

# Complejo I, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y NO mitocondriales como señales prodrómicas de la disfunción cardíaca en diabetes tipo 1

## *Mitochondrial Complex I, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and NO as Prodromal Signals of Cardiac Dysfunction in Type 1 Diabetes*

IVANA A. RUKAVINA-MIKUSIC<sup>1,2</sup>, MICAELA REY<sup>1</sup>, VALERIA TRÍPODI<sup>3</sup>, LAURA B. VALDEZ<sup>1,2</sup> 

### RESUMEN

**Introducción:** Resultados de nuestro laboratorio sugieren que la disfunción mitocondrial en el corazón precede a la falla miocárdica asociada a la hiperglucemia sostenida.

**Objetivo:** Estudiar los eventos tempranos que ocurren en las mitocondrias de corazón en un modelo de diabetes mellitus tipo 1.

**Materiales y métodos:** Ratas Wistar macho fueron inyectadas con estreptozotocina (STZ; 60 mg/kg, ip) y sacrificadas 10 o 14 días posinyección. Se obtuvo la fracción mitocondrial de corazón.

**Resultados:** El consumo de O<sub>2</sub> en estado 3 en presencia de malato-glutamato (21%) o succinato (16%) y las actividades de los complejos I-III (27%), II-III (24%) y IV (22%) fueron menores en los animales diabéticos a los 14 días posinyección. Cuando los animales se sacrificaron al día 10, solo el consumo de O<sub>2</sub> en estado 3 en presencia de sustratos del complejo I (23%) y su control respiratorio (30%) fueron menores en las ratas inyectadas con STZ, de acuerdo con una reducción en la actividad del complejo I-III (17%). Estos cambios se acompañaron de un aumento en las velocidades de producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (117%), NO (30%) y ONOO<sup>-</sup> (~225%), en la expresión de mtNOS (29%) y en la [O<sub>2</sub>]<sup>-</sup>ss (~150%) y [NO]ss (~30%), junto con una disminución de la actividad de la Mn-SOD (15%) y la [GSSG+GSH]mitocondrial (28%), sin cambios en la expresión de PGC-1α.

**Conclusión:** La disfunción del complejo I y el aumento en la generación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, NO y ONOO<sup>-</sup> pueden considerarse señales subcelulares prodrómicas del deterioro de la función mitocondrial que precede a la disfunción cardíaca en la diabetes.

**Palabras clave:** Diabetes mellitus tipo 1 - Hiperglucemia - Complejo I mitocondrial - Mitocondrias cardíacas - Óxido nítrico - Peróxido de hidrógeno

### ABSTRACT

**Background:** Previous results from our laboratory suggest that heart mitochondrial dysfunction precedes myocardial failure associated with sustained hyperglycemia.

**Purpose:** The aim of this study was to analyze the early events that take place in heart mitochondria in a type 1 diabetes mellitus (DM) model.

**Methods:** Male Wistar rats were injected with streptozotocin (STZ; 60 mg/kg, ip.) to induce DM. They were euthanized 10 or 14 days later and the heart mitochondrial fraction was obtained.

**Results:** State 3 O<sub>2</sub> consumption in the presence of malate-glutamate (21%) or succinate (16%), and complex I-III (27%), II-III (24%) and IV (22%) activities were lower in diabetic animals 14 days after STZ injection. When animals were euthanized at day 10, only state 3 O<sub>2</sub> consumption sustained by complex I substrates (23%) and its corresponding respiratory control (30%) were lower in rats injected with STZ, in agreement with reduced complex I-III activity (17%). These changes were accompanied by increased H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (117%), NO (30%) and ONOO<sup>-</sup> (~225%) production rates, mtNOS expression (29%) and O<sub>2</sub><sup>-</sup> (~150%) and NO (~30%) steady-state concentrations, together with a decrease in Mn-SOD activity (15%) and mitochondrial [GSSG+GSH] (28%), without changes in PGC-1α expression.

**Conclusion:** Complex I dysfunction and increased H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, NO and ONOO<sup>-</sup> production rates can be considered subcellular prodromal signals of the mitochondrial damage that precedes myocardial dysfunction in diabetes.

