocondrial (5).

2.2.1 INFARTO AGUDO DEL MIOCARDIO

Durante la isquemia se produce edema tisular y una contracción desordenada de las fibras miocárdicas. A los 20 minutos de la isquemia, disminuye el tamaño y número de gránulos de glucógeno y se observa edema y distorsión de las mitocondrias. A los 60 minutos existe edema de las fibras miocárdicas con anomalías de las mitocondrias, caracterizadas por hinchamiento y desorganización interna. A las 2 horas desaparecen las uniones cerradas de los discos intercalares, hay crecimiento notable de las mitocondrias, adelgazamiento y ruptura de los filamentos, desorganización de la fibrillas y aglutinación de las mitocondrias. Si la lesión isquémica es irreversible, las mitocondrias se fragmentan. En el miocardio isquémico, las mitocondrias sufren hinchamiento y contienen en su interior depósitos de fosfato de calcio. Muchos de estos cambios se vuelven más intensos al restablecerse el riego sanguíneo. Cuando la isquemia es grave y persistente, se presenta necrosis de coagulación o necrosis con bandas de contracción, ocasionada por el aumento en la entrada de calcio a las fibras necrosadas, lo que determina un paro de las fibras de contracción. Existe lesión de las mitocondrias con densidades amorfas y evidentes, pero sin calcificación. Por lo anterior, Braunwald (6) sugirió que las mitocondrias tienen un importante papel durante el infarto.

2.3 LA MITOCONDRIA

Las mitocondrias son pequeños orgánulos de alrededor de 0.2 a 1 μm de diámetro por 1 a 4 μm de longitud; constituidos por dos membranas: la externa y la interna, las cuales delimitan a su vez al espacio intermembranal y a la matriz mitocondrial (Fig. 2). La membrana externa es bastante permeable, permite el paso de diversas sustancias a través de las porinas y contiene los receptores de las proteínas de

importación. La membrana interna es altamente impermeable, por lo que cuenta con una gran variedad de transportadores específicos. La matriz mitocondrial contiene muchas enzimas solubles, que participan en vías metabólicas como el ciclo de Krebs y la β -oxidación de los ácidos grasos. También en este compartimiento se encuentra el ADN mitocondrial y la maquinaria necesaria para la replicación, la transcripción y la síntesis de proteínas como los ribosomas y el ARN de transferencia (16).

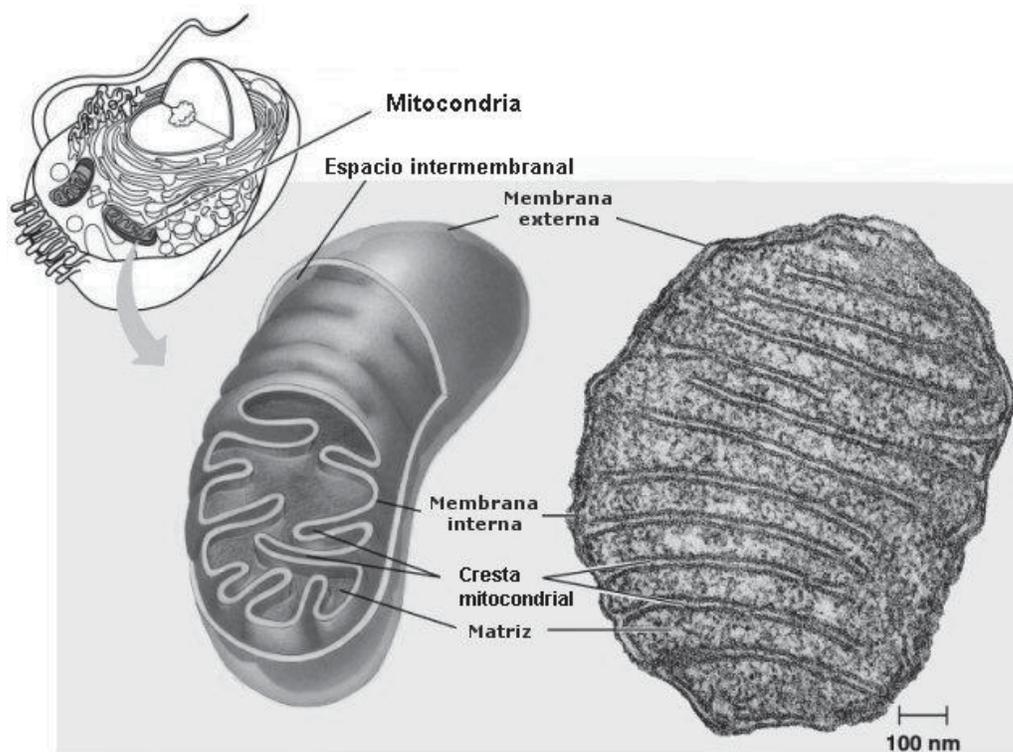


Figura 2. Esquema de la estructura de una mitocondria. Tomado y modificado de © Pearson Education, Inc., publicado por Benjamín Cummings.

Las mitocondrias son los orgánulos de las células eucariotas aeróbicas donde ocurren las transformaciones energéticas más importantes: la oxidación de sustratos en el ciclo de Krebs y la β -oxidación, el transporte de electrones a través de la cadena respiratoria y la fosforilación de ADP para formar ATP. Embebidos en

2.3.1 MITOCONDRIAS CARDIACAS

Un cardiomiocito mide en promedio $118 (\pm 16) \mu\text{m}$ de longitud, en el cual un 74% del volumen total es ocupado por mitocondrias (9). El principal papel de las mitocondrias en el tejido cardíaco es suministrar a los cardiomiocitos el ATP, una fuente de energía necesaria para la contracción y para mantener la homeostasis, la síntesis proteica y otras funciones celulares importantes. El corazón de rata contiene una superficie total de membrana interna mitocondrial de entre 12 y 20 m^2 (10).

Las mitocondrias en el corazón se localizan en línea entre las miofibrillas a lo largo de la longitud total de las fibras (Fig. 4-A). Esta geometría permite la proximidad de las células a los compartimentos que sintetizan energía y los que la utilizan (Fig. 4-B). Estructuralmente están empaquetadas fuertemente, la membrana interna mitocondrial tiene gran cantidad de crestas en forma de pliegues. La concentración proteica de estas membranas es alta y consiste principalmente de los componentes de la cadena respiratoria. El volumen del espacio de la matriz es pequeño en la mitocondria cardíaca con relación a otros tejidos (11).

Sin embargo, la mitocondria, específicamente la de corazón, tiene otras funciones como es la de acumular calcio cuando las concentraciones citosólicas del catión son altas (12); además, se le ha relacionado con coordinar algunas vías de transducción de señales mediadas por calcio (13). Se dice que es la encargada de mantener gradientes iónicos en células excitables. Además de su importante función como sensoras de los niveles de oxígeno celular.

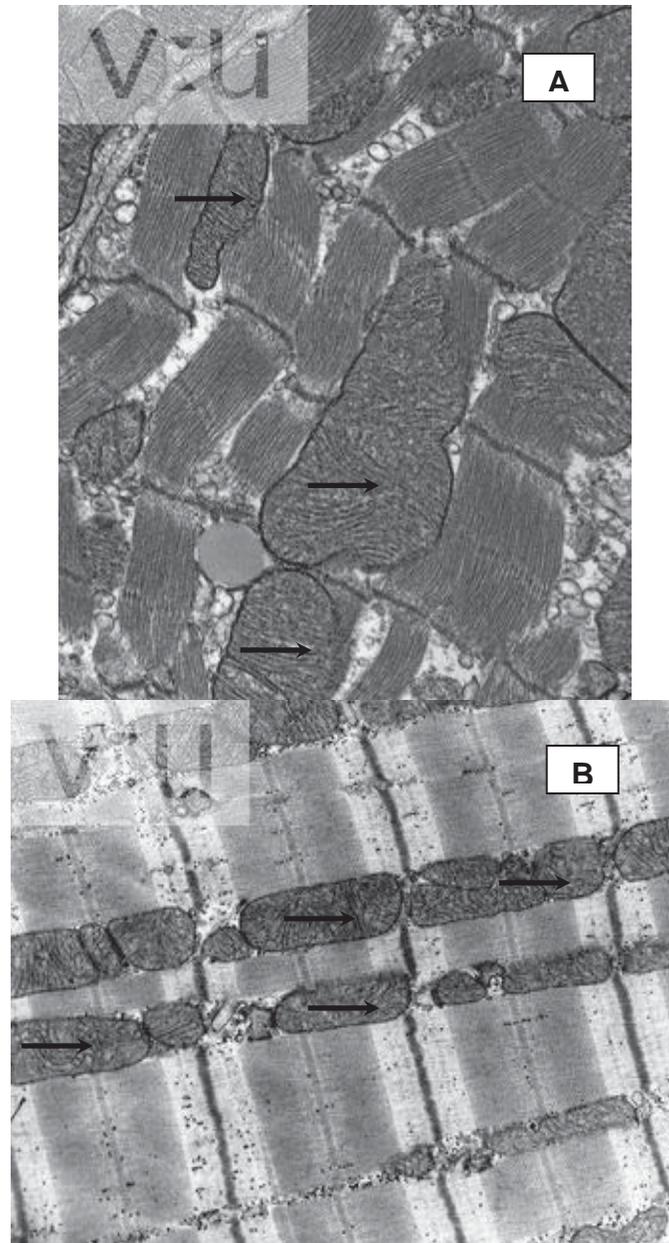


Figura 4. Estructura y localización de mitocondrias cardíacas. **A.** Corte de músculo cardíaco de mamífero. Se muestran los sarcómeros, las miofibrillas y señaladas con una flecha, las mitocondrias asociadas. **B.** Corte longitudinal del músculo cardíaco, mostrando mitocondrias (flechas) y partículas de glucógeno de las miofibrillas. TEMX48,400. Tomado y modificado de: © Dr. Fred Hossler / Visuals Unlimited.

2.4 EL CALCIO

El calcio forma parte de los huesos; más del 95% de este elemento se encuentra en el esqueleto. La pequeña fracción que no está presente en los huesos, cercana a 1% de la cantidad total, se encuentra en los líquidos y en las células donde desempeña importantes funciones. En su forma ionizada, el Ca^{+2} interviene en la regulación de la permeabilidad de las membranas plasmáticas y en la irritabilidad y excitabilidad neuromusculares. El calcio es necesario para la transmisión de los impulsos nerviosos y para la contracción muscular; se opone directamente a la respuesta que se obtiene con los niveles elevados de potasio, pues la amplitud del latido cardíaco aumenta a medida que la concentración de calcio se eleva hasta llegar a un máximo (14).

El calcio de los alimentos se absorbe en el intestino delgado, especialmente en su parte superior. Después de su absorción, este catión pasa al torrente sanguíneo donde se encuentra unido a las proteínas o en forma ionizada; esta última es la forma activa (14).

En condiciones fisiológicas la concentración intracelular de calcio es mil veces menor que la extracelular, por lo que la entrada de un exceso de calcio a la célula origina una situación inestable; este gradiente de concentración se mantiene normalmente por una bomba de calcio localizada en la membrana plasmática y con la ayuda de otros mecanismos de transporte en el retículo sarcoplásmico y la mitocondria.(15).

2.4.1 TRANSPORTE DE CALCIO MITOCONDRIAL

Las mitocondrias pueden acumular calcio de manera masiva a través del establecimiento de un gradiente eléctrico transmembranal, formado por la oxidación de sustratos por la cadena respiratoria o la hidrólisis del ATP por la

ATPasa. La capacidad de acumular calcio en la matriz llega a 1 μmol por miligramo de proteína. (16).

El transporte de calcio a través de la membrana interna es mediado por un uniportador que cataliza la entrada unidireccional del calcio dependiente del potencial eléctrico negativo interno. El uniportador puede transportar otros cationes divalentes con la siguiente selectividad: $\text{Ca} > \text{Sr} > \text{Mn} > \text{Ba}$. La $K_{0.5}$ para el calcio varía según se ha reportado en valores de 1-100 μM y una V_{max} de hasta 700 nmol/mg prot/min . El transporte de calcio es inhibido por magnesio, por el catión trinuclear hexavalente rojo de rutenio en forma no competitiva, con una K_i de 30 nM , y por el derivado dinuclear hexavalente del rutenio, el Ru_{360} , con una K_i de 7 nM . Sin embargo, el uniportador también es regulado por la concentración extramitocondrial de calcio (Fig. 5). (12,16 -18).

Se descubrió recientemente otro transportador de calcio mitocondrial, al que se conoce como “transportador rápido de calcio” (RaM). Este sistema es uniportador y muestra una mayor velocidad de transporte que el uniportador clásico de calcio (Fig. 5) (12,16-18). Gracias a esto, aumentos drásticos en la concentración de calcio citosólico pueden ser fácilmente equilibrados.

La vía de salida opera como antiportador de $\text{Ca}^{+2}/3\text{Na}^{+}$ o $\text{Ca}^{+2}/2\text{H}^{+}$, dependiendo del tejido del cual se originen las mitocondrias; en el corazón opera el primer antiportador (Fig. 5) (16, 19).

El recambio $\text{Ca}^{+2}/3\text{Na}^{+}$ ocurre mediante un transporte electroneutro catalizado por una proteína membranal de 110 kDa que es inhibida por diltiazem, magnesio, verapamil, amilorida y tetrafenil fosfonio. Además, este sistema también puede ser inhibido por cationes divalentes como: Sr^{+2} , Mn^{+2} y Ba^{+2} (12,16 -19). La V_{max} de transporte de este antiportador es de 18 $\text{nmol Ca}^{+2}/\text{prot/min}$ con un valor de K_m de alrededor de 10 mM Na^{+} . La estequiometría del transportador es de 3Na^{+} por 1Ca^{2+} (19).

Por lo tanto, la distribución del calcio entre el espacio citosólico y la matriz mitocondrial es regulada por las propiedades cinéticas de los dos sistemas de transporte.

En condiciones de elevadas concentraciones de calcio mitocondrial, existe otra vía alternativa de salida llamada poro de transición de la permeabilidad mitocondrial (PTPmt) el cual describiremos en un apartado especial (Fig. 5 y 10) (12,16-19).

