



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

ALTERACIONES MITOCONDRIALES EN LA NEFROTOXICIDAD INDUCIDA POR BROMATO DE POTASIO

TESIS

Que para optar por el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

I.B.Q. Daniela Sarai Rodríguez Rangel

TUTOR PRINCIPAL:

Dr. José Pedraza Chaverri
Facultad de Química

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

Dra. Nimbe Torres y Torres
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

Dr. José Guillermo Aguilar Osorio
Facultad de Química

Ciudad de México. Abril, 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Esta tesis fue apoyada por CONACYT 220046 y 252008 y por PAPIIT
IN210713

"Gracias a la tesis que me ha dado tanto..."

Muchas fueron las personas que participaron de manera directa e indirecta en la realización de este trabajo, a todas ellas les estaré eternamente agradecida, ya que no solo me apoyaron en este proyecto, me hicieron crecer como persona y me ayudaron a conocerme más.

Agradezco a mi tutor, el Dr. José Pedraza por la oportunidad brindada, por su cariño y por su infinita paciencia para conmigo.

Gracias a todos mis amigos, que sin sus bromas, risas y locuras este trabajo no hubiera podido ser. A quienes me acompañan de historias previas: Pablo Elías García, Heira Pineda, Carlos Sandomal, Jonathan Flores. A quienes me acompañaron en el inicio: Érica Rubi Luis, Jorge Limón, Jazmín García. A quienes encontré durante: Berenice Fernández, Alejandra Alvares, Sebastián Guerra, Lucero Chárez, Karla Villaseñor, Gustavo Vázquez, Pedro Rojas, Emiliano Trejo. A quien me guio, apoyó y me regañó con todo el amor de una hermana mayor: Daniela Trujillo. Y a quien me acompañó desde el principio y durante toda esta empresa: Fernando Gramados Castro, de quien aprendí mucho, con su eterno consejo: "relájate".

Gracias a mi novio, Rafael Esquivel de Jesús, por su amor y por su apoyo para concluir esta etapa.

Y principalmente, gracias a mis padres: María Antonieta Rangel Fernández y José de Jesús Rodríguez Salinas, sin ustedes esto simplemente no podría ser. Gracias por su amor, su paciencia, por su apoyo, por su esfuerzo y principalmente, gracias por no dejar de creer en mí. Gracias a mi hermano: Emilio Rangel, por cuidarme, por escucharme, por apoyarme, por ser irreverente y sacarme una sonrisa aun en los días más difíciles. Te quiero mucho hermano.

Por último, no quisiera dejar de agradecer y honrar a todos esos animales a quienes debemos el desarrollo de muchos de los avances en las ciencias biológicas. Sin ellos no sería posible el desarrollo de nuevos tratamientos, vacunas y el estudio de muchos de los males que aquejan a la humanidad.

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	1
RESUMEN	3
1. INTRODUCCIÓN	4
1.1 Bromato de potasio.....	4
1.2 Fisiología renal y nefrotoxicidad	6
1.3 Mitocondria: estructura y función.....	8
1.4 Fosforilación oxidativa y cadena de transporte de electrones.....	9
1.4.1 Componentes de la cadena de transporte de electrones	10
1.4.1.1 Complejo I o NADH deshidrogenasa.....	11
1.4.1.2 Complejo II o succinato deshidrogenasa	11
1.4.1.3 Complejo III o citocromo bc_1	12
1.4.1.4 Complejo IV o citocromo c oxidasa.....	13
1.4.2 ATP sintasa o F_1F_0 -ATP sintasa	14
1.5 Evaluación de la capacidad respiratoria y desacoplamiento mitocondrial.....	16
1.6 Especies reactivas de oxígeno (ERO) y estrés oxidativo	19
1.7 Antioxidantes.....	20
1.7.1 C-Ficocianina	22
2. JUSTIFICACIÓN.....	24
3. HIPÓTESIS	24
4. OBJETIVOS	24
4.1 Objetivo general	24
4.2 Objetivos específicos	24
5. DESARROLLO EXPERIMENTAL Y METODOLOGÍA	25
5.1 Reactivos	25
5.2 Animales.....	26
5.3 Tratamiento.....	26
5.4 Evaluación de la función renal.....	27
5.4.1 Creatinina en plasma.....	27
5.4.2 Nitrógeno de urea en sangre (BUN)	28
5.5 Preparación de los homogeneizados renales	28

5.6	<i>Cuantificación de proteína</i>	28
5.7	<i>Determinación de la actividad de enzimas antioxidantes</i>	29
5.7.1	<i>Catalasa</i>	29
5.7.2	<i>Glutación peroxidasa</i>	29
5.7.3	<i>Glutación reductasa</i>	30
5.7.4	<i>Glutación S-transferasa</i>	30
5.7.5	<i>Superóxido dismutasa</i>	31
5.8	<i>Cuantificación de proteínas oxidadas</i>	31
5.9	<i>Determinación de lipoperoxidación</i>	32
5.10	<i>Aislamiento de mitocondrias de riñón</i>	33
5.11	<i>Medición del consumo de oxígeno mitocondrial</i>	33
5.12	<i>Actividad enzimática de los complejos mitocondriales</i>	34
5.12.1	<i>Actividad del complejo I (NADH: ubiquinona oxidoreductasa)</i>	34
5.12.2	<i>Actividad del complejo II (succinato: ubiquinona oxidoreductasa)</i>	35
5.12.3	<i>Actividad del complejo III (coenzima Q: citocromo c oxidoreductasa)</i>	35
5.12.4	<i>Actividad del complejo IV (citocromo C oxidasa)</i>	36
5.13	<i>Medición de la producción de ATP</i>	36
5.14	<i>Potencial de la membrana mitocondrial</i>	37
5.15	<i>Actividad de aconitasa</i>	37
5.16	<i>Contenido de glutación reducido (GSH) mitocondrial</i>	38
5.17	<i>Producción mitocondrial de peróxido de hidrogeno (H₂O₂)</i>	38
5.18	<i>Análisis estadístico</i>	38
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
6.1	<i>Establecimiento del modelo de daño renal</i>	39
6.2	<i>Establecimiento del esquema de protección antioxidante</i>	40
6.3	<i>Evaluación del estrés oxidativo renal</i>	42
6.3.1	<i>Actividad de enzimas antioxidante</i>	43
6.3.2	<i>Marcadores de daño oxidativo</i>	44
6.4	<i>Evaluación de la función mitocondrial</i>	46
6.4.1	<i>Oximetría mitocondrial</i>	46
6.4.2	<i>Síntesis de ATP</i>	52
6.4.3	<i>Potencial de membrana mitocondrial</i>	53
6.4.4	<i>Actividad de los complejos mitocondriales</i>	55
6.5	<i>Evaluación del estrés oxidativo en la mitocondria renal</i>	56
6.5.1	<i>Generación de H₂O₂ en la mitocondria</i>	56

6.5.2	<i>Daño oxidativo mitocondrial</i>	58
6.6	<i>Efecto de la administración de $KBrO_3$ en el balance oxidativo mitocondrial</i>	60
6.6.1	<i>Actividad las enzimas antioxidantes mitocondriales</i>	60
6.6.2	<i>Contenido de GSH mitocondrial</i>	61
7.	CONCLUSIONES	62
8.	BIBLIOGRAFÍA	62

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Corte longitudinal de riñón	6
Figura 2. Estructura de la nefrona.....	7
Figura 3. Estructura general de la mitocondria.....	9
Figura 4. Secuencia de complejos en la fosforilación oxidativa.....	10
Figura 5. Ciclo de la ubiquinona o “Ciclo Q”.....	13
Figura 6. Estructura de la ATP sintasa mitocondrial en mamíferos	15
Figura 7. Evolución de la concentración de oxígeno en un estudio de oximetría mitocondrial.....	17
Figura 8. Reducción del O ₂ ; formación de ERO a partir de la reducción gradual de O ₂	19
Figura 9. Estructura química de la ficocianina, biliverdina y bilirrubina.....	23
Figura 10. Reacción de Jaffé para la cuantificación de creatinina	27
Figura 11. Reacción para la cuantificación de urea.....	28
Figura 12. Reacción acoplada para la determinación de la actividad de glutatión peroxidasa (GPx).....	29
Figura 13. Reacción empleada para la determinación de proteínas oxidadas	31
Figura 14. Efecto de la administración de bromato de potasio (KBrO ₃) sobre los marcadores de daño renal	40
Figura 15. Efecto del pretratamiento de C-ficocianina (C-FC) en los marcadores de daño renal	41
Figura 16. Efecto de la administración de bromato de potasio (KBrO ₃) y del pretratamiento con C-ficocianina (C-FC) en la actividad de glutatión peroxidasa (GPx) en plasma. .	42
Figura 17. Efecto de la administración de bromato de potasio (KBrO ₃) y del pretratamiento con C-ficocianina (C-FC) en la actividad de las enzimas antioxidantes en homogeneizados renales.....	44
Figura 18. Efecto de la administración de bromato de potasio (KBrO ₃) y del pretratamiento con C-ficocianina (C-FC) en los marcadores de daño oxidante en homogeneizado renal.....	45
Figura 19. Trazos representativas del consumo de oxígeno de mitocondrias renales.....	48
Figura 20. Efecto de la administración de bromato de potasio (KBrO ₃) y del pretratamiento con C-ficocianina (C-FC) en los estados de respiración mitocondrial.....	49
Figura 21. Efecto de la administración de bromato de potasio (KBrO ₃) y del pretratamiento con C-ficocianina (C-FC) en el índice de control respiratorio.....	50

Figura 22. Efecto de la administración de bromato de potasio (KBrO_3) y del pretratamiento con C-ficocianina (C-FC) en la relación ADP/O.	51
Figura 23. Efecto de la administración de bromato de potasio (KBrO_3) y del pretratamiento con C-ficocianina (C-FC) en la síntesis de ATP en mitocondrias aisladas de tejido renal.	52
Figura 24. Efecto de la administración de bromato de potasio (KBrO_3) y del pretratamiento con C-ficocianina (C-FC) en el potencial de membrana de mitocondrias aisladas de tejido renal.	55
Figura 25. Efecto de la administración de bromato de potasio (KBrO_3) y del pretratamiento con C-ficocianina (C-FC) en la actividad de los complejos I, II, III y IV en mitocondrias aisladas de tejido renal.	56
Figura 26. Efecto de la administración de bromato de potasio (KBrO_3) y del pretratamiento con C-ficocianina (C-FC) en la generación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) mitocondrial ..	57
Figura 27. Efecto de la administración de bromato de potasio (KBrO_3) y del pretratamiento con C-ficocianina (C-FC) en la actividad de aconitasa en mitocondrias aisladas de tejido renal.	59
Figura 28. Efecto de la administración de bromato de potasio (KBrO_3) en la actividad de las enzimas antioxidantes de mitocondrias aisladas de tejido renal.	60
Figura 29. Efecto de la administración de bromato de potasio (KBrO_3) en el contenido de glutatión reducido (GSH) en mitocondrias aisladas de tejido renal.	61

ABREVIATURAS

ADP	Adenosín difosfato.
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ASB	Albúmina sérica bovina.
ASB FF	Albúmina sérica bovina libre de ácidos grasos.
ATC	Ácido tricloroacético.
ATP	Adenosín trifosfato.
Br ⁻	Ion bromuro.
BrO ₃ ⁻	Ion bromato.
BUN	Nitrógeno de urea en sangre.
Ca ²⁺	Iones de calcio.
CAT	Catalasa.
CTE	Cadena de transporte de electrones.
CCCC	Carbonilcianuro-m-clorofenilhidrazona.
CDNB	1-cloro-2,4-dinitrobenceno.
C-FC	C-Ficocianina.
CO	Monóxido de carbono.
C=O	Grupos carbonilo.
CR	Control respiratorio.
CuCl ₂	Cloruro de cobre.
Cu	Cobre.
Δp	Fuerza protón motriz.
DCPIP	2,6-diclorofenol-indofenol hidrato de sal sódica.
DNPH	2,4-dinitrofenilhidrazina.
DuB	Decilubiquinona oxidada.
DuBH2	Decilubiquinona reducida.
e ⁻	Electrones.
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético.
EEM	Error estándar de la média.
ERO	Especies reactivas de oxígeno.
FAD	Flavín adenín dinucleótido.
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura.
FCB	Ficocianobilina.
FCCP	Carbonilcianuro-p-trifluorometoxi-hidrazona.
FDA	Administración de Alimentos y Drogas.
Fe-S	Hierro-azufre.
γGCL	γ-Glutamato cisteína ligasa.
GPx	Glutación peroxidasa.
GR	Glutación reductasa.
GRAS	Generalmente reconocidos como seguro.
GSH	Glutación reducido.
GSSG	Glutación disulfuro.
GST	Glutación S transferasa.
G6PDH	Glucosa 6-fofato deshidrogenasa.
H ⁺	Protones.
HCl	Ácido clorhídrico.
H ₂ O	Agua.

H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno.
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico.
HO•	Radical hidroxilo.
HRP	Peroxidasa de rábano.
i.p.	Intraperitoneal.
KCN	Cianuro de potasio.
KBrO ₃	Bromato de potasio.
K ₂ HPO ₄	Fosfato de potasio dibásico.
KH ₂ PO ₄	Fosfato de potasio monobásico.
MDA	Malondialdehído.
MEM	Membrana externa mitocondrial.
MnSOD	Superóxido dismutasa dependiente de manganeso.
MIM	Membrana interna mitocondrial.
MgCl ₂	Cloruro de magnesio.
Na ₂ CO ₃	Carbonato de sodio.
NaClO	Hipoclorito de sodio.
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido reducido.
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido.
NADP ⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato.
Na ₂ HPO ₄	Fosfato dibásico de sodio anhidro.
NaH ₂ PO ₄	Fosfato monobásico de sodio.
NBT	Azul de nitrotetrazolio.
NQO1	NADPH quinona óxido reductasa-1.
•NO	Óxido nítrico.
O ₂	Molécula de oxígeno.
O ₂ • ⁻	Anión superóxido.
¹ O ₂	Oxígeno singulete.
ONOO ⁻	Peroxinitrito.
Pi	Fosfato inorgánico.
p.c.	Peso cuerpo.
P/O	Mol de ATP sintetizado por mol de O ($\frac{1}{2}$ O ₂).
RO•	Alcoxilo.
RO ₂ •	Peroxilo .
SDS	Dodecil sulfato de sodio.
SOD	Superóxido dismutasa.
SS	Solución salina 0.9%.
U	Unidad de actividad enzimática.
UF	Unidades fluorométricas.
UQ	Ubiquinona.
UQH ₂	Ubiquinol.
XO	Xantina oxidasa.

RESUMEN

El bromato de potasio (KBrO_3) es un agente oxidante ampliamente empleado en la industria cosmética y alimenticia; también se le encuentra como principal subproducto de la ozonificación de aguas ricas en bromuro (Br^-). Se caracteriza por ser un potente agente nefrotóxico y cancerígeno, cuyo efecto ha sido asociado a la generación de estrés oxidante en el tejido renal y a la pérdida del potencial de membrana en la mitocondria. En este estudio, se reportan las alteraciones en las mitocondrias renales en la nefrotoxicidad inducida a las 24 horas posteriores a la administración de una sola dosis de KBrO_3 (200mg/Kg peso cuerpo, intraperitoneal) en ratones macho. La administración de KBrO_3 redujo significativamente en la mitocondria: los parámetros de consumo de oxígeno (control respiratorio, relación ADP/O), el potencial de membrana, la síntesis de adenosín trifosfato (ATP), la actividad de los complejos respiratorios, la actividad de las enzimas antioxidantes (glutación peroxidasa, glutación reductasa, catalasa y superóxido dismutasa), la actividad de la enzima aconitasa y los niveles de glutación reducido. Considerando el efecto del KBrO_3 sobre el balance oxidativo renal, también se estudió el efecto profiláctico de la administración de un agente antioxidante, la C- Ficocianina (C-FC), cuyas propiedades antioxidantes y renoprotectoras ya se han relacionado con la prevención del daño a nivel mitocondrial en otros modelos de nefrotoxicidad. No obstante, el esquema de tratamiento implementado con C-FC (administración intraperitoneal diaria de 15mg/kg peso cuerpo, durante 3 días previos a la administración de KBrO_3), solo fue capaz de prevenir la nefrotoxicidad inducida por KBrO_3 , llegando a generar por sí solo alteraciones en la función mitocondrial.

Los resultados obtenidos demostraron que las alteraciones en la función mitocondrial están íntimamente relacionadas con el daño inducido por la administración de KBrO_3 , y que la C-FC es incapaz de prevenir dichas alteraciones.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Bromato de potasio

El bromato de potasio (KBrO_3) es un agente oxidante empleado en la industria alimentaria y cosmética (Cadenas & Barja, 1999; IARC, 1986). Se utiliza como madurador de la harina durante la molienda y como acondicionador de la masa durante la panificación, proceso en el que promueve el desarrollo del gluten, brindando fuerza y elasticidad a la masa. Este aditivo también es empleado en la producción de cerveza y en la elaboración de queso y productos de pasta de pescado. En la industria cosmética, se utiliza como agente oxidante en las soluciones neutralizadoras para el ondulado permanente de cabello. También se le encuentra como subproducto mayoritario de la desinfección de aguas ricas en bromuro (Br^-) por la técnica de ozonización (Ahmad et al., 2012; Khan & Sultana, 2004).

La exposición a KBrO_3 puede ser crónica o aguda, en ambos casos es perjudicial para los tejidos, especialmente el riñón y el sistema nervioso central (Kurokawa et al., 1990). La exposición crónica se presenta al ingerir agua ozonizada contaminada o alimentos en los que se haya utilizado en exceso KBrO_3 durante su producción. En los estudios realizados sobre este modelo de exposición, se comprobó que genera carcinomas en células renales de ratas, hamsters y ratones (Kurokawa et al., 1990); así como tumores en tiroides y mesoteliomas en ratas (DeAngelo et al., 1998). Por tal motivo, la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer lo ubica dentro de la Categoría 2b – posiblemente carcinogénico para los humanos (IARC, 1986). La exposición aguda, se presenta por la ingesta accidental o intencionada de una alta concentración de KBrO_3 (IARC, 1986). Esta exposición causa falla renal, irritación gastrointestinal y desórdenes neuropatológicos como vértigo, tinnitus y sordera irreversible (EPA, 2001).

En solución acuosa el KBrO_3 se disocia rápidamente, y es el ion bromato (BrO_3^-) el responsable de todos los efectos tóxicos, provocados por la generación de intermediarios más reactivos que el mismo BrO_3^- durante su metabolismo. En estudios *in vivo* e *in vitro* se ha demostrado la rápida degradación del BrO_3^- al Br^- ; este último se caracteriza por ser más estable y menos reactivo que el primero (Fujii et al., 1984; Tanaka et al., 1984). Entre los órganos estudiados, el riñón fue el que presentó una mayor concentración de Br^- posterior

a la administración oral de KBrO_3 en ratas, sugiriendo que gran parte del catabolismo del BrO_3^- se realiza en el riñón (Fujii et al., 1984).

En la nefrotoxicidad inducida por BrO_3^- se ha descrito el aumento de los niveles de peroxidación de lípidos, carbonilación de proteínas y oxidación del ácido desoxiribonucleico (ADN). Así como la disminución del contenido de glutatión reducido (GSH), y de la actividad de las enzimas antioxidantes: catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx), glutatión reductasa (GR), glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), NADPH quinona óxido reductasa-1 (NQO1), glutatión-S-transferasa (GST) y superóxido dismutasa (SOD) (Ahmad & Mahmood, 2012; Ahmad et al., 2012; Cadenas & Barja, 1999; Giri et al., 1999; Khan & Sultana, 2004; Watanabe et al., 2001). Así mismo, se ha sugerido la pérdida de funciones mitocondriales, basándose en la disminución del potencial de membrana subsecuente a la administración de KBrO_3 (Ahlborn et al., 2009).

Debido a las características antes descritas, en países como Reino Unido, Canadá, Sri Lanka, China, Nigeria, Argentina, Costa Rica, Bolivia y los pertenecientes a la Unión Europea se ha prohibido el uso de KBrO_3 en productos alimentarios. En 1992 fue removido de la lista de aditivos alimentarios generalmente reconocidos como seguros (GRAS por sus siglas en inglés) por el comité experto de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura (FAO por sus siglas en inglés) (Meza, 2004). No obstante, la Administración de Alimentos y Drogas (FDA por sus siglas en inglés) se ha limitado exclusivamente a pedir a las industrias alimentarias que voluntariamente dejen de emplearlo, emitiendo los límites seguros para su uso.

En México, así como en Estados Unidos y algunos otros países, el uso de KBrO_3 no está prohibido; sin embargo, se busca la regulación de su uso a través de normatividades que establecen las cantidades adecuadas a usar. México cuenta con la norma "NMX-F-007-1982. Alimento para humanos. Harina de trigo" (1982), que considera 50 mg/kg de KBrO_3 (50 ppm) como la cantidad necesaria para la buena elaboración de harina de trigo; cabe mencionar que al ser una norma NMX no es de carácter obligatorio.

Para prevenir los efectos nefrotóxicos inducidos por KBrO_3 , se ha estudiado el efecto de algunos antioxidantes sobre las afecciones renales inducidas por este compuesto en modelos de exposición aguda y crónica. Algunos de los antioxidantes estudiados son:

cumarina (Khan et al., 2004), resveratrol, melatonina, vitamina E (Cadenas & Barja, 1999), isoflavonas de soya (Khan & Sultana, 2004), extracto de nenúfar blanco (Khan & Sultana, 2005), ácido indol-3-propiónico (Karbownik et al., 2006), extracto de comino negro (Sultan et al., 2012) y extracto de arándano (Bao et al., 2008), entre otros; la mayoría con resultados alentadores.

1.2 Fisiología renal y nefrotoxicidad

Los riñones son órganos presentes en par; situados en la parte posterior del abdomen, uno a cada lado de la columna vertebral. Algunas de sus funciones son: la regulación del equilibrio hidroelectrolítico y la presión arterial, la secreción de eritropoyetina, la gluconeogénesis, la eliminación de productos metabólicos de desecho y sustancias tóxicas por la orina, y la reabsorción de agua y electrolitos (Eaton & Pooler, 2006).

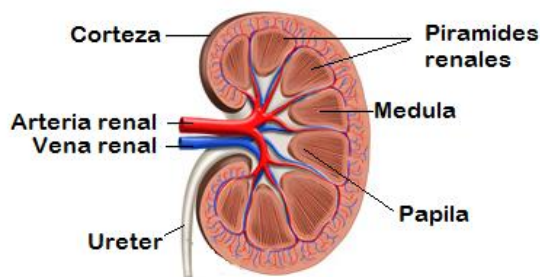


Figura 1. Corte longitudinal de riñón; estructura macroscópica (Eaton & Pooler, 2006)

El riñón presenta dos regiones principales (Figura 1): la región interna o médula renal, y la región externa o corteza renal. La médula renal está constituida por 8 a 16 subdivisiones cónicas denominadas pirámides renales; la base de cada pirámide hace frente a la corteza, mientras que la punta o papila apunta hacia el interior. El tejido papilar comprende principalmente las porciones terminales del sistema de ductos colectores y los vasos rectos. La corteza, es la región que contiene a las nefronas, unidades funcionales del riñón en donde ocurre el proceso de filtración, están constituidas por un corpúsculo renal en comunicación con un túbulo renal (Eaton & Pooler, 2006; NKUDIC, 2009), en la Figura 2 se observa el esquema de su estructura.

El corpúsculo renal es una estructura esférica, constituida por una cubierta hueca conocida como cápsula de Bowman, que envuelve a un ovillo apretado de asas capilares interconectadas conocido como glomérulo. Este actúa como una unidad de filtrado que mantiene las proteínas y células normales en el torrente sanguíneo, permitiendo que pasen los desechos y el agua en exceso. El túbulo renal es el encargado de reabsorber todas las sustancias útiles filtradas a nivel glomerular, algunas de ellas son: iones de sodio y potasio, glucosa, aminoácidos y agua. Se pueden identificar cuatro secciones: el túbulo proximal, asa de Henle delgada y asa de Henle gruesa ascendente, el túbulo distal y el túbulo colector. En el túbulo proximal se reabsorbe del 65 al 70% del filtrado glomerular (Barrett, et al., 2010; Eaton & Pooler, 2006).

