

**Fisiopatología mitocondrial en la sepsis experimental:  
Papel de la óxido nítrico sintasa mitocondrial  
constitutiva y la melatonina**



**Grupo de Investigación: CTS – 101:  
Comunicación Intercelular  
Instituto de Biotecnología  
Centro de Investigación Biomédica  
Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud  
Departamento de Fisiología  
Facultad de Medicina**



**Francisco José Ortiz García**

**2012**



Editor: Editorial de la Universidad de Granada  
Autor: Francisco José Ortiz García  
D.L.: GR 1206-2013  
ISBN: 978-84-9028-526-8



D. DARÍO ACUÑA CASTROVIEJO, Catedrático de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada.

CERTIFICA QUE D. Francisco José Ortiz García, Licenciada en Química, ha realizado bajo su dirección y en el instituto de Biotecnología de la Universidad de Granda, el trabajo titulado: “**Fisiopatología mitocondrial en la sepsis experimental: Papel de la óxido nítrico sintasa mitocondrial constitutiva y la melatonina**” reuniendo el mismo las condiciones necesarias para optar al grado de Doctor.

Granada, 3 de Mayo de 2012

Vº Bº Director

El interesado

Darío Acuña Castroviejo

Francisco José Ortiz García



D. GERMAINE ESCAMES ROSA, Profesora Titular de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada.

CERTIFICA QUE D. Francisco José Ortiz García, Licenciada en Química, ha realizado bajo su dirección y en el instituto de Biotecnología de la Universidad de Granda, el trabajo titulado: “**Fisiopatología mitocondrial en la sepsis experimental: Papel de la óxido nítrico sintasa mitocondrial constitutiva y la melatonina**” reuniendo el mismo las condiciones necesarias para optar al grado de Doctor.

Granada, 3 de Mayo de 2012

Vº Bº Director

El interesado

Germaine Escames Rosa

Francisco José Ortiz García



# Financiación y Proyectos





## **Becas y proyectos de investigación que han financiado este estudio:**

### **A. Becas predoctorales:**

- Beca con cargo al proyecto PI030817: Caracterización de la óxido nítrico sintasa mitocondrial y su regulación por la melatonina en la sepsis.

Duración: 2006 – 2007.

- Ayuda predoctoral de la Fundación Investigación Biosanitaria Andalucía Oriental (FIBAO).

Duración: 2007 – 2009.

### **B. Proyectos de Investigación:**

- **Título del Proyecto:** Bases moleculares y celulares del estrés oxidativo en el envejecimiento. Red Fis G03/137

**Entidad Financiadora:** ISCIII

**Entidades Participantes:**

**Referencia del Proyecto:** PI05-0107

**Duración, Desde:** 1-1-2006                      **Hasta:** 31-12-2006

**Investigador Principal:** Acuña-Castroviejo D

- **Título del Proyecto:** Mecanismo de acción de la melatonina  
**Entidad Financiadora:** PAI (Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa, Junta de Andalucía)

**Entidades Participantes:**

**Referencia del Proyecto:** CTS101-2007

**Duración, Desde:** 2007                      **Hasta:** 2010

**Investigador Principal:** Acuña-Castroviejo D

- **Título del Proyecto:** Bases moleculares de la inhibición de la óxido nítrico sintasa inducible durante la sepsis por la melatonina y análogos sintéticos: Efecto de la edad.

**Entidad Financiadora:** PAI (Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa, Junta de Andalucía)

**Entidades Participantes:** ISCIII

**Referencia del Proyecto:** P07-CTS-03135 (Proyecto de Excelencia)

**Duración, Desde:** 1-2-2008                      **Hasta:** 31-1-2012

**Investigador Principal:** Acuña-Castroviejo D

- **Título del Proyecto:** Regulación de la vía inflamatoria nuclear-mitocondrial por la melatonina y su modificación durante el envejecimiento: Evaluación experimental y clínica.

**Entidad Financiadora:** ISCIII

**Entidades Participantes:** Universidad de Granada

**Referencia del Proyecto:** PI08-1664

**Duración, Desde:** 1-1-2009                      **Hasta:** 31-12-2011

**Investigador Principal:** Acuña-Castroviejo D

**Publicaciones y Comunicaciones**



## **Publicaciones científicas relacionadas con esta tesis**

**Mitochondrial DNA and inflammatory diseases.** G. Escames, L. C. López, J. A. García, L. García-Corzo, F. Ortiz, D. Acuña-Castroviejo. Hum Genet 2012; 131(2): 161-173.