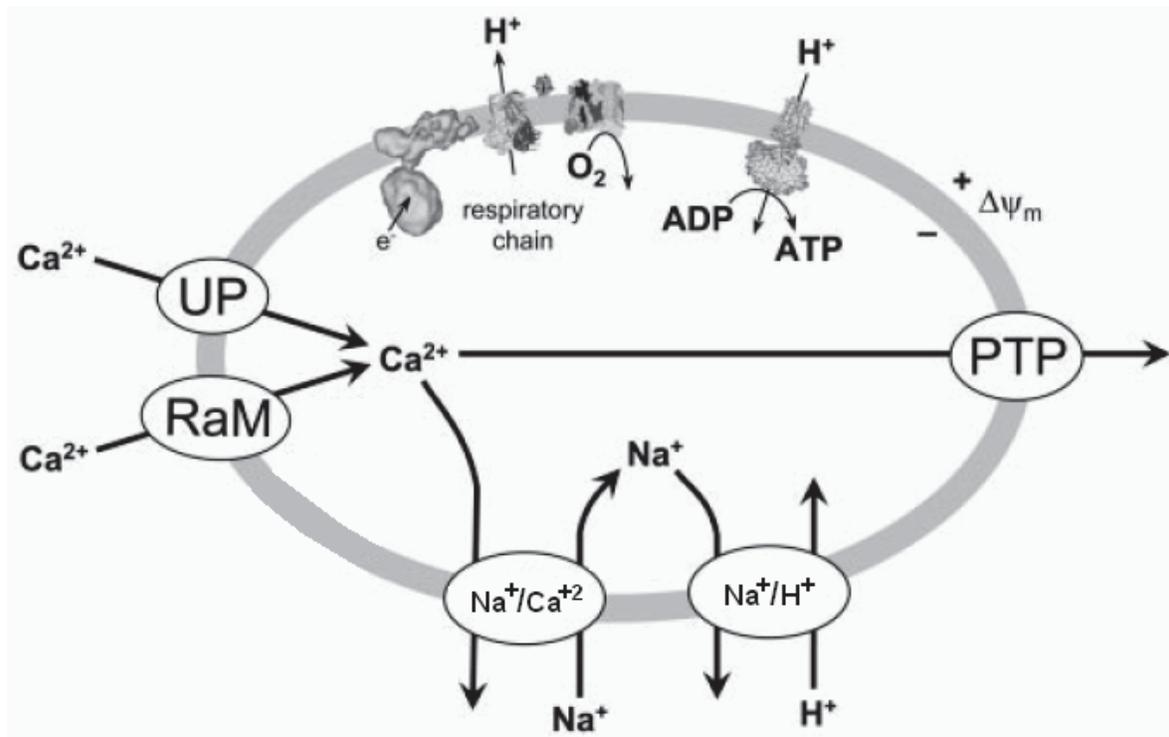


FIGURA 5. Transportadores de calcio mitocondrial. UP: uniportador. RaM: uniportador rápido de calcio. $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$: antiportador sodio-calcio (en mitocondrias de corazón). Na^+/H^+ : antiportador sodio-protones. PTP: poro de transición de la permeabilidad mitocondrial. Tomado y modificado de Brookes et al. 2004 (20).

2.5 RADICALES LIBRES Y ESPECIES REACTIVAS

Se llama radical libre a cualquier sustancia capaz de existir independientemente y que contiene uno o más electrones desapareados. Esta característica les confiere una alta reactividad debido a que buscan con avidez completar su par electrónico. Esto puede lograrse mediante una reacción entre dos radicales, con lo cual ambos dejan de serlo, o bien sustrayendo un electrón de otra molécula, la cual se convierte entonces en un radical. Este último mecanismo puede dar lugar a reacciones en cadena, o sea la propagación del fenómeno inicial (21, 22, 25).

Debido a que los seres humanos somos dependientes de oxígeno para sobrevivir, es de interés del presente trabajo, estudiar los radicales que se generan a partir de este gas. Con la reducción parcial del oxígeno se pueden generar los radicales superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y el hidroxilo (OH^{\cdot}) (22). Sin embargo, en el proceso de detoxificación de estos radicales libres, también se generan otras especies reactivas que aunque no son radicales también pueden oxidar biomoléculas, como es, el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (22, 25) En la fig. 6 se muestran las especies reactivas de oxígeno que pueden estar presentes en la mitocondria.

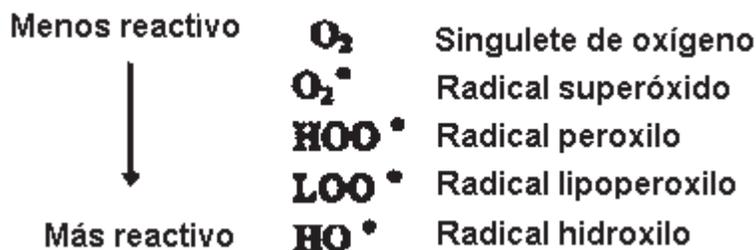


Figura 6. Radicales de oxígeno. Están ordenados con base en su reactividad.

La fuente más importante de radical superóxido *in vivo* en muchas células aeróbicas, es la cadena de transporte de electrones, a través de un deficiente flujo

de los mismos y fuga hacia el oxígeno que sufre una reducción parcial generando los radicales libres. Esta producción se lleva a cabo principalmente en los complejos I y III de la cadena respiratoria (Fig. 3) (7, 21).

También existen radicales libres de nitrógeno, entre ellos se encuentra principalmente el óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$). Los oxidantes derivados de éste son llamados especies reactivas de nitrógeno (ERN). El óxido nítrico puede reaccionar a su vez con el radical superóxido para producir peroxinitrito que es un fuerte oxidante (23). La velocidad de esta reacción es de $4-7 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ (24) y es controlada por la capacidad de difusión de ambos sustratos.

Las especies reactivas tienen como blancos de acción biomoléculas entre las que podemos citar: los lípidos, provocando la lipoperoxidación; proteínas, modificándolas a través de nitrosilación, nitración, oxidación o carboxilación; carbohidratos, oxidándolos y, finalmente, el ADN mitocondrial.

Cuando los radicales libres y las especies reactivas se producen en altas concentraciones que sobrepasan los límites de las defensas antioxidantes, sobreviene el estrés oxidativo y nitrosativo que pueden acarrear la muerte celular (22, 25).

2.6 ÓXIDO NÍTRICO

El óxido nítrico es una molécula de bajo peso molecular (30 Da), en estado gaseoso, lo que la hace altamente difusible. Se considera radical libre debido a que cuenta con un electrón desapareado en su configuración electrónica.

Entre las muchas acciones del óxido nítrico tenemos: vasodilatador, participa en el proceso de inflamación, inhibidor de la agregación plaquetaria, actúa como segundo mensajero en vías de transducción de señales dependientes de

proteínas G, funciona como inhibidor competitivo de la respiración a través de su acción sobre el complejo IV mitocondrial (26), y como neurotransmisor. Las reacciones del NO están estrechamente ligadas a su concentración y su ambiente (24).

El óxido nítrico se sintetiza a través de la oxidación de cinco electrones del nitrógeno guanidino de la L-Arginina; es producido en dos pasos de reacción. Primero se lleva a cabo la oxidación de dos electrones provistos por el NADPH generando el intermediario N^G-hidroxi-L-arginina, enseguida se da una oxidación de tres electrones del nitrógeno hidroxilado para finalmente producir L-citrulina y óxido nítrico; ambos pasos de reacción son dependientes de oxígeno y NADPH (27).

Esta reacción es catalizada por una familia de enzimas llamadas óxido nítrico sintasas (NOS) (Fig.7).

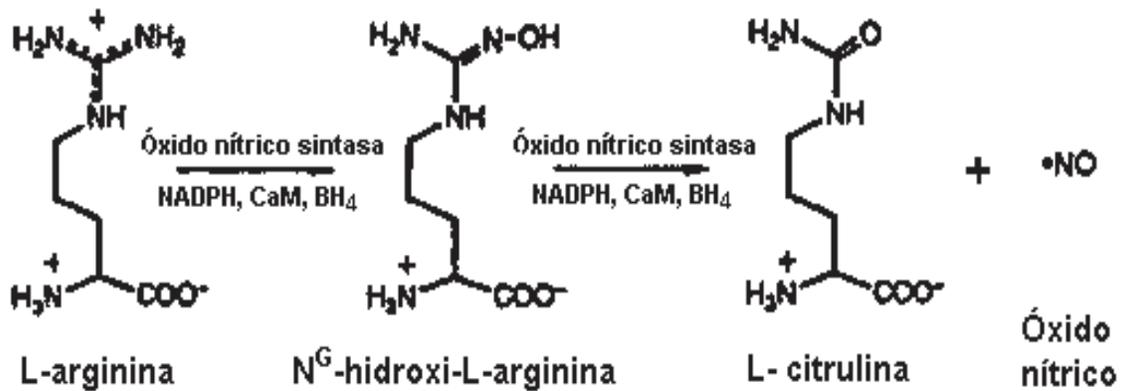


Figura 7. Reacción de producción de óxido nítrico catalizada por la óxido nítrico sintasa. Se mencionan los cofactores necesarios para la catálisis. CaM= calmodulina, BH₄ = Tetrahidrobiopterina. Modificado de Stuhler et al. 2004 (27).

2.6.1 ÓXIDO NÍTRICO SINTASA

La primera óxido nítrico sintasa fue identificada en el tejido neuronal, por lo que se le nombró óxido nítrico sintasa neuronal (NOSn o NOS I). La óxido nítrico sintasa

inducible (NOSi o NOSII) fue descubierta inicialmente en células como neutrófilos y macrófagos así que fue relacionada con procesos inflamatorios y presentaban infiltración celular. Posteriormente, se identificó la óxido nítrico sintasa endotelial (NOSe o NOS III). Estas isoformas fueron originalmente clasificadas por tener expresión constitutiva, ser tejido específico y sensibles a calcio; sin embargo, ahora se sabe que están presentes en diferentes tipos de células y que su expresión además está regulada por condiciones fisiológicas específicas, como es el caso de la NOSi respecto a su independencia de calcio (28).

A la fecha se conocen 4 isoenzimas: la NOSn (neuronal), la NOSe (endotelial), la NOSi (inducible) y una isoenzima más recientemente descrita, la NOSmt (mitocondrial) (29). En la tabla 1 se muestran las características de las diferentes isoformas.

Tabla 1. Características de la isoenzimas de la óxido nítrico sintasa.

ISOFORMA	ACTIVIDAD	CALCIO
Tipo I/NOSn	Constitutiva	Dependiente
Tipo II/NOSi	Inducible	Independiente
Tipo III/NOSe	Constitutiva	Dependiente
Tipo IV/NOSmt	Constitutiva	Dependiente

Tomada y modificada de:

<http://caibco.ucv.ve/caibco/CAIBCO/Vitae/VitaeTrece/Articulos/MedicinaMolecular/ArchivoSHTML/Intro.htm>

En la NOSn y la NOSe, concentraciones fisiológicas de calcio celular regulan la unión a calmodulina, por lo tanto, inician la transferencia de electrones de la

flavina al grupo hemo; en contraste, en la NOSi, la calmodulina permanece fuertemente unida aún a concentraciones bajas de calcio celular actuando esencialmente como una subunidad de la isoforma. Cuando las NOS se activan, funcionan como homodímeros. (28).

Estas enzimas contiene dos dominios: oxidasa y reductasa. El dominio N-terminal oxidasa cuenta con un residuo conservado de Cys que actúa como un ligando axial para el Fe^{+2} del grupo hemo. En el dominio reductasa tiene unido FMN, FAD, Fe^{+2} no hemo y tetrahidrobiopterina, razón por la cual se considera una flavoproteína. También cuenta con un sitio de unión a calmodulina que en algunas isoenzimas coopera junto con otros factores a su regulación (Fig. 8) (30).

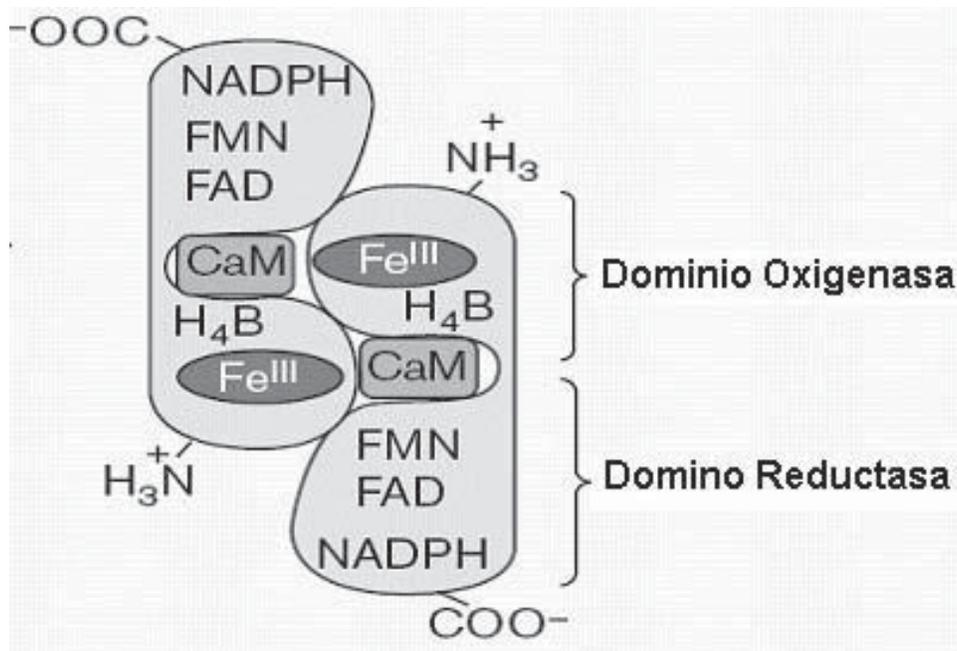


Figura 8. Esquema de la estructura de la óxido nítrico sintasa. Se muestran los dominios y los sitios de unión de los cofactores. En el esquema se muestra la conformación activa, es decir como dímero. Tomado y modificado de Groves y Wang, 2000.

El óxido nítrico puede asimismo regular la expresión y actividad de la NOS. Específicamente ha mostrado tener un importante papel regulador sobre la NOS ϵ , inhibiendo reversiblemente su actividad y por lo tanto, modificando la función de las células endoteliales vasculares. El mecanismo mediante el cual el óxido nítrico ejerce su acción reguladora es mediante S-nitrosilación, la cual es importante debido a que es regulada por las condiciones redox mitocondriales (23). Se sabe que tanto la NOS I como la NOS II sufren nitrosilación formando complejos ferroso nitrosilados en su grupo prostético hemo que pueden actuar inactivando parcialmente las enzimas (28). Otro mecanismo de control de la síntesis de óxido nítrico es mediante la disponibilidad de L-arginina (28, 31).

2.6.1.1 ÓXIDO NÍTRICO SINTASA MITOCONDRIAL

La NOS $_{mt}$ es la variante α de la NOS $_n$, que sufre una modificación post-traducciona consistente en la acilación con ácido mirístico vía un puente éster en el extremo N-terminal y además una fosforilación; estas modificaciones le permiten una migración rápida hacia la mitocondria y su anclaje a la membrana interna (33). Tiene un peso molecular de 147 kDa. Fue descubierta en el año de 1997. Está localizada en la membrana interna asociada con la matriz muy cerca del complejo IV de la cadena respiratoria. Tiene actividad dependiente de la concentración de calcio mitocondrial y su expresión es constitutiva. (32, 33)

Se ha propuesto que el óxido nítrico producido por la NOS $_{mt}$ regula el consumo de oxígeno mitocondrial y el potencial transmembranal vía una inhibición reversible de la citocromo c oxidasa. Por lo tanto, juega un papel crucial en la regulación de todas las funciones mitocondriales (30, 32, 33).

2.7 DEFENSAS ANTIOXIDANTES

Una de las exigencias de la aerobiosis es contar con una batería de defensas contra los radicales libres y especies reactivas; estos mecanismos de protección tienden a impedir su formación o a neutralizarlos una vez formados. Estas defensas presentan cinco niveles:

El primer nivel consiste en evitar la reducción univalente del oxígeno mediante sistemas enzimáticos capaces de efectuar la reducción tetravalente consecutiva sin liberar los intermediarios. Esto se determina por la eficacia de funcionamiento del sistema citocromo oxidasa, que origina más del 90% de la reducción del oxígeno en el organismo humano (7).