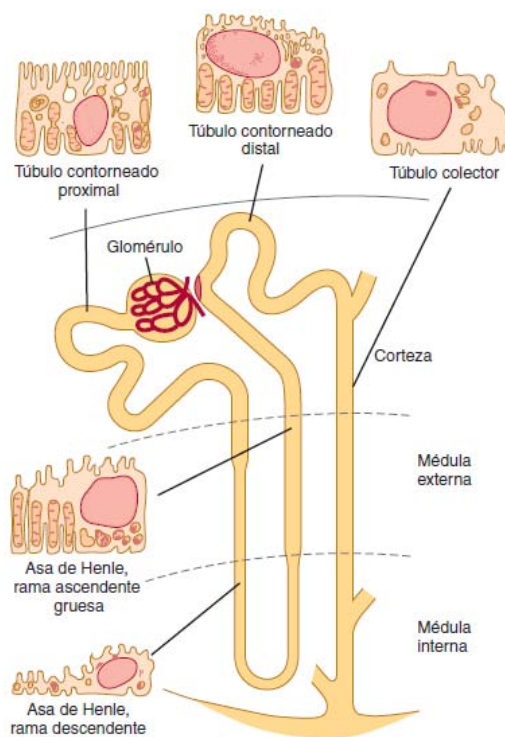


Figura 2. Estructura de la nefrona; las secciones del túbulo renal se diferencian entre sí por las características histológicas que presentan las células que constituyen cada sección (Barrett et al., 2010).

Los riñones entran en contacto con una gran cantidad de fármacos y sustancias químicas que circulan por la sangre; es aquí donde suelen concentrarse debido a los procesos de filtración, llegando a alcanzar concentraciones tóxicas. El efecto tóxico es causado por la transformación de las sustancias a un intermediarios más reactivos durante el proceso de excreción renal, debido a la actividad de una amplia variedad de enzimas que catalizan dos

fases de reacción. La fase I comprende reacciones de oxidación, reducción e hidrólisis que generan productos altamente reactivos y potencialmente tóxicos. La fase II, comprende reacciones sintéticas y de conjugación, estas generan productos polares biológicamente inactivos que pueden ser excretados fácilmente a través de la orina (Anders, 1980; Lock & Reed, 1998).

Durante la intoxicación aguda con una sustancia nefrotóxica, el daño registrado suele ser a nivel glomerular o tubular. El daño glomerular se manifiesta como la disminución del coeficiente de ultrafiltración provocado por la alteración de la permeabilidad o por la proliferación de las células mesangiales intraglomerulares. En el túbulo, el daño suele manifestarse como la obstrucción de este tejido, resultado de la necrosis celular provocada por diferentes mecanismos, entre los que se encuentra el daño directo a la mitocondria. Muchas nefrotoxinas dañan a la mitocondria, alterando la fosforilación oxidativa y en consecuencia la producción de adenosin trifosfato (ATP), lo que perturba las funciones de transporte celular dependientes de esta molécula y provoca la muerte celular (Rivas-Cabañero et al., 1995). Otro mecanismo de nefrotoxicidad es la generación de estrés oxidativo en el tejido renal (Slater, 1984).

1.3 Mitocondria: estructura y función

Las mitocondrias son los organelos celulares donde se efectúa la respiración celular (Paniagua, 2003). Contienen las enzimas del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, de la β -oxidación de ácidos grasos y de la fosforilación oxidativa. Son una fuente energética para la célula, al capturar la energía derivada de la oxidación de sustratos altamente reducidos, en forma de enlaces fosfato en la molécula de ATP, empleada como moneda energética en las vías metabólicas de la célula (Hansford et al., 2001; Metzler, 2003).

La mitocondria presenta una forma oval alargada (Figura 3); está cubierta por dos membranas concéntricas separadas por un espacio intermembranal de aproximadamente 7 nm. El espacio acotado por las membranas se conoce como matriz mitocondrial y en ella se encuentran las enzimas que forman parte de las principales vías metabólicas como la oxidación de carbohidratos, lípidos y aminoácidos (Nelson, 2005). La membrana externa

mitocondrial (MEM) sirve para demarcar el límite exterior de la mitocondria, es lisa y altamente permeable. La membrana interna mitocondrial (MIM) es de mayor densidad que la membrana externa al estar compuesta principalmente de proteínas. Es impermeable a los iones y moléculas pequeñas, permitiendo el paso únicamente de aquellos elementos para los que existe un transportador específico; actúa como un aislante eléctrico y como barrera química entre el espacio intermembranal y la matriz mitocondrial. A su vez, la MIM presenta una gran cantidad de invaginaciones conocidas como crestas mitocondriales, que incrementan su superficie e introducen una compartimentación abierta de la mitocondria. La cantidad y forma de las crestas es muy variable y suele relacionarse con las necesidades energéticas de la célula debido a que aloja los componentes de la cadena respiratoria y al complejo enzimático responsable de la síntesis del ATP (Metzler, 2003).

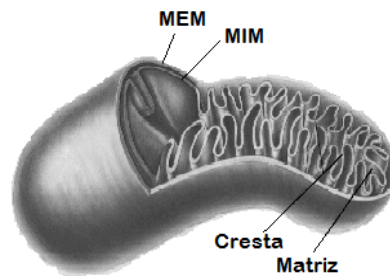


Figura 3. Estructura general de la mitocondria (Hernández, 2001).

Las mitocondrias son esenciales para el metabolismo energético celular a través de la fosforilación oxidativa, contribuyen en la homeostasis de iones de calcio (Ca^{2+}), en la regulación del ciclo celular y en las vías de señalización que controlan la respuesta celular ante estímulos externos (McBride et al., 2006). También, generan especies reactivas de oxígeno (ERO) como mecanismo de transducción de señales e interviene en la regulación de la apoptosis (Levine & Levine, 2006; Wallace et al., 2010).

1.4 Fosforilación oxidativa y cadena de transporte de electrones

La mitocondria produce la mayor parte de la energía requerida por la célula animal mediante la fosforilación oxidativa. En este proceso, la energía derivada del transporte de

electrones (e^-) provenientes de la oxidación de nutrientes reducidos como la glucosa, se almacena en forma de ATP (Hansford et al., 2001).

Los e^- pasan a través de una serie de complejos proteicos que en conjunto se conocen como cadena de transporte de e^- (CTE) o cadena respiratoria, para finalmente transferirse a una molécula de oxígeno y formar agua, todo este proceso se realiza en base al potencial redox de los complejos de la CTE (Hansford et al., 2001). El paso de los e^- a través de la CTE libera energía que se almacena en forma de gradiente de protones (H^+) a través de la MIM. Éste es utilizado por la ATP sintasa para producir ATP a partir de adenosín difosfato (ADP) y fosfato inorgánico (Pi) (Saraste, 1999), en otras palabras, la síntesis de ATP se acopla a la CTE.

1.4.1 Componentes de la cadena de transporte de electrones

La CTE es una secuencia de cuatro complejos enzimáticos localizados dentro de la MIM, tres de ellos son complejos transmembranales capaces de formar un supercomplejo (Saraste, 1999). A la ATP sintasa se le conoce como el quinto complejo de la CTE, aunque formalmente no participa en la transferencia de e^- (Figura 4) (Dudkina et al., 2010).

Los cuatro complejos de la CTE son: complejo I o NADH deshidrogenasa; complejo II o succinato deshidrogenasa, complejo III o citocromo *bc*₁ y complejo IV o citocromo *c* oxidasa (Nelson, 2005). Los complejos I, III y IV son los encargados de generar el gradiente de H^+ a través de la MIM (Saraste, 1999).

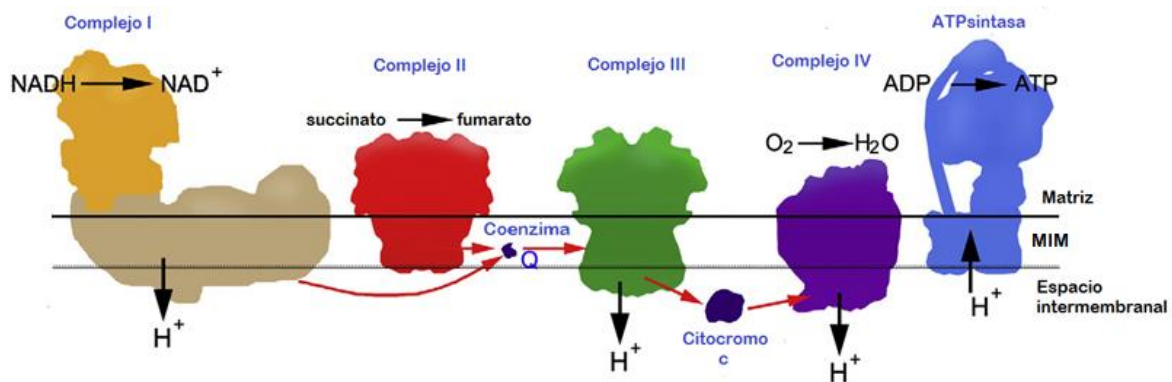


Figura 4. Secuencia de complejos en la fosforilación oxidativa. Los primeros cuatro complejos conforman la cadena de transporte de electrones (CTE) (Dudkina et al., 2010)

1.4.1.1 Complejo I o NADH deshidrogenasa

Es el complejo de mayor tamaño en la CTE, contiene cerca de 43 subunidades dentro de las que se encuentran siete centros hierro-azufre (Fe-S) y un grupo prostético flavín mononucleótido. Está formado por dos brazos que constituyen una estructura en forma de L; uno de los brazos se encuentra embebido en la MIM mientras que el otro está expuesto en la matriz mitocondrial donde oxida a la molécula nicotinamida adenina dinucleótido reducido (NADH) dando inicio al transporte de e^- . La molécula de NADH se genera dentro de la matriz mitocondrial por la acción de las deshidrogenasas que actúan en el ciclo de Krebs, la β -oxidación de ácidos grasos y algunas otras vías. Por cada par de e^- transferidos por el complejo I, éste bombea 4 H^+ de la matriz mitocondrial al espacio intermembranal (Metzler, 2003).

Posterior a la oxidación de NADH, el complejo I reduce a la coenzima liposoluble ubiquinona (UQ) o coenzima Q, generando la forma más reducida de esta especie, el ubiquinol (UQH_2). Este último, transporta los e^- a través de la MIM hasta el complejo III donde se vuelve a oxidar a UQ (Nelson, 2005).

Existen diferentes compuestos capaces de inhibir la actividad del complejo I, uno de los más estudiados es la rotenona, insecticida de origen natural que bloquea el transporte de e^- del complejo I a la UQ.

1.4.1.2 Complejo II o succinato deshidrogenasa

Es el único complejo de la CTE que también participa en el ciclo de Krebs, cataliza la oxidación de succinato a fumarato en la matriz mitocondrial y reduce a la UQ generando UQH_2 , este último transfiere los e^- al complejo III. El complejo II no transloca H^+ a través de la MIM (Saraste, 1999).

El complejo II está compuesto por 4 subunidades: SdhA, SdhB, SdhC y SdhB en mamíferos. Las subunidades SdhA y SdhB contienen los cofactores redox que participan en la reducción de la UQ; SdhA está unida covalentemente al cofactor flavín adenín dinucleótido (FAD) y contiene el sitio de unión para el succinato, mientras que SdhB contiene tres centros Fe-S

que median la transferencia de e^- a la UQ. Las subunidades SdhC y SdhB conforman el dominio membranal que contiene un residuo hemo *b* unido en la interfase de la subunidad (Rutter et al., 2010).

La actividad del complejo II se inhibe en presencia de malonato, análogo estructural del succinato (Huang & Millar, 2013).

1.4.1.3 Complejo III o citocromo bc_1

También conocido como ubiquinona-citocromo *c* óxido-reductasa, es un homodímero constituido en mamíferos por 11 subunidades en cada monómero. Cada monómero cuenta con tres subunidades con actividad redox: el citocromo *b* que alberga dos grupos hemo tipo *b* (b_{562} y b_{566}), el citocromo c_1 que contiene un solo grupo hemo tipo *c* y una proteína Fe-S conocida como proteína Rieske, ésta última cuenta con un centro [2Fe-2S] (Voet & Voet, 2011; Nyola & Hunte, 2008). El complejo III se distribuye asimétricamente a lo ancho de la MIM; el citocromo *b* se prolonga a lo ancho de la membrana, mientras que el citocromo c_1 y la proteína Rieske se encuentran próximas al espacio intermembranal (Nelson, 2005).

La función del citocromo bc_1 es recibir los e^- del UQH₂ y transportarlos al citocromo *c*. El mecanismo propuesto por el cual se realiza la transferencia de e^- se conoce como “ciclo Q”, en él se acopla el transporte de e^- y la translocación de H⁺ a través de la membrana por medio de la protonación y desprotonación de la UQ (Saraste, 1999). El ciclo Q empieza desde que la UQ se reduce por acción del complejo I o II, utilizando dos H⁺ tomados de la matriz mitocondrial (Figura 5). Después de difundir a través de la MIM, el UQH₂ es oxidado en dos pasos con la liberación de dos H⁺ en el espacio intermembranal, vía el radical UQ^{•-}. Uno de los e^- se transfiere a la proteína de Rieske, después al citocromo c_1 y finalmente al citocromo *c*; mientras que el otro e^- es transferido al grupo hemo b_{566} del citocromo *b* y posteriormente es transportado a través de la membrana hasta el grupo hemo b_{562} , que reduce la UQ a UQ^{•-}. Una segunda molécula de UQH₂ se deshidrogena de la misma manera y el e^- que pasa a través de los centros del citocromo *b* se usa para reducir el UQ^{•-} a UQH₂ con la absorción de dos H⁺ de la matriz mitocondrial. El UQH₂ resultante difunde nuevamente a través de la membrana para volver a funcionar, mientras que la otra UQ

difunde hacia el complejo I. El resultado neto es el bombeo de 4H^+ por cada 2e^- que pasan a través del complejo (Metzler, 2003).

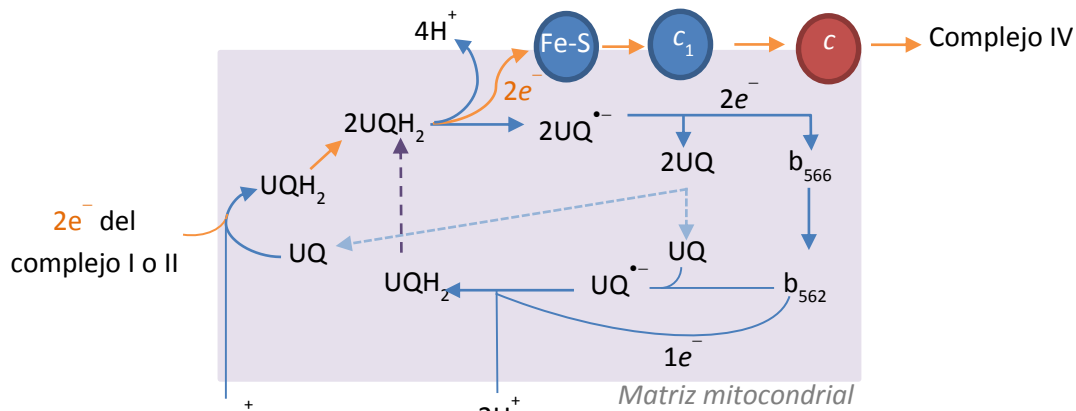


Figura 5. Ciclo de la ubiquinona o "Ciclo Q" (Metzler, 2003).

Después de recibir los e^- del complejo III, el citocromo *c* reducido difunde libremente en la cara externa de la MIM para posteriormente reaccionar con el complejo VI (Hansford et al., 2001).

La actividad del complejo III puede ser inhibida por diferentes compuestos cuya acción se efectúa en diferentes partes del mismo. Algunos de los inhibidores del complejo III más estudiados son: la antimicina A, que impide la transferencia de e^- del grupo hemo b_{562} al UQ; el mixotiazol, que se une a un punto muy cercano al citocromo b_{566} , actuando como un análogo del QH_2 ; y la estigmatelina, que se une a un punto cercano a la proteína de Rieske previniendo la oxidación del citocromo c_1 (Metzler, 2003; Voet & Voet, 2011).

1.4.1.4 Complejo IV o citocromo *c* oxidasa

La citocromo *c* oxidasa es el último complejo que conforma la CTE, en eucariontes consta de 8 a 13 subunidades. Las subunidades I, II y III son las más largas e hidrofóbicas y conforman el núcleo catalítico de este complejo, específicamente las subunidades I y II. Estas últimas, contienen cuatro centros con actividad redox: dos citocromos de tipo α , α_1 y α_3 , y dos centros de cobre (Cu), Cu_A y Cu_B . Se considera que la función de la subunidad III es meramente estructural debido a que no participa en la transferencia de e^- ni en la translocación de H^+ (Metzler, 2003; Saraste, 1999; Voet & Voet, 2011).

El complejo IV cataliza la oxidación consecutiva de cuatro moléculas reducidas de citocromo *c*, liberando en total 4 e⁻ que se emplean para reducir una molécula de oxígeno (O₂) y formar dos moléculas de agua (H₂O). De los estudios espectroscópicos se desprende que los e⁻ pasan del citocromo *c* al centro Cu_A, después al grupo hemo *a* y finalmente a un complejo binuclear formado por el grupo hemo *a*₃ y el centro Cu_B, en donde se efectúa la reducción de la O₂. Este último paso también requiere de 4 H⁺, obtenidos de la matriz mitocondrial por las subunidades I y II, que adicionalmente translocan 4 H⁺ al espacio intermembranal en cada ciclo, contribuyendo a la fuerza protón-motriz. En total, suman 8 H⁺ extraídos de la matriz mitocondrial en cada ciclo catalítico (Voet & Voet, 2011; Hansford et al., 2001).

Dentro de los compuestos capaces de inhibir la actividad del complejo IV se encuentran el cianuro, la azida, los iones sulfuro y el monóxido de carbono (CO). El cianuro se une específicamente al citocromo *a*₃ impidiendo su reducción, mientras que el CO compite con el O₂ por el sitio de unión (Metzler, 2003).

1.4.2 ATP sintasa o F₁F₀-ATP sintasa

La ATP sintasa es un complejo enzimático que emplea la fuerza protón-motriz generada por la CTE para fosforilar ADP y producir ATP. Su actividad se caracteriza por ser reversible, de tal forma que también puede hidrolizar ATP al bombear H⁺ en contra del gradiente electroquímico, es por ello que también se le conoce como ATPasa o F₁F₀-ATPasa (Metzler, 2003; Sarastre, 1999). En condiciones normales, la ATP sintasa es forzada a funcionar en dirección a la síntesis de ATP debido a la continua regeneración del gradiente de H⁺ y al consumo de ATP por la célula (Nicholls & Ferguson, 2002).

La F₁F₀-ATP sintasa mitocondrial está compuesta por 16 subunidades distintas que conforman dos dominios: F₁ y F₀. El dominio F₁ es el sector catalítico conformado principalmente por las subunidades hidrosolubles α y β presentes en triadas. En la subunidad β es donde se efectúa la síntesis de ATP a partir de ADP y Pi. Las demás subunidades que conforman el dominio F₁ son: γ , OSCP, δ , ϵ e IF₁. Éste dominio sobresale de la membrana interna hacia a la matriz mitocondrial y se caracteriza por su peculiar forma de perilla. El dominio hidrofóbico F₀ se encuentra embebido en la MIM, está compuesto por las subunidades: a, b, c, d, e, f, g, A6L y F6. El componente más abundante de este dominio

es la subunidad c, que forma un agregado de 12 a 14 subunidades en forma de cilindro hueco a través del cual se produce un flujo de H^+ del espacio intermembranal a la matriz mitocondrial, a este cilindro se le adosa la subunidad periférica a. Ambos dominios se encuentran unidos por las subunidades γ y b, que fungen de rotor central y eje lateral, respectivamente (Metzler, 2003; Saraste, 1999; Cano-Estrada & González-Halphen, 2011). En la Figura 6 se presenta un esquema de la estructura de la ATP sintasa en mamíferos.

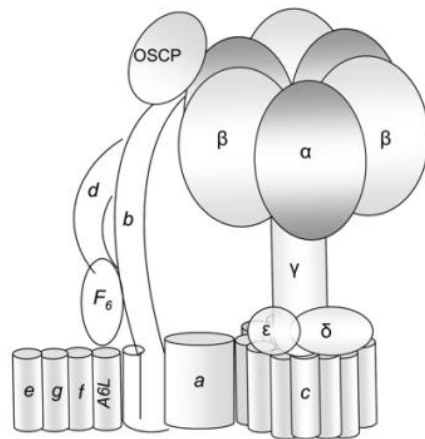


Figura 6. Estructura de la ATP sintasa mitocondrial en mamíferos (Cano-Estrada & González-Halphen, 2011).

El mecanismo de acoplamiento de ambas unidades es un mecanismo rotacional, donde el flujo de H^+ a través del canal F_0 impulsa el giro del rotor central o subunidad γ que conecta a F_1 con F_0 . Ambas unidades se mantienen fijas gracias a la subunidad b que actúa como estator periférico. El giro del rotor central provoca la alternancia de los sitios catalíticos del dominio F_1 en tres conformaciones distintas que se realizan de manera simultánea: una que une ADP y P_i , otra que los condensa y otra que libera al ATP de F_1 (García-Trejo et al., 2011).

Existe evidencia de que la ATP sintasa mitocondrial, dentro de su ambiente fisiológico, forma oligómeros. Se ha propuesto que este arreglo de la F_1F_0 -ATPasa induce la curvatura de las crestas mitocondriales, favoreciendo así la formación del gradiente electroquímico de protones (Cano-Estrada & González-Halphen, 2011).

La actividad de la ATP sintasa se inhibe en presencia de oligomicina, antibiótico producido por las bacterias del género *Streptomyces*. Este compuesto se une al dominio F_0 , donde

bloquea el paso de H^+ , impidiendo el giro del rotor central y en consecuencia evitando la fosforilación del ADP (Metzler, 2003).

1.5 Evaluación de la capacidad respiratoria y desacoplamiento mitocondrial

En los tejidos u órganos, el aumento en el trabajo requiere una mayor cantidad de energía, lo que implica, en la gran mayoría de los casos, un aumento en la velocidad de flujo de la fosforilación oxidativa, asociado al incremento en el consumo de oxígeno y al aumento en la síntesis de ATP. A esta relación directamente proporcional entre el consumo de oxígeno y la síntesis de ATP se le denomina “acoplamiento mitocondrial”; la regulación de la velocidad de la fosforilación oxidativa por los niveles de ADP se denomina control respiratorio (CR) (Hansford et al., 2001). El acoplamiento mitocondrial y el CR pueden estudiarse en experimentos *in vitro* empleando mitocondrias aisladas. Éstas responden aumentando su consumo de oxígeno en presencia de ADP, Pi, y algún sustrato de oxidación mitocondrial, como son: succinato, glutamato-malato o malato-piruvato. Este tipo de estudios se efectúan en microcámaras cerradas, utilizando una suspensión de mitocondrias en una solución amortiguadora, a la que se le mide la concentración de oxígeno disuelto por medio de un electrodo tipo Clark. De esta manera, se registran las variaciones en la concentración de oxígeno con respecto al tiempo, ante la adición de diferentes sustancias, ya sean: sustratos, inhibidores o desacoplantes de la respiración mitocondrial.

