



UNIVERSIDAD MICHOCANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO BIOLÓGICAS

**ESTRÉS OXIDATIVO Y NITROSATIVO EN MITOCONDRIAS
DE CEREBRO DE RATA DURANTE LA DIABETES**

Tesis que presenta la

Q.F.B. Ruth Noriega Cisneros

para obtener el Grado de

Maestra en Ciencias

en Biología Experimental

Director de Tesis:

Dr. Alfredo Saavedra Molina

Morelia, Michoacán.

Julio del 2008.

*“Es de importancia para quien desee alcanzar una certeza
en su investigación, el saber dudar a tiempo”*

Aristóteles

DEDICATORIA

A mis padres: **Eva** y **J. Cruz**, gracias por el amor, apoyo y confianza que siempre me han brindado.

A mi esposo: **Cristian**, porque tu amor y apoyo en todos los momentos me hace ser feliz.

A mi hijo: **Gael**, eres la razón de mí existir.

A mis hermanos: **Julián** y **J. Cruz**, gracias por su apoyo y compañía en todo momento.

A mis abuelitas: **Socorrito** y **Milita**, siempre tengo presente su cariño, son para mí un ejemplo de fortaleza, dedicación y amor por la vida.

Al **Dr. Saavedra** y a **Moni**, por su apoyo y amistad brindados desde que nos conocimos.

Al **Dr. Salvador Manzo**, por su apoyo y amistad proporcionados durante la realización de este trabajo.

AGRADECIMIENTOS

Al **Dr. Alfredo Saavedra Molina**, por su asesoría y apoyo brindados para la realización de este trabajo.

Al **Dr. Salvador Manzo Ávalos**, por sus consejos y apoyo brindado.

A la **Q.F.B. Mónica Clemente Guerrero**, por sus consejos y apoyo prestado para la realización del trabajo experimental.

Al **Dr. Carlos Cervantes Vega**, al **Dr. Salvador Manzo Ávalos** y al **Dr. Rafael Villalobos Molina**, por su participación como parte del comité tutorial y como sinodales, así como por las correcciones y sugerencias realizadas a este manuscrito.

A **los profesores** que participaron en los cursos de Maestría por sus enseñanzas.

A mis **compañeros de laboratorio de Bioquímica**, por su amistad, ayuda y buenos momentos.

A la **Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo** y en particular al **Instituto de Investigaciones Químico Biológicas** por mi formación académica.

Al apoyo económico parcial de los donativos de: **Fondos Mixtos CONACYT-Edo. de Michoacán** (64277, 64308), **COECYT Michoacán** (2007), **CIC-UMSNH** (2.16).

Al **CONACYT** por el apoyo económico recibido con la beca 199073.

ÍNDICE GENERAL

| | Página |
|--|--------|
| 1. RESUMEN | 1 |
| 2. INTRODUCCIÓN | 3 |
| 2.1 Diabetes mellitus: Definición, clasificación y perspectiva actual | 3 |
| 2.2 Encefalopatía diabética | 7 |
| 2.3 Cerebro y metabolismo cerebral | 9 |
| 2.4 La mitocondria | 13 |
| 2.5 El estrés oxidativo | 15 |
| 2.5.1 Especies reactivas de oxígeno | 16 |
| 2.5.1.1 Anión superóxido | 18 |
| 2.5.2 Especies reactivas de nitrógeno | 19 |
| 2.5.2.1 Óxido nítrico | 20 |
| 2.5.2.2 Peroxinitrito | 23 |
| 2.6 Defensas antioxidantes mitocondriales | 25 |
| 2.6.1 Glutación | 26 |
| 2.7 La aconitasa | 28 |
| 3. JUSTIFICACIÓN | 35 |
| 4. HIPÓTESIS | 35 |
| 5. OBJETIVOS | 35 |
| 5.1 Objetivo general | 35 |

| | |
|--|-----------|
| 5.2 Objetivos específicos | 35 |
| 6. MATERIALES Y MÉTODOS | 36 |
| 6.1 Reactivos | 36 |
| 6.2 Material biológico | 36 |
| 6.3 Inducción de la diabetes y medición de la glucemia | 36 |
| 6.4 Aislamiento de mitocondrias | 37 |
| 6.5 Determinación de proteína mitocondrial | 38 |
| 6.6 Determinación de citrulina | 39 |
| 6.7 Determinación de lipoperoxidación | 40 |
| 6.8 Cuantificación del glutati3n total | 41 |
| 6.9 Determinación de la actividad de la aconitasa | 41 |
| 6.10 Análisis por Western blot | 42 |
| 6.10.1 Perfil de nitrosilaci3n | 42 |
| 6.10.2 Inmunodetecci3n de la aconitasa | 43 |
| 6.11 Análisis estadístico | 44 |
| 7. RESULTADOS | 45 |
| 7.1 Peso de los animales | 45 |
| 7.2 Glucemia de los animales | 46 |
| 7.3 Efecto de la diabetes sobre la síntesis de citrulina | 47 |
| 7.4 Efecto de la diabetes sobre la oxidaci3n de lípidos | 48 |
| 7.5 Efecto de la diabetes sobre el contenido de glutati3n total | 49 |
| 7.6 Efecto de la diabetes sobre el perfil de nitrosilaci3n | 52 |
| 7.7 Efecto de la diabetes sobre la actividad y contenido de proteína aconitasa | 55 |

| | |
|---------------------------------|----|
| 8. DISCUSIÓN | 58 |
| 9. RESUMEN DE RESULTADOS | 68 |
| 10. CONCLUSIÓN | 69 |
| 11. PERSPECTIVAS | 69 |
| 12. BIBLIOGRAFÍA | 71 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| 1. Anatomía del cerebro humano | 10 |
| 2. Visión general del metabolismo de la glucosa | 12 |
| 3a. Especies reactivas de oxígeno | 17 |
| 3b. Producción de especies reactivas de oxígeno y su efecto en la mitocondria | 17 |
| 4a. Especies reactivas de nitrógeno | 19 |
| 4b. Producción de especies reactivas de nitrógeno y su efecto en la mitocondria | 20 |
| 5. Reacción de síntesis de óxido nítrico. | 21 |
| 6. Efecto de la diabetes inducida por STZ sobre el nivel del $\cdot\text{NO}$ | 23 |
| 7. Estructura del glutatión | 26 |
| 8. Western blot representativo que muestra los niveles de MnSOD | 28 |
| 9. Reacción de la aconitasa | 29 |
| 10a. Estructura tridimensional de la aconitasa | 30 |
| 10b. Centro $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ unido al sustrato, el citrato | 30 |
| 11. Inactivación de la aconitasa mitocondrial de corazón de cerdo por peroxinitrito | 31 |
| 12. Inactivación de la aconitasa mitocondrial por superóxido | 32 |
| 13. Actividades enzimáticas del CAC en mitocondrias de riñón de ratón de diferentes edades | 34 |
| 14. Efecto de la diabetes sobre el peso de los animales | 45 |
| 15. Efecto de la diabetes sobre la glucemia | 46 |
| 16. Efecto de la diabetes sobre la síntesis de citrulina en mitocondrias de cerebro de rata | 48 |
| 17. Efecto de la diabetes sobre los niveles de lipoperoxidación en mitocondrias de cerebro de rata | 50 |
| 18. Efecto de la diabetes sobre el contenido de glutatión total en mitocondrias de cerebro de rata | 51 |
| 19. Perfil de nitrosilación por peroxinitrito | 52 |
| 20. Perfil de nitrosilación por peroxinitrito y posibles proteínas nitrosiladas | 54 |

| | |
|---|----|
| 21. Efecto de la diabetes sobre la actividad de la aconitasa en mitocondrias de cerebro de rata | 56 |
| 22. Western blot representativo que muestra los niveles de aconitasa | 57 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|----|
| 1. Valores de glucosa para el diagnóstico de diabetes mellitus | 4 |
| 2. Transportadores de hexosas (GLUT) | 14 |

LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

| | |
|-------------------------------|---|
| aa | Aminoácidos |
| Acetil-CoA | Acetil-coenzima A |
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| AGE | Productos terminales de glucosilación avanzada |
| ARNm | Ácido ribonucleico mensajero |
| ATP | Adenosina trifosfato |
| CAC | Ciclo del ácido cítrico |
| CTE | Cadena transportadora de electrones |
| DM | Diabetes mellitus |
| ERO | Especies reactivas de oxígeno |
| ERN | Especies reactivas de nitrógeno |
| FAD ⁺ | Dinucleótido de adenina y flavina |
| FADH ₂ | Dinucleótido de adenina y flavina reducido |
| GSH | Glutación reducido |
| GSH _T | Glutación total |
| GSSG | Glutación oxidado |
| H ₂ O ₂ | Peróxido de hidrógeno |
| LRM | Lanzadera redox mitocondrial |
| MDH | Malondialdehído |
| MnSOD | Superóxido dismutasa dependiente de manganeso |
| NAD ⁺ | Dinucleótido de nicotinamida y adenina |
| NADH | Dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido |
| NADPH | Dinucleótido de nicotinamida y adenina fosfato reducido |
| ·NO | Óxido nítrico |
| NOS | Óxido nítrico sintasa |
| NOSmit | Óxido nítrico sintasa mitocondrial |
| O ⁻ ₂ | Anión superóxido |
| O ₂ | Oxígeno molecular |
| ONOO ⁻ | Peroxinitrito |
| PTPm | Poro de la transición de la permeabilidad mitocondrial |
| STZ | Estreptozotocina |
| TBARS | Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico |
| TP | Transportador de piruvato |
| Δμ _{H+} | Potencial transmembranal |

1. RESUMEN

Entre las múltiples complicaciones de la diabetes mellitus (DM), se encuentra la encefalopatía diabética, caracterizada por el deterioro de las funciones cognitivas, cambios electrofisiológicos, anormalidades estructurales y neuroquímicas en el cerebro. La relación entre el daño neuronal y la hiperglucemia no está bien dilucidada. Debido a que el daño por la DM comienza mucho antes de que los síntomas aparezcan, es interesante evaluar el desarrollo de esta enfermedad con el objetivo de que pueda controlarse antes de que el daño sea irreversible. La hiperglucemia crónica incrementa la oxidación de glucosa y, como consecuencia, aumentan los equivalentes reductores, los cuales son oxidados en la cadena respiratoria generando un incremento en el anión superóxido y como consecuencia un incremento en el estrés oxidativo mitocondrial. Con el objetivo de evaluar el estrés oxidativo y nitrosativo durante la DM, en el presente estudio se realizaron determinaciones de óxido nítrico ($\cdot\text{NO}$), sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), glutatión total (GSH_T), peroxinitrito (ONOO^-) y se midió la actividad de la aconitasa en mitocondrias de cerebro de ratas diabéticas como marcadores de estrés oxidativo y nitrosativo. A las primeras cinco semanas de diabetes, los resultados mostraron un aumento en la síntesis del $\cdot\text{NO}$ (12.15 ± 0.78 nmol/mg de proteína/hora vs. el control, 9.48 ± 0.09 nmol/mg de proteína/hora, $p < 0.01$), una disminución en los niveles de lipoperoxidación (5.45 ± 0.70 nmol/mg de proteína vs. el control, 6.64 ± 0.29 nmol/mg de proteína, $p < 0.05$), un aumento en el contenido de GSH_T (26.34 ± 6.56 nmol/ml vs. el control, 16.63 ± 7.74 nmol/ml), y

una elevada actividad de la aconitasa (32.48 ± 18.01 $\mu\text{mol NADPH/mg}$ de proteína/min vs. el control, 3.86 ± 0.32 $\mu\text{mol NADPH/mg}$ de proteína/min, $p < 0.01$), como respuesta a la elevada oxidación de la glucosa. Como consecuencia se observó una respuesta compensatoria, la cual parece mantenerse hasta las siete semanas de diabetes. En ese momento comienza un deterioro mitocondrial, reflejado como disminución de la síntesis de $\cdot\text{NO}$ (3.07 ± 0.17 nmol/mg de proteína/hora vs. el control, 7.15 ± 1.94 nmol/mg de proteína/hora, $p < 0.01$) y la disminución en la actividad de la aconitasa (2.25 ± 0.32 $\mu\text{mol NADPH/mg}$ de proteína/min vs. el control, 3.86 ± 0.64 $\mu\text{mol NADPH/mg}$ de proteína/min, $p < 0.05$). Los resultados sugieren que la hiperglucemia favorece el estrés oxidativo, el cual a su vez afecta las funciones mitocondriales y provoca daño mitocondrial en el cerebro.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Diabetes mellitus: definición, clasificación y perspectiva actual

La diabetes mellitus (DM) describe un desorden metabólico de etiología múltiple, caracterizado por hiperglucemia crónica, con alteración en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas, como resultado de defectos en la secreción de insulina, acción de la insulina o ambos [1,2].

Los efectos de la DM incluyen daño a largo plazo, que se manifiesta como disfunción y falla en varios órganos. Presenta síntomas característicos tales como polidipsia, poliuria, polifagia, visión borrosa y pérdida de peso; en su forma más severa puede desarrollarse cetoacidosis o un estado hiperosmolar no cetótico y conducir a estupor, coma y, en ausencia de tratamiento efectivo, la muerte [1,2].

A menudo los síntomas de la DM no son severos o pueden estar ausentes, y consecuentemente, la hiperglucemia puede estar presente para causar cambios patológicos y funcionales antes de que se haga el diagnóstico. Otros efectos a largo plazo de la DM incluyen desarrollo progresivo de complicaciones específicas como la retinopatía con ceguera potencial, la nefropatía que puede conducir a falla renal, y la neuropatía con riesgo de úlceras en pies, amputación, pie de Charcot y características de disfunción autonómica, incluyendo la disfunción sexual [1,2]. El desarrollo de estas complicaciones depende de la duración de la diabetes y de la calidad del control metabólico y pueden ser prevenidas sólo parcialmente por tratamiento intensivo mediante la

administración de insulina [3,4]. Las personas con DM tienen un riesgo incrementado de enfermedades cardiovasculares, vasculares periféricas y cerebrovasculares [1,2].

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

| Valores de glucosa para el diagnóstico de diabetes mellitus ^(1,2) | | | |
|---|--------------|---------------|---------------|
| Concentración de glucosa, mmol l ⁻¹ (mg dl ⁻¹) | | | |
| | Sangre Total | | Plasma |
| | Venosa | Capilar | Venosa |
| Ayuno | ≥ 6.1 (≥110) | ≥ 6.1 (≥110) | ≥ 7 (≥126) |
| 2 h posterior a una carga de glucosa | ≥ 10 (≥180) | ≥ 11.1 (≥200) | ≥ 11.1 (≥200) |

Tabla 1. Valores de glucosa para el diagnóstico de DM. Tomado y modificado de OMS [1,2].

La DM comprende un grupo heterogéneo de trastornos cuya característica común es la hiperglucemia. Puede ser secundaria a cualquier enfermedad que produzca una destrucción masiva de los islotes pancreáticos, como sucede con la pancreatitis, algunos tumores, algunos fármacos, la sobrecarga de hierro, determinadas endocrinopatías genéticas o adquiridas, y la extirpación quirúrgica del páncreas. Sin embargo, las causas más frecuentes de la DM se deben a trastornos primarios del sistema de señalización entre las células β de los islotes de Langerhans y la insulina. Estas fuentes pueden dividirse en variantes comunes (tipos 1 y 2) que difieren en sus patrones de herencia, sus respuestas a la insulina y sus causas. Junto a ellas existen otros defectos genéticos,

específicos de las funciones de las células β , que son menos frecuentes. Veamos a continuación la clasificación oficial [5].

Clasificación de la DM:

- ❖ **Tipo 1:** indica el proceso de destrucción selectivo de las células β del páncreas, que generalmente conduce a DM en la cual “la administración de insulina es requerida para sobrevivir”, y para prevenir el desarrollo de cetoacidosis, coma y muerte. Es de origen autoinmune o idiopático [1,2].
- ❖ **Tipo 2:** es la forma más común de DM y está caracterizada por una combinación de resistencia a la acción de la insulina y a una inadecuada secreción de insulina, cualquiera de las dos puede ser la característica predominante. Razones específicas para el desarrollo de estas anormalidades aún no son bien conocidas [1,2].
- ❖ **Otros tipos específicos de diabetes:** son los ocasionados por defectos genéticos en la función de las células β , los defectos genéticos en la acción de la insulina, la enfermedad exocrina del páncreas y las endocrinopatías [1,2].
- ❖ **Diabetes gestacional** [1,2].

Aunque los tipos más importantes de DM (tipos 1 y 2) obedecen a mecanismos patogénicos diferentes, las complicaciones a largo plazo en los vasos sanguíneos, los riñones, los ojos y los nervios entre otros, son similares [5].

De ser una enfermedad característica de los países desarrollados, la DM ha pasado a ser una epidemia en países en desarrollo y, a pesar de que existe

un progreso considerable en el esclarecimiento de los mecanismos de sus causas y consecuencias [6], las estrategias para su prevención han resultado insuficientes.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) calcula que en el mundo hay más de 180 millones de personas con DM, y es probable que esta cifra aumente a más del doble en el año 2030, y se calcula que las muertes por DM aumentarán en más de un 50% en los próximos 10 años si no se toman medidas urgentes [6].

La OMS estimó que para el año 2000 existirían en México 2.18 millones de personas con DM [7], sin embargo, la Encuesta Nacional de Salud 2000, efectuada por el Instituto Nacional de Salud Pública, detectó 3.65 millones [8], y alrededor de 582,826 mexicanos murieron de DM en el periodo comprendido de 1980 al 2000 [9], lo que significa que esta enfermedad está rebasando las estimaciones realizadas.

En México, esta enfermedad se presentó, igual que en la mayoría de los países en desarrollo, de forma rápida y sin reemplazar a los problemas pretransicionales como la desnutrición y las enfermedades infecto-contagiosas, lo que ha complicado todavía más la situación [10].

La población de diabéticos en México fluctúa entre los 6.5 y los 10 millones (prevalencia nacional de 10.7% en personas entre 20 y 69 años). De este gran total, se calcula que 2 millones de personas no han sido diagnosticadas. Con las cifras anteriores, México ocupa el noveno lugar de DM en el mundo [11].

Las complicaciones de la DM son las responsables de la mayor parte del gasto económico sanitario directo (hospitalizaciones, visitas ambulatorias, tratamiento farmacológico, tiras reactivas e instrumentos para la automonitorización), aunque en cuanto al gasto social derivado de la enfermedad, las complicaciones contribuyen más a los costos indirectos que llevan asociados (pérdidas de productividad, jubilación anticipada, muerte prematura antes de la jubilación). Por otra parte, la DM presenta un costo intangible considerable por el estrés, dolor y ansiedad que la enfermedad porta, y que puede reducir la calidad de vida, tanto de enfermos como de familiares [12, 13].

2.2 Encefalopatía diabética

Además de las complicaciones que han sido bien descritas, como la neuropatía periférica, la DM también está asociada con un desarrollo gradual de daño en órganos del sistema nervioso central (cerebro y médula espinal) [14, 15]. Cada vez se ha hecho más claro que el cerebro es otro sitio blanco de daño durante la DM [3]. En el cerebro, esta complicación poco conocida, referida como encefalopatía diabética, se caracteriza por el deterioro de las funciones cognitivas y cambios electrofisiológicos. Estos cambios funcionales son acompañados por anormalidades estructurales y neuroquímicas, así como por cambios degenerativos en el cerebro [14].

Se han reportado déficits cognitivos, los cuales son generalmente modestos en pacientes adultos jóvenes [16], pero pueden ser más pronunciados en pacientes diabéticos de mayor edad [17]. Estudios neurofisiológicos en

pacientes con DM tipo 2 demostraron moderado deterioro en la función cognitiva, implicando particularmente la memoria verbal o el procesamiento de información compleja [18, 19]. Otros estudios han registrado disminución en la densidad de materia gris cerebral en regiones responsables del procesamiento del lenguaje y la memoria [19, 20].

La patogénesis de la encefalopatía diabética es probablemente un proceso multifactorial en el que participan tanto factores vasculares como metabólicos. Se ha hecho referencia de que las enfermedades cerebrales micro y macrovasculares presentes en los pacientes diabéticos y el daño neuronal directo causado por concentraciones crónicamente elevadas de glucosa intracelular están implicadas en la encefalopatía [14].

Los efectos a largo plazo de la DM sobre el cerebro son manifestados a nivel estructural, neurofisiológico y neuropsicológico. La visión que emerge es que el cerebro diabético presenta muchos síntomas que son mejor descritos como un “envejecimiento acelerado del cerebro” [21].

