

Universidad de Granada
Instituto de Biotecnología
Facultad de Medicina
Departamento de Fisiología



**FISIOPATOLOGÍA MITOCONDRIAL
EN LA SEPSIS EXPERIMENTAL:
EFECTO PROTECTOR DE LA MELATONINA**

Luis Carlos López García
Granada, 2005



CERTIFICACIONES

Dr. DARÍO ACUÑA CASTROVIEJO, catedrático del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada,

Certifica que D. Luis Carlos López García, Licenciado en Biología, ha realizado bajo mi dirección y en el Departamento de Fisiología (Instituto de Biotecnología) de la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada el presente trabajo de investigación, titulado: **“Fisiopatología mitocondrial en la sepsis experimental: efecto protector de la melatonina”**, que ha sido objeto de su Tesis Doctoral, reuniendo las condiciones necesarias para optar al grado de Doctor.

Granada, 15 de Marzo de 2005

El director,

El interesado,

Fdo. Darío Acuña Castroviejo

Fdo. Luis Carlos López García

Dra. GERMAINE ESCAMES ROSA, profesora contratada doctora del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada,

Certifica que D. Luis Carlos López García, Licenciado en Biología, ha realizado bajo mi dirección y en el Departamento de Fisiología (Instituto de Biotecnología) de la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada el presente trabajo de investigación, titulado: **“Fisiopatología mitocondrial en la sepsis experimental: efecto protector de la melatonina”**, que ha sido objeto de su Tesis Doctoral, reuniendo las condiciones necesarias para optar al grado de Doctor.

Granada, 15 de Marzo de 2005

El director,

El interesado,

Fdo. Germaine Escames Rosa

Fdo. Luis Carlos López García



PUBLICACIONES

PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN QUE HAN FINANCIADO EL ESTUDIO.

1. Escames G. Estudio experimental y clínico del papel de la mitocondria en la fisiopatología de la sepsis. Evaluación de la melatonina y la S-adenosil-L-metionina como protectores mitocondriales. Acuña-Castroviejo D, Torres JM y Peñas L. Instituto de Salud Carlos III (Ministerio de Sanidad y Consumo). FIS 01-1076, 2001-2003.
2. Escames G. Caracterización de la óxido nítrico sintasa mitocondrial y su regulación por la melatonina en la sepsis. Acuña-Castroviejo D, Torres JM, Ros E y Rivas I. Instituto de Salud Carlos III (FIS). PI030817, 2003-2006.

PUBLICACIONES RELACIONADAS CON ESTA MEMORIA.

TRABAJOS.

1. López LC, Escames G, Utrilla P, Tapias V, León J, Acuña-Castroviejo D (2005). Inducible form of mitochondrial NO synthase: its source and effects on mitochondrial bioenergetics. *Crit. Care Med.*, (enviado).
2. Escames G, López LC, León J, Utrilla P, Hitos AB, Acuña-Castroviejo D (2005). Melatonin downregulates mitochondrial nitric oxide synthase and prevents mitochondrial failure in sepsis. *J. Pineal Res.* 2005 (enviado).
3. López LC, Escames G, Hitos AB, León J, Utrilla P, Acuña-Castroviejo D. Lacking of inducible mitochondrial NOS expression in B6.129P2-Nos2^{tm1Lau} mice prevents sepsis-induced heart failure. En redacción.

COMUNICACIONES A CONGRESOS.

1. López LC, Escames G, Sarno F, Rivas I, Tapias V, Bikjdaouene L, El haouhay N, Acuña-Castroviejo D. Melatonin counteracts mitochondrial damage during sepsis. *1st Luso-Spanish Congress on Free Radicals. 6th. Portuguese Congress on Free Radicals in Chemistry, Biology and Medicine. Actas del Congreso 1: 106.* Coimbra, 04-06 de Diciembre de 2003.
2. Escames G, Sarno F, López LC, Rivas I, Tapias V, Bikjdaouene L, El haouhay N, Navarro A, Acuña-Castroviejo D. Melatonin counteracts mitochondrial sepsis-induced mtNOS and NO production in mice. *1st Luso-Spanish Congress on Free Radicals. 6th. Portuguese Congress on Free Radicals in Chemistry, Biology and Medicine. Actas del Congreso 1: 88.* Coimbra, 04-06 de Diciembre de 2003.
3. López García LC, Escames G, Utrilla P, Hitos AB, Rodríguez MI, Rivas I, Acuña-Castroviejo D. Heart mitochondria failure in CLP-induced sepsis: the role of inducible mtNOS and prevention by melatonin. *XXXIII congress of the*

spanish society of the physiological sciences, sponsored symposia with the physiological society (UK and Eire) and the dutch society of physiology. J. Physiol. Biochem. 61 (1): 294. Sevilla, 10-13 de Febrero de 2005.

4. Escames G, Hitos AB, López LC, Tapias V, Utrilla P, Arana C, Barbero E, Acuña-Castroviejo D. Mitochondrial nitric oxide synthase: two isoforms in the same organelle. *XXXIII congress of the spanish society of the physiological sciences, sponsored symposia with the physiological society (UK and Eire) and the dutch society of physiology. J. Physiol. Biochem. 61 (1): 295. Sevilla, 10-13 de Febrero de 2005.*



AGRADECIMIENTOS

Hace algo menos de dos años y medio que llegué al grupo de investigación del profesor Darío Acuña Castroviejo tras asistir a una conferencia impartida por él mismo donde mostraba los interesantes estudios que se estaban llevando a cabo en su laboratorio. Tras la entrevista oportuna, Darío me dio la oportunidad de comenzar a trabajar en lo que ahora es esta Tesis Doctoral. Él me ha inculcado el entusiasmo e interés por la ciencia y la necesidad de la voluntad, la disciplina y la constancia en el trabajo diario como pilares básicos para hacer ciencia. Junto a Darío, la profesora Germaine Escames me enseñó el funcionamiento del laboratorio así como parte de las técnicas descritas en este trabajo. Pero sobre todo Germaine, más que mi directora de tesis, ha sido amiga y compañera de laboratorio, ayudándome siempre que fue necesario y dándome sabios consejos que me han servido y seguro me servirán en mi carrera científica. Su constante colaboración ha sido fundamental en el desarrollo de este trabajo. A ambos, Darío y Germaine, quiero mostrarles mi especial agradecimiento por sus enseñanzas y apoyo en la realización de esta Tesis.

Además de ellos, en este tiempo he encontrado respaldo y colaboración en todos los miembros que pertenecieron y pertenecen a este grupo de investigación: Pepi León, siempre generosa y disponible para solucionar cualquier problema, y de la que he aprendido mucho, especialmente en esos comienzos llenos de incertidumbre; Francesca y Víctor, con los que coincidí en la llegada al laboratorio y con los que he vivido momentos inolvidables tanto dentro como fuera del laboratorio; Elisa, a la que agradezco su gran ayuda en el cuidado de los animales; Inés, Maribel, Carlos, Marcos, Ana, Ángel, Miguel y María Dolores, que siempre estuvieron cuando les necesité y me proporcionaron ese ambiente necesario para trabajar con ilusión; y la profesora Pilar Utrilla, a la que agradezco su estimable colaboración en los experimentos de respiración

mitocondrial. Con todos ellos he convivido durante muchas horas a lo largo de este tiempo y han sido, cada uno a su manera, claves para conclusión de este trabajo.

Fuera del laboratorio también encontré el apoyo necesario. Y aquí debo mostrar mi profundo agradecimiento a mi familia, especialmente a mis padres y abuelas. Ellos me han educado en esos valores tan necesarios en cualquier aspecto de la vida, me han animado en los momentos más duros y se han interesado día a día por todo el desarrollo de mis experimentos. Sin duda, gracias a ellos hoy puedo presentar con orgullo esta Tesis Doctoral.

También he de dar las gracias a Beatriz, por mostrarme su comprensión y “aguantar” con paciencia todas mis explicaciones sobre el transcurso de mi trabajo. Y a mis amigos, por darme esos momentos de sosiego también importantes para afrontar cada día con ilusión.

Finalmente, agradezco a la Fundación Hospital Clínico por el soporte institucional que han prestado a la realización y difusión de este estudio.

A decorative horizontal scroll with a black outline and a light gray shadow. The scroll is open at both ends, with the top edge curving upwards and the bottom edge curving downwards. The word "ABREVIATURAS" is centered within the scroll.

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS.

ADNmt: ADN mitocondrial.

AFMK: N¹-acetil-N²-formil-5-metoxikinuramina.

aMT: melatonina.

AP-1: proteína activadora 1.

ARDS: síndrome de dificultad respiratoria aguda.

BH₄: tetrahidrobiopterina.

CaM: calmodulina.

CRE: elemento de respuesta a AMPc.

CTE: cadena de transporte electrónico.

COX: citocromo oxidasa.

eNOS: óxido nítrico sintasa endotelial.

ERK: kinasa regulada por señal extracelular.

ERNs: especies reactivas de nitrógeno.

EROs: especies reactivas de oxígeno.

FAD: flavina adenina dinucleótido.

FMN: flavina mononucleótido.

GPx: glutathion peroxidasa.

GRd: glutathion reductasa.

GSH: glutathion reducido.

GSSG: glutathion oxidado.

HIOMT: hidroxindol-O-metiltransferasa.

H₂O₂: peróxido de hidrógeno.

ICAM-1: molécula de adhesión intercelular 1

IFN: interferón.

IκB: inhibidor κB.

IKK: complejo inhibidor de κB kinasa.

IL: interleuquina.

iNOS: óxido nítrico sintasa inducible.

IRAK: Kinasa asociada al receptor de IL-1.

JAKs: janus kinasas.

JNK: kinasa c-jun-N-terminal.

LBP: proteína de unión a LPS.

LPS: lipopolisacáridos.

MAPK: proteína kinasa activada por mitógeno.

MD-2: proteína mieloide de diferenciación 2.

MODS: multi organ dysfunction syndrome (síndrome de disfunción multiorgánica).

mtNOS: óxido nítrico sintasa mitocondrial.

MyD88: factor mieloide de diferenciación 88.

NAT: N-acetiltransferasa

nNOS: óxido nítrico sintasa neuronal.

NO[•]: óxido nítrico.

NOD: dominios de oligomerización de nucleótidos.

NOS: óxido nítrico sintasa.

OH[•]: radical hidroxilo.

ONOO⁻: peroxinitritos.

PAF: factor de activación plaquetaria.

PAMPs: patrones moleculares asociados a patógenos.

SDH: succinato deshidrogenasa.

SER: elemento de respuesta a suero.

SIRS: síndrome de respuesta inflamatoria sistémica.

SOD: superóxido dismutasa.

STAT1: señal de transducción y activador de transcripción 1.

TGF- β : factor de crecimiento transformante β .

TIR: "Toll/IL-1 receptor/plant R gene product homology".

TLRs: receptores similares a los "Toll".

TNF: factor de necrosis tumoral.

TRAF6: factor 6 activado por receptor de TNF.

TRIF: adaptador de inducción de IFN- β que contiene dominio TIR.



ÍNDICE

ÍNDICE

Introducción.

<u>1.- Función mitocondrial.</u>	<u>3</u>
1.1.- Origen y estructura.	3
1.2.- CTE y fosforilación oxidativa.....	4
1.3.- NOS mitocondrial.....	12
1.4.- Producción mitocondrial de radicales libres y efectos en la función mitocondrial.....	16
<u>2.- Sepsis.</u>	<u>21</u>
2.1.- Definición e importancia sanitaria.	23
2.2.- Mecanismos de la respuesta inmunológica frente a la infección:	23
2.2.1.- Reconocimiento de los componentes microbianos.....	23
2.2.2.- Respuesta inmune y señales de amplificación.....	25
2.2.3.- iNOS en la sepsis. Activación y vías de señalización.	29
2.2.4.- mtNOS en la sepsis.....	31
2.3.- NO [•] y disfunción mitocondrial en la sepsis.....	32
2.4.- Fallo respiratorio y cardíaco en la sepsis.....	33
<u>3.- Melatonina.</u>	<u>35</u>
3.1.- Síntesis de melatonina en mamíferos.	36
3.2.- Mecanismos de protección mitocondrial de la melatonina.....	38
3.2.1.- Acción sobre la mtNOS.....	38
3.2.2.- Antioxidante de acción directa.	39
3.2.3.- Antioxidante de acción indirecta.	40
3.2.4.- Potenciación de la CTE.	41
3.3.- Papel terapéutico de la melatonina en la fisiopatología de la sepsis.	42

Objetivos.

<u>1.- Objetivos.</u>	<u>47</u>
-----------------------------	-----------

Material y métodos.

<u>1.- Animales, procedimiento quirúrgico y tratamiento.</u>	<u>51</u>
--	-----------

1.1.- Animales y grupos experimentales.	51
--	----

1.2.- Procedimiento quirúrgico y tratamiento.	51
--	----

<u>2.- Obtención de la fracción mitocondrial.</u>	<u>52</u>
---	-----------

2.1.- Aislamiento de la fracción mitocondrial por centrifugación diferencial.	52
--	----

2.2.- Aislamiento de la fracción mitocondrial por centrifugación diferencial y gradiente de densidad con percoll.	53
--	----

<u>3.- Métodos analíticos.</u>	<u>54</u>
--------------------------------------	-----------

3.1.- Determinación de la concentración de proteínas: método de Lowry.	54
---	----

3.2.- Determinación de la actividad óxido nítrico sintasa mitocondrial (mtNOS).	56
--	----

3.3.- Determinación de los niveles intramitocondriales de nitritos.	58
--	----

3.4.- Medida de la actividad de los complejos de la CTE.	59
---	----

3.4.1.- Determinación de la actividad específica de la NADH ubiquinona (CoQ) oxidoreductasa (complejo I).	60
--	----

3.4.2.- Determinación de la actividad específica de la succinato dicloroindofenol (DCIP) oxidoreductasa (complejo II).	61
---	----

3.4.3.- Determinación de la actividad específica de la ubiquinol: citocromo c oxidoreductasa (complejo III).	61
---	----

3.4.4.- Determinación de la actividad específica de la citocromo c oxidasa (complejo IV).	62
--	----

3.4.5.- Determinación de la actividad específica de la ATP sintasa (complejo V).	62
---	----

3.5.- Medida de la respiración mitocondrial y control respiratorio.	64
--	----

3.6.- Determinación del contenido intramitocondrial de AMP, ADP y ATP.	65
---	----

3.7.- Determinación de la peroxidación lipídica intramitocondrial.	67
---	----

3.8.- Medida de los niveles intramitocondriales de glutatión total, glutatión oxidado (GSSG) y glutatión reducido (GSH).	68
---	----

3.9.- <i>Determinación de la actividad de la glutathion peroxidasa (GPx) mitocondrial</i>	69
3.10.- <i>Determinación de la actividad de la glutathion reductasa (GRd) mitocondrial</i>	71
<u>4.- Análisis estadístico</u>	<u>72</u>
<u>5.- Reactivos utilizados</u>	<u>72</u>

Resultados.

<u>1.- mtNOS y NO[•] en la sepsis</u>	<u>79</u>
1.1.- <i>Efecto de la falta del gen de la iNOS en la actividad de la mtNOS</i>	79
1.2.- <i>Efecto de la ausencia del gen de la iNOS en los niveles intramitocondriales de nitritos</i>	82
<u>2.- Bioenergética mitocondrial en la sepsis</u>	<u>85</u>
2.1.- <i>Efecto de la falta del gen de la iNOS en la actividad de los complejos de la CTE</i>	85
2.2.- <i>Efecto de la falta del gen de la iNOS en la actividad ATP sintasa</i>	89
2.3.- <i>Efecto de la falta del gen de la iNOS en los niveles intramitocondriales de nucleótidos de adenina</i>	91
2.4.- <i>Efecto de la falta del gen de la iNOS en la respiración mitocondrial</i>	96
<u>3.- Estrés oxidativo en la sepsis</u>	<u>101</u>
3.1.- <i>Efecto de la falta del gen de la iNOS en la oxidación de los lípidos de membrana mitocondriales</i>	101
3.2.- <i>Efecto de la falta del gen de la iNOS en la actividad de la GPx y Grd</i>	103
3.3.- <i>Efecto de la falta del gen de la iNOS en los niveles intramitocondriales de glutathion total, GSH y GSSG</i>	106

Discusión.

<u>1.- mtNOS y NO[•] en la sepsis</u>	<u>113</u>
--	------------

2.- Bioenergética mitocondrial en la sepsis..... 117
3.- Estrés oxidativo en la sepsis..... 122

Conclusiones.

1.- Conclusiones..... 129

Bibliografía.

1.- Bibliografía..... 133

A decorative horizontal scroll graphic with a black outline and a light gray shadow. The scroll is unrolled in the middle, revealing the text. The left and right ends of the scroll are curled up.

INTRODUCCIÓN

1.- FUNCIÓN MITOCONDRIAL.

Las mitocondrias son orgánulos celulares que se identificaron y aislaron definitivamente a lo largo de la década de 1950-1960 y que en los últimos años han adquirido un especial interés debido a la aparición de las llamadas “enfermedades mitocondriales” y al papel central de las mitocondrias en la apoptosis o muerte celular programada (Scheffler, 2001).

1.1.- Origen y estructura.

Desde el descubrimiento de las mitocondrias, se han propuesto diversas hipótesis como posible origen de estos orgánulos celulares, pero sin duda, la teoría endosimbiótica (Margilius, 1981) es la más aceptada en la actualidad por la comunidad científica. La teoría explica que una célula protoeucariota anaeróbica y sin mitocondria evolucionó primero y, conforme la atmósfera se fue enriqueciendo en oxígeno este organismo capturó una proteobacteria aerobia por endocitosis. Tras establecer una relación simbiótica, hubo una pérdida de genes redundantes y transferencia de genes de la bacteria al núcleo conduciendo a una distribución de genes entre los dos genomas. De esta manera, la proteobacteria inicial se destinaría a convertirse en lo que actualmente conocemos como mitocondria.

Las mitocondrias existen en una variedad de formas y tamaños pero generalmente son de 1 a 2 μm de longitud y de 0.25 a 0.5 μm de diámetro. Es importante indicar también que la forma de las mitocondrias es dinámica, produciéndose fenómenos de fisión y fusión apreciables con técnicas de microscopía confocal (Karbowski y cols., 2003; Nisoli y cols., 2004)

La estructura de la mitocondria está limitada por dos membranas que desempeñan un papel crucial en las actividades de las mitocondrias. La membrana

externa es una bicapa lipídica relativamente simple, conteniendo estructuras proteicas llamadas porinas que permiten el paso de moléculas de menos de 10 kilodaltons (kDa). Asimismo, la membrana externa también posee complejos proteicos encargados de la importación de proteínas llamados TOM (del inglés “translocase of the outer membrane”). Por otro lado, la membrana interna es permeable al oxígeno, al dióxido de carbono y al agua, y posee una estructura compleja que incluye: complejos de la cadena de transporte electrónica incluyendo la succinato deshidrogenasa, la ATP sintasa, los complejos proteicos para la importación de proteínas llamados TIM (del inglés “translocase of the inner membrane”) y las proteínas desacoplantes UCPs (del inglés “uncoupling proteins”). Además, la membrana interna está organizada en pliegues o crestas laminares que incrementan su área superficial. Las membranas crean dos compartimentos mitocondriales:

- El espacio intermembrana que, como su propio nombre indica, es el espacio situado entre las dos membranas y tiene un papel importante en la fosforilación oxidativa.

- La matriz, que es el espacio que engloba la membrana interna y que contiene ribosomas para la síntesis de proteínas, su propio genoma (ADNmt), las enzimas de la β -oxidación de ácidos grasos y la mayoría de las enzimas del ciclo de Krebs, así como FAD, NAD, NADP, ADP y ATP.

1.2.- Cadena de transporte electrónico y fosforilación oxidativa.

En condiciones aeróbicas, la fosforilación oxidativa acoplada a la transferencia electrónica a través de la cadena de transporte electrónico (CTE) es responsable de la producción del 90-95 % del ATP que genera la célula (Skulachev, 1999). La CTE tiene como misión oxidar los equivalentes reductores (NADH y FADH₂) generados en el

ciclo de Krebs por la oxidación del acetylCoA, que proviene de la combustión de los principios inmediatos. El flujo de electrones generado se canaliza en reacciones redox con los diferentes complejos enzimáticos de la CTE, con el oxígeno molecular como aceptor final. La reducción del oxígeno es el paso final que se realiza por la citocromo oxidasa, acompañado del aporte de protones proveniente del bombeo que se establece en diferentes puntos de la CTE. La energía que se produce en estas reacciones genera un potencial eléctrico y un gradiente de pH a través de la membrana interna. La energía libre de estos procesos se utiliza para bombear los protones desde un lado a otro de la membrana en tres lugares específicos de la cadena, y el gradiente electrónico resultante se usa para sintetizar ATP mediante el complejo V o ATP sintasa. Durante este proceso el ADP es fosforilado a ATP (Figura 1) (Mitchell, 1961; 1966).

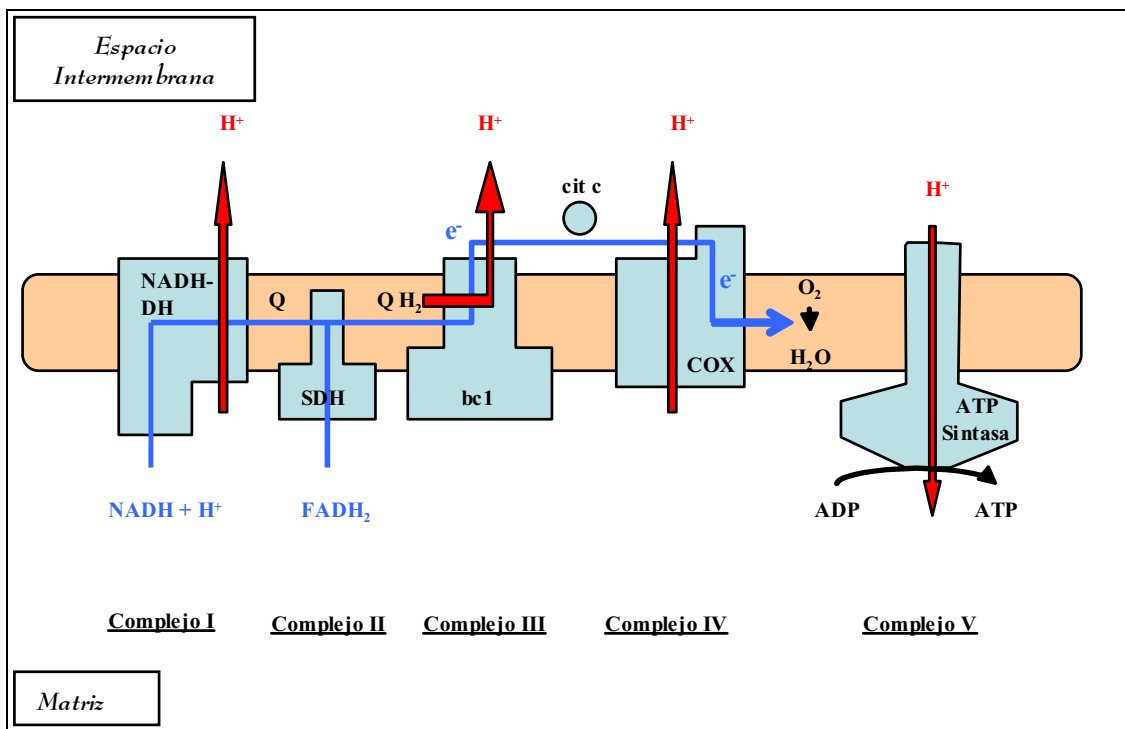


Figura 1. Esquema de la CTE acoplada a la fosforilación oxidativa.

La CTE está compuesta por cinco complejos enzimáticos y dos moléculas que actúan como nexo de unión o lanzadera (coenzima Q o ubiquinona y citocromo c) (Saraste, 1999):

- *Complejo I (NADH ubiquinona (CoQ) oxidoreductasa)*: es el complejo más grande de la CTE. El complejo I cataliza la transferencia de electrones desde el NADH a la ubiquinona ligado a la traslocación de protones (Friedrich y cols., 1995). En mamíferos el complejo I contiene 42 o 43 subunidades diferentes (25 polipéptidos, de los cuales 7 están codificados por el ADNmt) en una estequiometría no conocida, un flavín mononucleótido, siete u ocho centros Fe-S diferentes de naturaleza no hémica, lípidos unidos covalentemente fundamentales para su actividad catalítica y 3 moléculas de quinol (Walter, 1995; Saraste, 1999). El monómero del complejo I tiene un tamaño aproximado de 900 kDa. A través de técnicas de microscopía electrónica de partículas simples se ha revelado que el complejo I se dispone en una estructura en L con dos dominios grandes separados por un collar fino. Un brazo de la estructura se encuentra inmerso en la membrana mitocondrial, mientras que el otro penetra dentro de la matriz (Schulte y cols., 1994; Guenebaut y cols., 1998; Saraste, 1999). El brazo periférico, que incluye un mononucleótido de flavina y al menos 4 centros Fe-S, forma la fracción NADH deshidrogenasa. El brazo unido a la membrana contiene las siete subunidades codificadas por el ADNmt, uno o dos centros Fe-S, y constituye la fracción ubiquinona oxidoreductasa (Hofhaus y cols., 1991; Schulte y cols., 1994). Funcionalmente, un déficit o bloqueo a nivel del complejo I (con rotenona, por ejemplo) impide la oxidación del NADH, mientras que la

oxidación del FADH_2 generado en la reacción de la succinato deshidrogenasa, no se ve afectada porque está mediado por el complejo II.

- *Complejo II (succinato ubiquinona oxidoreductasa)*: es un componente del ciclo de Krebs y participa en la CTE transfiriendo electrones desde el succinato al *pool* de ubiquinona. No trasloca protones al espacio intermembrana y, por tanto, tan solo alimenta suministra electrones a la CTE (Saraste, 1999). Contiene cuatro polipéptidos y es el único que no posee subunidades codificadas por el ADNmt. Estructuralmente, se puede dividir en dos fracciones: una soluble formada por la succinato deshidrogenasa (SDH) y otra que sirve como anclaje a la membrana. La SDH a su vez, está formada por dos subunidades: una subunidad flavoproteica (70 kDa), que contiene el lugar de unión al succinato y la parte FAD que está unida covalentemente a la enzima, y otra subunidad compuesta por tres centros Fe-S (30 kDa). La SDH se une a la membrana interna mediante dos polipéptidos (15 y 13 kDa) que contienen un grupo hemo (citocromo b558); estas dos proteínas son necesarias para la unión con la ubiquinona (Ackrell y cols., 1992; Saraste, 1999). De forma similar al complejo I, un déficit o bloqueo a nivel del complejo II (con malonato, por ejemplo) se caracteriza por una disminución de la oxidación de los sustratos FADH_2 dependiente, como el succinato, y una oxidación normal de los que dependen del NADH, como malato, glutamato o aspartato.

- *Complejo III (Ubiquinol citocromo c oxidoreductasa)*: transfiere electrones desde el ubiquinol hasta el citocromo c. Esta reacción de oxidación-reducción va acoplada a la generación de un gradiente de protones a través de la membrana interna por un mecanismo conocido como ciclo Q (Trumpower, 1990) (Figura 2). Así, el ubiquinol, un compuesto liposoluble que puede

moverse dentro de la membrana, acopla la reacción de oxidación-reducción a la protonación y desprotonación. Estas dos reacciones son topológicamente organizadas, de tal manera que la oxidación del ubiquinol conduce al transporte activo de protones a través de la membrana interna (Saraste, 1999). Esto requiere dos sitios activos, uno para la oxidación del ubiquinol y liberación de protones en la superficie externa de la membrana interna (Q_0), y otro para la reducción de la ubiquinona acoplada a la captura de protones desde el lado interno o matricial de la membrana interna (Q_1). Este mecanismo requiere que los electrones sean transferidos desde el sitio Q_0 al sitio Q_1 (Saraste, 1999) (Figura 2). Estructuralmente, el complejo III de mamíferos contiene 11 subunidades, pero solamente tres de ellas llevan centros redox los cuales son usados en la conservación de la energía: Estas tres subunidades tienen subunidades homólogas en bacterias (Saraste, 1999). Las subunidades clave son: el citocromo b, que está codificado por el ADNmt (Anderson y cols., 1981) y que tiene 8 hélices transmembrana y dos grupos hemo entre la hélice B y D; una proteína Fe-S anclada a la membrana con un centro tipo Rieske (Fe_2S_2); y un citocromomo c_1 anclado a la membrana (Saraste, 1999). La función del resto de subunidades no se conoce (Adams y Turnbull, 1996) aunque algunos experimentos realizados en levaduras indican que desempeñan un papel en el ensamblaje del complejo y posiblemente en la regulación de su actividad, mientras que otros experimentos apuntan a que podrían estar implicadas en la importación de proteínas (Braun y Schmitz, 1995), sugiriendo una multifuncionalidad del complejo III. Por tanto, el sitio Q_0 es localizado entre la proteína Fe-S y el citocromo b, cercano a la cara externa de la membrana interna, y el sitio Q_1 junto al citocromo b, en la cara matricial de la

membrana interna (Saraste, 1999). Los dos grupos hemo del citocromo b tienen diferentes potenciales redox, localizándose el sitio Q_0 cerca del grupo hemo con bajo potencial y el sitio Q_1 cerca del grupo hemo con alto potencial. Esta propiedad es aprovechada para generar parte de la fuerza protón-motriz con el paso de electrones a través de los sitio Q_0 y Q_1 . En conjunto, este mecanismo conduce a la traslocación neta de dos protones por cada electrón transferido al citocromo c (Figura 2) (Saraste, 1999). Por último, indicar que un bloqueo a nivel del complejo III altera la utilización de sustratos NADH y $FADH_2$ dependientes.

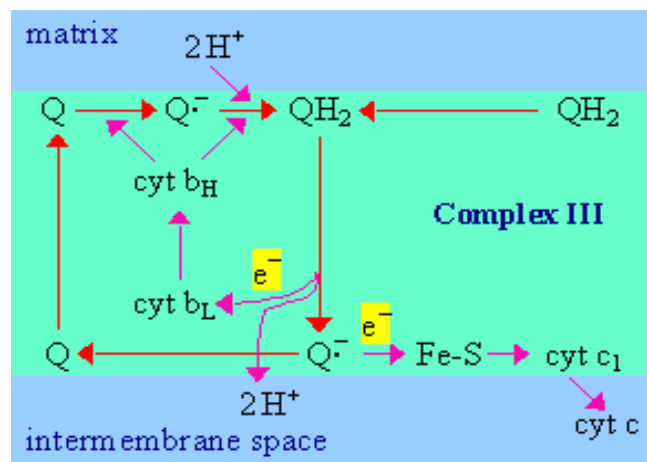


Figura 2. Esquema del ciclo Q.

- *Complejo IV (citocromo c oxidasa o COX):* cataliza la transferencia de cuatro electrones desde el citocromo c hasta el oxígeno molecular. Su sustrato, el citocromo c, es una hemoproteína soluble en agua que dona electrones en el lado citoplasmático de la membrana interna. Estos electrones son transferidos al sitio activo, el cual contiene hierro y cobre que son usados para reducir el O_2 a dos moléculas de agua, en un ciclo que incluye varios intermediarios (Saraste, 1999). Los protones necesarios para esta reacción son obtenidos de la

matriz mitocondrial a través de dos canales. Estos mismos canales son usados para bombear un protón por cada electrón que cruza la membrana (Saraste, 1999). Estructuralmente, la citocromo oxidasa contiene 13 subunidades. Las tres mayores (I, II y III), codificadas por el ADNmt, están asociadas al grupo prostético y realizan las funciones catalíticas y de bombeo de protones. Las otras 10 subunidades más pequeñas rodean a las anteriores y están codificadas por el ADN nuclear. La estructura tridimensional de la COX (Tsukihara y cols., 1995; Iwatta y cols., 1995) ha permitido establecer sus características básicas y la localización precisa de los lugares de unión a metales. La transferencia de electrones en este complejo se inicia con la unión del citocromo *c* a la subunidad II en la parte externa de la membrana. Esta subunidad contiene el centro de cobre bimetalico (CuA). Los electrones pasan desde el citocromo *c* al CuA, luego al hemo *a*, y de allí al centro binuclear hemo *a*₃-CuB, desde donde pasarán finalmente al oxígeno. El hemo *a*, hemo *a*₃ y el CuB se encuentran ligados a la subunidad I por seis histidinas. La subunidad III no contiene centro redox y parece desempeñar un papel importante en el ensamblaje del complejo IV (Saraste, 1999). Bloqueos a nivel del complejo IV (por ejemplo, con cianuro) tienen un efecto paralizante de toda la CTE. Además, el óxido nítrico (NO[•]) parece tener un papel regulador de este complejo tanto en situaciones fisiológicas como fisiopatológicas.

- *Complejo V (F₀-F₁-ATP sintasa)*: es una enzima funcionalmente reversible ya que a partir de ADP y Pi puede sintetizar ATP utilizando la fuerza motriz generada a través de la membrana interna o puede hidrolizar ATP para bombear protones en contra del gradiente electroquímico. La enzima bovina parece contener 16 proteínas diferentes (dos codificadas por ADNmt), con un

peso molecular superior a los 500 kDa. Está formada por dos fracciones, F_0 y F_1 , unidas por pedúnculo formado por dos estructuras paralelas (Saraste, 1999). La fracción F_0 está unida a la membrana y contiene un canal de protones. La fracción F_1 , que penetra en la matriz, es la porción catalítica de la enzima y está formada por cinco subunidades diferentes (α , β , γ , δ y ϵ) en una estequiometría 3:3:1:1:1 (Saraste, 1999). Las subunidades α y β son homólogas y ambas unen nucleótidos, aunque sólo la β tiene actividad catalítica. Por tanto, hay tres sitios activos dentro de la fracción catalítica, y acorde al mecanismo de intercambio y fijación de Boyer (1993; 1997) cada sitio pasaría por un ciclo de tres estados diferentes (“abierto”, “relajado” y “cerrado”, que corresponden a un estado vacío, un estado con ADP y Pi unido y a un estado con ATP unido respectivamente). En un momento dado los tres sitios están en diferentes estados. Se ha demostrado que la formación de ATP no requiere energía una vez que el sustrato ha sido separado de la solución acuosa, sino que la energía se requiere para la unión del sustrato y liberación del ATP (Boyer, 1993; Boyer, 1997; Saraste, 1999). En apoyo del mecanismo propuesto por Boyer (1997), se ha descrito una asimetría intrínseca de la enzima que sugiere que la enzima opera por medio de una catálisis rotacional. Sin embargo, aún quedan cuestiones por resolver sobre el funcionamiento de este mecanismo (Saraste, 1999).

1.3.- Óxido nítrico sintasa mitocondrial (mtNOS).

El NO \cdot puede ser producido por una familia de enzimas denominadas óxido nítrico sintasas (NOS, del inglés “nitric oxide synthase”), que catalizan siempre la misma reacción (Figura 3):

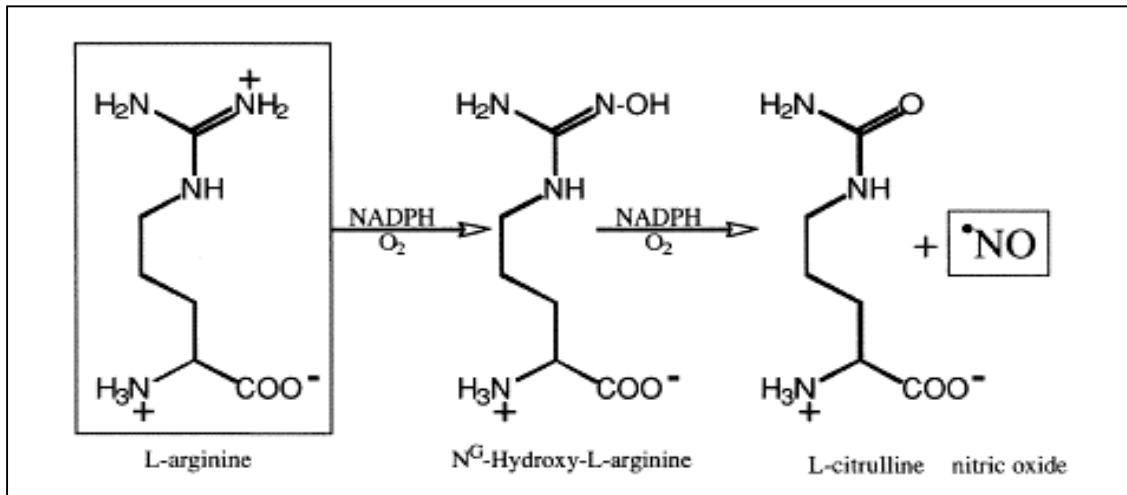


Figura 3. Síntesis de NO \cdot catalizada por la NOS.