Las variaciones registradas en la velocidad de consumo de oxígeno al agregar sustratos, inhibidores o desacoplantes, se conocen como estados de respiración mitocondrial. En 1955, Chance y Williams definieron los cuatro estados de respiración mitocondrial en base a un protocolo experimental de oximetría cerrada empleando mitocondrias aisladas (Chance & Williams, 1955). El estado 1 representa la respiración mitocondrial basal en presencia únicamente de Pi y se mide adicionando la muestra biológica al amortiguador de respiración. El estado 2 expresa la respiración mitocondrial en presencia de Pi y algún sustrato de oxidación. El estado 3 registra la mayor velocidad de respiración, representa el consumo de oxígeno mitocondrial en presencia de ADP, sustrato de oxidación y Pi. El estado 4 se registra una vez que todo el ADP adicionado se ha fosforilado, provocando la

disminución de la velocidad de consumo de oxígeno. Teóricamente, la velocidad de consumo de oxígeno de los estados 4 y 2, tendrían que ser iguales, debido a que ambos estados representan la respiración mitocondrial en presencia de Pi y sustrato oxidable. Sin embargo, la presencia contaminante de actividad de ATPasa provoca una mayor velocidad de respiración en el estado 4, al hidrolizar el ATP generado y producir ADP constantemente. Para eliminar esa actividad contaminante, el estado 4 puede ser inducido mediante la adición de oligomicina, a este estado inducido se le conoce como “estado 4o” (Brand & Nicholls, 2011). En la Figura 7 se presenta una gráfica donde se observan los estados de respiración en un ensayo de oximetría; en el eje de las ordenadas se representa la concentración de oxígeno y en el eje de las abscisas al tiempo. Las pendientes que se registran a lo largo del ensayo representan las diferentes velocidades de consumo de oxígeno en los estados de respiración.

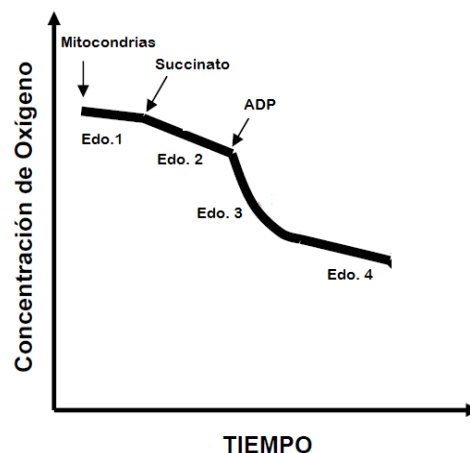


Figura 7. Evolución de la concentración de oxígeno en un estudio de oximetría mitocondrial (González-calvar & Coirini, 2004).

A partir de las velocidades de respiración registradas en el ensayo de oximetría, se puede evaluar la integridad de la muestra biológica estudiada mediante el cálculo del CR y la relación P/O. El primero se obtiene al dividir la velocidad de consumo de oxígeno registrada en el estado 3 entre la registrada en el estado 4. El segundo, representa la cantidad de moles de ATP sintetizado por moles de O ($1/2 O_2$) reducido. Existen diferentes técnicas por las cuales se puede medir la relación P/O, una de ellas es durante el ensayo de oximetría, donde se evalúa la cantidad de oxígeno consumido como resultado de la adición de una cantidad

conocida de ADP, cuando es evaluada por medio de esta técnica, la relación se suele nombrar como ADP/O (Hinkle, 2005).

Algunos libros de texto informan valores de ADP/O de 3 para los ensayos con sustratos relacionados a NADH y de 2 para succinato. Muchos han sido los trabajos dirigidos en determinar valores más exactos de este parámetro; sin embargo, los valores informados son muy variados debido principalmente a la gran cantidad de factores que pueden interferir en la medición. Muchas de estas investigaciones coinciden en que los valores son menores a los propuestos inicialmente, por lo que proponen los valores de 2.5 para los sustratos relacionados a NADH y de 1.5 para succinato (Metzler, 2003; Hinkle, 2005).

Al igual que en cualquier reacción de óxido-reducción acoplada a la generación de energía eléctrica o mecánica, la oxidación de los sustratos mitocondriales no es totalmente eficiente, llegando a presentar fugas energéticas. El aumento de la permeabilidad de la MIM puede producir la translocación de algunos H^+ del espacio intermembranal a la matriz reduciendo la eficiencia energética de la fosforilación oxidativa. Este fenómeno se conoce como desacoplamiento mitocondrial (Levine & Levine, 2006). Existen compuestos químicos conocidos como desacoplantes mitocondriales, capaces de disipar el gradiente de H^+ al permeabilizar la MIM, algunos ejemplos son: carbonilcianuro-p-trifluorometoxi-hidrazona (FCCP), carbonilcianuro-m-clorofenilhidrazona (CCCP) y el 2,4 dinitrofenol (Nelson, 2005). Los desacoplantes mitocondriales suelen ser empleados en el ensayo oximétrico para inducir la máxima respiración mitocondrial, conocida como “estado 3u”. Éste es controlado exclusivamente por la oxidación del sustrato, lo que permite detectar alguna disfunción en los componentes de la cadena respiratoria (Brand & Nicholls, 2011).

El desacoplamiento mitocondrial reduce la viabilidad celular y puede activar la apoptosis. Se presenta cuando la mitocondria queda funcionalmente comprometida y suele estar involucrado en casi todas las condiciones patológicas y toxicológicas (Neustadt & Pieczenik, 2008).

1.6 Especies reactivas de oxígeno (ERO) y estrés oxidativo

A pesar de que el oxígeno es indispensable para una gran cantidad de organismos, bajo ciertas condiciones este elemento puede ser tóxico. Resulta paradójico que un elemento imprescindible para la vida, sea al mismo tiempo dañino para los organismos que lo necesitan.

La toxicidad del oxígeno se atribuye principalmente a la formación de ERO. En condiciones ambientales de presión y temperatura, el oxígeno se presenta en la forma O_2 , que requiere de $4 e^-$ para lograr llegar a una conformación más estable y por lo tanto menos reactiva, que es el H_2O . La reducción incompleta del O_2 genera compuestos aún más reactivos que el mismo O_2 (Figura 8). Estos compuestos se conocen como ERO, y hacen referencia tanto a radicales libres como: el anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), hidroxilo (HO^{\bullet}), peroxilo (RO_2^{\bullet}) y alcoxilo (RO^{\bullet}); así como también a especies altamente reactivas no radicales como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Kohen & Nyska, 2002).

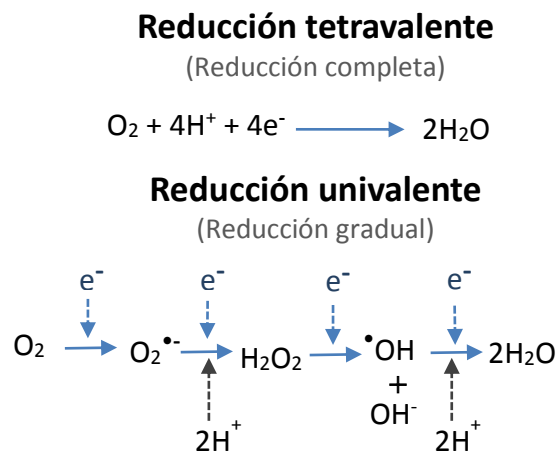


Figura 8. Reducción del O_2 ; formación de ERO a partir de la reducción gradual de O_2 .

Los radicales libres son especies químicas capaces de existir independientemente y que contienen uno o más e^- desapareados, lo que propicia que sean especies altamente reactiva. Bajo esta definición, el O_2 califica como un radical libre al tener dos e^- desapareados, cada uno localizado en un diferente orbital antienlace π^* y con spines paralelos (Halliwell & Gutteridge, 1999). En los organismos vivos también se producen radicales derivados de elementos distintos al oxígeno, tales como nitrógeno y azufre (Carocho & Ferreira, 2012).

Las ERO se producen normalmente en el organismo como producto del metabolismo celular, principalmente en la mitocondria, donde cerca del 1-3% del O₂ consumido en la CTE deriva en la formación de O₂^{•-}, específicamente en los complejos I y III (Halliwell & Gutteridge, 1999). Las ERO pueden participar en vías de señalización, así como en la defensa contra agentes infecciosos (Halliwell, 2011); sin embargo, debido a su alta reactividad, las ERO pueden oxidar a lípidos, proteínas y ADN. Por tal motivo, el organismo cuenta con una serie de compuestos que conforman una defensa capaz de neutralizar la reactividad de estas especies, a estos compuestos se les conoce como antioxidantes (Kohen & Nyska, 2002).

En condiciones normales existe un balance entre las ERO y los antioxidantes; sin embargo, existen factores externos y condiciones patológicas que favorecen la producción de ERO, conduciendo al organismo a un desbalance entre los agentes oxidantes y los antioxidantes, tal condición se conoce como estrés oxidativo (Carocho & Ferreira, 2012). Uno de los principales generadores y punto de daño de este desbalance es la mitocondria, que suele ser blanco común en la citotoxicidad producida por diversos compuestos químicos (Zorov, 2010). El daño oxidante generado en la mitocondria puede conducir a la célula a un daño letal mediante la disfunción respiratoria y consecuente reducción de la generación de ATP (Orrenius, 2007).

1.7 Antioxidantes

Muchas son las definiciones que se le han dado al término “antioxidante” según la aplicación que se le dé a estos compuestos, en lo que todas estas definiciones coinciden es que un antioxidante es un compuesto capaz de retrasar, evitar o eliminar el daño producido por las ERO en una molécula diana (Carocho & Ferreira, 2012).

Los organismos aerobios cuenta con una serie de compuestos endógenos con capacidad antioxidante para hacer frente a las ERO, estos compuestos conforman el sistema antioxidante. En el humano, este sistema se conforma por dos grandes grupos: los antioxidantes enzimáticos y los no enzimáticos.

Los antioxidantes enzimáticos están divididos en primarios y secundarios. Los primarios constan de aquellas enzimas que previenen la formación o neutralizan los radicales libres,

algunos ejemplos son: GPx, CAT, SOD y GST (Matés, et al., 1999). Los secundarios engloban a las enzimas que no neutralizan directamente a las especies reactivas, pero inducen la regeneración o producción de antioxidantes de acción directa, algunos ejemplos son: GR, G6PDH, γ -glutamato cisteína ligasa (γ GCL) y NQO1. En cuanto a los antioxidantes no enzimáticos, se pueden dividir en: vitaminas, cofactores de enzimas (Q_{10}), compuestos de nitrógeno (ácido úrico) y péptidos (GSH) (Carocho & Ferreira, 2012).

Los antioxidantes pueden ser endógenos, parte del sistema antioxidante del organismo, o exógenos, obtenidos como parte de la dieta. Algunos de los antioxidantes obtenidos en la dieta son incapaces de neutralizar de forma directa a las especies reactivas; sin embargo, promueven la actividad del sistema antioxidante del organismo (Rahman, 2007). La importancia de los antioxidantes exógenos se hace evidente en situaciones en las que el sistema antioxidante es insuficiente para neutralizar el exceso de ERO producidas, de tal forma que intervienen como apoyo al sistema antioxidante para evitar la generación de estrés oxidativo y poder mantener las funciones celulares (Pietta, 2000).

Los antioxidantes dietarios pueden catalogarse según su estructura y naturaleza química, algunos se caracterizan por la presencia de color, ejemplo de ellos son: algunos polifenoles, los carotenoides y las ficobiliproteínas. Estas últimas son cromoproteínas antena hidrosolubles presentes en cianobacterias y en ciertas algas eucariotas como *Rhodophytas* y *Cryptomonads*. Forman parte de una estructura fotosintética conocida como ficobilisoma, ubicada en la superficie exterior de la membrana tilacoidal. Su principal función es recolectar energía lumínica, que posteriormente se transfiere al fotosistema II (Eriksen, 2008).

Las ficobiliproteínas están compuestas por una holoproteína y un grupo prostético tetrapirrónico lineal conocido como ficobilina, responsable de la coloración de estas proteínas. Según la estructura de la ficobilina se pueden clasificar las ficobiliproteínas en: ficoeritobilinas y ficocianobilinas. Estas últimas se subdividen en: R-Ficocianina, C-Ficocianina (C-FC) y aloficocianina, de las cuales la C-FC es la más común (Eriksen, 2008).

1.7.1 C-Ficocianina

La C-FC es uno de los principales pigmentos fotosintéticos en el suplemento dietético spirulina, elaborado a partir de cianobacterias del género *Arthrospira*, principalmente *Arthrospira platensis* y *Arthrospira máxima*. También se le puede encontrar en otras cianobacterias y en las algas eucariotas *Rhodophytas* y *Cryptomonads* (Fernández-Rojas et al., 2014b; Koru, 2012; Ali & Saleh, 2012).

La C-FC está compuesta por dos unidades homólogas de tipo globina conocidas como α y β , ambas subunidades se unen formando el monómero $\alpha\beta$, que forma de manera natural agregados como trímeros ($\alpha_3\beta_3$) y hexámeros ($\alpha_6\beta_6$), siendo este último la forma funcional de la C-FC. La subunidad α está unida covalentemente a una ficobilina conocida como ficocianobilina (FCB), mientras que la subunidad β está unida a dos FCB. Debido a sus numerosas insaturaciones conjugadas, la FCB presenta un pico de absorción cercano a los 620 nm, reflejando la luz de color azul (Eriksen, 2008; Fernández-Rojas, et al., 2014b).

Debido a su intensa coloración azul y por ser un alimento GRAS, la C-FC es empleada como colorante en la industria alimentaria y cosmética. Otros campos donde se emplea son: la medicina y la biotecnología; gracias a su propiedad fluorescente y su fuerte actividad antioxidante (Eriksen, 2008; Fernández-Rojas et al., 2014b).

En diversas investigaciones se ha demostrado su capacidad para neutralizar las siguientes ERO: HO^\bullet , RO^\bullet , $\text{O}_2^{\bullet-}$ (Romay et al., 1998), oxígeno singulete ($^1\text{O}_2$) (Tapia et al., 1999), RO_2^\bullet (Benedetti et al., 2010; Romay et al., 2000), anión peroxinitrito (ONOO^-) (Bhat y Madyastha, 2001), óxido nítrico ($^\bullet\text{NO}$) (Thangam et al., 2013) y H_2O_2 (Fernández-Rojas et al., 2014a). También se ha descrito su capacidad para inhibir la lipoperoxidación así como también su capacidad antiinflamatoria (Romay et al., 1998; Fernández-Rojas et al., 2014a).

La capacidad antioxidante de la C-FC se le atribuye a la FCB, debido a la similitud estructural que guarda con la biliverdina, precursor de la bilirrubina, antioxidante natural presente en el plasma sanguíneo. Con base en ello, se ha propuesto que el mecanismo de acción *in vivo* de la C-FC es semejante al de la biliverdina, al ser susceptible a la actividad de la biliverdin reductasa, generando ficocianorubina, análogo de la bilirrubina (Eriksen, 2008). Durante el procesos de neutralización de las ERO se ha observado la decoloración de la C-

PC, reduciendo gradualmente su absorbancia a 620 nm (Patel et al., 2005, Benedetti et al., 2004; Lissi et al., 2000). En la Figura 9 se pueden apreciar las semejanzas estructurales de la FCB, la biliverdina y la bilirrubina.

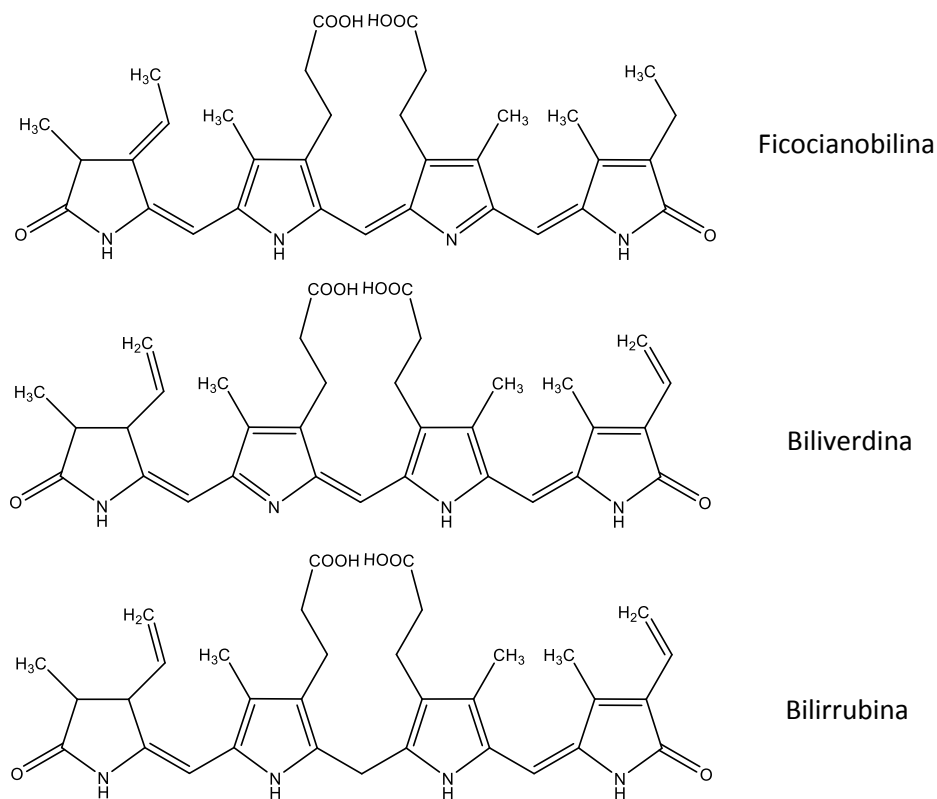


Figura 9. Estructura química de la ficocianobilina, biliverdina y bilirrubina (Fernández-Rojas et al., 2014b).

Se ha estudiado ampliamente el empleo de la C-FC como agente profiláctico del daño oxidante inducido por diferentes tóxicos en diversos órganos, tales como el hígado, páncreas (Ou et al., 2012), pulmón (Sun et al., 2011), cerebro (Pentón-Rol et al., 2011) y riñón (Rodríguez-Sánchez et al., 2012; Lim et al., 2013; Fernández-Rojas et al. 2015). Dentro de los estudios que describen la capacidad nefroprotectora de la C-FC, destaca el trabajo realizado por Fernández-Rojas et al. (2015), quien también describe la capacidad de la C-FC para prevenir el daño mitocondrial en la nefrotoxicidad inducida por cisplatino en ratones.

2. JUSTIFICACIÓN

El KBrO_3 es un agente oxidante cuyo uso se ha prohibido en muchos países; a excepción de México y Estados Unidos donde se sigue empleando como aditivo en la industria alimentaria y cosmética. Varios estudios en animales han comprobado que el KBrO_3 es un agente nefrotóxico y cancerígeno; sin embargo, no se ha determinado la participación de la mitocondria en el daño renal que causa, asociado a la generación de estrés oxidativo. Por lo tanto, fue de nuestro interés el describir el daño mitocondrial en la nefrotoxicidad inducida por KBrO_3 y analizar el uso profiláctico de un antioxidante, la C-FC, cuyas propiedades nefroprotectoras ya se han relacionado con la prevención del daño a nivel mitocondrial en otros modelos de daño renal.

3. HIPÓTESIS

Si el KBrO_3 causa nefrotoxicidad inducida por estrés oxidativo, es posible que induzca la pérdida de las funciones mitocondriales en el tejido renal; por lo tanto, gracias a sus propiedades antioxidantes, la C-FC será capaz de prevenir la nefrotoxicidad y las alteraciones mitocondriales inducidas por KBrO_3 .

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Evaluar las alteraciones mitocondriales renales en la nefrotoxicidad inducida por KBrO_3 ; así como el efecto de un pre-tratamiento con C-FC, a nivel renal y mitocondrial.

4.2 Objetivos específicos

- Establecer las condiciones adecuadas para el aislamiento de mitocondrias de riñón.
- Determinar las alteraciones en la función mitocondrial causadas en la nefrotoxicidad inducida por KBrO_3 , a través de la determinación del CR, ADP/O, potencial de membrana, síntesis de ATP y actividad de los complejos mitocondriales.
- Evaluar los marcadores de estrés oxidativo y daño oxidante en los grupos de estudio.

- Establecer si la C-FC es capaz de prevenir o reducir el daño renal, el estrés oxidativo y las alteraciones mitocondriales.

5. DESARROLLO EXPERIMENTAL Y METODOLOGÍA

5.1 Reactivos

Los siguientes reactivos se adquirieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA): D-manitol (M9647), succinato de sodio dibásico (S2378), ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico (HEPES; H3375), albúmina sérica bovina (ASB; A-6793), albúmina sérica bovina libre de ácidos grasos (ASB FF; A-6793), ADP (A2754), FCCP (C2920), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA; EDS-100G), ácido clorhídrico (HCl), percoll (P1644), rotenona (R8875), sacarosa (S9378), 2,6-diclorofenol-indofenol hidrato de sal sódica (DCPIP) (33125), antimicina A (A8674), NADH (N8129), borohidruro de sodio (71321), decilubiquinona oxidada (DuB) (D7911), la decilubiquinona reducida (DuBH₂) se obtuvo tras la adición de borohidruro de sodio a la DuB, ácido malónico (M1296), citocromo c (C7752), el citocromo c reducido se obtuvo mediante la adición de ditionita de sodio al citocromo c oxidado, KBrO₃ (309087; LOT: MKBJ8193V), nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido (NADPH), nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP⁺), amplex red, peroxidasa de rábano (HRP), GSH, glutatión disulfuro (GSSG), ácido p-aminobenzoico, dodecil sulfato de sodio (SDS), 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), xantina, xantina oxidasa (XO), azul de nitrotetrazolio (NBT). De Merck (Darmstadt, Alemania) se obtuvieron los siguientes reactivos: fosfato dibásico de sodio anhidro (Na₂HPO₄; 567550), fosfato monobásico de sodio (NaH₂PO₄; 567545), cianuro de potasio (KCN; 104965), detergente Tween 20 (US1655206), Tritón X-100, cloruro de magnesio (MgCl₂; 442615), ditionita de sodio (SC0530). El fosfato de potasio dibásico (K₂HPO₄; 7088), y fosfato de potasio monobásico (KH₂PO₄) se adquirieron en Mallinckrodt (Paris, KY, USA). La C-FC fue donada por Parry Nutraceuticals (EID Parry (I) Ltd., India). Los kits para la determinación de creatinina plasmática y nitrógeno de urea en sangre (BUN) se adquirieron de Spinreact (Girona, España). Se empleó el kit de ensayo de proteínas Bio-Rad (500-0006) de Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, EUA). Como sedante se empleó pentobarbital sódico (Sedalphorte MR Reg Q-7503-003). El hipoclorito de sodio (NaClO) y el H₂O₂ se obtuvieron

de JT Baker (Xalostoc, Edo. México, México). Otros compuestos y reactivos usados fueron de alta pureza y se obtuvieron comercialmente.

5.2 Animales

Se utilizaron ratones machos de la cepa CD1 de 30-35 g de peso. Durante todo el estudio, se mantuvieron en cajas de acrílico bajo condiciones constantes de temperatura, humedad y ciclos de luz/oscuridad de 12 h, con alimento y agua *ad libitum*.

Todos los procedimientos en los ratones se apegaron a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. La manipulación de los animales se realizó procurando minimizar el sufrimiento de éstos. El proyecto fue aprobado por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de laboratorio (CICUAL, FQ/CICUAL/058/13), de la Facultad de Química, UNAM.

5.3 Tratamiento

Se emplearon 40 ratones distribuidos en 4 grupos:

1. Control: grupo de ratones administrados con solución salina 0.9% (SS) vía intraperitoneal (i.p.), la SS se empleó como vehículo de C-FC y KBrO_3 .
2. 15FC: grupo de ratones administrados con 15 mg/Kg peso cuerpo (p.c.) de C-FC vía i.p. por 3 días.
3. KBrO_3 : grupos de ratones administrado con SS por 3 días, hora y media después de la administración del tercer día, se les administró una sola dosis de 200 mg/Kg p.c. de KBrO_3 vía i.p.
4. 15FC+K: grupo de ratones administrados con 15 mg/Kg p.c. de C-FC por 3 días, hora y media después de la administración del tercer día, se les administró una sola dosis de 200 mg/Kg p.c. de KBrO_3 vía i.p.