**Key words:** Type 1 Diabetes Mellitus - Hyperglycemia - Mitochondrial Complex I - Heart mitochondria - Nitric Oxide - Hydrogen Peroxide

### INTRODUCCIÓN

La diabetes mellitus es una enfermedad metabólica crónica causada por una deficiencia en la producción

de insulina por el páncreas o por la ineffectividad en la acción de dicha hormona, lo que lleva a un incremento de la concentración de glucosa en sangre. Las complicaciones cardiovasculares son la principal causa de

REV ARGENT CARDIOL 2021;89:92-97. <http://dx.doi.org/10.7775/rac.es.v89.i2.19865>

Recibido: 14/12/2020 - Aceptado: 14/02/2021

**Dirección para separatas:** Dra. Laura B. Valdez - Universidad de Buenos Aires, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Departamento de Química Analítica y Físicoquímica - Junín 956, C1113AAD, Buenos Aires, Argentina - Tel: 54-11-5287-4235 - E-mail: lbvaldez@ffyb.uba.ar; laubeaval@gmail.com

Este trabajo obtuvo el Premio Bernardo Houssay 2020

<sup>1</sup>Universidad de Buenos Aires, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Departamento de Química Analítica y Físicoquímica, Físicoquímica; <sup>2</sup>Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Instituto de Bioquímica y Medicina Molecular (IBIMOL; UBA-CONICET), Físicoquímica; <sup>3</sup>Universidad de Buenos Aires, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Departamento de Tecnología Farmacéutica. Buenos Aires, Argentina

morbilidad y mortalidad entre la población diabética (1,2) siendo la hiperglucemia sostenida un factor de riesgo que conduce, finalmente, a la miocardiopatía diabética (3,4). Aunque esta última se asocia más frecuentemente a pacientes con diabetes tipo 2, los pacientes con diabetes tipo 1 también presentan una miocardiopatía inducida metabólicamente, que se presenta independientemente de hipertensión, nefropatía o de cardiopatía isquémica (5,6). Resultados previos de nuestro laboratorio, obtenidos utilizando un modelo experimental de diabetes tipo 1 en rata, muestran que la hiperglucemia sostenida durante 25 días conduce a una disfunción mitocondrial cardíaca generalizada, en ausencia de hipertrofia y de cambios en la función cardíaca en reposo, pero con compromiso cardíaco ante una sobrecarga de trabajo (7,8), lo que sugiere que el deterioro de la función mitocondrial precede a la falla miocárdica en pacientes diabéticos.

Considerando que la mayoría de los estudios publicados hacen referencia a la función mitocondrial cardíaca en modelos de diabetes tipo 2 –en asociación a la resistencia a la insulina, la obesidad, la hipercolesterolemia y la hipertensión– o en modelos de diabetes tipo 1 por períodos de hiperglucemia muy prolongados, el objetivo de este trabajo fue estudiar los eventos tempranos que ocurren en las mitocondrias de corazón de rata en un modelo experimental de diabetes tipo 1.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Ratas Wistar macho (200-250 g) se dividieron aleatoriamente en dos grupos: control (C) y diabetes mellitus (DM). La diabetes se indujo mediante una inyección intraperitoneal de estreptozotocina (STZ, 60 mg/kg) diluida en buffer citrato 100 mM pH 4.50. Los animales del grupo C recibieron una inyección intraperitoneal del vehículo (buffer citrato 100 mM pH 4.50). La glucemia se determinó 3 días después de la inyección de STZ y a lo largo del protocolo experimental, utilizando el glucómetro One Touch Ultra, Johnson & Johnson. Las ratas que a los 3 días posinyección de STZ presentaron una concentración de glucosa en sangre superior a 200 mg/dl fueron consideradas diabéticas (9). El peso de los animales se determinó a lo largo del periodo de trabajo. A los 10 o 14 días posinyección de STZ, los animales se sacrificaron en atmósfera de CO<sub>2</sub> y se les extrajo el corazón, a partir del cual se obtuvo, mediante centrifugación diferencial, la fracción mitocondrial (10).