La enzima posee un dominio reductasa y un dominio oxigenasa (Figura 4) y utiliza L-arginina y oxígeno como sustratos para formar NO \cdot y L-citrulina como productos en relación estequiométrica 1:1. Para llevar a cabo esta reacción necesita una serie de cofactores: NADPH; la flavina adenina dinucleótido (FAD) y la flavina mononucleótido (FMN), utilizados como puentes electrónicos que permiten el paso de electrones desde el NADPH al centro catalítico de la enzima. Éste, está formado a su vez por un grupo hemo (protoporfirina IX) que en estado reducido puede unirse al oxígeno molecular; la calmodulina (CaM), que se activa al unirse a los iones de calcio (Ca⁺²), es necesaria para formar el tetrámero activo de la enzima (la iNOS no necesita que la CaM se active y se una a su cadena, ya que este polipéptido está presente entre el dominio reductasa y el sitio de unión al FMN); y la tetrahydrobiopterina (BH₄), que

aumenta la afinidad de la enzima por la L-arginina, permitiendo tanto un cambio conformacional como de configuración electrónica de la NOS. También es necesaria para formar el tetrámero activo (Andrew y Mayer, 1999) (Figura 4).

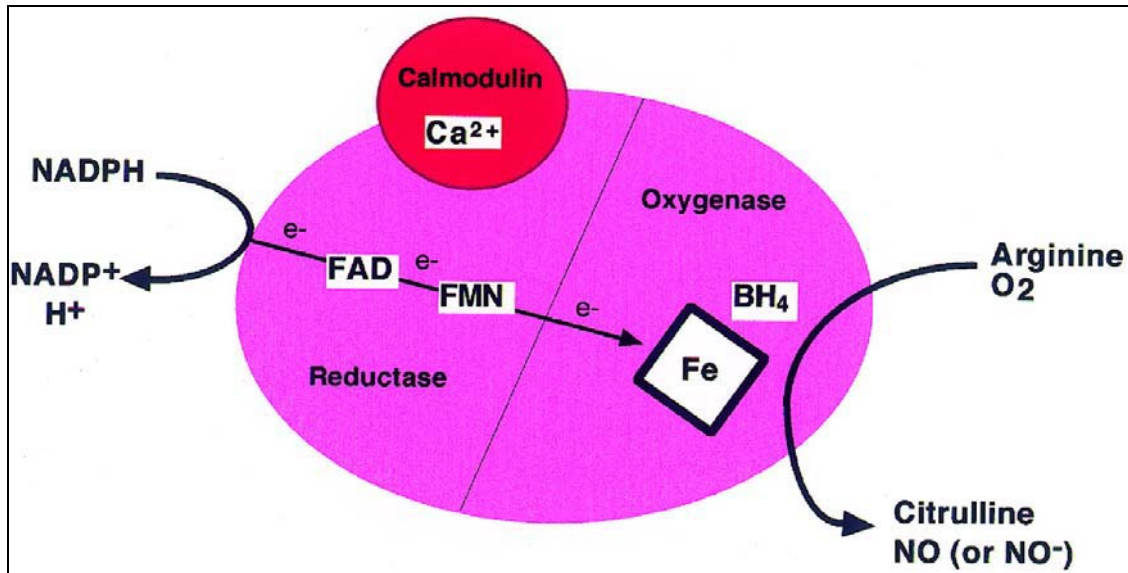


Figura 4. Cofactores y transferencia electrónica a través de los dominios de la NOS.

Tradicionalmente se han diferenciado tres isoformas de la NOS en función de los genes de donde proceden, de su localización, regulación, propiedades catalíticas y sensibilidad a inhibidores. Estas tres isoformas se denominan: NOS endotelial (eNOS) (también cNOS o NOS-3), NOS neuronal (nNOS) (también bNOS o NOS-1) y NOS inducible (iNOS) (también macNOS, mNOS o NOS-2) (Andrew y Mayer, 1999; Alderton y cols., 2001). Entre las características que las distinguen, hay que destacar dos:

- El tamaño de los monómeros, esto es, 134 kDa la eNOS, 160 kDa la nNOS y 130 kDa la iNOS, además de algunas variantes surgidas por ensamblaje alternativo (Alderton y cols., 2001).

- La dependencia de Ca^{+2} de las llamadas isoformas constitutivas (eNOS y nNOS) en contraste con la independencia de Ca^{+2} de la isoforma inducible (iNOS) (Andrew y Mayer, 1999; Alderton y cols., 2001).

Sin embargo, algunas de las características usadas para distinguirlas se están poniendo en duda en los últimos años, como es el caso de sus propiedades catalíticas, regulación y localización (Alderton y cols., 2001). A esta revisión de conceptos ha contribuido el descubrimiento de una óxido nítrico sintasa en la mitocondria (mtNOS) (Bates y cols., 1995; Kobzik y cols., 1995; Fradsen y cols., 1996) y los posteriores acercamientos a sus características bioquímicas (Chafourifar y cols., 1997; Tatoyan y Giulivi, 1998; Giulivi y cols., 1998). La reacción catalizada por esta enzima es la misma que la catalizada por las formas citosólicas. Ya que no parece existir un gen específico para la mtNOS, ésta debería proceder del gen que codifica alguna de las tres isoformas citosólicas, y es aquí donde ha surgido una gran controversia en los últimos años (Brookes, 2004). Los estudios iniciales indicaron que la mtNOS se correspondía con la isoforma endotelial (eNOS) (Bates y cols., 1995; Kobzik y cols., 1995), aunque posteriormente la han identificado como iNOS (Tatoyan y Giulivi, 1998; French y cols., 2001) y como nNOS (Kanai y cols., 2001; Elfering y cols., 2002; Riobo y cols., 2002; Giulivi y cols., 2003; Kanai y cols., 2004; Lores-Arnaiz y cols., 2004). En este sentido, los estudios de Giulivi demuestran que la mtNOS en hígado de rata es una nNOS con dos modificaciones post-translacionales: una acilación por ácido mirístico que puede tener su función en la unión a la membrana interna mitocondrial, y una fosforilación en el extremo C-terminal que puede ser importante en la regulación de

la actividad de la enzima en función de los requerimientos energéticos de la célula (Elfering y colbs., 2002; Haynes y colbs., 2004). Sin embargo, este mismo grupo encuentra que la mtNOS reacciona frente al anticuerpo de la iNOS (Tatoyan y Giulivi, 1998; Elfering y colbs., 2002). Otros investigadores (Escames y colbs., 2003) encontraron la existencia de dos isoformas en mitocondrias de hígado y pulmón de rata, nNOS e iNOS. Posteriormente otros estudios han mostrado resultados similares en mitocondrias de riñón de ratas (Bóveris y colbs., 2003) y en mitocondrias de células tumorales (Galli y colbs., 2003). También se ha detectado una NOS de 130 kDa en mitocondrias de hígado de rata que reacciona frente al anticuerpo de la nNOS y la iNOS, mientras que recientemente identificaron eNOS e iNOS en mitocondrias de corazón de ratas (Zanella y colbs., 2004). También hay autores que no detentan ninguna isoforma de la NOS en mitocondria (Lacza y colbs., 2003; Tay y colbs., 2004; Lacza y colbs., 2004). Frente a este panorama, ha surgido el debate y la discusión, cuestionándose incluso la metodología utilizada (Brookes y colbs., 2004). En este sentido, se han puesto en duda los métodos para purificar las mitocondrias, ya que si existe contaminación citosólica se podría estar detectando las isoformas citosólicas en lugar de la específica mitocondrial (Brookes y colbs., 2004). Por ello, Giulivi y colbs. (Giulivi y cobs., 1998) diseñaron un método de centrifugación diferencial con gradiente de densidad con Percoll con el que obtenían un alto rendimiento en la purificación mitocondrial estableciendo como mucho un límite de 4% de contaminación. A pesar de ello, el problema de la contaminación sigue siendo motivo de duda. Otro de los problemas son los anticuerpos utilizados para detectar las distintas isoformas mediante “western blotting” o inmunocitoquímica. Por ejemplo, los anticuerpos policlonales utilizados habitualmente que reaccionan frente al dominio C-terminal pueden tener reacciones cruzadas con las tres isoformas así como con la citocromo p450 reductasa

con la que tiene cierta homología (Brookes y cols., 2004). Además, las imágenes publicadas de western-blot suelen estar recortadas, mostrando solamente la zona donde se detecta la proteína y en muchos casos no existe un patrón de proteínas como marcador independiente de peso molecular. Ello hace que el lector muestre dudas sobre la veracidad del hallazgo (Brookes y cols., 2004). Otros trabajos en los que se ha utilizado microscopía confocal para detectar la mtNOS también han sido cuestionados por la ausencia de calibrado, el retoque con programas de dibujo o la baja especificidad de ciertos agentes fluorescentes hacia el NO \cdot (Brookes y cols., 2004). Por último, la medida de actividad de la mtNOS por radioisótopos también se ha cuestionado. Este método cuantifica la cantidad de L-(3 H)-citrulina formada a partir de L-(3 H)-arginina adicionada al medio, pero esa L-(3 H)-citrulina también puede provenir del ciclo de la urea (Brookes y cols., 2004). Sin embargo, esta posible interferencia sólo puede darse en el hígado que es donde tiene lugar el ciclo de la urea. Aceptando la posibilidad de ciertos problemas metodológicos, no debe escaparse de nuestro estudio la variedad de células, tejidos y animales usados para la detección de la mtNOS en la literatura lo que puede ser motivo de la variabilidad de resultados. En cualquier caso, aún se requiere mucho trabajo para esclarecer toda la polémica suscitada entorno a la mtNOS, incluyendo la regulación de su expresión y actividad.

1.4.- Producción mitocondrial de radicales libres y efectos en la función mitocondrial.

Los radicales libres son especies químicas que contienen algún electrón desapareado en su orbital más externo, lo que le confiere un alto poder para reaccionar con otras moléculas cercanas captando o cediendo algún electrón para eliminar ese orbital incompleto. La adquisición de esta forma estable ocurre a expensas de la

molécula con la que interacciona, la cual se queda, a su vez, con una configuración electrónica desestabilizada, convirtiéndose así en una forma reactiva. Estas moléculas inestables pueden desarrollar reacciones en cadena. (Proctor, 1989). El daño biológico de éstas especies depende de varios factores: de la concentración local que pueden alcanzar, de la capacidad de difusión determinada por su vida media y su solubilidad en el medio (liposolubilidad o hidrosolubilidad), de la capacidad reactiva de las moléculas y de los mecanismos amplificadores o neutralizadores del entorno en que se produce la acción oxidativa (Reiter, 1998).

En particular, a nosotros nos interesan dos grupos de radicales libres por su especial formación e interés en la mitocondria. Estos son, las especies reactivas de oxígeno (EROs) y las especies reactivas de nitrógeno (ERNs).

La mayor parte del oxígeno demandado por las células humanas es reducido a agua vía complejo IV mitocondrial. Esto requiere la adición de cuatro electrones a cada molécula de oxígeno. En esta reducción de O_2 pueden ocurrir pasos intermedios con el resultado de la formación de anión superóxido, peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radical hidroxilo (OH^\cdot), correspondiendo a la reducción por uno, dos y tres electrones respectivamente (Barja, 1999). Estas tres moléculas constituyen EROs y su formación en la mitocondria ha sido motivo de numerosos estudios en los últimos 35 años. Así, dado que el potencial de reducción estándar para la conversión de oxígeno molecular en anión superóxido es de -0.16 V (Wood, 1987) y como la CTE incluye una variedad de centros redox con un potencial de reducción estándar que varía entre los -0.32 V del NADPH y los $+0.39$ V del citocromo a3 del complejo IV, además de que el ambiente intramitocondrial es altamente reductor, parece claro que varios componentes respiratorios, incluyendo flavoproteínas, centros Fe-S y la ubisemiquinona, son termodinámicamente capaces de transferir un electrón al oxígeno. Además, muchos de

los pasos de la CTE contienen reacciones de un solo electrón, favoreciendo así la reducción monovalente del oxígeno (Turrens, 2003). El anión superóxido formado puede dismutarse produciéndose peróxido de hidrógeno que, a su vez, puede reducirse parcialmente formando radical hidroxilo. Otro aspecto clave en la formación de EROs es el mantenimiento de la fuerza protón-motriz, ya que si ésta es demasiado alta pueden “escaparse” electrones del complejo III generando EROs, y si es demasiado baja se reducen los niveles de ATP y el *pool* de NADPH pasa a estado oxidado (Nicholls y Budd, 2000).

Por otro lado, están las ERNs como el $\text{NO}\cdot$ y el producto de la reacción de éste con el anión superóxido, los peroxinitritos (ONOO^-), los cuales tienen un alto poder oxidante y son enormemente citotóxicos. Los efectos del $\text{NO}\cdot$ en la mitocondria, sobre todo en la respiración, se llevan estudiando desde mediados de la década de 1990 y vienen a ser más consistente por la existencia de la mtNOS. El $\text{NO}\cdot$ compite con el oxígeno por su sitio de unión al complejo IV, es decir, a la forma reducida del centro binuclear citocromo a_3 (Fe^{+2})-CuB (Cu^+). Por tanto, el $\text{NO}\cdot$ es un inhibidor de la citocromo oxidasa por su competición con el oxígeno al sitio de unión (Brown, 1999; Brown, 2001). Esta inhibición es reversible y se ha sugerido que puede darse por dos reacciones diferentes (Brookes y colbs., 2002). Puesto que en condiciones fisiológicas los tejidos están oxigenados en el rango de 20 μM de O_2 con un índice $[\text{O}_2]/[\text{NO}\cdot]$ entre 500 y 1000, se ha calculado que en esta situación el complejo IV está inhibido entre un 16 y un 26 % (Bóveris y colbs., 2000). Además de esta inhibición del C-IV en condiciones fisiológicas, con concentraciones mayores de $\text{NO}\cdot$, lo cual puede darse en determinadas patologías (Acuña-Castroviejo y colbs., 2001; Acuña-Castroviejo y colbs., 2002), éste se une al segmento bc_1 del C-III produciendo efectos similares a la antimicina, y aún a mayores concentraciones el $\text{NO}\cdot$ puede reaccionar con el ubiquinol

formando ubisemiquinona (Cadenas y colbs., 2000). Esta inhibición de la transferencia electrónica trae como consecuencia la formación de $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 (Poderoso y colbs., 1996; Poderoso y colbs., 1998). Como hemos dicho, el NO^{\cdot} reacciona con el anión superóxido formando peroxinitritos. Estos peroxinitritos inhiben irreversiblemente todos los complejos de la CTE, incluyendo la ATP sintasa, por mecanismos aún no conocidos en detalle (Brown, 1999; Brown, 2001). En conjunto, todas estas especies reactivas que pueden formarse en la mitocondria van actuar dañando proteínas, el ADNmt y oxidando lípidos, provocando en último caso la disfunción mitocondrial, mitoptosis y apoptosis (Turrens, 2003).

Frente a esta generación de radicales libres, la mitocondria tiene sus propios sistemas antioxidantes. En primer lugar, existe un leve desacoplamiento que previene un excesivo incremento de la fuerza protón motriz y, por tanto, formación de anión superóxido. La mitocondria posee otros dos sistemas antioxidantes, como son la oxidación a oxígeno por parte del citocromo *c* disuelto en el espacio intermembranal ($cit\ c^{+3} + O_2^{\cdot-} \rightarrow cit\ c^{+2} + O_2$) y la dismutación por parte de la superóxido dismutasa (SOD) convirtiendo el $O_2^{\cdot-}$ en H_2O_2 , el cual finalmente se convertirá a H_2O vía sistema glutathion (Figura 5) (Skulachev, 1999).

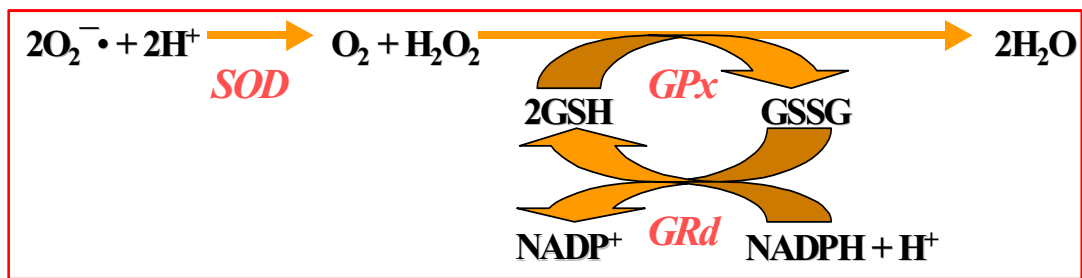


Figura 5. Sistemas antioxidantes enzimáticos: SOD y glutatión. SOD: superóxido dismutasa; GPx: glutatión peroxidasa; GRd: glutatión reductasa.

Finalmente, existen actualmente numerosos estudios que proponen a la melatonina, un potente antioxidante, una importante acción protectora a nivel mitocondrial frente al daño oxidativo (Acuña-Castroviejo y cols., 2001; Acuña-Castroviejo y cols., 2002; León y cols., 2004).

En resumen, las mitocondrias son una fuente importante de radicales libres, sobre todo de EROs y ERNs, frente a los cuales se defiende por sus propios sistemas antioxidantes. Cuando el balance entre prooxidantes (o radicales libres) y antioxidantes tiende hacia los primeros, se producirán daños en distintos componentes mitocondriales provocando una disfunción mitocondrial con caída bioenergética y en último caso la muerte celular.

2.- Sepsis.

2.1.- Definición e importancia sanitaria.

La sepsis es definida tradicionalmente como una respuesta sistémica del huésped frente a la infección. Esta definición abarca subclasificaciones en función del estado de gravedad de la sepsis. Así, en la conferencia consenso organizada en 1992 por la "Society of Critical Care Medicine" y la "American College of Chest Physicians" (Bone y cols., 1992) se establecieron diferentes términos para diferenciar los estados clínicos de la enfermedad en función de la gravedad, como muestra la Tabla 1:

Tabla 1: Definición clínica de sepsis.

SIRS	<ul style="list-style-type: none"> - Temperatura > 38,3 °C ó <36 °C. - Más de 90 latidos de corazón por minuto. - Más de 20 inspiraciones por minuto o una presión arterial parcial menor de 32 mmHg. - Cantidad de glóbulos blancos mayor de $12 \times 10^9/l$ o menor de $4 \times 10^9/l$
Sepsis	- Dos o más condiciones indicadas para SIRS más evidencia de la infección.
Sepsis severa	- Sepsis asociada con disfunción orgánica, hipoperfusión o hipotensión, incluyendo acidosis láctica, oliguria o alteración aguda del estado mental.
Shock séptico	- Hipotensión inducida por sepsis a pesar de un adecuado reemplazo de fluido, junto con presencia de alteraciones en la perfusión que pueden incluir acidosis láctica, oliguria o alteración aguda del estado mental.
MODS	- Presencia de función orgánica alterada en enfermos agudos en los que la homeostasis no puede mantenerse sin intervención.

En conferencias posteriores, se han seguido aprobando estos estados de sepsis, incluyendo otros parámetros para facilitar un diagnóstico preciso (Levy y cols., 2003). A partir de este consenso en cuanto a las subclasificaciones de la sepsis, se pudieron hacer estudios epidemiológicos fiables para saber la incidencia de la sepsis, su mortalidad y sus costes sanitarios, encuadrando al paciente dentro cada estado en función de los parámetros de gravedad. Todos estos estudios epidemiológicos hechos en

diferentes países coinciden en que la incidencia de la sepsis va aumentando cada año y la mortalidad está disminuyendo como consecuencia de los avances en los tratamientos. Sin embargo, el resultado neto de mortalidad muestra un incremento de muertes causadas por sepsis cada año (Palencia, 2004). De esta manera, la incidencia de la sepsis grave en países de nuestro entorno oscila entre los 50 a 100 casos por cada 100.000 habitantes y su mortalidad asociada va desde el 25-30% en estudios de base hospitalaria hasta el 35-55% en estudios realizados en las unidades de cuidados intensivos (UCI). Un factor importante en estos estudios es la edad, puesto que existe una relación exponencial entre la incidencia de sepsis grave y la edad y, además, la mortalidad también aumenta con la edad aunque de forma lineal (Angus y colbs., 2001). En España existen escasos estudios sobre la epidemiología de la sepsis aunque datos recientes indican una incidencia de la sepsis grave de 97 casos por cada 100.000 habitantes con una mortalidad del 28% en estudio de base hospitalaria. Considerando la población española, estaríamos hablando de alrededor de 44.500 casos de sepsis grave en España de los cuales 11.600 acabarían con la muerte del paciente, lo que sitúa a esta enfermedad como la quinta causa de muerte del país (Palencia, 2004). En cuanto a los costes, un estudio reciente realizado sobre 16.000 pacientes, de los cuales un 81,2% tenían 65 años o más, muestra un gasto de 44.600 \$ durante el ingreso hospitalario inicial del paciente, de 78.500 \$ al año y de 118.800 \$ a los 5 años (Weicker y colbs., 2003). En costes globales supondría alrededor de 16,7 billones de dólares para el sistema sanitario estadounidense (Angus y colbs., 2001). Todos estos datos en conjunto muestran la enorme importancia que tiene la sepsis para el sistema sanitario de cualquier país desarrollado y la necesidad de seguir avanzando en el conocimiento de la enfermedad y su progreso terapéutico, reduciendo así los tiempos y costes sanitarios.

2.2.- Mecanismos de la respuesta inmunológica frente a la infección.

La sepsis es debida a un inapropiado o exagerado incremento de la respuesta inmune innata, la cual utiliza a neutrófilos, macrófagos y células NK actuando directamente contra los patógenos invasores y erradicándolos sin intervención de la respuesta inmune adaptativa. Por ello, para tener un conocimiento de la sepsis es necesario entender como funciona la inmunidad innata así como las interacciones de las células que median la respuesta inmune.

2.2.1.- Reconocimiento de los componentes microbianos: los componentes microbianos reconocidos por la respuesta inmune innata son comúnmente denominados PAMPs (del inglés “pathogen-associated molecular patterns”) e incluyen lipopolisacáridos de bacterias gram-negativas, exotoxinas, peptidoglicanos y ácido lipoteico de bacterias gram-positivas así como otros componentes bacterianos, víricos, fúngicos y parasitarios (Das, 2000; Cohen, 2002).

Tras una infección por bacterias gram-negativas, los lipopolisacáridos (LPS) de la pared celular se unen primero a proteínas plasmáticas llamadas proteínas de unión a LPS (LBP, del inglés “LPS binding protein”), las cuales transfieren monómeros de LPS desde la pared bacteriana a una glicoproteína de membrana de monocitos, macrófagos y polimorfonucleares, llamada CD14, la cual es componente esencial del complejo receptor de LPS (Figura 1). Además del CD14 unido a membrana, existe otro componente soluble con la misma función y ambos parecen tener la capacidad para discriminar entre los productos bacterianos y fijar sus señales a los diferentes TLRs (del inglés “Toll like receptor”). Estos TLRs constituyen otro de los componentes del complejo receptor de LPS (Figura 6).

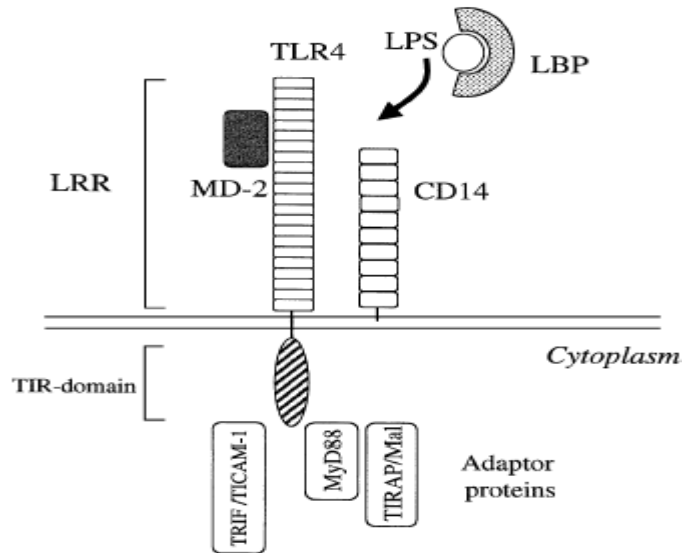


Figura 6. Esquema del complejo receptor de LPS de macrófagos formado por 3 proteínas: CD14, TLR4 y MD-2 (extraído de Fujihara y cols, 2003).

En mamíferos existen al menos 13 tipos de TLRs (10 identificados en humanos y 12 en ratones) (Beutler, 2004). Tienen una estructura de proteínas transmembrana tipo I caracterizadas por un dominio extracelular que contiene múltiples repeticiones ricas en leucinas, un dominio transmembrana y un dominio intracelular TIR (del inglés “Toll/IL-1 receptor/plant R gene product homology”). Este dominio intracelular en TLR4 es clave en el complejo receptor ya que gracias a él se va a iniciar la transducción de señales tras reconocer al LPS (Fujihara y cols., 2003). A pesar de que los CD14 y los TLR4 fueron inicialmente descritos para el reconocimiento de LPS, estudios posteriores han confirmado que también están implicados en el reconocimiento de otros tipos de PAMPs (Fujihara y cols., 2003).

Existe un tercer componente esencial en el complejo receptor de LPS llamado MD-2 (del inglés “myeloid differentiation protein-2”) Se trata de una proteína pequeña que está asociada al dominio extracelular del TLR4 y que no tiene dominio

transmembrana (Figura 6), cuya función está ligada a la distribución celular del TLR4. Otros estudios han demostrado que la MD-2 también está directamente implicada en el reconocimiento del LPS (Fujihara y colbs., 2003).

Por tanto, el complejo para reconocer al LPS unido a LBP está compuesto por CD14, TLR4 y MD-2, y los tres son necesarios para el reconocimiento de la endotoxina. Sin embargo, en los últimos años se han descrito otros receptores para LPS además de receptores para otros componentes microbianos, (Perera y colbs., 2001; Takeuchi y colbs., 2001; Triantafilou y colbs., 2001; Triantafilou, 2002; Fujihara y colbs., 2003; Girardin y colbs., 2003; Beutler, 2004).

2.2.2.- Respuesta inmune y señales de amplificación: según lo anterior, parece claro que los complejos receptores van a coordinarse para iniciar las señales intracelulares a través de los diferentes TLRs. Estas señales, basadas fundamentalmente en reclutamientos y fosforilaciones, culminarán con la síntesis de moléculas proinflamatorias que puedan combatir y erradicar la infección. Así pues, tras el reconocimiento del PAMP por el complejo receptor, la proteína adaptadora MyD88 (del inglés “myeloid differentiation factor 88”) va a ser reclutada al dominio TIR del receptor TLR. Esta MyD88 posee un dominio TIR C-terminal, que se asocia al dominio TIR del TLR e interactúa con el receptor IRAK (del inglés “IL-1 receptor-associated kinase”) por su dominio N-terminal. Tras esta interacción, IRAK va a fosforilar a otra molécula adaptadora llamada TRAF6 (del inglés “TNF receptor-activated factor 6”) que va a activar factores de transcripción a través de dos vías principales (Fujihara, 2003):

- Una primera vía conduce a la activación del factor de transcripción NF- κ B (Figura 7) (Takeuchi y colbs., 2001; Fujihara y colbs., 2003).

- La segunda vía conduce a la activación de otros factores de transcripción como la proteína activadora 1 (AP-1, del inglés “activator protein-1”), el elemento de respuesta a suero (SRE, del inglés “serum response element”) y el elemento de respuesta a AMPc (CRE, del inglés “cAMP responsive element”) (Figura 7). Dichos factores de transcripción son activados a través de las 3 rutas MAPK (del inglés “mitogen-activated protein kinase”) (Guha y cols., 2001) (Figura 7).

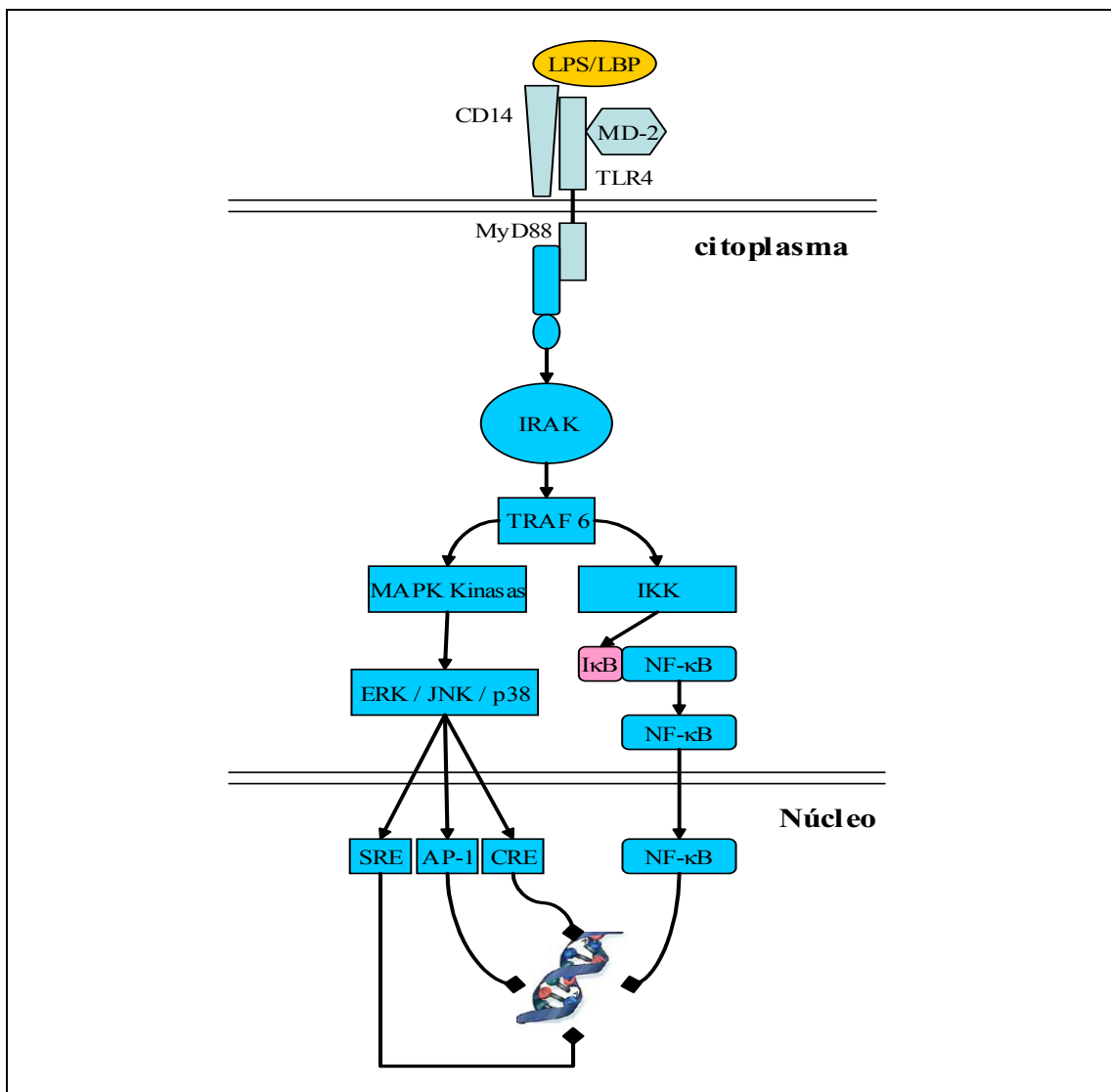


Figura 7. Esquema de las señales intracelulares dependientes del factor MyD88 en respuesta a LPS en macrófagos.

Las rutas descritas hasta ahora dependen de la proteína adaptadora MyD88, la cual es la que inicia las cascadas de señales intracelulares tras su interacción con TLR. En los últimos años se han descrito otras rutas independientes de la proteína adaptadora MyD88 (Fujihara y cols., 2003). En ellas, tras el reconocimiento del LPS por el complejo receptor, el dominio TIR del receptor TLR4 va a interactuar con una proteína adaptadora llamada TRIF (del inglés “TIR domain-containing adaptor inducing IFN- β ”), que puede activar la vía que conduce a la activación del NF- κ B (Figura 8) constituyendo así una vía alternativa de activación de NF- κ B independiente de MyD88, y también puede activar un factor de transcripción llamado IRF3 (del inglés “IFN regulatory factor 3”), el cual va a inducir la transcripción, y posterior traducción, de los genes para IFN- β (Figura 8). De esta manera se sintetiza IFN- β que sale al exterior de la célula donde puede interactuar con su receptor celular activando unas kinasas citoplasmáticas llamadas JAKs (del inglés “janus kinases”). Estas kinasas van a fosforilar restos de tirosina tanto del receptor del interferón como de otro factor de transcripción llamado STAT1 (del inglés “signal transducer and activator of transcription”) (Figura 8), el cual se dimeriza tras la fosforilación y se trasloca al núcleo para activar la expresión de genes dependientes de STAT. Esta vía juega un papel esencial en la expresión de ciertos genes como el de la iNOS (Yamamoto y cols., 2003; Fujihara y cols., 2003).

Por tanto, las diferentes señales van a culminar con la activación de ciertos factores de transcripción, los cuales van a ejercer su acción provocando la síntesis de mediadores de la inflamación, tales como el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), interleuquina 1- β (IL-1 β), IL-6, IL-10, interferón γ (IFN- γ) factor de crecimiento transformante β (TGF- β), factor de activación plaquetaria (PAF), molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1), el componente C5a del complemento, quimioquinas, NO \cdot y

otras especies reactivas de nitrógeno y oxígeno... (Bathia y cols., 2004). Todos estos mediadores de la inflamación van a ejercer diferentes funciones con el fin de erradicar la infección. De todos ellos, nos centraremos en el NO[•] y como se va a producir a partir de la inducción de una de las isoenzimas que lo sintetiza, la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS).

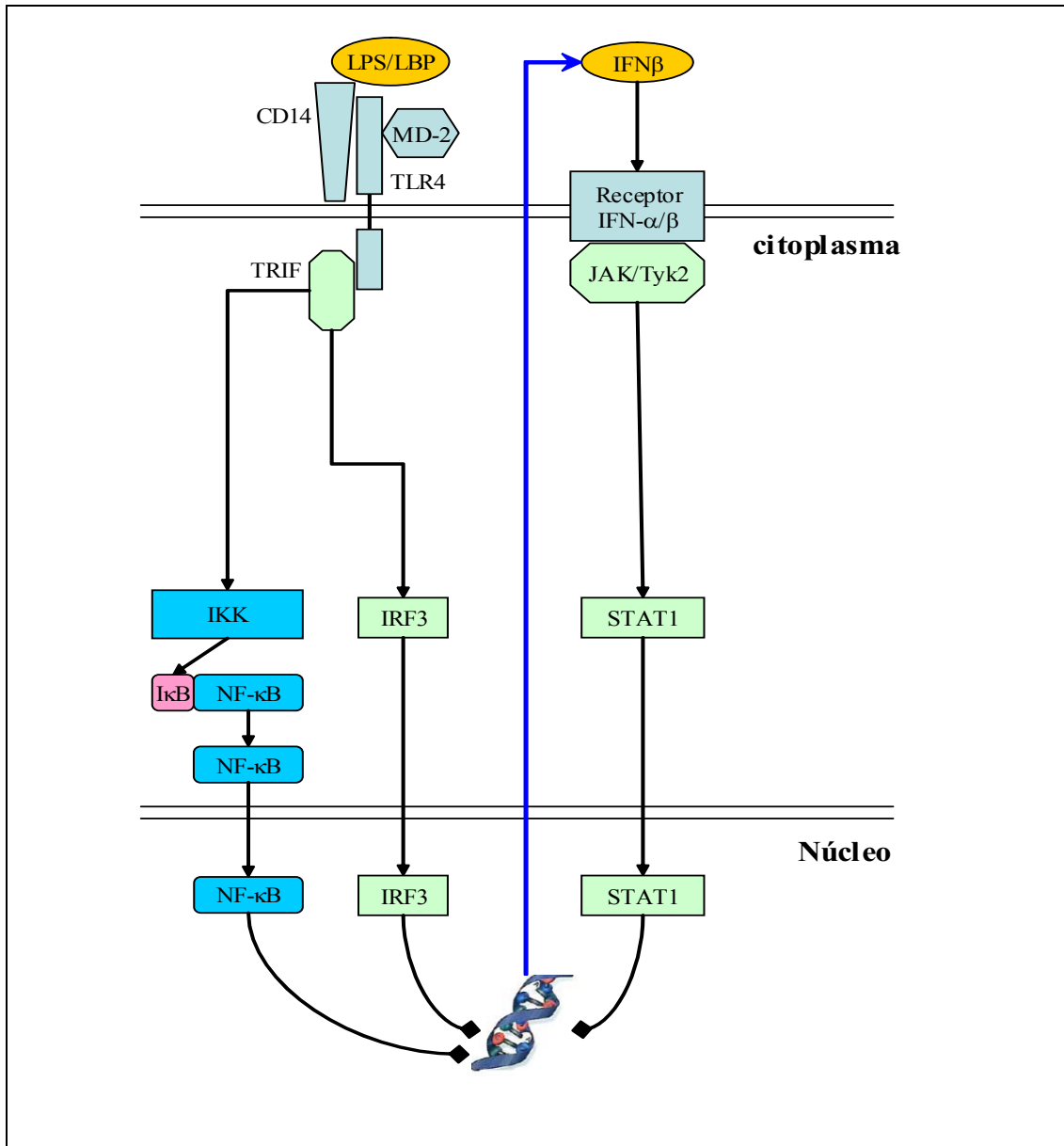


Figura 8. Esquema de las señales intracelulares independientes del factor MyD88 en respuesta a LPS en macrófagos.