El segundo nivel lo constituye la presencia de enzimas antioxidantes especializadas, entre las que tenemos la superóxido dismutasa (SOD) (7). Esta enzima convierte el anión superóxido en peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular. En mamíferos se conocen 3 isoformas de esta enzima codificadas por genes distintos pero que catalizan la misma reacción. Las isoformas son: CuZn-SOD citosólica, Mn-SOD mitocondrial y la CuZn-SOD extracelular (34, 35).

La Mn-SOD mitocondrial constituye la primera línea de defensa contra el radical superóxido debido a que es el principal punto de producción del mismo. Se sabe que esta enzima tiene una mayor expresión en los tejidos vasculares y cardíacos (36).

El tercer nivel de defensa está dado por un grupo de enzimas como la catalasa que se encarga de convertir el peróxido de hidrógeno a oxígeno molecular y agua. Las mitocondrias cardíacas son las únicas reportadas a la fecha que cuentan con una catalasa intramitocondrial (37).

Otra enzima importante a este nivel es la glutatión-peroxidasa que contiene selenio y cataliza la siguiente reacción:



Por otro lado, la glutatión-reductasa convierte al glutatión oxidado (GSSG) en glutatión reducido (GSH) con intervención de NADPH, impidiendo así que se agoten las reservas de GSH (38).

En el cuarto nivel se encuentran los antioxidantes no enzimáticos algunos de los cuales se ingieren en la dieta. Entre estos podemos citar el glutatión, las vitaminas C, E, β -carotenos y algunos flavonoides, sólo por mencionar algunos (39, 40).

Una vez producido el daño molecular por estrés oxidativo, el quinto nivel de defensa lo constituye la reparación del daño oxidativo. La mayor parte de las moléculas del organismo sufren un recambio constante, por lo que son periódicamente reemplazadas. En el caso del material genético, los radicales de oxígeno pueden producir rupturas en la cadena de ADN y aún inducir mutagénesis, pero existen mecanismos enzimáticos adicionales a nivel nuclear que permiten preservar la información genética intacta (7).

2.8 EL RESVERATROL

El descubrimiento del resveratrol se remonta hacia el año 1992, provocado por el surgimiento del fenómeno llamado “La paradoja francesa”; planteado por epidemiólogos franceses en la década de los 80’s, el cual consistía en la presentación de bajos índices de mortalidad por enfermedades cardiovasculares, aún cuando se tenía alta ingesta en colesterol y grasas saturadas en la población francesa; también se detectó que los hábitos de ingesta de bebidas alcohólicas de

este país era diferente en comparación con otros (41). A partir de esto, se comenzó a estudiar qué influencia tenía el tipo de bebidas alcohólicas ingeridas por las poblaciones, sobre el riesgo a sufrir enfermedades cardiovasculares. Se determinó que los países que tenían una ingesta moderada de vino tinto principalmente, presentaban un menor índice de mortalidad por este tipo de enfermedades (42).

En el año 2001, Wollin y Jones publicaron una revisión bibliográfica donde se mostraba que el vino tinto parecía tener mayor actividad biológica disminuyendo el riesgo cardiovascular, que las bebidas de bajo contenido alcohólico y la cerveza (43).

Más tarde, se descubrió que los constituyentes del vino tinto relacionados con la cardioprotección eran los polifenoles, principalmente el resveratrol, cuya molécula activa es el trans-resveratrol (Fig. 9) (44).

El resveratrol (3,4',5 hidroxiestilbeno), es una fitoalexina natural producida por algunas plantas espermatofitas, particularmente abundante en las uvas, en respuesta a condiciones de estrés como: infección por hongos, cambios climáticos, irradiación con luz ultravioleta, etc. Otras fuentes del resveratrol son los cacahuates, las moras y en la raíz de la planta *Polygonum cuspidatum* utilizada en la medicina china y japonesa (76).

Los polifenoles tienen la característica de contener en su estructura varios grupos bencénicos sustituidos por funciones hidroxílicas (45), lo que les confiere una alta capacidad antioxidante. El resveratrol es capaz de neutralizar algunas especies reactivas de oxígeno, como el radical hidroxilo, el superóxido y el radical lipoperoxilo (46).

El resveratrol ha demostrado tener cualidades como antiagregante plaquetario (47), antioxidante de LDL y HDL (48), anti-inflamatorio (49) y es un inhibidor

selectivo de las ciclooxygenasas 1 y 2 (COX1 y COX2) (50). Finalmente, tiene actividad antiproliferativa en ciertas líneas celulares cancerígenas (51).

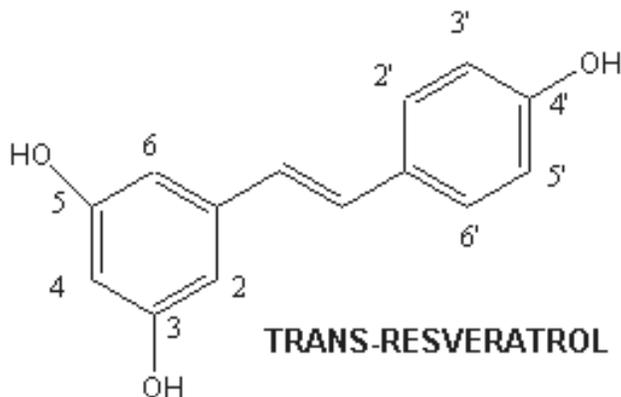


Figura 9. Estructura química del resveratrol. Se observan las sustituciones hidroxiladas en las posiciones 3, 5, y 4'.

2.9 EL PORO DE LA TRANSICIÓN DE LA PERMEABILIDAD MITOCONDRIAL.

El poro de la transición de la permeabilidad mitocondrial (PTPmt) es un complejo multiproteico que es capaz de formar poros no selectivos en la membrana interna de la mitocondria. Existen evidencias de que entre los componentes estructurales del poro están: el translocador de adenín nucleótidos (TAN), ubicado en la membrana interna, la ciclofilina D en la matriz y probablemente el VDAC o canal aniónico dependiente de voltaje, en la membrana externa mitocondrial (Fig. 10). Aunque se ha escrito mucho sobre el papel regulador que podrían tener otras proteínas y sobre los factores que aumentan la probabilidad de que el poro se abra, es de resaltar que los inductores fisiológicos promotores de la apertura más importantes son, el calcio y los radicales libres (52).

La transición de la permeabilidad es un mecanismo latente de transporte mediante el cual la membrana se vuelve permeable inespecíficamente a diversos solutos de hasta aproximadamente 1.5 KDa de masa. Debido a que la transición de la permeabilidad colapsa el potencial transmembranal, el movimiento de solutos ocurre por difusión facilitada impulsada por sus gradientes de concentración. La activación de este sistema requiere de la acumulación masiva de calcio y la adición de un agente inductor (16).

El estrés oxidativo se considera un inductor importante de este fenómeno. El daño mitocondrial causado por lipoperoxidación membranal y acumulación masiva de calcio subyace en el daño celular producido durante la isquemia/reperfusión. Se considera que existe estrés oxidativo, cuando los radicales y las especies reactivas de oxígeno rebasan la capacidad de las defensas antioxidantes (16).

Múltiples evidencias indican que el aumento en la concentración intramitocondrial de calcio, es seguido por una disfunción de la fosforilación oxidativa que puede llevar a la apoptosis o necrosis. Se sabe que durante la transición de la permeabilidad las mitocondrias liberan proteínas del espacio intermembranal, entre las que se incluye el citocromo c cuya liberación se ha relacionado como promotor de apoptosis (16).

La apertura del poro de transición puede ser inhibido por la ciclosporina A (CsA), que bloquea específicamente a la ciclofilina D impidiendo su interacción con la membrana mitocondrial interna, y el translocador de adenín nucleótidos (TAN) (53).

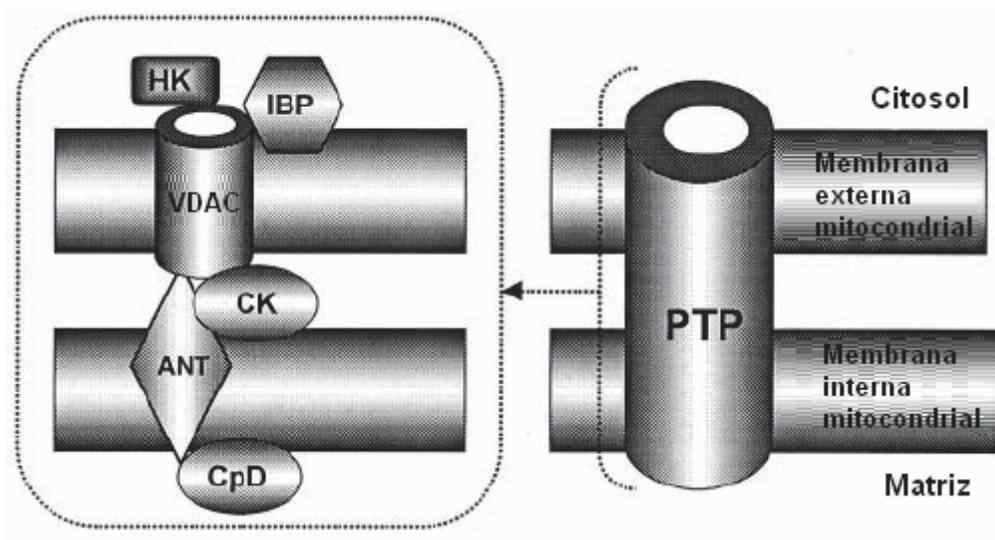


FIGURA 10. Esquema del poro de transición de la permeabilidad mitocondrial (PTPmt). Se muestran las proteínas que lo forman. VDAC: canal aniónico dependiente de voltaje, CpD: ciclofilina D, ANT: translocasa de nucleótidos de adenina, HK: hexocinasa, CK: creatin cinasa, IBP: receptor periférico de benzodiazepinas. Modificado de Szewczyk et al, 2002 (54).

2.10 EL GLUTATIÓN

El glutati3n (GSH) es un trip3ptido compuesto por glutamil-ciste3n-glicina (Fig. 11). Est3 ampliamente distribuido en tejidos animales, plantas y microorganismos. Est3 t3picamente presente en altos niveles (0.1-10 mM) y es el compuesto tiol celular m3s abundante. El glutati3n protege a las c3lulas de los efectos t3xicos de especies reactivas de ox3geno ya que funciona como antioxidante (55).

Cumple m3ltiples funciones en el metabolismo, entre las que est3n: es el sustrato de la enzima glutati3n peroxidasa, est3 involucrado en el metabolismo del 3cido asc3rbico, mantiene comunicaci3n entre c3lulas, etc. Su funci3n principal consiste en prevenir la oxidaci3n de los grupos -SH de las prote3nas. Tambi3n est3 involucrado en el transporte intracelular de cobre al funcionar como un quelante.

Participa asimismo en la degradación de proteínas y promueve la formación intracelular de cisteína (56, 57).

La oxidación de dos tioles de 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 puede reducir puentes disulfuro en una forma no enzimática (57, 58).

El GSH es empleado 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 (55). El glutatión oxidado es regenerado por la enzima 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 (58).

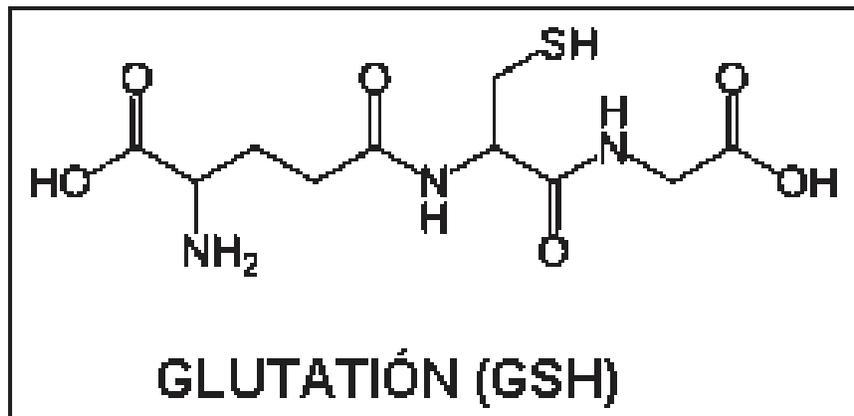


Figura 11. Estructura química del glutatión. Se muestra en su forma reducida que es la que se encuentra en mayores concentraciones en la mitocondria.

3 HIPÓTESIS

El tratamiento con resveratrol disminuye el daño ocasionado por el estrés oxidativo inducido por calcio en mitocondrias de corazón de rata.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto del resveratrol *in vitro* sobre el estrés oxidativo inducido por calcio en mitocondrias de corazón de rata.

4.1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar el efecto del resveratrol sobre los niveles de glutatión.
2. Evaluar la lipoperoxidación mitocondrial.
3. Analizar el efecto del resveratrol en la respiración mitocondrial.
4. Cuantificar la producción de óxido nítrico en presencia de resveratrol.
5. Evaluar la acción del resveratrol sobre la permeabilidad mitocondrial.

5 MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 REACTIVOS

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

5.2 ANIMALES

Se utilizaron ratas Wistar macho de aproximadamente 5 meses de edad y con un peso de 350 a 450 g, debido a que se consideran ratas en etapa adulta que es cuando más índice de patologías cardiovasculares se presenta comparativamente con los humanos.

5.3 AISLAMIENTO DE LAS MITOCONDRIAS

Las mitocondrias se aislaron de acuerdo al protocolo de digestión con proteasa propuesto por Moreno-Sánchez y Hansford (59). Las mitocondrias de corazón se aislaron de ratas macho Wistar, las cuales se sacrificaron por decapitación e inmediatamente se extrajo el corazón, se colocó en un medio (SHE) que contenía 250 mM de sacarosa, 10 mM de HEPES (ácido N-[2-hidroxietil]piperazina N'-[2-etanol-sulfónico]) y 1 mM de EGTA (ácido etilén glicol-bis(beta-aminoetil éter N,N,N',N'- tetraacético) ajustado a pH 7.4 en hielo. El corazón se cortó en pequeños fragmentos y se lavó tres veces con el medio SHE para eliminar la sangre del tejido. Se agregaron 0.4 mg de proteasa por corazón triturado y se incubó 5 min. Después 9 minutos, homogeneizando entre cada término de tiempo. Se detuvo la digestión enzimática centrifugando a 9,000 rpm por 10 min a 4°C en una centrífuga Beckman J2-MC. Se decantó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió para homogeneizar el tejido suavemente. El homogenado se centrifugó a 1,500 rpm por 10 min a 4°C, para remover los restos celulares. Se

filtró el sobrenadante sobre una membrana de nylon desechando la pastilla y enseguida se centrifugó a 8,000 rpm por 10 min a 4°C. Se decantó el sobrenadante y la pastilla mitocondrial se resuspendió en 1ml de medio SHE y se incubó por 10 min en presencia de 30 μ l de ADP (0.1M) y 80 μ l de albúmina de bovino (50 mg/ml, libre de ácidos grasos) por ml de suspensión. Se completó el volumen a 4 ml con medio SHE y se centrífugó a 9,000 rpm por 10 min a 4°C y la pastilla mitocondrial se resuspendió en 1 ml de medio SHE.