Existen reportes que sugieren que la toxicidad directa de la glucosa en las neuronas es debida a una incrementada oxidación de glucosa intracelular (la hiperglucemia es la característica principal de la diabetes), la cual conduce a un incremento en la producción de especies reactivas tanto en humanos como en ratas con diabetes experimental, por lo que el estrés oxidativo parece jugar un papel central en el daño cerebral [14].

La hiperglucemia puede conducir a una acumulación de metabolitos de glucosa potencialmente tóxicos, además del estrés oxidativo ya mencionado,

hay una acelerada formación de productos terminales de glucosilación avanzada (AGE, advanced glycosylation end products, por sus siglas en inglés) y cambios microvasculares en el cerebro, análogos a los observados en la neuropatía periférica [22].

Los mecanismos por los cuales la hiperglucemia causa daño a los tejidos y las consecuentes complicaciones, pueden ser divididos en dos categorías. La primera de éstas implica cambios rápidos en metabolitos intracelulares en respuesta a la hiperglucemia diabética. Estos cambios pueden revertirse cuando se controla la hiperglucemia, pero sus efectos acumulativos conducen al daño irreversible en los tejidos. Ejemplos de esta categoría son el mecanismo intracelular del aumento en el flujo de la vía de los polioles, una incrementada síntesis *de novo* de diacilglicerol, con la resultante activación de varias isoformas de la proteína cinasa C [23], y un alterado estado redox intracelular. La segunda categoría implica cambios lentos en moléculas extracelulares debido a una modificación covalente inducida por la hiperglucemia. Estos cambios son irreversibles para la vida media de la molécula extracelular. El mejor ejemplo estudiado de esta categoría de mecanismo extracelular es la modificación covalente de proteínas por productos terminales de glucosilación avanzada (AGE) [24].

2.3 Cerebro y metabolismo cerebral

El cerebro comprende la porción anterior y superior, que es también la más voluminosa del encéfalo. Tiene forma ovoidea con su extremidad más gruesa hacia atrás. Mide en promedio en adultos 17 cm en sentido

anteroposterior; 14 cm en sentido transversal y 12 cm en sentido vertical; dimensiones que varían medio centímetro menos para la mujer. Pesa en promedio aproximadamente 1200 g en el hombre y 1100 g en la mujer. Tiene alrededor de 100 mil millones de neuronas [25, 26].

En conjunto, está constituido por dos mitades simétricas, denominadas hemisferios cerebrales derecho e izquierdo, separadas una de otra por una cisura muy profunda, sagital y mediana, la cisura interhemisférica. La cara externa de cada hemisferio se divide en cuatro lóbulos (Fig. 1): frontal, occipital, temporal y parietal. La superficie del cerebro está recorrida por un gran número de surcos [25].

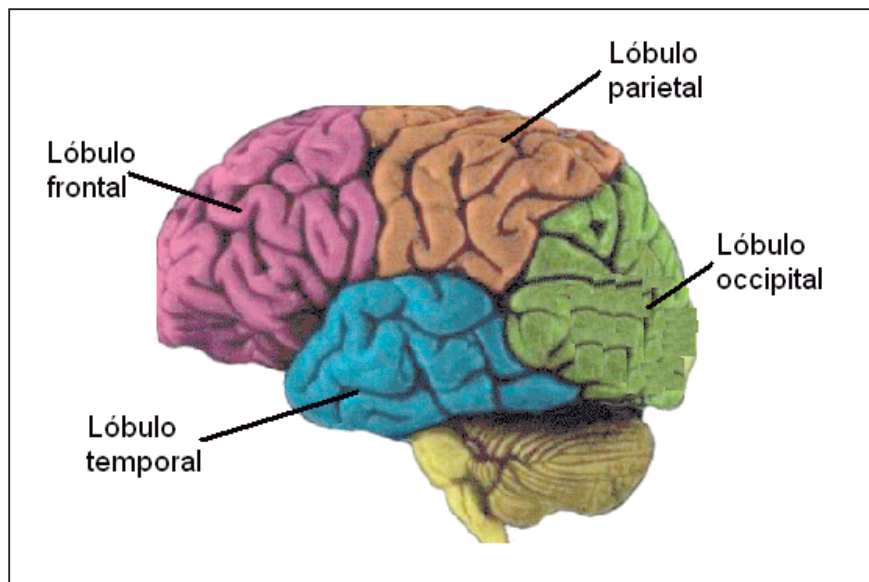


Figura 1. Anatomía del cerebro humano. Hemisferio izquierdo, vista lateral [27].

En condiciones normales, casi toda la energía utilizada por las células del cerebro es suministrada por la glucosa procedente de la sangre. Al igual que el

oxígeno, la mayor parte de ésta es suministrada minuto a minuto y segundo a segundo por la sangre capilar, y en un momento dado sólo existe un almacén de glucosa para dos minutos en forma de glucógeno en las neuronas [26].

Una característica especial del suministro de glucosa a las neuronas es que su transporte al interior de éstas a través de la membrana celular no depende de la insulina, incluso cuando se requiere insulina en la mayor parte de las restantes células del cuerpo. Por tanto, incluso en pacientes que tienen una diabetes grave con una secreción prácticamente nula de insulina, la glucosa todavía difunde con facilidad al interior de las neuronas [26].

El cerebro es el más exigente de los órganos y uno de los más voraces. Debe generar ATP en grandes cantidades para mantener los potenciales de membrana que son esenciales para la transmisión de los impulsos nerviosos [28]. Además de depender minuto a minuto, del suministro de glucosa, depende de un modo crítico de la concentración de glucosa en sangre, por lo cual el mantenimiento de ésta dentro de unos límites estrechos es crucial para el funcionamiento del cerebro [29].

Los requerimientos energéticos del cerebro ascienden alrededor del 60% de la utilización de glucosa del ser humano en reposo, necesita de 120 g de glucosa al día. El cerebro es un órgano altamente aerobio y su metabolismo requiere alrededor del 20% del oxígeno total consumido por el ser humano [28].

La glucosa es utilizada por el cerebro exclusivamente mediante la secuencia glucolítica y por el ciclo del ácido cítrico (Fig. 2) [29, 30].

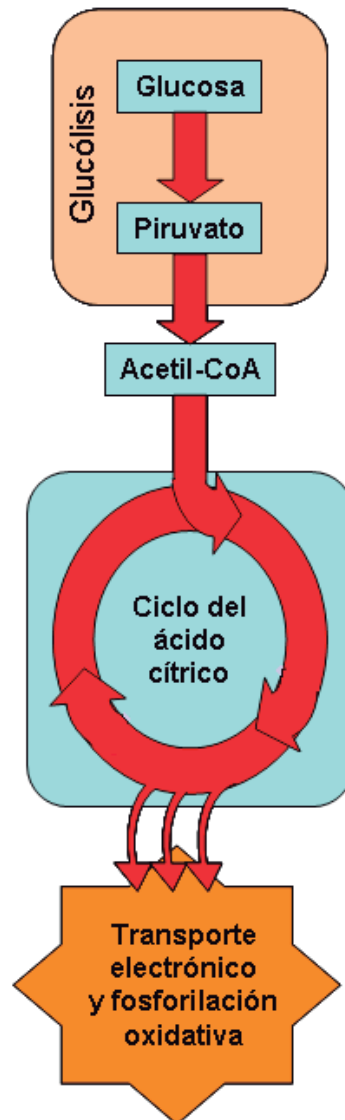


Figura 2. Visión general del metabolismo de la glucosa. Tomado y modificado de Mathews y Van Holde [28].

Para que la glucosa pueda ser metabolizada, debe entrar a la célula a través de los transportadores llamados GLUT presentes en la membrana celular. En el cerebro existen varias isoformas de ellos (Tabla 2): GLUT-3 asegura la entrada de glucosa de manera basal (independiente de insulina), GLUT-6 que

permite el ingreso de glucosa estimulado por insulina y GLUT-13 para el ingreso de glucosa y mioinositol [31, 32].

Una vez que la glucosa entra a la célula es fosforilada e ingresa a la vía glucolítica dando lugar al piruvato, este es convertido a acetil-CoA, el cual se oxida a CO₂ y H₂O en el ciclo del ácido cítrico dentro de la mitocondria.

2.4 La mitocondria

Las mitocondrias son orgánulos celulares de forma globular, poseen un diámetro de 0.5 - 1 µm y miden arriba de 7 µm de longitud. Se encuentran en todas las células excepto las bacterias, las arqueas y los eritrocitos maduros del organismo multicelular, su número en las células del cuerpo humano varía de acuerdo a la cantidad de trabajo que la célula lleva a cabo. En el caso de las neuronas, la cantidad de mitocondrias en cada célula es sumamente elevada debido a los cuantiosos requerimientos de energía [33, 34].

La mitocondria contiene una membrana externa y una estructural y funcionalmente más compleja membrana interna, el espacio entre éstas es el espacio intermembranal. En el interior de la membrana interna se halla la matriz, contiene un 50% de proteínas, contiene ADN y ribosomas [29]. La membrana externa contiene relativamente pocas proteínas de transporte o enzimáticas. La membrana interna aparece invaginada en pliegues o crestas, lo cual incrementa su área. La membrana interna consiste de 80% de proteínas y es rica en ácidos grasos insaturados. Los complejos enzimáticos del transporte de electrones y la fosforilación oxidativa están localizados en esta membrana [34].

ESTRÉS OXIDATIVO Y NITROSATIVO EN CEREBRO DURANTE LA DIABETES

| ISOFORMAS | NÚMERO DE aa | MONOSACÁRIDOS QUE TRANSPORTA | LOCALIZACIÓN | FUNCIÓN |
|----------------|--------------|--|---|---|
| GLUT 1 | 664 | Glucosa, Galactosa | Eritrocito, barreras hematoencefálica, placentaria y de la retina, astrocito, nefrona | Ingreso basal de glucosa |
| GLUT 2 | 522 | Glucosa, Galactosa, Fructosa | Células β pancreáticas, hígado, intestino delgado, neurona proximal | Sensor de glucosa en páncreas, transporte de glucosa en la membrana basolateral del intestino y riñón |
| GLUT 3 | 596 | Glucosa, Galactosa | Cerebro , placenta, hígado, riñón y corazón | Ingreso basal de glucosa |
| GLUT 4 | 509 | Glucosa | Músculo esquelético y cardiaco, tejido adiposo | Ingreso de glucosa estimulado por insulina |
| GLUT 5 | 501 | Fructosa. No muestra afinidad por la glucosa | Yeyuno, espermatozoides, riñón, células de la microglía | Transporte de fructosa |
| GLUT 6 | 507 | Glucosa | Cerebro , bazo y leucocitos | Ingreso de glucosa estimulado por insulina |
| GLUT 8 | 477 | Glucosa | Testículos y placenta | Ingreso de glucosa |
| GLUT 9 | 540 | Glucosa | Riñón e hígado | Ingreso de glucosa |
| GLUT 10 | 541 | Glucosa | Hígado y páncreas | Ingreso de glucosa |
| GLUT 11 | 496 | Glucosa | Músculo esquelético y corazón | Ingreso de glucosa |
| GLUT 12 | 617 | Glucosa | Músculo esquelético, tejido adiposo, intestino delgado | Ingreso de glucosa |
| GLUT 13 | 629 | Glucosa | Cerebro | Ingreso de glucosa y mioinositol |

Tabla 2. Transportadores de hexosas (GLUT). aa: aminoácidos. Tomado y modificado de Díaz y Burgos [31].

Las secuencias metabólicas llevadas a cabo dentro de la mitocondria son: el ciclo del ácido cítrico, el transporte electrónico y la fosforilación oxidativa (Fig. 2), la oxidación de ácidos grasos y el catabolismo de aminoácidos, entre otras [29].

Las mitocondrias son la principal fuente intracelular de especies reactivas de oxígeno (ERO), la producción de las cuales se incrementa con la edad, y ellas son también uno de los blancos principales de las ERO. El efecto dañino de las ERO puede ser el responsable del deterioro mitocondrial observado en varias situaciones como estrés oxidativo, y especialmente en procesos de envejecimiento celular [35].

La función mitocondrial es particularmente susceptible al daño oxidativo (las proteínas de la matriz mitocondrial son sensibles a la inactivación oxidativa), conduciendo a la disminución en la síntesis de ATP mitocondrial, pérdida de la homeostasis del calcio celular e inducción de la apertura del poro de la transición de la permeabilidad mitocondrial (PTPm), los cuales predisponen a la célula a necrosis o apoptosis [35, 36].

Existen evidencias que demuestran que el incrementado estrés oxidativo y consecuente daño oxidativo observado en condiciones de hiperglucemia comienzan en la mitocondria, por ser el principal sitio productor de especies reactivas de oxígeno [37, 38, 39].

2.5 El estrés oxidativo

El término estrés oxidativo designa aquella condición en donde existe un desbalance entre la producción de especies reactivas y los sistemas

antioxidantes (enzimáticos y no enzimáticos) produciendo un daño generalizado que afecta los procesos metabólicos ya sea de la célula o de un orgánulo en particular y que, de mantenerse por mucho tiempo, puedan provocarle un daño irreparable y consecuentemente, la muerte. Se reconoce en la actualidad que el estrés oxidativo puede ser el resultado de una disminución en las defensas antioxidantes o puede ser la consecuencia de un exceso en la producción de especies reactivas [40, 41].

El estrés oxidativo puede ser ocasionado por especies reactivas de oxígeno (ERO) y especies reactivas de nitrógeno (ERN), las cuales son productos del metabolismo celular normal y que por su alta reactividad debida a electrones desapareados que poseen en su última capa de valencia, o por su elevado potencial de oxidación, reaccionan con moléculas importantes para la vida como las proteínas, los lípidos, los ácidos nucleicos y los carbohidratos, alterando su estructura y por ende sus funciones dentro de la célula [42].

No obstante, las ERO y las ERN son reconocidas por tener una función dual como especies tanto benéficas como deletéreas, puesto que pueden ser dañinas o benéficas para los sistemas vivos [41].

2.5.1 Especies reactivas de oxígeno

La cadena respiratoria mitocondrial es el principal sitio de producción de ERO dentro de la célula [36]. Las especies en referencia son radicales derivados del oxígeno como el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el anión hidroxilo (HO^{\cdot}), el radical peroxi-alquil (ROO^{\cdot}), y no radicales como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Fig. 3a y 3b) [42].

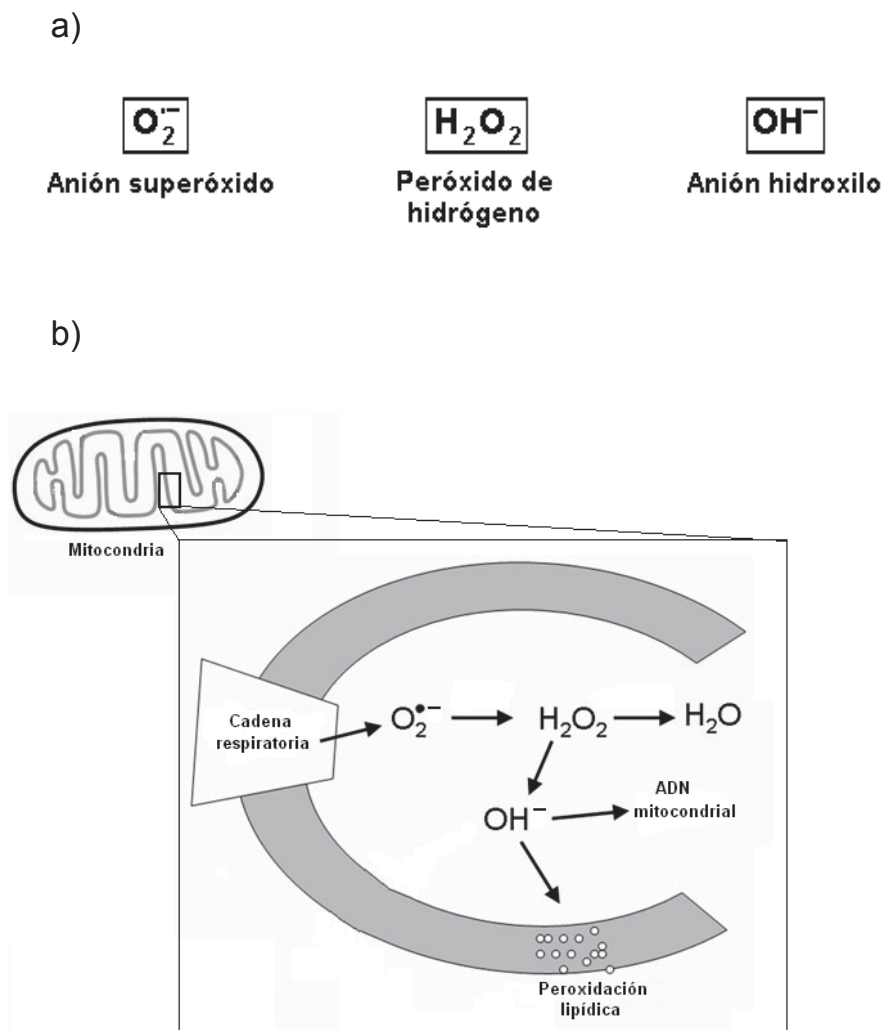


Figura 3. a) Especies reactivas de oxígeno. Tomado y modificado de Castillo y Col. [43]. **b) Producción de especies reactivas de oxígeno y su efecto en la mitocondria.** Tomado y modificado de Szeto [44].

Los efectos benéficos de las ERO ocurren a concentraciones bajas-moderadas e implican funciones fisiológicas en respuesta a anoxia, como por ejemplo en defensa contra agentes infecciosos y en la función de un número de sistemas de señalización celular. Otro ejemplo benéfico de las ERO a

concentraciones bajas-moderadas es la inducción de una respuesta mitogénica [41].

El exceso de ERO (conocido como estrés oxidativo de manera específica) puede dañar lípidos, proteínas o ADN inhibiendo su función normal. Debido a esto, el estrés oxidativo ha sido implicado en un número de enfermedades humanas, entre ellas la DM, así como en el proceso de envejecimiento (se sabe que las proteínas oxidadas se acumulan durante el envejecimiento) [35, 41].

2.5.1.1 Anión superóxido

El anión superóxido es una de las especies reactivas formadas a partir del oxígeno, que es de interés para este trabajo. Dentro de la mitocondria, los radicales libres de oxígeno son generados durante la fosforilación oxidativa cuando una molécula de oxígeno reacciona promiscuamente con uno de los electrones transportados antes de llegar a la citocromo *c* oxidasa (complejo IV). Por lo tanto, el anión superóxido O_2^- es producto de la reducción parcial del oxígeno y posee un electrón desapareado, debido a eso es más reactivo que el O_2 [45].

Los sitios principales productores de los radicales superóxido son los complejos I y III de la cadena transportadora de electrones. Las cantidades de oxígeno que reaccionan directamente para generar radicales libres son muy variadas. Sin embargo, típicamente se citan valores de 1.5-4% del oxígeno total consumido [46, 47].

El O_2^- puede reaccionar con diversos sustratos orgánicos e inorgánicos; puede reducir ferrocitocromo *c*, quinonas, metales de transición complejizados y

puede oxidar ácido ascórbico, α -tocoferol, catecoles, tetrapirroles, tioles y hemoproteínas, entre otros compuestos [45]. Además el superóxido ha sido implicado en la fisiología y patología de una variedad de transtornos que incluyen enfermedades de Parkinson, Huntington y Alzheimer, así como en el proceso de envejecimiento [47].