2.2.3.- iNOS en la sepsis. Activación y vías de señalización:

La sepsis va a provocar una inducción de la expresión de la iNOS a través de diferentes vías que se inician por la interacción de receptores celulares con los PAMPs (como el LPS), IFN- γ , IL-1 β , IL-6 y/o TNF- α . Las secuencias clonadas de los promotores de la iNOS de diferentes especies (Lowenstein y colbs., 1993; Xie y colbs., 1993; Lin y colbs., 1996; Chu y colbs., 1998; Zhang y colbs., 1998; Wang y colbs., 2001) exhiben homologías a sitios de unión de numerosos factores de transcripción, tales como AP-1, CRE, IRF, NF- κ B, SER o STAT-1, los cuales están implicados en la inducción de la transcripción de los mediadores de la inflamación (Kleinert y colbs., 2004). De algunos de estos factores existen ya numerosas evidencias de su implicación en la inducción de la iNOS en la sepsis:

- *NF- κ B*: tanto el LPS como la IL-1 β , el TNF- α y el estrés oxidativo, han mostrado inducir la expresión de la iNOS en diferentes tipos celulares a través de la activación, por las vías explicadas en el apartado anterior, del NF- κ B. Sin embargo, existe controversia sobre la localización del sitio de unión del NF- κ B al promotor humano de la iNOS debido a que los datos publicados difieren unos de otros (Titheradge MA, 1999; Kleinert y colbs., 2004).
- *IRF*: se ha demostrado en diferentes trabajos un papel esencial del sitio de unión a IRF (posiciones de -913 a -923 pares de bases) para la inducción del promotor de la iNOS en macrófagos RAW 264.7 (Kleinert y colbs., 2004).
- *STAT-1*: como ya dijimos antes, esta vía parece importante en la inducción de la expresión de la iNOS, y se ha demostrado en diferentes tipos celulares incluyendo células humanas. Sin embargo, no está claro que la estimulación de la inducción de la iNOS por esta vía sea por unión directa de STAT-1 al promotor de la iNOS o de forma indirecta induciendo la actividad de IRF.

- *AP-1*: existen trabajos contradictorios en cuanto al papel de este factor de transcripción en la regulación de la expresión de la iNOS. Algunos autores indican que AP-1 inhibe la expresión de la iNOS (Kleinert y colbs., 1998; Kleinert y colbs., 1999; Kizaki y colbs., 2001). Otros autores por el contrario, indican que AP-1 aumenta la expresión del promotor de la iNOS (Markonczalik, 1998; Kristof y colbs., 2001). Como indica Kleinert (2004) las discrepancias de estos resultados puede deberse a los distintos niveles de expresión de AP-1 usados en los distintos experimentos que pueden provocar situaciones de sofoque de cofactores de transcripción.
- *Otros factores de transcripción*: en la literatura existen otros factores de transcripción que han sido descritos con menor detalle y evidencia como reguladores de la actividad del promotor de la iNOS (Kleinert y colbs., 2004).

En cualquier caso, durante la sepsis hay una inducción de la iNOS en células inmunológicas con el consiguiente aumento de producción de NO^{*}, el cual tiene dos efectos beneficiosos en la inflamación: bactericida/antimicrobiano y vasodilatador para que las células inmunológicas lleguen al foco de infección. Sin embargo, en la sepsis, con una infección generalizada no localizada, la inducción de la iNOS tiene lugar en múltiples tipos celulares como células endoteliales, musculares, cardíacas, hepáticas, pancreáticas o pulmonares (Titheradge y colbs., 1999). Esta gran generación de NO^{*} en los distintos órganos va a provocar efectos dañinos en el sistema vascular provocando vasodilatación e hiporeactividad a agentes vasopresores, efectos hemodinámicos en los diferentes tejidos y una importante disfunción mitocondrial, que puede conducir al fallo de algún/os órgano/s o en el peor de los casos a un fallo multiorgánico (Vicent y colbs., 2000).

2.2.3.- mtNOS en la sepsis:

Hace ya 35 años que fue introducido el concepto de fallo bioenergético muscular debido a una disfunción mitocondrial como parte de la patología de la sepsis (Schumer y colbs., 1970; Mela y colbs., 1971). Los recientes descubrimientos que han revelado la existencia de una NOS mitocondrial (Bates y colbs., 1995; Kobzik y colbs., 1995; Fradsen y colbs., 1996; Chafourifar y colbs., 1997; Tatoyan y Giulivi, 1998; Giulivi y colbs., 1998), junto con los efectos del NO \cdot tanto en situaciones fisiológicas como fisiopatológicas en la mitocondria (Bóveris y colbs., 2000; Cadenas y colbs., 2000; Brown y colbs., 2001), han permitido considerar que la disfunción mitocondrial en la sepsis puede deberse a una inducción de la mtNOS y el consiguiente aumento de NO \cdot . De acuerdo con esto, Escames y colbs. (2003) demostraron por primera vez en un modelo de sepsis inducida por la administración de LPS a ratas Wistar, que durante la sepsis existe una inducción de la mtNOS en mitocondrias de hígado y pulmón. Estos investigadores, identifican dos isoformas de la NOS en mitocondrias de dichos tejidos, una Ca $^{+2}$ -dependiente que reacciona frente a anticuerpos anti-nNOS y otra Ca $^{+2}$ -independiente que reacciona frente a anticuerpos anti-iNOS. Tras la inducción de la sepsis existe un incremento tanto de expresión como de actividad de la mtNOS, fundamentalmente debido a la forma inducible de la mtNOS (66% de la actividad mtNOS) (Escames y colbs., 2003). Recientemente, Álvarez y Bóveris (2004) han apreciado también un incremento de la actividad de la mtNOS en corazón y diafragma de ratas Sprague Dawley tras la administración de LPS. Al igual que Escames y colbs., estos investigadores detectan actividad Ca $^{+2}$ dependiente e independiente en condiciones fisiológicas pero sin embargo, no distinguen entre ambas formas tras inducir la sepsis, mostrando sólo la actividad total de la mtNOS. Los mecanismos que inducen la mtNOS en sepsis no están claros. Durante la sepsis se ponen en

funcionamiento todas las cascadas de señales que provocan la inducción de la iNOS y es posible que esta iNOS pueda ser importada a la mitocondria (Bóveris y colbs., 2002). En cualquier caso, los autores sugieren que el aumento de actividad de la mtNOS en la sepsis es responsable de un incremento de estrés oxidativo con daño a la CTE (Escames y colbs., 2003; Álvarez y Bóveris, 2004).

2.3.- NO[•] y disfunción mitocondrial en la sepsis.

Durante la sepsis hay una inducción de la iNOS con el consiguiente aumento en la producción de NO[•], el cual tiene a altas concentraciones efectos nocivos sobre la función mitocondrial. En este sentido, son varios los estudios que han apreciado una inhibición de los complejos de la CTE durante la sepsis (Gellerich y colbs., 2002; Brealey y colbs., 2004; Nin y colbs., 2004) con una respiración mitocondrial alterada (Taylor y colbs., 1994; Taylor y colbs., 1998; Boczkowski y colbs., 1999; Callahan y colbs., 2001; Gellerich y colbs., 2002; Davies y colbs., 2004), así como una disminución de los niveles de ATP (Brealey y colbs., 2004). Recientemente, con el descubrimiento de la mtNOS, se sugirió que el aumento intramitocondrial de NO[•] debido a la inducción de ésta podría ser responsable del daño mitocondrial (Bóveris y colbs., 2002). Escames y colbs. (2003) observaron un incremento en la expresión y actividad de la mtNOS en mitocondrias de hígado y pulmón de ratas durante la sepsis con el consiguiente aumento en los niveles intramitocondriales de nitritos. Esta inducción de la mtNOS (fundamentalmente debida a la iNOS) provocó una inhibición de los complejos I y IV (Escames y colbs., 2003). Posteriormente, Álvarez y colbs. (Álvarez y colbs., 2004) han apreciado también un incremento de la mtNOS durante la sepsis en mitocondrias de corazón y diafragma de ratas con aumento de los niveles de anión superóxido, peróxido de hidrogeno y peroxinitritos, lo cual puede ser

consecuencia del daño en la CTE. Este incremento en los niveles intramitocondriales de peróxido de hidrógeno ya había sido detectado en trabajos previos (Taylor y cols., 1994; Boczkowski y cols., 1999) aunque sin implicar directamente al NO[•] producido por el aumento de actividad de la mtNOS en sepsis.

Todos estos datos sugieren que el aumento de actividad de la mtNOS y el consiguiente incremento en los niveles intramitocondriales de NO[•] pueden provocar un intenso estrés oxidativo que conlleva un daño mitocondrial con caída en la producción de ATP y denegización celular responsable del fallo orgánico o multiorgánico producido en el shock séptico.

2.3.- Fallo respiratorio y cardíaco en la sepsis.

Durante el síndrome de sepsis severa que evoluciona al fallo multiorgánico, la típica secuencia de eventos en pacientes incluye una disfunción ventilatoria inicial (denominado síndrome de dificultad respiratoria aguda) con inestabilidad en el sistema circulatorio (Awad SS, 2003). Ésto es seguido habitualmente por una disfunción renal y hepática, disfunción intestinal, coagulopatía, disfunción endocrina con hiperglucemia e insuficiencia suprarrenal y depresión del sistema nervioso central (Awad SS, 2003). Por tanto, el sistema respiratorio y el circulatorio suelen ser los primeros que se ven afectados en los estados de sepsis severa. Tradicionalmente se ha asociado el fallo respiratorio en sepsis con un fallo pulmonar pero cada vez hay más evidencias de un fallo en los músculos ventilatorios (Hussain, 1998; Barreiro y Hussain, 2002). Entre estos músculos se encuentran el diafragma, los músculos intercostales o los músculos abdominales, los cuales son, por su función respiratoria, esenciales para la vida. El agotamiento y el decrecimiento de la fuerza de los músculos ventilatorios en sepsis es común en humanos (Friman, 1977; Cohen y cols., 1982; Abraham y cols., 2004) y en

modelos animales (Boczkowski y colbs., 1990; Shindoh y colbs., 1992; Supinski y colbs., 1993; El Dwari y colbs., 1998; Boczkowski y colbs., 1999; Lanone y colbs., 2000), siendo frecuente en los pacientes con afección respiratoria la utilización de ventilación mecánica (Abraham y colbs., 2004). En el fracaso de los músculos ventilatorios durante la sepsis, parece tener un papel fundamental el NO[•] (Hussain, 1998; Barreiro y Hussain, 2002).

Por otro lado, la posibilidad del fallo cardíaco en la sepsis fue propuesto por primera vez en la década de 1960 y a lo largo de este tiempo se han realizado muchos estudios sobre su etiología. Parece claro que en la sepsis existe una disfunción en el miocardio, tanto en la sístole como en la diástole del ventrículo izquierdo y ventrículo derecho (Court y colbs., 2002). El daño celular parece que conlleva a un fallo en la contracción de los cardiomiocitos. Las altas concentraciones de NO[•] que se producen durante la sepsis van a producir daño mitocondrial (Bóveris y colbs., 2002; Álvarez y Bóveris, 2004) provocando la muerte celular (Court y colbs., 2002; Massion y colbs., 2003).

3.- MELATONINA.

La melatonina o N-acetil-5-metoxitriptamina (aMT) (Figura 9) es una indolamina descrita inicialmente por McCord y Allen (McCord y Allen, 1917) y aislada por primera vez por Lerner (Lerner y colbs., 1958), a partir de extractos de glándula pineal. Se trata de un cristal orgánico, con un punto de fusión entre 116-118 °C, poco soluble en agua y muy soluble en etanol (Szmuskowicz y Heinzelman, 1960).

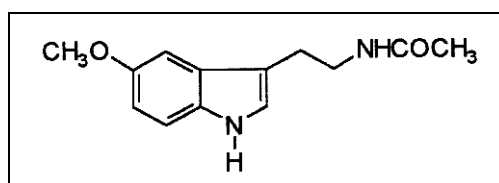


Figura 9. Estructura química de la melatonina.

Aunque inicialmente se encuadró a la melatonina exclusivamente en la fisiología circadiana y reproducción, estudios posteriores permitieron relacionarla con aspectos de la fisiología intracelular independientes de sus acción hormonal. Así, se demostró que la melatonina es un potente depurador de radicales libres (Tan y colbs., 1993); se identificaron y caracterizaron receptores nucleares para la melatonina en órganos periféricos (Acuña-Castroviejo y colbs., 1993; Acuña-Castroviejo y colbs., 1994; Becker-André y colbs., 1994; Hirose y colbs., 1994) y células del sistema nervioso central (Becker-André y colbs., 1994; Carlberg y colbs., 1994; Giguere y colbs., 1994). Asimismo, se demostró la capacidad de la melatonina para unirse a proteínas citosólicas como la proteína Kinasa C (PKC) (Benítez-King y Antón-Ray, 1996), la calmodulina (CaM) (Huerto-Delgadillo y colbs., 1994; Pozo y colbs., 1994; León y colbs., 2000), y la calreticulina (Macías y colbs., 2003), permitiendo esta interacción modular las acciones intracelulares del calcio. Por último, diversos trabajos han demostrado el

importante papel que la melatonina tiene en el mantenimiento de la homeostasis mitocondrial (Martín y colbs, 2000; Martín y colbs., 2002; Acuña-Castroviejo y colbs., 2001; Acuña-Castroviejo y colbs., 2002; León y colbs., 2004; León y colbs., 2005).

3.1.- Síntesis de melatonina en mamíferos.

La melatonina es un compuesto altamente conservado en la escala evolutiva, estando presente en muchos tipos de organismos, incluyendo bacterias, eucariotas unicelulares, microalgas, plantas, invertebrados y vertebrados. En mamíferos, el primer lugar donde se descubrió la síntesis de melatonina fue en la glándula pineal, la cual poseía todos los enzimas necesarios para su síntesis a partir de la serotonina (Axelrod y Wissbach, 1960) y su actividad bioquímica se veía afectada por los ciclos luz-oscuridad (Quay, 1964). Entonces, la síntesis de melatonina en la glándula pineal funciona como un mensaje codificado de la duración de la oscuridad y es responsable de la concentraciones picomolar/nanomolar de la indolamina en plasma (Reiter, 1991; Erren y colbs, 2003).

En la glándula pineal, la melatonina se sintetiza a partir del triptofano, que entra en el pinealocito por transporte activo en contra de gradiente de concentración (Sudden, 1979). Este triptofano se transforma, en primer lugar, en 5-hidroxitriptamina o serotonina, por acción sucesiva de la L-triptofano hidroxilasa y de la 5-hidroxitriptofano descarboxilasa. Posteriormente, la serotonina se convierte en N-acetilserotonina por acción de la N-acetiltransferasa (NAT), que actúa como enzima limitante en el proceso de síntesis de melatonina. Finalmente, la N-acetilserotonina sufre una metilación por acción de la hidroxindol-O-metiltransferasa (HIOMT) produciendo la molécula de melatonina. (Figura 10).

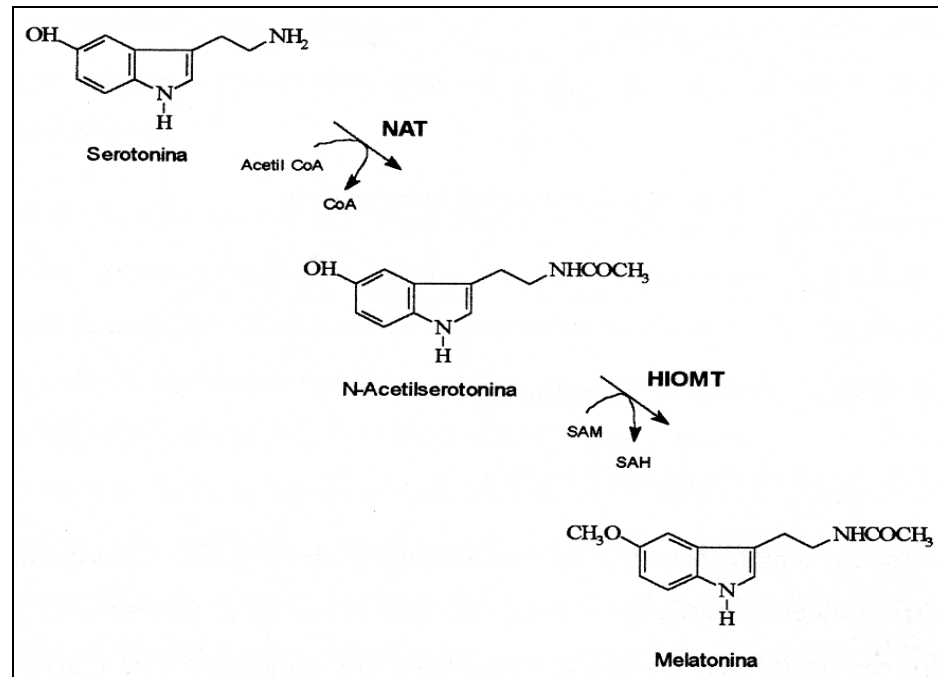


Figura 10. Síntesis de melatonina a partir de la serotonina en la glándula pineal. NAT: N-acetiltransferasa; HIOMT: hidroxindol-*O*-metiltransferasa; SAM: S-adenosilmetionina; SAH: S-adenosilhomocisteína.

Además de la síntesis pineal, en mamíferos la melatonina es sintetizada en una gran variedad de tejidos como la retina, la glándula harderiana, la mucosa del intestino, el cerebelo, el epitelio respiratorio, el hígado, el riñón, el timo, el tiroides, el páncreas, los ovarios, el cuerpo carotídeo, la placenta y el endometrio, así como en células no endocrinas tales como las células NK, los eosinófilos, las plaquetas y células endoteliales (Kvetnoy I, 2002). Además, en el interior de los orgánulos subcelulares la concentración de melatonina puede variar, y algunos autores han descrito que los niveles de esta indolamina en núcleo y en mitocondria pueden ser significativamente mayores que en plasma (Menéndez-Pelaez y Reiter, 1993; Acuña-Castroviejo y cols., 2003).

3.2.- Mecanismos de protección mitocondrial de la melatonina.

La melatonina es una molécula altamente lipofílica, lo que le permite atravesar las membranas celulares con cierta facilidad, enriqueciendo los compartimentos subcelulares, incluyendo la mitocondria, donde puede acumularse a altas concentraciones (Acuña-Castroviejo y colbs., 2002; Acuña-Castroviejo y colbs., 2003; León y colbs., 2004).

3.2.1.- Acción sobre la mtNOS:

Aunque aún no esté clara la naturaleza de la mtNOS, durante procesos inflamatorios como la sepsis se produce una inducción de la iNOS. La melatonina parece inhibir la activación del NF- κ B (Cuzzocrea y Reiter, 2001; Guerrero y Reiter, 2002) y puede también actuar a nivel de las MAPKs (Cuzzocrea y Reiter, 2001), reduciendo de esta manera la inducción de la expresión de la iNOS. La melatonina además reduce la expresión de la iNOS a nivel transcripcional (Cuzzocrea y Reiter, 2001). En este sentido, la administración de melatonina reduce la expresión de la iNOS en un modelo de sepsis experimental con administración de LPS (Crespo y colbs., 1999). Escames y colbs. (2003) encuentran un componente inducible de la mtNOS sobreexpresado en hígado y pulmón durante la sepsis. El tratamiento con melatonina inhibe tanto la expresión como la actividad de la mtNOS al igual que ocurre con la iNOS citosólica. En cualquier caso, los mecanismos por los que la melatonina inhibe la actividad de la iNOS no son conocidos. Además, Escames y colbs. (2003) también encuentran en la mitocondria una isoforma derivada de la nNOS cuya actividad no aumenta en la sepsis, aunque la melatonina también inhibe la actividad de ésta. En este sentido, León y colbs. (2000) demostraron que el mecanismo de inhibición de la actividad nNOS por la melatonina es por su unión a la calmodulina, la cual es necesaria para formar el tetrámero activo de la enzima.

Por tanto, la melatonina inhibe la producción de NO^\bullet que se produce en las sepsis, restaurando la función mitocondrial y evitando el fallo multiorgánico

3.2.2.- Antioxidante de acción directa:

La melatonina y algunos de sus metabolitos poseen la capacidad de depurar por sí mismos algunas especies reactivas de especial interés en la mitocondria (Acuña-Castroviejo y colbs., 2001; Reiter y colbs., 2003; León y colbs., 2004). La primera evidencia que mostró esta capacidad de la melatonina fue la neutralización por parte de la indolamina del radical hidroxilo (HO^\bullet) (Tan y colbs., 1993), eliminándose dos moléculas HO^\bullet por cada molécula de melatonina y produciéndose por esta interacción 3-hidroximelatonina cíclica, la cual es detectada en la orina como producto de excreción (Tan y colbs. 1998; Tan y colbs., 2002).

El peróxido de hidrógeno (H_2O_2), también es susceptible de ser depurado por la melatonina, formándose N^1 -acetil- N^2 -formil-5-metoxikinuramina (AFMK) (Tan y colbs., 2000). Estos experimentos también han sido comprobados *in vivo* (Reiter y colbs., 2003). Tanto la 3-hidroximelatonina cíclica como la AFMK, productos de reacción de la melatonina con HO^\bullet y H_2O_2 respectivamente, parecen tener funciones depuradoras de agentes tóxicos (Acuña-Castroviejo y colbs., 2001; Reiter y colbs., 2003; León y colbs., 2004).

Algunos autores han indicado también que la melatonina puede depurar anión superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) (Marshall y colbs., 1996; Zang y colbs., 1998), aunque este hecho aún está por confirmar, especialmente *in vivo*, ya que la reacción por la cual la melatonina ejercería esta acción no es conocida (Acuña-Castroviejo y colbs., 2001; Reiter y colbs., 2003; León y colbs., 2004).

La melatonina también puede depurar radicales peroxilo, interfiriendo así en la propagación de la peroxidación lipídica, aunque este hecho podría deberse más a la

acción depuradora de otras especies reactivas que pueden provocar peroxidación lipídica que a la depuración en sí de radicales peroxilo. No obstante, la melatonina es altamente eficaz para reducir los niveles de peroxidación lipídica, tanto basales como estimulados por estrés oxidativo (Reiter y colbs., 2003).

Además de las EROs, la melatonina actúa como depuradora de ERNs, reaccionando con el NO[•] para formar N-nitrosomelatonina, así como con los peroxinitritos (ONOO⁻), formándose un producto aún no del todo clarificado puesto que diferentes grupos han hallado diferentes productos en la reacción de la melatonina con el ONOO⁻ (Acuña-Castroviejo y colbs., 2001; Reiter y colbs., 2003; León y colbs., 2004) (Figura 11).

3.2.3.- Antioxidante de acción indirecta:

Junto a la capacidad intrínseca para depurar radicales libres, la melatonina posee la capacidad de estimular la actividad y expresión (Kotler y colbs., 1998; Antolin y colbs., 2002; Mayo y colbs., 2002) de otros sistemas antioxidantes, estableciendo así una forma de acción indirecta para la reducción del estrés oxidativo. En primer lugar, la melatonina estimula el ciclo del glutatión, aumentando la actividad de la glutatión peroxidasa (GPx) y de la glutatión reductasa (GRd), regulando así el balance glutatión oxidado (GSSG)/glutatión reducido (GSH) (Pablos y colbs., 1998; Martín y colbs., 2000). Además, la melatonina aumenta la producción de GSH por la estimulación de la γ -glutamylcisteina sintasa, enzima limitante en la ruta de síntesis de glutatión (Urata y colbs., 1999); y también estimula la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD), la cual genera el NADPH, requerido por la GRd (Pierrefiche y Laborit, 1995).

En el mismo sentido, se ha descrito que la melatonina estimula otras enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD) y la catalasa (Acuña-Castroviejo y

colbs., 2001; Reiter y colbs., 2003; León y colbs., 2004). También ejerce una acción sinérgica con otros antioxidantes como la vitamina E y C (Reiter y colbs., 2003).

En resumen, sea por acción directa y/o indirecta, la melatonina es un potente antioxidante con importantes propiedades para actuar en la mitocondria y, en consecuencia, protegerá el ADNmit, las membranas lipídicas y las proteínas mitocondriales del daño oxidativo (Figura 11).

3.2.4.- Potenciación de la CTE:

La influencia de la melatonina en la homeostasis mitocondrial no se limita a su poder antioxidante sino que también actúa en la CTE y en la producción de ATP. En diversos experimentos se ha demostrado que la melatonina, tanto *in vivo* como en mitocondrias incubadas *in vitro*, estimula la transcripción del ADNmt, aumentando la expresión del ARNm correspondiente a las subunidades I, II y III del complejo IV de la CTE que están codificados por el ADN mitocondrial (Escames y colbs., enviado). La administración de melatonina también impide la reducción en la actividad de los complejos I y IV debido al estrés oxidativo y daño mitocondrial inducido por rojo de rutenio administrado a ratas. (Martín y colbs., 2000b). En este mismo sentido, usando partículas submitocondriales obtenidas de hígado y cerebro de ratas, la melatonina aumenta la actividad de los complejos I y IV de forma dosis-dependiente (Martín y colbs., 2000; Martín y colbs., 2002), y contrarresta la inhibición del complejo IV causado por cianuro (Martín y colbs., 2002). En un modelo de daño mitocondrial inducido por la administración de LPS a ratas y mediado por el NO^{*}, la melatonina es capaz de recuperar la inhibición de los complejo I y IV en mitocondrias de hígado y pulmón (Escames y colbs., 2003).

Basado en estos resultados, es razonable pensar que el efecto de la melatonina en la regulación de la actividad de los complejos de la CTE no sólo se basa en el papel

ratones con inyecciones letales de LPS, reduciéndose la infiltración de neutrófilos polimorfonucleares en el hígado de los animales supervivientes. Estos efectos beneficiosos de la indolamina se asociaron a su acción en la expresión de la iNOS y en la producción de anión superóxido. A nivel mitocondrial Escames y colbs. (2003) detectan que la melatonina reduce la expresión y actividad de la mtNOS así como los niveles intramitocondriales de nitritos, recuperando la actividad de los complejos I y IV incluso por encima de los valores basales en hígado y pulmón de ratas con sepsis inducida por inyección de LPS. Recientemente, de Villa Bianca y colbs. (2004) también muestran que la melatonina previene el daño endotelial y vascular en ratas con sepsis inducida por LPS. Este efecto de la indolamina se relacionó con sus propiedades antioxidantes y su capacidad para inhibir la expresión de la iNOS.

Dados estos efectos beneficiosos de la melatonina, cabe esperar que su administración mejoraría la supervivencia asociada a la sepsis. En efecto, los trabajos realizados en este sentido en animales de experimentación, muestran una disminución de la mortalidad tras el tratamiento con melatonina. Sin embargo, los valores de supervivencia observados difieren de unos trabajos a otros, probablemente por las diferentes dosis de melatonina usadas. Se ha encontrado un aumento de la supervivencia del 28 % con la administración de melatonina (dos dosis de 10 mg/kg en dos días) tras inducir sepsis por ligadura y punción ileoceal en ratones (Wichmann y colbs., 1996); del 48 % y 86 % en ratas a las que se le administró melatonina (2 mg/kg) 3 y 6 horas después de la inyección de LPS respectivamente (Maestroni, 1996); del 40 % en ratones a los que se le administró melatonina (5 mg/Kg) después de la inyección de LPS (Wu y colbs., 2001); y del 73 % en ratas con sepsis inducida con zimosán A a las que se le administró melatonina (0.8 mg/kg) cada uno de los 10 días que duró el experimento (Reynolds y colbs. 2003).

Con toda la evidencia experimental en animales, Gitto y cols. (2001) realizaron el primer estudio en humanos con administración oral de melatonina en niños que nacen con sepsis. La melatonina (dos dosis de 10 mg/kg separadas por un intervalo de 1 hora) es administrada vía oral dentro de las 12 horas después del diagnóstico de la sepsis. Al igual que ocurría en animales de experimentación, la melatonina redujo el estrés oxidativo provocado durante la sepsis medido en términos de peroxidación lipídica en sangre. Además, la administración de melatonina mejora ciertos parámetros serológicos, tales como la cantidad de glóbulos blancos y neutrófilos, plaquetas y proteína reactiva C. Lo más importante desde un punto de vista clínico en este estudio es que los 10 pacientes tratados con melatonina sobrevivieron, en contraste con el fallecimiento de 3 de los 10 pacientes a los que no se les administró melatonina.



OBJETIVOS

El exceso de NO[•] producido por la iNOS está directamente relacionado con el fallo multiorgánico en la sepsis. No se conoce exactamente cual es la naturaleza de la mtNOS, pero es una enzima que se induce en la sepsis, provocando un aumento de la producción de NO[•] y de peroxinitritos que van a causar un daño mitocondrial severo, inhibiendo la actividad de los complejos respiratorios y, por tanto, la producción de ATP. El déficit de ATP implica por sí mismo un déficit de contractibilidad muscular pudiendo llegar a provocar fallo respiratorio y cardíaco, principales manifestaciones clínicas de la sepsis y que, en gran medida, contribuyen a la mortalidad. Por otro lado, la melatonina inhibe la expresión de la iNOS y mtNOS así como la actividad de la eNOS, disminuyendo la producción de NO[•]. Además, la melatonina es un importante depurador de radicales libres tanto de forma directa como indirecta, con una acción destacada a nivel mitocondrial.

En consecuencia, nuestra hipótesis de trabajo es la siguiente:

- a) El daño mitocondrial inducido por el sistema mtNOS/ NO[•] es causa importante del fallo mitocondrial previo a las alteraciones musculares y fallo multiorgánico en la sepsis.
- b) El tratamiento con melatonina va reducir de forma considerable la actividad de la mtNOS, principalmente de su componente inducible, disminuyendo el daño oxidativo mitocondrial y aumentando la actividad de la cadena respiratoria y la producción de ATP, lo cual se traducirá en una mejoría significativa del cuadro séptico.

Para comprobar esta hipótesis nos planteamos los siguientes objetivos:

1.- Identificar la mtNOS inducida en sepsis mediante sus propiedades catalíticas de su dependencia de Ca^{2+} y por el estudio comparativo en ratones deficientes en iNOS.

2.- Evaluar el daño mitocondrial provocado en la sepsis mediante: el estudio de la actividad de los complejos de la CTE, la producción de ATP y la respiración mitocondrial. Evaluar el estrés oxidativo mediante la determinación de el índice GSSG/GSH y la actividad de los enzimas del ciclo redox del glutation, la GPx y GRd, así como los niveles de nitritos y LPO. Todo ello se estudiará comparando los resultados entre ratones normales y deficientes en iNOS.

3.- Evaluar el papel protector y mecanismos de acción de la melatonina en el daño mitocondrial inducido en la sepsis mediante la determinación de todos los parámetros anteriores en ratones (tanto normales como deficientes en iNOS) tratados con melatonina.



MATERIAL Y MÉTODOS

1.- ANIMALES, PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO Y TRATAMIENTO.

1.1.- Animales y grupos experimentales.

Para el estudio se utiliza una cepa de ratones normales C57BL/6 y otra de ratones knockout B6.129P2-*Nos2^{tm1Lau}* (obtenidos de Jackson's Laboratory a través de Charles River Labs, Barcelona, España) para la iNOS (derivados de los C57BL/6), es decir, ratones deficientes en iNOS. Ambas cepas están estabuladas en el animalario de la Universidad de Granada, en condiciones estériles, bajo un ambiente de fotoperíodo (ciclo de luz-oscuridad de 12:12 horas) y temperatura (22 ± 1 °C) controlados, y con acceso libre al agua y a la comida (dieta estándar de laboratorio). Los ratones utilizados tienen una edad comprendida entre las 12-14 semanas y un peso entre 25-30 g. Todos los experimentos se han realizado acorde a las guías española y europea de cuidado de los animales.

En cada cepa se establecen 3 grupos experimentales con 44 ratones cada uno:

- Grupo control.
- Grupo de sepsis.
- Grupo de sepsis tratado con melatonina.

1.2.- Procedimiento quirúrgico y tratamiento.

La sepsis se induce por ligadura y punción cecal (Wichterman y cols., 1980). Se anestesian los animales con equitensin intraperitoneal (0,1 mg/kg), se abre la cavidad abdominal mediante laparotomía media, se localiza y libera el ciego y, mediante presión manual, se drenan retrógradamente las heces del colon ascendente hacia el ciego. Se liga el ciego justo por debajo de la válvula ileocecal y se punciona la superficie cecal

antimesentérica. Se recoloca el paquete intestinal y se sutura la pared abdominal, aplicándose povidona yodada a la herida.

La melatonina se administra en 4 dosis de 30 mg/kg de forma secuencial: 30 minutos antes de la operación (intraperitoneal) y 30 minutos, 4 horas y 8 horas (subcutáneo) después de la operación. Tanto en el grupo de sepsis como en el de sepsis tratado con melatonina, los animales se sacrifican por dislocación cervical 24 horas después de la inducción de la sepsis y, rápidamente y en frío, se extraen el músculo esquelético, el corazón y el diafragma para proceder a la extracción mitocondrial de cada tejido.

2.- OBTENCIÓN DE LA FRACCIÓN MITOCONDRIAL.

Para aislamiento la fracción mitocondrial se utilizan dos métodos: el primero es un método de centrifugación diferencial en el que obtienen mitocondrial crudas válidas para medidas en las que no hay interferencia de una posible contaminación citosólica, como la actividad de los complejos de la cadena de transporte electrónico y respiración. El segundo es un método de centrifugación diferencial con gradiente de densidad en el que se obtienen mitocondrias puras, libre de contaminación. Este último método es usado para obtener mitocondrias que se utilizan para realizar el resto de técnicas.

2.1.- Aislamiento de la fracción mitocondrial por centrifugación diferencial.

Tras sacrificar los animales, se extraen rápidamente el músculo esquelético, el corazón y el diafragma, se lavan en solución salina fría y se realiza una breve digestión (30 s para diafragma y corazón y 60 s para músculo esquelético) con proteinasa K (1 mg/ml en tampón de aislamiento que contiene sacarosa 250 mM, EDTA 2mM y Tris 10mM, pH 7,4). Seguidamente se lavan con solución de lavado (albúmina al 0,5% en

tampón de aislamiento), se trocea cada tejido y se homogenizan en un homogenizador de teflón (Stuart Scientific, mod. SS2) a 800 rpm que contiene 4 ml de tampón de aislamiento y 1,5 ml de solución de lavado. Todas estas manipulaciones se realizan en hielo para mantener una temperatura estable de 4 °C.