Haciendo uso de un electrodo de Clark (Hansatech Oxygen, Hansatech Instruments Ltd, Norfolk, Inglaterra), se determinó el consumo de O<sub>2</sub> mitocondrial en presencia de sustratos del complejo I (malato más glutamato) o del complejo II (succinato), tanto en ausencia (estado 4 o respiración pasiva) como en presencia (estado 3 o respiración activa) de ADP (11). Se calculó el control respiratorio (CR) como la relación entre el consumo de O<sub>2</sub> en estado 3/estado 4. Las actividades de los complejos respiratorios I-III (NADH-citocromo *c* reductasa), II-III (succinato-citocromo *c* reductasa) y IV (citocromo oxidasa) se determinaron a 550-540 nm mediante un espectrofotómetro de arreglo de diodos (12).

La velocidad de producción mitocondrial de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) se determinó fluorométricamente a 365-450 nm utilizando el método escopoletina-peroxidasa de rábano (HRP), en presencia de sustratos del complejo I (malato más

glutamato) (12,13). La producción de óxido nítrico (NO) mitocondrial se determinó a través de la oxidación de la oxihemoglobina a metahemoglobina mediante un espectrofotómetro de arreglo de diodos, a 577-591 nm (12,14,15). La actividad de la Mn-superóxido dismutasa (Mn-SOD) se determinó espectrofotométricamente a partir de la velocidad de reducción de ferricitocromo *c* por el anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) utilizando el sistema xantina-xantina oxidasa (16). A partir de las medidas experimentales de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, NO y Mn-SOD, se calcularon las concentraciones de O<sub>2</sub><sup>-</sup> y de NO en estado estacionario ([O<sub>2</sub><sup>-</sup>]<sub>ss</sub> y [NO]<sub>ss</sub>) en la matriz mitocondrial (8), y a partir de dichas concentraciones, se estimó la velocidad de producción de peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>). Las concentraciones mitocondriales de glutatión reducido (GSH) y oxidado (GSSG) se determinaron mediante micro HPLC-MS/MS (17). La expresión de la enzima óxido nítrico sintasa mitocondrial (mtNOS) y del coactivador 1α del receptor activador γ de la proliferación peroxisomal (PGC-1α) se analizaron mediante *western blot* utilizando anticuerpos anti-NOS neuronal (H299: sc-8309, Santa Cruz Biotechnology) y anti-PGC-1α (K-15: sc-5816, Santa Cruz Biotechnology), respectivamente. Se utilizaron anticuerpos anti-VDAC-1 (D-16: sc-32063, Biotechnology) y anti-β-tubulina ([1E1-E8-H4] ab131205, Abcam) como controles de carga.

## Análisis estadístico

Los resultados incluidos en tablas y figuras se expresaron como media ± ESM y representan repeticiones de 3 a 10 experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó utilizando el programa GraphPad InStat 4 (GraphPad Software, La Jolla, CA, EE.UU.). Se utilizó la prueba t de Student para analizar la significancia de las diferencias entre el grupo C y el grupo DM; y ANOVA-Dunnett para analizar la significancia de las diferencias respecto del grupo C o del grupo DM al inicio del tratamiento (día 0).

## Consideraciones éticas

El protocolo experimental utilizado fue aprobado por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires (CICUAL; 00663658/15) y los procedimientos fueron realizados siguiendo las indicaciones de la *Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio* publicada por la Academia Nacional de Ciencias de los Estados Unidos.

## RESULTADOS

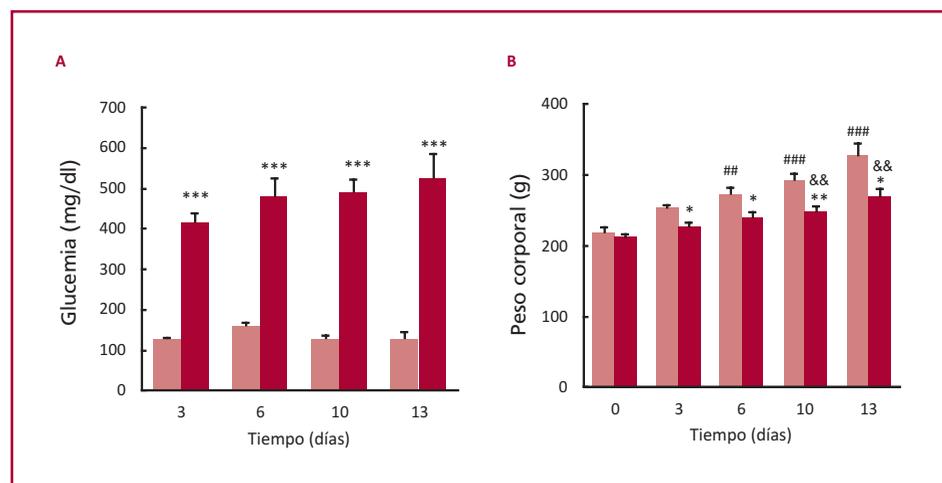
La glucemia determinada al tercer día posinyección de STZ fue significativamente mayor en los animales diabéticos con respecto al grupo control y se mantuvo elevada durante todo el periodo experimental, sin encontrarse diferencias dentro del grupo DM a lo largo del tratamiento (Fig. 1A).