2.5.2 Especies reactivas de nitrógeno

La producción excesiva de óxido nítrico ($\cdot\text{NO}$) induce la formación de diversas especies reactivas de nitrógeno, las cuales son capaces de realizar reacciones como nitración, oxidación, hidroxilación y nitrosilación de diversas biomoléculas (Fig.4). Estas modificaciones se realizan durante el metabolismo normal de las células y forman parte de procesos fisiológicos, sin embargo, en ciertas condiciones, la formación de especies reactivas de nitrógeno puede estar exacerbada, superando a los mecanismos de protección contra ellas. Bajo estas circunstancias puede establecerse una condición patológica conocida como estrés nitrosativo [41, 48]. Algunas especies reactivas de nitrógeno de interés son el $\cdot\text{NO}$ y el peroxinitrito (ONOO^-) (Fig.4).

a)



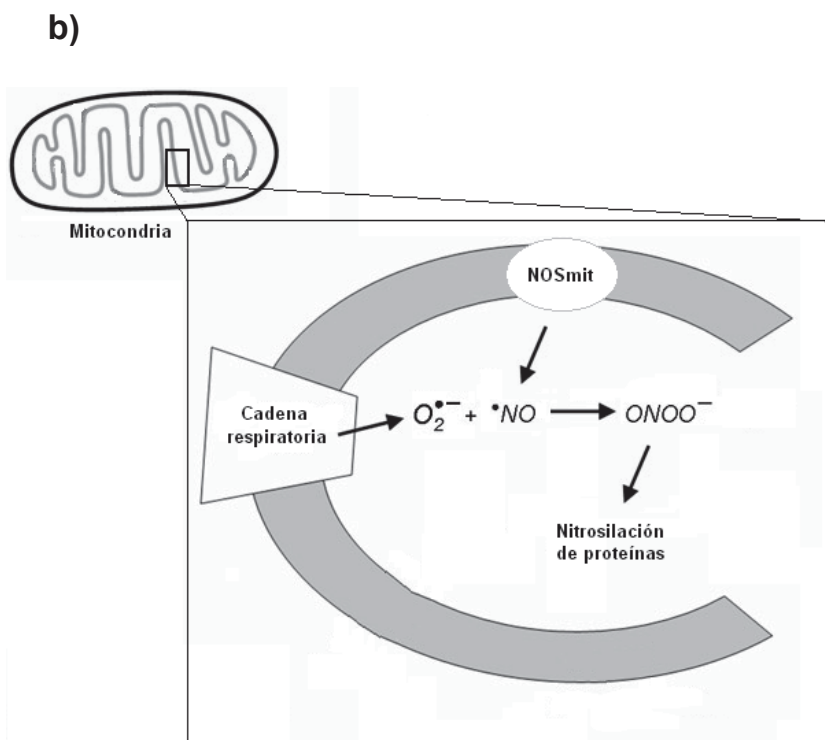


Figura 4. a) Especies reactivas de nitrógeno. Tomado y modificado de Castillo y Col. [43]. **b) Producción de especies reactivas de nitrógeno y su efecto en la mitocondria.** Tomado y modificado de Szeto [44].

2.5.2.1 Óxido nítrico

El óxido nítrico ($*NO$) es sintetizado por varias isoformas de la óxido nítrico sintasa (NOS) que catalizan la conversión de L-arginina a L-citrulina y $*NO$ [49]. La reacción tiene lugar en dos pasos, donde la oxidación de cinco electrones del nitrógeno guanidino de la L-arginina da lugar a la formación del intermediario N-hidroxi-L-arginina. Esta reacción consume estequiométricamente O_2 , requiere 1.5 moles de NADPH, y produce L-citrulina como coproducto (Fig. 5) [50, 52].

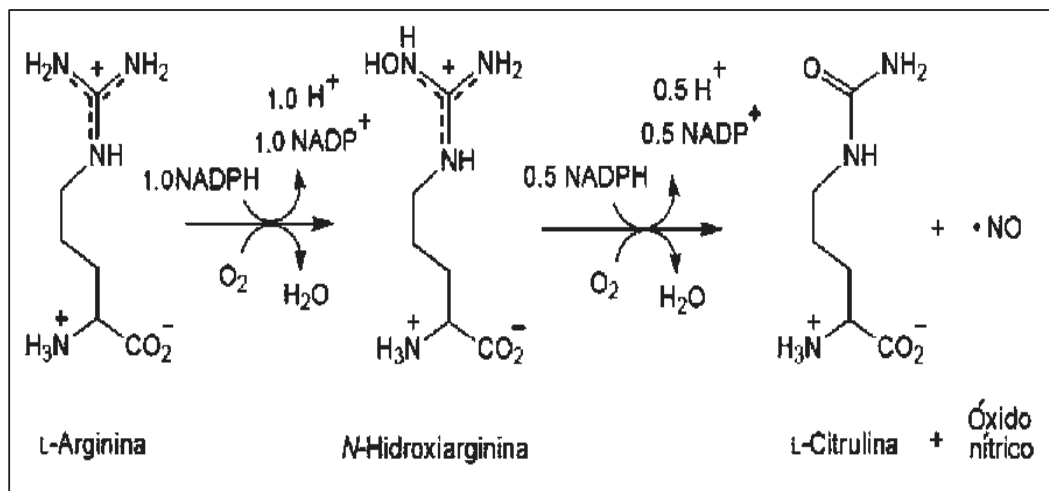


Figura 5. Reacción de síntesis de óxido nítrico. Tomado y modificado de Ghafourifar y Saavedra-Molina [48].

El $\cdot\text{NO}$ es una molécula reguladora difusible implicada en un amplio rango de eventos fisiológicos y patológicos. Originalmente conocido como factor relajante derivado del endotelio, ha demostrado ser un mensajero intracelular en procesos fisiológicos como la regulación del flujo sanguíneo y la neurotransmisión [14].

La división entre las actividades fisiológicas y patológicas del $\cdot\text{NO}$ es aún materia de controversia, pero es aceptado que la concentración y el sitio de producción subcelular son críticos para determinar si actúa como molécula señalizadora o neurotóxica [14].

En neuronas, el $\cdot\text{NO}$ es generado en las mitocondrias por la óxido nítrico sintasa mitocondrial (NOSmit) en la membrana interna de la mitocondria. A concentraciones fisiológicas se une reversiblemente al centro Cu^{2+}B de la citocromo *c* oxidasa (complejo IV) y puede inhibir parcialmente la transferencia

de electrones compitiendo con el oxígeno. Esto es posible debido a que el ·NO tiene propiedades químicas muy similares a las del O₂ [14, 50].

En mitocondrias de cerebro de ratas diabéticas, se ha demostrado que la actividad de la NOSmit incrementa, con la consecuente elevación de la concentración de ·NO, lo que además de inhibir a la citocromo c oxidasa, puede provocar la nitrosilación y oxidación de tioles de proteínas. Por otra parte, una alterada expresión y actividad de la NOSmit, incrementa la producción de peroxinitrito, el cual suprime las reacciones de detoxificación de modo que los efectos mediados por especies reactivas derivadas del ·NO pueden prevalecer [14].

La producción y función del ·NO es alterada en condiciones patológicas, tales como la DM y la hipertensión [53]. El ·NO puede contribuir al daño celular en la DM modulando la entrada de glucosa en las células por sobre-regulación de los GLUT en las neuronas [49]. La sobre-regulación de los GLUT por el ·NO puede ser perjudicial en condiciones caracterizadas por excesivo aporte de glucosa, como ocurre en DM, donde un incremento en la glucosa intracelular conduce a un excesivo aporte de electrones a la cadena transportadora mitocondrial, resultando en una hiperpolarización de la membrana mitocondrial y más adelante un incremento en la producción de radicales libres [14].

Estudios realizados en mitocondrias de cerebro de ratas diabéticas (21 días de diabetes), han mostrado una elevación en la concentración de ·NO durante las primeras semanas de esta enfermedad, como podemos observar en la figura 6, donde los autores determinaron nitritos y nitratos como indicadores

indirectos de la concentración de $\cdot\text{NO}$ [14], sugiriendo estrés nitrosativo durante el desarrollo de la DM.

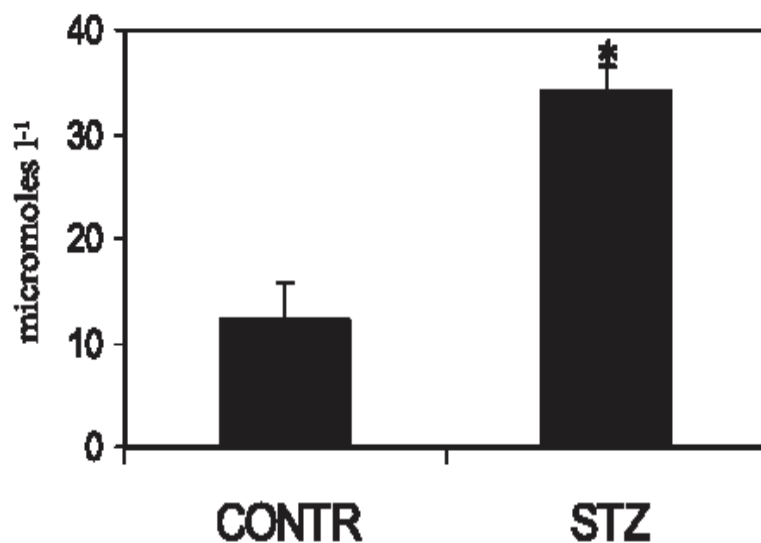


Figura 6. Efecto de la diabetes inducida por estreptozotocina (STZ) sobre el nivel del $\cdot\text{NO}$. Nivel de NO_2/NO_3 determinados por el método de Griess, en la fracción mitocondrial aislada de cerebro de ratas diabéticas (STZ) y controles (CONTR) [14].

2.5.2.2 Peroxinitrito

El peroxinitrito (ONOO^-) es un oxidante dañino formado por la reacción entre el anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) y el óxido nítrico ($\cdot\text{NO}$). Es formado en una reacción controlada por la difusión de ambos ($\cdot\text{NO}$ y $\text{O}_2^{\cdot-}$). Reacciona con una variedad de moléculas incluyendo proteínas y tioles no proteicos, ácidos grasos insaturados y ADN, afectando así los mecanismos de conservación de energía y

modificación post-traducciona oxidativa de proteínas, y causando finalmente la muerte celular neuronal [51, 54].

El ONOO⁻ puede interferir con enzimas del ciclo del ácido cítrico (como la aconitasa), con la cadena respiratoria mitocondrial (los complejos I, II y III), con el metabolismo del calcio o dañar el ADN con la subsiguiente activación de una enzima que consume energía, como la poli (ADP-ribosa) sintetasa [49].

La alterada expresión y actividad de la NOS incrementa la producción de peroxinitrito, el cual además de los efectos mencionados, suprime las reacciones de detoxificación, por lo tanto los efectos mediados por especies reactivas derivadas de ·NO prevalecen [14].

El peroxinitrito tiene una vida media en el orden de 10-100 ms, por lo tanto su detección directa en sistemas biológicos no es posible, por ello se emplean con frecuencia mediciones indirectas para identificar y medir la concentración de peroxinitrito formado, una de ellas es la medición de modificaciones oxidativas a biomoléculas, donde se evalúan huellas “footprints” de la acción del peroxinitrito sobre biomoléculas. El peroxinitrito causa la nitrosilación de residuos de tirosina y triptofano formando 3-nitrotirosina, 5- y 6-nitrotriptofano, respectivamente; la 3-nitrotirosina es considerada como “footprint” de la formación de peroxinitrito. Dentro de los métodos destaca la detección por técnicas inmunoquímicas de residuos de nitro-tirosina asociados a proteínas [55].

El peroxinitrito puede inhibir a la superóxido dismutasa dependiente de manganeso (MnSOD), reduciendo por lo tanto su actividad reguladora

(“quenching”) sobre el superóxido. Se ha demostrado que el contenido de MnSOD es reducido en mitocondrias de cerebro de ratas diabéticas. La función de la MnSOD mitocondrial es crítica protegiendo a las neuronas del daño por radicales libres. En enfermedades neurológicas, se han reportado mutaciones que afectan a la MnSOD, con el consecuente incremento de especies reactivas [14].

2.6 Defensas antioxidantes mitocondriales

Entre las defensas antioxidantes en la mitocondria se encuentra la enzima antioxidante MnSOD: convierte superóxido a peróxido de hidrógeno. La isoforma mitocondrial de la glutatión peroxidasa y la enzima peroxirredoxina III dependiente de tiorredoxina destoxifican el peróxido de hidrógeno convirtiéndolo en agua. La isoforma mitocondrial de la glutatión reductasa mantiene en estado reducido la reserva de glutatión mitocondrial, esta enzima requiere NADPH producido en la mitocondria por la isocitrato deshidrogenasa dependiente de NADP^+ y a través de una transhidrogenasa dependiente del $\Delta\mu_{\text{H}^+}$. Dentro de la bicapa de fosfolípidos mitocondrial se encuentran los antioxidantes solubles en lípidos, la vitamina E y la coenzima Q, que previenen la lipoperoxidación. Hay mecanismos que reparan o degradan lípidos, proteínas y ADN dañados oxidativamente [36].

El daño oxidativo ocurre siempre y cuando las especies reactivas producidas por la mitocondria evaden la destoxificación, y el nivel del daño oxidativo depende de las velocidades relativas de acumulación de daño, reparación y degradación [36].

2.6.1 Glutati3n

El glutati3n es un trip3ptido constituido por los amino3cidos glutamato, ciste3na y glicina (Fig.7). Se encuentra en concentraciones intracelulares de 1-11 mM (5-11 mM en la mitocondria).

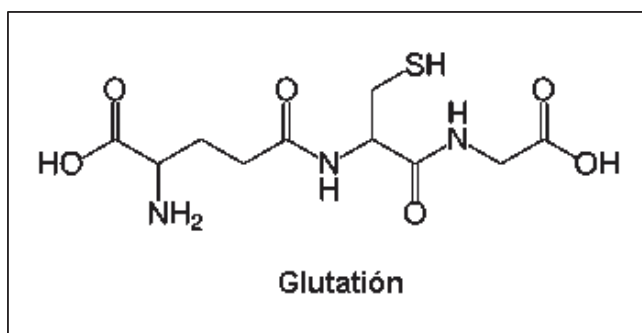


Figura 7. Estructura del glutati3n [61].

Puede presentarse tanto en forma de tiol reducido (GSH), como de disulfuro oxidado (GSSG) y la relaci3n GSH / GSSG es fundamental para mantener el estado redox celular. El GSH es el tiol end3geno no proteico m3s abundante y el principal antioxidante intracelular, actúa como atrapador de radicales libres y como reductor del H_2O_2 . La suma de las formas tiol reducido m3s disulfuro oxidado, m3s la porci3n de glutati3n unido a prote3nas se le conoce como glutati3n total (GSH_T) [56].

El glutati3n est3 presente dentro de las c3lulas principalmente en la forma reducida (GSH, 90-95% del glutati3n total). La oxidaci3n del glutati3n conduce a la formaci3n de glutati3n disulfuro (GSSG). El estado intracelular de GSH parece ser un indicador sensible de la salud de la c3lula completa y de su capacidad

para resistir a cambios tóxicos o dañinos. Elevados niveles de GSH en la célula pueden indicar la ocurrencia de cambios patológicos [59,60].

El glutatión se encuentra en todos los órganos, pero se presenta en mayor cantidad es en el hígado, el cual actúa como centro de síntesis, almacenamiento y distribución, para su utilización por los otros tejidos y órganos periféricos, incluyendo el cerebro [56, 58].

Ha sido reportado que la relación GSSG / GSH se encuentra aumentada en ratas tratadas con estreptozotocina (STZ) en comparación con los controles; así mismo, el contenido de MnSOD es marcadamente más bajo en ratas STZ (Fig. 8); aunado a esto, se observa una incrementada cantidad de peróxido de hidrógeno, indicando en conjunto que la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno consume los antioxidantes endógenos y suprime la capacidad antioxidante [14].

El peróxido de hidrógeno incrementado está relacionado a la pérdida drástica de GSH, el cual es requerido para activar a la GSH peroxidasa, la enzima detoxificante del H_2O_2 [14].

La poza mitocondrial de GSH es considerada vital para la supervivencia de la célula: después de una severa depleción de GSH mitocondrial, la muerte celular ocurre; esto, sin embargo, puede ser retrasado por un tratamiento antioxidante [62].

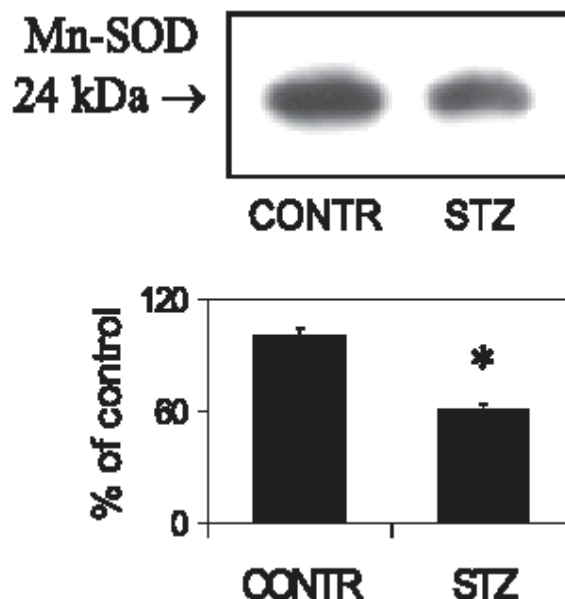


Figura 8. Western blot representativo que muestra los niveles de MnSOD, el histograma muestra las intensidades de las bandas. Los niveles de MnSOD fueron determinados de la fracción mitocondrial obtenida del cerebro de ratas diabéticas (STZ) y controles (CONTR), * $P < 0.05$ estadísticamente significativo con respecto al control [14].

2.7 La aconitasa

La aconitasa [citrato (isocitrato) hidro-liasa, EC 4.2.1.3] es una enzima del ciclo del ácido cítrico (Fig. 2) que cataliza la isomerización del citrato a isocitrato (Fig. 9). El citrato experimenta un reordenamiento, la transposición del grupo hidroxilo de la posición 3 a la posición 2 formando el isocitrato, su isómero. El proceso consta de una deshidratación para formar el producto intermediario “*cis*-aconitato”, que se hidrata y el resultado final es la transposición del grupo hidroxilo (OH) de la molécula.

El centro cúbico $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ localizado en el sitio activo de la enzima es esencial para la actividad catalítica (Figs. 10a y 10b), pero también provoca en la

aconitasa alta vulnerabilidad a las especies reactivas de oxígeno y especies reactivas de nitrógeno. Tres de los átomos de hierro en la estructura cúbica están unidos a azufres de cisteína del esqueleto de la proteína; el cuarto hierro (Fe_α , llamado hierro lábil) está ligado al azufre inorgánico y participa en la unión del sustrato al sitio activo interaccionando con grupos carboxilo e hidroxilo de éste [63, 64].

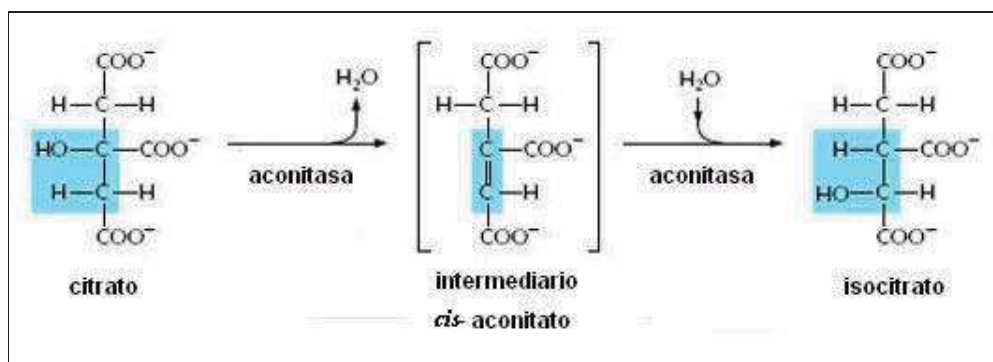


Figura 9. Reacción de la aconitasa [61].

La aconitasa es altamente susceptible al daño oxidativo; la exposición a superóxido, peróxido y peroxinitrito provoca la liberación del Fe_α (pérdida mediada por oxidantes) del centro $[\text{4Fe-4S}]^{2+}$, produciendo $[\text{3Fe-4S}]^{1+}$ y una inactivación de la aconitasa.