Después de dos centrifugaciones (centrífuga Beckman Avanti™ 30, rotor de ángulo fijo F1010) a 1.000 g durante 5 minutos a 4 °C, el sobrenadante obtenido se centrifuga a 23.000 g durante 10 minutos a 4 °C. El precipitado se resuspende en 1 ml de tampón de aislamiento y se centrifuga dos veces a 13.000 g durante 3 minutos a 4 °C (rotor de ángulo fijo F3602). El precipitado resultante es la fracción mitocondrial que se congela a -80 °C para su posterior utilización.

2.2.- Aislamiento de la fracción mitocondrial por centrifugación diferencial y gradiente de densidad con Percoll.

Tras sacrificar a los animales, se extraen rápidamente el músculo esquelético, el corazón y el diafragma, se lavan en solución salina fría y se realiza una breve digestión (30 s para diafragma y corazón y 60 s para músculo esquelético) con proteinasa K (1 mg/ml en tampón A que contiene manitol 250 mM, EGTA 0,5 mM, HEPES 5 mM y albúmina al 0,1 %, pH 7,4). Seguidamente se lavan con tampón A, se trocea cada tejido y se homogenizan en un homogeneizador de teflón (Stuart Scientific, mod. SS2) a 800 rpm que contiene 6 ml de tampón A. Todas estas manipulaciones se realizan en hielo intentando mantener una temperatura estable de 4 °C.

Después de dos centrifugaciones (centrífuga Beckman Avanti™ 30, rotor de ángulo fijo F1010) a 600 g durante 5 minutos a 4 °C, el sobrenadante obtenido se centrifuga a 10.300 g durante 10 minutos a 4 °C. El precipitado obtenido se resuspende en 0,5 ml de tampón A y se vierte en un tubo de ultracentrífuga que contiene 1,4 ml de

°tampón B (manitol 225 mM, EGTA 1 mM, HEPES 25 mM y albúmina 0,1%, pH 7,4) y 0,6 ml de Percoll. La mezcla se centrifuga (ultracentrífuga Beckman Coulter Optima™ L-90K, rotor de ángulo fijo 90 TI) a 105.000 g durante 30 min a 4 °C. La fracción, con una densidad entre 1,052-1,075 g/ml correspondiente a la fracción mitocondrial pura y situada entre el buffer B (arriba) y el percoll (abajo), es recogida y lavada dos veces con tampón A para eliminar restos de percoll a 10.300 g durante 10 minutos a 4 °C (centrífuga Beckman Avanti™ 30, rotor de ángulo fijo F3602). El precipitado resultante se congela a -80 °C, excepto los utilizados para medir los niveles de nucleótidos de adenina.

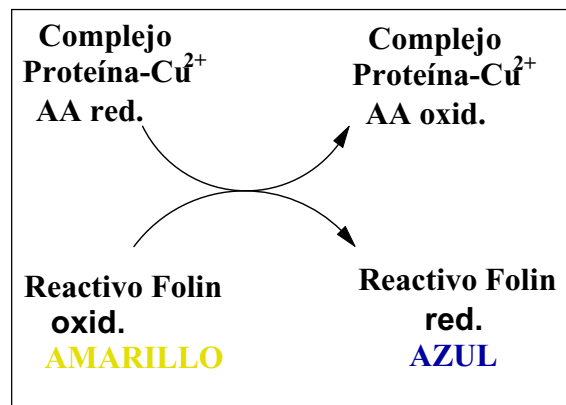
3.- MÉTODOS ANALÍTICOS.

3.1.- Determinación de la concentración de proteínas: método de Lówry.

Todos los resultados obtenidos en este trabajo son referidos a concentración de proteínas de la muestra mitocondrial analizada. Para calcular esta concentración de proteínas se utiliza el método de Lowry (Lowry y colbs., 1951) con las modificaciones del método de Biuret (Layne y colbs., 1957). Se trata de una técnica colorimétrica con dos reacciones complementarias:

- a) Reacción de Biuret: es específica de los grupos amino de los enlaces peptídicos e implica la formación de un complejo coordinado coloreado de estos grupos con el cobre en medio alcalino. La misión del pH alcalino es facilitar el desplegamiento de las proteínas globulares en medio acuoso, por tanto, actúa como un agente desnaturizante para que los iones de cobre puedan llegar hasta los grupos amino de los enlaces peptídicos.

- b) Reducción del reactivo de fenol: es específica de grupos reductores como el fenol. La reducción del reactivo de fenol se produce por el efecto de ciertos radicales aromáticos de los aminoácidos y de los complejos de Biuret. Este reactivo actúa como un indicador redox que al reducirse adquiere un color azul. La intensidad de color dependerá de la cantidad de proteínas presentes en la muestra, y puede cuantificarse midiendo la absorbancia a 650 nm.



Protocolo:

Para medir la concentración de proteínas de cualquier muestra mitocondrial, se ha adaptado el método de Lowry a un micrométodo realizado en placas de enzimoimmunoensayo.

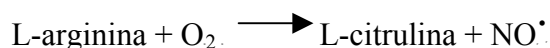
Para hacer la recta patrón se utiliza albúmina sérica bovina como estándar (disuelta en TRIS 20 mM) a concentraciones entre 0,1-0,8 mg/ml.

En primer lugar, se pone en los pocillos 50 µl de blanco, patrones o muestras. A continuación se añade 200 µl de reactivo de Lowry (carbonato disódico al 2% en NaOH 0,1 M, tartrato de sodio-potasio al 1% y sulfato cúprico al 0,5 %, la proporción de estas soluciones es 98:1:1) y se deja reposar durante 10 minutos en agitación (agitador de

placas: 1296-001 Delphia Plateshake). Finalmente, la reacción se revela con 50 µl de reactivo de fenol diluido 1:10 con agua destilada. Se incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente y se mide la absorbancia a 650 nm en un espectrofotómetro de placa (Bio-Tek Power-Wave_x Microplate Scanning Spectrophotometer). Todas las determinaciones se realizan por duplicado.

3.2.- Determinación de la actividad de la óxido nítrico sintasa mitocondrial (mtNOS).

Las diferentes isoformas de la NOS catalizan en presencia de sus cofactores la siguiente reacción:



Las llamadas isoformas constitutivas (nNOS y eNOS) son calcio-calmodulina dependientes, mientras que la llamada isoforma inducible (iNOS) es calcio-calmodulina independiente. Esta propiedad es utilizada para diferenciar entre NOS constitutiva e inducible, utilizando un quelante de calcio como el EDTA.

La actividad de la enzima se expresa en cantidad de producto formado (NO[•] o citrulina ya que su relación de síntesis es 1:1) a lo largo del tiempo de la reacción, todo ello dividido por la cantidad de proteínas totales. Por tanto, la cuantificación de la actividad NOS puede llevarse a cabo por la monitorización de la conversión de L-(³H)-arginina en L-(³H)-citrulina durante un tiempo determinado (Bredt y cols., 1989).

Protocolo:

La fracción mitocondrial se descongela, se resuspende (0,1g/ml) en un tampón frío compuesto por Tris-HCl 25 mM, DTT 0,5 mM, leupeptina 10 µg/ml, pepstatina 10 µg/ml (tomada de un disolución inicial de 1mg/ml en DMSO), aprotinina 10 µg/ml y

PMSF 1 mM (tomado de una disolución inicial 500 mM en etanol), a pH 7,6 y se sonica (Sonuplus HD-2070).

Las muestras se centrifugan entonces a 2.500 g durante 5 min a 4 °C (centrífuga Beckman Avanti™ 30, rotor de ángulo fijo F3602) y se recogen alícuotas del sobrenadante que son usadas inmediatamente para medir la actividad de la NOS o congeladas para la determinación posterior de la concentración de proteínas (Lowry y colbs., 1951).

En tubos eppendorf se añaden 10 µl de estas alícuotas y se les añade (volumen final de reacción 100µl):

- 50 µl de un tampón compuesto por Tris-HCl 25 mM, DTT 1mM, H₄-biopterina 30 µM, FAD 10 µM, inosina 0,5 mM, BSA 0,5 mg/ml, cloruro de calcio 0,1 mM, L-arginina 10 µM y L-(³H)-arginina 40 nM, pH 7,6 (como concentraciones finales en 100 µl).
- 10 µl de EDTA 10 mM (como concentración final en 100 µl) en los tubos para medir iNOS y 10 µl de agua en los tubos para medir la NOS total (constitutiva + inducible).
- Agua hasta completar un volumen final de 90 µl.

Los tubos se calientan a 37 °C durante 30 minutos a partir de la incorporación de 10 µl de una disolución de NADPH cuya concentración final es 0,75 mM. Durante este tiempo la NOS va a transformar la L-arginina, tanto normal como tritiada, en L-citrulina.

Una vez transcurridos los 30 minutos se adiciona a cada tubo 400 µl de un tampón frío compuesto por HEPES 0,1 M, EGTA 100 mM y L-citrulina 0,175 mg/ml, pH 5,5, lo que provoca la parada de la reacción.

De los 500 μl resultantes de todo el proceso, 400 μl se pasan a través de una columna con resina de intercambio iónico Dowex-50w en forma sódica encargada de retener la L-arginina que no se transforma en L-citrulina y, posteriormente, se eluyen con 1,2 ml de agua. La eficacia de retención de la L-(^3H)-arginina por la columna es superior al 98 %.

Para cuantificar la cantidad de L-(^3H)-citrulina formada se mide la radiación emitida en un contador de radiaciones β , mezclando 600 μl de eluido final con 4 ml de líquido de centelleo. El valor de actividad total es proporcionado por la medida de 50 μl de tampón de incubación.

La actividad enzimática se expresa en picomoles de L-citrulina formada por minuto de reacción y dividida por los miligramos de proteínas presentes en la muestra (pmol cit/min x mg prot).

3.3.- Determinación de los niveles intramitocondriales de nitritos.

Dado que el NO^\bullet es una molécula muy inestable, la medida directa de su contenido es difícil, por lo que se suele utilizar un método indirecto de mayor estabilidad como es la determinación de nitritos. El NO^\bullet reacciona rápidamente con el agua para producir nitritos, siendo su concentración directamente proporcional a la cantidad de NO^\bullet .

La concentración de nitritos presentes en la muestra puede determinarse mediante una técnica colorimétrica basada en la reacción de Griess (Green y cols., 1981). El reactivo de Griess formado por naftil-etilen-diamina (NEDA) y sulfanilamida, se combina con los nitritos para formar un compuesto nitrogenado coloreado. La intensidad de color púrpura producido es proporcional a la cantidad de cromógeno

formado y, en consecuencia, a la cantidad de nitritos existentes según la ley de Lambert-Beer.

Protocolo:

Cada fracción mitocondrial se descongela, se resuspende en agua destilada y se sonica (Sonuplus HD-2070) para romper las membranas mitocondriales. Las alícuotas de cada muestra son guardadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para medir la concentración de proteínas (Lowry y cols., 1951) o utilizadas inmediatamente para calcular la concentración de nitritos. La cantidad de nitritos presentes en la muestra se mide siguiendo la reacción de Griess (Green y cols., 1981). Se incuban en placa 100 μl de reactivo de Griess con 100 μl de muestra a temperatura ambiente. El reactivo de Griess está compuesto por sulfanilamida al 1 % en ácido fosfórico al 5 % y NEDA al 0.1 % en proporción 1:1. Tras 20 minutos de incubación se mide la absorbancia a 550 nm en un espectrofotómetro de placa (Bio-Tek Power-Wave_x Microplate Scanning Spectrophotometer). La concentración de nitritos se calcula comparando las absorbancias de la muestra con las de una curva estándar con concentraciones conocidas de nitrito sódico (2-20 nmol/ml) disuelto en agua. Los datos son expresados en nmol nitritos/mg prot.

3.4.- Medida de la actividad de los complejos de la CTE.

Los métodos utilizados para determinar la actividad de los complejos de la CTE, I, II, III y IV, son técnicas espectrofotométricas que poseen tres grandes ventajas:

- Al trabajar con partículas submitocondriales que conservan un perfecto estado catalítico de la maquinaria enzimática de la CTE, se pueden utilizar aceptores y donantes de electrógenos endógenos y artificiales.

- Se trata de técnicas colorimétricas, que presentan todas las ventajas de selectividad, reproducibilidad y sensibilidad que derivan de las leyes de Lambert.
- La característica cromófora de los aceptores y donantes de electrones empleados permite que la medida de actividad específica en cada caso sea directa, siguiendo los cambios de absorbancia experimentados.

Además de la actividad de estos cuatro complejos, también se mide la actividad del complejo V o ATP sintasa por espectrofotometría, aprovechando que este complejo tiene actividad reversible cuando el medio tiene altas concentraciones de ATP.

3.4.1.- Determinación de la actividad específica de la NADH ubiquinona (CoQ) oxidoreductasa (complejo I).

El día de realización de los experimentos, cada fracción mitocondrial es descongelada, resuspendida en 350 μ l de medio de incubación para la técnica de cada complejo y sonicada (Sonuplus HD-2070) para obtener las partículas submitocondriales. Alícuotas de cada muestra son utilizadas antes de la medida de los complejos para determinar la concentración de proteínas (Lowry y cols., 1951). Esta operación se realiza para la medida de cada complejo exceptuando el complejo V.

Protocolo:

Para determinar la actividad del complejo I, se incuban alícuotas de la fracción submitocondrial (0,6 mg/ml) durante 3 minutos a temperatura ambiente en un medio que contiene sacarosa 250 mM, fosfato potásico 50 mM, KCN 1 mM, decilubiquinona 50 μ M y antimicina 0,8 μ M, pH 7,4. La reacción se inicia por la adición de NADH 100 μ M (volumen final de reacción 500 μ l) y la actividad del complejo I (expresada en

nmol de NADH oxidado/min . mg prot) se mide siguiendo la oxidación del NADH a 340 nm en un espectrofotómetro de cubeta modelo UV1603 Shimadzu spectrophotometer (IZASA, Sevilla, España) (Barrientos, 2002).

3.4.2.- Determinación de la actividad específica de la succinato: dicloroindofenol (DCIP) oxidoreductasa (complejo II).

Protocolo:

Para medir la actividad del complejo II (succinato:dicloroindofenol (DCIP) oxidoreductasa, expresado en nmol de DCIP reducido/min . mg prot) se incuban alícuotas de la fracción submitocondrial (0,03 mg/ml) durante 10 minutos a 30 °C en un medio que contiene fosfato potásico 100 mM y succinato 20 mM, pH 7,4. Tras la incubación se añade antimicina 0,8 µM, rotenona 50 µM, KCN 2 µM y DCIP 50 µM. La reacción se inicia con la adición de decilubiquinona 50 µM (volumen final de reacción 1 ml) y la actividad del complejo II se mide siguiendo la reducción de 2,6-DCIP a 600 nm en un espectrofotómetro de cubeta modelo UV1603 Shimadzu spectrophotometer (IZASA, Sevilla, España) (modificado de Brusque y cols., 2002).

3.4.3.- Determinación de la actividad específica de la ubiquinol: citocromo c oxidoreductasa (complejo III).

Protocolo:

Para medir la actividad del complejo del complejo III (ubiquinol:citocromo c oxidoreductasa, (expresado en nmol de citocromo c reducido/min . mg prot) se incuban alícuotas de la fracción submitocondrial (0,03 mg/ml) durante 3 min a 30 °C en un medio que contiene fosfato potásico 35 mM, MgCl₂ 5mM, BSA 2,5 mg/ml, KCN 1,8 mM, rotenona 50 mM, pH 7,5. Tras la incubación se le añade decilubiquinona 2 mM

(previamente reducida con borohidruro potásico) y la reacción se inicia por la adición de citocromo *c* 125 μ M (volumen final de reacción 1 ml). La actividad del complejo III se mide siguiendo la reducción del citocromo *c* a 550 nm en un espectrofotómetro de cubeta modelo UV1603 Shimadzu spectrophotometer (IZASA, Sevilla, España) (modificadom por nosotros de Brusque y colbs., 2002).

3.4.4.- Determinación de la actividad específica de la citocromo c oxidasa (complejo IV).

Protocolo:

Para medir la actividad específica del complejo IV (citocromo *c* oxidasa, expresado en nmol citocromo *c* oxidado/min . mg prot) se incuban alícuotas de la fracción submitocondrial (0,1 mg/ml) en un medio que contiene fosfato potásico 50 mM, pH 6,8. La reacción se inicia por la adición de citocromo *c* reducido previamente con ditionito sódico (volumen final de reacción 1 ml) y midiendo la absorbancia a 550 nm en un espectrofotómetro de cubeta modelo UV1603 Shimadzu spectrophotometer (IZASA, Sevilla, España) (Barrientos, 2002).

3.4.5.- Determinación de la actividad específica de la ATP sintasa (complejo V).

Ante una adecuada concentración de ATP, la ATP sintasa sufre un cambio conformacional hidrolizando ATP (en lugar de formarlo) a ADP + Pi (Boyer, 1997). Esta propiedad se utiliza para medir la actividad de la ATP sintasa, cuantificando la cantidad de Pi formado en un tiempo determinado. Para cuantificar el Pi se suele utilizar un reactivo de molibdato (molibdato amónico-sulfato ferroso), que al reaccionar con los fosfatos forman ácido heteropolifosfomolibdico, el cual, en condiciones adecuadas de la

reacción se reduce a azul de heteropolimolibdeno cuya absorbancia se mide a una longitud de onda de 660 nm. La concentración de fosfatos es directamente proporcional a la absorbancia medida según la ley de Lamert-Beer.

Protocolo:

Cada fracción mitocondrial se descongela y resuspende en 200 μ l de medio de incubación compuesto por $MgCl_2$ 5 mM y TRIS-Cl 50 mM, pH 7,5 (Cormier y cols., 2001). Tras ello, cada muestra (0,3-0,8 mg/ml) se incuba durante 10 minutos a 37 °C en un medio que contiene medio de incubación y ATP 5 mM (una vez se añade al ATP comienza la reacción). Trascurrido este tiempo se añade ácido tricloroacético (TCA) al 10 % (frío) en proporción 1:1 (v/v) para detener la reacción y se centrifuga a 3.000 g durante 20 minutos a 4 °C. Se coge el sobrenadante y se le añade agua estilada en proporción 1:1 (v/v). Finalmente, se incuba en la placa espectrofotométrica 75 μ l de cada muestra con 50 μ l de reactivo de molibdato (ver preparación abajo) durante 20 minutos a temperatura ambiente y se lee a 660 nm en un espectrofotómetro de placa (Bio-Tek Power-Wave_x Microplate Scanning Spectrophotometer) (modificado por nosotros de Cormier y cols., 2001). La cantidad de Pi presente en la muestra y no dependiente de la actividad de la ATP sintasa se resta añadiendo a la muestra 20 μ l/ml de oligomicina, un inhibidor del complejo V, en el momento de incubar con el ATP. La concentración de Pi de cada muestra se calcula comparando las absorbancias de la muestra con las de una curva patrón de concentraciones conocidas de K_2HPO_4 (75-1200 nmol/ml). La actividad del complejo V se expresa en nmol de Pi formado/ min.mg prot.

Preparación del reactivo de molibdato, en fresco (Tauski y Shoor, 1951):

- Se disuelven 100 mg de molibdato amónico en 1 ml de ácido sulfúrico 10 N (Solución A).

- A 250 mg de $\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ se le añade 500 μl de la solución A y 4,5 ml de H_2O , se disuelven en agitación y éste es el reactivo de molibdato que utilizaremos para cuantificar el Pi.

3.5.- Medida de la respiración mitocondrial y control respiratorio.

Para medir la respiración mitocondrial, es necesario que las mitocondrias estén frescas e intactas. Para ello, los tejidos son homogenizados en un homogeneizador de teflón (Stuart Scientific, mod. SS2) a 800 rpm en un tampón de aislamiento compuesto formado por sacarosa 250 mM, EDTA 2 mM, TRIS 10 mM y 0,125 % de albúmina libre de ácidos grasos, y centrifugados a 1.000 g durante 5 minutos a 4 °C (centrífuga Beckman AvantiTM 30, rotor de ángulo fijo F1010). El sobrenadante resultante se centrifuga a 10.300 g durante 10 minutos a 4 °C y el precipitado resultante se resuspende en tampón de aislamiento para determinar la concentración de proteínas (Lowry y cols., 1951) y para el ensayo de la respiración mitocondrial. El consumo de oxígeno mitocondrial es medido polarográficamente con un electrodo de Clark en una cámara a 30 °C que contiene el tampón de respiración saturado con aire por agitación (se agita durante 30 minutos antes de usar) y compuesto por manitol 225 mM, sacarosa 75 mM, KCl 10 mM, Tris-CL 10 mM, fosfato potásico 5 mM, pH 7,2. Las mitocondrias se añaden al medio en un rango de concentración final de proteínas de 0,3-0,8 mg/ml y el consumo de oxígeno se determina usando como sustratos malato 5 mM-glutamato 5 mM (sustrato para el complejo I) o succinato 5 mM (sustrato para el complejo II) en presencia (estado 3) o ausencia (estado 4) de 125 nmol ADP. Finalmente, se añade dinitrofenol (DNP) 50 mM para desacoplar la respiración (Trounce y cols., 1996). El consumo de oxígeno (tanto en estado 3 como en estado 4, y tras añadir DNP) se expresa en nanogramos átomos de O_2 / min . mg prot. El índice de control respiración (RCR, del

inglés “respiratory control ratio”) se calcula como el cociente entre el consumo de oxígeno en el estado 3 partido por dicho consumo en el estado 4. El índice ADP:O se calcula dividiendo los nanomoles de ADP añadidos entre los nanomoles de oxígeno consumidos durante el estado 3 (Estabrook, 1967).

3.5.- Determinación del contenido intramitocondrial de AMP, ADP y ATP.

Entre los diferentes métodos que se pueden usar para medir moléculas de fosfato de alta energía, la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, del inglés “high performance liquid chromatography”) muestra la ventaja de permitir la medida de todos los nucleótidos fosforilados en un solo experimento.

Puesto que los nucleótidos fosforilados tienen diferentes cargas negativas en función de sus grupos fosfatos, estos nucleótidos se pueden separar mediante una cromatografía de intercambio iónico, la cual se fundamenta en la atracción entre partículas de cargas opuestas. Si las moléculas que se quieren separar son moléculas que presentan carga negativa como los nucleótidos fosforilados, la resina que se usa como fase estacionaria presentará cargas positivas.

La elección de la fase móvil que se utiliza para la la cromatografía es muy importante, ya que ésta debe tener un pH adecuado para permitir el enlace de las moléculas con la fase estacionaria y para no provocar la desnaturalización de las moléculas. Hay también que tener cuidado con el gradiente de concentración de la fase móvil que se usa, para permitir la elución diferencial y secuencial de las moléculas que hay que analizar.

Protocolo:

Los niveles intramitocondriales de nucleótidos de adenina se determinan por HPLC con una columna de intercambio iónico ProPac PA1 (4 x 250 mm, Dionex) y un gradiente binario de carbonato amónico 0,3 M y agua (Pissarek y colbs., 1999).

Las mitocondrias purificadas se resuspenden rápidamente en ácido perclórico 0,5 M (frío), se agitan durante 2 minutos en “vortex” (rompiendo así las membranas mitocondriales) y se centrifugan a 25.000 g durante 15 minutos a 2 °C para precipitar las proteínas (centrífuga Beckman AvantiTM 30, rotor de ángulo fijo F3602). Los precipitados obtenidos se congelan a -80 °C para determinar la concentración de proteínas (Lowry y colbs., 1951) y cada sobrenadante se mezcla con 8.5 µl de carbonato potásico 5 M para neutralizar el ácido, centrifugando seguidamente a 12.000 g durante 10 minutos a 2 °C. Los sobrenadantes obtenidos se usan para las medidas en HPLC.

Tras estabilizar la columna con fase móvil (previamente filtrada a tamaño de poro de 0,45 µm), se inyectan 20 µl de cada muestra en el sistema del HPLC. La fase móvil está compuesta por agua (fase A) y carbonato amónico 0,3 M, pH 8,9 (fase B), estableciéndose la siguiente programación para formar el gradiente binario (flujo a 1 ml/min): a los 5 minutos, 50 % A y 50 % B; durante 5 minutos pasando del 50 % al 100 % de B manteniendo este 100 % de B durante 25 minutos; 5 minutos pasando del 100 % al 50 % de B, manteniendo durante 5 minutos 50 % de A y 50 % de B (Krauss y colbs., 1997). Para la calibración, se usa agua como blanco y la curva estándar se realiza con las siguientes concentraciones de cada nucleótido (AMP, ADP y ATP): 3,125 µg/ml, 6,250 µg/ml, 12,5 µg/ml y 25 µg/ml. Las absorbancias de la curva y de las muestras son medidas con un detector ultravioleta a 254 nm y la concentración de cada nucleótido en la muestra es calculada según el área de cada pico formado (Pissarek y colbs., 1999).

3.5.- Determinación de la peroxidación lipídica intramitocondrial.

La medición de LPO se hace utilizando un kit comercial (Bioxytech LPO-586; Cayman Chemical) que está basado en la reacción de un reactivo cromógeno, el N-metil-2-fenilindol (NMFI), con el malonildialdehído (MDA) ó 4-hidroxiacetaldehído (4-HDA), a una temperatura de 45° C. Los niveles de MDA y 4-HDA así medidos reflejan directamente los niveles de peroxidación lipídica (Esterbauer y Cheeseman, 1990). La condensación de una molécula de MDA ó 4-HDA con dos moléculas de NMFI produce un cromóforo estable que, en presencia del ácido metanosulfónico tiene una absorbancia máxima a 586 nm (Esterbauer y Cheeseman, 1990).

Protocolo:

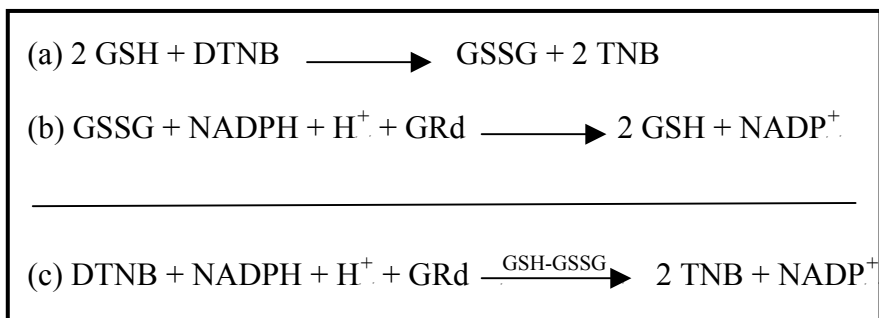
Cada fracción mitocondrial se descongela, resuspendida en agua y sonicada (Sonuplus HD-2070) para romper las membranas mitocondriales. Las alícuotas de estas muestras se guardan a -80 °C para determinar la concentración de proteínas (Lowry y cols., 1951) o se usan para calcular la peroxidación lipídica (LPO). En un tubo de vidrio limpio, se colocan 200 µl de muestra y 650 µl de un reactivo compuesto por NMFI 10.3 mM en acetonitrilo, y metanol, en relación 1:3 (v/v). Tras agitar durante 3-4 segundos, se añaden 150 µl de ácido metanosulfónico y cerramos los tubos. Inmediatamente, los introducimos en un baño y se incuban durante 40 minutos a 45° C. Transcurrida la incubación se colocan los tubos en hielo, se añade 100 µl a cada pocillo de la placa y se mide la absorbancia a 586 nm en un espectofotómetro de placa (Bio-Tek Power-Wave_x Microplate Scanning Spectrophotometer).

Para construir la recta de calibrado se utilizan diluciones de concentración conocida (2,5-20 nmol/ml), a partir de una disolución stock procedente del kit LPO-586. Todas las determinaciones se hacen por duplicado. Los resultados son expresados en nmol MDA + 4HDA/mg prot.

3.6.- Medida de los niveles intramitocondriales de glutatión total, glutatión oxidado (GSSG) y glutatión reducido (GSH).

Para la cuantificación de GSH y GSSG se ha utilizado un procedimiento enzimático indirecto basado en el uso de la glutatión reductasa (GRd) (Griffith, 1985).

El método de Griffith se basa en las siguientes reacciones:



Hay dos reacciones redox acopladas: por un lado la oxidación no enzimática del GSH con DTNB (a), y por otro lado la reducción enzimática del GSSG con NADPH y GRd (b). En estas reacciones las concentraciones de DTNB, NADPH y GRd están fijadas de tal manera que, en la reacción global (c), son proporcionales a la concentración de glutatión. Así, la formación de TNB se puede seguir espectrofotométricamente a 412 nm y utilizando patrones de GSH para poder realizar una curva de calibrado del ensayo podemos calcular la concentración que poseen las muestras problema. Con objeto de conocer la concentración de GSSG, el GSH se enmascara con 4-vinilpiridina, de forma que la cuantificación espectrofotométrica corresponde sólo al GSSG presente; y así, por la diferencia de glutatión total y GSSG podemos conocer la concentración de GSH.

Protocolo:

Cada fracción mitocondrial es descongelada y resuspendida en 350 µl de ácido sulfosalicílico al 2,5 % y centrifugado a 1.000 g durante 15 minutos a 4 °C (centrífuga

Beckman Avanti™ 30, rotor de ángulo fijo F3602). El precipitado resultante se utiliza para determinar la concentración de proteínas (Lowry y cols., 1951) y el sobrenadante es usado para calcular las concentraciones de glutatión. Para medir la forma oxidada del glutatión (GSSG), el contenido de GSH de la muestra es enmascarado con 2 µl de 4-vinilpiridina (para 200 µl de muestra) y la mezcla se centrifuga a 1.000 g durante 1 minuto a 4 °C (centrífuga Beckman Avanti™ 30, rotor de ángulo fijo F3602). Para cada experimento, se prepara una curva estándar de GSH (de 0,07550 a 4,8320 nmol/ml). Tanto las muestras para determinar el GSSG (el sobrenadante de la muestra centrifugada con 4-vinilpiridina), como las muestras para determinar glutatión total y las de la curva estándar se incuban en placa espectrofotométrica a 30 °C durante 3 minutos en presencia de NADPH 0,3 mM y DTNB 6 mM. Tras la incubación se añade glutatión reductasa (1,34 U/ml en el medio de reacción) y los cambios en la absorbancia se miden cada 50 segundos durante 7 minutos a 412 nm en un espectrofotómetro de placa (Bio-Tek Power-Wave_x Microplate Scanning Spectrophotometer). Las concentraciones de glutatión total, GSH y GSSG son expresadas en nmol/mg prot.

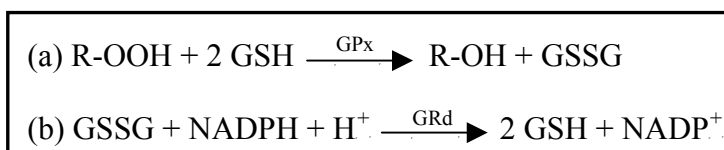
3.6.- Determinación de la actividad de la glutatión peroxidasa (GPx) mitocondrial.

Existen dos tipos de GPx, una dependiente de selenio (Se-GPx) y otra independiente de selenio (iSe-GPx). Ambas tipos pueden usar hidroperóxidos orgánicos (t-BHP, cumeno hidroperóxido) como substratos, pero sólo la Se-GPx es capaz de utilizar la forma inorgánica (H₂O₂) (Lawrence y Burk, 1976).

Algunos autores han descrito que en la mitocondria sólo existe la Se-GPx, mientras que la iSe-GPx es exclusivamente citosólica (Lawrence y Burk, 1978). Sin embargo, aún existe cierta controversia al respecto, por lo que para determinar la

actividad de la glutatión peroxidasa usamos como sustrato un hidroperóxido orgánico, utilizado por ambos tipos de GPx. De esta manera nos aseguramos la medida total de la actividad de la GPx mitocondrial.

El método empleado consiste en una técnica espectrofotométrica indirecta, basado en una reacción acoplada con GRd y utilizando cumeno hidroperóxido como sustrato (Jaskot y cols., 1983). Las reacciones que tienen lugar son:



Entonces, la actividad de la GPx se mide indirectamente siguiendo la oxidación del NADPH a 340 nm.

Protocolo:

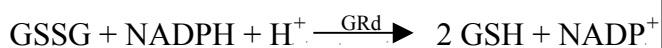
Cada fracción mitocondrial se resuspende en 200 μl de un tampón A compuesto por fosfato potásico 50 mM y EDTA dipotásico 1 mM, pH 7,4, y sonificado (Sonuplus HD-2070). Alícuotas de estas muestras se guardan a $-80\text{ }^\circ\text{C}$ para determinar la concentración de proteínas (Lowry y cols., 1951) o se usan para determinar la actividad de la GPx y GRd. Se incuban, 10 μl de muestra en una microplaca durante 4 minutos a $37\text{ }^\circ\text{C}$ con 240 μl de una solución de trabajo compuesta por tampón A, azida sódica 4 mM, GSH 4 mM, NADPH 0,2 mM y GRd (0,5 U/ml). Tras la incubación se añaden 10 μl de cumeno hidroperóxido al 0,3 % para iniciar la reacción y se mide la absorbancia a 340 nm durante 3 minutos en un espectrofotómetro de placa (with a Bio-Tek Power-Wave_x Microplate Scanning Spectrophotometer). En todas las determinaciones se resta la oxidación no enzimática del NADPH sustituyendo los 240

μl de la solución de trabajo por NADPH 0,2 mM. La actividad de la GPx es expresada en nmol NADPH oxidado/min . mg prot.

3.6.- Determinación de la actividad de la glutation reductasa (GRd)

mitochondrial.

La determinación de la actividad de la GRd se realizó siguiendo el método de Jaskot (Jaskot y cols., 1983), el cual permite una cuantificación directa del NADPH que se va oxidando como consecuencia del proceso de reducción del GSSG, en una reacción catalizada por la GRd. Esta reacción es la siguiente:



Protocolo:

Utilizándose la misma muestra que para medir la GPx, 35 μl de esta muestra se añade a 465 μl de una solución de trabajo compuesta por tampón A y GSSG 2 mM. Tras una incubación a 37 °C durante 4 minutos, se añade 8,5 μl de NADPH 9,5 mM para disparar la reacción y la oxidación del NADPH es seguida durante 3 minutos a 340 nm en un espectrofotómetro de cubeta (UV1603 Shimadzu spectrophotometer). En todas las determinaciones se resta la oxidación no enzimática del NADPH sustituyendo los 465 μl de solución de trabajo por tampón A. La actividad de la GRd es expresada en nmol NADPH oxidado/min . mg prot.

4.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Los datos son expresados como la media \pm error estándar de cuatro a seis experimentos por duplicado. Para comparar la media entre los diferentes grupos se ha usado un análisis de la t de Student, considerando un valor de *P* menor de 0,05 como estadísticamente significativo.

5.- REACTIVOS UTILIZADOS.

Anestesia.

- Solución salina isotónica. (*FRESENIUS KEBI*).
- Melatonina y nembutal (*SIGMA*).
- Etanol absoluto, hidrato de cloral, sulfato de magnesio ($\text{Mg}(\text{SO}_4)_2$) y propilenglicol (*PANREAC*).

Para preparar la mezcla de Equithesin:

- 29 mg/Kg de Nembutal.
- 127,5mg/Kg de Hidrato de Cloral.
- 71,4 mg/Kg de Sulfato de Magnesio.

Estos reactivos se disuelven en una mezcla de agua/etanol absoluto/propilenglicol en proporción 50:10:40.

Aislamiento de la fracción mitocondrial.

- Solución salina isotónica (*FRESENIUS KABI*).
- Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido etilenglicol-bis- β -aminoetil-eter-tetracético (EGTA), ácido hidroxietil-1-piperazin-etanosulfónico (Hepes), albúmina sérica bovina (BSA), percoll, proteinasa K (*SIGMA*).

- D(-) Manitol, sacarosa y tris-(hidroximetil)-aminoetano (TRIS-base) (*PANREAC*).

Determinación de la concentración de proteínas.

- Albúmina sérica bovina (BSA) (*SIGMA*).
- Ácido clorhídrico al 35%, carbonato disódico, hidróxido sódico, hidroximetil aminometano (TRIS-base), reactivo de fenol (Folin-Ciocalteu), sulfato cúprico y tartrato de sodio y potasio (*PANREAC*).

Determinación de la actividad mtNOS.

- Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido hidroxietil-1-piperazinetanosulfónico (Hepes), aprotinina, albúmina sérica bovina (BSA), dicloruro de 5,6,7,8-tetrahidro-L-biopterina (H₄-biopterina), dinucleótido de flavina y adenina (FAD), DL-ditiotreitol (DTT), fluoruro de fenilmetansulfonilo (PMSF), fosfato de dinucleótido de nicotinamida y adenina (forma reducida) (NADPH), hipoxantina-9-D-ribofuranóxido (inosina), L-arginina, L-citrulina, leupeptina, pepstatina y resina Dowex-50w, forma Na⁺. (*SIGMA*).
- Ácido clorhídrico al 35 %, cloruro de calcio, dimetilsulfóxido (DMSO), etanol absoluto, hidróxido sódico e hidroximetil aminometano (TRIS-base) (*PANREAC*).
- L-(2,3,4,5-³H)-arginina (5.8 Ci/mmol) (*AMERSHAM, BUCKS, UK*).
- Líquido de centelleo (*BECKMAN*).

Determinación de nitritos.

Naftil-etilen-diamina (NEDA), nitrito sódico (NaNO_2) y sulfanilamida (*SIGMA*).

Determinación de la actividad de los complejos de la CTE (I, II, III, IV y V).

- Ácido tricloroacético (TCA), albúmina sérica bovina (BSA), antimicina A, citocromo c, decilubiquinol (DBH_2), decilubiquinona (DB), dicloroindolfenol (DCIP), dinucleótido de nicotidamina y adenina (forma reducida) (NADH), ditionito sódico, fosfato dipotásico (K_2HPO_4), fosfato monopotásico (KH_2PO_4), oligomicina, rotenona, succinato y trifosfato de adenosina (ATP) (*SIGMA*).
- Ácido sulfúrico 96 % etanol absoluto, hidroximetil aminometano (TRIS-base), molibdato amónico tetrahidratado, sacarosa, sulfato férrico heptahidratado (*PANREAC*).
- Cianuro potásico (KCN) (*FLUKA*).
- Cloruro magnésico (MgCl_2) (*MERCK*).

Medida de la respiración mitocondrial.

- Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), albúmina sérica bovina (BSA), difosfato de adenosina (ADP), dinitrofenol (DNP), glutamato, malato y succinato (*SIGMA*).
- Hidroximetil aminometano (TRIS-base) (*PANREAC*).

Determinación de los niveles de nucleótidos de adenina.

- Carbonato potásico (K_2CO_4), difosfato de adenosina (ADP), monofosfato de adenosina (AMP), trifosfato de adenosina (ATP) (*SIGMA*).
- Ácido perclórico (HClO_4), carbonato amónico [$\text{CO}_3 (\text{NH}_4)_2$] (*PANREAC*).

Determinación de peroxidación lipídica (LPO).

- Acetonitrilo, ácido metanosulfónico y metanol (*SIGMA*).
- ácido clorhídrico al 35 % e hidroximetil aminometano (TRIS-base) (*PANREAC*).
- Kit LPO-586 (*BIOXYTECH*).

Determinación de glutatión.

- Ácido sulfosalicílico dihidratado, ácido 5, 5'-ditiobis (2-nitrobenzóico) (DTNB), fosfato de dinucleótido de nicotinamida y adenina (forma reducida) (NADPH), glutatión reducido (GSH), glutatión reductasa (GRd) y 4-vinilpiridina (95 % mínimo) (*SIGMA*).

Determinación actividades GPx y GRd.

- Azida sódica, cumeno hidroperóxido 98 %, EDTA dipotásico, fosfato de dinucleótido de nicotinamida y adenina (forma reducida) (NADPH), fosfato dipotásico (K_2HPO_4), fosfato monopotásico (KH_2PO_4), glutatión oxidado (GSSG), glutatión reducido (GSH), glutatión reductasa (GRd) (*SIGMA*).

RESULTADOS

1.- *mtNOS Y NO*: EN LA SEPSIS.

1.1.- Efectos de la falta del gen de la iNOS en la actividad de la mtNOS.

Los ratones normales y los deficientes en iNOS expresan de forma constitutiva dos componentes de la mtNOS en las mitocondrias del grupo control en los tres tejidos estudiados: diafragma, corazón y músculo esquelético (Figuras 1, 2 y 3). Estos componentes corresponden a la actividad de la mtNOS Ca^{2+} -dependiente y a la actividad Ca^{2+} -independiente, clásicamente referidas a las isoformas constitutiva e inducible respectivamente.

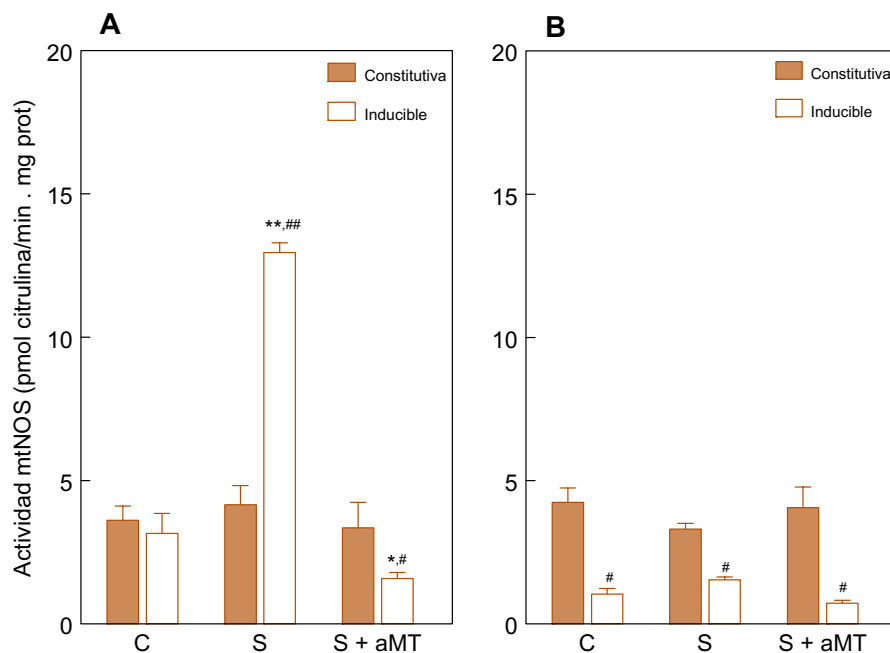


Figura 1. Cambios en la actividad de los componentes constitutivo e inducible de la mtNOS durante la sepsis en diafragma de ratones normales (A) y ratones deficientes en iNOS (B). C= control; S = sepsis; S+aMT = sepsis + melatonina. * $P < 0,01$ y ** $P < 0,001$ vs. control; # $P < 0,01$ y ## $P < 0,001$ vs. isoforma constitutiva.

La diferencia entre los dos tipos de ratones es que en los ratones normales, la actividad basal es similar en los dos componentes de la mtNOS (Figuras 1A, 2A y 3A),

mientras que la actividad inducible es indetectable en los ratones deficientes en iNOS (Figura 1B, 2B y 3B; $P < 0,01$ en diafragma, $P < 0,001$ en corazón y músculo esquelético).

La sepsis provoca un incremento significativo de la mtNOS en los ratones normales (Figuras 1A, 2A y 3A; $P < 0,001$) y esta actividad corresponde a la actividad inducible, calcio independiente, mientras que la actividad del componente calcio dependiente no varía (Figuras 1A, 2A y 3A).

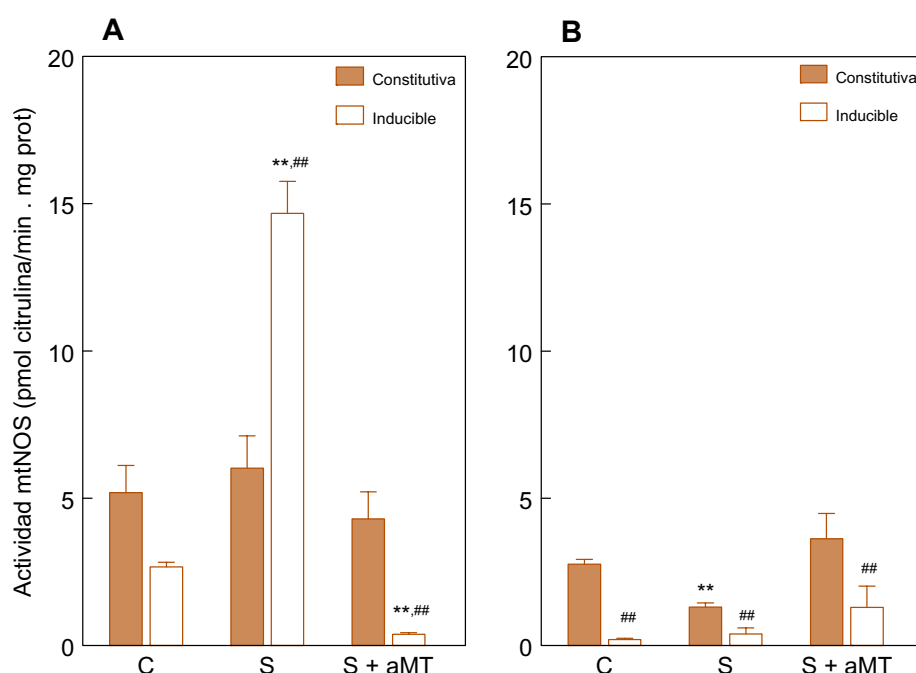


Figura 2. Cambios en la actividad de los componentes constitutivo e inducible de la mtNOS durante la sepsis en corazón de ratones normales (A) y ratones deficientes en iNOS (B). C= control; S = sepsis; S+aMT = sepsis + melatonina. * $P < 0,01$ y ** $P < 0,001$ vs. control; # $P < 0,01$ y ## $P < 0,001$ vs. isoforma constitutiva.

La mayor inducción de la mtNOS por la sepsis tuvo lugar en mitocondrias de músculo esquelético, mientras que corazón y diafragma mostraron una inducción similar. Los ratones deficientes en iNOS no muestran cambios en ninguno de los componentes de la mtNOS, ni en el componente Ca^{2+} -dependiente ni en el Ca^{2+} -

independiente después de la sepsis (Figuras 1B, 2B y 3B), a excepción del corazón donde hay un descenso en la actividad constitutiva (Figura 2B; $P < 0,001$). Por tanto, la falta del gen de la iNOS, que previene la expresión de la iNOS citosólica (Crespo y cols., 1999), parece prevenir también actividad de la mtNOS inducible en los ratones deficientes en iNOS. Estos datos sugieren que la mtNOS inducible deriva del mismo gen que la iNOS citosólica.

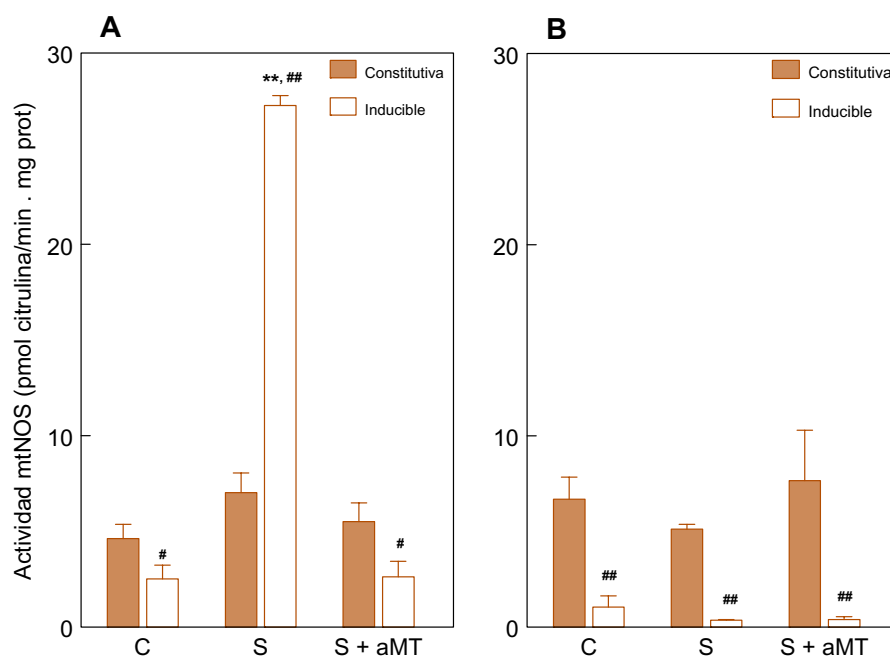


Figura 3. Cambios en la actividad de los componentes constitutivo e inducible de la mtNOS durante la sepsis en músculo esquelético de ratones normales (A) y ratones deficientes en iNOS (B). C= control; S = sepsis; S+aMT = sepsis + melatonina. * $P < 0,01$ y ** $P < 0,001$ vs. control; # $P < 0,01$ y ## $P < 0,001$ vs. isoforma constitutiva.

La administración de melatonina disminuye significativamente la actividad de la mtNOS en la sepsis de ratones normales (Figuras 1A, 2A y 3A) debido a la reducción del componente inducible, el cual adquiere una actividad similar al control en músculo esquelético (Figura 3A) e inferior al control en diafragma y corazón (Figuras 1A y 2A; $P < 0,01$ y $P < 0,001$ respectivamente). Asimismo, tras la administración de melatonina, la

actividad inducible es significativamente menor a la constitutiva en los tres tejidos de ratones normales (Figuras 1A, 2A y 3A; $P < 0,01$ en diafragma y músculo esquelético, $P < 0,001$ en corazón). En ratones deficientes en iNOS la administración de melatonina no produce ningún efecto (Figuras 1B, 2B y 3B).

1.2.- Efecto de la ausencia del gen de la iNOS en los niveles intramitocondriales de nitritos.

Los niveles de nitritos cambian de forma paralela a la actividad de la mtNOS.

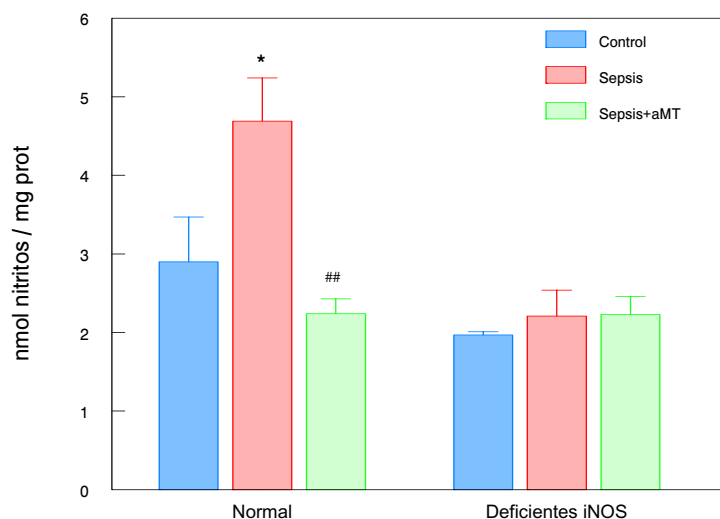


Figura 4. Medida de los niveles intramitocondriales de nitritos en diafragma de ratones normales y deficientes en iNOS. S+aMT = sepsis + melatonina. * $P < 0,1$ y ** $P < 0,05$ vs. control; # $P < 0,1$ y ## $P < 0,05$ vs. sepsis.

En consecuencia, aumentan de forma significativa después de la sepsis en diafragma y músculo esquelético de ratones normales (Figuras 4 y 6; $P < 0,1$ y $P < 0,05$ respectivamente) pero no en los ratones deficientes en iNOS (Figuras 4 y 6) donde incluso disminuye en músculo esquelético (Figura 6; $P < 0,05$).

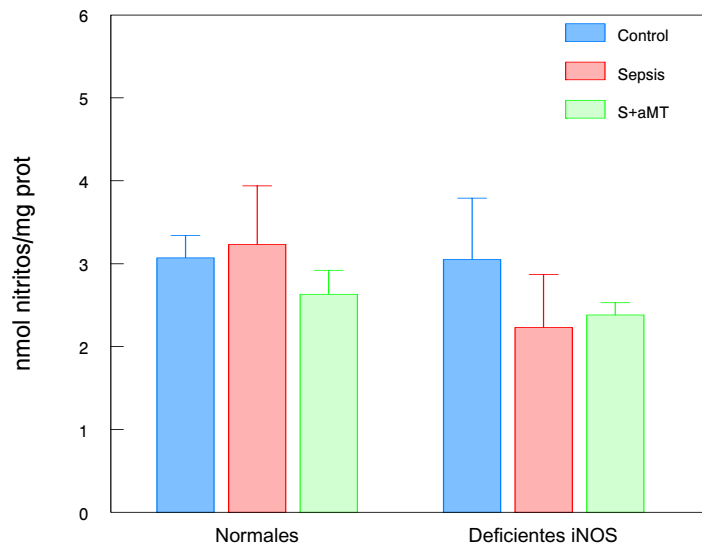


Figura 5. Medida de los niveles intramitocondriales de nitritos en corazón de ratones normales y deficientes en iNOS. S+aMT = sepsis + melatonina.

Sin embargo, en el corazón la sepsis no induce cambios significativos de los niveles intramitocondriales de nitritos tanto en ratones normales como en deficientes en iNOS (Figura 5). La administración de melatonina, que disminuye la actividad de la mtNOS, también disminuye la producción de nitritos en los ratones normales (Figura 4 y 6; $P < 0,05$).

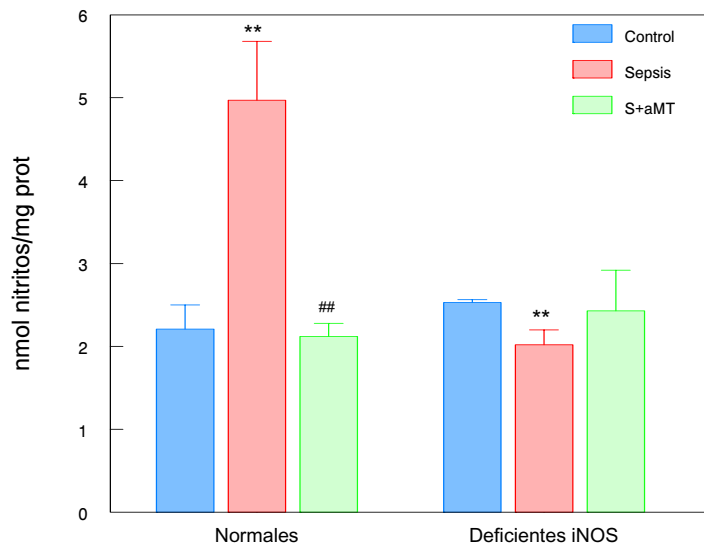


Figura 6. Medida de los niveles intramitocondriales de nitritos en músculo esquelético de ratones normales y deficientes en iNOS. S+aMT = sepsis + melatonina. * $P < 0,1$ y ** $P < 0,05$ vs. control; ## $P < 0,05$ vs. sepsis.

2.- BIOENERGÉTICA MITOCONDRIAL EN LA SEPSIS.

2.1.- Efecto de la falta del gen de la iNOS en la actividad de los complejos de la CTE.

Tras medir la actividad de los complejos I, II, III y IV de la CTE en diafragma, el grupo control de los ratones deficientes en iNOS muestran una actividad de los complejos I y II significativamente menor que en los ratones normales (Figura 7A y B; $P < 0,001$). Por el contrario, la actividad de los complejos III y IV es significativamente mayor en los ratones deficientes en iNOS (Figura 7C y D; $P < 0,001$).

Aunque el NO^\bullet es un inhibidor fisiológico del complejo IV, también puede reducir la actividad del complejo III (Poderoso y cols., 1999; Shiva y cols., 2001; Brown y Borutaite, 2004). La nula actividad del componente inducible de la mtNOS en los ratones deficientes en iNOS, con la consiguiente disminución en la producción de NO^\bullet , puede explicar la actividad basal de estos complejos comparados con los ratones normales. La baja actividad del complejo I y II en los ratones deficientes en iNOS es más difícil de explicar. Podría suceder que los niveles basales de NO^\bullet tuviesen un papel regulador en la actividad de estos complejos.

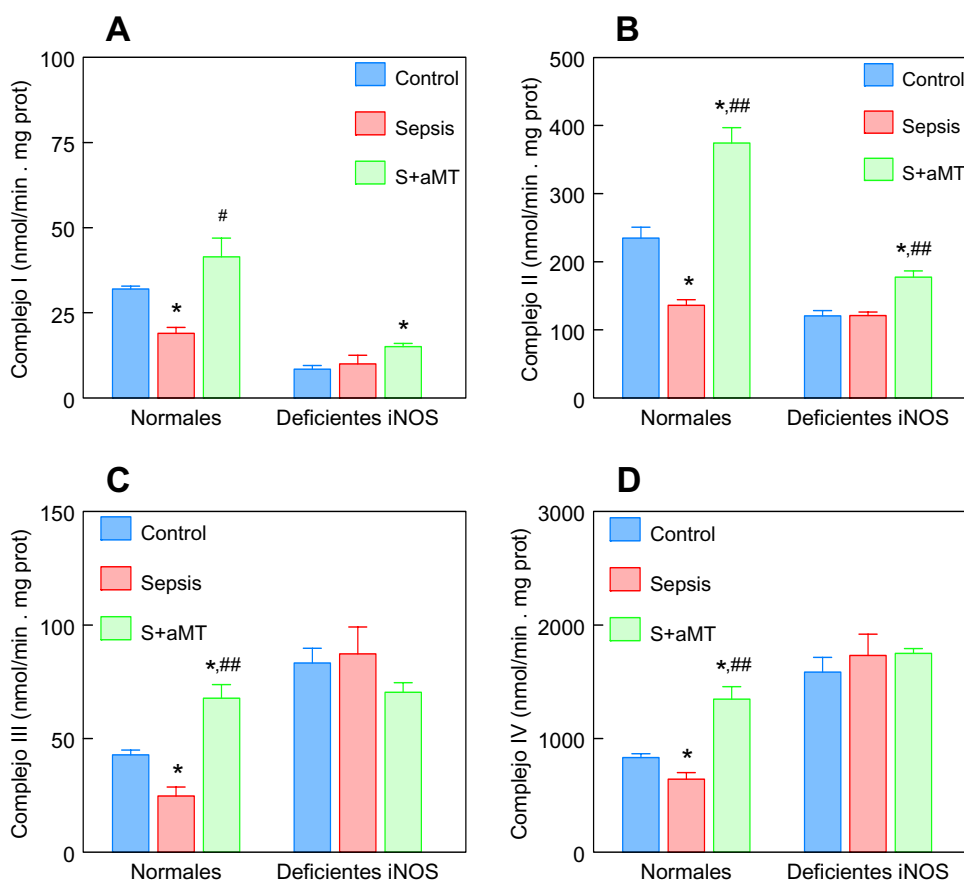


Figura 7. Cambios en la actividad de los complejos I (A), II (B), III (C) y IV (D) de la CTE en diafragma de ratones normales y deficientes en iNOS. S+aMT = sepsis + melatonina. * $P < 0,01$ vs. control; # $P < 0,01$ y ## $P < 0,001$ vs. sepsis.

En la sepsis, la actividad de los complejos I, II, III y IV es reducida de forma significativa los ratones normales (Figura 7A-D; $P < 0,01$), mientras que dicha actividad no varía en ratones deficientes en iNOS (Figura 7A-D). Por tanto, la ausencia del gen de la iNOS bloquea la inducción de la mtNOS en la sepsis y previene el daño a los complejos de la CTE. La administración de melatonina (4 x 30 mg/Kg), no sólo contrarresta la inhibición de los complejos (Figura 7A-D; $P < 0,01$ para CI y $P < 0,001$ para CII, CIII y CIV) sino que incluso la incrementa por encima de los valores control (Figura 7A-D; $P < 0,01$ para CII, CIII y CIV). La melatonina también incrementa de forma significativa la actividad de los complejos I y II en la sepsis en ratones deficientes

en iNOS (Figura 7A, B; $P < 0,01$) y no produce ningún efecto en los complejos III y IV (Figura 7C, D).

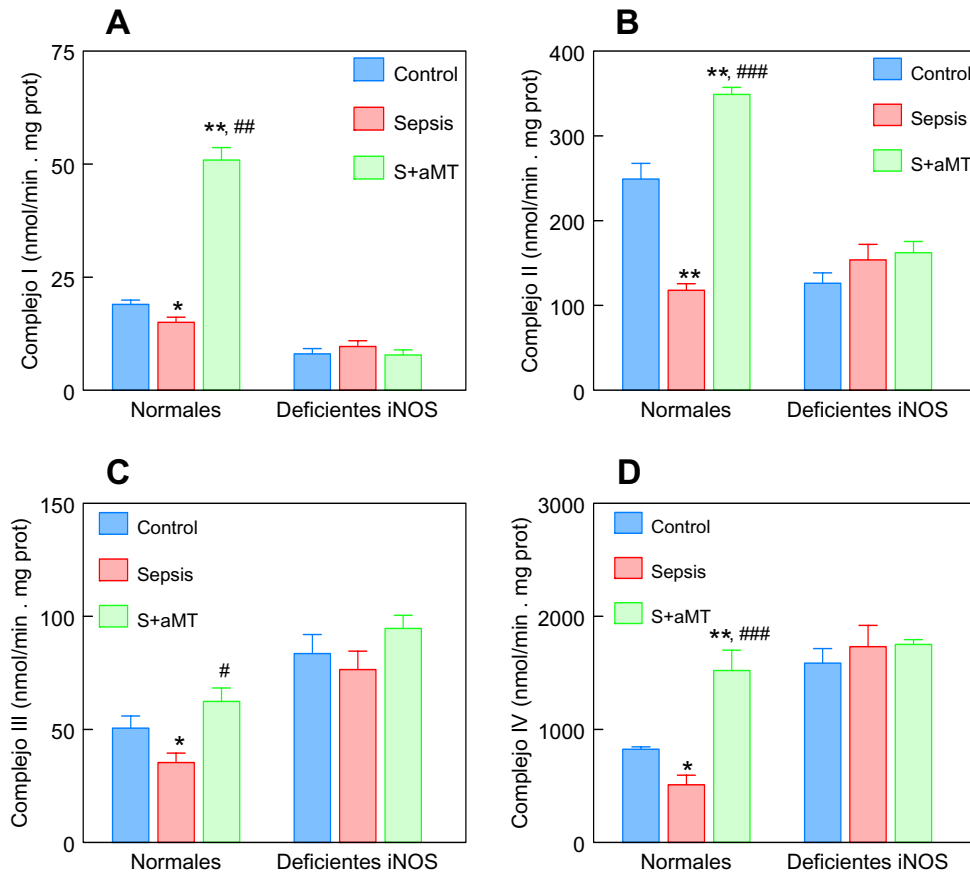


Figura 8. Cambios en la actividad de los complejos I (A), II (B), III (C) y IV (D) de la CTE en corazón de ratones normales y deficientes en iNOS. S+aMT = sepsis + melatonina. * $P < 0,05$ y ** $P < 0,01$ vs. control; # $P < 0,05$, ## $P < 0,01$ y ### $P < 0,001$ vs. sepsis.

En el corazón, al igual que ocurre con el diafragma, la actividad de los complejos I, II, III y IV se reduce significativamente en la sepsis en ratones normales (Figura 8A-D; $P < 0,05$ para CI, CIII y CIV, $P < 0,01$ para CII), mientras que dicha actividad no varía en ratones deficientes en iNOS (Figura 8A-D). También, la actividad de los complejos I y II es menor en los ratones deficientes en iNOS y, a su vez, la actividad de los complejos III y IV es mayor. La administración de melatonina (4 x 30

mg/Kg), también contrarresta la inhibición de los cuatro complejos (Figura 8A-D; $P < 0,001$ para CI, CII y CIV, $P < 0,01$ para CIII) e incrementa la actividad de los complejos I, II y IV por encima de los valores control de forma significativa (Figura 8A-D; $P < 0,01$). La actividad de los cuatro complejos no varía tras el tratamiento con melatonina en ratones deficientes en iNOS (Figura 8A-D).

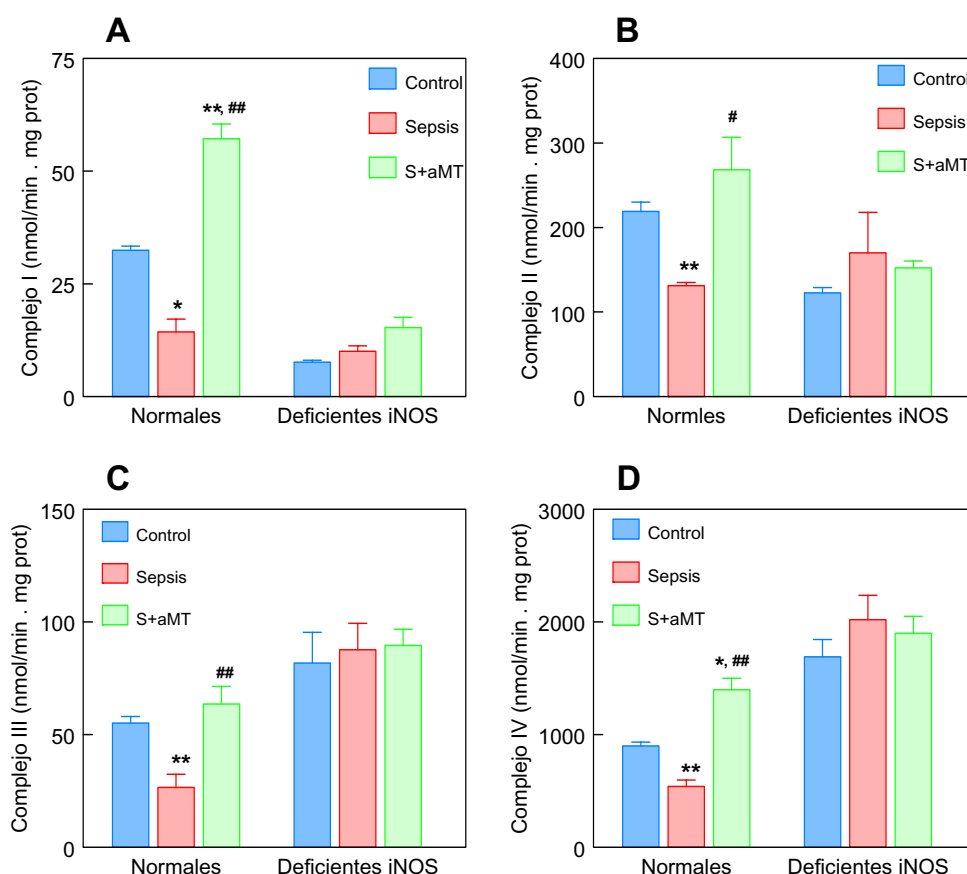


Figura 9. Cambios en la actividad de los complejos I (A), II (B), III (C) y IV (D) de la CTE en músculo esquelético de ratones normales y deficientes en iNOS. S+aMT = sepsis + melatonina. * $P < 0,01$ y ** $P < 0,001$ vs. control; # $P < 0,01$ y ## $P < 0,001$ vs. sepsis.

Los resultados del músculo esquelético son similares a los dos tejidos anteriores, reduciendo la actividad de los cuatro complejos en la sepsis en ratones normales (Figura 9A-D; $P < 0,01$ para CI, $P < 0,01$ para CII, CIII y CIV) y recuperándose dicha actividad tras el tratamiento con melatonina (Figura 9A-D; $P < 0,01$ para CII, $P < 0,01$ para CI, CIII

y CIV). Igualmente la actividad de los complejos I y II es menor y la actividad de los complejos III y IV es mayor en ratones deficientes en iNOS (Figura 9A-D).

2.2.- Efecto de la falta del gen de la iNOS en la actividad de la ATP sintasa.

La actividad de la ATP sintasa se mide gracias a la actividad reversible de este complejo enzimático en condiciones saturantes de ATP.

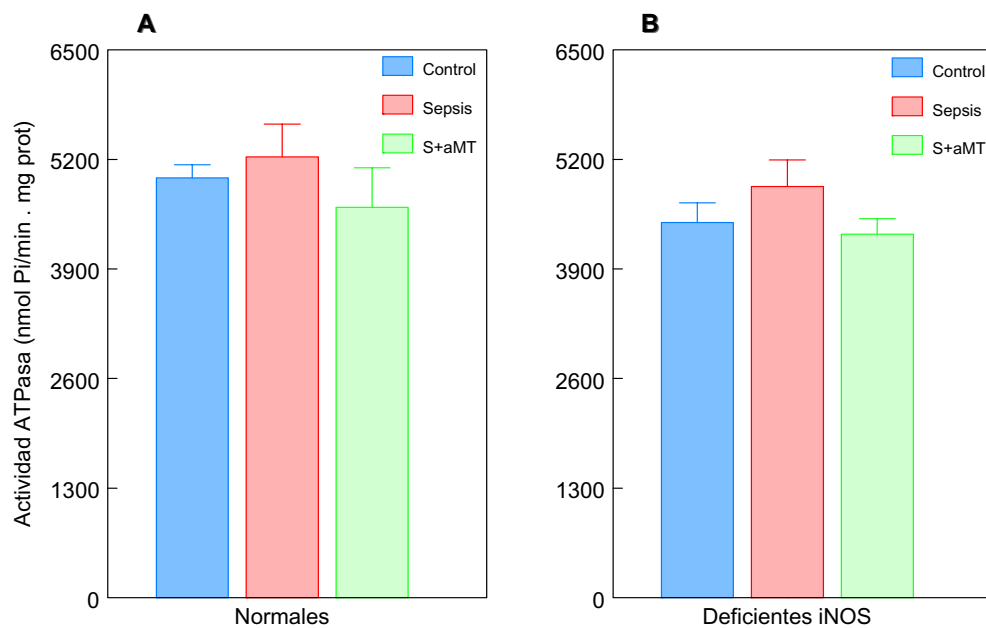


Figura 10. Cambios en la actividad de la ATP sintasa en diafragma de ratones normales (A) y deficientes en iNOS. S+aMT = sepsis + melatonina.

Como muestra la figura 10, la actividad permanece constante en los tres grupos experimentales en diafragma, tanto en ratones normales (Figura 10A) como en ratones deficientes en iNOS (Figura 10B).

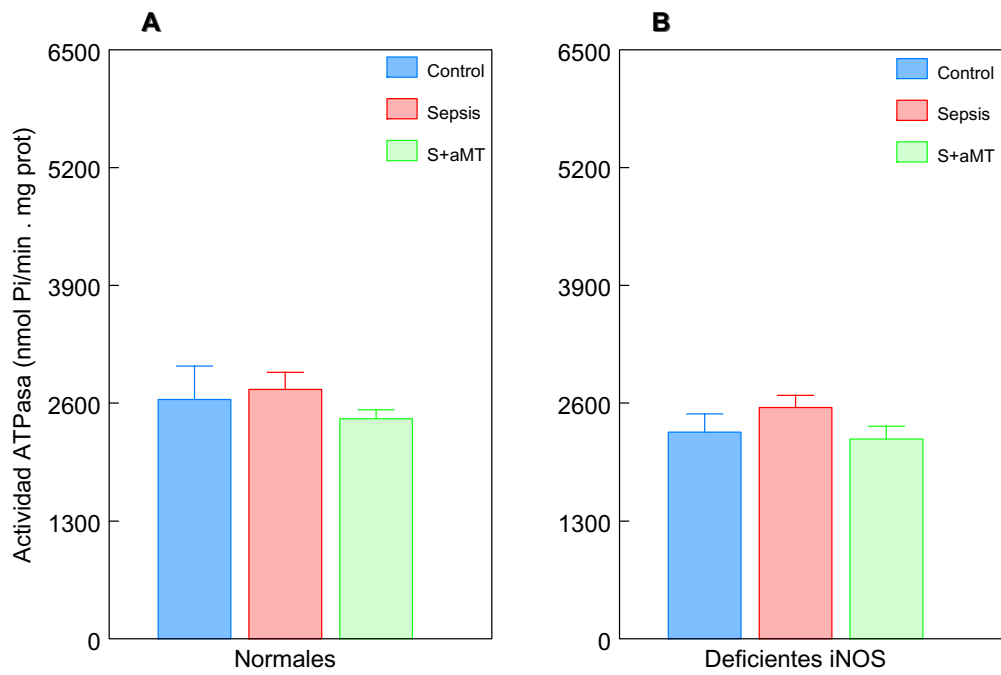


Figura 11. Cambios en la actividad de la ATP sintasa en corazón de ratones normales (A) y KO para la iNOS. S+aMT = sepsis + melatonina.