5.4 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA MITOCONDRIAL

La concentración de proteína mitocondrial se determinó mediante una modificación del método de biuret (60) usando como estándar la albúmina bovina. Una vez conocida la concentración, se calculó el volumen necesario para obtener una concentración de ensayo tanto de 0.5 mg/ml como de 1 mg/ml de proteína mitocondrial.

5.5 CÁLCULO DE LAS CONCENTRACIONES DE CALCIO

Para preparar la solución de calcio y determinar los volúmenes a utilizar, empleamos el programa WinMax que toma en cuenta la fuerza iónica de la mezcla de reacción, concentración de quelantes en el medio y el calcio contaminante. Calculamos el volumen necesario para obtener una concentración final de calcio libre de 0.5, 1.0 y 5.0 μ M, tomando en cuenta el volumen final, el medio utilizado y los cofactores de cada ensayo.

5.6 MEDICIÓN DE LA RESPIRACIÓN MITOCONDRIAL MEDIANTE OXIMETRÍA

Para evaluar el estado funcional de las mitocondrias se determinó el consumo de oxígeno y el cociente respiratorio (CR) con un electrodo de oxígeno tipo Clark marca YSI, modelo 5,300; este ensayo se llevó a cabo en un medio saturado al 100% de oxígeno y a temperatura ambiente con agitación lenta y continua.

Se utilizó el medio especial para oximetría, que contenía: 120 mM de KCl, 20 mM de Mops y 0.5 mM de EGTA a pH 7.4. Se adicionó a la mezcla de reacción: 1 mM de NaCl, 0.5 mM de NaH_2PO_4 . Se usó succinato 10 μM como sustrato oxidable de la cadena respiratoria y 2 μM de rotenona para inhibir el transporte de electrones del complejo I. Para evaluar la funcionalidad mitocondrial durante la fosforilación oxidativa, es decir, en el estado 3 se agregó 300 μM de ADP para estimularla. El cociente respiratorio (CR) se obtuvo al dividir el consumo de oxígeno del estado 3 entre el consumo del estado 4.

Para inducir diferentes condiciones de estrés por calcio se utilizaron las siguientes concentraciones: calcio 0.5 μM , 1.0 μM y 5.0 μM . Para evaluar el efecto del resveratrol en los distintos ensayos, se empleó una concentración de 100 μM .

5.7 EVALUACIÓN DE LA PERMEABILIDAD MITOCONDRIAL

El hinchamiento mitocondrial se determinó de acuerdo al protocolo descrito por Chappell en el año de 1966. Es una técnica utilizada para observar el transporte de iones a través de la membrana mitocondrial interna y se detecta observando la disminución de la absorbencia en un espectrofotómetro normal (61).

Las suspensiones mitocondriales son turbias y producen la dispersión de la luz. La luz dispersada es en gran parte una función de la diferencia entre los índices de refracción del contenido de la matriz y el medio, y cualquier proceso que disminuya esta diferencia hará que disminuya la luz dispersada (61).

El medio de hinchamiento contenía: 250 mM de sacarosa, 10 mM de MOPS (ácido (3-[N-morfolino]pronanosulfónico)) y 0.05 mM de EGTA. El medio se ajusta a pH de 7.4 a temperatura ambiente. Se agregó calcio a las concentraciones de: 0.5 μ M, 1.0 μ M y 5.0 μ M y resveratrol a 100 μ M. La ciclosporina A (CsA) se llevó una concentración final de 1 μ M.

En los ensayos con resveratrol se incubó 5 min antes de iniciar la medición. Los experimentos combinados donde se usó el resveratrol y el calcio se incubó 5 min con el primero y al agregar el calcio se incubó 5 min para después comenzar a medir. También al emplear la CsA se incubó 5 min antes.

La apertura del poro de la transición de la permeabilidad mitocondrial se indujo con 30 μ M de CaCl_2 , 1 mM de ácido fosfórico y 10 mM de KCl. Se evaluó el hinchamiento o permeabilidad mitocondrial en función de la disminución de la absorbencia a 540 nm en un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 18.

5.8 DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DEL ÓXIDO NÍTRICO MITOCONDRIAL

Para este fin se hizo la medición indirecta de la producción de óxido nítrico a través de la cuantificación de nitritos por el método de Griess de acuerdo al protocolo de Green y col. (62), que consiste en una reacción de diazotización para la determinación espectrofotométrica de la formación de nitritos formados por la oxidación espontánea de óxido nítrico bajo condiciones fisiológicas (Fig. 12). La detección límite para este método está entre 0.1 y 1.0 μ M de nitritos. Se mide el nitrito debido a que es uno de los principales, estables y no volátiles productos del óxido nítrico.

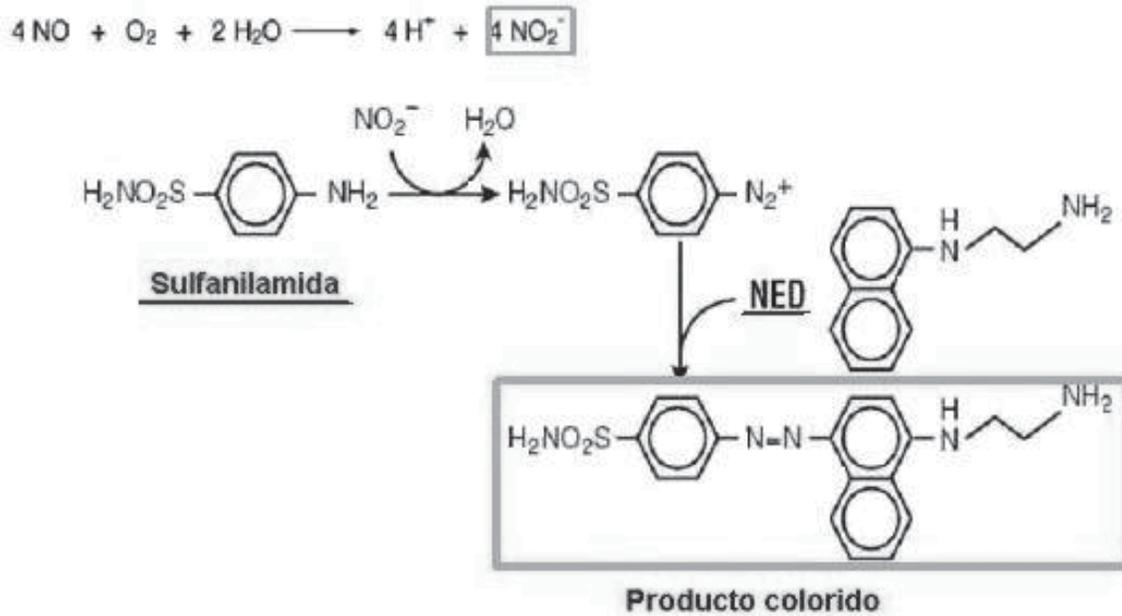


Figura 12. Determinación de nitritos por el método de Griess. Reacción llevada a cabo para hacer la determinación indirecta del óxido nítrico producido en la mitocondria. Green, 1982.

La batería de ensayo se preparó como sigue: se adicionó a tubos de ensayo 0.5 mg de proteína mitocondrial resuspendida en medio de oximetría (KME, descrito anteriormente), enseguida se agregaron los cofactores necesarios (succinato, rotenona y el tratamiento a probar). Se completó con medio hasta un volumen final de 2 ml. A continuación, se incubó a temperatura ambiente 30 min con agitación lenta. Se detuvo la reacción agregando 40 μl de HClO_4 al 0.4% y mezclando con el vortex. Después se centrifugaron los tubos a 7500 rpm durante 5 min para desproteinizar. Se tomaron 1400 μl del sobrenadante y se desechó la pastilla. Se agregaron 100 μl del reactivo de Griess (solución 1:1 de dihidrocloruro de N-1-naftiletildiamina (NED) más sulfanilamida), y se incubó durante 20-30 min a temperatura ambiente protegidos de la luz. Al cabo de este tiempo se leyó la absorbencia a 546 nm.

Para determinar la concentración de óxido nítrico se preparó una curva patrón empleando como estándar una solución 1 mM de NaNO_2 como se indica a continuación (Tabla 2).

Tabla 2. Curva de nitritos por el método de Griess

TUBOS	MEDIO(μl)	Stock NaNO_2 [1mM]		Reactivo de Griess
		Vol. (μl)	[final]	
1 Blanco	1400	-----	-----	100 μl
2	1398.5	1.5	1 μM	100 μl
3	1395.5	4.5	3 μM	100 μl
4	1392.5	7.5	5 μM	100 μl
5	1388	12	8 μM	100 μl
6	1385	15	10 μM	100 μl

Los tratamientos probados fueron: el resveratrol a una concentración de 100 μM , y el calcio a 0.5, 1.0 y 5.0 μM . Se realizaron también ensayos con: el inhibidor L-NMMA (N-monometil-L-arginina) a una concentración de 100 μM , y el donador de óxido nítrico S-nitroso-N-acetilpenicilamina (SNAP) a concentración de 50 μM , como controles negativo y positivo respectivamente.

5.9 MEDICIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE GLUTATIÓN TOTAL

Para determinar los niveles de glutatión se empleó un kit adquirido en SIGMA-Aldrich. Es un método colorimétrico, que corresponde al protocolo descrito por Akerboom en el año de 1981 (77).

Tratamiento preliminar: la muestra biológica es primero desproteinizada con ácido sulfosalicílico al 5% y posteriormente centrifugada para descartar la proteína; así la muestra está lista para la determinación de glutatión total.

La medición de glutatión total se logra a través de un ensayo cinético donde el glutatión (GSH) presente en la muestra, reduce continuamente el ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) a ácido 5-tio-2-nitrobenzoico (TNB) que es un compuesto colorido. La reacción es la siguiente:



La velocidad de reacción es proporcional a la concentración de glutatión. El producto colorido amarillo (ácido 5-tio-2-nitrobenzoico) es medido espectrofotométricamente a 412 nm. Las mediciones se realizaron en un lector de ELISA marca BIO-RAD modelo Benchmark. El kit utiliza una curva estándar de GSH para calcular la concentración de glutatión en la muestra biológica.

Las incubaciones con todos los tratamientos probados se realizaron antes del tratamiento preliminar de la muestra. En los ensayos con resveratrol se incubó 5 min antes de iniciar la medición. Los experimentos donde se usó el resveratrol y el calcio se incubó 5 min con el primero y al agregar el calcio se incubó durante 5 min.

5.10 DETERMINACIÓN DE LA LIPOPEROXIDACIÓN MITOCONDRIAL

Para la determinación de los niveles de oxidación lipídica, se utilizó una modificación del método del ácido tiobarbitúrico (TBA) reportada por Buege y Aust

(63). Este método mide la producción de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS por sus siglas en inglés) entre las que se encuentra el malondialdehído, el principal producto de la lipoperoxidación.

La preincubación con los oxidantes se realizó en un medio de fosfatos 0.15 M con la finalidad de prevenir las interferencias debido a la reacción del TBA con carbohidratos como el manitol o la sacarosa. Después de la preincubación de 15 min, se agregó a cada tubo 2 ml de una solución ácida compuesta por ácido tricloroacético 15%, TBA 0.375% y HCl 0.25 N. Posteriormente, se calentaron los tubos en un baño maría hirviendo y a los 15 min, los tubos fueron enfriados en hielo para después ser centrifugados a 7500 rpm por 5 min. Por último, se extrajo el sobrenadante y se leyó su absorbencia a 535 nm en un espectrofotómetro UV/vis Perkin-Elmer Lambda 18. Los resultados fueron expresados como nanomoles de TBARS/mg de proteína y fueron calculados con base en ϵ (coef. de extinción molar) del malondialdehído de $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (63).

6 RESULTADOS

6.1 EFECTO DEL RESVERATROL SOBRE LOS NIVELES DE GLUTATIÓN TOTAL EN LA MITOCONDRIA

Para determinar el estado redox mitocondrial y evaluar el efecto del resveratrol, se realizó un ensayo de glutatión total. Los resultados obtenidos se observan en la Fig. 13.

Las mitocondrias control tuvieron una concentración de glutatión total de 4.5 nmoles/mg de proteína. La presencia de resveratrol no promovió ningún cambio en los niveles de glutatión total en la mitocondria en condiciones basales. Al adicionar 0.5 μM de calcio se observó una elevación correspondiente al 80%

respecto al control, mientras que la concentración de 1.0 μM de Ca^{2+} promovió el aumento en los niveles de glutatión, sólo en un 47%. En presencia de la concentración de 5.0 μM de Ca^{2+} , los niveles de glutatión total decayeron hasta en un 42% en comparación con el control.

Sin embargo, en los tratamientos combinados de resveratrol y las tres concentraciones de calcio, los niveles de glutatión total se mantuvieron sin cambios respecto a los del control.

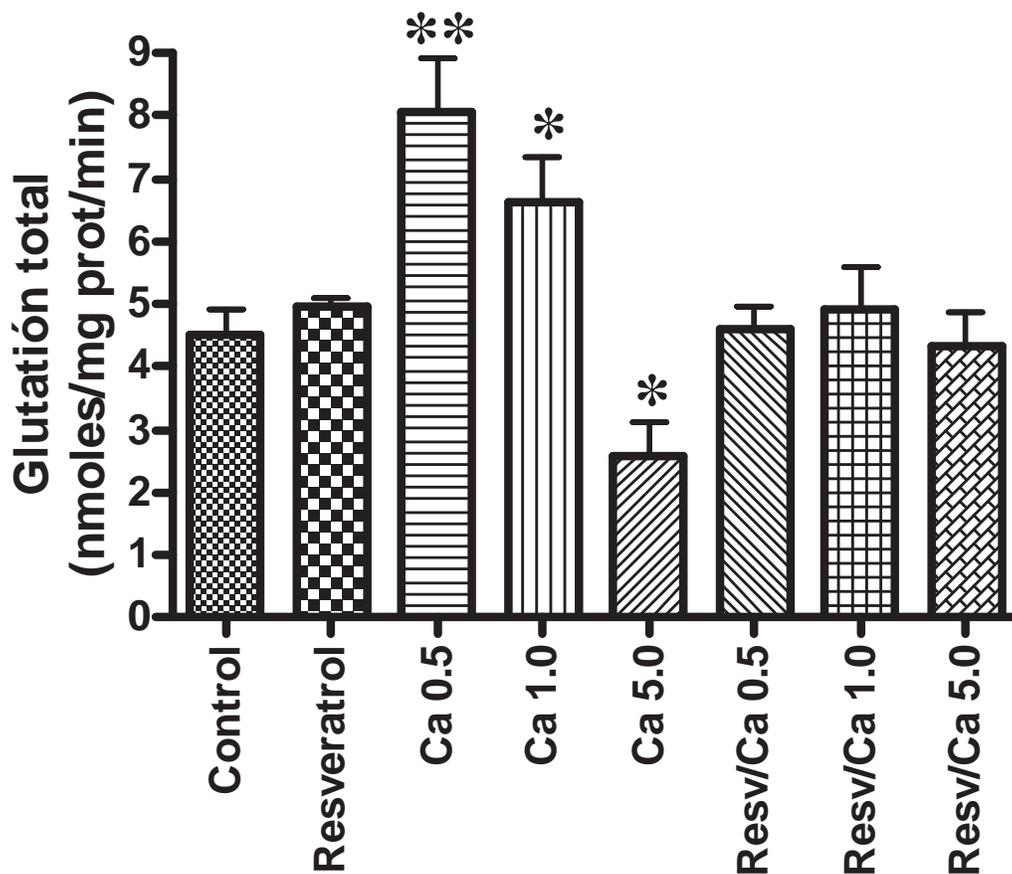


Figura 13. Cuantificación de glutatión total mitocondrial. Se utilizó una concentración de proteína mitocondrial de 1 mg/ml. Los tiempos de incubación con cada tratamiento se describen en materiales y métodos. $[\text{Ca}^{+2}] = \mu\text{M}$. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ vs. Control. $n = 4$.