**Attenuation of cardiac mitochondrial dysfunction by melatonin in septic mice.** G. Escames, L. C. López, F. Ortiz, A. López, J. A. García, E. Ros, D. Acuña-Castroviejo. FEBS J 2007; 274(8): 2135-2147.

Acuña-Castroviejo. J Pineal Res 2007; 42(3): 272-279.

**Age-dependent lipopolysaccharide-induced iNOS expression and multiorgan failure in rats: effects of melatonin treatment.** G. Escames, L. C. López, F. Ortiz, E. Ros, D. Acuña-Castroviejo. Exp Gerontol 2006; 41(11): 1165-1173.

**Melatonin restores the mitochondrial production of ATP in septic mice.** L. C. López, G. Escames, F. Ortiz, E. Ros, D. Acuña-Castroviejo. Neuro Endocrinol Lett 2006; 27(5): 623-630.



## **Comunicaciones en congresos relacionadas con esta tesis:**

**Efecto de la edad y el tratamiento con melatonina sobre la expresión de la iNOS y estrés oxidativo en la sepsis experimental.** F. Ortiz, G. Escames, J.A. García, A. López, M.I. Rodríguez, D. Acuña-Castroviejo. 2ª Reunión nacional de la Sociedad Española de Medicina Geriátrica (SEMEG) 2006.

**La isoforma constitutiva de la óxido nítrico sintasa no participa en el fallo mitocondrial durante la sepsis experimental.** F. Ortiz. Endocrine and Neural Systems in Aging 2008.

**Constitutive isoform of mitochondrial nitric oxide synthase is not involved in the mitochondrial failure during sepsis.** F. Ortiz, C. Venegas, J.A. García, J.C. Dayoub, A. Fernández, D. Acuña-Castroviejo, G. Escames. XXXV Congreso de la Sociedad Española de Ciencias Fisiológicas (SECF) P172 2009 (Abstract)

**Constitutive mitochondrial nitric oxide synthase and mitochondrial bioenergetics during sepsis. Role of melatonin.** J.A. García, F. Ortiz, C. Venegas, A. López, A. Puertas, D. Acuña-Castroviejo, G. Escames. XXXV Congreso de la Sociedad Española de Ciencias Fisiológicas (SECF) P171 2009 (Abstract)





# Agradecimientos



Tras acometer otra nueva etapa en mi vida, toca un momento de reflexión y echar la vista hacia atrás para comprender mejor las condiciones que han permitido que yo pueda disfrutar de encontrarme hoy aquí: Y en primer lugar no puedo más que acordarme de mi familia, sin los cuales y sin el grandísimo esfuerzo y desgaste empleado yo nunca hubiese podido sentir y disfrutar de las sensaciones que hoy siento y el estado que hoy poseo, no creo que existan, al menos en nuestro lenguaje, palabras con las que se puedan describir la admiración y gratitud que siento hacia ellos.

No puedo olvidarme de ti, primero como mi mejor amiga y más tarde como mi mejor compañera de viaje, gracias Ana por hacerme ver la vida de otro color.

Debo acordarme también de Mari Carmen Sierra, sin la cual nunca habría podido conocer al grupo que ha permitido poder estar hoy en situación de escribir estas líneas.

Gracias al Dr. Darío Acuña y la Dra. Germaine Escames por haberme abierto las puertas de su laboratorio y brindado la oportunidad de realizar mi tesis doctoral bajo su dirección. Ha sido todo un orgullo.

Por último tengo que acordarme de mis compañeros, los que estuvieron y los que siguen, gracias por hacer que tantas horas empleadas además de haber merecido la pena también hayan podido ser amenas.

Gracias a todos.