El peso del corazón de los animales inyectados con STZ a los 10 y 14 días fue 15% y 25% menor respecto del peso de los animales control, en concordancia con el menor incremento del peso corporal observado en las ratas diabéticas en comparación con el perfil de crecimiento normal (Fig. 1B). En consecuencia, no se evidenciaron diferencias en el índice cardíaco (peso corazón/peso corporal) porcentual entre los grupos (C: 0,340 ± 0,010; DM-10 días: 0,336 ± 0,004; DM-14 días: 0,339 ± 0,003), lo que indica la ausencia de hipertrofia a estos tiempos experimentales.

Con el fin de evaluar la función mitocondrial cardíaca se determinó el consumo de O<sub>2</sub> en presencia de malato-glutamato o de succinato, así como las actividades de los complejos respiratorios I-III, II-III y IV (Tabla 1). No se observaron cambios en la respiración mitocondrial en estado 4 (pasiva), sostenida por malato-glutamato o por succinato, en el corazón de ratas diabéticas en comparación a los animales control, ni a los 10 ni a los 14 días posteriores a la inyección de STZ. Cuando las ratas se sacrificaron el día 10, el cual corresponde aproximadamente a 7 días de hiperglucemia, el consumo de O<sub>2</sub> en estado 3 (respiración activa) sostenido por malato-glutamato (23%) así como su correspondiente control respiratorio (30%) fueron menores en el grupo diabético, en concordancia con la reducción de la

actividad del complejo I-III (17%), siendo el complejo I el único complejo respiratorio modificado en este estadio. Por el contrario, cuando los animales fueron sacrificados a los 14 días posinyección de STZ, es decir, tras ~11 días de hiperglucemia, tanto el consumo de O<sub>2</sub> en estado 3 sostenido por malato-glutamato (21%) como la respiración en estado 3 sostenida por succinato (16%) y las actividades de los complejos respiratorios I-III (27%), II-III (24%) y IV (22%) fueron menores en el grupo diabético en relación con los valores detectados en el grupo control.

Debido a que ~7 días de hiperglucemia llevaron a una incipiente disfunción mitocondrial, evidenciada tanto por la disminución del consumo de O<sub>2</sub> en estado 3 sostenido por malato-glutamato como por la reduc-



**Fig. 1.** Glucemia (A) y peso corporal (B) de los animales a lo largo del protocolo experimental. Grupo C: barras rosa; grupo DM: barras rojas. \*\*\*p < 0,005; \*\*p < 0,01; \*p < 0,05 DM vs. C al mismo día de tratamiento (prueba t de Student); ###p < 0,005; ##p < 0,01 C vs. C al día 0 (ANOVA-Dunnett); &&p < 0,01 DM vs. DM al día 0 (ANOVA-Dunnett).

	C (control)	DM (diabetes mellitus) 10 días	DM (diabetes mellitus) 14 días
<b>Consumo de O<sub>2</sub> mitocondrial</b>			
<b>Malato-glutamato</b>			
Estado 4 (ng-át. O/min.mg proteína)	41 ± 3	45 ± 4	39 ± 3
Estado 3 (ng-át. O/min.mg proteína)	353 ± 20	271 ± 24*	280 ± 18*
Control respiratorio	8,6	6,0	7,2
<b>Succinato</b>			
Estado 4 (ng-át. O/min.mg proteína)	122 ± 5	126 ± 11	106 ± 13
Estado 3 (ng-át. O/min.mg proteína)	347 ± 21	299 ± 23	290 ± 30
Control respiratorio	2,8	2,4	2,7
<b>Complejos respiratorios</b>			
I-III (nmol/min.mg proteína)	376 ± 14	312 ± 18*	274 ± 26***
II-III (nmol/min.mg proteína)	184 ± 10	154 ± 16	140 ± 13*
IV (1/min.mg proteína)	72 ± 4	69 ± 5	56 ± 4*