6.2 EFECTO DEL RESVERATROL EN LA LIPOPEROXIDACIÓN MITOCONDRIAL

Para evaluar el daño que el estrés oxidativo induce sobre los lípidos mitocondriales, se llevó a cabo un ensayo de lipoperoxidación por el método de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS).

Al intentar inducir la lipoperoxidación utilizando calcio en concentraciones 0.5, 1.0 y 5.0 μM , se observó interferencia con la técnica. Se probaron varias modificaciones presentando los mismos problemas en la medición. Por esta razón, se indujo la lipoperoxidación empleando el sistema oxidante hierro/ascorbato a la concentración 0.25/0.5 mM respectivamente.

La adición del resveratrol provocó una disminución del 60% de la lipoperoxidación, respecto al control en ausencia del sistema oxidante. Cuando se agregó el sistema oxidante, se obtuvo el doble de oxidación lipídica que la del control. El tratamiento combinado de resveratrol y el sistema oxidante mostró un 50% de disminución en la lipoperoxidación, respecto del valor obtenido en el tratamiento con el sistema oxidante (Fig. 14).

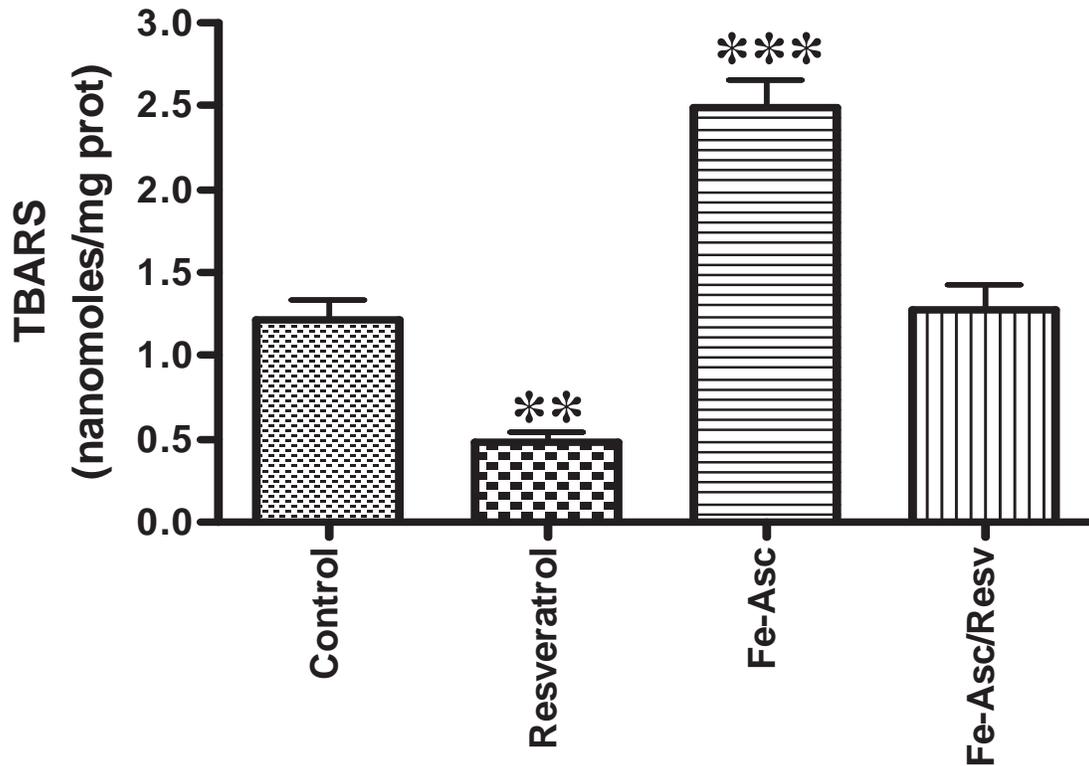


Figura 14. Cuantificación de la lipoperoxidación mitocondrial. Se indujo la lipoperoxidación con el sistema oxidante: 0.25 mM Fe/0.5 mM Ascorbato. La pre-incubación con los tratamientos se hizo en un medio de fosfatos con una concentración de proteína por ensayo de 1 mg/ml, el tiempo de incubación fue de 15 min con agitación suave. **p < 0.01 ***p < 0.001 vs. Control. n = 5.

6.3 EFECTO DEL RESVERATROL EN LA RESPIRACIÓN MITOCONDRIAL

Para determinar el efecto del resveratrol sobre las funciones mitocondriales: respiración y fosforilación oxidativa. Se midió el consumo de oxígeno que se expresa como nano-átomos de oxígeno/min/mg de proteína mitocondrial.

Se evaluaron los efectos de los tratamientos con resveratrol y/o calcio (0.5, 1.0 y 5.0 μ M) en dos estados de respiración mitocondrial. En el estado 4 (estado de respiración basal), se utilizó como sustrato oxidable el succinato acompañado de

la inhibición del complejo I mitocondrial con rotenona a una concentración de 2 μM . El estado 3 se promovió energizando a la mitocondria con 300 μM de ADP.

Durante el estado 4 de la respiración (Fig. 15), el control tuvo un consumo de oxígeno de 95.8 nano-átomos de $\text{O}_2/\text{min}/\text{mg}$ de proteína mitocondrial. El resveratrol *per se* aumentó el consumo de oxígeno 29%, respecto al control. La adición de calcio 0.5 μM aumentó el consumo 49%, sin embargo, a las concentraciones de 1.0 y 5.0 μM , provocaron el abatimiento en el consumo de oxígeno aproximadamente en un 24%, respecto al control.

Al incubar con resveratrol 5 min y después adicionar cada una de las concentraciones de calcio, observamos un efecto mayor en el consumo de oxígeno. Con calcio 0.5 μM fue de 93% más, con 1.0 μM el consumo fue de más de tres veces, respecto del control. Y finalmente, en presencia de 5.0 μM de Ca^{2+} , el aumento en el consumo fue del doble, respecto al control.

En el estado 3 de la respiración el consumo de oxígeno es mayor debido a la energización de las mitocondrias con ADP. El control consumió 185.3 nano-átomos de $\text{O}_2/\text{min}/\text{mg}$ de proteína mitocondrial. Se observó que el resveratrol promovió un aumento de 30% en el consumo de oxígeno. La concentración de 0.5 μM no alteró el consumo. Con las concentraciones 1.0 y 5.0 μM de calcio se observó nuevamente una disminución en el consumo de aproximadamente 40%. El consumo de oxígeno en el tratamiento combinado de resveratrol y Ca^{2+} 0.5 μM fue equiparable al del control. Sin embargo, el tratamiento con resveratrol y Ca^{2+} 1.0 μM demostró nuevamente ser el de mayor consumo de oxígeno, al ser de 64% con respecto del control. La concentración de Ca^{2+} 5.0 μM y resveratrol promovió un aumento del 33% (Fig. 16).

En cuanto al consumo de oxígeno en el estado 3 mitocondrial, se observó la misma tendencia en cuanto a los tratamientos. El resveratrol tanto solo, como con la adición de Ca^{2+} 1.0 y 5.0 μM provocó un elevado consumo de oxígeno, respecto

del control. Con el tratamiento de Ca^{2+} en concentraciones 1.0 y 5.0 μM , sin resveratrol, se abatió la respiración mitocondrial.

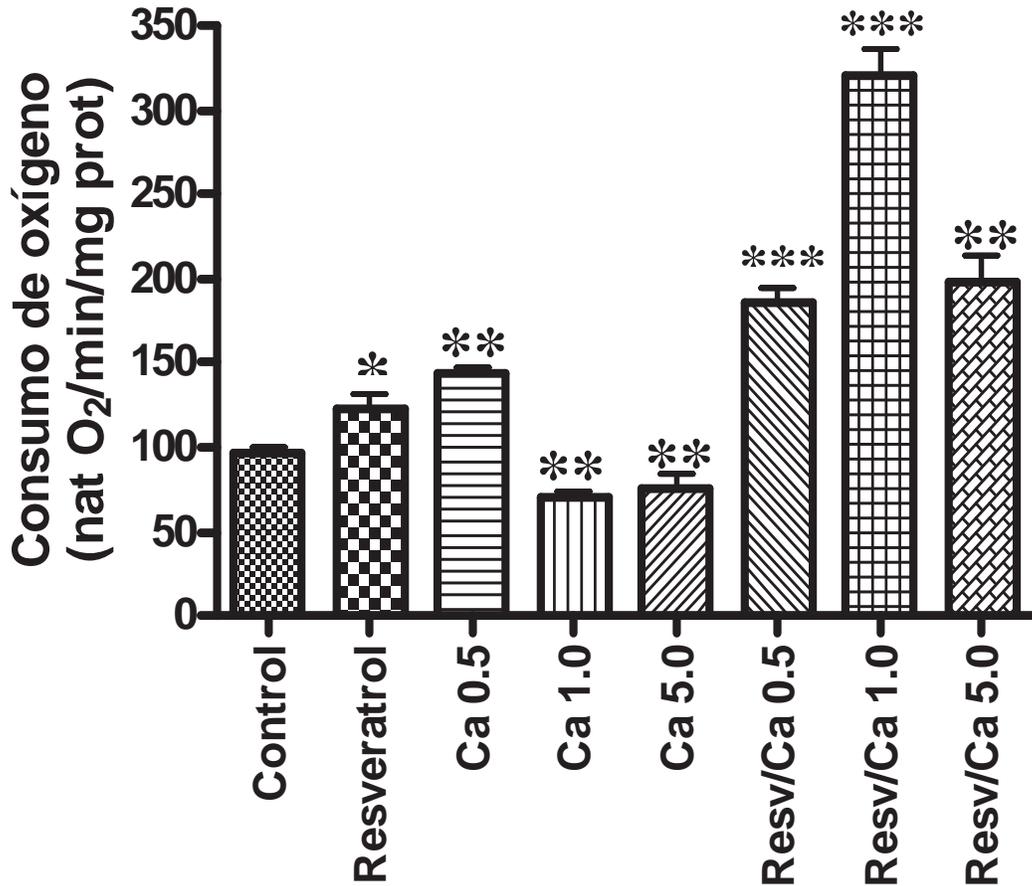


Figura 15. Consumo de oxígeno durante el Estado 4 de la respiración mitocondrial. Se empleó una cámara saturada al 100% de oxígeno. Se incubó en el medio KME especial para mitocondrias de corazón (descrito en materiales y métodos). Se utilizó una concentración de 1 mg/ml de proteína mitocondrial. Se adicionó 10 μM de succinato, 2 μM de rotenona sin la adición de ADP. $[\text{Ca}^{2+}] = \mu\text{M}$. $[\text{Resveratrol}] = 100 \mu\text{M}$. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$ vs. Control. $n = 4$.

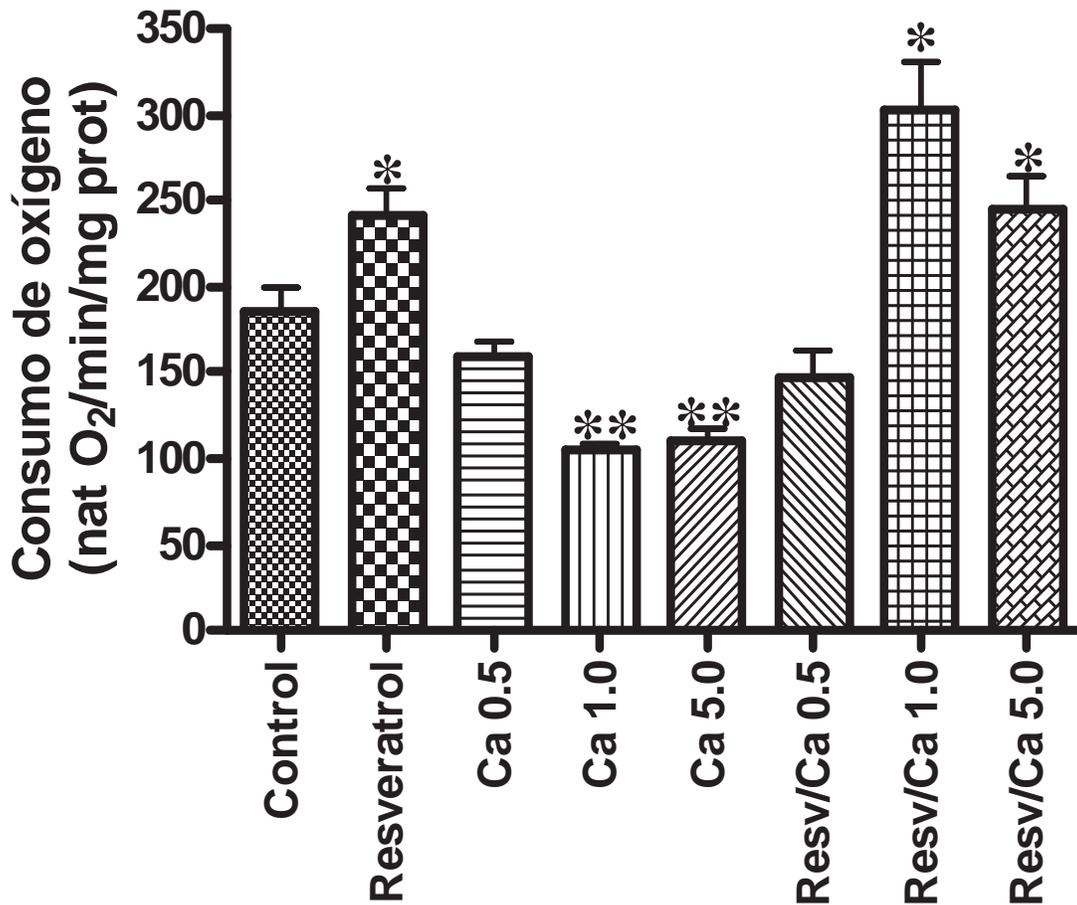


Figura 16. Consumo de oxígeno durante el Estado 3 de la respiración mitocondrial. Se empleó una cámara saturada al 100% de oxígeno. Se incubó en el medio KME especial para mitocondrias de corazón (descrito en materiales y métodos). Se utilizó una concentración de 1 mg/ml de proteína mitocondrial. Se adicionó 10 μM de succinato y 2 μM de rotenona; 2-4 min. después las mitocondrias fueron energizadas con 300 μM de ADP. $[\text{Ca}^{+2}] = \mu\text{M}$. $[\text{Resveratrol}] = 100 \mu\text{M}$. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ vs. Control. $[\text{Ca}^{+2}] = \mu\text{M}$. $n = 4$.