## Abreviaturas



**4-HDA:** 4-hidroxi-alquenal.

**ADP:** Adenosín difosfato.

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

**AMK:** N1-acetil-5-metoxikinuramina.

**aMT:** melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina).

**ANOVA:** Análisis de varianza.

**AP-1:** Proteína activadora 1.

**ATP:** Adenosín trifosfato.

**BH<sub>4</sub>:** Tetrahidrobiopterina.

**BSA:** Albumina.

**Ca-CaM:** Calcio-calmodulina.

**CaM:** Calmodulina.

**cAMP:** Adenosín 3'-5'-monofosfato cíclico.

**CAT:** Catalasa.

**CD14:**

**CLP:** Ligadura y punción cecal.

**c-mtNOS:** Óxido nítrico sintasa mitocondrial constitutiva.

**CRE:** Elemento de respuesta a cAMP.

**DNA:** Ácido desoxirribonucleico.

**eNOS:** Óxido nítrico sintasa endotelial.

**ETC:** Cadena de transporte electrónico.

**FAD:** Flavina adenina dinucleótido (oxidada).

**FADH<sub>2</sub>:** Flavina adenina dinucleótido (reducida).

**FMN:** Flavin mononucleótido.

**G6PD:** Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.

**GPx:** Glutation peroxidasa.

**GRd:** Glutation reductasa.

**GSH:** Glutation reducido.

**GSSG:** Glutation oxidado.

**ICAM-1:** Molécula de adhesión intercelular 1.

**IFN:** Interferón.

**IFN $\beta$ :** Interferon beta.

**IFN- $\gamma$ :** Interferón gamma.

**IKK:** Inhibitor of  $\kappa$ B kinase complex.

**IL-10:** Interleuquina 10.

**IL-1 $\beta$ :** Interleuquina 1-beta.

**IL-6:** Interleuquina 6.

**i-mtNOS:** Óxido nítrico sintasa mitocondrial inducible.

**iNOS:** Óxido nítrico sintasa inducible.

**IUPAC:** International Union of Pure and Applied Chemistry.

**I $\kappa$ B:** inhibidor de  $\kappa$ B.

**JAKs:** Janus quinasas.

**LBP:** Proteína de unión a lipopolisacárido.

**LOO $\bullet$ :** Radicales peróxido.

**LPO:** Peroxidación lipídica.

**LPS:** Lipopolisacarido.

**Mal:** (MyD88-adaptor-like protein

**MAPK:** Proteína quinasa activada por mitógeno.



**MD-2:** Proteína mielóide de diferenciación 2.

**MDA:** malonildialdehído.

**MDP:** Muramil dipéptido.

**Mn-SOD:** Manganeseo-superóxido dismutasa.

**MODS:** Síndrome de disfunción multiorgánica.

**mRNA:** Ácido ribonucleico mensajero.

**mtDNA:** Ácido desoxirribonucleico mitocondrial.

**mtNOS:** Óxido nítrico sintasa mitocondrial.

**MyD88:** Factor mielóide de diferenciación 88.

**NADH:** Nicotinamida adenín dinucleótido reducido.

**NADPH:** Nicotinamida adenín dinucleótido fosfato reducido.

**NF- $\kappa$ B:** Factor de transcripción kappa B.

**nNOS:** Óxido nítrico sintasa neuronal.

**nNOS<sup>-/-</sup>:** Ratones deficientes en nNOS.

**nNOS<sup>+/+</sup>:** Ratones controles.

**NO $\cdot$ :** Óxido nítrico.

**NOS:** Óxido nítrico sintasa.

**ONOO $\cdot$ :** Peroxinitritos.

**PAF:** Factor de activación plaquetaria.

**PAMPs:** Patrones moleculares asociados a patógenos.

**RNS:** Especies reactivas de nitrógeno.

**ROS:** Especies reactivas de oxígeno.

**SDH:** Succinato deshidrogenasa.

**QH:** Semiubiquinona.

**SER:** Elemento de respuesta al serum.

**SIRS:** Síndrome de respuesta inmune sistémica.

**SOD:** Superóxido dismutasa.

**STAT1:** Señal de transducción y activador de transcripción 1.

**TGF- $\beta$ :** Factor de crecimiento transformante beta.

**TIM:** Translocador de membrana interna.

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

**TIRAP:** TIR domain containing adapter protein.

**TLR:** Receptor similares a receptores "Toll".

**TNF $\alpha$ :** factor de necrosis tumoral alfa.

**TOM:** Translocador de membrana externa.

**TRAF6:** Factor 6 activado por TNF.

**TRIF/TICAM-1:** TIR domain-containing adaptor inducing IFN- $\beta$ /TIR domain-containing adaptor molecule-1.

# Índice



<b>Introducción.....</b>	<b>1</b>
<b>1.Función mitocondrial.....</b>	<b>3</b>