\*\*\*p < 0,005; \*p < 0,05 DM vs. C (test t de Student)

C: control

DM: diabetes mellitus

**Tabla 1.** Función mitocondrial. Consumo de O<sub>2</sub> y complejos respiratorios en mitocondrias de corazón de ratas control y diabéticas, sacrificadas 10 o 14 días posinyección de STZ

ción de la actividad del complejo I-III, dicho período experimental fue considerado un estadio temprano de disfunción mitocondrial cardíaca. Por esta razón, el estudio de la generación de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno, del estado redox y de la biogénesis mitocondrial se realizó en corazón de animales sacrificados 10 días posinyección de STZ.

En referencia al estado redox mitocondrial, éste se evaluó a través de la determinación de la concentración de glutatión mitocondrial y de la actividad de la Mn-SOD, principales antioxidantes no enzimático y enzimático, respectivamente, mitocondriales (Tabla 2). La concentración mitocondrial de glutatión total ([GSH + GSSG]) fue un 28% menor en los animales diabéticos en comparación con la determinada en ratas control, debido tanto a una disminución en la concentración de glutatión reducido ([GSH]) como en la concentración de glutatión oxidado ([GSSG]), no encontrándose diferencias en la relación [GSH]/[GSSG]. La actividad de la enzima Mn-SOD también resultó ser 15% menor en las mitocondrias de corazón de los animales diabéticos sacrificados 10 días posinyección.

En cuanto a las velocidades de producción de especies reactivas del oxígeno, la generación de  $H_2O_2$ , en presencia de sustratos del complejo I fue significativamente mayor (117%) en las mitocondrias de corazón de los animales diabéticos luego de ~7 días de hiperglucemia, en comparación con la determinada en el grupo control (Fig. 2A). Se evidenció también un aumento (30%) en la velocidad de generación mitocondrial de NO (Fig. 2B), en concordancia con un incremento del 29% en la expresión de NOS determinada en membranas mitocondriales (mtNOS) (Fig. 2C).

A partir de las medidas experimentales se estimaron las concentraciones en estado estacionario de  $O_2^-$  -precursor estequiométrico del  $H_2O_2$ - y de NO en las mitocondrias de corazón de los animales diabéticos y controles. Se evidenció un incremento muy marcado (~150%) en la  $[O_2^-]_{ss}$  (Fig. 2D) en el grupo diabético respecto del grupo control, acompañado de un aumento de ~30% en la  $[NO]_{ss}$  (Fig. 2E). A partir de las concen-

traciones en estado estacionario de dichas especies se estimó la velocidad de generación mitocondrial de ONOO $\cdot$  (Fig. 2F), la cual fue 3 veces superior en el corazón de los animales inyectados con STZ que en ratas control.

Por otro lado, se determinó la expresión del factor de transcripción PGC-1 $\alpha$ , principal regulador de la biogénesis mitocondrial, en homogenato total de corazón de animales sacrificados 10 días posinyección de STZ, así como también se estimó la masa mitocondrial cardíaca a partir de la relación de la actividad de citocromo oxidasa (COX) determinada en la fracción mitocondrial y en el homogenato (18). No se encontraron diferencias entre los grupos experimentales, ni en la expresión de PGC-1 $\alpha$  (Fig. 3) ni en la masa mitocondrial cardíaca (C:  $24,6 \pm 0,1$  y DM:  $24,1 \pm 0,2$  mg proteína mitocondrial/g tejido), lo que indica que luego de 7 días de hiperglucemia, no se ha desencadenado la síntesis *de novo* de mitocondrias, en contraste con lo observado cuando la hiperglucemia se sostiene por aproximadamente 25 días (8).