Después de 24 h de evolución, los ratones se anestesiaron con pentobarbital sódico (70 mg/kg p.c; vía i.p.), se obtuvo una muestra de sangre del plexo axilar usando tubos eppendorf con heparina como anticoagulante, dichas muestras se centrifugaron a 300 g

durante 15 minutos y se almacenaron a 4°C hasta la determinación de los marcadores de función renal. Los ratones se sacrificaron por dislocación cervical y se les extrajo el tejido renal para realizar el aislamiento mitocondrial. En un duplicado de los cuatro grupos experimentales descritos con anterioridad, el tejido renal obtenido se congeló en nitrógeno líquido para su posterior homogeneización, en estas muestras se llevó a cabo la evaluación de la actividad de enzimas antioxidante y los marcadores de daño oxidante.

Previamente determinamos la dosis de KBrO_3 a utilizar. Se emplearon 6 grupos de 5 animales, a los que se les administró una dosis diferente de KBrO_3 , las dosis probadas fueron: 0, 190, 200, 225 y 250 mg/Kg de p.c. De igual forma se determinó la dosis de C-FC utilizada, se evaluaron 5 dosis diferentes de C-FC bajo el esquema de administración diaria durante 3 días, las dosis evaluadas fueron: 5, 10, 15, 30 y 45 mg/Kg de p.c.

5.4 Evaluación de la función renal

5.4.1 Creatinina en plasma

La determinación de creatinina en plasma se realizó mediante un ensayo colorimétrico empleando un estuche comercial cuyo fundamento se basa en la reacción de Jaffé (Figura 10). La creatinina presente en el plasma reacciona directamente con el picrato alcalino formando un complejo colorido, picrato-creatinina, cuya absorbancia se mide a 492 nm. El método se ajustó a una placa de 96 pozos con un volumen final de 200 μL , y se realizó en un lector de placas Synergy HT (BioTek instruments, VT, E.U.A). Los resultados se expresan como mg de creatinina/dL.

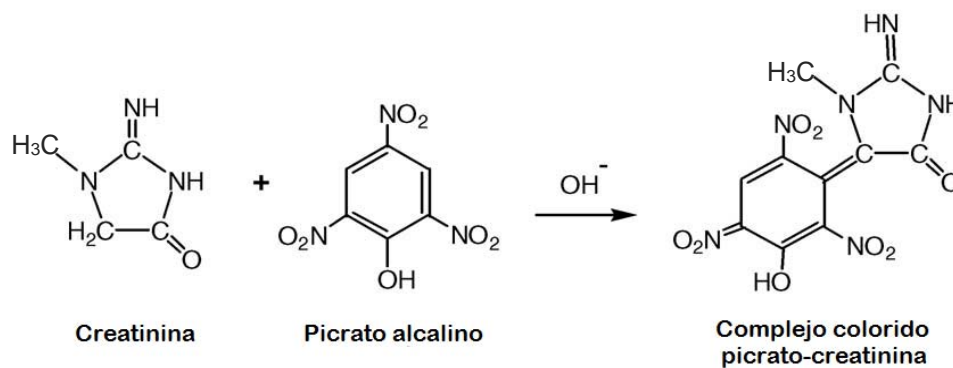


Figura 10. Reacción de Jaffé para la cuantificación de creatinina (Chen et al., 2006)

5.4.2 Nitrógeno de urea en sangre (BUN)

La concentración de urea en plasma se determinó mediante un ensayo colorimétrico empleando un estuche comercial. El ensayo consiste en la reacción de la urea presente en la muestra con ortoftaldehído en medio ácido para formar el complejo colorido ortoftaldehído-urea, cuya absorbancia se mide a 510 nm (Figura 11). El método se ajustó a una placa de 96 pozos con un volumen final de 300 μ L, y se realizó en un lector de placas Synergy HT. La cantidad de BUN se calcula dividiendo la concentración de urea entre 2.14, factor que resulta del cociente entre el peso molecular de la urea y el peso de dos átomos de nitrógeno. Los resultados se expresan en mg/dL.

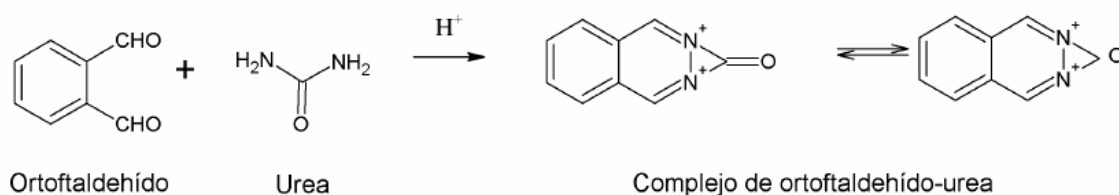


Figura 11. Reacción para la cuantificación de urea (Negrette Guzmán, 2012).

5.5 Preparación de los homogeneizados renales

El tejido renal se homogeneizó en un Polytron (Modelo PT 200; Brinkmann, Westbury, NY, EUA) por 10 segundos en amortiguador de fosfatos (50 mM, pH 7.0) con Triton X-100 (0.05%) a 4°C. Posteriormente los homogeneizados se centrifugaron a 19,000 x g y 4°C durante 30 minutos, el sobrenadante obtenido se separó para la determinación de proteína total, para evaluar la actividad de enzimas antioxidantes (CAT, GR, GPx, GST y SOD), los niveles de lipoperoxidación y la cantidad de proteínas oxidadas.

5.6 Cuantificación de proteína

La cuantificación de proteína se realizó utilizando el método de Bradford (1976), fundamentado en el cambio de coloración producto de la fijación del colorante azul de Coomassie en residuos de aminoácidos aromáticos y básicos. El método se ajustó a una

placa de 96 pozos con un volumen final de 200 μL , utilizando el reactivo comercial BIO-RAD protein assay. La lectura se realizó en un lector de placas Synergy HT.

5.7 Determinación de la actividad de enzimas antioxidantes

5.7.1 Catalasa

La actividad de la enzima CAT se determinó utilizando el método de Aebi (1982), en el que se evalúa la desaparición de H_2O_2 (30 mM) en presencia de la muestra a analizar, en este caso 10 μg de proteína de homogeneizado renal o amortiguador de fosfatos (50 mM, pH 7.4), este último para determinar la actividad inespecífica. Para evaluar la desaparición del H_2O_2 se realizó una cinética corta, con lecturas a 240 nm a los 0, 15 y 30 segundos (período en el que la descomposición del H_2O_2 sigue una cinética de primer orden) en un lector de placas Synergy HT. Para la determinación en mitocondrias renales se emplearon 5 μg de proteína mitocondrial en el ensayo. Los datos se expresan como k/mg de proteína, en donde k es la constante de reacción de primer orden.

5.7.2 Glutación peroxidasa

La actividad de la GPx se midió de manera indirecta por medio de una reacción acoplada con la actividad de la GR (Lawrence & Burk, 1976). La técnica se basa en la disminución de la absorbancia a 340 nm debido a la desaparición del NADPH. La GPx al reducir los hidroperóxidos consume GSH, que posteriormente es regenerado por la GR a partir de GSSG y NADPH (Figura 12).



Figura 12. Reacción acoplada para la determinación de la actividad de GPx.

La determinación se realizó en una placa de 96 pozos en un lector de placas Synergy HT. Brevemente, a una mezcla de reacción compuesta por: GSH (1 mM), NADPH (0.2 mM) y GR (1 mM); se le adicionaron 0.1 mg de proteína de homogeneizado renal y H₂O₂ (2.5 mM) para iniciar la reacción. Para la determinación de la actividad inespecífica, la muestra se sustituyó con amortiguador de fosfatos (50 mM, pH 7.4). Se corrió una cinética de 3 minutos con lecturas cada minuto. Para la determinación en mitocondrias renales se emplearon 50 µg de proteína mitocondrial en el ensayo. Los resultados se expresan en unidades de actividad enzimática (U) entre mg de proteína (U/mg de proteína). La U representa la cantidad de enzima que en una reacción enzimática cataliza la conversión de 1 µmol de sustrato por minuto.

5.7.3 *Glutación reductasa*

Para medir la actividad de GR se empleó el método de Carlberg y Mannervik (1975), en el que se mide la desaparición de NADPH a 340 nm como resultado de la actividad de la enzima GR. Brevemente, a una mezcla de reacción con la siguiente composición: amortiguador de fosfatos (100 mM; pH 7.6), GSSG (1.25 mM), EDTA (0.5 mM) y NADPH (0.1 mM); se le adicionaron 0.1 mg de proteína renal para iniciar la reacción o amortiguador de fosfatos para medir la actividad inespecífica. Se corrió una cinética de 3 minutos con lecturas cada minuto. Para la determinación en mitocondrias renales se emplearon 50 µg de proteína mitocondrial en el ensayo. Los resultados se expresan en U/mg de proteína.

5.7.4 *Glutación S-transferasa*

La actividad de GST se determinó adicionando 0.2 mg de proteína renal a una mezcla de reacción compuesta por: amortiguador de fosfatos (50 mM, pH 6.5), GSH (1 mM) y CDNB (1 mM). La determinación se realizó en una placa de 96 pozos en un lector de placas Synergy HT. Los cambios en la absorbancia a 340 nm se midieron durante 3 minutos, la actividad de la enzima se calculó como los nmol formados de CDNB conjugado por min⁻¹ por mg⁻¹ de proteína utilizada, usando el coeficiente de extinción molar del CDNB de 9.6 mmol⁻¹cm⁻¹. Para la determinación en mitocondrias renales se emplearon 50 µg de proteína mitocondrial en el ensayo. Los resultados se expresan en U/mg de proteína.

5.7.5 Superóxido dismutasa

La actividad total de SOD se determinó por medio de un ensayo espectrofotométrico a 560 nm, empleando NBT como agente indicador. La SOD es capaz de inhibir la reducción del NBT a formazán por la acción de los aniones $O_2^{\bullet-}$ generados por el sistema xantina-XO. Brevemente, a una mezcla de reacción con la siguiente composición: xantina (0.122 mM), EDTA (0.122 mM), NBT (30.6 μ M), ASB (0.006%) y carbonato de sodio (Na_2CO_3 ; 49 mM); se le adicionaron 30 μ g de proteína renal y XO (5.5 U/L) para iniciar la reacción, se incubó a 27°C por 15 minutos. Para la determinación de la actividad inespecífica, la muestra se sustituyó con amortiguador de fosfatos (50 mM, pH 7.4). Posteriormente se adicionó cloruro de cobre ($CuCl_2$; 0.195 mM) para detener la reacción y la absorbancia se leyó a 560 nm. La lectura se realizó en un lector de placas Synergy HT. Para la determinación en mitocondria renal se emplearon 150 μ g de proteína en el ensayo. La cantidad de proteína capaz de inhibir la reducción de NBT a un 50% del máximo se definió como 1 U de SOD. Los resultados se expresan en U/mg de proteína.

5.8 Cuantificación de proteínas oxidadas

La cantidad de proteínas oxidadas se evaluó en base a los grupos carbonilo ($C=O$) originados por la acción de las ERO sobre algunos de los aminoácidos (leucina, valina, lisina, prolina, arginina, treonina e isoleucina) que conforman las proteínas. La determinación se fundamenta en la reactividad de los $C=O$ con la 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) para formar un complejo proteína-hidrazona (Figura 13) (Reznick et al, 1994; Levine et al., 1994; Sohal et al, 1993).

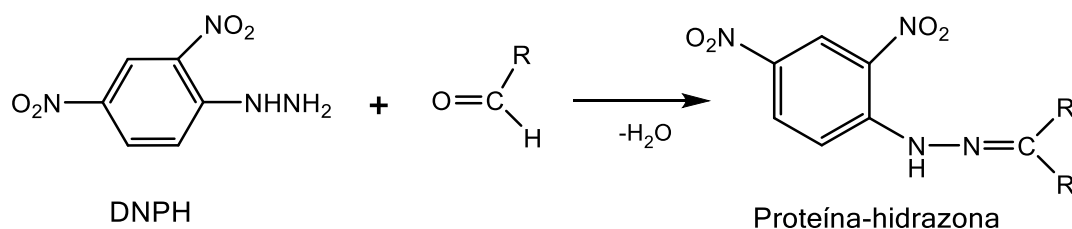


Figura 13. Reacción empleada para la determinación de proteínas oxidadas

Brevemente, 3 mg de proteína de homogeneizado renal se incubaron durante 15 minutos con una solución de sulfato de estreptomicina (1%) y se centrifugaron a 6,000 x g por 10 minutos a 4°C. Posteriormente, 150 µL del sobrenadante con DNPH (8 mM) y otros 150 µL del sobrenadante con HCl (2 M) se incubaron durante una hora a temperatura ambiente y en oscuridad, agitando en vórtex cada 15 minutos. Una vez terminado el tiempo de incubación, se adicionó ácido tricloroacético (ATC) al 3.3% a ambos ensayos y se volvió a incubar durante 10 minutos a 4°C. Se realizó una centrifugación a 2,236 x g por 10 minutos a 4°C y se desechó el sobrenadante. Se adicionaron 600 µL de ATC al 10%, se resuspendió y se volvió a centrifugar a 2,236 x g por 10 minutos a 4°C eliminando el sobrenadante. A continuación se añadieron 600 µL de una mezcla de etanol/acetato de etilo (1:1 v/v), se resuspendió y se centrifugó a 2,236 x g por 10 minutos a 4°C; se repitió 2 veces más el lavado con etanol/acetato de etilo. Finalmente se resuspendió el botón en 1 mL de guanidina-HCl (6 M), se incubó por 10 minutos a 37°C, se centrifugó a 5,000 x g por 3 minutos para eliminar cualquier partícula insoluble y se leyó la absorbancia del sobrenadante de cada tubo tratado con DNPH a 370 nm, usando el tubo tratado con HCl como blanco para su respectiva muestra. Se cuantifico la proteína total en cada una de las muestras al final de todo el tratamiento empleando una curva estándar de ASB (4 mg en 1 ml de guanidina/HCl 6.0 M) y midiendo la absorbancia a 280 nm. La lecturas se realizaron en un lector de placas Synergy HT. Los resultados se expresan en nmoles de carbonilos/mg de proteína total.

5.9 Determinación de lipoperoxidación

La lipoperoxidación se evaluó mediante la determinación del contenido de malondialdehído (MDA) presente en los homogeneizados renales. Para el ensayo se realizó una curva estándar con tetrametoxipropano. Paralelamente se mezclaron: 2.5 mg de proteína de homogeneizado renal, 650 µL de 1-metil-2-fenilindol (15.4 mM) disuelto en una solución de acetonitrilo: metanol (3:1), y 150 µL de HCl concentrado. La mezcla y la curva se incubaron durante 45 min a 40°C. Después se centrifugaron a 3,000 x g por 5 min, y se midió la absorbancia del sobrenadante a 586 nm en un lector de placas Synergy HT. Los valores se informaron como nmoles de MDA/mg de proteína.

5.10 Aislamiento de mitocondrias de riñón

Todas las etapas del aislamiento mitocondrial se realizaron a 4°C. Una vez sacrificados los animales, los riñones se removieron rápidamente, se enjuagaron y se homogeneizaron en amortiguador de aislamiento con la siguiente composición: D-manitol (225 mM), sacarosa (75 mM), EDTA (1 mM), HEPES (11 mM), ASB FF (0.1%), a pH 7.4. Se utilizó un homogeneizador tipo Potter-Elvehjem con pistilo de Teflón acoplado a un taladro. Los homogeneizados se sometieron a una serie de cuatro centrifugaciones. La primera se realizó a 1,100 x g durante 5 minutos. El sobrenadante se mezcló con una solución de percoll al 80% en una relación 11:1, y se estratificó cuidadosamente con una solución de percoll al 15% en una proporción 1.2:1. La segunda centrifugación se efectuó a 18,500 x g durante 15 minutos sin freno. Se recuperó la fracción enriquecida del fondo del tubo y se resuspendió en 1 mL de amortiguador de lavado con la siguiente composición: D-manitol (225 mM), sacarosa (75 mM), HEPES (11 mM) a pH 7.4. La tercera centrifugación se realizó a 10,000 x g durante 10 min. Se recuperó el botón mitocondrial, y se resuspendió en 1 mL de amortiguador de lavado. La cuarta y última centrifugación se efectuó a 10,000 x g durante 10 min. Finalmente, se recuperó el botón mitocondrial y se resuspendió en 100 µL de amortiguador de lavado.

5.11 Medición del consumo de oxígeno mitocondrial

Las mediciones se realizaron en un oxímetro SI modelo 782 equipado con un electrodo tipo Clark en una cámara de 500 µL modelo MT200 (Strathkelvin instruments, ML, Escocia). Se utilizaron muestras mitocondriales recién aisladas y un medio de respiración compuesto por: sacarosa (70 mM), D-manitol (220 mM), MgCl₂ (5 mM), KH₂PO₄ (10 mM), HEPES (25 mM), ASB (0.2%), EDTA (1 mM) y pH 7.2; a temperatura constante de 37°C. Como sustrato respiratorio se empleó glutamato (10 mM) con malato (5 mM) para la evaluación de la respiración a partir del complejo I, y succinato (10 mM) con rotenona (2 µM) para la evaluación de la respiración a partir del complejo II. Las mitocondrias aisladas (15 µg proteína para la evaluación con succinato y 30 µg para la evaluación con glutamato-malato) se agregaron a 100 µL de medio de respiración en agitación, registrando el consumo de oxígeno mitocondrial en presencia de Pi. Posteriormente se adicionaron los sustratos para

la CTE (succinato o glutamato-malato) y se midió la tasa de consumo de oxígeno equivalente al estado 2. Una vez estabilizado el consumo de oxígeno, se adicionó ADP (115 μM) para registrar el estado 3 o estado fosforilante, que corrió hasta agotarse todo el ADP adicionado, registrándose de esta manera el estado 4. Todos los estados se corrigieron en base a los μg de proteína mitocondrial empleados. Los valores de CR se calcularon dividiendo la velocidad de consumo de oxígeno en el estado 3 entre el estado 4.

5.12 Actividad enzimática de los complejos mitocondriales

Todos los ensayos se realizaron en placas de 96 pozos empleando un lector de placas Synergy HT. Se emplearon mitocondrias previamente aisladas y almacenadas a -80°C . Para la evaluación de la actividad de los complejos I y II de la CTE, las mitocondrias se lisaron mediante cuatro ciclos de congelación-descongelación. En el caso de los complejos III y IV, las muestras no tuvieron ningún pretratamiento.

La actividad específica de todos los complejos se calculó por medio de la sustracción de la actividad en presencia y en ausencia de su respectivo inhibidor.

5.12.1 Actividad del complejo I (NADH: ubiquinona oxidoreductasa)

Se empleó una técnica colorimétrica fundamentada en la decoloración del compuesto DCPIP, que funge como el aceptor artificial de los e^{-} procedentes de la oxidación del sustrato NADH por la actividad del complejo I, a través de la reducción y posterior oxidación de la DuB que participa como transportador de e^{-} del complejo I al DCPIP. La forma oxidada del DCPIP absorbe a 600 nm, por lo tanto, el decremento en la absorción a 600 nm es proporcional a la reducción del DCPIP producida por los e^{-} provenientes del NADH y por lo tanto es también proporcional a la actividad del complejo I (Metzler, 2003; Spinazzi et al., 2012).

Brevemente, en cada pozo se adicionaron 5 μg de proteína mitocondrial a una mezcla de reacción con la siguiente composición: amortiguador de fosfatos (41 mM, pH 7.4), ASB FF (3.5 mg/mL), DCPIP (67 μM), antimicina A (1 μM), NADH (0.2 mM) y KCN 0.2 (mM). Para determinar la actividad no enzimática se preparó un pozo paralelo idéntico al anterior y se le adicionó rotenona (13 μM) para inhibir la actividad del complejo I. Ambos pozos se

incubaron simultáneamente durante 5 minutos a 37°C. La actividad basal se midió en una cinética de 2 minutos con lectura de la absorbancia a 600 nm en intervalos de 30 segundos. A continuación se agregó DuB (3.12 mM) a cada pozo para comenzar la reacción, el decremento en la absorbancia se midió durante 3 minutos en intervalos de 20 segundos.

5.12.2 Actividad del complejo II (succinato: ubiquinona oxidoreductasa)

La técnica empleada para evaluar la actividad del complejo II comparte el mismo fundamento que la técnica anterior, la única diferencia radica en que el sustrato a utilizar debe ser succinato.

Brevemente, en cada pozo se adicionaron 5 µg de proteína mitocondrial a una mezcla de reacción con la siguiente composición: amortiguador de fosfatos (30 mM, pH 7.4), ASB FF (0.4 mg/mL), DCPIP (67 µM), antimicina A (1 µM), succinato de sodio (0.2 mM) y KCN (0.2 mM). Para determinar la actividad no enzimática se preparó un pozo en paralelo idéntico al anterior y se le adicionó ácido malónico (10 mM) para inhibir la actividad del complejo II. Ambos pozos se incubaron simultáneamente durante 10 minutos a 37°C. La actividad basal se midió en una cinética de 2 minutos con lectura de la absorbancia a 600 nm en intervalos de 30 segundos. A continuación se agregó DuB (3.12 mM) a cada pozo para comenzar la reacción. El decremento en la absorbancia se midió durante 3 minutos en intervalos de 20 segundos.

5.12.3 Actividad del complejo III (coenzima Q: citocromo c oxidoreductasa).

La técnica se fundamenta en la oxidación de la DuBH₂ y subsecuente reducción del citocromo c que absorbe a 550 nm, por acción del complejo III. (Metzler, 2003; Spinazzi et al., 2012).

Brevemente, en cada pozo se adicionaron 2.5 µg de proteína mitocondrial a una mezcla de reacción con la siguiente composición: amortiguador de fosfatos (30 mM, pH 7.4), ASB FF (0.4 mg/mL), Tween 20 (220 µM), rotenona (1 µM), MgCl₂ (0.6 mM), KCN (0.4 mM), EDTA (0.1 mM) y citocromo C oxidado (17 µM). Para determinar la actividad no enzimática se preparó un pozo en paralelo idéntico al anterior y se le adicionó antimicina A (1.8 mM) para inhibir la actividad del complejo III. Ambos pozos se incubaron simultáneamente durante 10 minutos a 37° C. La actividad basal se midió en una cinética de 2 minutos con lectura de

la absorbancia a 550 nm en intervalos de 30 segundos. A continuación se agregó DuBH2 (3.12 mM) a cada pozo para comenzar la reacción, el incremento en la absorbancia se midió durante 3 minutos en intervalos de 20 segundos.

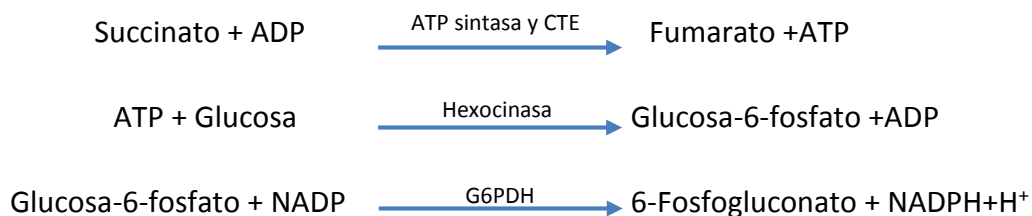
5.12.4 Actividad del complejo IV (citocromo C oxidasa)

La determinación de la actividad del complejo IV se fundamenta en la disminución de la absorbancia a 550 nm, consecuencia de la oxidación del citocromo c reducido por acción del complejo IV, mientras reduce O₂ a H₂O (Spinazzi et al., 2012).