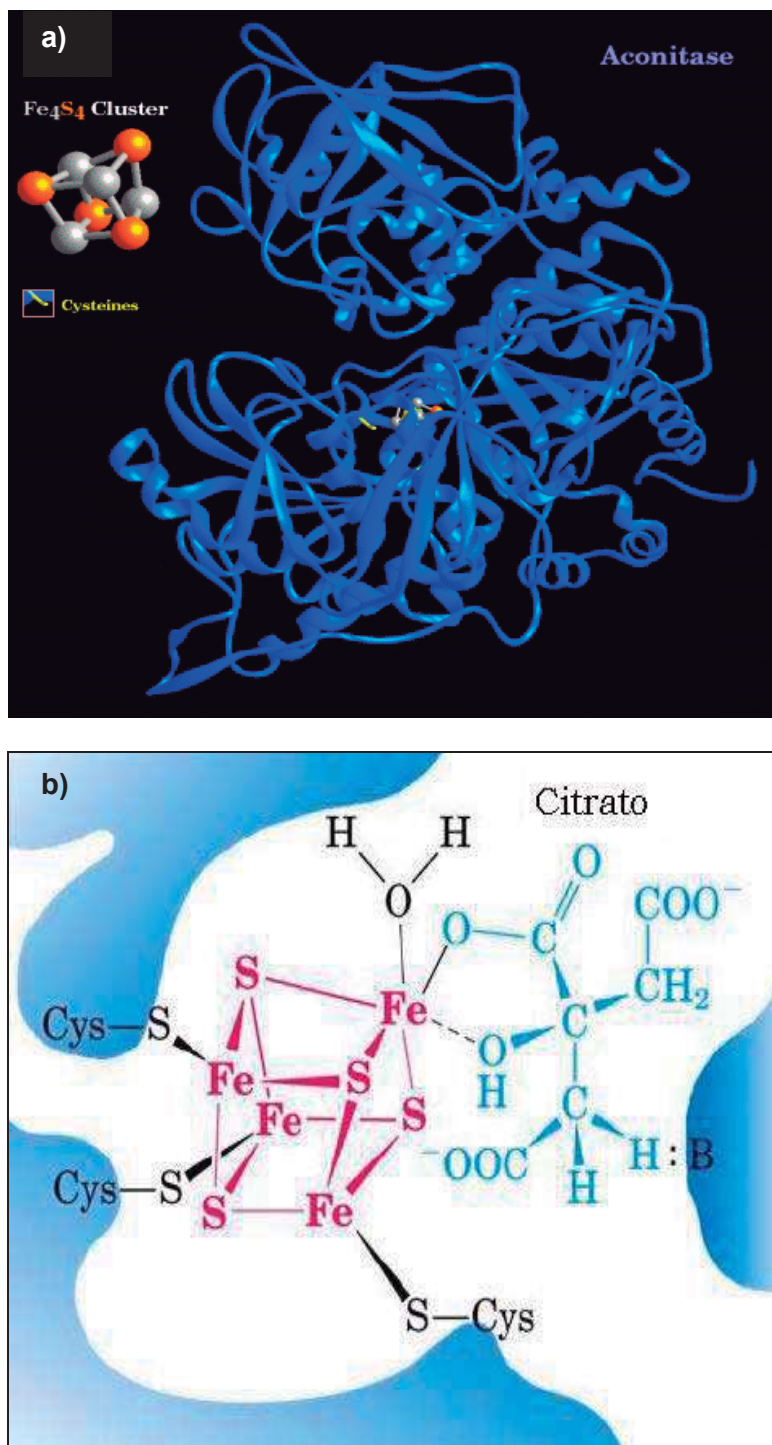


Figura 10. a) Estructura tridimensional de la aconitasa y ubicación del centro $[4Fe-4S]^{2+}$. b) Centro $[4Fe-4S]^{2+}$ unido al sustrato, el citrato [66].

La enzima también es inactivada por carbonilación y nitrosilación, a través de modificaciones en los aminoácidos cisteína y tirosina [64, 67]. Debido a esta susceptibilidad la medición de la actividad de la aconitasa se emplea frecuentemente como marcador de daño neurodegenerativo. La enzima es inactivada por $O_2^{\cdot -}$, H_2O_2 y $ONOO^-$.

Por ejemplo la exposición de aconitasa mitocondrial activa a $ONOO^-$ da como resultado la inactivación de la enzima en una manera dependiente de la concentración de $ONOO^-$ empleada (Fig. 11) [66].

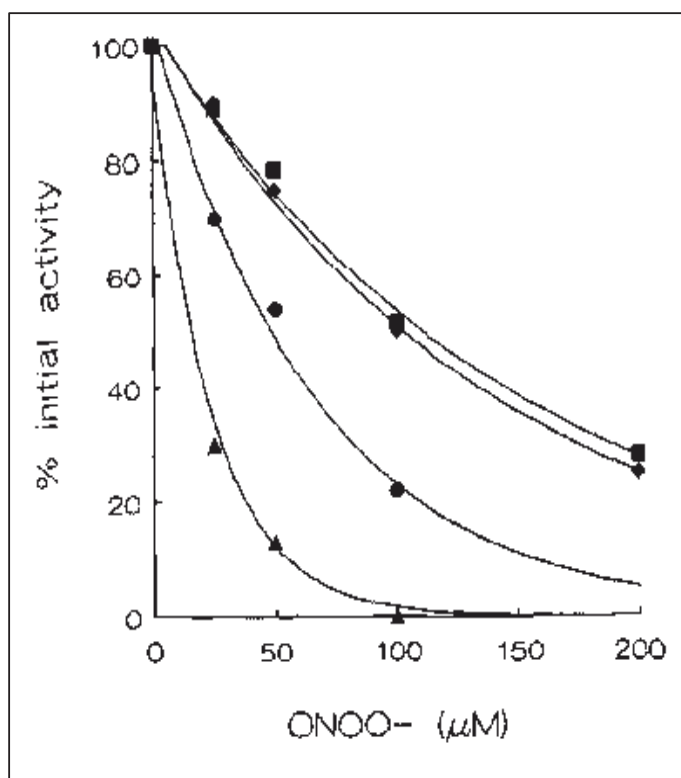


Figura 11. Inactivación de la aconitasa mitocondrial de corazón de cerdo por peroxinitrito. Diferentes concentraciones de aconitasa (7.25 (\blacktriangle), 24.2 (\bullet), 48.3 (\blacklozenge), y 109 (\blacksquare) μ M) fueron incubadas con peroxinitrito y se midió la actividad enzimática después de incubar por 5 minutos [64].

La incubación de la aconitasa en un sistema de superóxido más peróxido de hidrógeno (Fig. 12, línea 6) causó una progresiva pérdida de actividad en la enzima, la cual es dependiente de la cantidad de ambas especies. La presencia o ausencia de catalasa (Fig. 12, línea 3) o superóxido dismutasa (Fig. 12, líneas 4 y 5), sólo previnieron parcialmente la inactivación de la aconitasa.

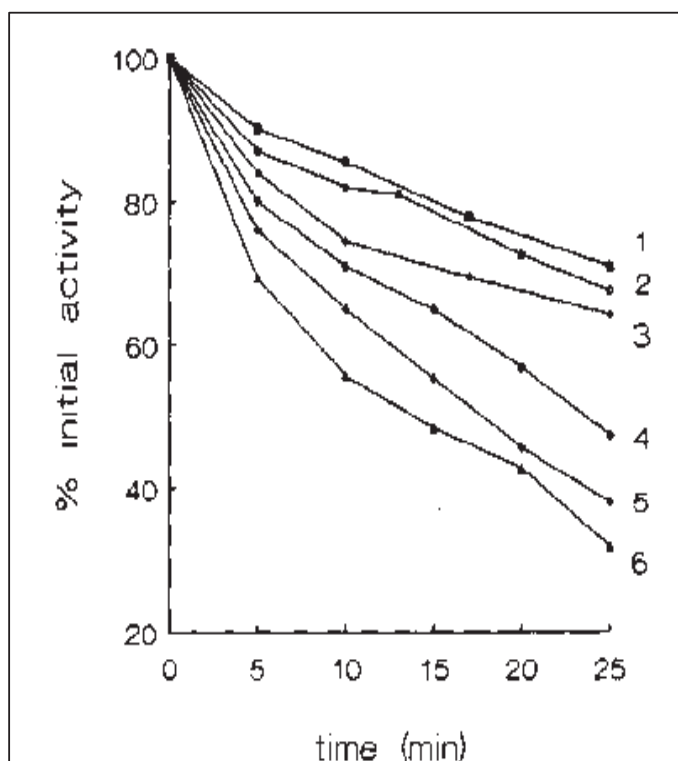


Figura 12. Inactivación de la aconitasa mitocondrial por superóxido. La aconitasa ($76 \mu\text{M}$) fue incubada con hipoxantina ($150 \mu\text{M}$) y xantina oxidasa (5.5 miliunidades/ml). Línea 2: incubación de la aconitasa bajo una atmósfera saturada de aire sin xantina oxidasa. Todas las demás condiciones incluyen xantina oxidasa más $1.92 \mu\text{M}$ de superóxido dismutasa más $0.5 \mu\text{M}$ de catalasa (línea 1), $0.5 \mu\text{M}$ de catalasa (línea 3), $1.92 \mu\text{M}$ de superóxido dismutasa (línea 4), $0.77 \mu\text{M}$ de superóxido dismutasa (línea 5), y sin adiciones (línea 6) [64].

La protección total se obtuvo cuando la catalasa y la superóxido dismutasa estaban presentes simultáneamente (Fig. 12, línea 1), la inactivación

bajo esta condición fue similar a la observada al exponer la aconitasa a una atmósfera saturada de aire (Fig. 12, línea 2) [64].

El ciclo del ácido cítrico tiene un papel central en la bioenergética mitocondrial, suministrando equivalentes reductores, NADH y FADH₂ para la síntesis de ATP, y NADPH para la reducción de H₂O₂ y GSSG en la mitocondria, así como aportando intermediarios esenciales para la síntesis de aminoácidos, lipogénesis y gluconeogénesis.

Estudios realizados por Yarian y col. (2005), indican que de las enzimas del ciclo del ácido cítrico, la aconitasa exhibe la disminución más significativa en actividad asociada con la edad (Fig. 13). Una pequeña, pero significativa disminución en la actividad ocurre con la α -cetoglutarato deshidrogenasa, mientras que la isocitrato deshidrogenasa-NADP⁺ muestra una elevación en la actividad. Además, la relación molar NADPH:NADP⁺ también decae con la edad, lo cual puede ser asociado con un incremento relacionado con la edad del estado pro-oxidante en la mitocondria [67, 68].

Una disminución en la actividad de la aconitasa es probable que afecte la eficiencia total del ciclo del ácido cítrico, aún un daño selectivo o sutil a las enzimas del ciclo, puede potencialmente resultar en concentraciones alteradas de los intermediarios, los cuales pueden afectar el metabolismo secundario, así como mecanismos de transducción de señales [67].

Tomando en cuenta que se ha documentado un aumento en el estrés oxidativo durante el envejecimiento, y que es en esta condición cuando la aconitasa se ve alterada, podemos tomar la actividad de la aconitasa como

marcador de daño oxidativo en la condición que nosotros estudiamos, la diabetes.

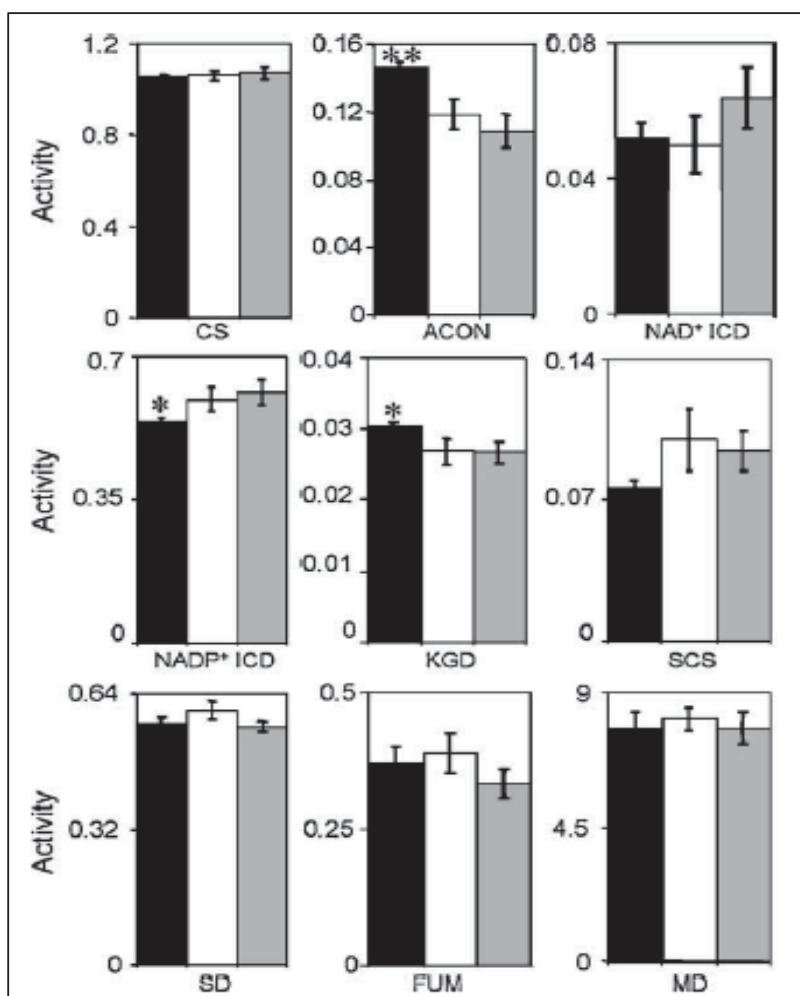


Figura 13. Actividades enzimáticas del ciclo del ácido cítrico en mitocondrias de riñón de ratón de diferentes edades: 6 (negro), 16 (blanco) y 24 (gris) meses de edad. CS: citrato sintasa, ACON: aconitasa, NAD⁺ICD: isocitrato deshidrogenasa-NAD⁺, NADP⁺ICD: isocitrato deshidrogenasa-NADP⁺, KGD: α-cetoglutarato deshidrogenasa, SCS: succinil CoA sintetasa, SD: succinato deshidrogenasa, FUM: fumarasa y MD: malato deshidrogenasa [67].

3. JUSTIFICACIÓN

Debido a la elevada prevalencia de la DM y al limitado conocimiento acerca de la encefalopatía diabética, es importante conocer el mecanismo del daño oxidativo mitocondrial en el cerebro durante la diabetes.

4. HIPÓTESIS

La hiperglucemia diabética favorece el estrés oxidativo y nitrosativo, y contribuye al deterioro progresivo de las funciones mitocondriales en el cerebro.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar el estrés oxidativo y nitrosativo en mitocondrias de cerebro de rata durante la diabetes.

5.2 Objetivos específicos

En mitocondrias de cerebro de ratas diabéticas y controles:

1. Determinar la concentración de $\cdot\text{NO}$.
2. Medir los niveles de lipoperoxidación (TBARS).
3. Cuantificar la concentración de glutatión total.
4. Comparar el perfil de nitrosilación por ONOO^- .
5. Determinar la actividad enzimática de la aconitasa.
6. Conocer los niveles de la aconitasa.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Reactivos

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

6.2 Material biológico

Se emplearon ratas Wistar macho de 3 meses de edad (peso entre 250-300 g) que se mantuvieron enjauladas, en grupos de 4 o 6 ratas, con acceso libre a agua y alimento, bajo condiciones controladas de luz.

6.3 Inducción de la diabetes y medición de la glucemia

Los animales fueron divididos en dos grupos: el grupo diabético y el grupo control. La diabetes fue inducida químicamente después de un período de 12 horas de ayuno a través de una inyección intraperitoneal de estreptozotocina (STZ) (40 mg/kg). Esta droga destruye selectivamente a las células β del páncreas (células productoras de insulina) [70, 71, 72, 73, 74]. A las ratas del grupo control se les inyectó sólo el vehículo (agua).

Las ratas fueron sacrificadas 1, 3, 5, 7 y 16 semanas después de la administración de STZ o vehículo. Durante ese periodo, el peso de las ratas fue registrado, así como la concentración de glucosa en sangre que fue obtenida de la vena de la cola, y se empleó un glucómetro comercial (Glucometer Accu Check Sensor III). Se realizaron mediciones de glucemia con ayuno o sin ayuno

antes y después de la administración de STZ/vehículo, respectivamente. Si la concentración de glucosa en sangre excedía 300 mg/dL (sin ayuno) las ratas entraron al grupo diabético.

6.4 Aislamiento de mitocondrias

Las mitocondrias de cerebro fueron aisladas por centrifugación diferencial y purificadas en un gradiente de Percoll, de acuerdo al método de Sims [69] y Thakar [75], con algunas modificaciones para su optimización. Las ratas fueron sacrificadas por decapitación, rápidamente se extrajo el cerebro (descartando el cerebelo y el bulbo raquídeo) y se colocó en el medio de aislamiento (manitol 210 mM, sacarosa 70 mM, EGTA (ácido etilen glicol-bis [β -amino etil éter]-N, N, N', N'-tetraacético) 1 mM, albúmina sérica bovina al 0.5% y de MOPS (ácido 3-[N-morfolino] propano sulfónico) 10 mM, a un pH de 7.4). Todo el proceso de aislamiento de mitocondrias se realizó a 4°C. El cerebro se trituró y homogeneizó manualmente empleando un homogeneizador de vidrio con un vástago de teflón. El homogeneizado se centrifugó a 4,100 rpm (centrífuga Beckman J2-MC) durante 3 min a 4°C. Se separó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió con medio de aislamiento, se centrifugó a 4,100 rpm por 3 min a 4°C. Se desechó el precipitado y el sobrenadante obtenido se mezcló con el de la primera centrifugación. La mezcla se centrifugó a 16,400 rpm por 10 min a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y el sedimento se suspendió suavemente en Percoll al 15%. Esta suspensión se colocó sobre un gradiente discontinuo de Percoll (23% y 40%), previamente preparado. Este gradiente se

centrifugó a 19,600 rpm por 6 min a 4°C. Se obtuvieron 3 fracciones, de las cuales cuidadosamente se extrajo la tercera fracción inferior correspondiente a las mitocondrias. La fracción extraída se diluyó 1:4 con el medio de aislamiento y se centrifugó a 14,000 rpm durante 10 min a 4°C. Se descartó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 3 ml del medio de aislamiento con la adición de 500 µl (10 mg/ml) de albúmina bovina para posteriormente centrifugar a 9,000 rpm por 10 min a 4°C. Las mitocondrias fueron mantenidas en hielo hasta el momento de su utilización o fueron almacenadas a -80°C para pruebas posteriores. Muestras tomadas al azar con mitocondrias obtenidas con este método fueron analizadas para descartar la presencia de contaminantes citosólicos empleado el marcador de citosol, calreticulina.

6.5 Determinación de la proteína mitocondrial

La concentración de proteína mitocondrial obtenida en cada aislamiento se determinó por el método de Lowry [76]. El procedimiento se realizó por duplicado. Para la curva de calibración se agregaron los volúmenes correspondientes a 0, 12.5, 25, 50, 75 y 100 µg de proteína a partir de una solución patrón de 0.5 mg/ml de albúmina sérica bovina y se completaron con agua desionizada a 200 µl. En el caso de las muestras y medio de aislamiento (que contiene 0.5% de albúmina sérica bovina), se agregaron 15 µl de éstas y se adicionaron 185 µl de agua desionizada. Tanto a la curva de calibración como a las muestras se les agregó 1 ml de la solución C (compuesta por una mezcla de la solución A: Na₂CO₃ al 2%, NaOH al 0.4%, tartrato de sodio y potasio al 0.2% y

la solución B: CuSO₄ al 0.5%), se agitó y dejó reposar 10 min. Posteriormente, se agregó tanto a la curva de calibración como a las muestras 100 µl del reactivo de Folin, se agitó y dejó reposar por 30 min. Se determinó la absorbencia a 660 nm en un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 18. Se construyó la curva de calibración en Excel (Microsoft Office) y por extrapolación se estimó la concentración de proteínas de las muestras, empleando la ecuación de la línea recta. Una vez conocida la concentración de proteína mitocondrial, se realizaron los cálculos correspondientes para saber el volumen correspondiente a la concentración que cada prueba requirió.

6.6 Determinación de citrulina

La citrulina se determinó mediante el método descrito por Knipp [77] con algunas modificaciones. Las mitocondrias (0.3 mg) fueron incubadas en una solución que contenía manitol 190 mM, MOPS 10 mM, KH₂PO₄ 5 mM, KCl 15 mM, MgCl₂ 3 mM, EGTA 1 mM, a pH de 7.4, adicionando succinato 10 mM y rotenona 2 µM. Las mitocondrias fueron incubadas por 60 min a 30°C y una agitación de 30 rpm. Después de este periodo, la reacción se detuvo con la adición de ácido perclórico al 4%. Posteriormente, se centrifugó a 5,000 rpm por 20 min. A 300 µl del sobrenadante obtenido se le adicionaron 3 ml del reactivo cromogénico compuesto de: solución férrica ácida (H₃PO₄ 3 M, H₂SO₄ 6 M, NH₄Fe(SO₄)₂ 2 mM y solución DAMO la cual contiene DAMO (2,3-butanodiona monoxima) 80 mM y tiosemicarbazida 2 mM. Se mezcló vigorosamente y se calentó en baño maría por 10 min a 95°C. Se dejó enfriar y se determinó la

absorbencia a 530 nm en un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 18. Se corrió un blanco y una curva estándar de citrulina.