## DISCUSIÓN

Los resultados muestran que ~7 días de hiperglucemia sostenida son suficientes para evidenciar una incipiente disfunción mitocondrial cardíaca, con disminución del consumo de  $O_2$  en estado 3 y aumento de la producción de  $H_2O_2$ , ambos al utilizar malato-glutamato, en concordancia con la reducción de la actividad del complejo I, lo cual sugiere la presencia de modificaciones estructurales de las proteínas de dicho complejo en la primera fase de la disfunción cardíaca en ratas diabéticas. El aumento en la producción de  $H_2O_2$  se acompañó de un incremento en la generación de ONOO $\cdot$ , este último a expensas del marcado aumento en la concentración de  $O_2^-$  y del aumento en la generación de NO y de la expresión de la enzima responsable de su síntesis, la mtNOS. Cabe mencionar que el ONOO $\cdot$  es una especie altamente oxidante y nitrante, involucrada en la inhibición del complejo I a través de nitración de tirosinas

**Tabla 2. Estado redox mitocondrial.** [GSH], [GSSG] y Mn-SOD en mitocondrias de corazón de ratas control y diabéticas sacrificadas 10 días posinyección de STZ

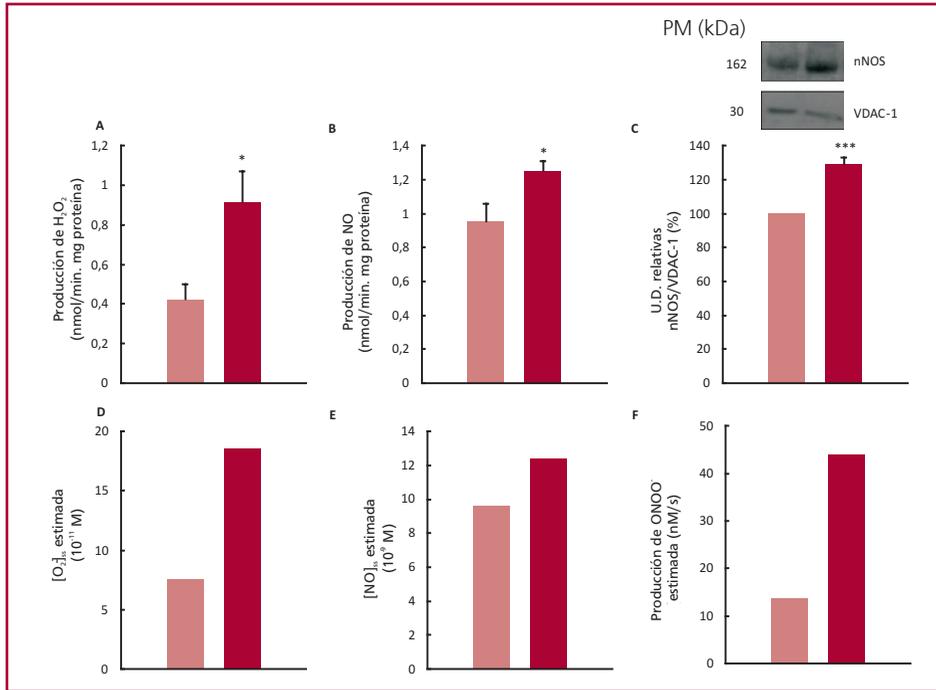
	C	DM - 10 días
<b>[Glutatión]</b> (pmol/mg proteína)		
[GSH]	104 $\pm$ 5	76 $\pm$ 7
[GSSG]	8 $\pm$ 1	5,5 $\pm$ 0,7
[GSH + GSSG]	113 $\pm$ 6	81 $\pm$ 7*
[GSH]/[GSSG]	12 $\pm$ 1	14 $\pm$ 2
<b>Mn-SOD</b>		
Actividad (USOD/mg proteína)	79 $\pm$ 5	67,5 $\pm$ 2,5*
[Mn-SOD] ( $\mu$ M)	11,2 $\pm$ 0,8	9,8 $\pm$ 0,4

\*p<0,05 DM vs. C (test t de Student)