1.1. Estructura y función de la mitocondria.....	3
1.2. ETC y fosforilación oxidativa.....	4
1.3. Óxido nítrico sintasa: Estructura y función.....	12
1.4. Producción de radicales libres y efectos en la función mitocondrial.....	17
<b>2.Sepsis.....</b>	<b>21</b>
2.1. Definición e importancia sanitaria de la sepsis.....	21
2.2. Mecanismo de la respuesta inflamatoria frente a la infección.....	24
2.2.1. Reconocimiento de PAMPs microbianos.....	24
2.2.2. Respuesta inmune y señales de amplificación.....	26
2.2.2.1. Vías dependientes de MyD88.....	26
2.2.2.2. Vías independientes de MyD88.....	30
2.2.2.3. Otras vías implicadas.....	32
2.3. NOS, NO <sup>•</sup> y disfunción mitocondrial en la sepsis.....	33
<b>3.Melatonina.....</b>	<b>35</b>
3.1. Mecanismos de acción de la melatonina.....	36
3.1.1. Antioxidante de acción directa.....	37
3.1.2. Antioxidante de acción indirecta.....	39

3.1.3. Función sobre la NOS. ....	40
3.1.4. Acciones sobre la fisiología mitocondrial. ....	41
3.2. Papel terapéutico de la melatonina en la sepsis. ....	42
<b>Hipótesis y Objetivos .....</b>	<b>45</b>
<b>1.Hipótesis. ....</b>	<b>47</b>
<b>2.Objetivos.....</b>	<b>48</b>
<b>Materiales y métodos .....</b>	<b>49</b>
<b>1.Animales, procedimiento quirúrgico y tratamiento. ....</b>	<b>51</b>
1.1. Animales y grupos experimentales. ....	51
1.2. Procedimiento quirúrgico y tratamiento. ....	51
<b>2.Obtención de la fracción mitocondrial.....</b>	<b>52</b>
2.1. Aislamiento de la fracción mitocondrial por centrifugación diferencial. ....	53
2.2. Aislamiento de la fracción mitocondrial por centrifugación diferencial y gradiente de densidad con Percoll.....	53
<b>3 Metodología analítica.....</b>	<b>54</b>

3.1. Determinación de la actividad de la óxido nítrico sintasa mitocondrial (mtNOS).....	54
3.2. Determinación de nNOS e iNOS por western blot.....	57
3.3. Determinación de los niveles intramitocondriales de nitritos.....	58
3.4. Determinación de la peroxidación lipídica intramitocondrial.....	59
3.5. Determinación de proteínas nitrosiladas por western blot.....	60
3.6. Determinación de proteínas carboniladas en mitocondria y citosol.....	61
3.7. Determinación de la actividad de la glutatión peroxidasa (GPx) mitocondrial.....	63
3.8. Determinación de la actividad de la glutatión reductasa (GRd) mitocondrial.....	65
3.9. Medida de los niveles intramitocondriales de glutatión oxidado (GSSG) y glutatión reducido (GSH).....	66
3.10. Medida de la actividad de los complejos de la ETC.....	67
3.10.1.Determinación de la actividad específica de la NADH ubiquinona oxidorreductasa (complejo I).....	68
3.10.2.Determinación de la actividad específica de la succinato: dicloroindofenol oxidorreductasa (complejo II).....	68
3.10.3.Determinación de la actividad específica de la ubiquinol: citocromo c oxidorreductasa (complejo III).....	69
3.10.4.Determinación de la actividad específica de la citocromo c oxidasa (complejo IV).....	69
3.11. Determinación de la concentración de proteínas: Método de Lowry.....	70

<b>4.Análisis estadístico.....</b>	<b>71</b>
------------------------------------	-----------

<b>Resultados.....</b>	<b>73</b>
------------------------	-----------

<b>1.Cambios en la actividad y expresión de las isoformas de la NOS durante la sepsis experimental en ratones nNOS<sup>+/+</sup> y nNOS<sup>-/-</sup> .....</b>	<b>75</b>
---	-----------

1.2. Efecto de deficiencia de nNOS en la actividad de la NOS citosólica.....	76
1.3. Efecto de deficiencia de nNOS en la expresión de la NOS citosólica y mitocondrial mediante western blot.....	78
1.4. Efecto de deficiencia de nNOS en los niveles de nitritos en mitocondrias. ....	80
1.5. Efecto de deficiencia de nNOS en los niveles citosólicos y mitocondriales de peroxinitritos.....	81