6.7 Determinación de lipoperoxidación

La peroxidación lipídica o lipoperoxidación, es un proceso degenerativo que afecta a los lípidos insaturados de la membrana bajo condiciones de estrés oxidativo. La medición de los niveles de lipoperoxidación se emplea comúnmente como un indicador de estrés oxidativo. Se realizó la determinación basada en el método del ácido tiobarbitúrico (TBA) reportada por Buege y Aust [78] con algunas modificaciones. Este método mide la producción de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS, thiobarbituric acid reactive substances) entre las que se encuentra el malondialdehído (MDH), un producto de lipoperoxidación por radicales libres. Las mitocondrias (0.15 mg) se suspendieron en un medio de fosfatos 0.15 M para evitar interferencias debido a la reacción del TBA con carbohidratos como el manitol y la sacarosa contenidos en el medio de aislamiento. A cada tubo se le agregó 2 ml de una solución ácida compuesta por ácido tricloroacético 15%, TBA 0.375% y HCl 0.25 N. Posteriormente, los tubos se calentaron en un baño maría hirviendo durante 15 min, transcurrido este tiempo los tubos fueron enfriados en hielo y centrifugados a 7,500 rpm por 5 min. Finalmente, se extrajo el sobrenadante y se determinó la absorbencia a 535 nm en un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 18. Los resultados se expresaron en nanomolas de TBARS/mg de proteína, empleando

para los cálculos el coeficiente de extinción molar del malodialdehído de $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

6.8 Cuantificación del glutatión total

Para la determinación del contenido total de glutatión se empleó el Glutathione Assay Kit de Sigma-Aldrich y de acuerdo al método de Akerboom y Sies con algunas adaptaciones [59]. Las muestras de mitocondrias (0.1 mg) fueron desproteinizadas empleando una solución de ácido sulfosalicílico al 5% durante 10 min. a 4° C. Posteriormente fueron centrifugadas a 10,000 rpm por 10 min. Se separó el sobrenadante y se agregó la mezcla de reacción la cual contenía buffer de análisis 1x (buffer fosfato de potasio 100 mM, pH 7, EDTA 1 mM), glutatión reductasa (6 u/ml) y solución de DTNB (5,5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzoico)) (1.5 mg/ml). Las muestras se incubaron por 5 min y se agregó el NADPH para comenzar la reacción. Se tomaron lecturas a intervalos de 1 min durante 5 min a 412 nm empleando un lector de Elisa. Se realizó una curva estándar de glutatión en cada experimento.

6.9 Determinación de la actividad de la aconitasa

Para el análisis de la actividad enzimática de la aconitasa se empleó el método descrito por Sohal [67] con algunas modificaciones. Las mitocondrias (0.05 mg) fueron permeabilizadas, resuspendiéndolas en un pequeño volumen de Tris-HCl 50 mM (pH 7.4) y Tritón x-100 0.02% (v/v), la muestra se agitó y dejó reposar 5 min. Posteriormente, se centrifugó a 9,900 rpm por 5 min y 4°C. En el

sobrenadante se obtuvieron las proteínas presentes en la matriz mitocondrial, por lo que se empleó el sobrenadante para el análisis inmediato. La actividad de la aconitasa fue analizada usando citrato como sustrato y acoplando la reacción a la de isocitrato deshidrogenasa-NADP⁺, en una mezcla de reacción que contenía Tris 27 mM, pH 7.4, citrato 5 mM, MnCl₂ 0.6 mM, NADP⁺ 0.2 mM y una unidad de isocitrato deshidrogenasa-NADP⁺. Se registró el cambio en la absorbencia a 340 nm en un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 18, durante 5 min a 30°C y se usó el coeficiente de extinción molar de NADPH, 6.22 mM⁻¹ cm⁻¹.

6.10 Análisis por Western blot

6.10.1 Perfil de nitrosilación

Se emplearon 40 µg de proteína mitocondrial y se mezclaron con 6 µl de buffer de solubilización. Posteriormente se hirvieron a 95°C durante 3 min. Las proteínas se separaron mediante electroforesis SDS-PAGE (10%) durante 90 min a 100 V. Una vez completada la electroforesis, las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF (fluoruro de polivinildieno) empleando un equipo de transferencia húmeda (Bio-Rad) durante 60 min a 100 V. Una vez transferidas, las membranas fueron teñidas con rojo de Ponceau para verificar una óptima transferencia, posteriormente se destiñeron con buffer de lavado (TBS-T). Las membranas fueron bloqueadas con TBS-T-gelatina (USB) 1%, durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación continua.

Posteriormente las membranas fueron incubadas con el anticuerpo policlonal de conejo anti-3-nitotirosinas (anti-3-NT, Molecular Probes) en TBS-T-gelatina 1% (1:2,000) por 1 hora a temperatura ambiente en agitación constante. Las membranas se lavaron 3 veces con TBS-T durante 10 min y se incubaron con el anticuerpo secundario IgG acoplado a peroxidasa (goat anti-rabbit; Southern Biotech) en TBS-T-gelatina 1% (1:4,000). Las membranas se lavaron 3 veces con TBS-T durante 10 min. La interacción antígeno-anticuerpo se determinó mediante quimioluminiscencia (Western Blotting Luminol Reagent; Santa Cruz Biotechnology), las membranas se expusieron a una película durante 30 segundos. Las películas se digitalizaron con ayuda de un escáner ScanJet 3400C (Hewlett Packard) y las imágenes se guardaron en una computadora. La intensidad de las bandas se determinó empleando un software de análisis de imágenes (ImageJ).

6.10.2 Inmunodetección de la aconitasa

La separación de proteínas se realizó mediante electroforesis SDS-PAGE (8%) utilizando 20 µg de proteína mitocondrial. Las condiciones fueron las mismas que el protocolo descrito anteriormente. Las membranas con las proteínas transferidas, se incubaron por 1 hora a temperatura ambiente en agitación constante con una solución de TBS-T-leche 5%.

Posteriormente las membranas fueron incubadas con el anticuerpo policlonal anti-aconitasa mitocondrial, el cual fue amablemente donado por el Dr. Luke Sweda (*Oklahoma Medical Research Foundation, OK, USA*) (1:20,000) en

TBS-T-leche al 5% por 1 hora a temperatura ambiente en agitación constante. Las membranas se lavaron 3 veces con TBS-T durante 10 min y se incubaron con el anticuerpo secundario IgG acoplado a peroxidasa de rábano (goat anti-rabbit; Southern Biotech) (1:4,000) en TBS-T-leche al 5% por 1 hora a temperatura ambiente en agitación constante. Al concluir la incubación las membranas se lavaron 3 veces con TBS-T durante 10 min. La interacción antígeno-anticuerpo se determinó mediante quimioluminiscencia empleando luminol como sustrato (Western Blotting Luminol Reagent; Santa Cruz Biotechnology). Posteriormente se expusieron a una película durante 1 min. Las películas se digitalizaron con ayuda de un escáner ScanJet 3400C (Hewlett Packard) y la intensidad de las bandas se determinó empleando un software de análisis de imágenes (ImageJ).

6.11 Análisis estadístico

Los datos representan el promedio \pm el error estándar de 3 o más mediciones de animales diferentes. Los datos fueron sometidos a la prueba *t* de Student para determinar la significancia ($p < 0.05$, $p < 0.01$ y $p < 0.001$) de la diferencia entre los valores promedio, respecto al control del mismo tiempo (control y diabético) y entre diferentes tiempos (1, 3, 5, 7 y 16 semanas), utilizando el programa SigmaStat versión 2.03.

7. RESULTADOS

7.1 Peso de los animales

Una de las características de la DM es la pérdida de peso, por lo cual consideramos de ayuda llevar un registro del peso de los animales como corroboración de nuestro modelo de diabetes. Se realizó el registro del peso de las ratas tanto del grupo control como del grupo diabético (Fig. 14), se pudo observar una ganancia en el peso de las ratas del grupo control que corresponde con su crecimiento normal, en cuanto al grupo diabético se observó una disminución en el peso, característica del modelo de diabetes en ratas.

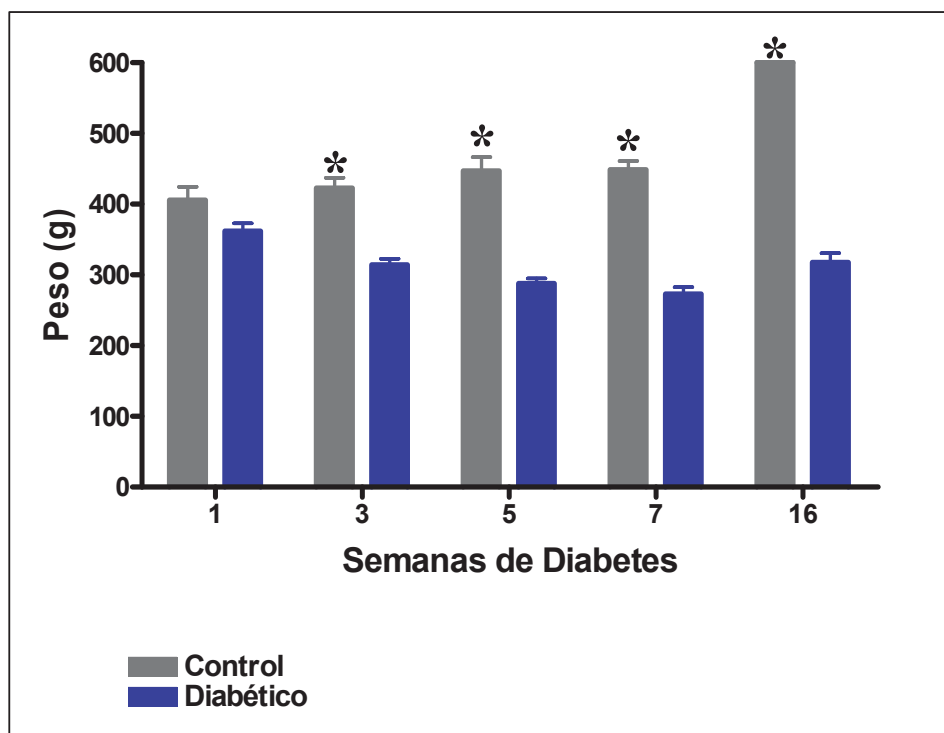


Figura 14. Efecto de la diabetes sobre el peso de los animales. Los valores se obtuvieron en los dos grupos inmediatamente antes de sacrificar a las ratas. Los valores representan la media \pm EE de n=6-12. *P<0.001, con respecto al diabético del mismo tratamiento.

7.2 Glucemia de los animales

Una de las características principales de la DM es la hiperglucemia crónica, por lo tanto, la medición de la concentración de glucosa sérica en las ratas empleadas para los experimentos es importante, ya que así nos aseguramos de que contamos con un modelo adecuado de diabetes.

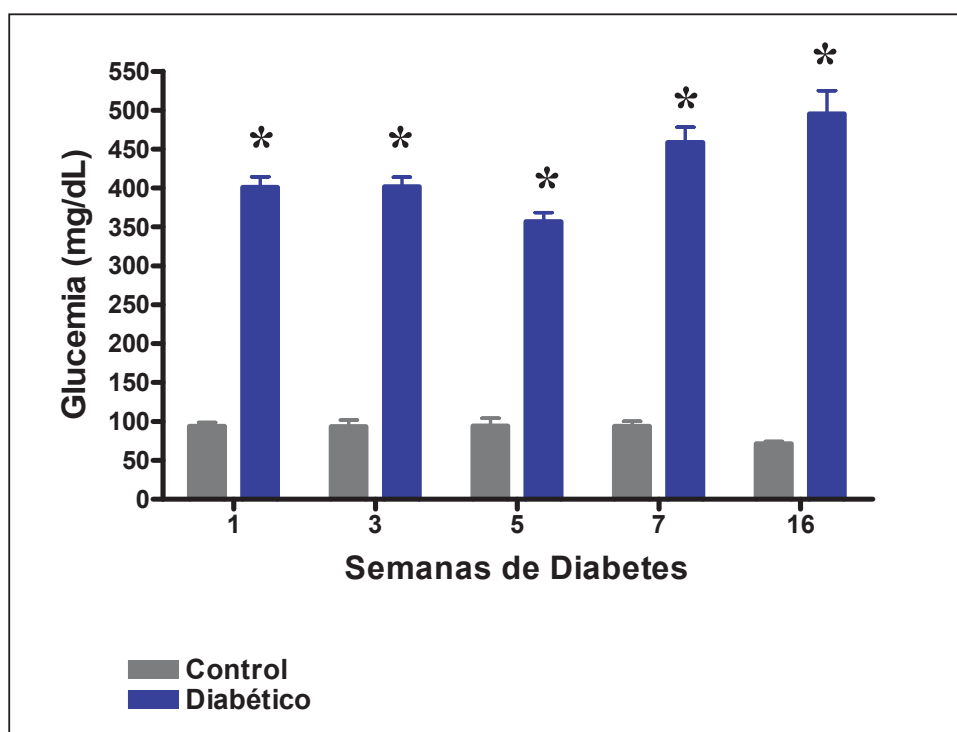


Figura 15. Efecto de la diabetes sobre la glucemia. Los valores se obtuvieron en los dos grupos (control y diabético) inmediatamente antes de sacrificar a las ratas. Los valores representan la media \pm EE de $n=6-12$. * $P<0.001$, con respecto al control del mismo tratamiento.

La figura 15 muestra los valores medios de glucosa sérica para el grupo control y diabético durante las diferentes semanas de tratamiento, pudiendo observar que en el grupo control la concentración de glucosa sérica se mantuvo

dentro de los valores normales (70-110 mg/dL) y en el caso del grupo diabético los valores de glucosa sérica promedio superaron los 300 mg/dL, por lo tanto, obtuvimos un modelo adecuado de diabetes en ratas.

7.3 Efecto de la diabetes sobre la síntesis de citrulina

La óxido nítrico sintasa (NOS) cataliza la oxidación de L-arginina a L-citrulina y $\cdot\text{NO}$ en forma equimolar, por lo tanto, la determinación de citrulina puede ser utilizada como una medida indirecta de los niveles de óxido nítrico.

En la figura 16 se muestran los resultados obtenidos de la determinación de citrulina en mitocondrias de cerebro de ratas diabéticas. Se determinó citrulina tanto en el grupo diabético como en el grupo control a las 1, 3, 5, 7 y 16 semanas posteriores a la inducción de la diabetes.

Se observó un aumento en la síntesis de citrulina a las 3 y 5 semanas de diabetes (13.0 ± 0.49 y 12.15 ± 0.78 nmol/mg proteína/hora, $p < 0.01$), este aumento también se presentó en el grupo control (8.82 ± 0.13 y 9.48 ± 0.09 nmol/mg proteína/hora, $p < 0.01$) sólo que en el grupo diabético este aumento fue más marcado ($p < 0.01$). En el grupo diabético, a partir de la semana 7 comenzó una disminución en la síntesis de citrulina que fue marcada a la semana 16 (3.07 ± 0.17 nmol/mg proteína/hora), el grupo control no mostró disminución en la síntesis de citrulina a las 16 semanas, su valor es cercano al inicial, 7.15 ± 1.94 nmol/mg proteína/hora. Estos resultados sugieren que durante la diabetes los niveles de $\cdot\text{NO}$ pueden elevarse provocando una situación de estrés nitrosativo que afecta la integridad de la mitocondria y como consecuencia de esta

situación, con el paso del tiempo la NOSmit puede verse afectada, lo cual se reflejaría como una disminución en la síntesis de $\cdot\text{NO}$.

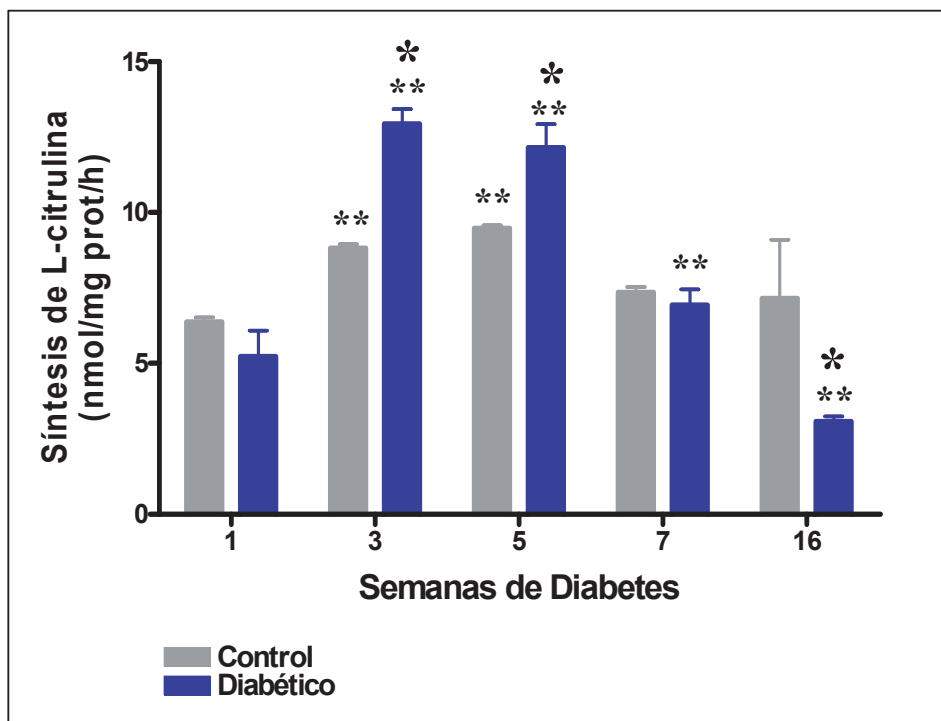


Figura 16. Efecto de la diabetes sobre la síntesis de L-citrulina en mitocondrias de cerebro de rata. Los resultados son la media \pm EE de $n=3-4$ mediciones. * $P<0.01$ con respecto al control del mismo tratamiento, ** $P<0.01$ con respecto al control de 1 semana. Control 1 semana: 6.38 ± 0.14 nmol/mg proteína/hora.

7.4 Efecto de la diabetes sobre la oxidación de lípidos

Los lípidos que componen las membranas mitocondriales son un blanco de peroxidación por ERO, por lo tanto, determinamos los niveles de lipoperoxidación con objeto de evaluar la presencia de estas ERO. Se midieron los niveles de lipoperoxidación en mitocondrias aisladas de cerebro de ratas de

los grupos control y diabético, de 1, 3, 5, 7 y 16 semanas de diabetes, por el procedimiento descrito en materiales y métodos.

La tendencia en los niveles de lipoperoxidación fue parecida en ambos grupos (control y diabético), sin embargo hubo efectos que parecen estar más pronunciados en la condición diabética. En la figura 17 podemos observar los resultados que muestran la tendencia a disminuir de los niveles de lipoperoxidación, siendo este cambio significativo ($p < 0.05$) en el grupo diabético a las 5 semanas donde obtenemos un nivel de 5.45 ± 0.70 nmol/mg proteína y 5.25 ± 0.29 nmol/mg proteína a las 16 semanas. Aunque en el grupo control se observó la misma tendencia a disminuir en los niveles de lipoperoxidación, los cambios no alcanzaron a ser significativos sino hasta las 16 semanas ($p < 0.05$), en este caso los valores fueron de 6.64 ± 0.29 nmol/mg proteína a las 5 semanas y 4.80 ± 0.30 nmol/mg proteína a las 16 semanas. Los resultados sugieren que las ERO, responsables de la lipoperoxidación, están siendo consumidas por otras vías (posiblemente reaccionando con otras especies reactivas) y no están disponibles para causar lipoperoxidación.

7.5 Efecto de la diabetes sobre el contenido de glutatión total

El glutatión es un antioxidante que tiene gran movilización dentro del organismo, dependiendo de los cambios, normales o patológicos, la concentración de este antioxidante se modifica rápidamente en respuesta a la condición que se presente [56]. Se realizaron determinaciones del contenido de glutatión total como indicador del estado antioxidante dentro de la célula en

mitocondrias de cerebro de rata (grupo control y diabético) de 1, 3, 5, 7 y 16 semanas de diabetes, mediante el procedimiento descrito en el apartado de materiales y métodos.