Lo mismo sucede con el corazón (Figura 11) y músculo esquelético (Figura 12), salvo un descenso de la actividad ATP sintasa en este último tras el tratamiento con melatonina en ratones normales (Figura 12A, $P < 0,005$).

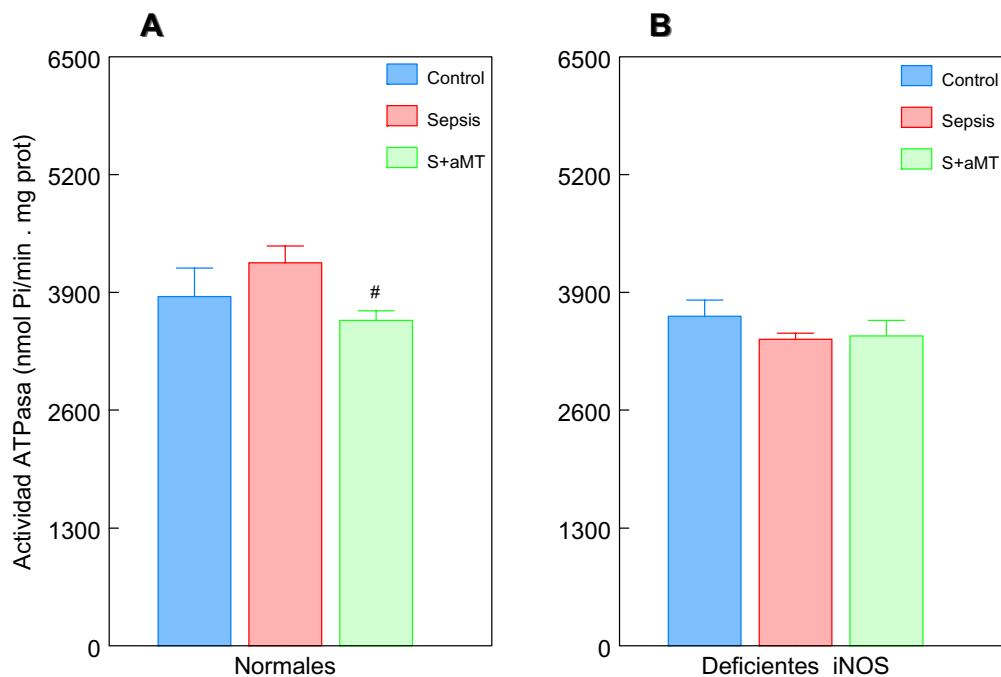


Figura 12. Cambios en la actividad de la ATP sintasa en músculo esquelético de ratones normales (A) y KO para la iNOS. S+aMT = sepsis + melatonina. # $P < 0.005$ vs. Sepsis.

2.3.- Efecto de la falta del gen de la iNOS en los niveles intramitocondriales de nucleótidos de adenina.

La determinación de los nucleótidos de adenina en las mitocondrias de ratones normales y deficientes en iNOS muestran diferencias significativas entre ambos tipos de ratones (Tabla 1: resultados diafragma; Tabla 2: resultados corazón; Tabla 3: resultados músculo esquelético). Los niveles de AMP, ADP y ATP en las mitocondrias de ratones deficientes en iNOS son significativamente menores que en los ratones normales (40-50% para diafragma; 45-70% para corazón; 4-40% para músculo esquelético). El descenso en el índice ATP/ADP en los ratones deficientes en iNOS supone una baja producción de ATP. La baja producción de ATP por los ratones deficientes en iNOS

Tabla 1

Cambios en los niveles intramitocondriales de nucleótidos de adenina tras la sepsis en diafragma de ratones normales y deficientes en iNOS.

Nucleótido	Normales			Deficientes en iNOS		
	Control	Sepsis	S + aMT	Control	Sepsis	S + aMT
AMP	3,05 ± 0,39	2,18 ± 0,30 *	1,67 ± 0,20 *	1,88 ± 0,35	1,98 ± 0,15	1,29 ± 0,23
ADP	3,16 ± 0,62	3,47 ± 0,58	2,33 ± 0,35	2,02 ± 0,29	1,72 ± 0,11	2,23 ± 0,15 #
ATP	2,00 ± 0,26	1,16 ± 0,25 *	0,94 ± 0,08 **	0,82 ± 0,11	1,24 ± 0,12 *	0,93 ± 0,14
ATP/ADP	0,67 ± 0,11	0,35 ± 0,07 **	0,43 ± 0,04 *	0,42 ± 0,12	0,46 ± 0,19	0,42 ± 0,07

Los valores de AMP, ADP y ATP son expresados en µg de nucleótido/mg proteínas. La sepsis fue inducida por ligadura y punción cecal y los animales se sacrificaron 24 horas más tarde. La melatonina se administró en 4 dosis de 30 mg/kg. S + aMT = sepsis + melatonina. * $P < 0,05$ y ** $P < 0,01$ vs. control.

puede reflejar la baja actividad de los complejos I y II de la CTE. Cuando son transferidos menos electrones a través de la CTE, el gradiente protónico también disminuye, y la poca energía es disipada a través de la ATP sintasa para fosforilar ADP y obtener ATP.

Cuando se induce la mtNOS, los ratones normales muestran un descenso en la producción de ATP con una disminución del índice ATP/ADP (Tablas 1,2 y 3; $P < 0.01$ para diafragma y corazón, $P < 0,05$ para músculo esquelético). Sin embargo, la sepsis no induce cambios significativos en estos nucleótidos en los ratones deficientes en iNOS. En consecuencia, los ratones deficientes en iNOS están protegidos del daño ocasionado en la CTE en la sepsis y, por consiguiente, no se produce una disminución en los niveles de ATP en la sepsis. El tratamiento con melatonina (4 x 30 mg/kg) no es capaz de recuperar los niveles de ATP disminuidos en la sepsis y, en consecuencia, el índice ATP/ADP no alcanza los valores del grupo control. La melatonina no afecta los niveles de nucleótidos en los ratones deficientes en iNOS (Tablas 1, 2 y 3), a excepción del músculo esquelético donde se aprecia un descenso en los niveles de AMP (Tabla 3). Estudios previos muestran que la melatonina es capaz de incrementar la síntesis de ATP en las mitocondrias de hígado de rata (Martín y cols., 2001). Pero altos niveles de melatonina pueden tener propiedades desacoplantes, lo cual puede explicar la imposibilidad de recuperar la síntesis de ATP en nuestros experimentos.

Tabla 2

Cambios en los niveles intramitocondriales de nucleótidos de adenina tras la sepsis en corazón de ratones normales y deficientes en iNOS.

Nucleótido	Normales		Deficientes en iNOS	
	Control	Sepsis	Control	Sepsis + aMT
AMP	3,22 ± 0,33	3,16 ± 0,56	1,77 ± 0,22	2,05 ± 0,38
ADP	2,10 ± 0,40	1,95 ± 0,38	0,90 ± 0,04	1,07 ± 0,12
ATP	2,21 ± 0,40	1,27 ± 0,23 *	0,72 ± 0,08	0,90 ± 0,06
ATP/ADP	1,12 ± 0,12	0,65 ± 0,01 **	0,80 ± 0,06	0,85 ± 0,11
				0,70 ± 0,07 **
				0,70 ± 0,06

Los valores de AMP, ADP y ATP son expresados en µg de nucleótido/mg proteínas. La sepsis fue inducida por ligadura y punción cecal y los animales se sacrificaron 24 horas más tarde. La melatonina se administró en 4 dosis de 30 mg/kg. S + aMT = sepsis + melatonina. * $P < 0,05$ y ** $P < 0,01$ vs. control.

Tabla 3

Cambios en los niveles intramitocondriales de nucleótidos de adenina tras la sepsis en músculo esquelético de ratones normales y deficientes en iNOS.

Nucleótido	Normales			Deficientes en iNOS		
	Control	Sepsis	Sepsis + aMT	Control	Sepsis	Sepsis + aMT
AMP	2,16 ± 0,25	2,24 ± 0,50	1,62 ± 0,18	1,84 ± 0,14	1,99 ± 0,02	1,42 ± 0,03 ^{##}
ADP	2,31 ± 0,46	3,36 ± 0,58	3,00 ± 0,38	2,22 ± 0,30	2,07 ± 0,19	1,96 ± 0,27
ATP	1,65 ± 0,21	1,49 ± 0,28	1,31 ± 0,20	1,05 ± 0,08	1,10 ± 0,01	1,03 ± 0,14
ATP/ADP	0,51 ± 0,02	0,44 ± 0,01 *	0,44 ± 0,07 *	0,49 ± 0,06	0,54 ± 0,05	0,53 ± 0,05

Los valores de AMP, ADP y ATP son expresados en µg de nucleótido/mg proteínas. La sepsis fue inducida por ligadura y punción cecal y los animales se sacrificaron 24 horas más tarde. La melatonina se administró en 4 dosis de 30 mg/kg. S + aMT = sepsis + melatonina. * $P < 0,05$ y ** $P < 0,01$ vs. control.

2.4.- Efecto de la falta del gen de la iNOS en la respiración mitocondrial.

Cuando se usa el glutamato + malato como sustrato, la respiración puede ser medida en los ratones normales, mientras que en los ratones deficientes en iNOS los resultados no son reproducibles en diafragma y corazón, pero sí en músculo esquelético. La baja actividad del complejo I encontrada en los animales deficientes en iNOS podría ser una de las causas que impide una respiración normal utilizando NADH. Por primera vez se obtienen estos resultados y sugieren que el NO[•] producido por la mtNOS inducible expresada de forma constitutiva participa en la regulación del complejo I. Los datos que se obtienen al utilizar succinato como sustrato respiratorio (Tablas 4 y 5) muestran que los valores de los estados III y IV de la respiración en los ratones deficientes en iNOS son significativamente superiores que los obtenidos en los ratones normales (Tablas 4 y 5; P<0,1 y P<0,01 en el estado III de diafragma y corazón respectivamente, P<0,01 en estado IV). Parece ser que la respiración deficiente a través del complejo I es compensada en estos ratones por un aumento de la respiración a través del complejo II. Además, el bajo índice ATP/ADP en los controles de los ratones deficientes en iNOS puede ayudar a aumentar la actividad respiratoria. Por otro lado, el índice de control respiratorio (RCR) es significativamente más bajo en los ratones deficientes en iNOS (Tablas 4, 5 y 6; P<0,01 en diafragma y músculo esquelético, P<0,1 en corazón). La sepsis induce un descenso significativo del índice de control respiratorio (RCR) en corazón y músculo de ratones normales (Tablas 5 y 6; P<0,01 y P<0,1 respectivamente) con un aumento significativo del estado IV músculo esquelético (Tabla 6; P<0,1). La sepsis también induce un descenso del cociente ADP/O en músculo esquelético (Tabla 6; P<0,01). En ratones deficientes en iNOS la sepsis provoca un aumento del cociente ADP/O en diafragma (Tabla 4, P<0,1) y un descenso del estado III en corazón (Tabla 5, P<0,01), en ambos casos utilizando succinato como sustrato.

La melatonina reduce de forma significativa el consumo de oxígeno en estado III y en estado IV en ratones normales (Tablas 4, 5 y 6). El estado de desacoplamiento inducido con DNP también es reducido por la melatonina en el corazón (Tabla 5, $P<0,1$). Además, la melatonina mantiene el bajo RCR de la sepsis en músculo esquelético (Tablas 6; $P<0,01$) mientras que este índice tiene valores similares al control en diafragma y corazón (Tablas 4 y 5). En ratones deficientes en iNOS, la melatonina incrementa el consumo de oxígeno inducido por DNP y el cociente ADP/O (Tabla 4; $P<0,1$) y disminuye el RCR ($P<0,1$) en diafragma; recupera el estado III a nivel del control e incrementa el RCR (Tabla 5, $P<0,1$) en corazón; e incrementa en estado III y estado IV (Tabla 6, $P<0,01$) así como desciende el consumo de oxígeno inducido por DNP ($P<0,1$) en músculo esquelético. En cuanto al cociente ADP/O, éste se normaliza en corazón (Tabla 5) y músculo (Tabla 6) tras el tratamiento con melatonina, mientras que en diafragma es incrementado en ratones normales y deficientes en iNOS (Tabla 4; $P<0,01$ y $P>0,1$, respectivamente).

Estos datos sugieren que la pérdida del gen de la iNOS conduce a una pérdida de la eficiencia de la mitocondria, que puede incrementar el consumo de oxígeno para mantener los requisitos bioenergéticos necesarios para la vida celular.

Tabla 4

Cambios en la respiración mitocondrial de diafragma en ratones normales y deficientes en iNOS, usando succinato como sustrato.

Respiración	Normales			Deficientes en iNOS		
	Control	Sepsis	Sepsis + aMT	Control	Sepsis	Sepsis + aMT
Estado III	46,28 ± 5,61	44,59 ± 4,38	34,84 ± 3,26* [#]	80,72 ± 15,86	70,30 ± 8,88	76,23 ± 10,68
Estado IV	28,47 ± 2,31	28,21 ± 2,12	21,45 ± 2,91* [#]	69,60 ± 9,86	65,41 ± 8,60	75,08 ± 10,67
DNP	33,28 ± 2,54	35,36 ± 2,46	27,56 ± 3,01	38,09 ± 10,33	39,52 ± 9,17	59,28 ± 11,02* [#]
RCR	1,63 ± 0,08	1,58 ± 0,07	1,63 ± 0,09	1,22 ± 0,09	1,08 ± 0,04	1,03 ± 0,01*
ADP/O	1,84 ± 0,10	2,16 ± 0,19	2,39 ± 0,11**	2,90 ± 0,30	4,08 ± 0,22*	4,22 ± 0,28*

El consumo de oxígeno durante el estado III, IV y tras el desacoplamiento con la adición de dinitrofenol (DNP) es expresado en ng atom oxígeno/min .
 mg prot. RCR = control respiratorio (del inglés, “respiratory control ratio”), calculado como el cociente estado III/estado IV. * $P < 0,05$ and ** $P < 0,01$ vs. control; [#] $P < 0,05$ and ^{##} $P < 0,01$ vs. sepsis.

Tabla 5

Cambios en la respiración mitocondrial de corazón en ratones normales y deficientes en iNOS, usando succinato como sustrato.

	Normales			Deficientes en iNOS		
	Control	Sepsis	Sepsis + aMT	Control	Sepsis	Sepsis + aMT
Estado III	108,03 ± 12,36	92,56 ± 4,34	82,68 ± 3,12 * [#]	206,31 ± 12,14	162,82 ± 8,42 **	202,28 ± 13,06 ^{##}
Estado IV	66,30 ± 6,98	62,92 ± 2,30	51,87 ± 1,55 * ^{##}	141,18 ± 10,43	121,45 ± 8,47	123,97 ± 9,07
DNP	113,88 ± 18,56	105,56 ± 4,54	91,00 ± 4,05 [#]	179,90 ± 18,25	165,60 ± 10,03	159,10 ± 24,07
RCR	1,62 ± 0,03	1,47 ± 0,04 *	1,59 ± 0,03 [#]	1,48 ± 0,05	1,37 ± 0,09	1,65 ± 0,06 * [#]
ADP/O	2,47 ± 0,13	2,16 ± 0,15 *	2,31 ± 0,10	2,22 ± 0,11	2,25 ± 0,08	2,29 ± 0,11

El consumo de oxígeno durante el estado III, IV y tras el desacoplamiento con la adición de dinitrofenol (DNP) es expresado en ng atom oxígeno/min .
 mg prot. RCR = control respiratorio (del inglés, “respiratory control ratio”), calculado como el cociente estado III/estado IV. * $P < 0,05$ and ** $P < 0,01$ vs. control; [#] $P < 0,05$ and ^{##} $P < 0,01$ vs. sepsis.

RESULTADOS

Tabla 6

Cambios en la respiración mitocondrial de músculo esquelético en ratones normales y deficientes en iNOS, usando glutamato/malato como sustrato.

	Normales				Deficientes en iNOS				
	Control	Sepsis	Sepsis + aMT	Control	Sepsis	Sepsis + aMT	Control	Sepsis	Sepsis + aMT
Estado III	67,77 ± 5,80	78,52 ± 4,63	31,46 ± 1,74 **##	40,18 ± 1,78	41,60 ± 5,54	68,90 ± 2,49 **##			
Estado IV	20,45 ± 4,27	30,03 ± 2,82 *	13,55 ± 1,76 ##	36,50 ± 1,56	38,48 ± 5,48	68,10 ± 5,28 **##			
DNP	87,01 ± 12,98	98,15 ± 4,89	37,27 ± 12,78 *##	28,25 ± 4,41	20,11 ± 5,46	15,08 ± 0,52 *			
RCR	3,95 ± 0,45	2,81 ± 0,17 *	2,58 ± 0,19 *	1,11 ± 0,04	1,11 ± 0,06	1,03 ± 0,09			
ADP/O	4,20 ± 0,20	2,95 ± 0,09 **	4,24 ± 0,35 #	4,58 ± 0,73	4,25 ± 0,50	5,14 ± 0,91			

El consumo de oxígeno durante el estado III, IV y tras el desacoplamiento con la adición de dinitrofenol (DNP) es expresado en ng atom oxígeno/min .
 mg prot. RCR = control respiratorio (del inglés, “respiratory control ratio”), calculado como el cociente estado III/estado IV. * $P < 0,05$ and ** $P < 0,01$
 vs. control; # $P < 0,05$ and ## $P < 0,01$ vs. sepsis.

3.- *ESTRÉS OXIDATIVO EN LA SEPSIS.*

3.1.- Efecto de la falta del gen de la iNOS en la oxidación de los lípidos de membrana mitocondriales.

Los datos obtenidos muestran que la sepsis induce un incremento significativo de la peroxidación lipídica mitocondrial en diafragma (Figura 13; $P < 0,05$) y músculo esquelético (Figura 15; $P < 0,005$) de ratones normales pero no en corazón (Figura 14).

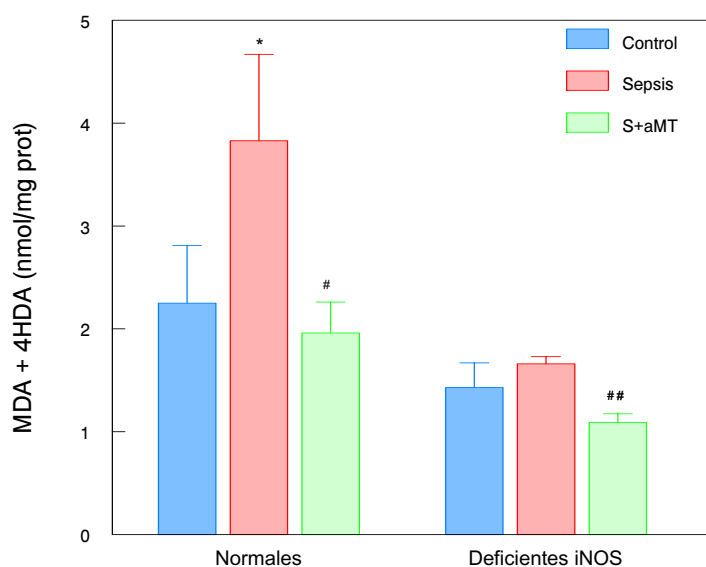


Figura 13. Cambios en la peroxidación lipídica mitocondrial tras la sepsis en diafragma de ratones normales y deficientes en iNOS. S + aMT = sepsis + melatonina. * $P < 0,05$ vs. control; # $P < 0,05$ y ## $P < 0,005$ vs. sepsis.

Por el contrario, en ratones deficientes en iNOS la sepsis no induce peroxidación lipídica en ninguno de los tejidos (Figuras 13, 14 y 15). El tratamiento con melatonina reduce significativamente los niveles intramitocondriales de lípidos peroxidados en diafragma y músculo esquelético de ratones normales recuperando los valores control

(Figuras 13 y 15). En ratones deficientes en iNOS el tratamiento con melatonina disminuye los valores de peroxidación con respecto al grupo de sepsis en diafragma (Figura 13; $P < 0,005$) y con respecto al control en corazón (Figura 14; $P < 0,005$), mientras que en músculo esquelético aumentan estos valores con respecto al grupo de sepsis (Figura 15; $P < 0,005$).

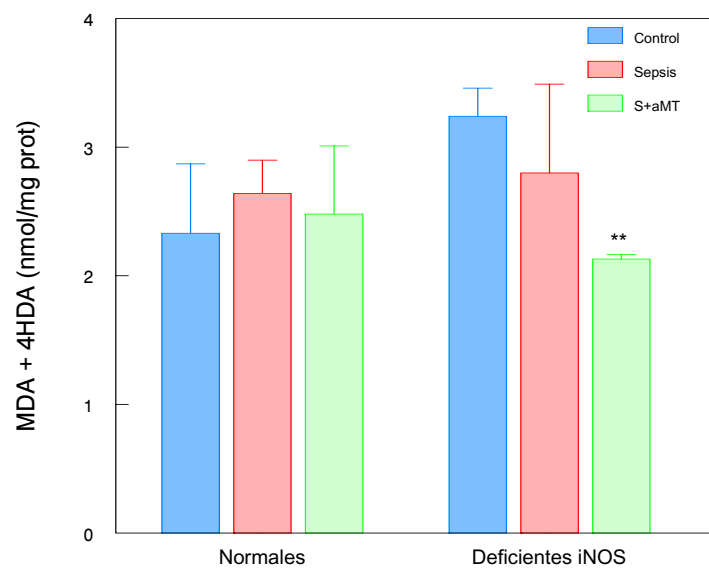


Figura 14. Cambios en la peroxidación lipídica mitocondrial tras la sepsis en corazón de ratones normales y deficientes en iNOS. S + aMT = sepsis + melatonina. ** $P < 0,005$ vs. control.

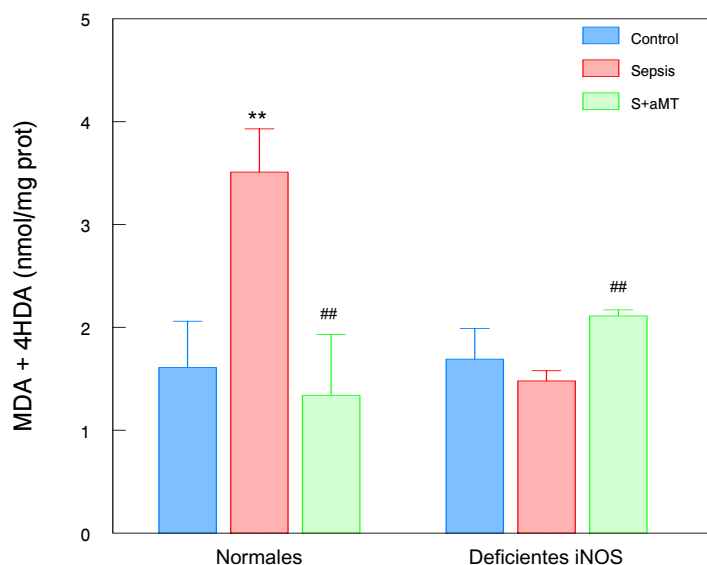


Figura 15. Cambios en la peroxidación lipídica mitocondrial tras la sepsis en músculo esquelético de ratones normales y deficientes en iNOS. S + aMT = sepsis + melatonina. ** $P < 0,005$ vs. control; ## $P < 0,005$ vs. sepsis.

3.2.- Efecto de la falta del gen de la iNOS en la actividad de la GPx y GRd.

También se han medido la actividad de los enzimas del ciclo del glutatión, GPx y GRd. La actividad basal de estos enzimas es similar en ambos tipos de ratones en diafragma (Figura 16), mientras que en corazón y músculo esquelético las actividades son inferiores en ratones deficientes en iNOS (figuras 17 y 18). En los ratones normales, la actividad de la GPx aumenta en los tres tejidos en la sepsis (Figuras 16A, 17A y 18A; $P < 0,1$ para diafragma, $P < 0,001$ para corazón y músculo esquelético) mientras que la actividad de la GRd disminuye (Figuras 16B, 17B y 18B; $P < 0,001$ para diafragma y corazón, $P < 0,1$ para músculo esquelético). La sepsis no afecta a la actividad de ninguna de las enzimas en los ratones deficientes en iNOS (Figuras 16, 17 y 18).

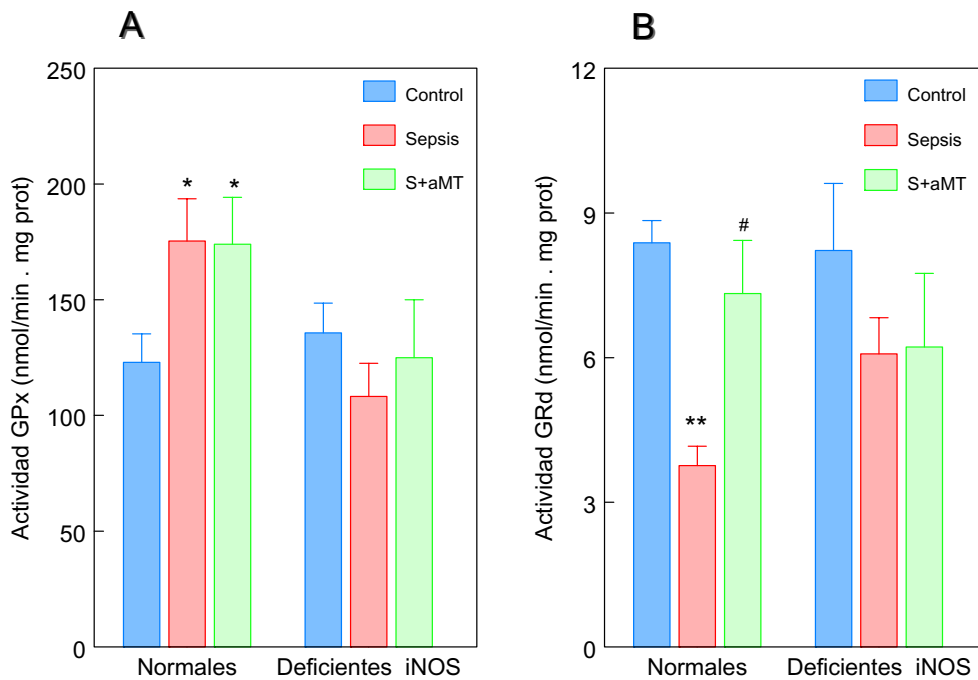


Figura 16. Cambios en la actividad de la glutatión peroxidasa (GPx) (A) y glutatión reductasa (GRd) (B) mitocondrial tras la sepsis en diafragma de ratones normales y deficientes en iNOS. S + aMT = sepsis + melatonina. * $P < 0.1$ y ** $P < 0.001$ vs. control; # $P < 0.1$ vs. sepsis.

La administración de melatonina contrarresta la inhibición de la GRd observada en la sepsis en los ratones normales (Figuras 16B, 17B y 18B; $P < 0,1$ en diafragma y músculo esquelético, $P < 0.001$ en corazón), incrementando la actividad por encima del control en el corazón (Figura 17B; $P < 0,001$), mientras que no tiene efecto en los ratones deficientes en iNOS (Figuras 16B, 17B y 18B). La actividad de la GPx mantiene una actividad superior al control en los ratones normales tratados con melatonina (Figuras 16A, 17A y 18A; $P < 0,1$ en diafragma y corazón, $P < 0,001$ en músculo esquelético), mientras que no tiene efectos en los ratones deficientes en iNOS.

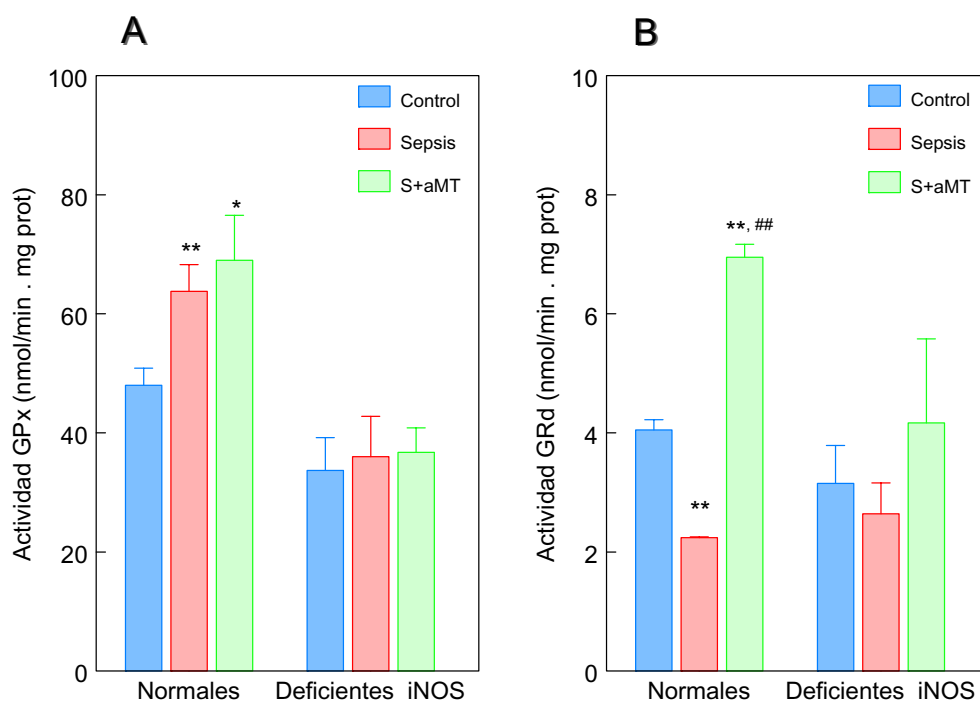


Figura 17. Cambios en la actividad de la glutatión peroxidasa (GPx) (**A**) y glutatión reductasa (GRd) (**B**) mitocondrial tras la sepsis en corazón de ratones normales y deficientes en iNOS. S + aMT = sepsis + melatonina. * $P < 0.1$ y ** $P < 0.001$ vs. control; ## $P < 0.001$ vs. sepsis.

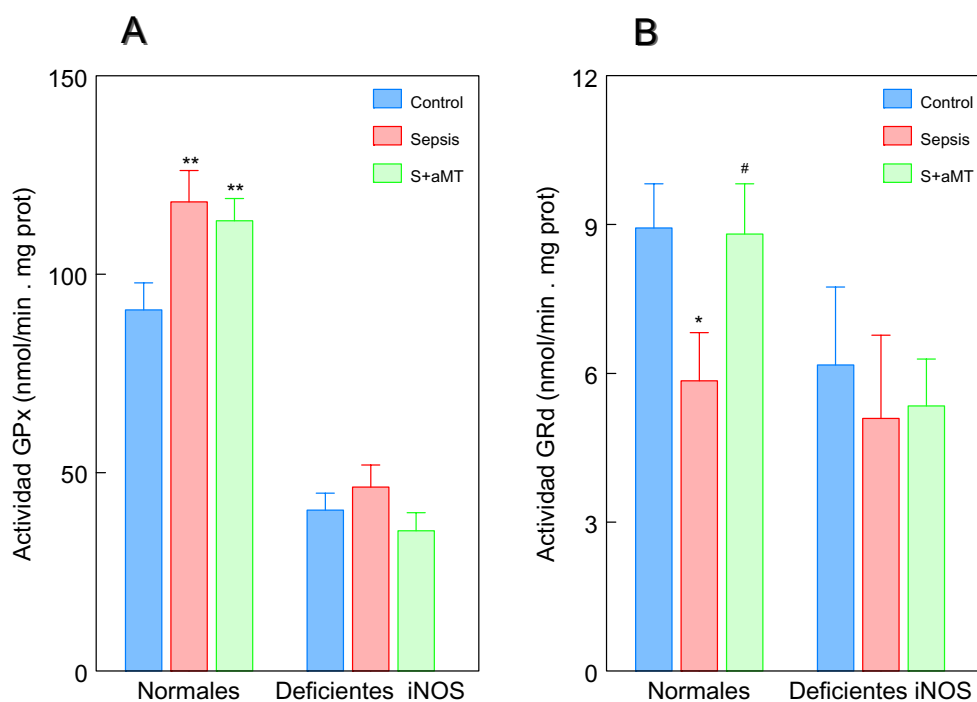


Figura 18. Cambios en la actividad de la glutatión peroxidasa (GPx) (A) y glutatión reductasa (GRd) (B) mitocondrial tras la sepsis en músculo esquelético de ratones normales y deficientes en iNOS. S + aMT = sepsis + melatonina. * $P < 0,1$ y ** $P < 0,001$ vs. control; # $P < 0,1$ vs. sepsis.

3.3.- Efecto de la falta del gen de la iNOS en los niveles intramitocondriales de glutatión total, GSH y GSSG.

Las mitocondrias de ambos tipos de ratones, normales y deficientes para la iNOS, contienen niveles similares de glutatión total en diafragma, corazón y músculo esquelético (Figuras 19A, 20A y 21A, respectivamente). El glutatión total contenido en las mitocondrias de los ratones normales desciende en la sepsis (Figuras 19A, 20A y 21A; $P < 0,05$ en diafragma y músculo esquelético, $P < 0,01$ en corazón). Además, la sepsis induce una fuerte caída de los niveles de GSH en los ratones normales (Figuras 19B, 20B y 21B; $P < 0,05$ en diafragma, $P < 0,001$ en corazón y músculo esquelético) con

los cambios opuestos en los niveles de GSSG en diafragma y músculo esquelético (Figuras 19C y 21C; $P < 0,001$ y $P < 0,005$, respectivamente).

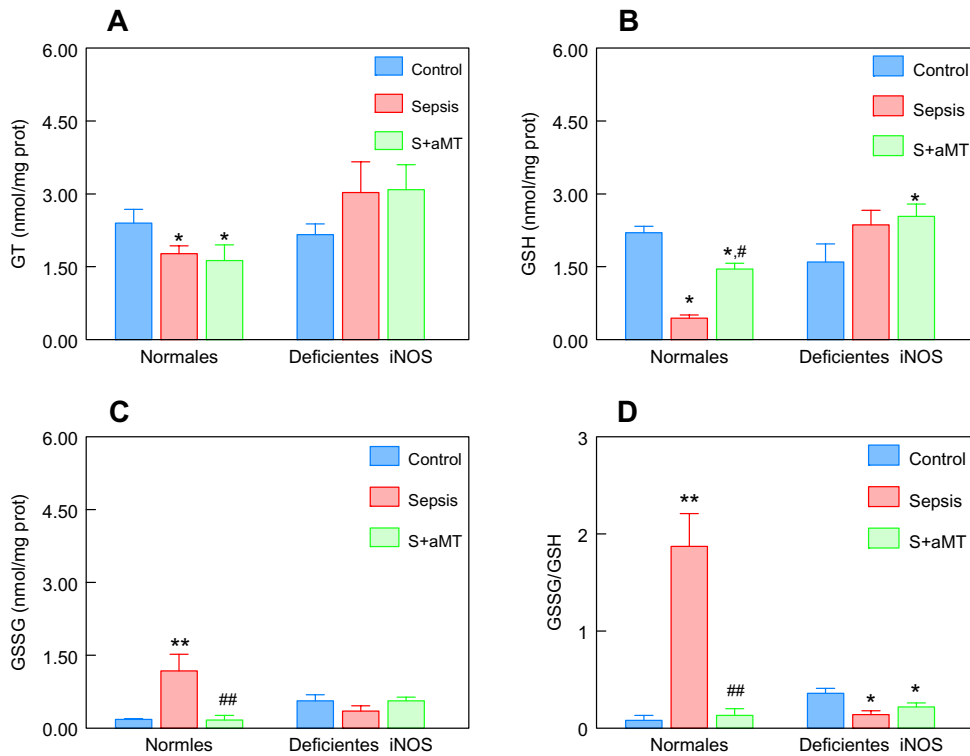


Figura 19. Cambios en el glutatión mitocondrial tras la sepsis en diafragma de ratones normales y deficientes en iNOS. S + aMT = sepsis + melatonina. * $P < 0,05$ y ** $P < 0,001$ vs. control; # $P < 0,05$ y ## $P < 0,001$ vs. sepsis.

En consecuencia, el índice GSSG/GSH es incrementado en la sepsis en los tres tejidos de ratones normales (Figuras 19D, 20D y 21D; $P < 0,001$). Sin embargo, la sepsis no modifica los niveles de glutatión en los ratones deficientes en iNOS aunque sí se aprecia un descenso del índice GSSG/GSH en diafragma y corazón (Figuras 19D y 20D; $P < 0,001$).