En cada pozo se colocó mezcla de reacción con la siguiente composición: amortiguador de fosfatos (37 mM, pH 7.4), ASB FF (0.4 mg/mL), Tween20 (220 µM) y citocromo c reducido (17 µM). Para determinar la actividad no enzimática se preparó otro pozo idéntico al anterior y se le adicionó KCN (0.25 mM) para inhibir la actividad del complejo IV. Ambos pozos se incubaron simultáneamente durante 10 minutos a 37°C. La actividad basal se midió en una cinética de 2 minutos con lectura de la absorbancia a 550 nm en intervalos de 30 segundos. A continuación se agregaron 2.5 µg de mitocondrias a cada pozo para comenzar la reacción. El decremento en la absorbancia se midió durante 3 minutos en intervalos de 20 segundos.

5.13 Medición de la producción de ATP

La síntesis de ATP se evaluó al medir la producción de NADPH+H⁺ a 340 nm, como producto de las siguientes reacciones acopladas a la producción de ATP:



La determinación se realizó en una placa de 96 pozos empleando un lector de placas Synergy HT. En un pozo se adicionaron 30 µg de proteína mitocondrial recién aislada a una mezcla de reacción con la siguiente composición: glucosa (25 mM), succinato de sodio (15

mM), hexocinasa (4 U), NADP⁺ (2 mM) y G6PDH (10 U). La actividad basal se midió en una cinética de 3 minutos con lectura de la absorbancia a 340 nm en intervalos de 30 segundos. A continuación se agregó ADP (1.2 mM) a cada pozo para comenzar la reacción, el aumento de la absorbancia se midió durante 3 minutos con lectura cada 15 segundos. Una vez concluido ese tiempo se adicionó oligomicina (1.6 μ M) para inhibir la actividad de la ATP sintasa y se midió la actividad en presencia de oligomicina durante 2 minutos con lectura cada 15 segundos.

5.14 Potencial de la membrana mitocondrial

Se empleó un método indirecto para evaluar cualitativamente el potencial de la MIM. La técnica se basa en la medición de la distribución del colorante catiónico fluorescente, safranina, que difunde a través de la MIM por influencia del potencial de membrana (Zanotti & Azzone, 1980). El ensayo se realizó en un lector de placas Synergy HT, ajustado a las siguientes longitudes de onda: excitación-495 nm, emisión-586 nm. En una placa negra de 96 pozos se adicionaron 50 μ g de proteína mitocondrial recién aislada a 155 μ L de medio de respiración (apartado 5.11) con safranina (10 μ M). Se corrieron 3 cinéticas de 3 minutos con lectura cada 25 segundos; la primera fue una cinética basal, la segunda corrió al adicionar succinato (14 mM), y la tercera y última corrió al adicionar FCCP (20 μ M). El potencial de membrana se expresó como la diferencia del promedio de las unidades fluorométricas (UF) obtenidas cuando se adicionó el FCCP menos las que se obtuvieron cuando se adiciono el succinato. Los valores se representan como Δ UF/ mg de proteína.

5.15 Actividad de aconitasa

La actividad enzimática de la aconitasa se midió espectrofotométricamente siguiendo el incremento en la absorbancia a 240 nm como resultado de la formación de cis-aconitato a partir de isocitrato (Hausladen & Fridovich, 1994; Lodi et al., 2001). La determinación se realizó en un lector de placas Synergy HT, empleando una placa de 96 pozos para UV donde se colocaron 50 μ g de proteína mitocondrial en una mezcla de reacción con la siguiente composición: isocitrato (20 mM) y cloruro de manganeso (0.5 mM) en Tris HCl (50 mM, pH

7.4). La actividad se midió en una cinética de 2 minutos con lectura cada minuto. Para el cálculo de la actividad se utilizó el coeficiente de extinción milimolar del cis-aconitato a 240 nm de $3.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

5.16 Contenido de glutatión reducido (GSH) mitocondrial

El contenido de GSH mitocondrial se determinó mediante la formación de aductos fluorescentes con monoclorobimano (1 mM) en presencia de GST (1 U/L) y 50 μg de proteína mitocondrial. Se empleó una curva estándar de GSH en solución de Krebs-Henseleit pH 7.4. Los aductos se midieron en un lector de placas Synergy HT a 385 y 478 nm de excitación y emisión, respectivamente. Los valores se informaron como $\mu\text{mol/mg}$ de proteína.

5.17 Producción mitocondrial de peróxido de hidrogeno (H_2O_2)

Se empleó el sistema fluorométrico Amplex Red – HRP para evaluar la producción mitocondrial de H_2O_2 . En este sistema la HRP cataliza la reacción entre el Amplex Red y el H_2O_2 generado por la mitocondria, produciendo el compuesto fluorescente resorufina. La determinación se realizó en un lector de placas Synergy HT con los filtros de excitación y emisión de 530/25 y 590/35, respectivamente. En una placa negra de 96 pozos, se colocaron: 30 μg de proteína mitocondrial, Amplex Red (10 μM), HRP (4 U/mL) y amortiguador de fosfatos; y se corrió una cinética basal de 1.7 minutos con lectura cada 25 segundos. Posteriormente se adicionó succinato (2 mM) en cada pozo y se corrió una cinética de 3 minutos con lectura cada 20 segundos. Se realizó el mismo esquema de cinéticas empleando (10 μM). Para la calibración del método se realizó una curva tipo para cada condición (con y sin rotenona) empleando H_2O_2 de 0 a 6 nM (Starkov, 2010).

5.18 Análisis estadístico

Todos los resultados se expresaron como el promedio \pm error estándar de la media (EEM) de las observaciones. Los datos se analizaron por ANOVA y Student Newman Keuls para comparaciones múltiples. El software de GraphPad Prism 5 (San Diego, CA, EUA) se utilizó

para analizar estadísticamente. Las comparaciones con una $P < 0.05$ se consideraron significativas.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Establecimiento del modelo de daño renal.

Para determinar la dosis de KBrO_3 a utilizar en el modelo experimental, se realizó la evaluación de los marcadores de función renal BUN y creatinina en plasma de 4 dosis diferentes, 24 h después de la administración i.p. de KBrO_3 . Las dosis probadas se establecieron en base a las informadas por Watanabe et al. (2001) y por Bao et al. (2008), ambos trabajos emplearon ratones de diferente cepa a la utilizada en el presente trabajo.

Los resultados demostraron que las dosis de 200, 225 y 250 mg/Kg p.c. son capaces de inducir daño funcional renal asociado a un incremento significativo de los niveles de creatinina plasmática (Figura 14a) y BUN (Figura 14b) ($P < 0.05$) con respecto al grupo control (0 mg/Kg p.c. de KBrO_3). No obstante, las dosis de 225 y 250 mg/Kg p.c. fueron letales en un 50% de los animales tratados, razón por la que se determinó el uso de la dosis de 200 mg/kg como la más adecuada para inducir nefrotoxicidad en el modelo experimental.

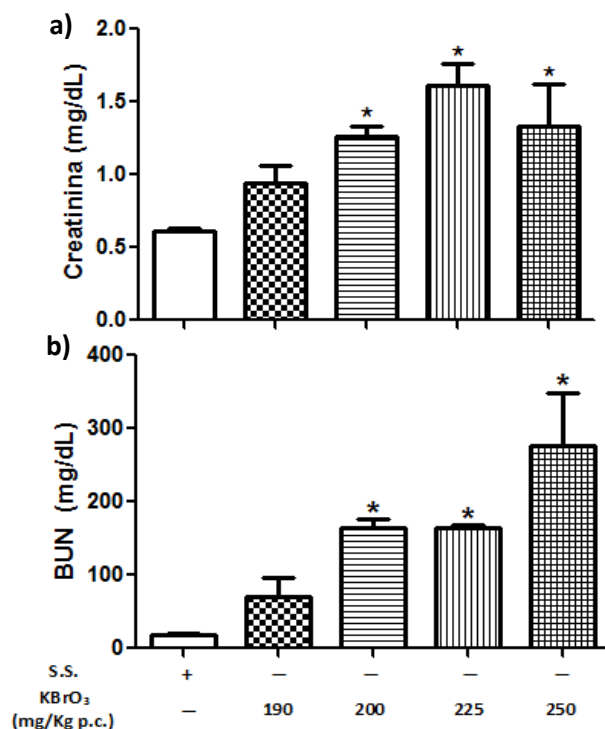


Figura 14. Efecto de la administración de bromato de potasio (KBrO₃) sobre los marcadores de función renal (a) creatinina y (b) nitrógeno de urea en sangre (BUN) de las diferentes dosis probadas. Los valores están representados como promedio ± EEM, n=12 para los grupos 0 y 200 mg/Kg, n= 6 para el grupo 190 mg/Kg, y n=3 para la dosis de 225 y 250 mg/Kg (la n inicial de estos dos últimos grupos era de 6 animales, sin embargo la mitad de los animales de ambos grupos murió antes de las 24 h). *P<0.05 vs. Control (0 mg/Kg p.c. de KBrO₃). Solución salina al 0.9% (S.S), peso cuerpo (p.c.)

6.2 Establecimiento del esquema de protección antioxidante.

La dosis de C-FC a emplear en el esquema de protección se determinó mediante la evaluación de los marcadores de función renal: creatinina plasmática (Figura 15a) y BUN (Figura 15b) en animales tratados con 0, 5, 10, 15, 30, 45 mg/Kg de C-FC, durante tres días previos a la administración de KBrO₃ (Fernández-Rojas et al. 2014a). Los resultados se presentan en la Figura 15, donde observamos que la dosis de 15 mg/Kg p.c. fue la única capaz de prevenir de manera significativa el daño en la función renal inducido por la administración de KBrO₃.

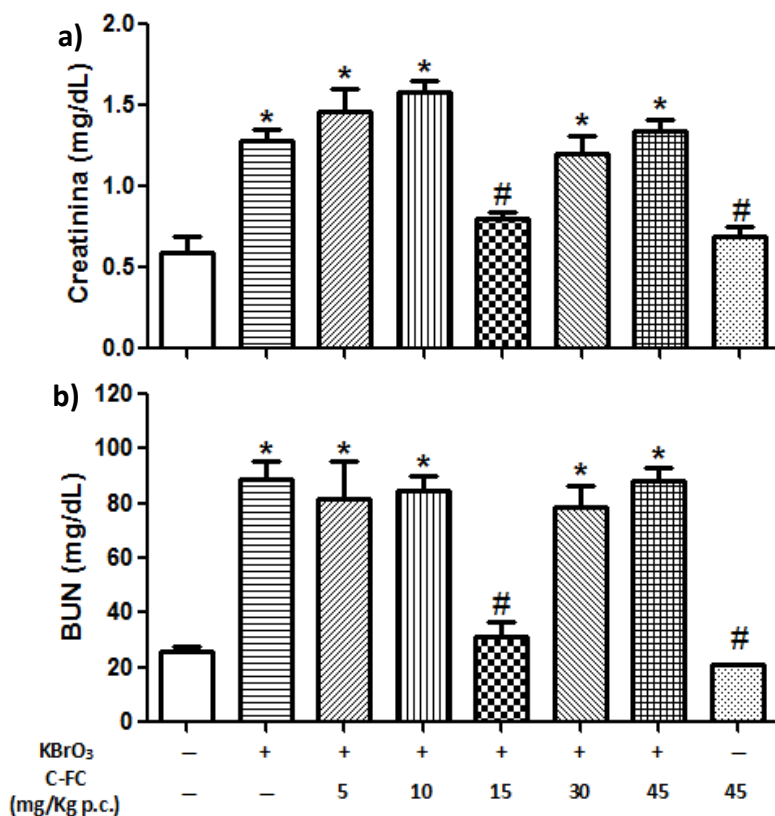


Figura 15. Efecto del pretratamiento de C-ficocianina (C-FC) en los marcadores de función renal (a) creatinina y (b) nitrógeno de urea en sangre (BUN) en ratones tratados con 0, 5, 10, 15, 30 y 45 mg /Kg C-FC, 3 días previos a la administración de bromato de potasio (KBrO₃). Los valores están representados como promedio \pm EEM, n=4-8. *P<0.05 vs. Control y #P<0.05 vs. KBrO₃.

Para corroborar el efecto profiláctico de la dosis seleccionada se evaluó un tercer marcador de función renal, la actividad de GPx extracelular en plasma. Esta enzima se produce principalmente en las células epiteliales del túbulo proximal en humanos, ratas y ratones; por lo que el daño en el tejido renal afecta la producción de la GPx extracelular provocando la disminución de su actividad en el plasma sanguíneo (Maser et al., 1994). Como se observa en la Figura 16, la administración de KBrO₃ redujo significativamente la actividad de la enzima GPx en plasma con respecto al grupo control. En apoyo a esta observación, en investigaciones previas se ha sugerido que la nefrotoxicidad inducida por KBrO₃ se origina en las células epiteliales del túbulo proximal debido a la presencia del transportador Na⁺/I⁻, capaz de transportar al BrO₃⁻ al interior de la célula, en donde produce estrés oxidante, comprometiendo la funcionalidad celular (Spitzweg et al., 2001). Este transportador

también se encuentra en la tiroides, otro tejido blanco de la toxicidad del KBrO_3 (Eskandari et al., 1997; Spitzweg et al., 2001).

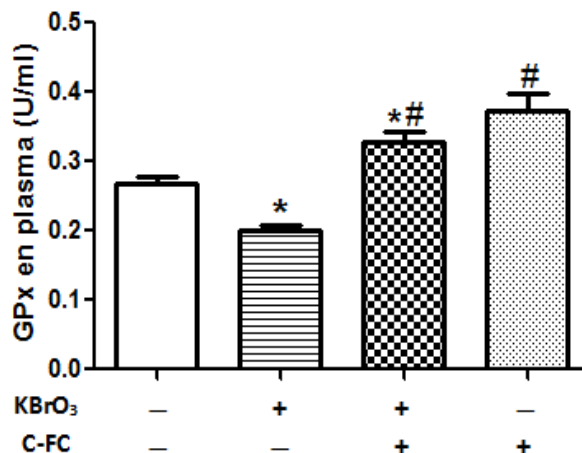


Figura 16. Efecto de la administración de bromato de potasio (KBrO_3 ; 200 mg/Kg p.c.) y del pretratamiento con C- ficocianina (C-FC; 15 mg/Kg p.c.) en la actividad de glutatión peroxidasa (GPx) en plasma. Los valores están representados como promedio \pm EEM, n=11. *P<0.05 vs. Control y #P<0.05 vs. KBrO_3 .

El pre-tratamiento por 3 días con 15 mg/Kg de C-FC previno la reducción en la actividad de GPx en plasma inducida por la administración de KBrO_3 , corroborando la capacidad renoprotectora de este antioxidante.

Una vez determinadas las dosis a emplear de KBrO_3 y de C-FC, se llevó a cabo la inclusión de los 4 grupos de estudio para determinar el efecto en el balance oxidativo, y en las funciones de las mitocondrias renales.

6.3 Evaluación del estrés oxidativo renal

Como se mencionó anteriormente, la generación intracelular de ERO es un proceso natural de gran importancia fisiológica; sin embargo, debido a la alta reactividad de estos compuestos, el organismo cuenta con un sistema antioxidante que neutraliza a las ERO generadas, evitando que reaccionen con las macromoléculas de la célula. El desbalance entre la cantidad de ERO y los agentes antioxidantes se conoce como estrés oxidante,

condición íntimamente relacionada con enfermedades crónico degenerativas y cuadros de intoxicación aguda por agentes oxidantes y/o tóxicos.

Por esta razón, fue de nuestro interés evaluar la actividad de algunas de las enzimas antioxidantes y los marcadores de daño oxidante en homogeneizados de tejido renal de los cuatro grupos estudiados. De esta manera se evaluó el efecto de la nefrotoxicidad por KBrO_3 en el balance oxidativo renal y la capacidad de la C-FC para prevenirlo.

6.3.1 Actividad de enzimas antioxidante

Se ha informado previamente que el KBrO_3 es un compuesto capaz de afectar la actividad de diversas enzimas antioxidantes en el riñón, tanto en ratas como en ratones bajo diferentes esquemas de administración. En ratas, se ha demostrado que la administración de KBrO_3 es capaz de reducir la actividad de las enzimas GST, GR, CAT, GPx, G6PDH y SOD (Khan et al., 2004; Khan & Sultana, 2004 y 2005; Kujawska et al., 2013; Ke et al., 2013). Mientras que en ratones, solo se ha descrito la disminución de la actividad de GPx y CAT (Watanabe et al., 2001).

En el presente trabajo se evaluó la actividad de las enzimas GPx, CAT, GR, SOD y GST en homogeneizados renales. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 17, donde se observa que la administración de KBrO_3 redujo significativamente la actividad de las enzimas: GPx (Figura 17a), CAT (Figura 17b), GR (Figura 17c) y SOD (Figura 17d), en un 39, 39, 14 y 14% respectivamente. En la actividad de la enzima GST no se observaron cambios (datos no mostrados).

A pesar de que la administración de KBrO_3 redujo la actividad de casi todas las enzimas evaluadas, el efecto no fue tan acentuado como el descrito por otros grupos de investigación, quienes no solo han reportado una mayor reducción, en magnitud, a la observada en el presente trabajo, también han reportado la reducción de la actividad de GST (Khan et al., 2004; Khan & Sultana, 2004 y 2005; Kujawska et al., 2013; Ke et al., 2013; Watanabe et al., 2001).

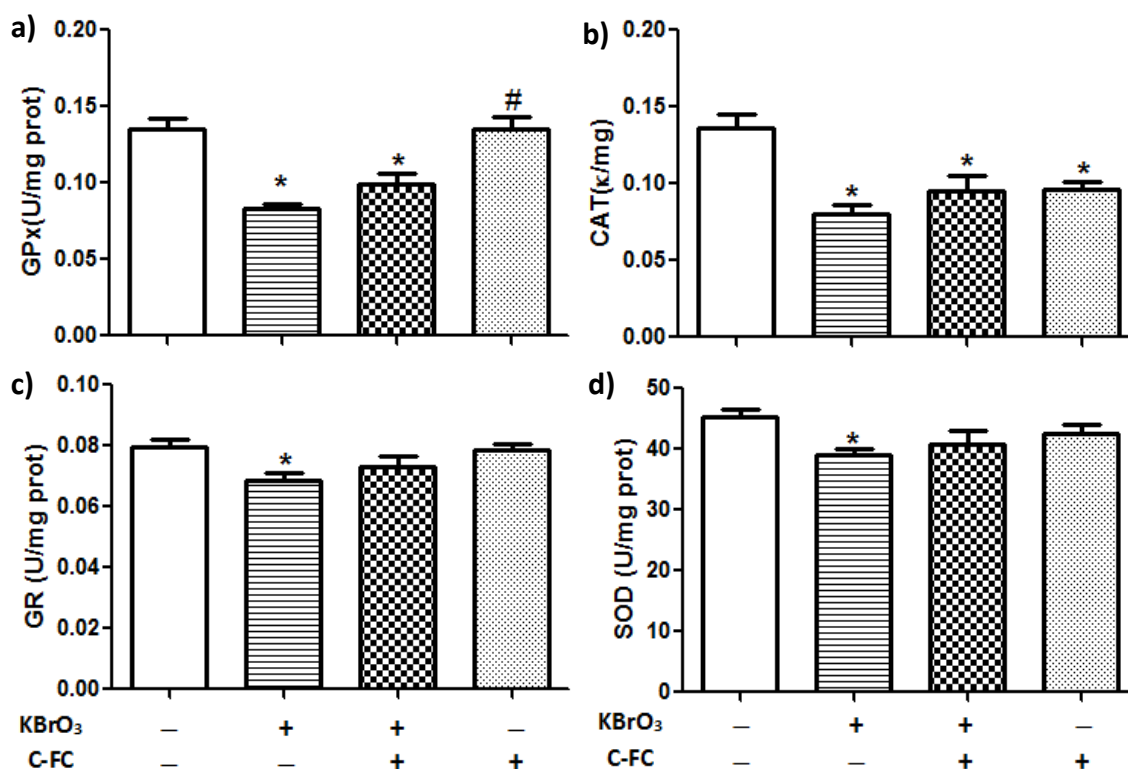


Figura 17. Efecto de la administración de bromato de potasio (KBrO₃; 200 mg/Kg p.c.) y del pretratamiento con C-ficocianina (C-FC; 15 mg/Kg p.c.) en la actividad de las enzimas antioxidantes (a) glutatión peroxidasa (GPx), (b) catalasa (CAT), (c) glutatión reductasa (GR) y (d) superóxido dismutasa (SOD) en homogeneizados renales. Los valores están representados como promedio ± EEM, n=7. *P<0.05 vs. Control y #P<0.05 vs. KBrO₃.

El pretratamiento con C-FC fue incapaz de prevenir el efecto negativo del KBrO₃ sobre la actividad de las enzimas GPx, CAT, GR y SOD. Adicionalmente, la sola administración de C-FC redujo significativamente la actividad de la enzima CAT en un 27% con respecto al grupo control; sugiriendo la afectación del balance oxidativo del organismo, a pesar de prevenir la nefrotoxicidad del KBrO₃.

6.3.2 Marcadores de daño oxidativo

Generalmente la aparición de estrés oxidativo es secundado por la generación de daño a las principales biomoléculas orgánicas por acción de las ERO generadas. La evaluación del daño oxidativo en el modelo estudiado se efectuó mediante la determinación en homogeneizados renales del contenido de proteínas oxidadas y de los niveles de MDA como marcador de lipoperoxidación.

Existe evidencia del efecto promotor del KBrO_3 sobre los niveles renales de MDA 24 h después de su administración en ratas (Sai et al., 1991; Khan et al., 2004; Khan & Sultana, 2004 y 2005; Karbownik et al., 2006; Kujawska et al., 2013) y en ratones (Bao et al., 2008). Sin embargo, en los resultados obtenidos en nuestra investigación no se encontró diferencia en los niveles de MDA entre los grupos estudiados (Figura 18a). El mismo comportamiento se observó en el contenido de proteínas oxidadas (Figura 18b), evidenciando la ausencia de daño oxidativo en el modelo estudiado a pesar de existir afectaciones en la actividad de las enzimas antioxidante evaluadas.

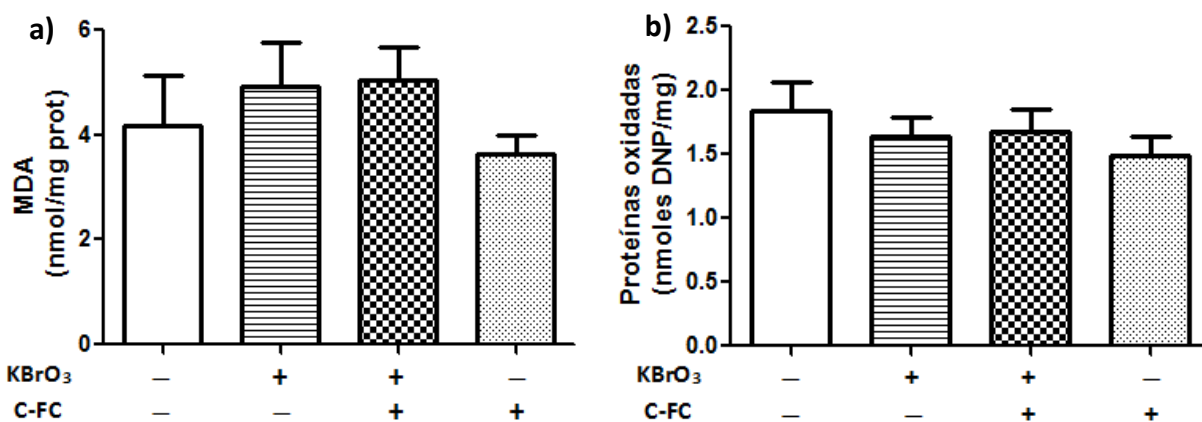


Figura 18. Efecto de la administración de bromato de potasio (KBrO_3 ; 200 mg/Kg p.c.) y del pretratamiento con C-ficocinaina (C-FC; 15 mg/Kg p.c.) en los marcadores de daño oxidante en homogeneizado renal (a) niveles de MDA y (b) proteínas oxidadas. Los valores están representados como promedio \pm EEM, n=7. *P<0.05 vs. Control y #P<0.05 vs. KBrO_3 .