Para evaluar la síntesis de ATP en la mitocondria, se hizo el cálculo del cociente respiratorio, el cual se obtiene dividiendo el consumo de oxígeno en el estado 3 entre el consumo del estado 4. Debido a que el sustrato oxidable es succinato, el cociente promedio debe ser aproximado a 2. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Cociente respiratorio mitocondrial. Se obtuvo dividiendo el consumo de oxígeno en el estado 3 entre el consumo del estado 4.

TRATAMIENTO	COCIENTE
Control	1.93
Resveratrol 100 μ M	1.96
Ca 0.5 μ M	1.12
Ca 1.0 μ M	1.52
Ca 5.0 μ M	1.48
Resv/Ca 0.5 μ M	0.80
Resv/Ca 1.0 μ M	0.95
Resv/Ca 5.0 μ M	1.24

6.4 EFECTO DEL RESVERATROL SOBRE LA PRODUCCIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO

Se estudió el efecto del resveratrol en la producción de óxido nítrico, debido a su importancia tanto a nivel mitocondrial, como en el órgano estudiado. La medición del óxido nítrico mitocondrial se realizó de manera indirecta, a través del método de Griess con el protocolo descrito por Green y col. (62).

En la Fig. 17 se observa que en el control se obtuvo una concentración de 0.653 μ moles/mg de proteína. El resveratrol aumentó la producción de óxido nítrico en un 91%. La concentración de Ca^{2+} 0.5 μ M no provocó ningún cambio en la producción, respecto del control. En presencia de 1.0 μ M de Ca^{2+} , se observó un incremento de 88% en la síntesis de óxido nítrico. Con 5.0 μ M de Ca^{2+} , el aumento en la síntesis de NO fue de más del doble, respecto del control. Este resultado se esperaba, debido a que la actividad de la NOSmt es dependiente de calcio.

Con los tres tratamientos combinados de resveratrol y calcio, se observó un efecto aditivo en cuanto a la producción de óxido nítrico. Con base en esto tenemos que el tratamiento de resveratrol con 0.5 μM de calcio promovió un incremento del 80%, con Ca^{2+} 1.0 μM , se obtuvo el doble, respecto al control y finalmente con Ca^{2+} 5.0 μM , el incremento fue del triple en la producción de NO, con respecto al control.

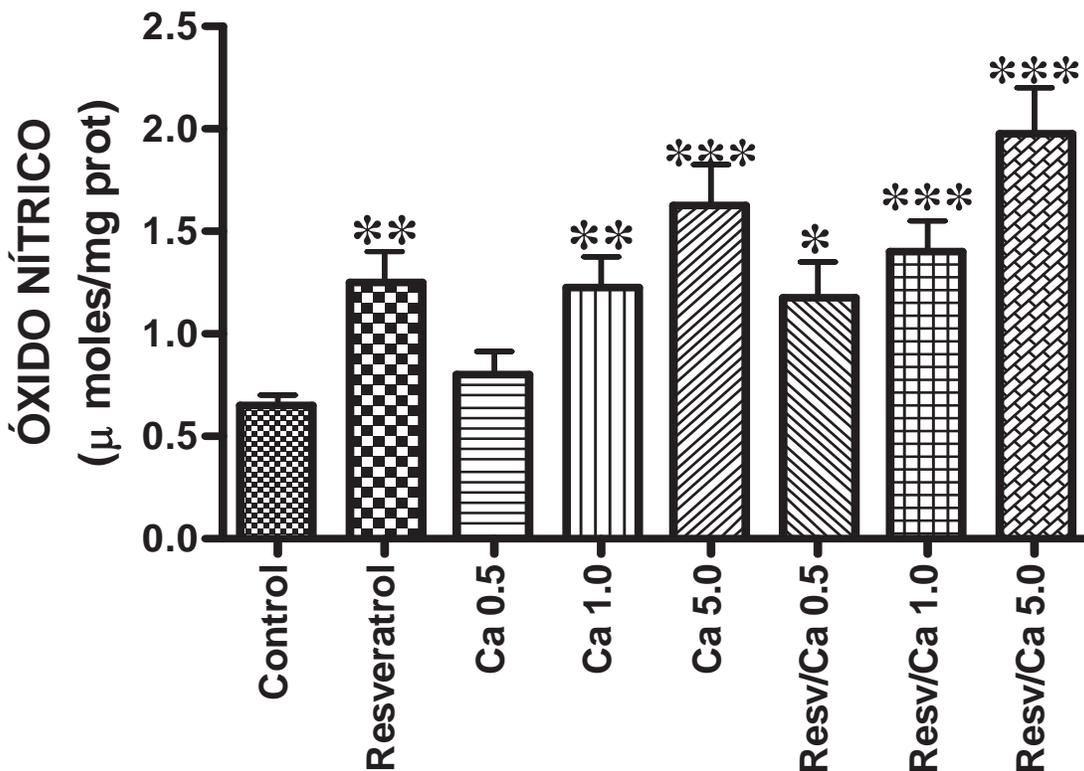


Figura 17. Evaluación de la producción de óxido nítrico mitocondrial. La concentración de óxido nítrico se obtuvo con la extrapolación de absorbencia con base en la curva de nitritos descrita en materiales y métodos. La incubación con los tratamientos fue de 10 min. empleando una concentración de 1mg/ml de proteína mitocondrial. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$ vs Control. Resveratrol [100 μM]; [Ca^{2+}] = μM . $n = 6$.

Para determinar si este aumento en las concentraciones de óxido nítrico es de origen enzimático producto de la NOSmt, se agregó un inhibidor específico de la enzima, el N-monometil-L-arginina (L-NMMA), empleando como control positivo el donador de óxido nítrico SNAP (S-nitroso-N-acetilpenicilamina). Los resultados se muestran en la Figura 18.

En el control se obtuvo una concentración de óxido nítrico de tan sólo 0.391 μ moles/mg de proteína mitocondrial que corresponde a un 45% de inhibición de la síntesis de NO; este resultado sugiere que el 55% restante se debe a la producción de nitritos de origen no enzimático.

En el tratamiento de resveratrol más el inhibidor, la concentración de NO fue de 0.62 μ moles/mg proteína, por lo tanto disminuyó 50%, con respecto a lo obtenido en el tratamiento con resveratrol sin inhibidor (1.25 μ moles/mg prot); lo que sugiere que la disminución del óxido nítrico fue producto de la actividad de la NOSmt. El resultado de inhibición con los demás tratamientos (Resv/Ca 0.5, Resv/Ca 1.0 y Resv/Ca 5.0 μ M) correspondió a un 50% aproximadamente, respecto de la producción con resveratrol solo. La adición del donador promovió un incremento en la concentración de óxido nítrico de tres veces en comparación con el control.

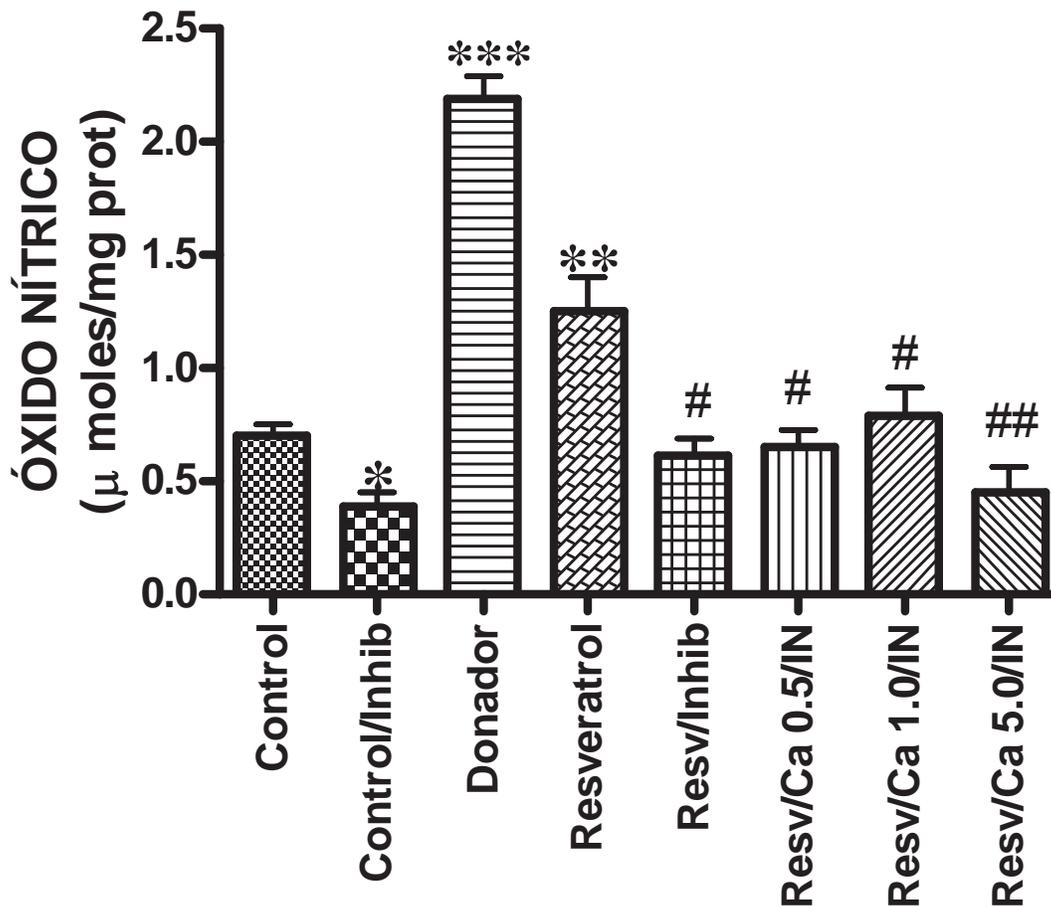


Figura 18. Producción de óxido nítrico mitocondrial en presencia del inhibidor L-NMMA. La concentración de óxido nítrico se obtuvo con la extrapolación de absorbancia con base en la curva de nitritos descrita en materiales y métodos. La incubación con los tratamientos fue de 10 min. empleando una concentración de 1mg/ml de proteína mitocondrial. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ vs. Control. y # $p < 0.05$ ## $p < 0.01$ vs. Resveratrol [100 µM]; Inhibidor [100 µM]; Donador = SNAP, [50 µM]; [Ca⁺²] = µM. n = 6.

6.5 EFECTO DEL RESVERATROL SOBRE LA TRANSICIÓN DE LA PERMEABILIDAD MITOCONDRIAL

Para determinar si en el desacoplamiento de la respiración mitocondrial, provocado por la presencia del resveratrol, está involucrado el poro de transición

de la permeabilidad mitocondrial (PTPmt), se llevó a cabo un ensayo de hinchamiento mitocondrial. En esta técnica, una disminución en la absorbencia indica hinchamiento mitocondrial provocado por la apertura de dicho poro.

En las figuras 19 y 20 se muestran los resultados obtenidos del ensayo de hinchamiento. Al control negativo sólo se agregó el medio de hinchamiento y las mitocondrias en una concentración final de 1 mg/ml prot. En el control positivo se indujo la apertura del poro adicionando una concentración de 30 μM de Ca^{2+} , observándose una marcada disminución de la absorbencia que indica hinchamiento mitocondrial. La ciclosporina A (CsA) es un inhibidor específico del PTPmt y notamos que no produce ninguna disminución en la absorbencia (Fig. 19).

La adición del resveratrol tampoco promovió la apertura del poro. El dimetil sulfóxido (DMSO) fue el vehículo en el cual se disolvió el resveratrol y se observó que no causó disminución en la absorbencia, por lo tanto, no provocó interferencia alguna en las mediciones (Fig. 19).

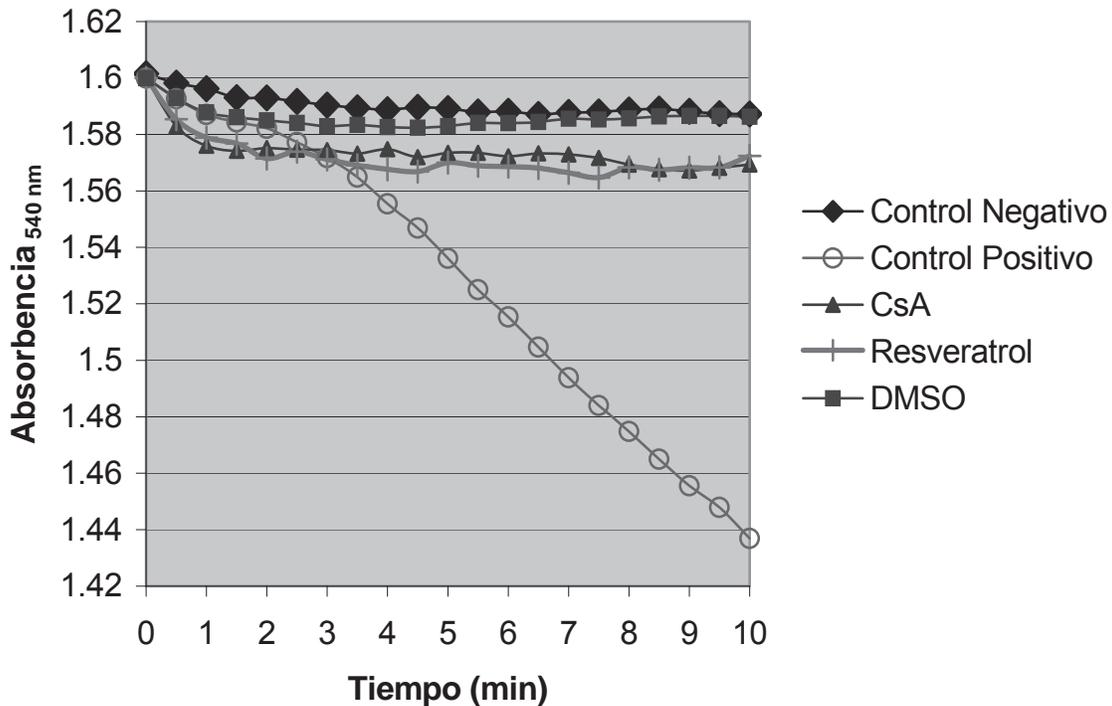


Figura 19. Curvas control del ensayo hinchamiento mitocondrial. Se utilizó un medio de hinchamiento específico para mitocondrias de corazón (descrito en materiales y métodos). En el control negativo sólo se adicionó el medio de hinchamiento, 10 μM de succinato y 1 mg/ml de proteína mitocondrial. En el control positivo se indujo el hinchamiento con 30 μM de calcio. Las demás curvas llevan todo lo anterior y el tratamiento ensayado. Todos los ensayos se realizaron en ausencia de ADP. Los tiempos de incubación de cada tratamiento se mencionan en el texto. [CsA] = 1 μM . [Resveratrol] = 100 μM . Cada curva representan el trazo significativo de al menos $n = 10$.