<b>2. Estado redox mitocondrial durante la sepsis experimental en ratones nNOS<sup>+/+</sup> y nNOS<sup>-/-</sup> .....</b>	<b>83</b>
---	-----------

2.1. Efecto de deficiencia de nNOS en los niveles de proteínas oxidadas por carbonilación.....	83
2.2. Efecto de deficiencia de nNOS en los niveles de peroxidación lipídica.....	85
2.3. Efecto de deficiencia de nNOS en la regulación de la actividad de glutathion peroxidasa y glutathion reductasa.....	86
2.4. Efecto de deficiencia de nNOS en la regulación de los niveles de glutathion reducido y glutathion oxidado. ....	89

<b>3. Cambios en la bioenergética mitocondrial durante la sepsis experimental en ratones nNOS<sup>+/+</sup> y nNOS<sup>-/-</sup>.....</b>	<b>91</b>
3.1. Efecto de deficiencia de nNOS en la regulación de la actividad de los complejos de la cadena de transporte electrónico.....	91
<b>Discusión .....</b>	<b>93</b>
<b>Conclusiones .....</b>	<b>105</b>
<b>Bibliografía .....</b>	<b>109</b>
<b>Apéndice I.....</b>	<b>125</b>





# Introducción



## **1. Función mitocondrial.**

### **1.1. Estructura y función de la mitocondria.**

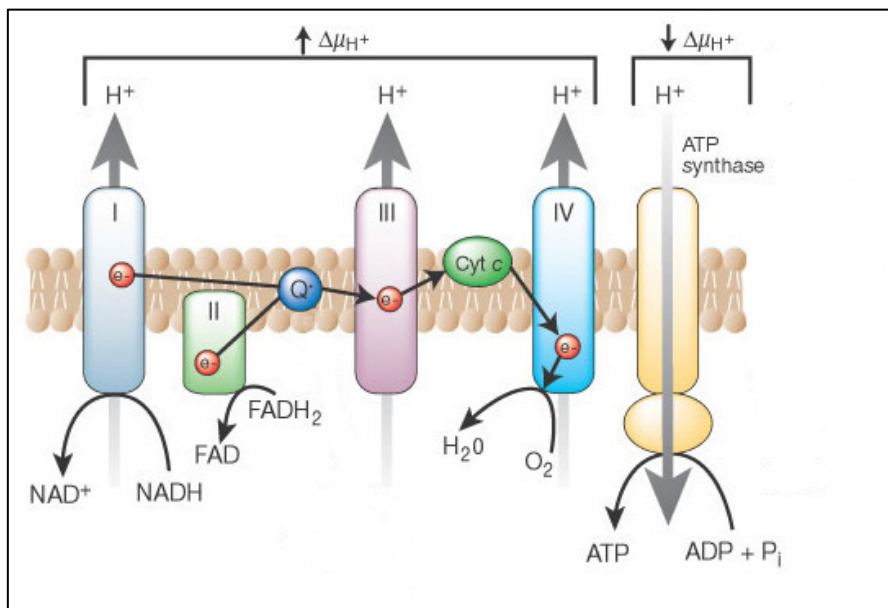
Las mitocondrias existen en una gran cantidad de formas y tamaños, generalmente con unas medidas de entre 1-2  $\mu\text{m}$  de longitud y de entre 0,25-0,5  $\mu\text{m}$  de diámetro. Son orgánulos morfológicamente muy dinámicos y estrechamente vinculados a muchos procesos celulares, incluyendo el desarrollo y la muerte celular. Estas variaciones reflejan las diversas funciones que posee la mitocondria dentro de la célula, que incluyen no sólo la generación de energía, el control del metabolismo, y la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$ , sino también el control de muchas funciones celulares como la respuesta inmune innata y el destino de la propia célula (West y cols., 2011; Tait y Green, 2012). En la mayoría de las células de mamíferos, las mitocondrias existen como una red reticular ramificada que se irradia desde el núcleo, aunque el carácter dinámico de su morfología se refleja en diferencias en el número, tamaño y posición dentro de las diferentes líneas celulares, tejidos y organismos (Frazier y cols., 2006). Además, alteraciones en el medio van a ocasionar cambios en la morfología de las mitocondrias, produciéndose fenómenos de fusión y fisión mitocondriales (Karbowski y Youle, 2003; Nisoli y cols., 2004; Frazier y cols., 2006) y migración de estas mitocondrias para atender a las distintas necesidades energéticas celulares allí donde sean requeridas (Frazier y cols., 2006).