GSH glutatión reducido

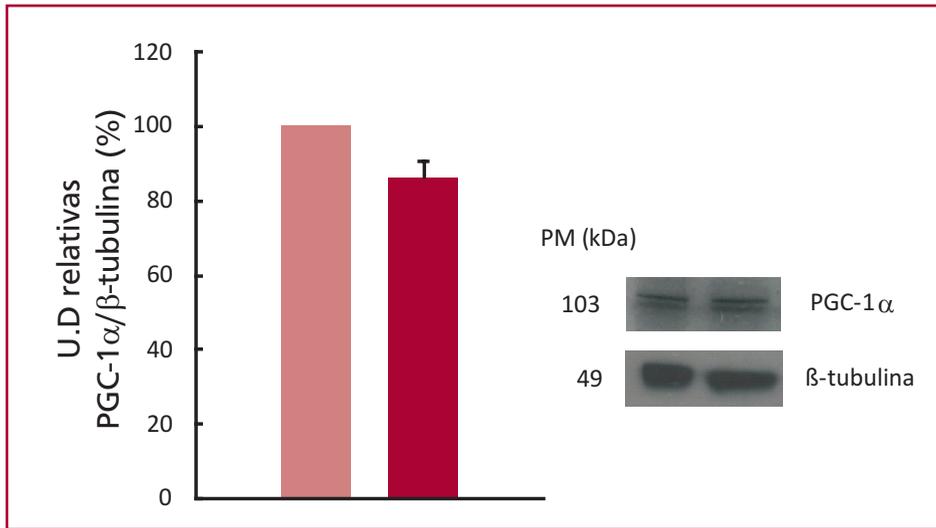
GSSG glutatión oxidado

Mn-SOD Manganese superóxido dismutasa



**Fig. 2. Especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno.** Producción mitocondrial de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> -malato+glutamato- (A), de NO (B) y de ONOO<sup>-</sup> (F). Expresión de mtNOS (C). Concentraciones mitocondriales en estado estacionario de O<sub>2</sub><sup>-</sup> (D) y de NO (E). Grupo C: barras rosas; grupo DM: barras rojas. \*\*\*p < 0,005; \*p < 0,05 DM vs. C (test t de Student)

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> peróxido de hidrógeno. NO óxido nítrico. ONOO<sup>-</sup> peroxinitrito



**Fig. 3. Biogénesis mitocondrial.** Expresión de PGC-1α en homogenato de corazón de ratas control y diabéticas. Grupo C: barras rosas; grupo DM: barras rojas.

PGC-1 α :coactivador 1 alfa del receptor activador gamma de la proliferacion peroxisomal

y/o S-nitrosilación (12,19). Dado que no se evidenciaron cambios en la expresión del factor PGC-1α ni en la masa mitocondrial cardíaca, el NO mitocondrial parecería ser una especie química ubicada río arriba en las vías de señalización que llevan a la síntesis de nuevas mitocondrias, en respuesta a la hiperglucemia.

En conclusión, la disfunción del complejo I y el aumento en las velocidades de producción mitocondrial de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, NO y ONOO<sup>-</sup> pueden considerarse señales prodrómicas subcelulares de la disfunción mitocondrial cardíaca que precede a la falla miocárdica en este modelo de DM tipo 1.

**Declaración de conflictos de intereses**

Los autores declaran que no poseen conflicto de intereses.

(Véase formulario de conflicto de intereses de los autores en la web / Material suplementario).

**Financiamiento**

Este trabajo fue realizado con subsidios de investigación de la Universidad de Buenos Aires (UBACyT 200-201-601-00132BA) y de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT, PICT 2016-0187).