La ausencia de daño oxidativo y la baja disminución en la actividad de las enzimas GPx, CAT, GR y SOD puede deberse tanto a una etapa temprana en la generación del estrés oxidativo, como a una etapa tardía o de recuperación. El hallazgo descrito por Watanabe et al. (2001) sobre el aumento y posterior descenso del nivel de MDA a valores basales durante las 24 h posteriores a la administración de KBrO_3 , apoya la hipótesis de una etapa de recuperación del estrés oxidativo en el modelo estudiado.

6.4 Evaluación de la función mitocondrial.

La mitocondria es el organelo encargado de producir gran parte de la energía requerida por la célula en forma de ATP mediante la fosforilación oxidativa. Durante este proceso también se genera una gran cantidad de ERO derivadas del empleo de O_2 como aceptor final de e^- en la CTE.

Debido a que la mitocondria es una de las principales fuentes de ERO en la célula, suele participar en la generación de estrés oxidante en enfermedades crónico degenerativas como el Parkinson (Blesa et al., 2015) y en algunos cuadros de intoxicación aguda como la nefrotoxicidad inducida por dicromato de potasio (Molina-Jijón et al., 2011). La falla en alguna de las funciones mitocondriales, deriva generalmente en la disminución de la cantidad de energía metabolizada y/o en el aumento de la cantidad de ERO producidas.

En el caso de la nefrotoxicidad inducida por $KBrO_3$ se ha descrito la alteración de aproximadamente 13 genes involucrados en el funcionamiento mitocondrial como resultado de la administración oral de $KBrO_3$ durante 2 y 52 semanas (Ahlborn et al., 2009). También se ha encontrado, en esquemas similares de administración, el aumento de la actividad de las enzimas lactato deshidrogenasa y hexocinasa, considerado como una respuesta adaptativa en el metabolismo energético celular como resultado de la disfunción mitocondrial inducida por $KBrO_3$ (Ahmad et al., 2012; 2013).

A pesar de que existe evidencia del efecto de la exposición al $KBrO_3$ sobre la actividad de la mitocondria, aun no se han estudiado detalladamente las alteraciones en la funcionalidad de este organelo. Una de las técnicas más empleadas para evaluar la función mitocondrial es la oximetría, que mide el consumo de O_2 de mitocondrias aisladas en presencia de algún sustrato para la cadena de transporte de e^- , Pi y ADP.

6.4.1 Oximetría mitocondrial.

La evaluación del consumo de oxígeno mitocondrial se realizó en un respirómetro celular modelo MT200 (Strathkelvin), con microcámaras equipadas con electrodos tipo Clark, que miden el O_2 presente en una solución amortiguadora colocada dentro de ellas. El equipo también cuenta con un software que registra y grafica la concentración de O_2 disuelto en la solución amortiguadora con respecto al tiempo. Durante el ensayo, se procede a inyectar

en la microcámara las siguientes soluciones: mitocondrias aisladas, sustrato de la CTE y ADP, en orden de adición.

Las pendientes registradas en la gráfica a partir de la adición de cada una de las soluciones se denominan estados de respiración y representan la velocidad de consumo de O_2 mitocondrial bajo diferentes condiciones. En total se registran 4 diferentes estados de respiración: estados 1, 2, 3 y 4. Los estados 1 y 2 representan el consumo de oxígeno al adicionar la suspensión mitocondrial y el sustrato de la CTE, respectivamente. El estado 3 es la velocidad registrada después de la adición de ADP, se interpreta como el consumo de oxígeno durante la actividad de la CTE y la ATP sintasa. El estado 4 es la velocidad registrada al agotarse el ADP adicionado y representa el consumo de oxígeno basal por la CTE al parar la actividad de la ATP sintasa por falta de sustrato. La relación del estado 3 entre el estado 4 da por resultado el CR, valor que expresa el nivel de acoplamiento entre la función de la CTE y la fosforilación de ADP.

En la Figura 19 se presentan los gráficos registrados por el respirómetro representativos de cada uno de los grupos estudiados, estos se llevaron a cabo por animal. Las gráficas muestran sus respectivos valores de los estados 3 y 4, empleando succinato (Figura 19 a), como sustrato del complejo II, y glutamato-malato (Figura 19 b), como sustrato del complejo I de la CTE.

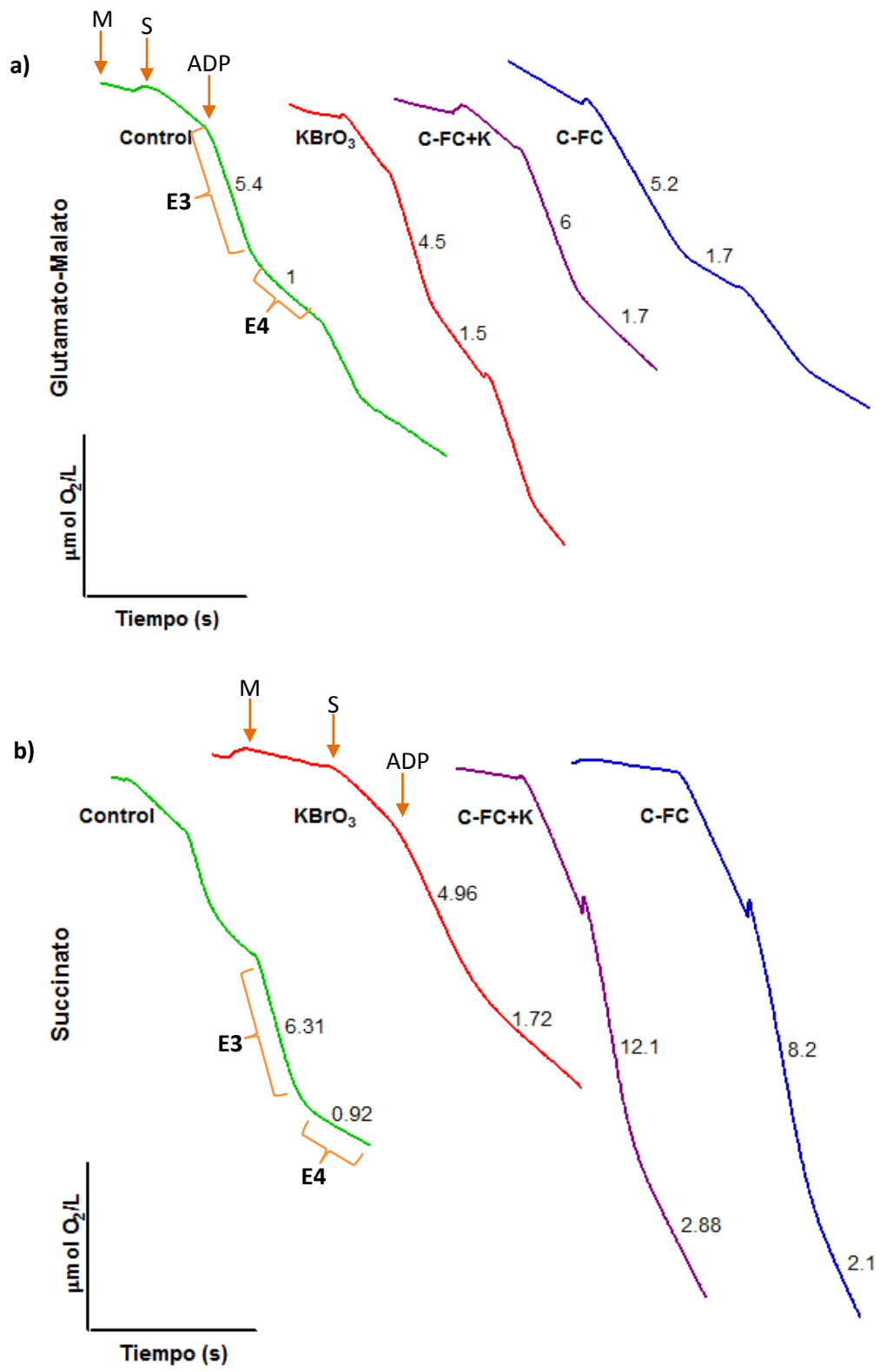


Figura 19. Trazos representativos del consumo de oxígeno de mitocondrias renales generados en el respirómetro, empleando (a) glutamato-malato y (b) succinato como sustratos respiratorios; los valores en los trazos pertenecen a lecturas puntuales. M: mitocondrias, S: sustrato, ADP: adenosín difosfato, E3: estado 3, E4: estado 4. Grupos control (verde), KBrO₃ (rojo), 15FC+K (morado) y 15FC (azul). Las unidades de los estados de respiración son ngAtO/min*ug.

En la Figura 20 se presenta la cuantificación de los estados 3 (Figura 20, a y c) y 4 (Figura 20, b y d) de todos los grupos de estudio empleando ambos sustratos. En ella se puede observar que la administración de KBrO_3 redujo la velocidad de consumo de O_2 en el estado 3, presentando diferencia significativa con respecto al control en el ensayo con succinato (Figura 20 c). En el caso del estado 4, la velocidad de consumo de O_2 se elevó como resultado del tratamiento con KBrO_3 , siendo estadísticamente significativo en el ensayo con glutamato-malato (Figura 20 b).

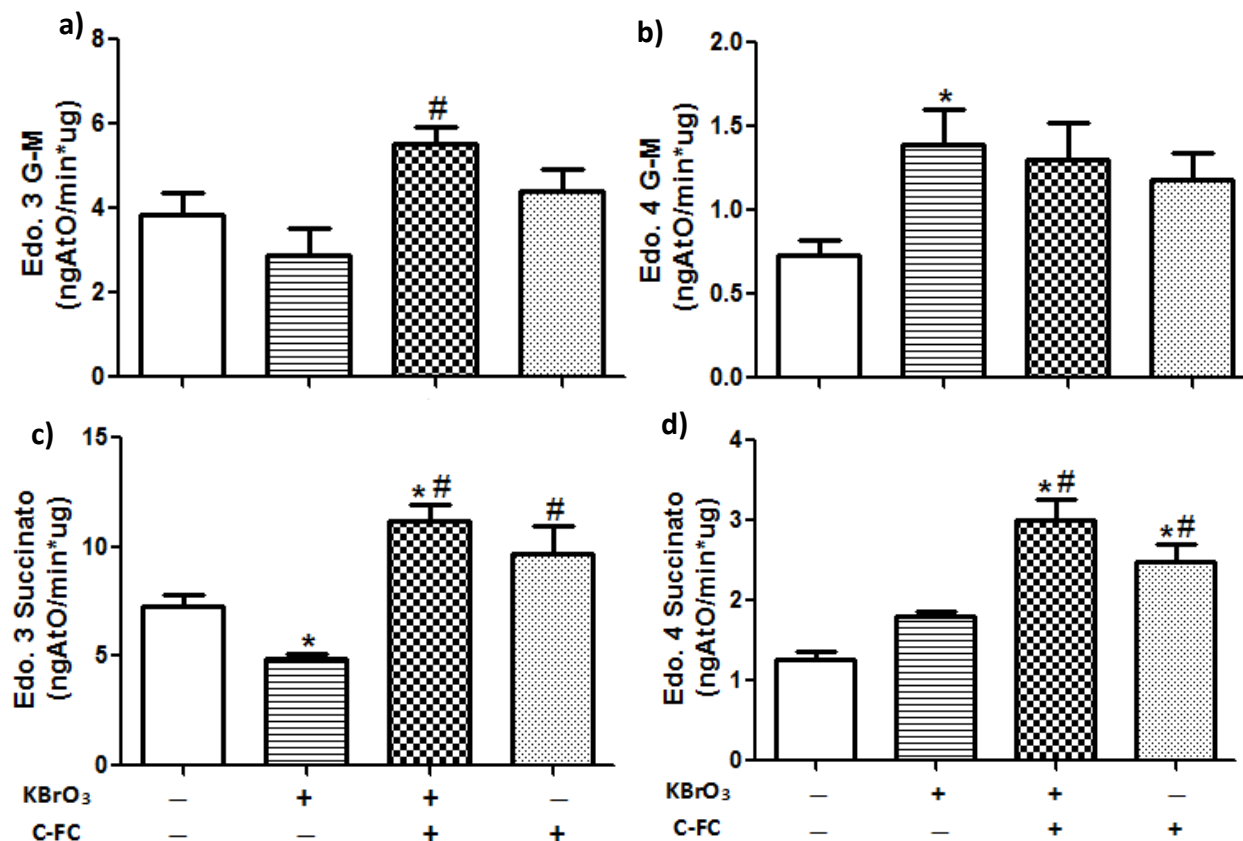


Figura 20. Efecto de la administración de bromato de potasio (KBrO_3 ; 200 mg/Kg p.c.) y del pretratamiento con C- ficocianina (C-FC; 15 mg/Kg p.c.) en los estados de respiración mitocondrial. En el panel superior se muestran los estados (a) 3 y (b) 4 empleando glutamato-malato (G-M) como sustrato para el complejo I; en el panel inferior se muestran los estados (c) 3 y (d) 4 empleando succinato como sustrato para el complejo II. Los valores están representados como promedio \pm EEM, (a y b) $n=7-11$, (c y d) $n=8-15$. * $P<0.05$ vs. Control y # $P<0.05$ vs. KBrO_3 .

El tratamiento con C-FC produjo un efecto en los estados de respiración diferente al esperado. La sola administración de C-FC elevó la velocidad de consumo de O_2 de los dos estados con ambos sustratos, alcanzando diferencia significativa en el estado 3 con respecto

al grupo tratado con KBrO_3 (Figura 20 c), y en el estado 4 con respecto a los grupos control y KBrO_3 en el ensayo con succinato (Figura 20 d). Estos resultados evidencian la capacidad de la C-FC de generar alteraciones en el funcionamiento mitocondrial. De igual manera, su empleo como agente profiláctico propició el aumento de la velocidad de consumo de O_2 de los estados 3 y 4 con ambos sustratos en el grupo tratado con C-FC y KBrO_3 . El incremento observado presentó diferencia significativa en la velocidad del estado 3 con respecto al grupo tratado con KBrO_3 en el ensayo con glutamato-malato (Figura 20 a), y en la velocidad de los estado 3 y 4 con respecto a los grupos control y KBrO_3 en el ensayo con succinato (Figura 20 c y d).

A partir de la división de los estado 3 y 4 se calcula el CR, parámetro que ayuda a evaluar el acoplamiento del transporte de e^- y la fosforilación de ADP en la mitocondria. La relación de los estados 3 y 4 del grupo tratado con KBrO_3 resultó en un CR significativamente menor al calculado para el grupo control al emplear glutamato-malato (Figura 21 a) y succinato (Figura 21 b). En el caso de los grupos tratados con C-FC, las alteraciones observadas en los

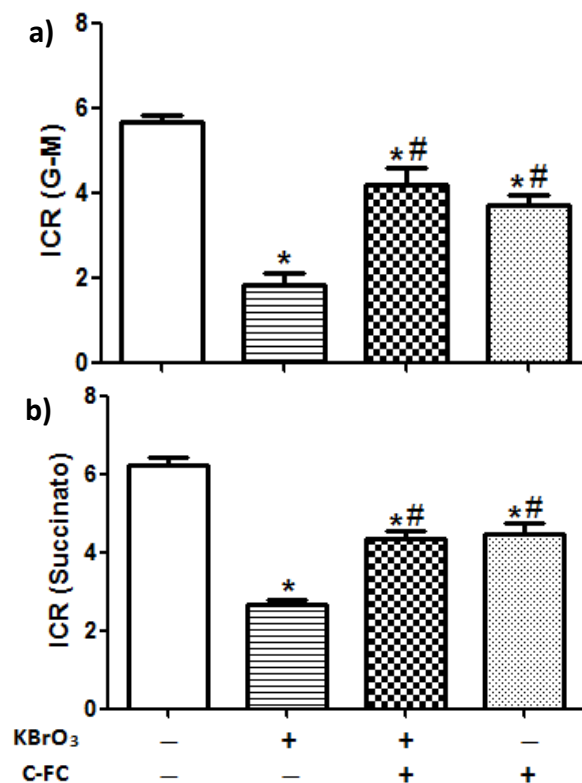


Figura 21. Efecto de la administración de bromato de potasio (KBrO_3 ; 200 mg/Kg p.c.) y del pretratamiento con C-ficocianina (C-FC; 15 mg/Kg p.c.) en el control respiratorio empleando (a) glutamato-malato (G-M) y (b) succinato como sustratos respiratorios. Los valores están representados como promedio \pm EEM, (a) $n=7-10$, (b) $8-15$. * $P<0.05$ vs. Control y # $P<0.05$ vs. KBrO_3 .

estados de respiración con ambos sustratos se vieron reflejadas en CR significativamente mayores al del grupo administrado con KBrO_3 y significativamente menores al del grupo control (Figura 21 a y b). Esto demuestra que a pesar de que la C-FC genera alteraciones en el funcionamiento mitocondrial al disminuir el CR, es capaz de prevenir parcialmente el desacoplamiento inducido por la administración de KBrO_3 .

Otro parámetro empleado para evaluar la funcionalidad mitocondrial es la relación ADP/O, se calcula dividiendo la cantidad de ADP adicionada durante el ensayo, previamente establecida, con la cantidad de O_2 consumido para su completa fosforilación (O_2 consumido durante el estado 3). A pesar de que los valores exactos de dicho parámetro para una mitocondria funcional aún no se han establecido, varios informes coinciden en reportar valores de 2.5-3 en ensayos que emplean sustratos para el complejo I, y de 1.5-2 en ensayos con sustratos para el complejo II (Hinkle, 2005). El grupo control presentó valores similares en los ensayos con glutamato-malato (Figura 22 a) y con succinato (Figura 22 b).

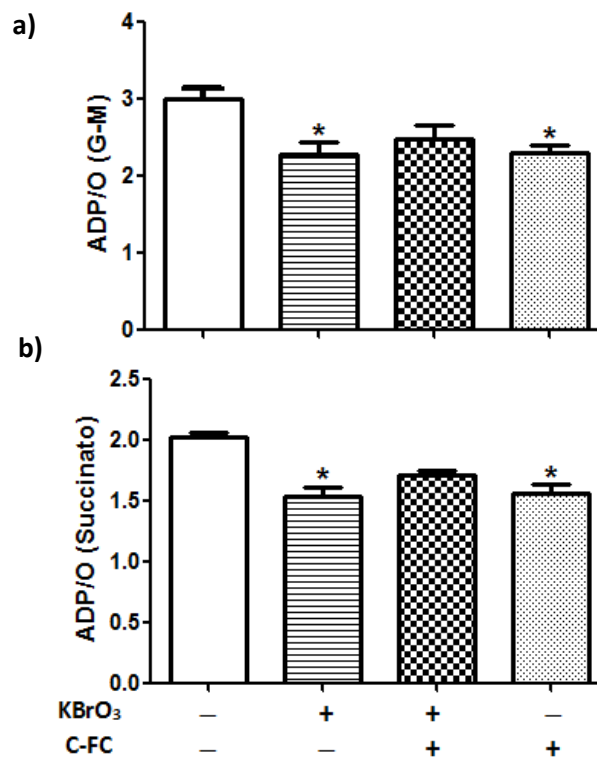


Figura 22. Efecto de la administración de bromato de potasio (KBrO_3 ; 200 mg/Kg p.c.) y del pretratamiento con C- ficocianina (C-FC; 15 mg/Kg p.c.) en la relación ADP/O empleando (a) glutamato-malato (G-M) y (b) succinato como sustratos respiratorios. Los valores están representados como promedio \pm EEM, (a) n=7-9, (b) n=8-15. *P<0.05 vs. Control.

La administración de KBrO_3 al igual que la sola administración de C-FC, provocaron la reducción significativa del valor de ADP/O con respecto al grupo control, evidenciando su efecto desacoplante al elevar la cantidad de O_2 requerido para fosforilar al ADP adicionado, en el ensayo con glutamato malato (Figura 22 a), así como con succinato (Figura 22 b). El mismo efecto se observó en el grupo tratado con ambos compuestos; sin embargo, éste no presentó diferencia significativa con respecto al grupo control con ninguno de los dos sustratos (Figura 22 a y b).

6.4.2 Síntesis de ATP

La cuantificación del ATP sintetizado por las mitocondrias aisladas es otra manera de analizar la integridad mitocondrial, de esta forma se evalúa la función general de la fosforilación oxidativa en la mitocondria e implícitamente se examina la capacidad de este orgánulo para proveer de ATP a la célula.

Dado que la síntesis de ATP depende plenamente de la respiración mitocondrial, un valor pequeño de CR suele verse reflejado en una baja síntesis de ATP en la mitocondria. Esta relación directa entre el valor de CR y la síntesis de ATP se observó en el grupo tratado con KBrO_3 , cuya síntesis de ATP, al igual que su CR, fue significativamente menor al del grupo control (Figura 23). Sin embargo, esta relación no se cumplió en los grupos tratados con C-FC, cuya síntesis de ATP no presentó ninguna alteración a pesar de haber registrado valores de CR significativamente menores a los del grupo control.

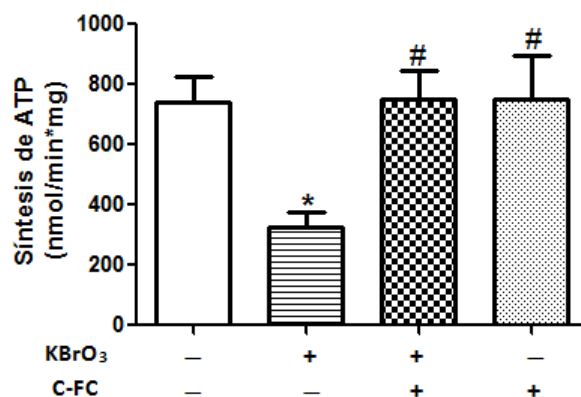


Figura 23. Efecto de la administración de KBrO_3 (200 mg/Kg p.c.) y el pretratamiento con C-FC (15 mg/Kg p.c.) en la síntesis de ATP en mitocondrias aisladas de tejido renal. Los valores están representados como promedio \pm EEM, n= 5-7. * $P < 0.05$ vs. Control y # $P < 0.05$ vs. KBrO_3 .

Si bien el esquema de tratamiento implementado con C-FC generó alteraciones en la función mitocondrial, estas alteraciones no parecen intervenir en el abastecimiento energético de la célula, e inclusive logran prevenir parcialmente el efecto tóxico del KBrO_3 sobre la mitocondria. En investigaciones previas se ha descrito el efecto protector de la administración C-FC sobre las alteraciones mitocondriales inducidas en diferentes esquemas de daño en modelos *in vitro* (Marín-Prida et al., 2012; Gupta et al., 2011) y en modelos *in vivo* (Fernández-Rojas et al., 2015). Sin embargo en ninguna de estas investigaciones se encontró algún efecto sobre el funcionamiento mitocondrial como resultado de la sola administración de C-FC, tal como se observó en la presente investigación.

6.4.3 Potencial de membrana mitocondrial.

El potencial de membrana mitocondrial es el potencial eléctrico que resulta de la separación de cargas positivas y negativas a través de la MIM. Alcanza un valor aproximado de 150 - 180 mV y junto a un pequeño gradiente de pH conforman la fuerza protón motriz (Δp) de aproximadamente 220 mV, generada durante el transporte de e^- por la cadena respiratoria a través de la MIM (Perry et al., 2011).

La Δp es aprovechada por la mitocondria para realizar diferentes funciones, como la síntesis de ATP, el transporte de proteínas, entre otras. Cada una de estas funciones consume cierto potencial eléctrico de la Δp , lo que provoca el aumento de la respiración mitocondrial para que la CTE logre su restablecimiento, tal como sucede al adicionar ADP durante la oximetría. Cada una de las funciones que hace uso de la Δp tiene ciertos requerimientos, en el caso particular de la síntesis de ATP, la Δp debe mantenerse en un 80 a 90% de su máxima capacidad. Cualquier afectación en el potencial de membrana mitocondrial tendrá un efecto negativo sobre las funciones que dependen de él (Nicholls & Ward, 2000).