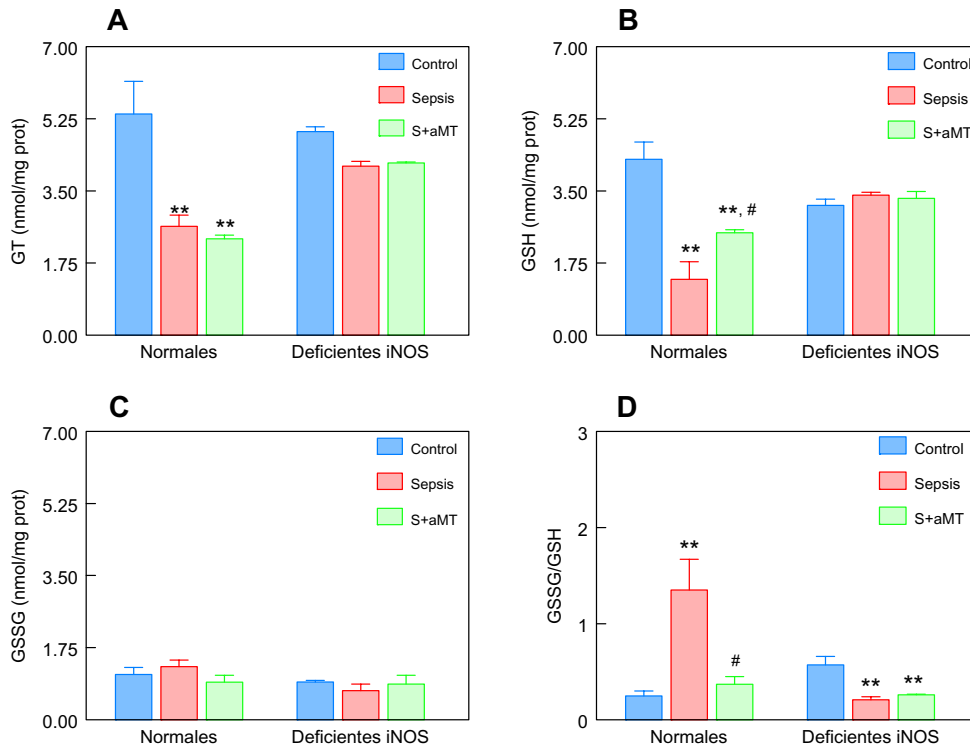


Figura 20. Cambios en el glutatión mitocondrial tras la sepsis en corazón de ratones normales y deficientes en iNOS. S + aMT = sepsis + melatonina. * $P < 0,05$ y ** $P < 0,001$ vs. control; # $P < 0,05$ vs. sepsis.

La administración de melatonina en los ratones normales con sepsis previene muchos de los cambios producidos en el glutatión mitocondrial. De hecho, aunque la melatonina no restaura el contenido de glutatión total en la mitocondria (Figuras 19A, 20A y 21A), el índice GSSG/GSH se normaliza (Figuras 19D, 20D y 21D; $P < 0,001$ en diafragma y músculo esquelético, $P < 0,05$ en corazón) debido al incremento de los niveles de GSH (Figuras 19B, 20B y 21B; $P < 0,05$ en diafragma y corazón; $P < 0,001$ en músculo esquelético) y al descenso de los niveles de GSSG (Figuras 19C, 20C y 21C; $P < 0,001$). En los ratones deficientes en iNOS la melatonina disminuye el índice GSSG/GSH en diafragma y corazón (Figuras 19D y 20D; $P < 0,05$ y $P < 0,001$ respectivamente), mientras que lo aumenta en músculo esquelético (Figura 21D; $P < 0,001$).

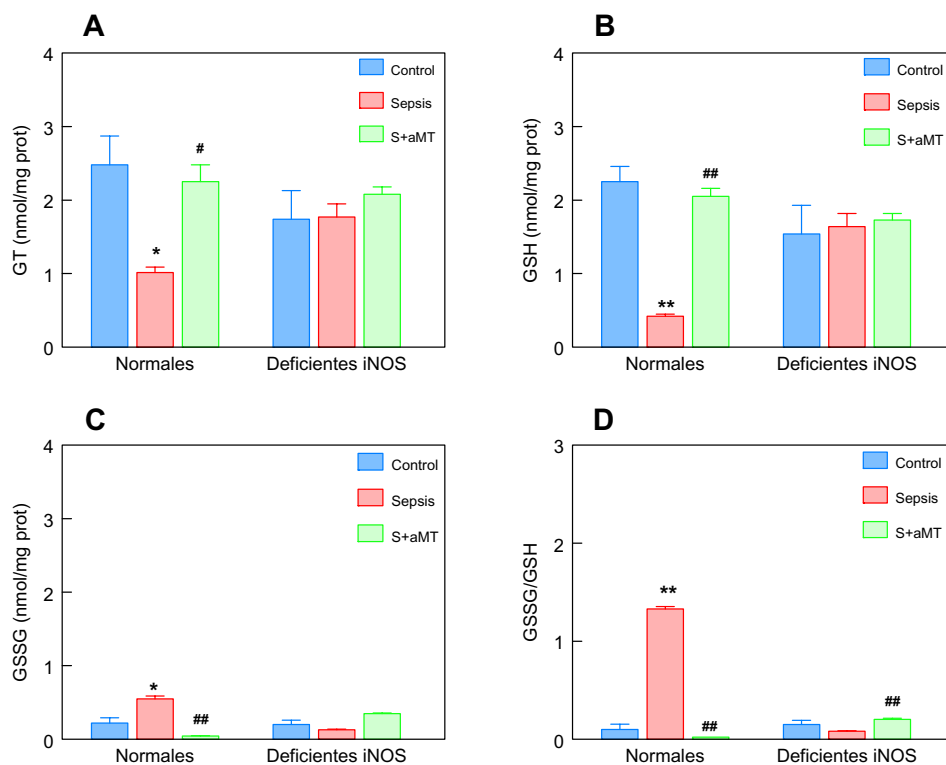


Figura 21. Cambios en el glutatión mitocondrial tras la sepsis en músculo esquelético de ratones normales y deficientes en iNOS. S + aMT = sepsis + melatonina. * $P < 0,05$ y ** $P < 0,001$ vs. control; # $P < 0,05$ y ## $P < 0,001$ vs. sepsis.



DISCUSIÓN

1.- mtNOS Y NO[•] EN LA SEPSIS.

Nuestros resultados muestran que, además de la isoforma constitutiva de la mtNOS, en las mitocondrias de distintos tejidos como músculo esquelético, corazón y diafragma de ratones normales existe otra isoforma de la mtNOS que se induce en situaciones de reacción inflamatoria como la sepsis. Estos datos confirman estudios anteriores que indicaban la presencia de una mtNOS inducible en mitocondrias de hígado y pulmón en ratas con sepsis inducida por lipopolisacáridos bacterianos (Escames y colbs., 2003). Sin embargo, nuestros resultados demuestran por primera vez que esta isoforma de la mtNOS proviene del mismo gen que codifica la iNOS citosólica. Por tanto, en la mitocondria coexisten dos isoformas de la mtNOS: una, derivada de la nNOS y que se expresa constitutivamente, y la otra, derivada de la iNOS, y que se induce como ésta en situaciones de inflamación. Mientras que la primera produce NO[•] en cantidades suficientes para regular la respiración, el aumento de la forma inducible produce un exceso de NO[•] y peroxinitritos que pueden causar un fracaso energético mitocondrial.

En este trabajo hemos estudiado el efecto que la inducción de la mtNOS puede tener sobre la función mitocondrial. Para ello, hemos medido la actividad de la mtNOS en mitocondrias de músculo, corazón y diafragma en ratones normales y deficientes en iNOS a los que se le induce la sepsis por ligadura y punción ileocecal, un modelo que produce una serie de cambios bioquímicos y hemodinámicos que se asemejan mucho a aquellos presentes en la clínica humana (Remick y colbs., 2000; Riedeman y colbs., 2003; Overhaus y colbs., 2004). Nuestros resultados demuestran que tanto los ratones normales como los deficientes en iNOS tienen una actividad de la mtNOS en condiciones basales que desaparece en presencia de EDTA, lo que indica que es Ca²⁺-

dependiente, y que corresponde a la forma constitutiva de la NOS desde el punto de vista cinético. Además, los ratones normales presentan una actividad basal de la mtNOS que es independiente de Ca^{2+} , y que por tanto se corresponde con la llamada forma inducible de la NOS. Esta segunda isoforma de la mtNOS es prácticamente indetectable en los ratones deficientes en iNOS. Tras la inducción de sepsis, en los ratones normales se observa un aumento significativo de la actividad de la mtNOS, que se debe al componente inducible, ya que la actividad de la forma constitutiva no se afecta. Los ratones deficientes en iNOS no presentan cambios en la actividad de la mtNOS tras la sepsis. Estos resultados confirman los datos previos sobre la presencia de una forma inducible de la mtNOS en mitocondrias de hígado y pulmón de rata (Escames y cols., 2003), y sugieren que esta isoforma deriva de la iNOS citosólica. Aunque recientemente Álvarez y Bóveris (2004) han observado que la sepsis inducida por LPS provoca un aumento de la actividad de la mtNOS en corazón y diafragma, estos autores no diferencian entre mtNOS constitutiva e inducible en función de su dependencia o independencia de Ca^{2+} .

La administración de melatonina reduce significativamente la actividad de la mtNOS en ratones normales tras la sepsis, debido al descenso de la actividad del componente inducible (Escames y cols., 2003). En los ratones deficientes en iNOS el tratamiento con melatonina no produce ningún efecto. Estos datos indican que la melatonina actúa selectivamente para contrarrestar la isoforma inducible de la mtNOS, afectando mínimamente a la forma constitutiva, reflejando la inhibición de la expresión de la iNOS (Crespo y cols., 1999). Aunque las mitocondrias del músculo esquelético de los ratones normales son las que mostraron un mayor aumento de la mtNOS tras la sepsis, la melatonina revertió esos cambios de forma similar en los tres tejidos estudiados.

Los cambios en la actividad de la mtNOS deben reflejarse en variaciones paralelas del NO^\bullet , lo que efectivamente ocurre cuando medimos los niveles intramitocondriales de nitritos. En ratones normales los niveles de nitritos aumentan en la sepsis y se reducen a sus niveles basales cuando se tratan con melatonina. La melatonina, sin embargo, no afecta a los niveles de nitritos en los ratones deficientes en iNOS, que tampoco se modificaron tras la sepsis. La única excepción a esta regla ha sido el comportamiento diferente entre actividad mtNOS y nitritos en mitocondrias de corazón en ratones normales. Mientras que en los tres tejidos hay un aumento de la mtNOS tras la sepsis, en corazón, sorprendentemente, esta inducción de la mtNOS no se traduce en una elevación de los niveles intramitocondriales de nitritos. Para intentar explicar este comportamiento aparentemente anormal, hay que tener en cuenta que el NO^\bullet reacciona rápidamente con el $\text{O}_2^{\bullet-}$ formando ONOO^- (Cadenas y colbs., 2000). Ya que el tejido cardíaco tiene una proporción de mitocondrias mayor que los otros dos tejidos analizados, podemos suponer que también producirá una mayor cantidad de $\text{O}_2^{\bullet-}$, por lo que habrá una mayor producción de ONOO^- y, en consecuencia, menores niveles relativos de nitritos. Además, los ONOO^- pueden reaccionar con la BH_4 , un cofactor necesario para la formación de óxido nítrico por las óxido nítrico sintasas, conduciendo a la formación de radical BH_3^\bullet (Kuzcaya y colbs., 2003). Por tanto, la oxidación de la BH_4 por parte de los peroxinitritos es causa de la disociación parcial de la NOS, lo cual a su vez incide en un descenso de la producción de NO^\bullet y un aumento paralelo de la producción de $\text{O}_2^{\bullet-}$ (Kuzcaya y colbs., 2003; Kunagai y colbs., 2004). Todo ello llevaría a un aumento de los niveles de ONOO^- . Por último, el NO^\bullet participa de forma importante en la función cardíaca, estando implicado en efectos vasculares y no vasculares (Massion y colbs., 2003). Esta función más amplia que tiene el NO^\bullet en el corazón podría deberse a una ruta o utilización del NO^\bullet mitocondrial en el corazón

distinta a la del músculo y diafragma, que se vería reflejada en un menor nivel de nitritos.

Los resultados discutidos hasta ahora resuelven algunos misterios relacionados con la mtNOS. Muchos de los resultados publicados en cuanto a la naturaleza de la mtNOS son contradictorios. Diversos autores indican la presencia de mtNOS en mitocondrias de diferentes tejidos con propiedades de eNOS, nNOS e iNOS. Otros, por el contrario, indican que no existe una mtNOS (Lacza y colbs., 2003; Tay y colbs., 2004; Lacza y colbs., 2004). Recientemente se ha identificado una mtNOS constitutiva, Ca^{2+} -dependiente, derivada de la nNOS modificada post-traduccionalmente (Elfering y colbs., 2002; Traaseth y colbs., 2004). También se ha observado un aumento de la expresión de la mtNOS después de la sepsis (Escames y colbs., 2003). Como hemos dicho, nuestros datos demuestran que dos componentes de la mtNOS, Ca^{2+} -dependiente y Ca^{2+} -independiente, se expresan de forma constitutiva en las mitocondrias de ratones normales. La sepsis induce cambios en las isoformas mitocondriales de la mtNOS totalmente coherentes con los cambios que se observan en las isoformas constitutiva e inducible de la NOS citosólica durante la sepsis. Durante la sepsis no se observa aumento de actividad de la mtNOS en los ratones deficientes en iNOS, lo que indica claramente que la isoforma inducible de la mtNOS corresponde a una forma codificada por el gen de la iNOS, y que por tanto deriva de la iNOS citosólica. Estos datos explican que la mtNOS haya sido identificada por los anticuerpos anti-iNOS y anti-nNOS (Tatoyan y Giulivi, 1998; Escames y colbs., 2003; Brookes, 2004).

El aumento de la mtNOS inducible tras la sepsis da lugar a un déficit importante de la función mitocondrial, como veremos más adelante. Sin embargo, este daño mitocondrial no está presente en los ratones deficientes para la iNOS, y por tanto las mitocondrias de estos ratones mutantes están protegidas frente a la sepsis. La cuestión

importante es: ¿cuál es la función de la forma inducible de la mtNOS en relación a la función mitocondrial? En principio, al igual que ocurre con la inducción de la iNOS en la sepsis, su función debe ser protectora, aunque si da lugar a un exceso de NO^\bullet , las consecuencias pueden ser fatales. En condiciones normales el NO^\bullet intramitocondrial controla la respiración ya que inhibe la actividad del complejo IV compitiendo por el oxígeno. De esta forma, dependiendo del cociente $\text{O}_2/\text{NO}^\bullet$ la respiración puede variar en un amplio margen. Tras la sepsis, el aumento de NO^\bullet intramitocondrial producido por la forma inducible de la mtNOS puede frenar la respiración y por tanto el consumo de oxígeno a este nivel. Ello permitiría la redistribución de oxígeno hacia otras células u otros territorios más necesitados de él, evitando que entraran en hipoxia. Sin embargo, por encima de un cierto nivel, el exceso de NO^\bullet en la mitocondria lleva a su vez a un exceso de producción de ONOO^- que dañan irreversiblemente todos los complejos de la CTE. Es entonces cuando el efecto beneficioso del aumento de NO^\bullet en la mitocondria se torna en peligroso, deviniendo en el fracaso mitocondrial, desenergización celular y fallo multiorgánico.

2.- BIOENERGÉTICA MITOCONDRIAL EN LA SEPSIS.

Cuando se induce la mtNOS en la sepsis, los niveles de nitritos aumentan de forma significativa en los ratones normales mientras que no se observan cambios en los ratones deficientes en iNOS. Por tanto, en estos estados inflamatorios aumenta la producción de NO^\bullet intramitocondrial a través de la mtNOS. Estos cambios que se producen durante la sepsis pueden afectar la regulación de la CTE. En condiciones fisiológicas el NO^\bullet inhibe reversiblemente al complejo IV por competición con el oxígeno en su sitio de unión a este complejo (Boveris y cols., 2000; Brown, 2001). En

estas condiciones, los tejidos son oxigenados en el rango de 20 μM de O_2 , con una relación $[\text{O}_2]/[\text{NO}]$ de 500-1000, estando inhibido el complejo IV en un 16-26% (Boveris, 2000). Sin embargo, el NO^\bullet producido en exceso en procesos fisiopatológicos como la sepsis provoca una importante disfunción mitocondrial (Maestroni, 1996; Shapira, 1998; Boczkowski, 1999; Escames y cols., 2003; Linares, 2003; Brealey, 2004), ya que los niveles elevados de NO^\bullet inhiben de forma progresiva los complejos II y I, y quizás también el III (Poderoso y cols., 1996). Además, la inhibición de la transferencia electrónica trae como consecuencia la formación de $\text{O}_2^{\bullet-}$ y H_2O_2 (Poderoso y cols., 1996; Poderoso y cols., 1998) que también dañan los componentes mitocondriales. A su vez, el NO^\bullet reacciona con el $\text{O}_2^{\bullet-}$ formando ONOO^- , los cuales dañan irreversiblemente todos los complejos de la CTE (Brown, 1999; Brown, 2001). Por tanto, el aumento de NO^\bullet en la sepsis es responsable de la inhibición de los complejos respiratorios. Estas observaciones son aplicables a nuestros resultados ya que el aumento de los niveles de NO^\bullet va acompañado por una reducción del 30-50 % de los complejos I, II, III y IV de la CTE en los ratones normales. Los ratones deficientes en iNOS no ven alterada la actividad de la CTE tras el proceso inflamatorio, indicando que el daño de la cadena respiratoria está asociado al NO^\bullet derivado de la mtNOS inducible.

Un hecho interesante es que la falta de expresión constitutiva de la isoforma inducible de la mtNOS en los ratones deficientes en iNOS se acompaña de un aumento significativo (hasta el doble) de la actividad de los complejos III y IV en mitocondrias normales. Estos datos parecen indicar que en condiciones normales la expresión de la mtNOS inducible produce el NO^\bullet necesario para mantener una inhibición tónica de los complejos III y IV. Sin embargo, la actividad de los complejos I y II es significativamente más baja en mitocondrias de ratones deficientes en iNOS que en ratones normales. Aunque no tenemos una explicación coherente para este hecho, desde

un punto de vista fisiológico, la disminución de la actividad de estos complejos, fundamentalmente el complejo I, puede ser compensada por un aumento de las actividades de los complejos III y IV, en un intento de mejorar la eficiencia mitocondrial y mantener una adecuada producción de ATP.

En cuanto al complejo V o ATP sintasa, esta enzima no se altera tras la sepsis ni en ratones normales ni en los deficientes en iNOS. En este sentido, recientemente Vyatkina y colbs. (Vyatkina y colbs., 2004) han medido la actividad de los cinco complejos mitocondriales cardíacos en un modelo de infección parasitaria. Estos investigadores demuestran que los complejos I-IV se dañan en la fase temprana y aguda de la infección, momento en el cual está actuando la inmunidad innata y, por tanto, la iNOS está inducida y el NO[•] elevado. El complejo V no se daña en esta primera fase de la infección pero en la última fase, o fase progresiva, cuando actúa la inmunidad adaptativa, el complejo V se daña. Estos datos parecen indicar que el daño del complejo V no está mediado por el NO[•], lo que viene a corroborar nuestros resultados. La diferente sensibilidad de los complejos I-IV y del complejo V al estrés nitrosativo/oxidativo puede depender de la diferente composición estructural de dichos complejos. Así, los complejos I-IV, y no el complejo V, tienen en común una serie de centros redox, los cuales son muy sensibles a este tipo de estrés. Tal es el caso de los centros Fe-S que parecen ser sitios específicos de daño por parte del NO[•] (Pearce y colbs., 2001).

El acoplamiento de la fosforilación oxidativa a la CTE conduce a la producción de ATP. En condiciones aerobias, la fosforilación oxidativa es responsable del 90-95% de la producción total de ATP por parte de la célula. Por tanto, una reducción en la actividad de la CTE puede provocar un descenso de la producción de ATP. En efecto, si la CTE está dañada, pasan menos protones al espacio intermembranal y, por tanto, hay

una menor fuerza protón-motriz, traduciéndose en una menor producción de ATP por parte de la ATP sintasa. Nuestros resultados concuerdan con estos datos, ya que la inducción de sepsis en ratones normales reduce el índice ATP/ADP debido a un descenso en los niveles intramitocondriales de ATP, lo cual va en paralelo a la inhibición de los complejos respiratorios y a una pérdida de la eficiencia de la fosforilación oxidativa (medida por el cociente ADP/O) en corazón y músculo pero no en diafragma. La caída de los niveles de ATP y del índice ATP/ADP, así como la pérdida en la eficiencia en la fosforilación oxidativa no ocurre en los ratones deficientes en iNOS. Por tanto, el daño a la CTE provocado por el aumento de NO[•] producido por la mtNOS inducible, es el responsable de la reducción del ATP. La reducción del contenido en ATP disminuye la energía disponible para la célula, lo que aumenta las posibilidades de muerte celular.

Acorde a la actividad de los complejos respiratorios, los ratones deficientes en iNOS no fueron capaces de respirar utilizando glutamato+malato como sustratos y sí usando succinato, ya que la actividad del complejo I (que utiliza glutamato+malato) está enormemente disminuida mientras que la actividad del complejo II (que utiliza succinato) está disminuida en menor medida, siendo mayores los valores absolutos de actividad. Además, el consumo de oxígeno en los estados III y IV fue mucho más alto en ratones deficientes en iNOS que en ratones normales. Estas diferencias pueden reflejar el aumento de actividad del complejo IV en los ratones deficientes en iNOS, que lleva a ese aumento del consumo de oxígeno. Es posible también que este aumento de consumo de oxígeno por la mitocondria respirando con succinato, puede reflejar un mecanismo compensatorio por la baja respiración por el complejo I.

Parece pues claro que la inducción de la mtNOS conduce al daño mitocondrial y a la desenergización celular. En nuestro laboratorio hemos demostrado previamente que

la melatonina es capaz de inhibir tanto la expresión como la actividad de la iNOS citosólica, así como la mtNOS en hígado y pulmón de ratas tratadas con LPS (Crespo y colbs., 1999; Escames y colbs., 2003). Nuestros resultados confirman que la administración de melatonina contrarresta la actividad de la mtNOS inducida por la sepsis en ratones. La melatonina no sólo contrarrestó la inhibición de los complejos I y IV por la sepsis, tal como estaba descrito (Escames y colbs., 2003), sino que por primera vez se describe que es capaz de aumentar también la actividad de los complejos II y III. El resultado es un aumento significativo de la actividad de la cadena respiratoria. Sin embargo, la melatonina no afectó prácticamente a la actividad de la CTE en ratones deficientes en iNOS, lo que sugiere que el efecto de la melatonina se debió principalmente a la inhibición de la mtNOS. Sin embargo, el hecho de que la melatonina pueda aumentar la actividad de los complejos de la cadena respiratoria por encima de sus valores basales sugiere un efecto más específico de la indolamina. En efecto, junto con otros datos recientes (Martín y colbs, 2000b; Martín y colbs, 2001; Acuña-Castroviejo y colbs., 2003; Escames y colbs., 2003) nuestros resultados sugieren que la melatonina puede ejercer un efecto directo sobre la CTE (León y colbs., 2004), y puede recuperar la actividad de la cadena respiratoria frente al daño causado por potentes agentes prooxidantes (Acuña-Castroviejo y colbs., 2002).

Un hecho que llama la atención en este estudio ha sido la falta de efecto de la melatonina sobre los niveles intramitocondriales de ATP. En estudios anteriores, se usaron dosis de melatonina de 1 a 100 nM para aumentar la producción de ATP in vitro (Martín y colbs., 2002) y de 10 mg/kg de peso in vivo (Martín y colbs., 2000b). Sin embargo, en nuestro estudio utilizamos una dosis total de melatonina de 120 mg/kg de peso, siendo esta dosis capaz de contrarrestar la actividad de la mtNOS y de la CTE a las 24 horas de inducir la sepsis. Quizás 24 horas no ha sido tiempo suficiente para

detectar un aumento de los niveles de ATP, a pesar de que la melatonina si mejoró la eficiencia de la fosforilación oxidativa. Otra explicación viene de los datos de respiración, ya que la melatonina redujo el consumo de oxígeno en estado III y IV a través del complejo I (datos no mostrados) y II, al igual que un bajo consumo de oxígeno al añadir dinitrofenol, lo cual refleja cierto desacoplamiento debido a las altas dosis de melatonina usadas. De todas formas, una dosis de melatonina menor a la usada en este estudio hubiera sido suficiente para normalizar la cadena respiratoria y quizás con una dosis menor el efecto desacoplante sería lo suficientemente bajo como para no solapar el aumento de ATP.

3.- ESTRÉS OXIDATIVO EN LA SEPSIS.

El aumento de actividad de la mtNOS durante la sepsis, además de afectar a la CTE, puede tener como consecuencia la producción de radicales libres, que a su vez dañan a la propia mitocondria incluyendo la CTE. Las mitocondrias son la fuente más importante de radicales libres (Boveris, 1985; Sohal y Brunk, 1992; Shapira, 1998) y la generación de estas moléculas puede proceder del daño en la CTE, lo cual provoca fuga de electrones y formación de ROS incluyendo $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 y $HO\cdot$, debido a la reducción parcial del oxígeno por uno, dos y tres electrones, respectivamente (Barja, 1999). A su vez, altos niveles de $O_2^{\cdot-}$ favorecen el aumento de la producción de $ONOO^-$, que inhiben irreversiblemente la CTE (Bockzkowski, 1999; Brown, 2001; Escames y cols., 2003) y la peroxidación lipídica de las membranas mitocondriales (Scabó, 2003), abriendo un círculo vicioso que termina en una severa disfunción mitocondrial y muerte celular (Bustamante y cols., 2002; Piantadosi y cols., 2002). En consecuencia, un aumento de los niveles intramitocondriales de peroxidación lipídica, como los

observados en nuestros resultados tras la sepsis, sirve como señal indirecta de estrés oxidativo. Este efecto no ocurre en los ratones deficientes en iNOS, lo que indica que la peroxidación se produce a consecuencia de la inducción de la mtNOS. Sin embargo, en corazón de ratones normales no hay un aumento de peroxidación lipídica, quizás debido a que la composición de los ácidos grasos susceptibles de ser peroxidados difiere entre las mitocondrias de un tejido y otro, siendo los de corazón poco susceptibles a la misma (Piergiacomi y cols., 2001).

La mitocondria lucha contra el estrés oxidativo con sus propios sistemas antioxidantes, siendo el glutathione uno de los más importantes debido a que es la principal vía mitocondrial para depurar el H_2O_2 . El sistema del glutathione convierte el H_2O_2 a H_2O por acción de la GPx. En este proceso, el GSH es oxidado a GSSG y la GRd restaura los niveles de GSH. Entonces, un aumento de estrés oxidativo mitocondrial debe reflejarse por cambios en el índice GSSG/GSH y en las actividades de la GPx y GRd. Nuestros resultados en ratones normales tras la sepsis muestran un aumento en los niveles intramitocondriales de GSSG con una paralela reducción de los niveles de GSH (en consecuencia, el índice GSSG/GSH aumenta), además de un descenso en los niveles totales de glutathione. De acuerdo con estos datos, la actividad de la GPx aumenta en la sepsis mientras que la actividad de la GRd disminuye, ya que esta enzima se daña fácilmente e irreversiblemente por los radicales libres. En este estado, la mitocondria tiene dificultades para reciclar el GSH. El aumento de la forma oxidada de glutathione (GSSG) depende del aumento de radicales libres que ocurre como consecuencia del aumento de actividad de la mtNOS inducible, como lo muestra la ausencia de cambios en el índice GSSG/GSH, así como en las actividades de la GPx y GRd en ratones deficientes en iNOS con sepsis. Estos datos confirman el efecto de la sepsis para promover la producción de radicales libres en la mitocondria, tal como

Álvarez y Bóveris (2004) demostraron en ratas. Estos autores muestran que en la sepsis aumenta la actividad de la SOD mitocondrial sin cambios en la actividad de la catalasa. Posiblemente ello sea debido a que, como observamos en nuestro modelo experimental, la detoxificación de H_2O_2 en la mitocondria ocurre principalmente por el sistema del glutathion y no por la catalasa (Antunes y cols., 2002). El sistema del glutathion se alteró de forma significativa en músculo, corazón y diafragma de ratones normales en respuesta al estrés oxidativo inducido por la sepsis, lo que sugiere que ésta es una respuesta general a la sepsis.

Los efectos antioxidantes de la melatonina (Acuña-Castroviejo y cols., 2001; Reiter y cols., 2003) sugieren que su administración debe contrarrestar el aumento de radicales libres provocado por la sepsis. La melatonina es muy eficaz para restaurar el contenido de glutathion en mitocondrias incubadas *in vitro* con agentes como el t-butil hidroperóxido, un potente agente prooxidante (Martín y cols., 2000). Nuestros datos muestran que también *in vivo* la administración de melatonina a ratones normales restaura el contenido de glutathion reducido mitocondrial al normalizar las actividades de los enzimas del ciclo redox del glutathion.

Por tanto, la melatonina previene el daño mitocondrial en la sepsis actuando a varios niveles (Figura 22): depurando radicales libres; estimulando los sistemas antioxidantes como los enzimas del ciclo del glutathion, poniendo a disposición de la mitocondria un contenido permanente de glutathion reducido, además de inhibir la producción de $NO\cdot$ por parte de la mtNOS. Todo ello tiene como consecuencia la normalización de la función de la cadena respiratoria. Independientemente de esos efectos, hay serias evidencias de que la melatonina pueda aumentar directamente la actividad de los complejos de la CTE, aunque este dato necesita ser demostrado en estudios futuros.

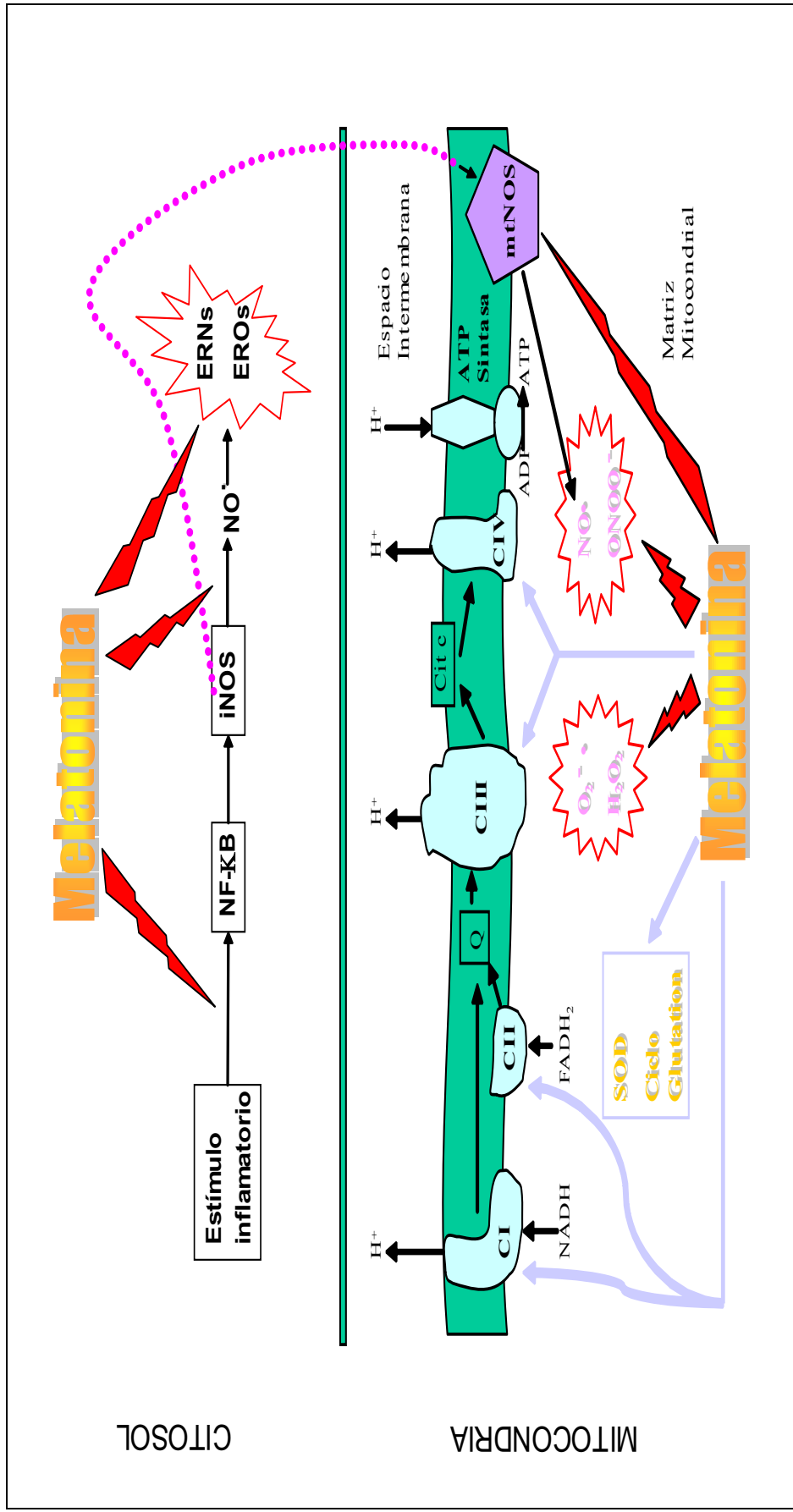


Figura 22. Efecto de la melatonina en la disfunción mitocondrial en la sepsis.



CONCLUSIONES

Del presente estudio podemos extraer las siguientes conclusiones:

- 1) Las mitocondrias de músculo, corazón y diafragma poseen una mtNOS con un componente inducible codificado por el mismo gen que la iNOS citosólica.
- 2) La falta del gen de la iNOS va acompañado de una desaparición de la inducción de la mtNOS en la sepsis.
- 3) La ausencia del gen de la iNOS sugiere que el NO[•] derivado de esta isoforma de la mtNOS participa en la regulación de la actividad de la CTE en condiciones normales. Efectivamente, estos ratones muestran diferencias significativas en la actividad de la CTE, producción de ATP y respiración.
- 4) El componente inducible de la mtNOS es el responsable de la inhibición de los complejos mitocondriales I, II, III y IV en la sepsis, pero no del complejo V, cuya actividad no varía. Este daño a la CTE se traduce en una desenergización celular.
- 5) El componente inducible de la mtNOS es el responsable del aumento de estrés oxidativo mitocondrial en la sepsis.
- 6) La melatonina es muy efectiva para frenar el daño mitocondrial en la sepsis. La inhibición de la actividad del componente inducible de la mtNOS normaliza el NO[•], recuperando la actividad de la cadena respiratoria y contrarrestando el estrés oxidativo mitocondrial. Sin embargo, a la dosis usada, la melatonina no recupera los niveles mitocondriales de ATP.