La mitocondria está limitada por dos bicapas lipídicas; la membrana externa presenta características similares al resto de membrana celulares, siendo rica en colesterol y en estructuras proteicas llamadas porinas que permiten el paso de moléculas e iones de tamaño inferior a 10 kD a. Asimismo, posee otros complejos proteicos encargados de la importación de proteínas citosólicas denominados TOM (*translocase of the outer membrane*). Por otro lado, la membrana interna presenta una organización

en base a crestas laminares que van a incrementar mucho su superficie total. La membrana interna es impermeable a iones y rica en cardiolipinas, que van permitir la unión a las proteínas de la cadena de transporte electrónico (ETC). Igualmente presenta complejos proteicos para la importación de proteínas que, en este caso, se denominan TIM (*translocase of the inner membrane*). El espacio que se delimita entre ambas membranas, denominado espacio intermembranal, tiene un papel clave en los procesos de fosforilación oxidativa, mientras que el espacio que se delimita dentro de la membrana interna (matriz mitocondrial) contiene ribosomas para la síntesis de proteínas, de su propio genoma (mtDNA), enzimas para la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos y para el ciclo de Krebs.

### 1.2. ETC y fosforilación oxidativa.

La ETC está compuesta por cinco complejos enzimáticos y dos moléculas que van a actuar como puente electrónico entre algunos de estos complejos (coenzima Q o ubiquinona y citocromo c) (Saraste, 1999).



**Figura 1:** Esquema de la cadena de transporte electrónico.

**-Complejo I** (*NADH ubiquinona oxidorreductasa*): es el complejo más grande de la ETC, el monómero del complejo I tiene un tamaño aproximado de 900 kDa. Cataliza la transferencia de electrones desde el NADH a la ubiquinona y está ligado a la translocación de protones al espacio intermembranal (Friedrich y cols., 1995). La enzima en mamíferos contiene 42 o 43 subunidades diferentes (25 polipéptidos, de los cuales 7 están codificados por el mtDNA) en una estequiometría desconocida, un flavin mononucleótido, siete u ocho centros de FeS unidos covalentemente a lípidos y al menos tres moléculas de quinol (Walker, 1995; Saraste, 1999). La microscopía electrónica de partículas ha revelado que el complejo I se dispone en una estructura en L con dos dominios grandes separados por un fino collar. 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., 1997; Saraste, 1999). El brazo periférico, que incluye un mononucleótido de flavina y al menos 4 centros FeS, forma la fracción NADH deshidrogenasa. El brazo unido a la membrana contiene las siete subunidades codificadas por el mtDNA, uno o dos centros FeS, y constituye la fracción ubiquinona oxidorreductasa (Hofhaus y cols., 1991; Schulte y cols., 1994).

Un déficit o bloqueo a nivel del complejo I (con rotenona, por ejemplo) impide la oxidación del NADH, mientras que la oxidación del FADH<sub>2</sub> generado en la reacción de la succinato deshidrogenasa, no se ve afectada porque está mediado por el complejo II.

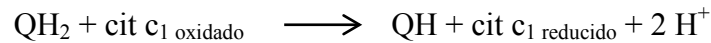
**-Complejo II** (*succinato ubiquinona oxidorreductasa*): es un componente del ciclo de Krebs y participa en la ETC transfiriendo electrones desde el succinato a la ubiquinona. No transloca protones al espacio intermembrana y, por tanto, tan solo suministra electrones a la ETC (Hagerhall, 1997; Saraste, 1999). Contiene cuatro polipéptidos y es el único que no posee subunidades codificadas por el mtDNA.

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 FeS (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 (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<sub>2</sub> dependiente, como el succinato, y una oxidación normal de los que dependen del NADH, como malato, glutamato o aspartato.

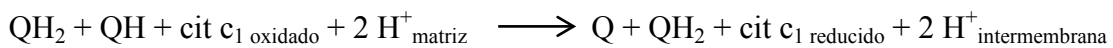
**-Complejo III (*Ubiquinol citocromo c oxidorreductasa*):** Transfiere electrones desde el ubiquinol hasta el citocromo c, esta reacción de oxidación-reducción va a permitir al complejo III generar de un gradiente de protones a través de la membrana interna por un mecanismo conocido como ciclo Q (Trumpower, 1990) (Figura 2). De esta manera, el ubiquinol, un compuesto liposoluble que puede moverse dentro de la membrana, acopla la reacción de oxidación-reducción a la protonación y desprotonación, de tal manera que la oxidación del ubiquinol conduce al transporte activo de protones a través de la membrana interna (Saraste, 1999). Estas dos reacciones, van a requerir por tanto dos sitios activos, uno para la oxidación del ubiquinol y liberación de protones en la superficie externa de la membrana interna (Q<sub>0</sub>), 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<sub>1</sub>). Este mecanismo requiere que los electrones sean transferidos desde el sitio Q<sub>0</sub> al sitio Q<sub>1</sub> (Saraste, 1999) (Figura 2).