Con las concentraciones de 0.5, 1.0 y 5.0 μM de Ca^{+2} , se observó una disminución en la absorbancia, sin embargo, es menor a la obtenida del control positivo. Al someter las mitocondrias a una preincubación de 5 min con resveratrol y la posterior adición del calcio, se observó durante los primeros 4 min del ensayo un trazo similar al de la curva del control negativo, sin embargo, después de tal tiempo, disminuyó la absorbancia con una tendencia parecida a la presentada por las curvas en ausencia del resveratrol.

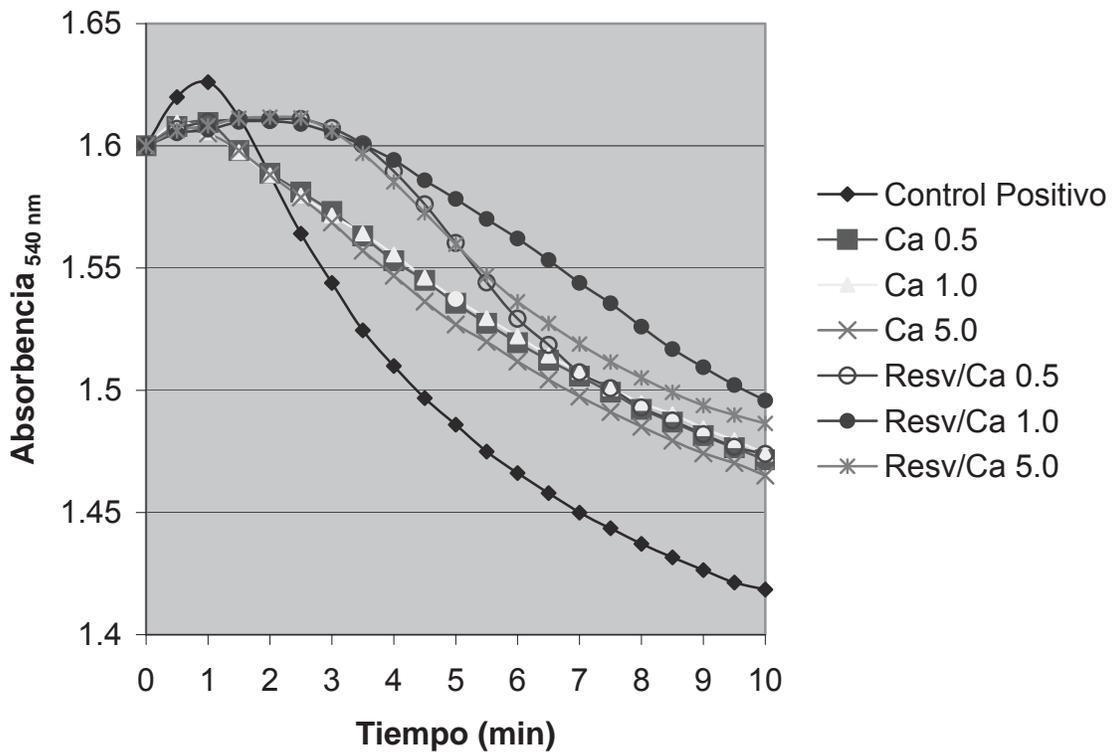


Figura 20. Efecto del calcio y el resveratrol sobre el hinchamiento mitocondrial. Las mitocondrias del control positivo fueron inducidas con calcio 30 μM . Se utilizó un medio de hinchamiento específico para mitocondrias de corazón (descrito en materiales y métodos), además se adicionó 10 μM de succinato y 1mg/ml de proteína mitocondrial. Los tiempos de incubación de cada tratamiento se mencionan en el texto. Todos los ensayos se realizaron en ausencia de ADP. $[\text{Ca}^{+2}] = \mu\text{M}$. $[\text{Resveratrol}] = 100 \mu\text{M}$. Cada curva representa el trazo significativo de al menos $n = 10$.

7 DISCUSIÓN

El glutatión es un indicador del estado redox de la mitocondria. Cuando este estado se mantiene en forma oxidada, el glutatión responde de varias maneras para estabilizarlo. El glutatión por sí solo funciona como un captador de radicales libres, sin embargo, también la enzima glutatión peroxidasa lo utiliza como sustrato para transformar el peróxido de hidrógeno a agua y oxígeno molecular dejando el glutatión en forma oxidada que es posteriormente regenerado por la enzima

glutación reductasa (38). De esta manera, se evita que el estrés oxidativo cause daños irreversibles en la mitocondria o en la célula debido a que el peróxido de hidrógeno es capaz de difundir libremente a través de las membranas.

Los aumentos drásticos en las concentraciones de calcio inducen estrés oxidativo y por lo tanto, los niveles de glutación aparecen disminuidos por esta condición. Cuando se sometieron las mitocondrias a un estrés oxidativo producido por concentraciones altas de calcio (1.0 y 5.0 μM) (Fig. 13), se observó que la capacidad antioxidante del sistema glutación alcanzó su límite máximo y después descendió. Estos resultados concuerdan con lo mencionado por Mansfield y col. donde reportan que cuando el estrés oxidativo es muy alto, el glutación (GSH) se daña disminuyendo su concentración y por lo tanto su disponibilidad para la glutación peroxidasa (64).

El hecho de que el resveratrol mantiene los niveles fisiológicos de glutación, aún en condiciones de estrés por calcio (Fig. 13), habla de su capacidad como antioxidante, ya que puede estar actuando río arriba en la cascada de neutralización de radicales libres, actuando sobre el radical hidroxilo (78), o el superóxido (46).

El resveratrol disminuyó eficientemente los niveles de lipoperoxidación (Fig. 14) probablemente gracias a que en su estructura contiene dobles enlaces y grupos oxhidrilo que son capaces de neutralizar radicales libres tales como el anión superóxido (46), el hidroxilo (78) y radicales lipídicos a través de la donación de electrones, convirtiéndose finalmente el resveratrol es un radical estabilizado por resonancia (79). En otros sistemas lipídicos tales como tejido cerebral murino (80), y las lipoproteínas LDL y HDL (48) se había probado el resveratrol obteniendo resultados que coinciden con los obtenidos en este trabajo respecto a la disminución de la lipoperoxidación. Debido a que el corazón es un órgano esencialmente aeróbico y que toma la mayor parte de su energía de los lípidos, es muy importante que el resveratrol pueda protegerlos de la oxidación.

El resveratrol *per se* aumentó el consumo de oxígeno en el estado 4 de la respiración mitocondrial lo que sugiere la existencia de desacoplamiento mitocondrial (Fig. 15). Este desacoplamiento puede deberse a la caída del potencial de membrana provocado por varias causas entre las que tenemos: disminución o abatimiento del transporte de electrones en la cadena respiratoria; o por la apertura del poro de transición de la permeabilidad mitocondrial. Al disminuir el potencial, la velocidad tanto en el transporte de electrones, como en el bombeo de protones se incrementa para recuperar el potencial, aumentando por tanto, el consumo de oxígeno.

La estructura del resveratrol sugiere cierto parecido con el desacoplante FCCP (fenilhidrazona de trifluorometoxicarbonil cianuro) (Fig. 21) que es un protonóforo, es decir, una sustancia que iguala el número de protones a ambos lados de la membrana mitocondrial interna, abatiendo el potencial.

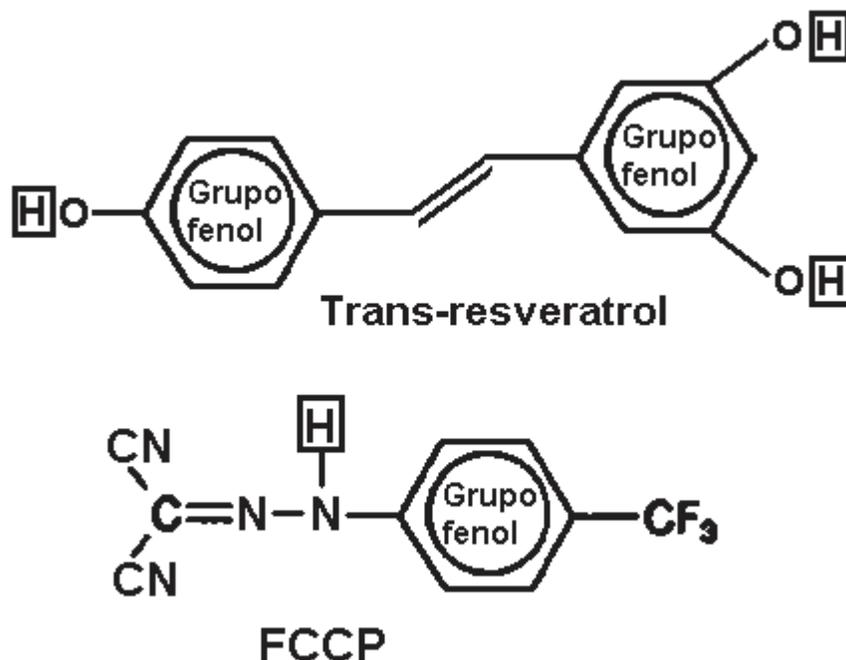


Figura 21. Comparación estructural del trans-resveratrol con el desacoplante FCCP (fenilhidrazona de trifluorometoxicarbonil cianuro). Los grupos fenoles (lipofílicos) quedan atrapados en la membrana interna mitocondrial (MIM). Los grupos ionizables (en los rectángulos) son los encargados de igualar las cargas en ambos lados de la MIM. Estructura de FCCP tomada de (81).

El resveratrol, por ser altamente lipofílico, es posible que atraviese sin dificultad la membrana externa mitocondrial; sin embargo, en la membrana interna más selectiva a la permeabilidad, puede quedar atrapado en la misma, actuando con un mecanismo típico de los protonóforos (65). Esta situación es benéfica si tomamos en cuenta que en la mitocondria se expresan fisiológicamente proteínas desacoplantes que están involucradas en procesos de preconditionamiento como por ejemplo la isquemia (66), la inanición o en el ejercicio intenso (67). Las proteínas desacoplantes obligan a la mitocondria a realizar un desplazamiento de las reservas energéticas de la célula, aumentando la β -oxidación para la obtención de energía a partir de los lípidos. Se ha planteado el uso de esta estrategia como terapia en diabetes, obesidad y síndrome metabólico (68, 69).

El cálculo del cociente respiratorio es una aproximación matemática sencilla que nos da una idea general sobre la eficiencia de síntesis de ATP mitocondrial. Los resultados se muestran en la Tabla 3. El resveratrol por sí solo aumenta el consumo de oxígeno pero no provoca variación en cuanto al cociente. En las mitocondrias tratadas a concentraciones 0.5, 1.0 y 5.0 μM de calcio, existió una disminución en el cociente respiratorio, lo que indica que hay un ligero desequilibrio en la cadena de transporte de electrones y el bombeo de protones. Al utilizar los tratamientos combinados de Resv/Calcio 0.5 y 1.0 μM , el cociente respiratorio se reduce un 50% lo que confirma el desacoplamiento provocado por la presencia del resveratrol en combinación con el calcio. Sin embargo al determinar el cociente respiratorio del tratamiento Resv/Ca 5.0 μM , obtenemos un valor irregular debido a que hay un aumento en el consumo de oxígeno en el estado 4 (desacoplamiento) que no es corregido por la energización de la mitocondria con ADP, por lo que también se detecta alto consumo en el estado 3 de respiración. Debido a que regularmente el consumo de oxígeno en el estado 3 es mucho mayor que en el 4 (10), se hace necesaria una determinación más

exacta desde el punto de vista experimental para poder tener un valor certero del cociente respiratorio y la síntesis de ATP.

En los experimentos de hinchamiento mitocondrial (Fig. 19 y 20), se observó que el resveratrol *per se* no promovió la apertura del PTPmt. El calcio en las tres concentraciones utilizadas promueve hinchamiento mitocondrial sin ser equivalente a la respuesta provocada por el tratamiento de Ca^{2+} a $30 \mu\text{M}$ (83). Esto sugiere que el calcio a esta última concentración, provocó una apertura drástica e irreversible del PTPmt. El hinchamiento provocado por las concentraciones empleadas en nuestro estudio sugiere un aumento en la permeabilidad a través de la apertura del poro, pero en su estado de apertura transitoria o de baja energía, este estado se ha relacionado con preconditionamiento cardíaco (70).

Cuando se ensayaron los tratamientos combinados de resveratrol y las tres concentraciones de calcio probadas, se observó que los primeros 4 min de medición se mantiene la condición lineal del trazo, típica del control, es decir, sin hinchamiento. Se observó una resistencia al hinchamiento mitocondrial promovida por el resveratrol. Este tiempo de protección contra el hinchamiento o más específicamente contra la apertura del PTPmt, es muy importante, debido a que sugiere de un tiempo crítico y suficiente para que se restablezcan las condiciones fisiológicas del tejido y además, exista la recuperación total de la célula al desequilibrio en las concentraciones de calcio citosólico. Adicionalmente a esto, Javadov y col. mencionan que someter corazones a regulares y breves periodos (3-5 min) de isquemia brindan preconditionamiento y promueven una mejor recuperación del tejido aún después de la reperfusión (82). Esto trae como consecuencia una menor mortalidad de los cardiomiocitos evitando la disfunción del órgano.

La producción de óxido nítrico es importante en el corazón porque se encarga de regular la vasodilatación, esto nos habla de mayor aporte de sangre y por lo tanto

de oxígeno y nutrientes a todas las células del organismo. Además, el óxido nítrico funciona como segundo mensajero en cascadas de señalización inducidas en condiciones de estrés celular.

Al adicionar el calcio a las concentraciones 0.5, 1.0 y 5.0 μM , se observó que la producción de óxido nítrico fue mayor respecto del control (Fig. 17), estos resultados concuerdan con lo descrito por Dedkova y col. (71) en referencia a la dependencia de la NOSmt con las concentraciones de calcio, además de que estas concentraciones de calcio están dentro de los parámetros considerados por los autores citados, respecto a la estimulación límite del calcio sobre la NOSmt.

El resveratrol puede influir en la expresión y actividad de la NOSe (72, 73), así como también de la NOSi (74), por lo tanto, se sugiere que el resveratrol también pudiera aumentar la actividad de la NOSmt. Sin embargo, el mecanismo estructural o funcional que involucra la estimulación de las NOS por resveratrol es aún desconocido; por lo que se requiere llevar a cabo otros experimentos más específicos como el Western Blot para evaluar la expresión de la NOSmt; además de ensayos de su actividad.

En modelos con corazones completos se ha observado que la alta producción de óxido nítrico tiene efectos benéficos en la recuperación de infarto o en episodios de isquemia-reperfusión como lo menciona Hattori y col. en un artículo del año 2002 (84). Además, los altos niveles de óxido nítrico tienen otras implicaciones, debido a que al reaccionar con el radical superóxido se produce peroxinitrito, que tiene múltiples funciones a nivel celular, entre las que se encuentra la nitrosilación de proteínas. Debido a la alta velocidad de reacción para la producción de peroxinitrito, se le ha relacionado con un mecanismo avanzado de regulación de actividad de algunas enzimas o como un segundo mensajero en algunas vías en las que intervengan proteínas que son reguladas por medio de nitrosilación-desnitrosilación (75).

8 CONCLUSIÓN

El resveratrol disminuye el estrés oxidativo inducido por calcio, en mitocondrias de corazón de rata.