La generación de estrés oxidante en la mitocondria puede producir su despolarización, al inducir el incremento de la permeabilidad de la MIM por medio de la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (Nicholls & Ward, 2000).

Una forma sencilla de evaluar cualitativamente la Δp es a través de la evaluación del potencial de membrana mitocondrial empleando el colorante safranina, caracterizado por ser un compuesto catiónico, lipofílico y fluorescente. Su empleo se basa en los cambios ópticos que sufre a partir de su distribución entre el espacio intermembranal y la matriz mitocondrial como efecto del potencial de membrana, así como también por su unión a sitios aniónicos de la MIM (Zanotti & Azzone, 1980).

La técnica empleada en esta investigación consta de dos etapas; en la primera, la safranina es internalizada en la mitocondria al adicionar un sustrato para la CTE; y en la segunda, el colorante es liberado al colapsar el potencial de membrana mediante la adición de FCCP. La diferencia entre la fluorescencia registrada en ambas etapas se reporta como el ΔUF , este valor es directamente proporcional al estado del potencial de membrana. Entre mayor sea el ΔUF registrado, mayor será la polarización de la membrana mitocondrial y en mejor estado se encontrará el potencial de membrana.

Los resultados de la evaluación del potencial de membrana de los grupos estudiados se presentan en la Figura 24, donde se observa que la administración de $KBrO_3$ tuvo en efecto adverso en el potencial de membrana al presentar un ΔUF significativamente menor al grupo control. Este efecto suele relacionarse con el daño a la integridad de la MIM, provocando la despolarización de la mitocondria y la subsecuente pérdida del potencial de membrana.

El pretratamiento con C-FC fue incapaz de prevenir el efecto adverso del $KBrO_3$, sin embargo su ΔUF no presentó diferencia significativa con ninguno de los otros grupos estudiados. Por sí sola, la administración de C-FC no presentó ninguna alteración en el potencial de membrana, presentando un ΔUF semejante al del grupo control (Figura 24).

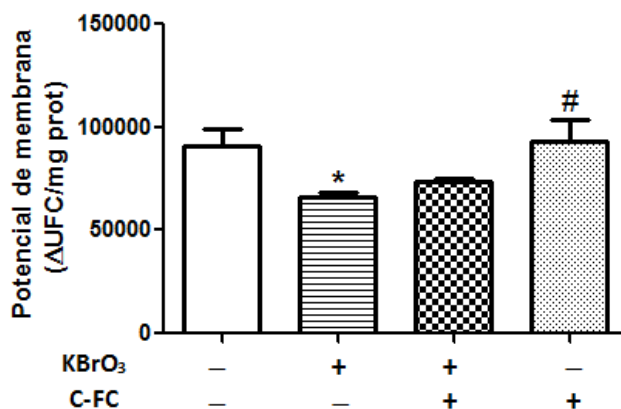


Figura 24. Efecto de la administración de bromato de potasio (KBrO₃; 200 mg/Kg p.c.) y el pretratamiento con C-ficocianina (C-FC; 15 mg/Kg p.c.) en el potencial de membrana de mitocondrias aisladas de tejido renal. Los valores están representados como promedio ± EEM, n= 5-7. *P<0.05 vs. Control y #P<0.05 vs. KBrO₃.

6.4.4 Actividad de los complejos mitocondriales

Si bien la oximetría y la evaluación de la síntesis de ATP son ensayos indispensables para describir la función mitocondrial, resulta complicado, basándonos en los parámetros obtenidos, determinar cuál de todos los complejos implicados se encuentra comprometido funcionalmente. Para ello, se procedió a evaluar de manera individual la actividad enzimática de cada uno de los complejos de la CTE. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 25, en donde se aprecia el efecto negativo de la administración del KBrO₃ sobre la actividad de todos los complejos, al presentar una actividad significativamente menor en comparación con el grupo control.

El pretratamiento con C-FC únicamente previno el efecto adverso del KBrO₃ sobre la actividad de los complejos I y II (Figura 25a y b), elevó significativamente la actividad del complejo III en comparación con los grupos control y KBrO₃ (Figura 25c), y fue incapaz de prevenir la reducción de la actividad del complejo IV (Figura 25d). La sola administración de C-FC no afectó la actividad de los complejos I, II y III; sin embargo, redujo significativamente la actividad del complejo IV.

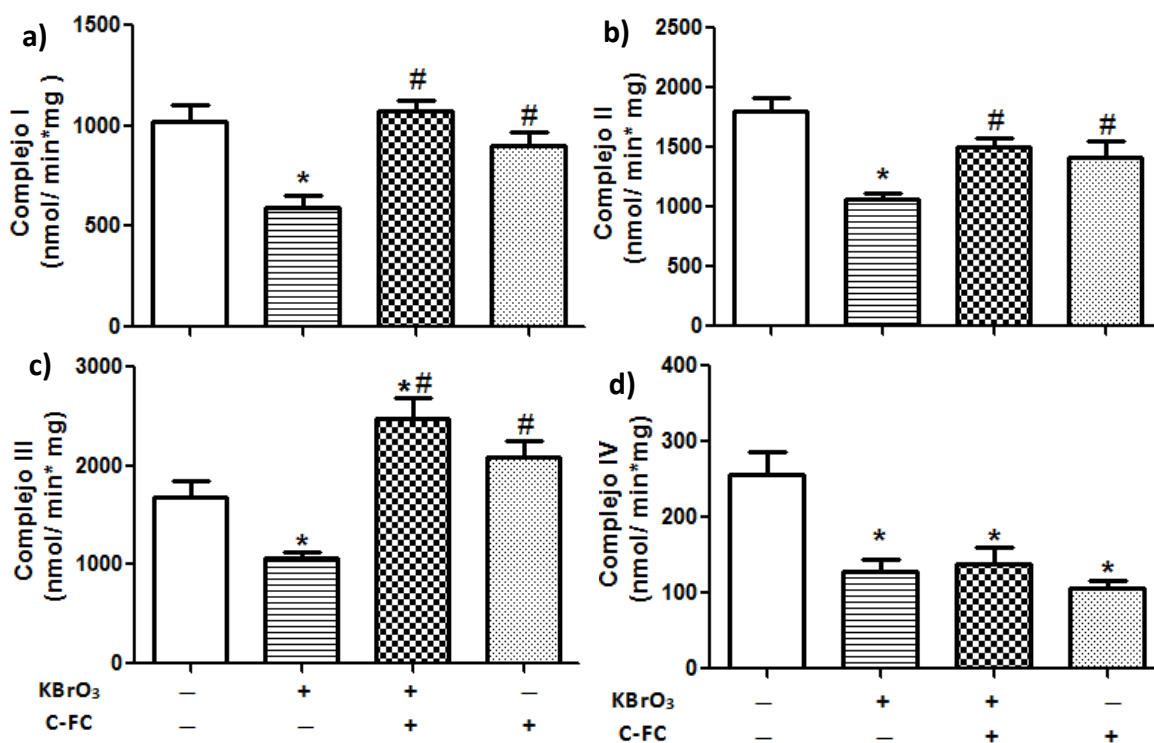


Figura 25. Efecto de la administración de bromato de potasio (KBrO₃; 200 mg/Kg p.c.) y del pretratamiento con C-ficocianina (C-FC ;15 mg/Kg p.c.) en la actividad de los complejos (a) I, (b) II, (c) III y (d) IV en mitocondrias aisladas de tejido renal. Los valores están representados como promedio ± EEM, n= 5-10. *P<0.05 vs. Control y #P<0.05 vs. KBrO₃.

6.5 Evaluación del estrés oxidativo en la mitocondria renal

El metabolismo energético mitocondrial es reconocido como una de las principales fuentes de ERO en la célula. El aumento en la cantidad de ERO puede conducir a la generación de estrés oxidativo y subsecuente daño mitocondrial, lo que a su vez promueve la producción de más ERO, expandiendo el daño a toda la célula.

6.5.1 Generación de H₂O₂ en la mitocondria.

En la mitocondria se han reconocido nueve sitios productores de ERO, destacando la actividad de los complejos I y III de la CTE (Andreyev et al., 2005). La principal ERO generada por la mitocondria es el O₂^{•-}, producto de la reducción monovalente del O₂ durante el transporte de e⁻ a través de los complejos mitocondriales. Debido a la alta reactividad del O₂^{•-}, éste es reducido rápidamente a H₂O₂ por acción de la SOD mitocondrial dependiente de manganeso (MnSOD). El H₂O₂ se caracteriza por ser más estable y menos reactivo que el

$O_2^{\bullet-}$, y gracias a su neutralidad electroquímica, puede difundir libremente a través de la membrana mitocondrial llegando al citosol. El H_2O_2 también es reconocido por ser precursor de una de las ERO más agresivas, el $^{\bullet}OH$ (Kowaltowski et al., 2009).

Debido a la rápida dismutación del $O_2^{\bullet-}$ a H_2O_2 y O_2 , la evaluación de la generación de ERO por la mitocondria suele enfocarse en la medición del H_2O_2 generado durante la actividad de la CTE. Para evaluar la participación de los complejos I y III en la generación del H_2O_2 , se suelen emplear durante el ensayo inhibidores de la actividad de dichos complejos.

La evaluación de la producción de H_2O_2 se efectuó empleando el sistema Amplex Red-peroxidasa, realizando cinéticas bajo diferentes condiciones. En la Figura 26 se presenta la generación H_2O_2 en las mitocondrias aisladas sin estímulo, en presencia de succinato y en presencia de succinato y rotenona.

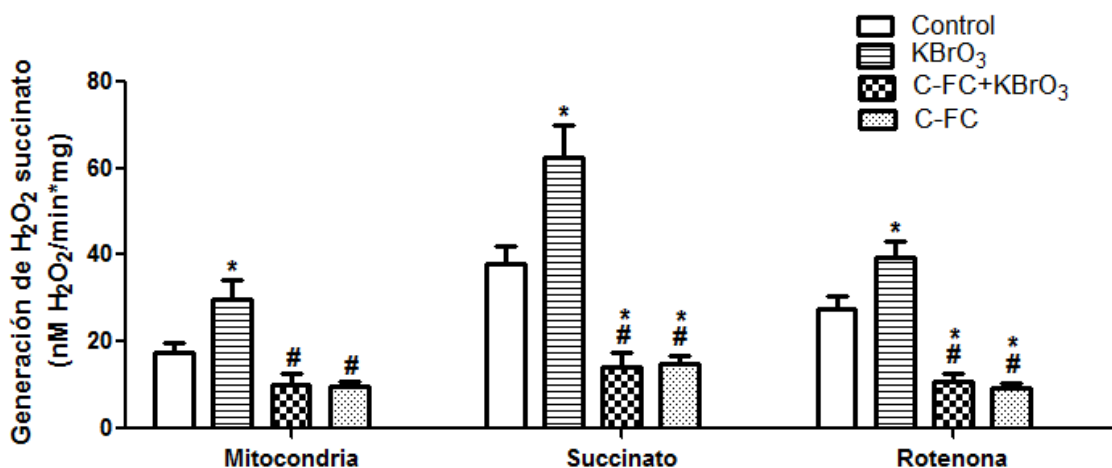


Figura 26. Efecto de la administración de bromato de potasio ($KBrO_3$; 200 mg/Kg p.c.) y del pretratamiento con C-ficocianina (C-FC; 15 mg/Kg p.c.) en la generación de H_2O_2 mitocondrial empleando succinato como sustrato. Los valores están representados como promedio \pm EEM, $n = 5-9$. * $P < 0.05$ vs. Control y # $P < 0.05$ vs.

La administración de $KBrO_3$ indujo el aumento significativo de la producción de H_2O_2 con respecto al grupo control en las mitocondrias aisladas sin ningún estímulo, en presencia de succinato y succinato-rotenona. El pretratamiento con C-FC previno el efecto promotor de la administración de $KBrO_3$ sobre la producción de H_2O_2 , llegando a reducir significativamente con respecto al grupo control la producción de H_2O_2 en presencia succinato y succinato-rotenona. El mismo comportamiento se observó en el grupo tratado

solo con C-FC. La reducción en la cantidad de H_2O_2 observada en los grupos tratados con C-FC también puede deberse a la interacción directa entre la C-FC y las ERO generadas por la mitocondria ($O_2^{\bullet-}$, H_2O_2), en dado caso que la C-FC lograra llegar de forma intacta a la mitocondria o en su defecto algún metabolito. Para descartar esta última posibilidad se podría realizar un estudio de HPLC en las mitocondrias aisladas y de esta manera determinar la presencia de C-FC.

El aumento de la producción de H_2O_2 en presencia de succinato es un fenómeno ya descrito en estudios mitocondriales *in vitro*, en los cuales se ha observado que la producción de ERO en mitocondrias aisladas está altamente influenciado por el sustrato respiratorio empleado. El uso de succinato como sustrato respiratorio en mitocondrias aisladas promueve la producción de ERO por el complejo I debido al flujo inverso de e^- ; sin embargo, al adicionar rotenona la producción de ERO disminuye debido a la inhibición de este complejo (Kowaltowski et al., 2009). El aumento significativo en la producción de H_2O_2 en el grupo tratado con $KBrO_3$ en presencia de succinato y succinato-rotenona sugiere que la administración de $KBrO_3$ promueve el aumento de la producción de ERO en los complejo I y III.

6.5.2 Daño oxidativo mitocondrial

Una de las formas más específicas para evaluar el daño oxidante en la mitocondria es por medio de la evaluación de la actividad de la enzima aconitasa, presente en la matriz mitocondrial. Esta enzima forma parte del ciclo de los ácidos tricarboxílicos donde cataliza la isomerización del citrato a isocitrato. Una de sus principales características es su alta susceptibilidad a la inactivación por $O_2^{\bullet-}$ debido a la presencia de un centro activo $[Fe_4S_4]^{2+}$, es por ello que la disminución en su actividad es considerada como un marcador de daño oxidante a nivel mitocondrial.

Los resultados de la evaluación de la actividad de esta enzima en los grupos estudiados se presentan en la Figura 27. En ella se observa que la administración de $KBrO_3$ redujo significativamente la actividad de aconitasa con respecto al grupo control, evidenciando la generación de estrés oxidante en las mitocondrias renales como resultado del tratamiento con este nefrotóxico. La administración de C-FC no solo previno el efecto negativo del $KBrO_3$

sobre la actividad de esta enzima, también incremento significativamente su actividad en los grupos tratados con este antioxidante en comparación al grupo control.

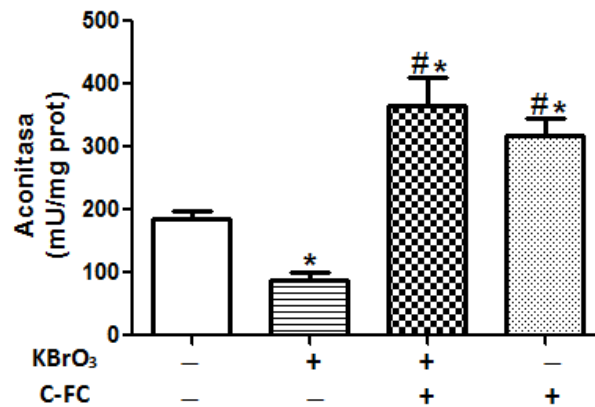


Figura 27. Efecto de la administración de bromato de potasio (KBrO₃; 200 mg/Kg p.c.) y del pretratamiento con C- ficocianina (C-FC; 15 mg/Kg p.c.) en la actividad de aconitasa en mitocondrias aisladas de tejido renal. Los valores están representados como promedio \pm EEM, n= 7-14. *P<0.05 vs. Control y #P<0.05 vs. KBrO₃.

El aumento de la actividad de la enzima aconitasa en los grupos tratados con C-FC puede estar íntimamente ligado con la baja producción de H₂O₂ registrada en los mismos grupos, dado que una baja cantidad de H₂O₂ representa una baja producción de O₂⁻, principal inactivador de la enzima en cuestión.

A pesar de que el pretratamiento con C-FC fue capaz de prevenir exitosamente la nefrotoxicidad inducida por la administración de KBrO₃, su efecto profiláctico en las alteraciones inducidas en el balance oxidativo del tejido renal así como en la función mitocondrial no fue el esperado. Por sí solo, el tratamiento con C-FC generó alteraciones en la actividad de la enzima CAT y en los parámetros de función mitocondrial, a pesar de no afectar la síntesis de ATP y prevenir la generación de daño oxidante en la mitocondria. Ante estos resultados, sería interesante realizar estudios más detallados sobre los efectos de la administración de C-FC en la función y biogénesis mitocondrial.

6.6 Efecto de la administración de KBrO_3 en el balance oxidativo mitocondrial

Para caracterizar completamente las alteraciones en la función mitocondrial producidas en la nefrotoxicidad inducida por KBrO_3 , se evaluó el balance oxidativo por medio de la determinación del contenido de GSH y de la actividad de las enzimas antioxidantes GPx, GR, CAT y SOD en mitocondrias renales aisladas del grupo tratado con KBrO_3 .

6.6.1 Actividad las enzimas antioxidantes mitocondriales

La actividad de las enzimas GPx, GR, CAT y SOD se evaluó en mitocondrias aislada del tejido renal únicamente de los grupos control y administrado con KBrO_3 . Lo resultados de esta determinación se muestran en la Figura 28, en donde se observa la significativa reducción en la actividad de las enzimas estudiadas como resultado del tratamiento con KBrO_3 , evidenciando la presencia de estrés oxidativo a nivel mitocondrial.

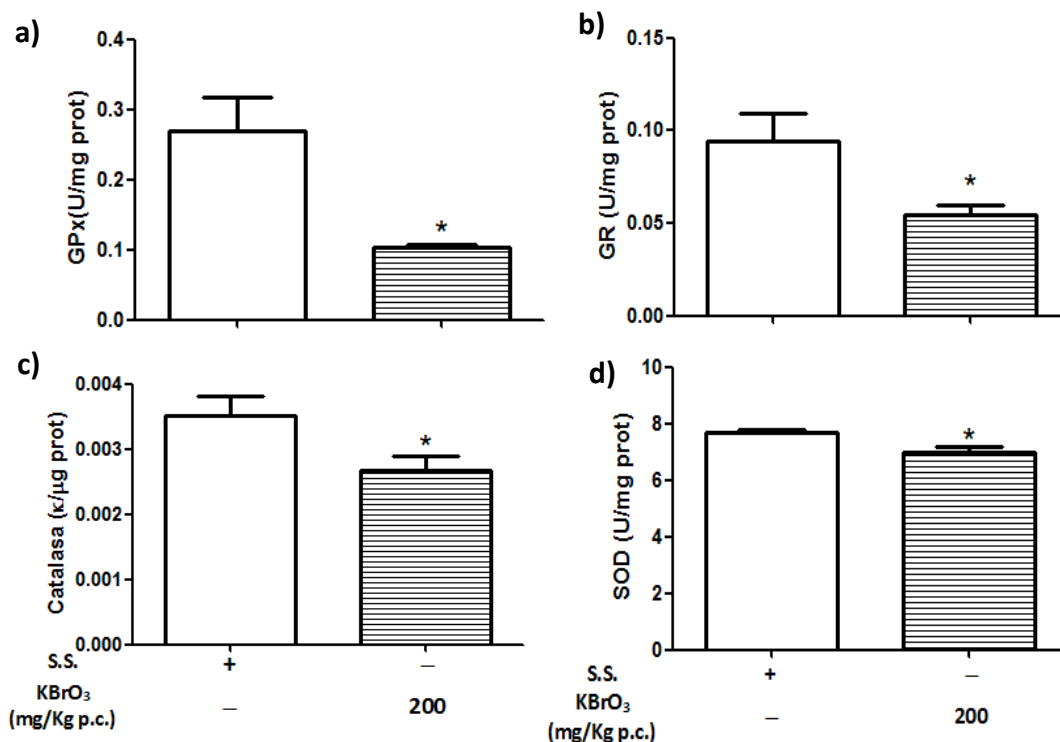


Figura 28. Efecto de la administración de bromato de potasio (KBrO_3 ; 200 mg/Kg p.c.) en la actividad de las enzimas antioxidantes (a) glutatión peroxidasa (GPx), (b) glutatión reductasa (GR), (c) catalasa (CAT) y (d) superóxido dismutasa (SOD) de mitocondrias aisladas de tejido renal. Los valores están representados como promedio \pm EEM, $n = 6$. * $P < 0.05$ vs. Control.

6.6.2 Contenido de GSH mitocondrial

Como un segundo marcador de daño oxidante a nivel mitocondrial se evaluó el contenido de GSH en las mitocondrias aisladas del tejido renal únicamente de los grupos control y administrado con KBrO_3 . Los resultados de esta determinación se muestran en la Figura 29, donde se observa que el grupo tratado con KBrO_3 presenta niveles de GSH significativamente menores al grupo control.

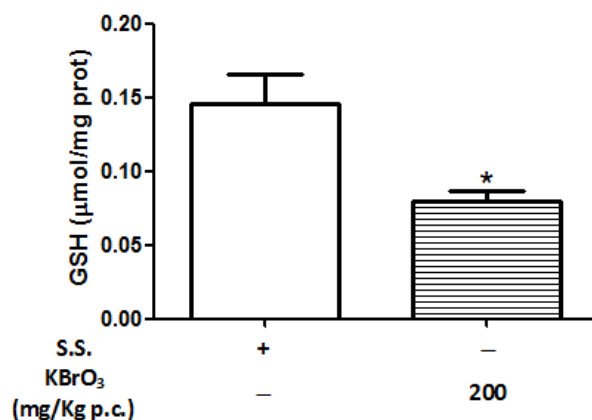


Figura 29. Efecto de la administración de bromato de potasio (KBrO_3 ; 200 mg/Kg p.c.) en el contenido de GSH de mitocondrias aisladas de tejido renal. Los valores están representados como promedio \pm EEM, n= 7. *P<0.05 vs. Control.

El aumento en la producción de H_2O_2 mitocondrial, la disminución en el contenido de GSH y en la actividad de las enzimas mitocondriales, así como de la enzima aconitasa, es evidencia de la capacidad del KBrO_3 de inducir estrés y daño oxidativo en la mitocondria y en consecuencia alterar el correcto funcionamiento de este organelo.

Al comparar los resultados del balance oxidativo en las mitocondrias aisladas y en los homogeneizados renales, se propone que las alteraciones a nivel mitocondrial representan la etapa inicial en la propagación del estrés y posterior daño oxidativo en el tejido renal en el modelo de nefrotoxicidad estudiado.

7. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran el daño a nivel mitocondrial en la nefrotoxicidad inducida por KBrO_3 . Sin embargo, también evidencian la ausencia de daño oxidante en el tejido renal, a pesar de que la actividad de las enzimas antioxidantes haya disminuido en el modelo estudiado. El marcado efecto del KBrO_3 sobre la mitocondria, aunado a la ausencia de daño oxidativo en los homogeneizados renales, apunta a una etapa temprana en la generación de estrés oxidativo en el riñón.

El pretratamiento con C-FC logró prevenir exitosamente la nefrotoxicidad, sin embargo fue incapaz de prevenir las demás alteraciones, tanto a nivel tisular como a nivel mitocondrial, resultado de la administración de KBrO_3 . La sola administración de C-FC generó alteraciones en el funcionamiento y en el balance oxidativo mitocondrial, es por ello que resultaría interesante investigar a profundidad el efecto de la C-FC sobre la mitocondria. Evaluando no solo el consumo de oxígeno y el estrés oxidativo, sino también el efecto de este antioxidante sobre la biogénesis mitocondrial y la mitofagia, en diferentes esquemas de tratamiento.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Aebi H.E. (1982). Catalase. *Methods of Enzymatic Analysis* Vol. III. 3 ed. Editado por: Hans-Ulrich Bergmeyer. Verlag Chemie by Elsevier. Weinheim, Baden-Württemberg, Alemania.
- Ahlborn G. J., Delker D. A., Roop B. C., Geter D. R., Allen J. W., DeAngelo A. B. & Winnik W. M. (2009). Early alterations in protein and gene expression in rat kidney following bromate exposure. *Food Chem Toxicol* 47(6):1154–1160.
- Ahmad M. K., & Mahmood R. (2012). Oral administration of potassium bromate, a major water disinfection by-product, induces oxidative stress and impairs the antioxidant power of rat blood. *Chemosphere* 87(7):750–756.
- Ahmad M. K., Naqshbandi A., Fareed M. & Mahmood R. (2012). Oral administration of a nephrotoxic dose of potassium bromate, a food additive, alters renal redox and metabolic status and inhibits brush border membrane enzymes in rats. *Food Chem* 134(2):980–985.