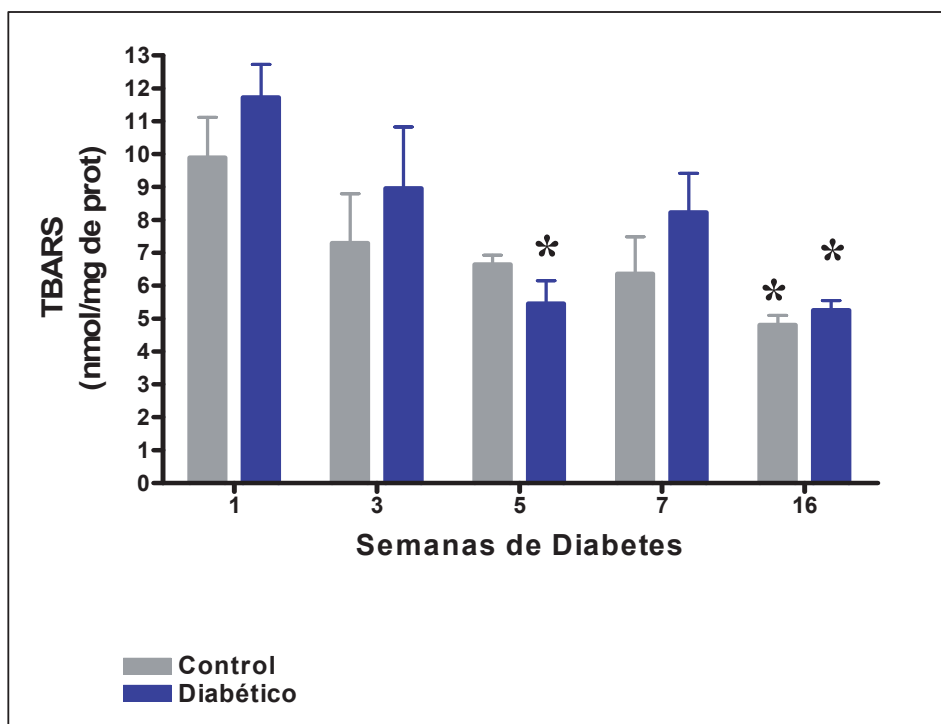


Figura 17. Efecto de la diabetes sobre los niveles de lipoperoxidación (TBARS) en mitocondrias de cerebro de rata. Los valores son la media \pm EE de n=3-7 determinaciones. *P<0.05 con respecto al control de 1 semana. Control de 1 semana: 9.89 ± 1.23 nmol/mg proteína.

Los resultados obtenidos de la cuantificación de glutatión total se muestran en la figura 18, donde se puede observar que ambos grupos (control y diabético) mantuvieron la misma tendencia, pero los efectos continuaron siendo más acentuados en el grupo diabético. Los datos muestran una tendencia a aumentar la concentración de glutatión total a las 3, 5 y 16 semanas en el grupo

diabético siendo los valores de 20.12 ± 3.62 nmol/ml, 26.34 ± 6.56 nmol/ml y 18.69 ± 1.56 nmol/ml, respectivamente. Como se mencionó, aunque la tendencia en ambos grupos de aumentar el contenido de glutatión total es semejante, en el grupo control este aumento sólo fue significativo ($p < 0.05$) hasta transcurridas 16 semanas, siendo el valor alcanzado de 14.95 ± 1.81 nmol/ml. Estos resultados sugieren que durante las primeras semanas de diabetes se presenta una respuesta para contrarrestar el posible estrés oxidativo presente aumentando el contenido de glutatión, pero con el paso de las semanas el daño continúa sin poder ser controlado.

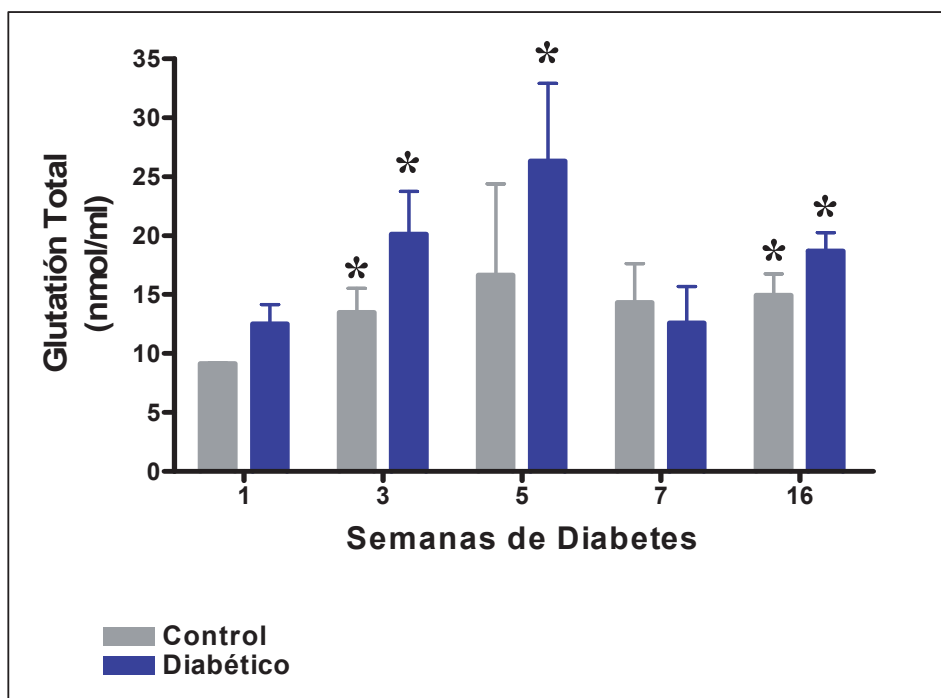
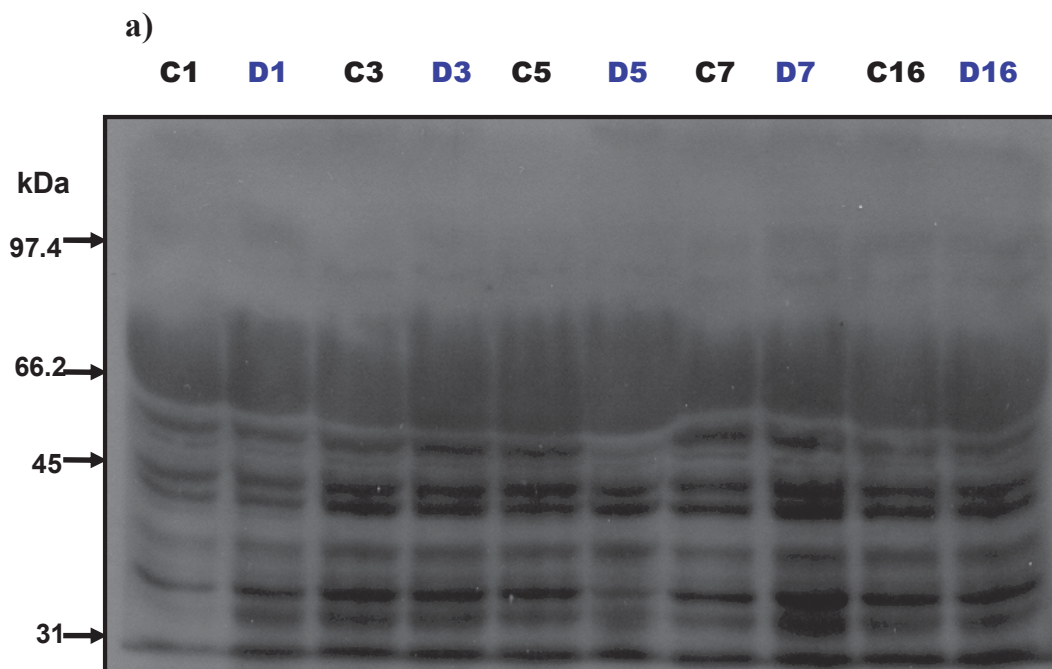


Figura 18. Efecto de la diabetes sobre el contenido de glutatión total en mitocondrias de cerebro de rata. Los valores son la media \pm EE de $n=4-8$ determinaciones. * $P < 0.05$ con respecto al control de 1 semana. Control de 1 semana: 9.15 ± 0.08 nmol/ml.

7.6 Efecto de la diabetes sobre el perfil de nitrosilación

Con el objeto de saber si las dos especies reactivas que originan al ONOO^- ($\text{O}_2^{\cdot-}$ y $\cdot\text{NO}$) estaban presentes en elevadas cantidades, llevamos a cabo la cuantificación de proteínas nitrosiladas por medio de la detección de 3-nitrotirosinas en mitocondrias de cerebro de ratas (grupo control y diabético) de 1, 3, 5, 7 y 16 semanas posteriores a la inducción de diabetes. En la figura 19a se muestra una autorradiografía representativa del perfil de nitrosilación de proteínas, mientras que en la figura 19b se presenta su correspondiente análisis densitométrico.



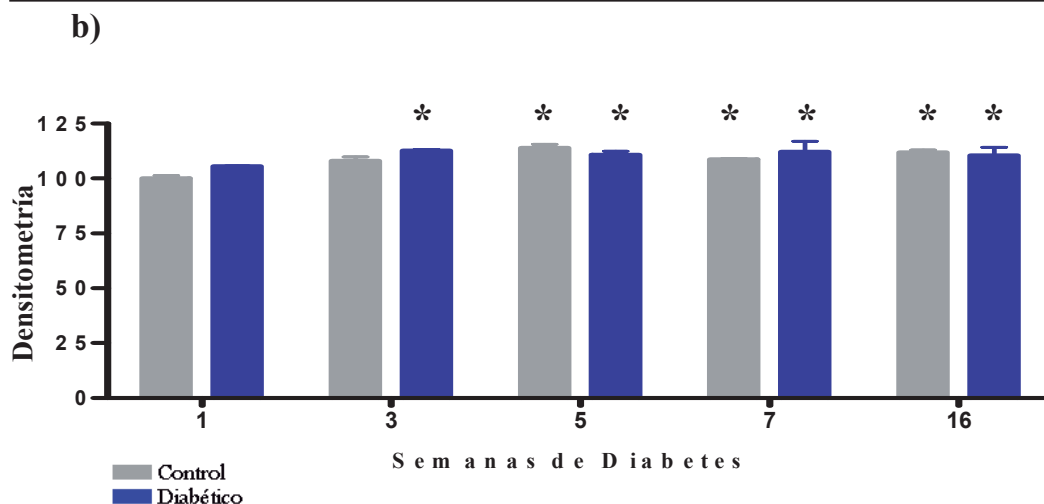


Figura 19. a) Perfil de nitrosilación por ONOO⁻. Se empleó el anticuerpo policlonal anti-3-nitrotirosina (3-NT) como se describe en materiales y métodos. Carriles: C1, control 1 semana; D1, diabético 1 semana; C3, control 3 semanas; D3, diabético 3 semanas; C5, control 5 semanas; D5, diabético 5 semanas; C7: control 7 semanas; D7, diabético 7 semanas; C16, control 16 semanas y D16, diabético 16 semanas. Las flechas a la izquierda indican el peso molecular aproximado en las bandas. **b) Análisis por densitometría**, el control de 1 semana tiene un valor de 100%, n=4 experimentos. *P<0.05 respecto al control de 1 semana.

Los resultados indican que no hay diferencias marcadas entre ambos grupos (control y diabético) ya que aunque los datos arrojan un aumento en los niveles de proteínas nitrosiladas, esto ocurre en ambos grupos. La diferencia es que este aumento en la cantidad de nitrotirosinas está presente desde las 3 semanas en el grupo diabético y en el grupo control hasta las 5 semanas.

En la figura 20 se muestra otra autoradiografía del perfil de proteínas nitrosiladas, a diferencia de la figura 19, en esta es posible observar bandas correspondientes a proteínas con un peso molecular superior a 70 kDa, posiblemente debido a una mejor transferencia de las proteínas durante la realización de la técnica.

Se ha documentado que varias proteínas son el blanco de ataque del peroxinitrito, entre ellas encontramos la aconitasa, dos subunidades del complejo II de la cadena transportadora de electrones y la MnSOD, basándonos en el peso molecular de estas proteínas y en los marcadores de peso molecular empleados durante la técnica, mostramos la posible ubicación de estas proteínas (Fig. 20).

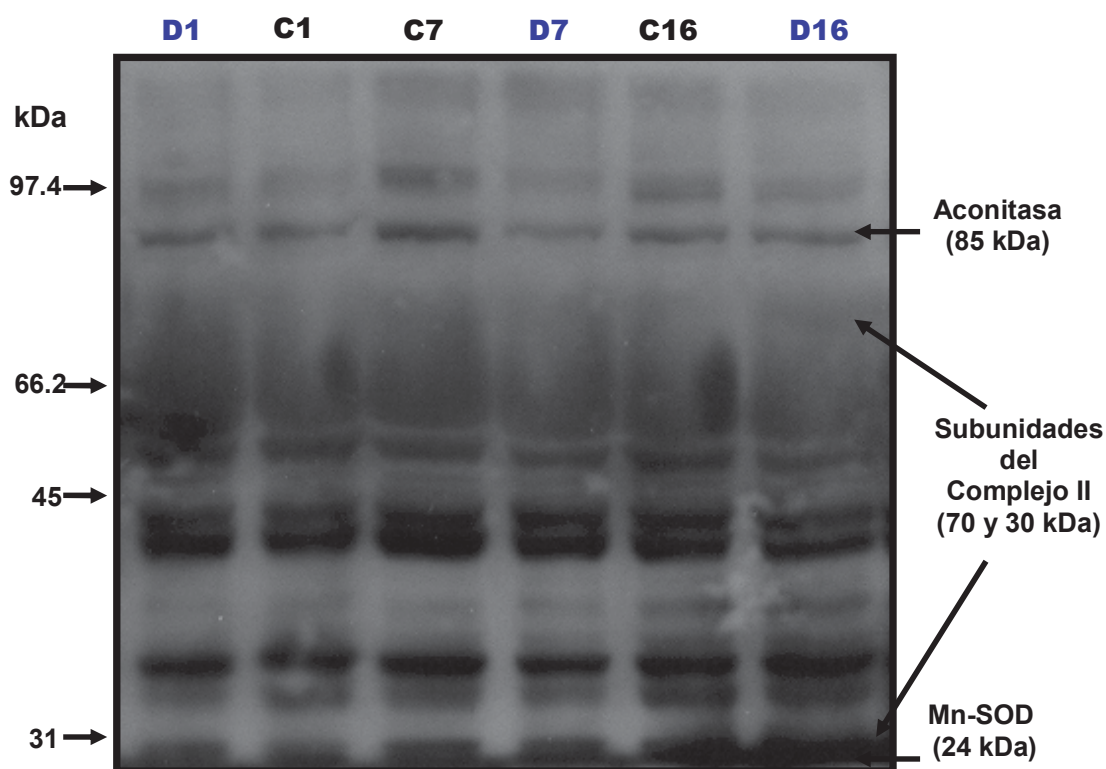


Fig. 20. Perfil de nitrosilación por ONOO^- , el cual fue realizado empleado el anticuerpo policlonal anti-3-nitrotirosina (3-NT) como se describe en materiales y métodos. Las flechas a la izquierda indican el peso molecular aproximado en las bandas. La flechas a la derecha indican la posible ubicación de proteínas blanco de nitrosilación. Carriles: C1, control 1 semana; D1, diabético 1 semana; C7: control 7 semanas; D7, diabético 7 semanas; C16, control 16 semanas y D16, diabético 16 semanas.

7.7 Efecto de la diabetes sobre la actividad y contenido de proteína aconitasa

Siendo la aconitasa una de las enzimas más susceptibles al daño por estrés oxidativo, se midió su actividad como un indicador de estrés, en mitocondrias de cerebro de rata (grupos control y diabético) de 1, 3 5, 7 y 16 semanas de diabetes siguiendo la metodología descrita en materiales y métodos. Se obtuvieron los resultados que se muestran en la figura 21. La actividad de la aconitasa en ratas diabéticas resultó significativamente aumentada desde la primera semana ($13.18 \pm 0.96 \mu\text{mol NADPH/mg proteína/min}$ vs. el control, $4.18 \pm 0.32 \mu\text{mol NADPH/mg proteína/min}$, $p < 0.01$). Este aumento continuó hasta las 5 semanas ($32.48 \pm 18.01 \mu\text{mol NADPH/mg proteína/min}$), posteriormente la actividad de la aconitasa disminuyó a las 7 semanas a $5.47 \pm 0.96 \mu\text{mol NADPH/mg proteína/min}$ y a las 16 semanas a tan solo $2.25 \pm 0.32 \mu\text{mol NADPH/mg proteína/min}$, a este tiempo la actividad de la enzima estaba por debajo del valor registrado inicialmente, incluso por debajo del valor del control al iniciar el tratamiento ($p < 0.05$), esto apuntaría a que todo el ciclo del ácido cítrico, así como la producción de intermediarios podría estar alterada, repercutiendo en el metabolismo total del organismo.

En cuanto al grupo control, la actividad de aconitasa se mantuvo sin variaciones significantes durante las semanas analizadas, los valores obtenidos fueron de $4.18 \pm 0.32 \mu\text{mol NADPH/mg proteína/min}$ para 1 semana y de $3.86 \pm 0.64 \mu\text{mol NADPH/mg proteína/min}$ a las 16 semanas.

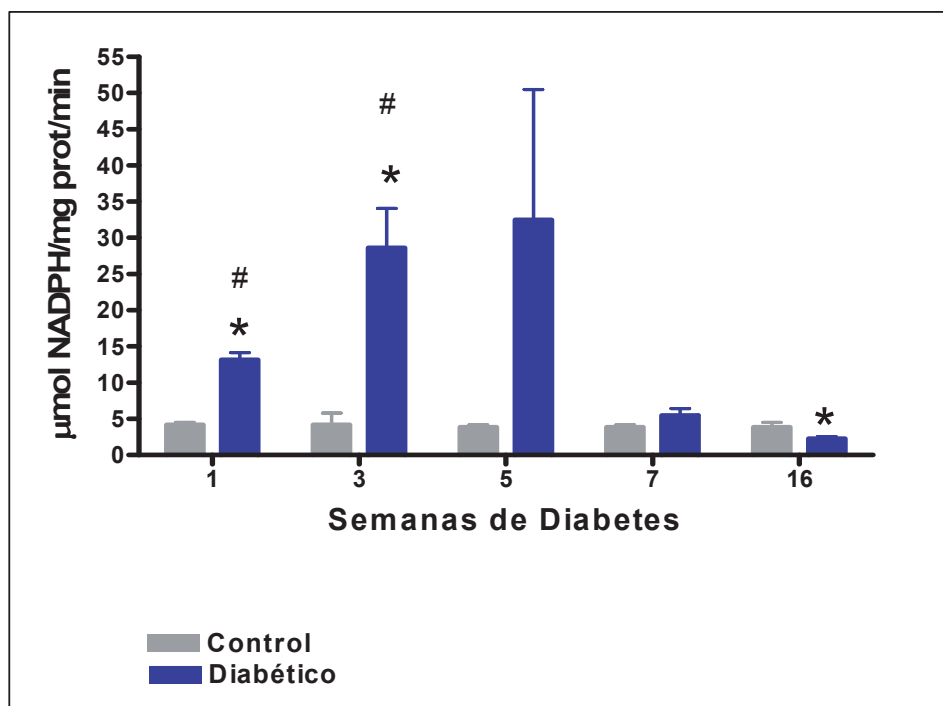


Figura 21. Efecto de la diabetes sobre la actividad de la aconitasa en mitocondrias de cerebro de rata. * $P < 0.05$ respecto al control 1 semana, # $P < 0.01$ respecto al control misma edad. $n = 3-4$. Control de 1 semana: 4.18 ± 0.32 $\mu\text{mol NADPH/mg prote\u00edna/min}$.

Para corroborar que las variaciones en actividad de aconitasa obtenidas en los experimentos eran resultado de modificaciones a la actividad y no debidas al aumento o disminuci\u00f3n de la cantidad de prote\u00edna, realizamos un an\u00e1lisis tipo Western blot empleando el anticuerpo anti-acnitasa mitocondrial. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 22a, donde se observa la banda proteica de nuestro inter\u00e9s, se obtuvieron niveles de prote\u00edna aproximadamente constantes en todas las determinaciones realizadas, tanto para el grupo control como para el grupo diab\u00e9tico en todas las semanas analizadas (1, 3, 5, 7 y 16 semanas de diabetes). Las variaciones aparentes en el nivel de prote\u00edna,

pueden deberse a fallas en el separación de las proteínas durante la electroforesis ó a la inespecificidad del anticuerpo empleado para la determinación, para esto, la realización del análisis densitométrico (Fig. 22b) de la banda de interés resultó de gran ayuda, ya que indica que no hay variaciones significativas entre las bandas proteicas.