**BIBLIOGRAFÍA**

- Garcia MJ, McNamara PM, Gordon T, Kannell WB. Morbidity and mortality in diabetics in the Framingham population. Sixteen year follow up study. *Diabetes* 1974;23:105-11. <https://doi.org/10.2337/diab.23.2.105>
- Miki T, Yuda S, Kouzu H, Miura T. Diabetic cardiomyopathy: Pathophysiology and clinical features, *Heart Fail. Rev* 2013; 18:149-66. <https://doi.org/10.1007/s10741-012-9313-3>
- Boudina S, Abel ED. Diabetic cardiomyopathy revisited. *Circulation* 2007;115:3213-23. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.679597>
- Huynh K, Bernardo BC, McMullen JR, Ritchie RH. Diabetic cardiomyopathy: Mechanisms and new treatment strategies targeting antioxidant signaling pathways, *Pharmacol Ther* 2014;142:375-415. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2014.01.003>
- Gøtzsche O, Darwish A, Gøtzsche L, Hansen LP, Sørensen KE. Incipient Cardiomyopathy in Young Insulin-dependent Diabetic Patients: A Seven-year Prospective Doppler Echocardiographic Study. *Diabet Med* 1996;13:834-40. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9136\(199609\)13:9<834::AID-DIA225>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9136(199609)13:9<834::AID-DIA225>3.0.CO;2-M)
- Ritchie RH, Zerenturk EJ, Prakoso D, Calkin AC. Lipid metabolism and its implications for type 1 diabetes-associated cardiomyopathy. *J Mol Endocrinol* 2017;58:R225-40. <https://doi.org/10.1530/JME-16-0249>
- Bombicino SS, Iglesias DE, Mikusic IAR, D'Annunzio V, Gelpi RJ, Boveris A, et al. Diabetes impairs heart mitochondrial function without changes in resting cardiac performance, *Int. J Biochem Cell Biol* 2016;81:335-45. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2016.09.018>
- Bombicino SS, Iglesias DE, Rukavina-Mikusic IA, Buchholz B, Gelpi RJ, Boveris A, et al. Hydrogen peroxide, nitric oxide and ATP are molecules involved in cardiac mitochondrial biogenesis in Diabetes. *Free Radic Biol. Med* 2017;112:267-76. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.07.027>
- Joffe II, Travers KE, Perreault-Micale CL, Hampton T, Katz SE, Morgan JP, et al. Abnormal cardiac function in the streptozotocin-induced non-insulindependent diabetic rat: noninvasive assessment with doppler echocardiography and contribution of the nitric oxide pathway. *J Am Coll Cardiol* 1999;34:2111-9. [https://doi.org/10.1016/S0735-1097\(99\)00436-2](https://doi.org/10.1016/S0735-1097(99)00436-2)
- Boveris A, Oshino N, Chance B. The cellular production of hydrogen peroxide, *Biochem J* 1972;128:617-30. <https://doi.org/10.1042/bj1280617>
- Boveris A, Costa LE, Cadenas E, Poderoso JJ. Regulation of mitochondrial respiration by adenosine diphosphate, oxygen and nitric oxide, *Methods Enzymol* 1999;301:188-98. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)01082-4](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)01082-4)
- Valdez LB, Zaobornyj T, Bombicino S, Iglesias DE, Boveris A, Donato M, et al. Complex I syndrome in myocardial stunning and the effect of adenosine. *Free Radic Biol Med* 2011;51:1203-12. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.06.007>
- Boveris A. Determination of the production of superoxide radicals and hydrogen peroxide in mitochondria, *Methods Enzymol* 1984;105:429-35. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05060-6](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05060-6)
- Murphy M, Noack E. Nitric oxide assay using the hemoglobin method, *Methods Enzymol* 1994; 233:240-50. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(94\)33027-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(94)33027-1)
- Boveris A, Lores Arnaiz S, Bustamante J, Alvarez S, Valdez LB, Boveris AD, et al. Pharmacological regulation of mitochondrial nitric oxide synthase, *Methods Enzymol* 2002; 359:328-39. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(02\)59196-5](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(02)59196-5)
- McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein), *J Biol Chem* 1969;244:6049-55. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)63504-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)63504-5)
- Squellerio I, Caruso D, Porro B, Veglia F, Tremoli E, Cavalca V. Direct glutathione quantification in human blood by LC- MS/MS: comparison with HPLC with electrochemical detection, *J Pharm Biomed Anal* 2012;71:111-8. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2012.08.013>
- Navarro A, Bandez MJ, Lopez-Cepero JM, Gómez C, Boveris AD, Cadenas E, et al. High doses of vitamin E improve mitochondrial dysfunction in rat hippocampus and frontal cortex upon aging, *Am. J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2011;300:R827-R834. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00525.2010>
- Riobó NA, Clementi E, Melani M, Boveris A, Cadenas E, Moncada S, et al. Nitric oxide inhibits mitochondrial NADH:ubiquinone reductase activity through peroxynitrite formation. *Biochem J* 2001;359:139-45. <https://doi.org/10.1042/bj3590139>