BIBLIOGRAFÍA

- Abraham E, Andrews P, Antonelli M, Brochard L, Brun-Buisson C, Dobb G, Fagon J-Y, Groeneveld J, Mancebo J, Metnitz P, Nava S, Pinsky M, Radermacher P, Ranieri M, Richard C, Tasker R, Vallet B (2004). Year in review in intensive care medicine-2003. Part 1: respiratory failure, infection and sepsis. *Intensive Care Med.* 30: 1017.
- Ackrell BAC, Johnson MK, Ginsalus RP, Cechini G (1992). Structure and function of succinate dehydrogenase and fumarate reductase. In: *Biochemistry of Flavoenzymes*. Muller F, ed. Boca Raton, FL: CRC Press.229.
- Acuña-Castroviejo D, Pablos MI, Menéndez-Peláez A, Reiter RJ (1993). Melatonin receptors in purified cell nuclei of liver. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 82: 253.
- Acuña-Castroviejo D, Reiter RJ, Menendez-Pelaez A, Pablos MI, Burgos A (1994). Characterization of high-affinity melatonin binding sites in purified cell nuclei of rat liver. *J. Pineal Res.* 12 (2): 100.
- Acuña-Castroviejo D, Martín M, Macías M, Escames G, León J, Khaldy H, Reiter RJ (2001). Melatonin, mitochondria and cellular bioenergetics. *J. Pineal Res.* 30: 65.
- Acuña-Castroviejo D, Escames G, Carazo A, León J, Khaldy H, Reiter RJ (2002). Melatonin, mitochondrial homeostasis and mitochondrial-related diseases. *Curr. Topics Med. Chem.* 2: 133.
- Acuña-Castroviejo D, Escames Rosa G, León López J, Carazo Gallego A, and Khaldy H. Mitochondrial regulation by melatonin and its metabolites. In: *Developments in Tryptophan and Serotonin Metabolism*, edited by Allegri G, Costa CVL, Ragazzi E, Steinhart H, and Varesio L, New York, USA:Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2003, p. 549.
- Adams PL, Turnbull DM (1996). Disorders of the electron transport chain. *J. Inher. Metab. Dis.* 19: 463.
- Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG (2001). Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem. J.* 357: 593.
- Álvarez S, Bóveris A (2004). Mitochondria nitric oxide metabolism in rat muscle during endotoxemia. *Free Radic. Biol. Med.* 37: 1472.
- Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijin MHL, Coulson AR, Drouin J (1981). Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290: 457.
- Andrew PJ, Mayer B (1999). Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovasc. Res.* 43: 521.
- Angus DC, Linde-Zwirbe WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky, MR (2001). Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome and associated costs of care. *Crit. care Med.* 29: 1303.

- Antolin I, Mayo JC, Sainz RM, del Brio Mde L, Herrera F, Martin V, Rodriguez C (2002). Protective effect of melatonin in a chronic experimental model of Parkinson's disease. *Brain Res.* 943 (2): 163.
- Antunes, F; Han, D; Cadenas, E (2002). Relative contributions of heart mitochondria glutathione peroxidase and catalase to H₂O₂ detoxification in vivo conditions *Free Radic. Biol. Med.* 33:1260.
- Awad SS (2003). State-of-the-art therapy for severe sepsis and multisystem organ dysfunction. *Am. J. Surg.* 186: 23S.
- Axerold J, Wissbach H (1960). Enzymatic O-methylation of N-acetyl-serotonin to melatonin. *Science* 131: 1312.
- Barja G (1999). Mitochondrial oxygen radical generation and leak: Sites of production in states 4 and 3, organ specificity, and relation to aging and longevity. *J. Bioenerg. Biomemb.* 31: 347.
- Barreiro E, Hussain SNA (2002). Fracaso de los músculos respiratorios en la sepsis. *Arch. Bronconeumol.* 38: 226.
- Barrientos A (2002). In vivo and in organelle assessment of OXPHOS activities. *Methods* 26: 307.
- Bates TE, Loesch A, Burnstock G, Clark JB (1995). Immunocytochemical evidence for a mitochondrially located nitric oxide synthase in brain and liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 213: 896.
- Bathia M, Mochhala S (2004). Role of inflammatory mediators in the pathophysiology of acute respiratory distress syndrome. *J. Pathol.* 202: 145.
- Becker-André M, Wiesenberg I, Scharren-Wiemers N, André E, Missbach M, Saurat JH, Carlberg C (1994). Pineal gland hormone melatonin binds and activates an orphan of the nuclear receptor superfamily. *J. Biol. Chem.* 269: 28531.
- Benítez-King G, Antón-Tay F (1996). In vitro inhibition of Ca²⁺/CaM-dependent kinase II activity by melatonin. *Biochim. Biophys. Acta* 1290: 191.
- Beutler B (2004). Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. *Nature* 430: 257.
- Boczkowski J, Dureuil B, Pariente R, Aubier M (1990). Preventive effects of indomethacin on diaphragmatic contractile alterations in endotoxemic rats. *Am. Rev. Respir. Dis.* 142: 193.
- Boczkowski J, Lisdero CL, Lanone S, Samb A, Carreras MC, Bóveris A, Aubier M, Poderoso JJ (1999). Endogenous peroxynitrite mediates mitochondrial dysfunction in rat diaphragm during endotoxemia. *FASEB J.* 13: 1637.
- Bone RC, Sprung CL, Sibbald WJ (1992). Definitions for sepsis and organ failure. *Crit. Care Med.* 20: 724.
- Bóveris, A., Costa, L.E., Poderoso, J.J., and Cadenas, E. (2000).

- Regulation of mitochondrial respiration by oxygen and nitric oxide. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 899: 121.
- Bóveris A, Álvarez S, Navarro A (2002). The role of mitochondrial nitric oxide synthase in inflammation and septic shock. *Free Radic. Biol. Med.* 33: 1186.
- Bóveris A, Valdez LB, Álvarez S, Zaobornyj T, Bóveris AD, Navarro A (2003). Kidney mitochondrial nitric oxide synthase. *Antioxid. Redox Signal* 5: 265.
- Boyer PD (1993). The binding change mechanism for ATP synthase—some probabilities and possibilities. *Biochim. Biophys. Acta* 1140: 215.
- Boyer PD (1997). The ATP synthase—a splendid molecular machine. *Annu. Rev. Biochem.* 66: 717.
- Braun HP, Schmitz UK (1995). Are de “core” proteins of the mitochondrial bc₁ complex evolutionary relics of a processing protease? *Trends Biochem. Sci.* 20: 171.
- Brealey D, Karyampudi S, Jacques TS, Novelli M, Stidwill R, Taylor V, Smolenski RT, Singer M (2004). Mitochondrial dysfunction in a long-term rodent model of sepsis and organ failure. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 286: R491.
- Brookes PS, Levonen A-L, Shiva S, Sarti P, Darley-Usmar VM (2002). Mitochondria: regulators of signal transduction by reactive oxygen and nitrogen species. *Free Radic. Biol. Med.* 33: 755.
- Brookes PS (2004). Mitochondrial nitric oxide synthase. *Mitochondrion* 3: 187.
- Brown, GC (1999). Nitric oxide and mitochondrial respiration. *Biochim. Biophys. Acta* 1411: 351.
- Brown, GC (2001). Regulation of mitochondrial respiration by nitric oxide inhibition of cytochrome c oxidase. *Biochim. Biophys. Acta* 1504: 46.
- Brown GC, Borutaite V. Inhibition of mitochondrial respiratory complex I by nitric oxide, peroxynitrite and S-nitrosothiols (2004). *Biochim Biophys Acta* 1658: 44.
- Brusque AM, Rosa RB, Schuck PF, Dalcin KB, Ribeiro CAJ, Silva CG, Wannmacher CMD, Dutra-Filho CS, Wyse ATS, Briones P, Wajner M (2002). Inhibition of the mitochondrial respiratory chain complex activities in rat cerebral cortex by methylmalonic acid. *Neurochem. Int.* 40: 593.
- Bustamante J, Besier G, Badin RA, Cymeryng C, Parodi A, Bóveris A (2002). Sequential NO production by mitochondria and endoplasmic reticulum during induced apoptosis. *Nitric Oxide* 6: 333.
- Cadenas E, Poderoso JJ, Antunes F, Bóveris A (2000). Analysis of the pathways of nitric oxide utilization in mitochondria. *Free Radic. Res.* 33: 747.

- Callahan LA, Stofan DA, Szweda LI, Nethery DE, Supinski GS (2001). Free radical alter maximal diaphragmatic mitochondrial oxygen consumption in endotoxin-induced sepsis. *Free Radic. Biol. Med.* 30: 128.
- Carlberg C, Weisenberg I (1995). The orphan receptor family RZR/ROR, melatonin and 5-lipoxygenase: and unexpected relationship. *J. Pineal Res.* 18: 171.
- Chu SC, Marks Konczal J, Wu HP, Banks TC, Moss J (1998). Analysis of the cytokine-stimulated human inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene: characterization of differences between human and mouse iNOS promoters. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 248: 871.
- Cohen CA, Zigelbaum G, Gross D, Roussos C, Macklem PT (1982). Clinical manifestations of inspiratory muscle fatigue. *Am. J. Med.* 73: 308.
- Cohen J (2002). The immunopathogenesis of sepsis. *Nature* 420: 885.
- Cormier A, Morin C, Zini R, Tillement JP, Lagrue G (2001). In vitro effects of nicotine on mitochondrial respiration and superoxide anion generation. *Brain Res.* 900: 72.
- Court O, Kumar A, Parrillo JE, Kumar A (2002). Clinical review: myocardial depression in sepsis and septic shock. *Crit. Care* 6: 500.
- Crespo E, Macías M, Pozo D, Escames G, Martín M, Vives F, Guerrero JM, Acuña-Castroviejo D (1999). Melatonin inhibits expression of the inducible NO synthase II in liver and lung and prevents endotoxemia in lipopolysaccharide-induced multiple organ dysfunction syndrome in rats. *FASEB J.* 13: 1537.
- Cuzzocrea S, Reiter RJ (2001). Pharmacological action of melatonin in shock, inflammation and ischemia/reperfusion injury. *Eur. J. Pharmacol.* 426: 1.
- Das UN (2000). Critical advances in septicemia and septic shock. *Crit. care* 4: 290.
- Davies NA, Cooper CE, Stidwill R, Singer M (2004). Inhibition of mitochondrial respiration during early stage sepsis. *Adv. Exp. Med. Biol.* 530: 725.
- de Villa Bianca R, Marzocco S, Di Paola R, Autore G, Pinto A, Cuzzocrea S, Sorrentino S (2004). Melatonin prevents lipopolysaccharide-induced hyporeactivity in rat. *J. Pineal Res.* 36: 146.
- El-Dwari Q, Comtois A, Gou Y, Hussain SNA (1998). Endotoxin-induced skeletal muscle contractile dysfunction: contribution of nitric oxide synthases. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 43: C770.
- Elfering SL, Sarkela TM, Giulivi C (2002) Biochemistry of mitochondrial nitric-oxide synthase. *J. Biol. Chem.* 277: 38079.

- Erren TC, Reiter RJ, Piekarski C (2003). Light, timing of biological rhythms, and chronodisruption in man. *Naturwissenschaften* 90 (11): 485.
- Escames G, León J, Macías M, Khaldy H, Acuña-Castroviejo, D (2003). Melatonin counteracts lipopolysaccharide-induced expression and activity of mitochondrial nitric oxide synthase in rats. *FASEB J.* 17: 932.
- Escames G, Carrazo A, Acuña-Castroviejo D (2005). Melatonin enlaces the expresión of complex IV subunits coded by mtDNA. *Eur. J. Biochem.* Enviado.
- Estabrook RW (1967) Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurements of ADP:O ratios. *Meth. Enzymol.* 10: 41.
- Frandsen U, López-Figueroa M, Hellsten Y (1996). Localization of nitric oxide synthase in human skeletal muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 227: 88.
- French S, Giulivi C, Balaban RS (2001). Nitric oxide synthase in porcine heart mitochondria: evidence for low physiological activity. *Am. J. Physiol.* 280: H2863.
- Friedrich T, Steinmüller A, Weiss H (1995). The proton pumping respiratory complex I of bacteria and mitochondria and its homologue in chloroplasts. *FEBS Lett.* 367: 107.
- Friman G (1977). Effects of acute infectious disease on isometric strength. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 37: 303.
- Fujihara M, Muroi M, Tanamoto K, Suzuki T, Azuma H, Ikeda H (2003). Molecular mechanism of macrophage activation and deactivation by lipopolysaccharide: roles of the receptor complex. *Pharmacol. Ther.* 100: 171.
- Galli S, Labato MA, Bal de Kier Joffé E, Carreras MC, Poderoso JJ (2003). Decreased mitochondrial nitric oxide synthase activity and hydrogen peroxide relate persistent tumoral proliferation to embryonic behavior. *Cancer Res.* 63: 6370.
- Gellerich FN, Trumbeckaite S, Opalka JR, Gellerich JF, Chen Y, Neuhof, C, Redl H, Werdan K, Zierz S (2002). Mitochondrial dysfunction in sepsis: evidence from bacteraemic baboons and endotoxaemic rabbits. *Biosci. Rep.* 22: 99.
- Ghafourifar P, Richter C (1997). Nitric oxide synthase in mitochondria. *FEBS Lett.* 418: 291.
- Gigardin SE, Boneca JG, Carneiro LA, Antignac A, Jehanno M, Viala J, Tedin K, Taha MK, Labigne A, Zathringer U, Coyle AJ, DiStefano PS, Bertin J, Sansonetti PJ, Philpott DJ (2003). Nod1 detects a unique muropeptide from Gram-negative bacterial peptidoglycan. *Science* 300: 1584.
- Gigueré V, Tini M, Flock G, Ong E, Evans RM, Otulakowski G (1994). Isoform-specific amino-

- terminal domains dictate DNA-binding properties of ROR α , a novel family of orphan hormone nuclear receptors. *Genes Dev.* 8: 538.
- Giulivi C, Poderoso JJ, Bóveris, A (1998). Production of nitric oxide by mitochondria. *J. Biol. Chem.* 273: 11038.
- Giulivi C (2003) Characterization and function of mitochondrial nitric-oxide synthase. *Free Radic. Biol. Med.* 34: 397.
- Gitto E, Karbownik M, Reiter RJ, Tan DX, Cuzzocrea S, Chiurazzi P, Cordaro S, Corona G, Trimarchi G, Barberi I (2001). Effects of melatonin treatment in septic newborns. *Pediatr. Res.* 50: 756.
- Green LC, Ruiz de Luzuriaga K, Wagner DA (1981). Nitrate biosynthesis in man. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 78: 7764.
- Griffith OW (1985). Glutathione and glutathione disulfide. In: *Methods of enzymatic analysis* (Bergmeyer, ed.) pp. 521, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim.
- Guenebaut V, Schlitt A, Weiss H, Keonard K, Friedrich, T (1998). Consistent structure between bacterial and mitochondrial NADH: ubiquinone oxidoreductase (complex I). *J. Biol. Chem.* 276: 105.
- Guha M, Mackman N (2001). LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell. Signalling* 13: 85.
- Haynes V, Elfering S, Traaseth N, Giulivi C (2004). Mitochondrial nitric-oxide synthase: enzyme expression, characterization, and regulation. *J. Bioenerg. Biomembr.* 36: 341.
- Hirose T, Smith RJ, Jetten AM (1994). ROR γ . The third member of RZR/ROR orphan receptor subfamily that is highly expressed in skeletal muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 205: 1976.
- Hofhaus G, Weiss H, Leonard K (1991) Electron microscopy analysis of the peripheral and membrane parts of mitochondrial NADH dehydrogenase (complex I). *J. Mol. Biol.* 221: 1027.
- Huerto-Delgadillo L, Antón-Tay F, Benítez-King G (1994). Effects of melatonin on microtubule assembly depend on hormona concentration: role of melatonin as a calmodulin antagonist. *J. Pineal Res.* 17:55.
- Hussain SNA (1998). Respiratory muscle dysfunction in sepsis. *Moll. Cell Biochem.* 179: 125.
- Iwata S, Ostermeier C, Ludwig B, Michel H (1995). Structure at 2.8 Å resolution of cytochrome c oxidase from *Paracoccus denitrificans*. *Nature* 376: 660.
- Jaskot RH, Charlet EG, Grose EC, Grady MA, Roycroft JH (1983). An automatic analysis of glutathione peroxidase, glutathione-S-transferase, and reductase activity in animal tissue. *J. Anal. Toxicol.* 7: 86.
- Kanai AJ, Pearce LL, Clemens PR, Birder LA, VanBibber MM, Choi SY, de Groat WG, Peterson J (2001). Identification a neuronal nitric oxide synthase

- in isolated cardiac mitochondria using electrochemical detection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 14126.
- Kanai A, Epperly M, Pearce L, Birder L, Zeidel M, Meyers S, Greenbeger J, de Groat W, Apodaca G, Peterson J (2004). The differing roles of mitochondria nitric oxide synthase in cardiomyocytes and urothelial cells. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 286: H13.
- Karbowski M, Youle RJ (2003). Dynamics of mitochondrial morphology in healthy cells and during apoptosis. *Cell Death Differ.* 10: 870.
- Kavetnoy I (2002). Extrapineal melatonin in pathology: new perspectives for diagnosis, prognosis and treatment of illness. *Neuro Endocrinol. Lett.* 1: 92.
- Kleinert H, Wallerath T, Fritz G, Ihrig-Biedert I, Rodriguez-Pascual F, Geller DA, Förstermann U (1998). Cytokine induction of NO synthase II in human DLD-1 cells: roles of the JAK-STAT, AP-1 and NF-kappa B-signalling pathways. *Br. J. Pharmacol.* 125: 193.
- Kleinert H, Geller DA, Förstermann U (1999). Analysis of the molecular mechanism regulating the induction of the human NO synthase II promoter in human A549/8 alveolar carcinoma cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 359: R37.
- Kleinert H, Pautz A, Linker K, Schwarz PM (2004) Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Eur. J. Pharmacol.* 500: 255.
- Kobzik L, Stringer B, Balligand JL, Reid MB, Stamler JS (1995). Endothelial type nitric oxide synthase in skeletal muscle fibers: mitochondrial relationships. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 211: 375.
- Kotler M, Rodriguez C, Sainz RM, Antolin I, Menendez-Pelaez A (1998). Melatonin increases gene expression for antioxidant enzymes in rat brain cortex. *J. Pineal Res.* 24 (2): 83.
- Krauss GJ, Pissarek M, Blasing I (1997). HPLC of nucleic acid components with volatile mobile phases: Part 2. Separations on polymeric supports. *J. High Resolut. Chromatogr.* 20: 693.
- Kristof AS, Marks-Konczalik J, Moss J (2001). Mitogen activated protein kinases mediate activator protein-1-dependent human inducible nitric-oxide synthase promoter activation. *J. Biol. Chem.* 276: 8445.
- Kunagai Y, Kihushima M, Nakai Y, Shimojo N, Kunimoto, M (2004). Neuronal nitric oxide synthase (nNOS) catalyzes one-electron reduction of 2,4,6-trinitrotoluene, resulting in decreased nitric oxide production and increased nNOS gene expression: implications for oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 37: 350.
- Kuzcaya N, Weissmann N, Harrison D G, Dikalov S (2003). Interactions of peroxynitrite, tetrahydrobiopterin, ascorbic

- acid, and thiols. *J. Biol. Chem.* 278: 22546.
- Lacza Z, Snipes JA, Zhang J, Horváth EM, Figueroa JP, Szabó, C Busija DW (2003). Mitochondrial nitric oxide synthase is not eNOS, nNOS or iNOS. *Free Radic. Biol. Med.* 35: 1217.
- Lacza Z, Hornz TF, Snipes JA, Zhang J, Roychowdhury S, Horváth EM, Figueroa JP, Kollai M, Szabó, C Busija DW (2004). Lack of mitochondrial nitric oxide production in the mouse brain. *J. Neurochem.* 90: 942.
- Lanone S, Mebazaa A, Heymes C, Henin D, Poderoso JJ, Panis Y, Zedda C, Billiar T, Payen D, Aubier M, Boczkowski J (2000). Muscular contractile failure in septic rats. Role of the inducible nitric oxide synthase. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 162: 2308.
- Lawrence RA, Burk RF (1976). Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 71: 952.
- Lawrence RA, Burk RF (1978). Species, tissue and subcellular distribution of non Se-dependent glutathione peroxidase activity. *J. Nutr.* 108: 211.
- Layne E (1957). Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. *Methods in enzymol.* III: 447.
- León J, Macías M, Escames G, Camacho E, Khaldy H, Martín M, Espinosa A, Gallo MA, Acuña-Castroviejo D (2000). Structure-related inhibition of calmodulin-dependent neuronal nitric-oxide synthase activity by melatonin and synthetic kynurenines. *Mol. Pharmacol.* 58: 967.
- León J, Acuña-Castroviejo D, Sainz RM, Mayo JC, Tan D-X, Reiter RJ (2004). Melatonin and mitochondrial function. *Life Sci.* 75: 765.
- Leon J, Acuna-Castroviejo D, Escames G, Tan DX, Reiter RJ (2005). Melatonin mitigates mitochondrial malfunction. *J. Pineal Res.* 38 (1): 1.
- Lerner AB, Case JD, Takahashi Y, Lee TH, Mori W (1958). Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. *J. Am. Chem. Soc.* 80: 2587.
- Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, Opal SM, Vincent JL, Ramsay G (2003). 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit. care Med.* 287: 553.
- Lin AW, Chang CC, McCormick, CC (1996). Molecular cloning and expression of an avian macrophage nitric-oxide synthase cDNA and the analysis of the genomic 5'-flanking region. *J. Biol. Chem.* 271: 11911.
- Linares E, Nakao LS, Augusto O, Kaduska MB (2003). EPR studies of in vivo radical production by lipopolysaccharide: potential role of iron mobilized from iron-

- nitrosyl complexes. *Free Radic. Biol. Med.* 34: 766.
- Lowenstein CJ, Alley EW, Raval P, Snowman AM, Snyder SH, Russell SW, Murphy WJ (1993). Macrophage nitric oxide synthase gene- two upstream regions mediate induction by interferon- γ and lipopolysaccharide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90: 9730.
- Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951). Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265.
- Macias M, Escames G, Leon J, Coto A, Sbihi Y, Osuna A, Acuna-Castroviejo D (2003). Calreticulin-melatonin. An unexpected relationship. *Eur. J. Biochem.* 270 (5): 832.
- Maestroni GJM (1996). Melatonin as a therapeutic agent in experimental endotoxic shock. *J. Pineal Res.* 20: 284-289.
- Margilius L (1981). Symbiosis in cell evolution. *Freeman, San Francisco.*
- Marks-Konczalik J, Chu SC, Moss J (1998). Cytokine-mediated transcriptional induction of the human inducible nitric oxide synthase gene requires both activator protein 1 and nuclear factor-kB-binding sites. *J. Biol. Chem.* 273: 22201.
- Marshall KA, Reiter RJ, Poeggeler B, Aruoma OI, Halliwell B (1996). Evaluation of the antioxidant activity of melatonin in vitro. *Free Radic. Biol. Med.* 21: 307.
- Martín M, Macías M, Escames G, León J, Acuña-Castroviejo D (2000). Melatonin but not vitamins C and E maintains glutathione homeostasis in t-butyl hydroperoxide-induced mitochondrial oxidative stress. *FASEB J.* 14: 1677.
- Martín M, Macías M, Escames G, Reiter RJ, Agapito MT, Ortiz GG, Acuña-Castroviejo D (2000b). Melatonin-induced increased activity of the respiratory chain complexes I and IV can prevent mitochondrial damage induced by ruthenium red in vivo. *J. Pineal Res.* 28: 242.
- Martín M, Macías M, León J, Escames G, Khaldy H, Acuña-Castroviejo D (2002). Melatonin increases the activity of the oxidative phosphorylation enzymes and the production of ATP in rat brain in liver mitochondria. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 34: 348.
- Massion PB, Feron O, Dessy C, Balligand JJ (2003). Nitric oxide and cardiac function: ten years after, and continuing. *Circ. Res.* 93: 388.
- Mayo JC, Sainz RM, Antolin I, Herrera F, Martín V, Rodríguez C (2002). Melatonin regulation of antioxidant enzyme gene expression. *Cell Mol. Life Sci.* 59 (10): 1706-1713.
- McCord CP, Allen FB (1917), Evidences associating pineal gland function with alterations in pigmentation. *J. Exp. Zool.* 13: 207.
- Menéndez-Pelaez A, Reiter RJ (1993). Distribution of melatonin in

- mammalian tissues: the relative importance of nuclear versus cytosolic localization. *J. Pineal Res.* 15: 59.
- Mitchell P (1961). Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism. *Nature* 191: 144.
- Mitchell P (1966). Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. *Biol. Rev.* 71: 445-502.
- Nicholls DG, Budd SL (2000). Mitochondria and neuronal survival. *Physiol. Rev.* 80: 315.
- Nin N, Cassina A, Boggia J, Alfonso E, Botti H, Peluffo G, Trostchansky A, Batthány C, Radi R, Rubbo H, Hurtado FJ (2004). Septic diaphragmatic dysfunction is prevented by Mn(III)porphyrin therapy and inducible nitric oxide synthase inhibition. *Intensive Care Med.* In press.
- Nisoli E, Clementi E, Moncada S, Carruba MO (2004). Mitochondrial biogenesis as a cellular signalling framework. *Biochem. Pharmacol.* 67: 1-15.
- Overhaus, M, Togel S, Pezzone MA, Bauer AJ (2004). Mechanisms of polymicrobial sepsis-induced ileus. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 287: G685.
- Pablos MI, Reiter RJ, Ortiz GG, Guerrero JM, Agapito MT, Chuang JI, Sewerynek E (1998). Rhythms of glutathione peroxidase and glutathione reductase in brain of chick and their inhibition by light. *Neurochem. Int. Lett.* 18: 49.
- Palencia E (2004). Curso sepsis grave. *Revista electrónica de medicina intensiva* 4: 1.
- Pearce LL, Epperly MW, Greenberger JS, Pitt BR (2001). Identification of respiratory complexes I and III as mitochondrial sites of damage following exposure to ionizing radiation and nitric oxide. *Nitric Oxide* 5: 128.
- Perera PY, Mayadas TN, Takcuchi O, Akira S, Zaks-Ziberman M, Goyert SM, Vogel, SN (2001). CD11b/CD18 acts in concert with CD14 and Toll-like receptor (TLR) 4 to elicit full lipopolysaccharide and taxol-inducible gene expression. *J. Immunol.* 166: 574.
- Pergiacomi VA, Palacios A, Catalá A (2001). Comparative studies on lipid peroxidation of microsomas and mitochondria obtained from different rat tissues: effect of retinyl palmitate. *Prostaglandins, Leukot. Essent. Fatty Acids* 64: 75.
- Piantadosi CA, Tatro LG, Whorton AR (2002). Nitric oxide and differential effects of ATP on mitochondrial permeability transition. *Nitric Oxide* 6: 45-60.
- Pierrefiche G, Laborit H (1995). Oxygen radicals, melatonin and aging. *Exp. Gerontol.* 30: 213.
- Pissarek M, Reinhardt R, Reichelt C, Manaenko A, Krauss GJ, Illes P (1999). Rapid assay for one-run determination of purine and pyrimidine nucleotide contents

- in neocortical slices and cell cultures. *Brain Res. Protoc.* 4: 314.
- Poderoso JJ, Carreras MC, Lisdero C, Riobó N, Schöper F, Bóveris A (1996). Nitric oxide inhibits electron transfer and increases superoxide radical production in rat heart mitochondria and submitochondrial particles. *Arch. Biochem. Biophys.* 308: 89.
- Poderoso JJ, Peralta JG, Lisdero CL, Carreras MC, Radisic M, Schöper F, Cadenas E, Bóveris A (1998). Nitric oxide regulates oxygen uptake and hydrogen peroxide release by isolated beating rat heart. *Am. J. Physiol.* 274: C112.
- Poderoso JJ, Lisdero C, Schöper F, Riobó N, Carreras MC, Cadenas E, Bóveris A (1999). The regulation of mitochondrial oxygen uptake by redox reactions involving nitric oxide and ubiquinol. *J. Biol. Chem.* 274: 37709.
- Proctor PH (1989) Free radicals and human disease. *CRC handbook of free radicals and antioxidant* 1: 209.
- Pozo D, Reiter RJ, Calvo JR, Guerrero JM (1994). Physiological concentrations of melatonin inhibit nitric oxide synthase in rat cerebellum. *Life Sci.* 55: PL455.
- Quay WB (1964). Circadian and estrous rhythms in pineal melatonin and 5-hydroxy indole-3-acetic acid. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 115: 710.
- Reiter RJ (1991). Pineal melatonin: the chemical expression of darkness. *Mol. Cell. Endocrinol.* 79: C153.
- Reiter RJ (1998). Oxidative damage in the central nervous system: protection by melatonin. *Progress in Neurobiology* 56: 359.
- Reiter RJ, Tan DX, Mayo JC, Sainz RM, León J, Czarnecki Z (2003). Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanism and pathophysiological implications in humans. *Acta Biochim. Pol.* 50: 1129.
- Remick DG, Newcomb DE, Bolgos GL, Call DR (2000). Comparison of the mortality and inflammatory response of two models of sepsis: lipopolysaccharide vs. cecal ligation and puncture. *Shock* 13: 110.
- Riedemann NC, Guo RF, Ward PA (2003). The enigma of sepsis. *J. Clin. Invest.* 112: 460.
- Riobo NA, Melani M, Sanjuan N., Fiszman ML, Gravielle MC, Carreras MC, Cadenas E, Poderoso JJ (2002). The modulation of mitochondrial nitric-oxide synthase activity in rat brain development. *J. Biol. Chem.* 277: 42447.
- Saraste M (1999). Oxidative phosphorylation at the fin de siècle. *Science* 283: 1488.
- Shapira AHV (1998). Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative disorders. *Biochim. Biophys. Acta* 1366: 225.

- Scheffler IE (2001). A century of mitochondrial research: achievements and perspectives. *Mitochondrion* 1: 3.
- Schulte U, Fecke W, Krüll C (1994). In vivo dissection of the mitochondrial NADH ubiquinone oxidoreductase (complex I). *Biochim. Biophys. Acta* 1187: 121.
- Shindoh C, DiMarco A, Nethery D, Supinski G (1992). Effect of PEG-superoxide dismutase on the diaphragmatic response to endotoxin. *Am. Rev. Respir. Dis.* 145: 1350.
- Shiva S, Brookes PS, Patel RP, Anderson PG, Darley-Usmar VM (2001). Nitric oxide partitioning into mitochondrial membranes and the control of respiration at cytochrome c oxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98: 7212.
- Skulachev VP (1999). Mitochondrial physiology and pathology; concepts of programmed death of organelles, cells and organisms. *Mol. Aspects Med.* 20: 139.
- Suden D (1979). Circadian changes in rat pineal tryptophan content: lack correlation with serum tryptophan. *J. Neurochem.* 33: 811.
- Supinski G, Nethery D, DiMarco A (1993). Effect of free radical scavengers on endotoxin-induced respiratory muscle dysfunction. *Am. Rev. Respir. Dis.* 148: 1318.
- Szabó C (2003). Multiple pathways of peroxynitrite cytotoxicity. *Toxicol. Lett.* 140-141: 105.
- Szmuskowicz AW, Heinzelman RV (1960). Synthesis of N-acetylmethoxytryptamine. *J. Org. Chem.* 25: 287.
- Takeuchi O, Akira S (2001). Toll-like receptors; their physiological role and signal transduction system. *Int. Immunopharmacol.* 1: 625.
- Tan DX, Chen LD, Poeggeler B, Manchester LC, Reiter RJ (1993). Melatonin: a potent, endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocrine J.* 1: 57.
- Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, Plummer BF, Hardies LJ, Weintraub ST, Vijayalaxmi, Shepard AM (1998). A novel melatonin metabolite, cyclic 3-hydroxymelatonin: a biomarker of in vivo hydroxyl radical generation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 253: 614.
- Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, Plummer BL, Limson J, Weintraub ST, Qi W (2000). Melatonin directly scavenges hydrogen peroxide: a potentially new metabolic pathway of melatonin biotransformation. *Free Radic. Biol. Med.* 29: 1177.
- Tan DX, Reiter RJ, Manchester LC, Yan MT, El-Sawi M, Sainz RM, Mayo JC, Kohen R, Allegra M, Hardeland R (2002). Chemical and physical properties and potential mechanism: melatonin as a broad-spectrum antioxidant and free radical scavenger. *Curr. Topics Med. Chem.* 2: 181.

- Tatoyan A, Giulivi C (1998). Purification and characterization of a nitric oxide synthase from rat liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* 273: 11044.
- Tausski HH, Shorr E (1951). A microcolorimetric method for the determination of inorganic phosphorous. *J. Biol. Chem.* 2: 675.
- Tay YM, Lim KS, Sheu FS, Jenner A, Whiteman M, Wong KP, Halliwell B (2004). Do mitochondria make nitric oxide? no? *Free Radic. Res.* 38: 591.
- Taylor DE, Ghio AJ, Piantadosi CA (1995). Reactive oxygen species produced by liver mitochondria of rats in sepsis. *Arch. Biochem Biophys.* 316: 70.
- Taylor DE, Kantrow SP, Piantadosi CA (1995). Mitochondrial respiration after sepsis and prolonged hypoxia. *Am. J. Physiol.* 275: L139.
- Titheradge MA (1999). Nitric oxide in septic shock. *Biochem. Biophys. Acta* 1411: 437.
- Traaseth N, Elfering S, Solien J, Haynes V, Giulivi C (2004). Role of calcium signaling in the activation of mitochondrial nitric oxide synthase and citric acid cycle. *Biochim. Biophys. Acta* 1658: 64.
- Triantafilou K, Triantafilou M, Dedrick RL (2001). A CD14-independent LPS receptor cluster. *Nat. immunol.* 2: 338.
- Triantafilou K, Triantafilou M (2002). Lipopolysaccharide recognition: CD14, TLRs and the LPS-activation cluster. *Trends. Immunol.* 23: 301.
- Trounce IA, Kim IL, Jun AS, Wallace DC (1996). Assessment of mitochondrial oxidative phosphorylation in patient muscle biopsies, lymphoblast, and transmittochondrial cell lines. *Meth. Enzymol.* 264: 484.
- Trumppower BL (1990). The proton motive Q cycle. Energy transduction by coupling of proton translocation to electron transfer by the cytochrome bc1 complex. *J. Biol. Chem.* 265: 11409-11412.
- Tsukihara T, Aoyama H, Yamashita E, Ohta S, Kagawa Y (1995). Structures of metal sites of oxidized bovine heart cytochrome c oxidase at 2.8 Å. *Science* 269: 1069.
- Turrens JF (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J. Physiol.* 552.2: 335.
- Urata Y, Honma S, Goto S, Todoroki S, Ueda T, Cho S, Honma K, Kondo T (1999). Melatonin induces gamma-glutamylcysteine synthase mediated by activator protein-1 in human vascular endothelial cells. *Free Radic. Biol Med.* 27: 838.
- Vanecek J (1988). Melatonin binding sites. *J. Neurochem.* 51: 1436.
- Vicent, J-L, Zhang H, Szabo H, Preiser J-C (2000). Effects of nitric oxide in septic shock. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 161: 1781.

- Vyatkina G, Bhatia V, Gerstner A, Papaconstantinou J, Garg N (2004). Impaired mitochondrial respiratory chain and bioenergetics during chagasic cardiomyopathy development. *Biochim. Biophys. Acta* 1689: 162.
- Walker, JE (1995). Determination of the structures of respiratory chain enzyme complexes from mammalian mitochondria. *Biochim. Biophys Acta* 1271: 221.
- Wang T, Ward M, Grabowski P, Secombes CJ (2001). Molecular cloning, gene organization and expression of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene. *Biochem. J.* 358: 747.
- Weicker D, Akhras KS, Edelsberg J, Angus, DC, Ester G (2003). Long-term mortality and medical care charges in patients with severe sepsis. *Crit. Care Med.* 31: 2316.
- Wichmann MW, Haisken JM, Ayala A, Chaudry IH (1996). Melatonin administration following hemorrhagic shock decreases mortality from subsequent septic challenge. *J. Surg. Res.* 65: 109.
- Wood PM (1987). The two redox potentials for oxygen reduction to superoxide. *Trends Biochem. Sci* 12: 250.
- Wu CC, Chiao CW, Hsiao G, Chen A, Yen MH (2001). Melatonin prevents endotoxin-induced circulatory failure in rats. *J. Pineal Res.* 30: 147.
- Xie QW, Whisnant R, Nathan C (1993). Promoter of the mouse gene encoding calcium independent nitric oxide synthase confers inducibility by interferon γ and bacterial lipopolysaccharide. *J. Exp. Med.* 177: 1779.
- Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Hoshino K, Kaisho T, Sanjo H, Takeuchi O, Sujiyama M, Okabe M, Takeda K, Akira S (2003). Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent Toll-like receptor signalling pathway. *Science* 301: 640.
- Zanella B; Giordano E; Muscari C; Zini M; Guarnieri C (2004). Nitric oxide synthase activity in rat cardiac mitochondria. *Basis Res. Cardiol.* 99: 159.
- Zang LY, Cosma G, Gardner H, Vallynathan V (1998). Scavenging of reactive oxygen species by melatonin. *Biochim. Biophys. Acta* 1425: 467.
- Zhang H, Chen X, Teng X, Snead C, Catravas JC (1998). Molecular cloning and analysis of the rat inducible nitric oxide synthase gene promoter in aortic smooth muscle cells. *Biochem. Pharmacol.* 55: 1873.