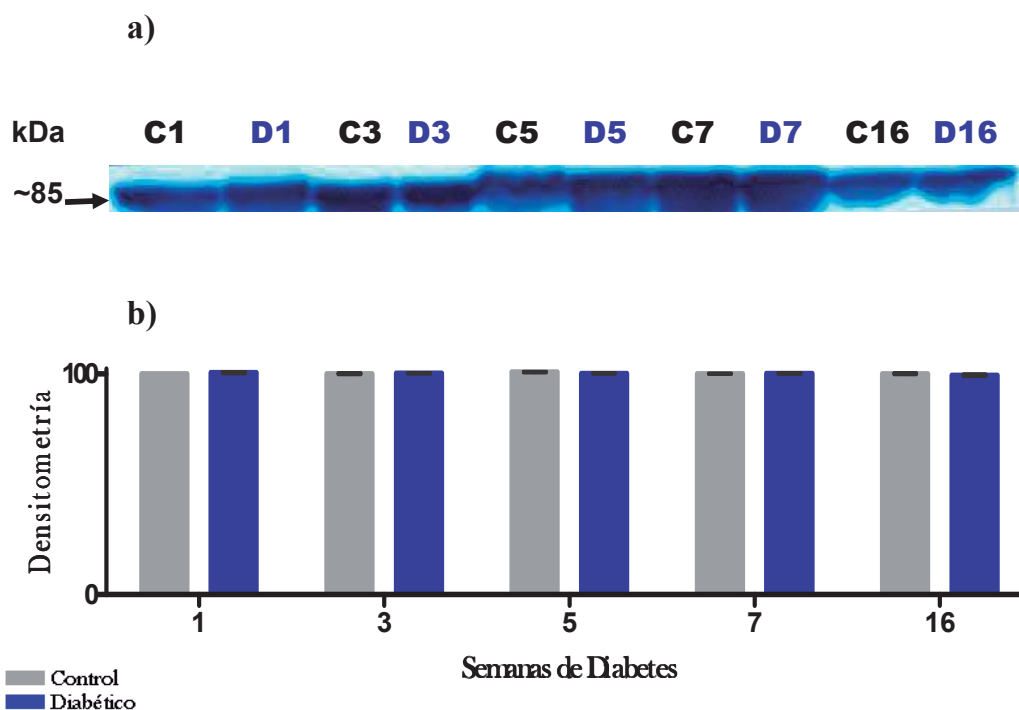


Figura 22. a) Western blot representativo que muestra los niveles de la aconitasa. Se empleó el anticuerpo policlonal anti-aconitasa mitocondrial como se describe en materiales y métodos. Carriles: C1, control 1 semana; D1, diabético 1 semana; C3, control 3 semanas; D3, diabético 3 semanas; C5, control 5 semanas; D5, diabético 5 semanas; C7: control 7 semanas; D7, diabético 7 semanas; C16, control 16 semanas y D16, diabético 16 semanas. **b) Análisis densitométrico**, el control de 1 semana tiene un valor de 100%, n=6 experimentos.

8. DISCUSIÓN

A la fecha la DM se ha convertido en una epidemia que amenaza con destruir la calidad de vida de la población mundial. Cada vez es más frecuente encontrarnos con casos de diabetes en el círculo de personas dentro del cual nos desenvolvemos, y aunque la cantidad de información para retardar la aparición de esta enfermedad ha aumentado notablemente, continúa siendo insuficiente y poco efectiva, ya que las cifras de personas que han desarrollado la enfermedad y que fallecen por esa causa se incrementa día a día sin que pueda hacerse algo efectivo.

El deterioro del cerebro es una de las complicaciones de la DM que se han quedado rezagadas en cuanto a investigación, posiblemente porque el desarrollo de las demás complicaciones es más evidente (como la nefropatía y retinopatía diabéticas), pero no debemos minimizar las consecuencias de un posible daño al cerebro, teniendo en cuenta que es el responsable de nuestras funciones cotidianas como caminar, hablar, pensar, recordar, entre otras, y que el daño en alguna área del cerebro puede afectar nuestra calidad de vida.

La hiperglucemia crónica presente durante el desarrollo de la DM ha sido ampliamente reconocida como la causante de las múltiples complicaciones de este padecimiento [39]. Una de las relaciones que más atrae la atención dentro del contexto de la diabetes es la que existe entre la hiperglucemia crónica y el estrés oxidativo. Se ha sugerido que la hiperglucemia puede causar aumento en la producción de especies reactivas y ser posiblemente éstas las responsables del daño observado en la DM [14]. El deterioro de la función mitocondrial está

intrínsecamente relacionado con la DM [39], posiblemente debido a que es el principal sitio de generación de especies reactivas dentro de la célula y a que, como se mencionó, parece ser que las especies reactivas son las responsables de desencadenar las complicaciones en la DM.

La mayoría de los reportes existentes sobre la presencia de estrés oxidativo durante la DM no analizan ambas, especies reactivas de oxígeno y especies reactivas de nitrógeno, y dichos reportes se han limitado a un análisis en un tiempo muy corto de diabetes [14]. Lo anterior, por lo tanto, justifica el estudio del estrés oxidativo y nitrosativo durante un periodo prolongado de la DM.

Para la realización de los experimentos era necesario contar con un modelo de diabetes experimental en rata. Los registros realizados del nivel de glucosa en sangre y del peso de las ratas confirmaron el haber obtenido y trabajado con un modelo de diabetes experimental adecuado (Figs.14 y 15). La hiperglucemia (característica de la diabetes) se mantuvo durante las semanas analizadas y la disminución en la ganancia de peso observada en los animales diabéticos concuerda con las características de animales con diabetes experimental [14, 57].

Los resultados obtenidos en este trabajo describen la presencia de estrés oxidativo y nitrosativo en mitocondrias de cerebro durante la diabetes. Comenzaremos describiendo la presencia de estrés nitrosativo.

Los resultados obtenidos en la síntesis de citrulina (representativo de la síntesis de $\cdot\text{NO}$) muestran variaciones durante las semanas analizadas (1, 3, 5, 7

y 16), aunque las variaciones son similares en las ratas control y diabéticas, los cambios son más acentuados en las diabéticas. Hubo un aumento en la síntesis de citrulina a las 3 y 5 semanas, el cual puede deberse a una respuesta para regular la velocidad de transporte de electrones y el consumo de oxígeno, por parte de la cadena transportadora de electrones (CTE). Esto debido a que el NO se une de manera reversible al complejo IV en el sitio de unión del O₂, esto en respuesta a la elevada oxidación de glucosa (debido a la hiperglucemia crónica) que a su vez da lugar a una gran formación de NADH y FADH que pasan a la CTE [36].

A las 7 semanas de diabetes, la síntesis de citrulina desciende al nivel inicial y a las 16 semanas la síntesis se ve disminuida significativamente (Fig. 16), esto se puede deber a especies reactivas que fueron producidas durante las primeras semanas e inactivaron a la enzima encargada de su síntesis, la NOSmit, pero hacen falta más determinaciones para asegurar este suceso, como medir el ARNm o la cantidad de proteína de esta enzima.

Conociendo que el cerebro puede ser especialmente vulnerable a las especies reactivas, debido a que es rico en ácidos grasos insaturados (los blancos de la lipoperoxidación), realizamos determinaciones de lipoperoxidación en mitocondrias de cerebro de ratas de 1, 3, 5, 7 y 16 semanas de diabetes y en los respectivos controles.

Aunque el grado de insaturación de los lípidos que componen las membranas mitocondriales se ha correlacionado con su susceptibilidad a la lipoperoxidación, la ausencia de detección de mayores niveles de

lipoperoxidación puede ser debida no a la ausencia de estrés oxidativo, sino a que el daño oxidativo puede presentarse de manera preferencial en otras biomoléculas como proteínas o ácidos nucleicos [79].

Los resultados mostraron un comportamiento similar en ambos grupos (control y diabético), con variaciones que continúan siendo más marcadas en el grupo diabético (Fig. 16). Podemos observar la tendencia a disminuir el nivel de lipoperoxidación, siendo el cambio significativo a las 5 y 16 semanas. Esto puede ser debido a que las especies reactivas de oxígeno reaccionen y dañen otras biomoléculas como proteínas. También podrían reaccionar con especies reactivas de nitrógeno, lo cual concuerda con que a las 3 y 5 semanas la producción de $\cdot\text{NO}$ resultó elevada (Fig. 16), como sería el caso de la reacción del $\text{O}_2\cdot^-$ con el $\cdot\text{NO}$ para formar el ONOO^- , dando lugar a nuevas especies reactivas como $\cdot\text{NO}_2$, N_2O_4 , ONOOH [53, 77]. Cualquiera de las dos situaciones resulta nociva para el funcionamiento mitocondrial. En cuanto al grupo control, aunque presentó variaciones en los niveles de lipoperoxidación desde las primeras semanas de diabetes, la disminución fue significativa hasta después de haber transcurrido 16 semanas, por lo que podemos ver que las alteraciones, tal vez propias de la edad, comienzan tiempo antes en las ratas diabéticas.

Otra explicación que consideramos posible para los niveles bajos de lipoperoxidación observados en las mitocondrias de cerebro de las ratas diabéticas, fue que el sistema antioxidante respondió ante el incremento de especies reactivas en la mitocondria (originadas posiblemente al actuar el $\cdot\text{NO}$ como inhibidor en la CTE), evitando que tuviera lugar la lipoperoxidación.

Sabiendo que el glutatión es uno de los principales antioxidantes, realizamos las determinaciones de glutatión total (GSH_T) contenido en las mitocondrias de cerebro de ratas de 1, 3, 5, 7 y 16 semanas. Los resultados mostraron una tendencia a aumentar el contenido de GSH_T que fue significativo a las semanas 3, 5 y 16 en el grupo diabético (Fig. 18), lo que podría influir sobre los bajos niveles de lipoperoxidación observados en estas semanas. Por lo tanto, es posible que, ante la presencia de estrés oxidativo, se dé una respuesta de defensa por parte de la mitocondria aumentando el contenido de glutatión. Sin embargo no podemos asegurar que predomine un estado reducido dentro de la mitocondria, para eso sería necesario hacer determinaciones de glutatión reducido y la relación con el glutatión oxidado (GSH/GSSG).

La primera explicación planteada sobre los bajos niveles de lipoperoxidación obtenidos consistió en la probable reacción entre $\text{O}_2^{\cdot-}$ y el $\cdot\text{NO}$ para formar el $\text{ONOO}^{\cdot-}$; para ello, analizamos las proteínas nitrosiladas por $\text{ONOO}^{\cdot-}$, técnica que se usa frecuentemente para cuantificar el estrés nitrosativo y como marcador de enfermedad [52]. En la mitocondria, el dióxido de carbono, las metaloproteínas (como Mn-SOD y aconitasa) y los tioles (como el glutatión) son los blancos de reacción preferenciales del peroxinitrito [50]. Los resultados obtenidos de la cuantificación de 3-nitrotirosinas en mitocondrias de cerebro de ratas de 1, 3, 5, 7 y 16 semanas, con los respectivos controles, mostraron un aumento en la nitrosilación en ambos grupos (Fig. 19a). Este aumento se presentó a las 3 semanas en las ratas diabéticas y más tarde en el grupo control (a las 5 semanas). Aunque no continuó aumentado la nitrosilación en las

semanas siguientes, el hecho de que se observe el cambio primero en el grupo diabético, nos señala la posible presencia de más especies reactivas de nitrógeno en la diabetes. En la Fig. 20 se muestran algunos de los blancos de nitrosilación por peroxinitrito, son proteínas conocidas por ser las primeras en dañarse ante el estrés oxidativo, la aconitasa por su centro formado por Fe-S, fácilmente inactivado por especies reactivas, también la Mn-SOD puede dañarse por estrés oxidativo provocando que el daño sea mayor al no poder realizar su función detoxificante.

Con frecuencia se emplea a la aconitasa como indicador de daño por estrés oxidativo debida a su susceptibilidad, por lo cual medimos su actividad en mitocondrias de cerebro de ratas diabéticas de 1, 3, 5, 7 y 16 semanas con los respectivos controles. Los resultados obtenidos mostraron un considerable aumento en la actividad de la aconitasa durante las primeras semanas (Fig. 21), lo que puede ser explicado como resultado del metabolismo acelerado a consecuencia de la elevada concentración de glucosa en sangre presente que llega al cerebro, ya que en él, la entrada de glucosa a las células es por difusión facilitada, entre más concentración de glucosa haya en el exterior más entrará a la célula, dando como consecuencia eventos como los mencionados. Otra variación observada en la aconitasa fue la disminución en la actividad a las 16 semanas de diabetes. Esto al igual que con la NOSmit, puede ser debido a que la enzima es afectada por las especies reactivas producidas durante la diabetes. Para asegurar que los cambios en actividad de la enzima fueran el resultado de modificaciones provocadas por las especies reactivas, determinamos la cantidad

de proteína aconitasa en las mitocondrias de cerebro de ratas de los grupos control y diabético de 1, 3, 5, 7 y 16 semanas (Fig. 22). Los resultados mostraron un nivel de proteína constante para todas las muestras analizadas, por lo tanto, no hay cambios en la cantidad de la proteína aconitasa que sean los responsables de las modificaciones en actividad observados en ratas diabéticas; cabe señalar que la actividad aconitasa del grupo control tampoco mostró cambios durante las semanas analizadas (Fig. 22).

De manera general podemos decir que en todos los parámetros analizados, las tendencias de animales control y diabéticos fueron similares, sin embargo, las variaciones fueron más pronunciadas en el grupo diabético. Esta situación concuerda con la descripción empleada para describir los síntomas presentes en un cerebro diabético: *...presenta muchos síntomas que son mejor descritos como un “envejecimiento acelerado del cerebro”* [21].

Para tratar de explicar los eventos que tienen lugar durante la diabetes, se muestra el esquema simplificado de una mitocondria y algunos de los procesos y proteínas de interés, la posible explicación a los resultados obtenidos durante las primeras 5 semanas de diabetes se ilustra en la figura 23. La característica principal de la diabetes es la hiperglucemia, por lo tanto, habrá una elevada oxidación de glucosa a través de la glucólisis **(a)** y el ciclo del ácido cítrico **(b)**, estos procesos aumentarán la cantidad equivalentes reductores en estado reducido: NADH y FADH, los cuales pasarán sus electrones a la CTE **(c)**, por lo tanto habrá un gran paso de electrones a la CTE. En respuesta al elevado paso de electrones a la CTE y a la elevada actividad de los complejos, se sintetizará

más $\cdot\text{NO}$ (d), esto para regular la actividad de la CTE, ya que el $\cdot\text{NO}$ regula el consumo de O_2 en la CTE. Esta acción traerá como consecuencia la acumulación de electrones río arriba de la CTE que fácilmente podrán reaccionar con el oxígeno circundante dando lugar a la formación de $\text{O}_2^{\cdot-}$ (e), lo cual aumentará el estrés oxidativo.

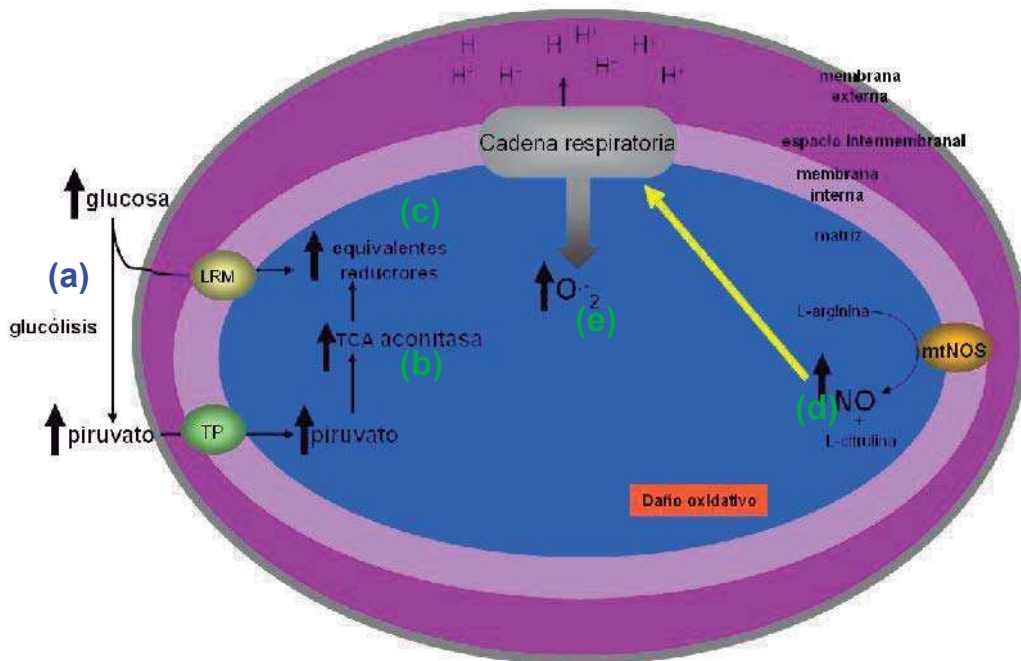


Figura 23. Mecanismo propuesto de daño oxidativo mitocondrial en diabetes. Sucesos representativos de las primeras 5 semanas de diabetes.

A las 7 semanas ocurren cambios en los parámetros medidos que conducen a que estos se restablezcan a niveles cercanos a los observados en la primera semana de diabetes. Esto ocurrió para el $\cdot\text{NO}$, la lipoperoxidación y el glutatión; posiblemente porque se dio una respuesta metabólica (aumento de

antioxidantes (f) de los animales diabéticos para contrarrestar el estrés oxidativo que se hizo evidente hasta las 7 semanas (Fig. 24).

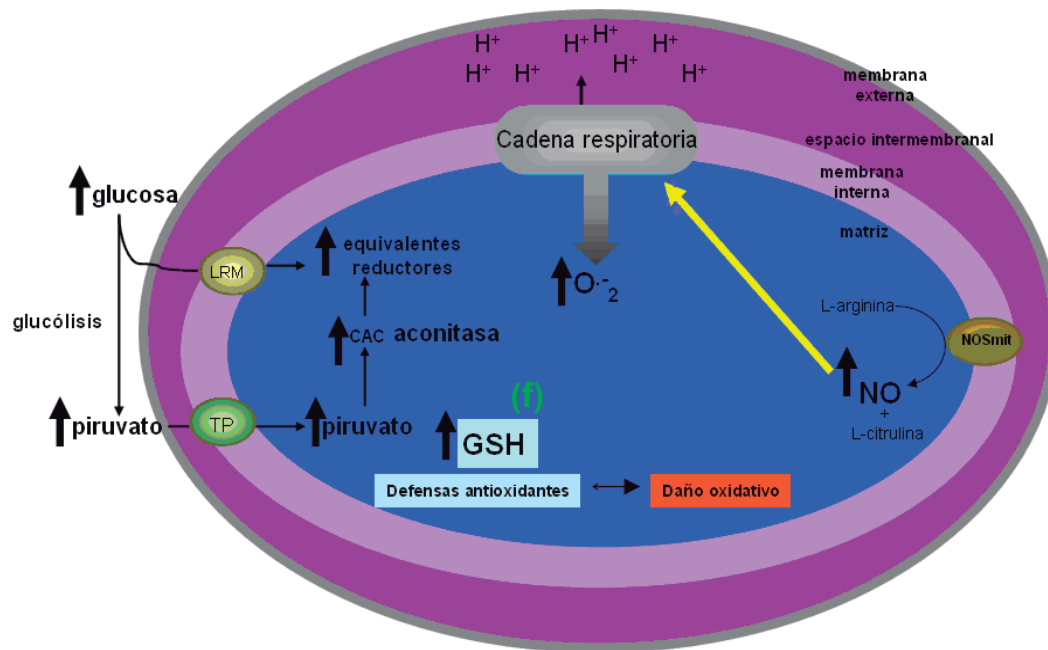


Figura 24. Mecanismo propuesto de daño oxidativo mitocondrial en diabetes. Sucesos representativos de las 7 semanas de diabetes.

