

ESTRÉS OXIDATIVO Y NITROSATIVO EN MITOCONDRIAS DE RIÑÓN DE RATA ADULTA DURANTE LA DIABETES MELLITUS EXPERIMENTAL

Pérez-Gallardo R.V.*, Albarrán-Bravo S., Clemente-Guerrero M., Ayala-Izquierdo J.L., Manzo-Avalos S., Saavedra-Molina A.
Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas. Edificio B-3. C.U.
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Mich. 58030.
*dewper19@hotmail.com

Resumen

En la actualidad, la diabetes mellitus (DM) plantea un grave problema mundial de salud pública, debido a que ha aumentado su incidencia y prevalencia. En 1980 ocupó el noveno lugar como causa de muerte, para colocarse a finales de los 90, en el tercero y primer lugar en el grupo de 55 a 64 años.

Estudios recientes sugieren que la diabetes está relacionada con una sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ERO) causada por la hiperglucemia, y que este evento es clave en la patogénesis de las complicaciones asociadas a la diabetes.

La cadena respiratoria de la mitocondria es la principal fuente de (ERO), por lo que parece ser el paso inicial y principal acontecimiento involucrado en las complicaciones de la diabetes. El aumento de ERO provoca acumulación de metabolitos, tales como, fructosa, sorbitol y las triosas fosfatos, éstos últimos pueden provocar productos de glicosilación avanzada, así como un incremento en la síntesis de diacilglicérols, los cuales activan a la proteína cinasa C. Por otro lado, hay una alteración en la proporción normal entre los nucleótidos de niacinamida reducidos con respecto a los oxidados, conduciendo a una deficiencia en los sistemas antioxidantes.

Se inyectó vía intraperitoneal 30 mg/Kg de estreptozotocina a ratas macho Wistar de 11 meses de edad para inducir la diabetes. Fueron sacrificadas a las 1, 3, 6, 9, y 12 semanas postinducción. Se aislaron las mitocondrias de riñón, a las cuales se les evaluó óxido nítrico (NO), oxidación de lípidos, así como la actividad de la aconitasa, utilizada como marcador de daño oxidativo. Los resultados mostraron un incremento en los niveles de óxido nítrico y en la oxidación de lípidos, así como una disminución en la actividad de la aconitasa en las ratas diabéticas, con respecto al control. Estos resultados afirman que durante la diabetes en edad avanzada hay daño a nivel mitocondrial causado por el estrés oxidativo y nitrosativo.

Metodología

Se utilizaron ratas macho Wistar de aproximadamente 11 meses de edad (600-700gr), debido a que se consideran ratas en edad adulta mayor, la cual es equiparable a la edad donde se registra la mayor incidencia de diabetes en los humanos. Se les indujo la diabetes con una inyección de estreptozotocina (30 mg/Kg de peso.) en la región peritoneal.

Las mitocondrias de riñón fueron aisladas por centrifugación diferencial y purificadas a través de un gradiente de Percoll. La proteína mitocondrial fue cuantificada por el método de biuret.

La producción de óxido nítrico por la mitocondria (1 mg) fue evaluada por cambios en la absorbencia a 546 nm mediante el método de Griess (Green et al., 1982).

El ensayo de lipoperoxidación (TBARS) está basado en la cuantificación de malondialdehído (MDA), el principal producto de la peroxidación de los ácidos grasos poliinsaturados de membrana (Buege y Aust, 1978). Una molécula de MDA reacciona con dos moléculas ácido tiobarbitúrico (TBA), formando un aducto MDA-TBA₂ que absorbe fuertemente a 535 nm.

La actividad de la aconitasa fue determinada usando isocitrato como sustrato (90 mM Tris pH 8.0, 20 mM isocitrato, y 8-24 µg de proteína). (Henson y Cleland, 1967).

Resultados

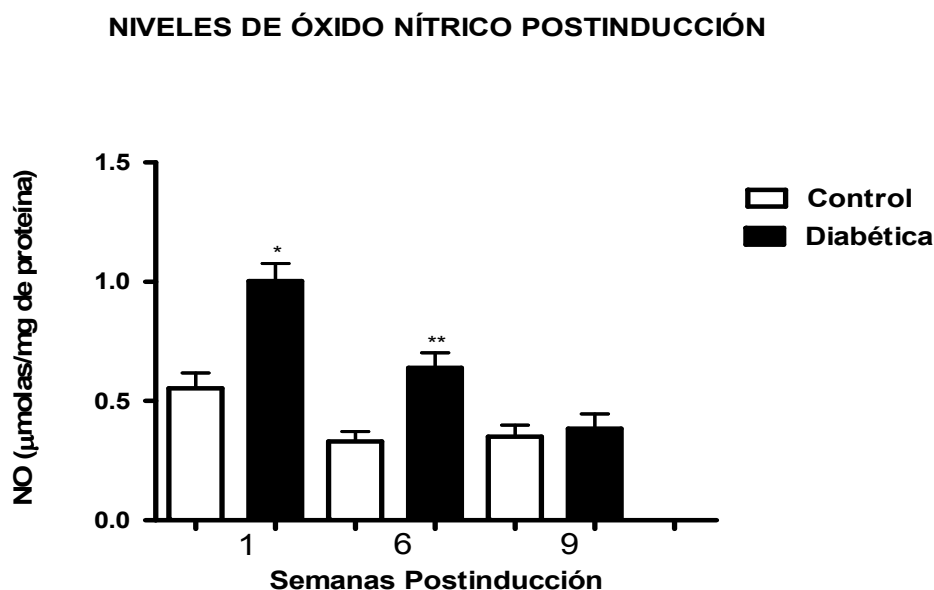
Los resultados mostraron un incremento significativo de óxido nítrico mitocondrial de riñón de ratas con 1 y 6 semanas de hiperglucemia, con respecto a las ratas control, mientras que en la semana 9 no se observó una diferencia significativa.