9 BIBLIOGRAFÍA

1. Tratado de Fisiología Médica. Arthur C. Guyton. Ed. Interamericana, México, 1977. pp. 160-182.
2. Ciencias de la Salud. Berta Yoshiko Higashida Hirose. Ed. McGraw-Hill México, 1991. pp. 169-173.
3. <http://www.gratisweb.com/cvallecor/Index.htm>
4. Goldspink DF, Burniston JG y Tan LP. 2003. Cardiomyocyte death and the ageing and failing heart. *Exp. Physiol.* 88: 447-458.
5. Holmberg S, Cumming D, Kusama Y, Hearse D, Poole-Wilson P, Shattock M Williams A. 1991. Reactive oxygen species modify the structure and function of the cardiac sarcoplasmic reticulum calcium-release channel. *Cardiosci.* 2:19-25.
6. Braunwald E. 1990. Tratado de Cardiología. 3ª. Edición. Vol. II. Interamericana-McGraw-Hill. México. Capítulo 38.
7. Diaz-Zagoya J, Hicks-Gómez J. 1995. Bioquímica. Ed. Interamericana Mc. Graw-Hill. 2ª. Edición. México, D.F.
8. Logan DC. 2006. The mitochondrial compartment. *J. Experim. Bot.* 57: 1225–1243.
9. Brady NR, Elmore SP, van Beek JJHG, Krab MK, Courtoy PJ, Hue L, Westerhof HV. 2004. Coordinated behavior of mitochondria in both space and time: A reactive oxygen species-activated wave of mitochondrial depolarization. *Biophys. J.* 87: 2022–2034.

10. Alvarez S, Novoa-Bermudez MJ, Boveris A. 1994. La mitocondria: estructura, función y especies reactivas de oxígeno. Edición electrónica de la revista: Antioxidantes, Vitaminas y Nutrientes., 1: 26.
11. Lehninger, AL, Nelson DL, Cox M. 1993. Principles of Biochemistry. 2ª. Edition. Ed. Worth.
12. Toescu EC. 2000. Mitochondria and calcium signaling. J. Cell. Mol. Med. 4: 164-175.
13. Duchen M. 1999. Contributions of mitochondria to animal physiology: from homeostatic sensor to calcium signaling and cell death. J. Physiol. 516: 1-17,
14. Laguna J. 1978. Bioquímica. Ed. La prensa médica mexicana. 2ª. Edición. México.
15. Bhagavan NV. 2002. Bioquímica. Ed. Interamericana. 2ª. Edición. México, D.F.
16. Vázquez-Memije ME, Tuena de Gómez-Puyou M. 2002. Mitocondria. Ed. Prado. México.
17. Bernardi P. 1999. Mitochondrial transport of cations: Channels, exchangers, and permeability transition. Physiol. Rev. 79: 1127-1155.
18. Rizuto R, Bernardi, P, Pozzan T. 2000. Mitochondria as all-round players of the calcium game. J. Physiol. 529: 37-47.
19. Blaustein PM, Lederer WJ. 1999. Sodium/calcium exchange: its physiological implications. Physiol. Rev. 79: 763-854.
20. Brookes, PS, Yisang Y, Robotham JL, Anders MW, Sheu SS. 2004. Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. Am. J. Physiol. Cell Physiol. 287: C817–C833.
21. Chen Q, Vazquez EJ, Moghaddas S, Hoppel CL, Lesnefsky EL. 2003. Production of reactive oxygen species by mitochondria. J. Biol. Chem. 278: 36027–36031.
22. Turnes JL. 2003. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. J. Physiol. 552: 335–344.
23. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. 2007. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. Physiol. Rev. 87: 315–424.

24. Ricciardolo F., Sterk PJ, Gaston B, and Folkerts G. 2004. Nitric oxide in health and disease of the respiratory system. *Physiol Rev.*, 84: 731–765.
25. Dröge W. 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* 82: 47-95.
26. Shiva S, Brookes PS, Patel RP, Anderson PG, and Darley-USmar VM. 2001. Nitric oxide partitioning into mitochondrial membranes and the control of respiration at cytochrome c oxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 98: 7212-7217.
27. Stuehr DJ, Santolini J, Wang ZQ, Wei CC, Adak S. 2004. Update on mechanism and catalytic regulation in the NO synthases. *J. Biol. Chem.* 279: 36167–36170.
28. Furchgott R, Zawadzki J. 1980. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288: 373-376.
29. Palmer RMJ, Ashton DS, Moncada S. 1988. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 333: 664 - 666.
30. Lamas S, Cadenas E. 2006. Nitric oxide, cell signaling and gene expression. CRC. Taylor and Francis, USA.
31. Steppan J, Ryoo S, Schuleri KH, Rani CG, Hasan K, White AR, Bugaj LJ, Khan M, Santhanam L, Nyhan D, Shoukas AA, Hare JM, Berkowitz DE. 2006. Arginase modulates myocardial contractility by a nitric oxide synthase 1-dependent mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103: 4759–4764.
32. Ghafourifar P, Cadenas E. 2005. Mitochondrial nitric oxide synthase. *Trends Pharmacol. Sci.* 26: 190-195.
33. Elfering SL, Sarkela TM, Giulivi C. 2002. Biochemistry of mitochondrial nitric-oxide synthase. *J. Biol. Chem.* 277: 38079–38086.
34. Faraci MF, Didion SP. 2004. Superoxide dismutase isoforms in the vessel wall. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24; 1367-1373.
35. Fridovich I. 1997. Superoxide anion radical, superoxide dismutases and related matters. *J. Biol. Chem.* 272: 18515-18517.
36. Pérez-Vázquez V, Ramírez J, Aguilera-Aguirre L, González-Hernández JC, Clemente-Guerrero M, Manzo-Avalos S, Uribe S, Saavedra-Molina A. 2002.

- Effect of Ca^{+2} and Mg^{+2} on the Mn-superoxide dismutase from rat liver and heart mitochondria. *Amino Acids* 22: 405-416.
37. Radi R, Turrens JF, Chang LY, Bush KM, Crapoll JD, Freeman AB. 1991. Detection of catalase in rat heart mitochondria. *J. Biol. Chem.* 266: 22028-22034.
 38. Leopold JA, Loscalzo J. 2005. Oxidative enzymopathies and vascular disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*; 25: 1332-1340.
 39. Jha P, Flather M, Lonn E, Farkouh M, Yusuf S. 1995. The antioxidant vitamins and cardiovascular disease: A critical review of epidemiologic and clinical trial data. *Ann. Intern. Med.* 123: 860-872.
 40. Prasad KN, Kumar A, Kochupillai V, MD, Cole WC. 1999. High doses of multiple antioxidant vitamins: Essential ingredients in improving the efficacy of standard cancer therapy. *J. Am. Coll. Nut.* 18: 13-25.
 41. Ferrières J. 2004. The French paradox: lessons for other countries. *Heart.* 90:107–111.
 42. Ruidavets JB, Bataille V, Dallongeville J, Simon C, Bingham A, Amouyel P, Arveiler P, Ducimetière P, Ferrières J. 2004. Alcohol intake and diet in France, the prominent role of lifestyle. *Eur. Heart J.* 25: 1153–1162.
 43. Wollin SD, Jones PJH. 2001. Alcohol, red wine and cardiovascular disease. *J. Nutr.* 131: 1401–1404.
 44. Siemann EH, Creasy LL. 1992. Concentration of the phytoalexin resveratrol in Wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 43: 49-52.
 45. Gutiérrez-Maydata A. 2002. Vino, polifenoles y protección a la salud. *Revista Cubana Aliment. Nutr.* 16: 134-41.
 46. Hung LM, Su MJ, Chu WK, Chiao CW, Chan WF, Chen JK. 2002. The protective effect of resveratrol on ischaemia-reperfusion injuries of rat hearts is correlated with antioxidant efficacy. *British J. Pharmacol.* 135: 1627-1633.
 47. Pace-Asciak CR, Hahn S, Diamandis EP, Soleas G, Goldberg DM. 1995. The red wine phenolics *trans*-resveratrol and quercetin block human platelet aggregation and eicosanoid synthesis: Implications for protection against coronary heart disease. *Clin. Chim. Acta* 235: 207-219.

48. Rifici VA, Stephan EM, Schneider SH, Khachadurian AK. 1999. Red wine inhibits the cell-mediated oxidation of LDL and HDL. *J. Am. Coll. Nutr.* 18: 137-143.
49. Gilroy DW, Lawrence T, Perretti M, Rossi AG. 2004. Inflammatory resolution: New opportunities for drug discovery. *Nature Rev.* 3: 401-416.
50. Szewczuk LM, Penning TM. 2004. Mechanism-based inactivation of COX-1 by red wine *m*-hydroquinones: A structure-activity relationship study. *J. Nat. Prod.* 67: 1777-1782.
51. Szende B, Tyihák E, Király-Véghely Z. 2000. Dose-dependent effect of resveratrol on proliferation and apoptosis in endothelial and tumor cell cultures. *Experim. Mol. Med.* 32: 88-92.
52. Zazueta C, Correa F, García J. 2003. La transición de la permeabilidad mitocondrial y su relación con apoptosis en corazones sometidos a isquemia-reperfusión. *Memorias del XIV Congreso de Bioenergética y Biomembranas.* Oaxaca, Oaxaca.
53. Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C. 2007. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol. Rev.* 87: 99–163.
54. Szewczyk A, Wojtczak L. 2002. Mitochondria as a pharmacological target. *Pharmacol. Rev.* 54: 101–127.
55. Meister A. 1988. Glutathione metabolism and its selective modification. *J. Biol. Chem.* 263: 17205-17208.
56. Halliwell B, Gutteridge JMC. 1985. *Free radicals in biology and medicine.* Third edition. Oxford Science Publications.
57. Wang W, Ballatori N. 1998. Endogenous glutathione conjugates: Occurrence and biological functions. *Pharmacol. Rev.* 50: 335-355.
58. www.med.unibs.it/~marchesi/ppp.html
59. Moreno-Sánchez R, Hansford GR. 1988. Dependence of cardiac mitochondrial pyruvate dehydrogenase activity on intra mitochondrial free Ca²⁺ concentration. *Biochem. J.* 256: 403-412.
60. Gornall AG, Bardawill CJ, David MM. 1948. Determination of serum proteins by means of the Biuret reaction. *J. Biol. Chem.* 177: 751-765.

61. Chappell JB, Crofts AR. In Regulation of Metabolic Processes in Mitochondria, ed. J. M. Tager, S. Papa, E. Quagliariello, and E. C. Slater (New York: Elsevier Publishing Company, 1966).
62. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PI, Wishnok JS, Tannenbaum SR. 1982 Analysis of nitrate, and [15 N] nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.* 126: 131-138.
63. Buege JA, Aust SD. 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Methods. Enzymol.* 52: 302-310.
64. Kyle D, Mansfield M, Simon C, Keith B. 2004. Hypoxic reduction in cellular glutathione levels requires mitochondrial reactive oxygen species. *J. Appl. Physiol.* 97: 1358–1366.
65. Garlid KD, Jabuñrek M, Jezíek P. 1998. The mechanism of proton transport mediated by mitochondrial uncoupling proteins. *FEBS Lett.* 438: 10-14.
66. McLeod CJ, Aziz A, Hoyt RF, McCoy JP, Sack JP. 2005. Uncoupling proteins 2 and 3 function in concert to augment tolerance to cardiac ischemia. *J. Biol. Chem.* 280: 33470–33476.
67. <http://www.efdeportes.com/efd61/mitocon.htm>
68. Zaninovich AA. 2005. Rol de las proteínas desacoplantes UCP1, UCP2 y UCP3 en el gasto energético, diabetes tipo 2 y obesidad sinergismo con la tiroides. *Medicina (Buenos Aires).* 65: 163-169.
69. Schrauwen P, Xia J, Bogardus C, Pratley RE, Ravussin E. 1999. Skeletal muscle uncoupling protein 3 expression is a determinant of energy expenditure in Pima indians. *Diabetes* 48: 146-149.
70. Hausenloy D, Wynne A, Duchon M, Yellon D. 2004. Transient mitochondrial permeability transition pore opening mediates preconditioning-induced protection. *Circulation* 109:1714-1717.
71. Dedkova, EN, Ji X, Lipsius SL, Blatter LA. 2004. Mitochondrial calcium uptake stimulates nitric oxide production in mitochondria of bovine vascular endothelial cells. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 286: C406–C415.
72. Leikert JF, Räthel TR, Wohlfart P, Cheynier V, Vollmar AM, Dirsch VM. 2002. Red wine polyphenols enhance endothelial nitric oxide synthase expression

- and subsequent nitric oxide release from endothelial cells. *Circulation* 106: 1614-1617.
- 73.** Wallerath T, Deckert G, Ternes T, Anderson H, Li H, Witte K, Förstermann U. 2002. Resveratrol, a polyphenolic phytoalexin present in red wine, enhances expression and activity of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* 106: 1652-1658.
- 74.** Imamura G, Bertelli AA, Bertelli A, Otani H, Maulik N, Das DK. 2002. Pharmacological preconditioning with resveratrol: an insight with iNOS knockout mice. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 282: H1996–H2003.
- 75.** Hare JM, Stamler JS. 2005. NO/redox disequilibrium in the failing heart and cardiovascular system. *J. Clin. Invest.* 115: 509-517.
- 76.** Montero C, Cristescu SM, Jiménez JB, Orea JM, Hekker SL, Harren FJM, González Ureña A. 2003. trans-Resveratrol and grape disease resistance. A dynamical study by high-resolution laser-based techniques. *Plant Physiology.* 131: 129-138.
- 77.** Akerboom, TP, and Sies H, Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. 1981. *Methods Enzymol.*, 77: 373-382.
- 78.** Hyo Jin Kim, Eun Ju Chang, Sung Hee Cho, Shin Kyo Chung, Heui Dong Park, Sang Won Choi. Antioxidative activity of resveratrol and its derivatives isolated from seeds of *Paeonia lactiflora*. 2002. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 66: 1990-1993.
- 79.** Valdez LB, Álvarez S, Zaobornyj T, Boveris A. Polyphenols and red wine as antioxidants against peroxynitrite and other oxidants. 2004. *Biol. Res.* 37: 279-286.
- 80.** Karlsson J, Emgård M, Brundin P, Burkitt MJ. *trans*-Resveratrol protects embryonic mesencephalic cells from *tert*-butyl hydroperoxide: electron paramagnetic resonance spin trapping evidence for a radical scavenging mechanism. *J. Neurochem.*, 75: 141-150.
- 81.** Terada H. Uncouplers of oxidative phosphorylation. 1990. *Env. Health Perspectives* 87: 213-218.

- 82.** Javadov SA, Clarke S, Das M, Griffiths EJ, Lim KH, Halestrap AP. 2003. Ischaemic preconditioning inhibits opening of mitochondrial permeability transition pores in the reperfused rat heart. *J Physiol.*, 549: 513–524.
- 83.** Jacobus WE, Tiozzo R, Lugli G, Lehninger AL, Carafoli E. Aspects of energy-linked calcium accumulation by rat heart mitochondria. 1975. *J. Biol. Chem.*, 250: 7863-7870.
- 84.** Hattori R, Otani H, Maulik N, Das DK. 2002. Pharmacological preconditioning with resveratrol: role of nitric oxide. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 282: H1988–H1995.