Hay que resaltar que durante este periodo la mortalidad de las ratas fue elevada (50%), por lo tanto, los experimentos a las 16 semanas fueron realizados con ratas que lograron sobrevivir a pesar de las complicaciones que ya eran evidentes.

Aunque las ratas analizadas a las 16 semanas fueron un subgrupo que resistió más al padecimiento, son representativas del curso que tiene esta enfermedad (para cualquier enfermedad siempre habrá individuos más susceptibles y otros más resistentes que el promedio), y el daño observado en

los parámetros medidos hace evidente que la condición empeora, sugerimos un daño a la NOSmit (**g**) por parte del estrés oxidativo, así como de la aconitasa (**h**) y a la misma CTE (**i**), haciendo que produzca mayor cantidad de radicales libres, prevaleciendo el estrés oxidativo (Fig. 25).

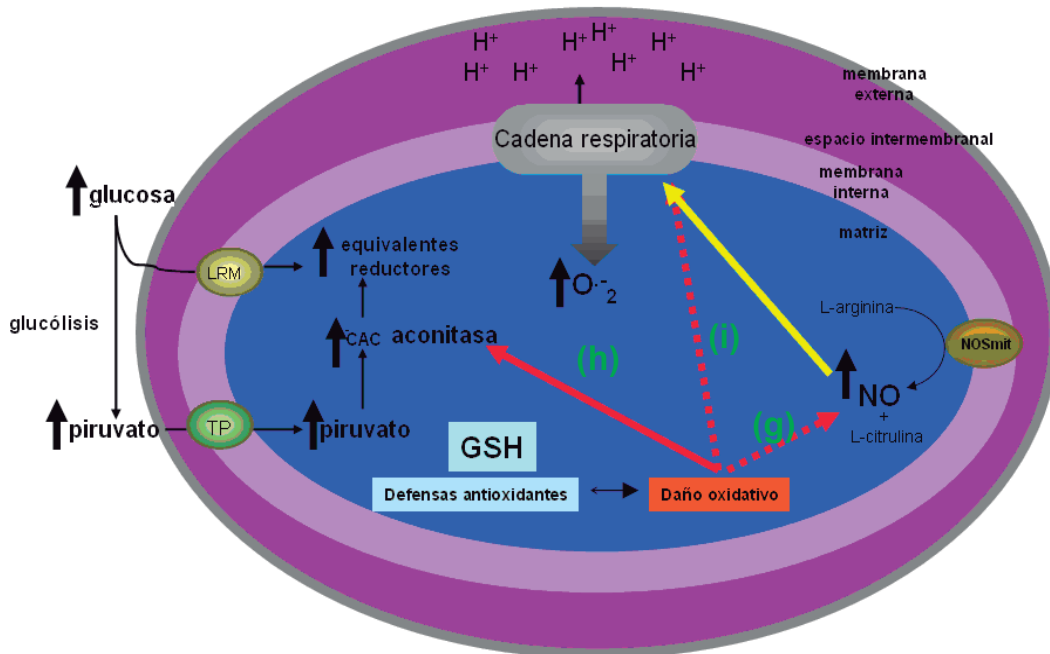


Figura 25. Mecanismo propuesto de daño oxidativo mitocondrial en diabetes. Sucesos representativos de las 16 semanas de diabetes.

9. RESUMEN DE RESULTADOS

- ❖ En animales diabéticos hubo una elevación de $\cdot\text{NO}$ durante las primeras 5 semanas, y una disminución posterior en las mitocondrias del cerebro.
- ❖ La lipoperoxidación (TBARS) disminuyó conforme avanzó el tiempo en el grupo diabético hasta la semana 5, después regresó a valores iniciales.
- ❖ Los niveles de glutatión total mostraron un aumento que se mantuvo hasta las 5 semanas, seguido de una disminución a partir de la semana 7.
- ❖ El perfil de nitrosilación de proteínas fue similar en ratas control y diabéticas. Hubo un aumento a partir de la tercera semana en ratas diabéticas y a partir de la quinta en los controles.
- ❖ La actividad de la aconitasa durante las primeras 5 semanas aumentó, a partir de la semana 7 disminuyó en el grupo diabético.
- ❖ Los niveles de la aconitasa permanecieron constantes en los dos grupos.

10. CONCLUSIÓN

La diabetes favorece el estrés oxidativo más que el nitrosativo; si el estrés oxidativo persiste, aumenta el daño en las mitocondrias de cerebro.

11. PERSPECTIVAS

- Analizar el perfil de proteínas oxidadas en mitocondrias de cerebro de ratas diabéticas; *ya que el perfil de proteínas nitrosiladas no tuvo mayores variaciones entre grupos, diabético y control, es probable que el daño en la DM sea debido más a proteínas oxidadas que nitrosiladas.*
- Analizar otras defensas antioxidantes en mitocondrias de cerebro como la Mn-SOD y la catalasa durante hiperglucemia; *tomando en cuenta que el cerebro es de los órganos con menos defensas antioxidantes, conviene saber si estos sistemas detoxificantes están siendo afectados para poder prevenir el daño.*
- Medir actividad de las enzimas del ciclo del ácido cítrico en mitocondrias de cerebro de ratas diabéticas; *debido a las variaciones observadas en la actividad de la aconitasa durante la DM, es conveniente saber si otras enzimas en la ruta presentan alteraciones en su actividad e influyeron en los cambios observados en las mediciones de actividad de la aconitasa.*
- Medir el contenido de ácidos grasos en mitocondrias de cerebro durante la diabetes; *para descartar que las variaciones en los niveles de lipoperoxidación observados se deban a cambios en el contenido de ácidos grasos.*

12. BIBLIOGRAFÍA

1. World Health Organization. 1980. Expert Committee on Diabetes Mellitus. Second Report. Geneva: WHO. *Technical Report Series* **646**.
2. National Diabetes Data Group. 1979. Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. *Diabetes* **28**, 1039-1057.
3. Manschot, S.M. 2006. Diabetic encephalopathy: a cerebrovascular disorder? Edit. Utrecht University.
4. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. 1993. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med.* **329**, 977-986.
5. Cotran, R.S., Kumar, V. y Collins, T. 2000. Patología estructural y funcional. Robbins. 6ª edición. Edit. McGraw-Hill Interamericana. Colombia. Capítulo 20.
6. Haffner, S.M. 2002. Type 2 diabetes: Unravelling its causes and consequences: a compendium of classical papers. Cambridge: Medical Publications.
7. NHM-DIA. Diabetes estimates 1995-2025. 2001. Ginebra, Suiza: World Health Organization.
8. Olaiz G., Rojas R., Barquera S., Shamah T., Aguilar C. y Cravioto P. 2003. Encuesta Nacional de Salud 2000. Tomo 2. La salud de los adultos. Cuernavaca, Morelos, México: Instituto Nacional de Salud Pública.

9. Barquera S., Tovar-Guzmán V., Campos-Nonato I., González-Villalpando C. y Rivera-Dommarco J. 2003. Geography of diabetes mellitus mortality in Mexico: an epidemiologic transition analysis. *Arch Med Res.* **34**(5), 407-14.
10. Rivera-Dommarco J., Barquera S., Campirano F., Campos I., Safdie M. y Tovar V. 2002. The epidemiological and nutritional transition in Mexico: rapid increase of non-communicable chronic diseases and obesity. *Public Health Nutr.* **5**(1A), 113-122.
11. Página web de la Federación Mexicana de Diabetes, A.C. http://www.fmdiabetes.com/v2/paginas/d_numeros.php.
12. Rubio, J.A. y Álvarez, J. 1998. Costes económicos de la diabetes mellitus: revisión crítica y valoración coste-eficacia de las estrategias propuestas para su reducción. *Aten Primaria.* **22**, 239-258.
13. Salud: México 2003. Información para la rendición de cuentas. Página web: <http://www.salud.gob.mx/unidades/evaluacion/saludmex2003/sm2003.htm>.
14. Mastrocola, R., Restivo, F., Vercellinatto, I., Danni, O., Brignardello, E., Aragno, M. y Boccuzzi, G. 2005. Oxidative and nitrosative stress in brain mitochondria of diabetic rats. *J. Endocrinol.* **187**, 37-44.
15. Pirart, J. 1978. Diabetes mellitus and its degenerative complications: a prospective study of 4,400 patients observed between 1947 and 1973. (Pt 1). *Diabetes Care* **1**, 168-188.
16. Biessels, G.J., Kappelle, A.C., Bravenboer, B., Erkelens, D.W. y Gispen, W.H. 1994. Cerebral function in diabetes mellitus. *Diabetologia* **37**, 643-650.

17. Stewart, R. y Liolitsa, D. 1999. Type 2 diabetes mellitus, cognitive impairment and dementia. *Diabet. Med.* **16**, 93-112.
18. Reske-Nielsen, E., Lundbaek, K. y Rafaelsen, O.J. 1965. Pathological changes in the central and peripheral nervous system of young long term diabetics. *Diabetologia* **1**, 233–241.
19. Musen, G., Lyoo, I.K. y Sparks, C.R. 2006. Effects of type 1 diabetes on gray matter density as measured by voxel-based morphometry. *Diabetes* **55**, 326–333.
20. Wessels, A. M., Simsek, S., Remijnse, P. L., Veltman, D.J., Biessels, G.J., Barkhof, F., Scheltens, P., Snoek, F.R., Heine, R.J. y Rombouts, S.A.R.B. 2006. Voxel-based morphometry demonstrates reduced grey matter density on brain MRI in patients with diabetic retinopathy. *Diabetologia* **49**(10), 2474-2480.
21. Biessels, G.J., Van der Heide, L.P., Kamal, A., Bleys, R.L.A.W y Gispen W.H. 2002. Ageing and diabetes: implications for brain function. *Eur. J. Pharmacol.* **441**, 1-14.
22. Brownlee, M. 2005. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes* **54**, 1615–1625.
23. Giardino, I., Fard, A. K., Hatchell, D. L. y Brownlee, M. 1998. Aminoguanidine inhibits reactive oxygen species formation, lipid peroxidation, and oxidant-induced apoptosis. *Diabetes* **47**, 1114-1120.
24. Giardino, I., Edelstein, D. y Brownlee, M. 1996. BCL-2 expression or antioxidants prevent hyperglycemia-induced formation of intracellular advanced glycation end products in bovine endothelial cells. *J. Clin. Invest.* **97**, 1422–1428.

25. Quiroz, G.F. 1997. Anatomía humana. 35ª edición. Edit. Porrúa México. Tomo II.
26. Guyton, A.C. y Hall, J. E. 1997. Tratado de fisiología médica. 9ª Edición. Edit. McGraw Hill Interamericana. México. Capítulos 45 y 60.
27. Página web: <http://www.claudiogutierrez.com/NuevoHumanismo/cerebro.gif>
28. Mathews, C.K. y Van Holde, K.E. 2001. Bioquímica. 2ª Edición. Edit. McGraw-Hill Interamericana. España. Capítulo 23.
29. Lehninger, A.L. 1995. Bioquímica. 2ª Edición. Edit. Omega. Barcelona. Capítulo 35.
30. Pelley, J. W. 2008. Elsevier's integrated biochemistry. 1ª Edición. Edit. Mosby Elsevier. China. Capítulos 6 y 7.
31. Díaz H., D.P. y Burgos H., L.C. 2002. ¿Cómo se transporta la glucosa a través de la membrana celular? *IATREIA*. **15**, 3.
32. Manolescu, A.R., Witkowska K., Kinnaird A., Cessford T. y Cheesman C. 2007. Facilitated hexose transporters: new perspectives on form and function. *Physiology* **22**, 234-240.
33. Loewy, A.G. y Siekevitz, P. 1983. Estructura y función celular. 2ª Edición. Edit. CECOSA. México. Capítulo 13.
34. Devlin, T.M. 2006. Biochemistry. 6ª Edición. Edit. Wiley-Liss. U.S.A. Capítulo 1 y 14.
35. Delaval, E., Perichon, M. y Friguet, B. 2004. Age-related impairment of mitochondrial matrix aconitase and ATP-stimulated protease in rat liver and heart. *Eur. J. Biochem.* **271**, 4559–4564.

36. Green, K., Brand, M.D. y Murphy, M.P. 2004. Prevention or mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. *Diabetes* **53**, S110-S118.
37. Raha, S., Robinson, B.H. 2000. Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. *Trends Biochem. Sci.* **25**, 502-508.
38. Duchen, M.R. 2004. Mitochondria in health and disease: perspectives on a new mitochondrial biology. *Molecular Aspects of Medicine* **25**(4), 365-451.
39. Rolo, A.P. y Palmeira, C.M. 2006. Diabetes and mitochondrial function: role of hyperglycemia and oxidative stress. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **212**, 167-178.
40. Gutiérrez Salinas, J. 2006. ¿Qué sabe usted acerca de...radicales libres?. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. Sociedad Farmacéutica Mexicana A.C. **37**(004), 69-73.
41. Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T.D., Mazur, M. y Telser, J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **39**(1), 44-84.
42. Vargas, F., Rivas, C., Nursamaa, A. y Zoltan. 2007. Reacciones de radicales libres con relevancia biológica en la teoría del envejecimiento. *Avances en Química* **2**(2), 3-15.
43. Castillo, C., Benedito, J.L., López-Alonso, M. 2001. Importancia del estrés oxidativo en ganado vacuno: en relación con el estado fisiológico (preñez y parto) y la nutrición. *Arch. med. vet.* **33**(1), 5-20.
44. Szeto, H.H. Cell-permeable, mitochondrial-targeted, peptide antioxidants. 2006. *AAPS Journal* **8**(2), E277-E283.

45. Cortés Rojo, C. 2004. Tesis de Maestría en Biología Experimental: Efecto del Estrés Oxidativo sobre la cadena respiratoria de *S. cerevisiae*. Instituto de Investigaciones Químico Biológicas-UMSNH.
46. Speakman, J.R. 2003. Oxidative phosphorylation, mitochondrial proton cycling, free-radical production and aging. *Adv. Cell Aging Gerontol.* **14**, 35-68.
47. Muller, F.L., Liu, y., Remmen, V.H. 2004. Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane. *J. Biol. Chem.* **279**(47), 49064-49073.
48. Guzmán G., A.M., Velásquez G., A. y Sierra V., M.P. 2006. Óxido nítrico, estrés nitrosante y función mitocondrial. *Revista de Endocrinología y Nutrición* **14**(4), 227-232.
49. Bolaños, J.P., Almeida, A., Stewart, V., Peuchen, S., Land, J.M., Clark, J.B. y Heales S.J. 1997. Nitric oxide-mediated mitochondrial damage in the brain: mechanisms and implications for neurodegenerative diseases. *J. Neurochem.* **68**(6), 2227-2239.
50. Ghafourifar, P. y Saavedra-Molina A. 2006. Functions of mitochondrial nitric oxide synthase. En: *Nitric oxide, cell signaling, and gene expression*. (Lamas, S. y Cadenas, E. eds.). USA. **4**, 79-81.
51. Quijano, C., Cassina, A., Castro, L., Rodríguez, M. y Radi R. 2006. Peroxynitrite: a mediator of nitric-oxide-dependet mitochondrial dysfunction in pathology. En: *Nitric oxide, cell signaling, and gene expression*. (Lamas, S., Cadenas, E. eds.). USA. **5**, 101-107.

52. Bryan, N.S. y Grisham, M.B. 2007. Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples. *Free Radic. Biol. Med.* **43**, 645-657.
53. Calderón-Cortés, E., Clemente-Guerrero, M., Sierra-Campos, E., Cortés-Rojo, C., Gaona-Zamudio, F.J., Villalobos-Molina, R. y Saavedra-Molina, A. 2006. Functional characterization of brain mitochondrial nitric oxide synthase during hypertension and aging. *Amino Acids* **30**, 73-80.
54. Murria J., Taylor, S.W., Zhang, B., Ghosh, S. 2003. Oxidative damage to mitochondrial complex I due to peroxynitrite. *J. Biol. Chem.* **278**, 3723-37230.
55. Radi, R. 2000. Peroxinitrito: una década de investigación sobre la bioquímica y biología celular de un intermediario citotóxico. *Actas de Fisiología* **6**, 123-130.
56. Matuz-Mares, D., Guinzberg, R., Riveros-Rosas, H. y Zentella de Piña, M. 2005. Movilización de glutatión total (GSH_T) en hepatocitos aislados. Memorias del XVI Congreso de Bioenergética y Biomembranas. Sociedad de Bioquímica A.C.
57. Srinivasan, K. y Ramarao, P. 2007. Animal models in type 2 diabetes research: an overview. *Indian J Med Res.* **125**, 451-472.
58. Dringen, R., Gutterer, J.M. y Hirrlinger, J. 2000. Glutathione metabolism in brain. Metabolic interaction between astrocytes and neurons in the defense against reactive oxygen species. *Eur. J. Biochemistry* **267**, 4912-4916.
59. Akerboom, T.P. y Sies, H. 1981. Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods Enzymol.* **77**, 373-38.

60. Nair, S., Singh, S.V. y Krishan, A. 1991. Flow cytometric monitoring of glutathione content and anthracycline retention in tumor cells. *Cytometry* **12**, 336-342.
61. Página web de wikipedia: <http://es.wikipedia.org/wiki/Glutati%C3%B3n>.
62. Han, D., Canali, R., Rettori, D. y Kaplowitz, N. 2003. Effect of glutathione depletion on sites and topology of superoxide and hydrogen peroxide production in mitochondria. *Mol. Pharmacol.* **64**, 1136-1144.
63. Han, D., Canali, R., García, G., Aguilera, R., Gallea, T.K. y Cadenas, E. 2005. Sites and mechanisms of aconitase inactivation by peroxynitrite: modulation by citrate and glutathione. *Biochemistry* **44**, 11986-11996.
64. Castro, L., Rodríguez, M. y Radi, R. 1994. Aconitase is readily inactivated by peroxynitrite, but not by its precursor, nitric oxide. *J. Biol. Chem.* **269**(47), 9409-29415.
65. Página web the national health museum: http://www.accessexcellence.org/RC/VL/GG/ecb/complete_citric_acid_cycle.html.
66. Página web: <http://160.114.99.91/astrojan/protein/pictures/akonitaz.gif>.
67. Yarian, C.S., Toroser, D. y Sohal, R.S. 2005. Aconitase is the main functional target of aging in the citric acid cycle of kidney mitochondria from mice. *Mech. Ageing Devel.* **127**, 79-84.
68. Yarian, C.S., Toroser, D. y Sohal, R.S. 2005. In the aging housefly aconitase is the only citric acid cycle enzyme to decline significantly. *J. Bioenerg. Biomembr.* **37**(2), 91-96.

69. Sims, N.R. 1990. Rapid isolation of metabolically active mitochondria from rat brain and subregions using Percoll density gradient centrifugation. *J. Neurochem.* **55**, 698-707.
70. Dunn, J.S., Sheenan, H.L. y McLetchie, N.G.B. 1943. Necrosis of islets of Langerhans produced experimentally. *Lancet* **i**: 484-487.
71. Rakieten, N., Rakieten, M.L. y Nadkarni, M.V. 1963. Studies on the diabetogenic action of streptozotocin. *Cancer Chemother. Rep.* **29**, 91-98.
72. Weaver, D.C., McDaniel, M.L., Naber, S.P., Barry, D. y Lacy, P.E. 1978. Alloxan stimulation and inhibition from isolated rat islets of Langerhans. *Diabetes* **27**, 1205-1214.
73. Öztürk, Y., Altan, V.M. y Yildizoglu-Ari, N. 1996. Effects of experimental diabetes and insulin on smooth muscle function. *Pharmacol. Rev.* **48**, 69-112.
74. Ingle, D.J. 1948. The production of experimental glycosuria in the rat. *Recent Prog. Horm. Res.* **2**, 229-253.
75. Thakar, J.H. y Hassan, M.N. 1988. Effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP), cyperquat (MPP+) and paraquat on isolated mitochondria from rat striatum cortex and liver. *Life Sci.* **43**, 143-149.
76. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**(1), 265-275.
77. Knipp, M. y Vasák, M. 2000. A colorimetric 96-well microtiter plate assay for the determination of enzymatically formed citrulline. *Anal. Biochem.* **286**(2), 257-264.

78. Buege, J.A. y Aust, S.D. 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* **52**, 302-310.
79. Halliwell, B. y Gutteridge, J.M.C. 1999. Oxidative stress: adaptation, damage and death. En: *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3^a Edición. England. Oxford University Press 4, 264-350.
80. Ignarro, L.J. 2000. Nitric oxide. Biology and pathobiology. 1^a Edición. USA. Academic Press 2, 23-40.