En nuestros resultados también se observó un incremento en el grado de lipoperoxidación en ratas con 1, 6 y 9 semanas de hiperglucemia, con respecto al control.

De igual manera, se determinó la actividad de la aconitasa mitocondrial, ya que es usada como marcador de daño oxidativo, y se observó una disminución en la actividad de la misma, que con respecto a las ratas control. Lo que comprueba un aumento en la producción de ERO y ERN y por lo tanto, un daño oxidativo y nitrosativo, respectivamente. Por lo que se concluye que el estrés oxidativo y nitrosativo juegan un papel importante en el daño renal en mitocondrias durante la diabetes.

Agradecimientos: Los autores agradecen el apoyo económico parcial de los donativos de COECYT Michoacán (2008), CONACYT (83205), CIC-UMSNH (2.16).

Fig. 1.



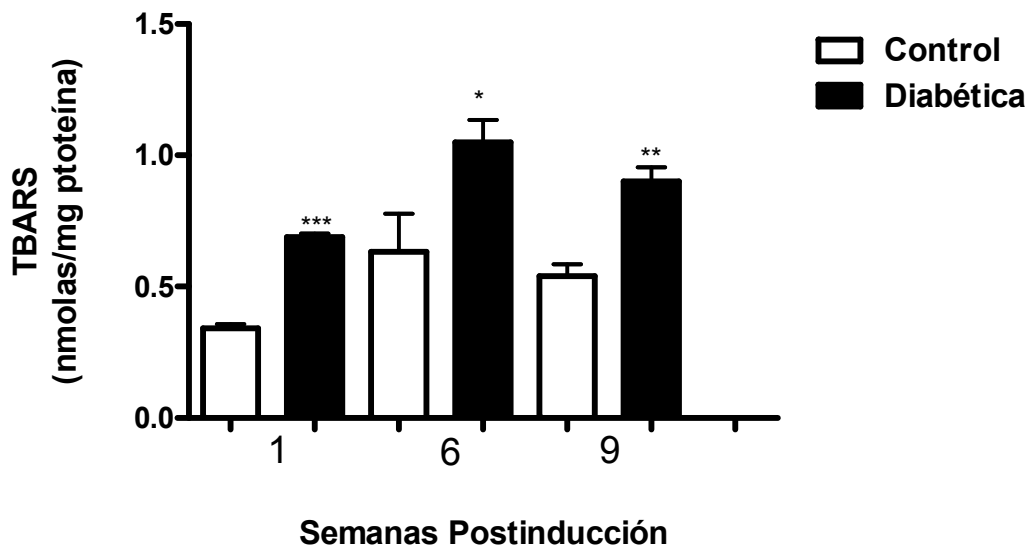
n=4

* P<0.05

** P<0.01

Fig. 2.

NIVELES DE LIPOPEROXIDACIÓN POSTINDUCCIÓN



n=4

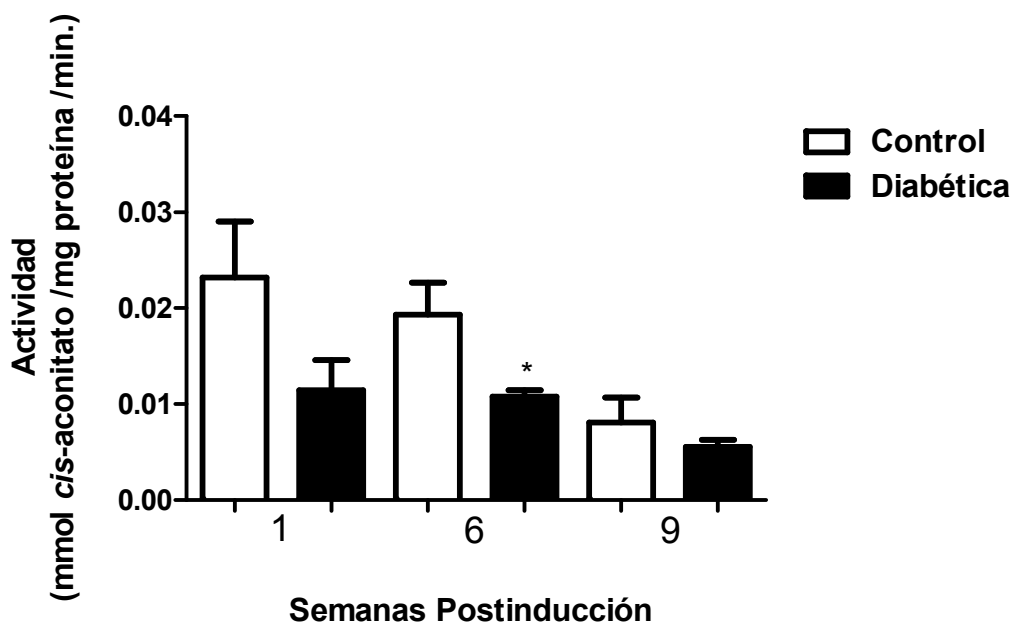
* P<0.05

** P<0.01

*** P<0.001

Fig. 3

ACTIVIDAD DE LA ACONITASA POSTINDUCCIÓN



n= 4-5

* P<0.05