- Ahmad M. K., Khan A. A. & Mahmood R. (2013). Taurine ameliorates potassium bromate-induced kidney damage in rats. *Amino Acids* 45:1109–1121.
- Akanji M. A., Nafiu M. O. & Yakubu M. T. (2008). Enzyme Activities and Histopathology of Selected Tissues in Rats Treated with Potassium bromate. *Afr J Biomed Res* 11:87 – 95.
- Ali S.K. & Saleh A.M. (2012). Spirulina - an overview. *Int J Pharm Pharm Sci* 4(3):9-15.
- Anders M. W. (1980). Metabolism of drugs by the kidney. *Kidney Int* 18(5):636–647.
- Andreyev A.Y., Kushnareva Y.E. & Starkov A.A. (2005). Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry (Mosc)* 70(2):200-214.
- Ballmaier D. & Epe B. (2006). DNA damage by bromate: Mechanism and consequences. *Toxicology* 221(2-3):166-171.
- Bao L., Yao X.-S., Tsi D., Yau C.-C., Chia C.-S., Nagai H. & Kurihara H. (2008). Protective effects of bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) extract on KBrO₃-induced kidney damage in mice. *J Agric Food Chem* 56(2):420–425.
- Barrett K., Barman S., Boitano S., & Brooks H. (2010). *Ganong: Fisiología médica* .23 ed. McGraw Hill. Ciudad de México, DF, México.
- Bhat V. B., & Madyastha K. M. (2001). Scavenging of peroxynitrite by phycocyanin and phycocyanobilin from *Spirulina platensis*: Protection against oxidative damage to DNA. *Biochem Biophys Res Commun* 285(2):226–262.
- Benedetti S., Benvenuti F., Pagliarani S., Francogli S., Scoglio S., & Canestrari F. (2004). Antioxidant properties of a novel phycocyanin extract from the blue-green alga *Aphanizomenon flos-aquae*. *Life Sci* 75:2353–2362.
- Benedetti S., Benvenuti F., Scoglio S. & Canestrari F. (2010). Oxygen radical absorbance capacity of phycocyanin and phycocyanobilin from the food supplement *Aphanizomenon flos-aquae*. *J Med Food* 13(1):223–227.
- Blesa J., Trigo-Damas I., Quiroga-Varela A. & Jackson-Lewis V. R. (2015). Oxidative stress and Parkinson's disease. *Front Neuroanat* 9:91.
- Bradford M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254.
- Brand M. & Nicholls D. (2011). Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochem* 435:297–312

- Cadenas S., & Barja G. (1999). Resveratrol, melatonin, vitamin E and PBM protect against renal oxidative DNA damage induced by the kidney carcinogen KBrO₃. *Free Radic Biol Medi* 26(99):1531–1537.
- Cano-Estrada A., & González-Halphen D. (2011). F₁F₀-ATP sintasa y sus diferencias estructurales. *Rev Educ Bioq* 30(3):98-108.
- Carlberg I. & Mannervik B. (1975). Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *J Biol Chem* 250(14):5475-5480.
- Carocho M. & Ferreira I. C. F. R. (2012). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food Chem Toxicol* 51C:15–25.
- Chance B. & Williams G.R. (1955). Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation; III. The steady state. *J Biol Chem* 207(1): 409-427.
- Chen J.-C., Kumar A. S., Chung H.-H., Chien S.-H., Kuo M.-C. & Zen J.-M. (2006). An enzymeless electrochemical sensor for the selective determination of creatinine in human urine. *Sensor Actuat B-Chem* 115(1):473–480.
- Chipman J.K., Davies J.E., Parsons J.L., Nair J., O'Neill G. & Fawell J.K. (1998). DNA oxidation by potassium bromate; a direct mechanism or linked to lipid peroxidation?. *Toxicology* 126(2):93-102.
- Chipman J.K., Parsons J.L. & Beddowes E.J. (2006). The multiple influences of glutathione on bromate genotoxicity: Implications for the dose–response relationship. *Toxicology* 221(2-3):187–189.
- DeAngelo A., George M., Kilburn S., Moore T. & Wolf D., (1998). Carcinogenicity of potassium bromate administered in the drinking water to male B6C3F1 mice and F344/N rats. *Toxicol Pathol* 26:724–729
- Delker D., Hatch G., Allen J., Crissman B., George M., Geter D., Kilburn S., Moore T., Nelson G., Roop B., Slade R., Swank A., Ward W. & DeAngelo A. (2006). Molecular biomarkers of oxidative stress associated with bromate carcinogenicity. *Toxicology* 221(2-3):158–165.
- Dudkina N. V., Kouril R., Peters K., Braun H.-P. & Boekema E. J. (2010). Structure and function of mitochondrial supercomplexes. *Biochim Biophys Acta* 1797(6-7):664–670.
- Environmental Protection Agency [EPA]. (2001). *Toxicological Review of Bromate (CAS No. 15541–45–4)*. Integrated Risk Information System [IRIS]. Washington DC, EUA.
- Eaton D. C. & Pooler J. P. (2006). *Fisiología renal de Vander*. 6th ed. McGraw Hill Interamericana. Ciudad de México, DF, México.

- Eriksen N.T. (2008). Production of phycocyanin—a pigment with applications in biology, biotechnology, foods and medicine. *Appl Microbiol Biotechnol* 80:1–14.
- Eskandari S., Loo D. D. F., Dai G., Levy O., Wright E.M. & Carrasco N. (1997). Thyroid Na⁺/I⁻ symporter. Mechanism, stoichiometry, and specificity. *J Biol Chem* 272(43):27230-27238.
- Fernández-Rojas B., Medina-Campos O. N., Hernández-Pando R., Negrette-Guzmán M., Huerta-Yepez S. & Pedraza-Chaverri J. (2014a). C-Phycocyanin prevents cisplatin-induced nephrotoxicity through inhibition of oxidative stress. *Food Funct* 5:480–490.
- Fernández-Rojas B., Hernández-Juárez J. & Pedraza-Chaverri J. (2014b). Nutraceutical properties of phycocyanin. *J Funct Foods* 11:375-392.
- Fernández-Rojas B, Rodríguez-Rangel DS, Granados-Castro LF, Negrette-Guzmán M, León-Contreras JC, Hernández-Pando R, Molina-Jijón E, Reyes JL, Zazueta C, Pedraza-Chaverri J. (2015). C-phycocyanin prevents cisplatin-induced mitochondrial dysfunction and oxidative stress. *Mol Cell Biochem* 406(1-2):183-97.
- Fujii M., Oikawa K., Saito H., Fukuhara C., Onosaka S. & Tanaka K. (1984). Metabolism of potassium bromate in rat I. in vivo studies. *Chemosphere* 13(II):1207–1212.
- García-Trejo J. J., Zarco-Zavala M. & Morales E. (2011). Estructura y regulación del nanomotor que le da energía a la vida : La F1 F0 -ATP sintasa. *Mensaje Bioquímico* XXXV:39–52.
- Giri U., Iqbal M. & Athar M. (1999). Potassium bromate (KBrO₃) induces renal proliferative response and damage by elaborating oxidative stress. *Cancer Lett* 135(2): 181–188.
- Gnaiger E. (2009). MitoPathways: Respiratory States and Coupling Control Ratios. *Mitochondrial Pathways and Respiratory Control*. 2nd ed. OROBOROS MiPNet Publications. Innsbruck, Austria.
- González-Calvar S. & Coirini H. (2004). Control respiratorio. *Departamento de Bioquímica Humana Facultad de Medicina; Universidad de Buenos Aires*, 1–12.
- Gupta M., Dwivedi U.N. & Khandelwal S. (2011). C-Phycocyanin: An effective protective agent against thymic atrophy by tributyltin. *Toxicol Lett* 204(1):2-11.
- Halliwell B. & Gutteridge M.C. (1999). *Free radicals in biology and medicine*. 3a ed. Oxford. Nueva York, EUA.
- Halliwell B. (2011). Free radicals and antioxidants - quo vadis? *Trends Pharmacol Sci* 32(3):125–130.
- Hansford R., George S. & Indies W. (2001). Oxidative Phosphorylation. *eLS*, 1-8.

- Hausladen A. & Fridovich I. (1994) Superoxide and peroxyxynitrite inactivate aconitases, but nitric oxide does not. *J Biol Chem* 269(47):29405-29408.
- Hernández R. (2001). Respiración. *Facultad de Ciencias Forestales y Ambientales. Universidad de Los Andes - Mérida - Venezuela*. Retrieved from <http://www.forest.ula.ve/~rubenhg/respiracion/index.html>
- Hinkle P.C. (2005). P/O ratios of mitochondrial oxidative phosphorylation. *Biochim Biophys Acta* 1706:1 – 11.
- Huang S. & Millar H. (2013). Succinate dehydrogenase: the complex roles of a simple enzyme. *Curr Opin Plant Biol* 16:344–349.
- International Agency for Research on Cancer [IARC]. (1986). Some naturally occurring and synthetic food components, furocoumarins and ultraviolet radiation. *IARC Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans*. Vol 40. World Health Organization. Lyon, France.
- Jałoszyński P., Murata S., Shinkai Y., Takahashi S., Kumagai Y., Nishimura S. & Yamamoto M. (2007). Dysfunction of Nrf2 decreases KBrO₃-induced oxidative DNA damage in Ogg1-null mice. *Biochem Biophys Res Commun* 364(4):966-971.
- Karbownik M., Stasiak M., Zygmunt A. & Zasada K. (2006). Protective effects of melatonin and indole-3-propionic acid against lipid peroxidation, caused by potassium bromate in the rat kidney. *Cell Biochem Funct* 24:483–489.
- Ke Y., Xu X., Wu S., Huang J., Geng Y., Misra H. & Li Y. (2013). Protective effects of extracts from *Fructus rhodomyrti* against oxidative DNA damage *In Vitro* and *In Vivo*. *Oxid Med Cell Longev* 2013:1-8.
- Khan N., Sharma S. & Sultana S. (2004). Attenuation of potassium bromate-induced nephrotoxicity by coumarin (1,2-benzopyrone) in Wistar rats: chemoprevention against free radical-mediated renal oxidative stress and tumor promotion response. *Redox Rep* 9(1):19–28.
- Khan N. & Sultana, S. (2004). Abrogation of potassium bromate-induced renal oxidative stress and subsequent cell proliferation response by soy isoflavones in Wistar rats. *Toxicology* 201:173–184.
- Khan N. & Sultana S. (2005). Inhibition of potassium bromate-induced renal oxidative stress and hyperproliferative response by *Nymphaea alba* in Wistar rats. *J Enzyme Inhib Med Chem* 20(3):275–283.
- Kohen R. & Nyska A. (2002). Oxidation of biological systems: Oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol Pathol* 30:620–650.

- Koru E. (2012). Chapter 11: Earth Food Spirulina (Arthrospira): Production and Quality Standarts. *Food Additive*. Editado por Prof. Yehia El-Samragy. InTech. Disponible en: <http://www.intechopen.com/books/food-additive/earth-food-spirulina-arthrospira-production-and-qualitystandarts>.
- Kowaltowski A.J., de Souza-Pinto N.C., Castilho R.F. & Vercesi A.E. (2009). Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med* 47(4):333-343.
- Kurokawa Y., Maekawa A., Takahashi M. & Hayashi Y. (1990). Toxicity and carcinogenicity of potassium bromate--a new renal carcinogen. *Environ Health Perspect* 87:309-335.
- Kujawska M., Ignatowicz E., Ewertowska M., Adamska T., Markowski J. & Jodynys-Liebert J. (2013). Attenuation of KBrO₃-induced renal and hepatic toxicity by cloudy apple juice in rat. *Phytother Res* 27:1214-1219.
- Lawrence R.A. & Burk R.F. (1976) Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 71:952-958.
- Levine T. B., & Levine A. B. (2006). Chapter 2: Mitochondria. *Metabolic Syndrome and Cardiovascular Disease*. 2a ed. Wiley-Blackwell. Hoboken, Nueva Jersey, EUA.
- Levine R.L., William J.A., Stadtman E.R. & Shacter E. (1994) Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Meth Enzymol* 233:343-357.
- Lim B. J., Jeong J. Y., Chang Y.-K., Na K.-R., Lee K. W., Shin Y.-T. & Choi D. E. (2013) C-phycocyanin attenuates cisplatin-induced nephrotoxicity in mice. *Ren Fail* 34:892-900.
- Lissi E., Pizarro M., Aspee A. & Romay C. (2000). Kinetics of phycocyanine bilin groups destruction by peroxy radicals. *Free Radic Biol Med* 28(7):1051-1055.
- Lock E. a. & Reed C. J. (1998). Xenobiotic Metabolizing Enzymes of the Kidney. *Toxicol Pathol* 26(1):18-25.
- Lodi R., Hart P.E., Rajagopalan B., Taylor D.J., Crilley J.G., Bradley J.L., Blamire A.M., Manners D., Styles P., Schapira A.H. & Cooper J.M. (2001). Antioxidant treatment improves in vivo cardiac and skeletal muscle bioenergetics in patients with Friedreich's ataxia. *Ann Neurol* 49(5):590-596.
- Marín-Prida J., Pentón-Rol G., Rodrigues F. P., Alberici L. C., Stringhetta K., Leopoldino A. M., Naal Z., Polizello A. C. M., Llopiz-Arzuaga A., Rosa M.N., Liberato J. L., Ferreira dos Santos W., Uyemura S. A., Pentón-Arias E., Curti C. & Pardo-Andreu G. L. (2012). C-Phycocyanin protects SH-SY5Y cells from oxidative injury, rat retina from transient ischemia and rat brain mitochondria from Ca²⁺/phosphate-induced impairment. *Brain Res Bull* 89(5-6):159-167.

- Maser R. L., Magenheimer B.S & Calvet J.P. (1994). Mouse plasma glutathione peroxidase. cDNA sequence analysis and renal, proximal tubular expression and secretion. *J Biol Chem* 269(43):27066-27073.
- Matés J. M., Pérez-Gómez C. & Núñez de Castro I. (1999). Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem* 32(8):595–603.
- McBride H. M., Neuspiel M. & Wasiak S. (2006). Mitochondria: more than just a powerhouse. *Curr Biol* 16(14):R551–560.
- Metzler D. (2003). *Biochemistry: The Chemical Reactions of Living Cells* Vol. 1–2. 2nd ed. Academic Press, an imprint of Elsevier. San Diego, California, EUA.
- Meza D. L. (2004). *Cuantificación de bromato de potasio en harinas de panificación en el área de San Salvador*. Trabajo de graduación en Ingeniería en Alimentos. Universidad Dr. Jose Matias Delgado. La Libertad, El Salvador.
- Molina-Jijón E., Tapia E., Zazueta C., Hafidi M.E., Zatarain-Barrón Z. L., Hernández-Pando R., Omar Noel Medina-Campos O. N., Zarco-Márquez G., Torres I. & Pedraza-Chaverri J. (2011). Curcumin prevents Cr(VI)-induced renal oxidant damage by a mitochondrial pathway. *Free Radic Biol Med* 51(8):1543-1557.
- Murata M., Bansho Y., Inoue S., Ito K., Ohnishi S., Midorikawa K. & Kawanishi S. (2001). Requirement of glutathione and cysteine in guanine-specific oxidation of DNA by carcinogenic potassium bromate. *Chem Res Toxicol* 14:678-685.
- National Kidney and Urologic Diseases Information Clearinghouse [NKUDIC]. (2009). Los riñones y cómo funcionan. EUA: National Institutes of Health. *NIH Publication N° 09-3195S*. Consultado en línea el 27 de agosto 2015 en: <http://www.niddk.nih.gov/health-information/informacion-de-la-salud/anatomia/los-rinones-y-como-funcionan/Pages/anatomia.aspx>
- NMX-F-007-1982. Alimento para humanos. Harina de trigo. (1982). *NORMAS MEXICANAS. DIRECCIÓN GENERAL DE NORMAS*.
- Negrette Guzmán M. F. (2012). *Efecto protector del sulforafano en la toxicidad tubular y la insuficiencia renal aguda inducidas por gentamicina*. Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas. UNAM. Ciudad de México, DF, México.
- Nelson D. L. (2005). *Principios de Bioquímica: Lehninger*. 4a ed. OMEGA. Barcelo, España.
- Neustadt J. & Pieczenik S. R. (2008). Medication-induced mitochondrial damage and disease. *Mol Nutr Food Res* 52(7):780–788.
- Nicholls D. G. & Ferguson S. J. (2002). *Bioenergetics 3*. Academic Press, an imprint of Elsevier Science. San Diego, California, EUA.

- Nicholls D. G & Ward M.W. (2000). Mitochondrial membrane potential and neuronal glutamate excitotoxicity: mortality and millivolts. *Trends Neurosci* 23:166–174.
- Nyola A. & Hunte C. (2008). A structural analysis of the transient interaction between the cytochrome bc₁ complex and its substrate cytochrome c. *Biochem Soc Trans* 36:981–985
- Orrenius S. (2007). Reactive oxygen species in mitochondria-mediated cell death. *Drug Metab Rev* 39(2-3):443–455.
- Ou Y., Lin L., Pan Q., Yang X. & Cheng X. (2012). Preventive effect of phycocyanin from *Spirulina platensis* on alloxan-injured mice. *Environ Toxicol Pharmacol* 34(3):721–726.
- Paniagua R. (2003). *Biología celular*. 2a ed. McGraw Hill, Interamericana. Avaraca, Madrid, España.
- Parsons J.L. & Chipman J.K. (2000). The role of glutathione in DNA damage by potassium bromate *in vitro*. *Mutagenesis* 15(4):311-316.
- Patel A., Mishra S., Pawar R. & Ghosh P. K. (2005). Purification and characterization of C-phycocyanin from cyanobacterial species of marine and freshwater habitat. *Protein Expr Purif* 40:248–255.
- Pietta P. G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod* 63(7):1035–1042.
- Pentón-Rol G., Martínez-Sánchez G., Cervantes-Llanos M., Lagumersindez-Denis N., Acosta-Medina E. F., Falcón-Cama V., Alonso-Ramírez R., Valenzuela-Silva C., Rodríguez-Jiménez E., Llópiz-Arzuaga A., Marín-Prida J., López-Saura P. A., Guillén-Nieto G. E. & Pentón-Arias E. (2011). C-Phycocyanin ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis and induces regulatory T cells. *Int Immunopharmacol* 11(1):29–38.
- Perry S.W., Norman J.P., Barbieri J., Brown E.B. & Gelbard H.A. (2011). Mitochondrial membrane potential probes and the proton gradient: a practical usage guide. *BioTechniques* 50:98-115.
- Rahman K. (2007). Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clin Interv Aging* 2(2):219–236.
- Reznick AZ & Packer L. (1994). Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Meth Enzymol* 233:357-363.
- Rivas-Cabañero L., Rodríguez-Barbero A., Eleno N. & López-Novoa J. M. (1995). Mecanismos básicos de nefrotoxicidad. *Nefrología XV*:44–48.
- Rodríguez-Sánchez R., Ortiz-Butrón R., Blas-Valdivia V., Hernández-García A. & Cano-Europa E. (2012). Phycobiliproteins or C-phycocyanin of *Arthrospira (Spirulina) maxima*

- protect against HgCl₂-caused oxidative stress and renal damage. *Food Chem* 135:2359–2365.
- Romay C., Ledón N. & Gonzalez R. (1998). Further studies on anti-inflammatory activity of phycocyanin in some animal models of inflammation. *Inflamm Res* 47 334–338.
- Romay C., Gonzalez R., Pizarro M. & Lissi E. (2000). Kinetics of C-phycocyanin reaction with hypochlorite. *J Protein Chem* 19(2):151–155.
- Rutter J., Winge D.R. & Schiffman J.D. (2010). Succinate dehydrogenase – Assembly, regulation and role in human disease. *Mitochondrion* 10:393–401.
- Sai K., Takagi A., Umemura T., Hasegawa R. & Kurokawa Y. (1991). Relation of 8-Hydroxyguanosine formation in rat kidney to lipid peroxidation, glutathione level and relative organ weight after a single administration of potassium bromate. *Jpn J Cancer Res* 82:165-169.
- Saraste M. (1999). Oxidative phosphorylation at the fin de siècle. *Science* 283:1488–1493.
- Slater T. F. (1984). Free-radical mechanisms in tissue injury. *Biochem J* 222(1):1–15.
- Sohal R.S., Agarwal S., Dubey A. & Orr W.C. (1993). Protein oxidative damage is associated with life expectancy of houseflies. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:7255-7259.
- Spinazzi M., Casarin A., Pertegato V., Salviati L. & Angelini C. (2012). Assessment of mitochondrial respiratory chain enzymatic activities on tissues and cultured cells. *Nat Protoc* 7:1235-1246.
- Spitzweg C., Dutton C.M., Castro M.R., Bergert E.R., Goellner J.R., Heufelder A.E. & Morris J.C. (2001). Expression of the sodium iodide symporter in human kidney. *Kidney Int* 59(3):1013-1023.
- Starkov A. A. (2010). Measurement of mitochondrial ROS production. *Methods Mol Biol* 648:245–255.
- Sultan M. T., Butt M. S., Ahmad R. S., Pasha I., Ahmad A. N. & Qayyum M. M. N. (2012). Supplementation of *Nigella sativa* fixed and essential oil mediates potassium bromate induced oxidative stress and multiple organ toxicity. *Pak J Pharm Sci* 25(1):175–181.
- Sun Y., Zhang J., Yan Y., Chi M., Chen W., Sun P. & Qin S. (2011). The protective effect of C-phycocyanin on paraquat-induced acute lung injury in rats. *Environ Toxicol Pharmacol* 32(2):168–174.
- Tanaka K., Oikawa K., Fukuhara C., Saito H., Onosaka S., Min K.-S., & Fujii M. (1984). Metabolism of potassium bromate in rats II. In vitro studies. *Chemosphere* 13(2):1213-1219.

- Tapia G., Galetovic A., Lemp E., Pino E. & Lissi E. (1999). Singlet oxygen-mediated photobleaching of the prosthetic group in hemoglobins and C-phycoerythrin. *Photochem Photobiol* 70:499–504.
- Thangam R., Suresh V., Asenath Princy W., Rajkumar M., Senthilkumar N., Gunasekaran P., Rengasamy R., Anbazhagan C., Kaveri K. & Kannan S. (2013). C-Phycocyanin from *Oscillatoria tenuis* exhibited an antioxidant and in vitro antiproliferative activity through induction of apoptosis and G0/G1 cell cycle arrest. *Food Chem* 140:262–272.
- Voet D. & Voet J.G. (2011). *Biochemistry*. 4th ed. John Wiley & Sons, INC. Hoboken, Nueva Jersey, EUA.
- Wallace D. C., Fan W., & Procaccio V. (2010). Mitochondrial energetics and therapeutic. *Annu Rev Pathol* 5:297–348.
- Watanabe S., Yoshimura Y. & Fukui T. (2001). Contribution of glutathione peroxidase and nitric oxide to potassium bromate-induced oxidative stress and kidney damage in mice. *J Health Sci* 47(6):565–570.
- Zanotti A. & Azzone G. F. (1980). Safranin as membrane potential probe in rat liver mitochondria. *Arch Biochem Biophys* 201(1):255-265.
- Zorov D. B. (2010). Amelioration of aminoglycoside nephrotoxicity requires protection of renal mitochondria. *Kidney international* 77(10):841–843.



MITOCHONDRIA

THE CELL'S POWER HOUSE

theAwkwardYeti.com