En el primer ciclo, el ubiquinol (QH<sub>2</sub>) se une al sitio Q<sub>0</sub> donde transfiere 1 electrón a la proteína FeS, liberando 2 H<sup>+</sup> al espacio intermembrana y formando semiubiquinona (QH).

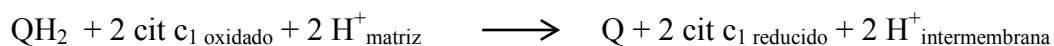


La proteína FeS reduce el citocromo c<sub>1</sub> y QH transfiere sus electrones al citocromo b<sub>L</sub>, formando Q. El citocromo b<sub>L</sub> reducirá el citocromo b<sub>H</sub>. El Q formado es liberado del sitio Q<sub>0</sub>, y se une al sitio Q<sub>1</sub>, dónde adquiere el electrón del cit.B<sub>H</sub>, formándose QH.

En el segundo ciclo, otra molécula de QH<sub>2</sub>, pasa por el proceso anterior, luego 1 electrón reduce la proteína FeS y el citocromo c<sub>1</sub>. El otro electrón reduce secuencialmente el citocromo b<sub>L</sub> y el citocromo b<sub>H</sub>. Éste segundo electrón reduce el QH del primer ciclo, formando QH<sub>2</sub>.

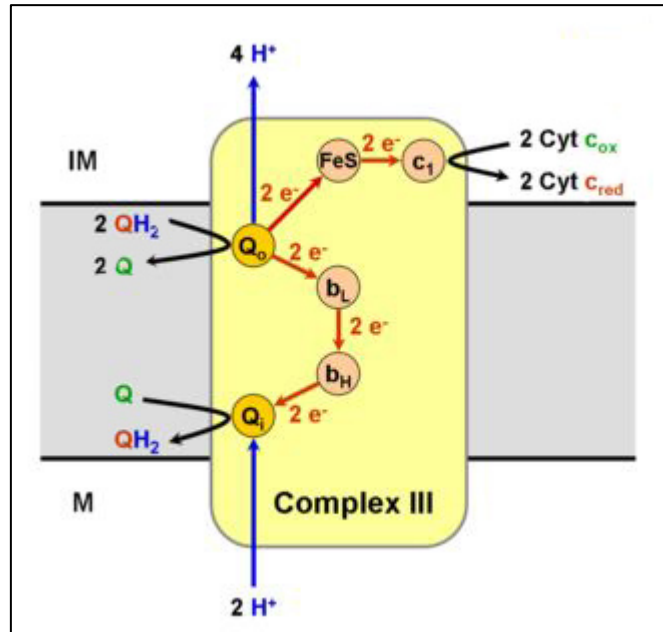


La reacción global del proceso quedaría de la siguiente manera:



Con lo que por cada dos moléculas de QH<sub>2</sub> que entran al ciclo Q, se regenera un QH<sub>2</sub>.





**Figura 2:** Esquema ciclo Q en complejo III

Estructuralmente, el complejo III de mamíferos contiene 11 subunidades, pero solamente tres poseen los centros redox que son usados en la conservación de la energía (Saraste, 1999): Las subunidades clave son: el citocromo b, que está codificado por el mtDNA (Anderson y cols., 1981), tiene 8 hélices transmembrana y dos grupos hemo entre la hélice B y D; una proteína FeS anclada a la membrana con un centro tipo Rieske ( $\text{Fe}_2\text{S}_2$ ); y un citocromo  $c_1$  anclado a la membrana (Saraste, 1999). La mayor parte de las otras 8 subunidades son pequeñas proteínas que rodean al núcleo de metaloproteínas, cuya función parece estar implicada 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.

El sitio  $Q_0$  está localizado entre la proteína FeS 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 sitios  $Q_0$  y  $Q_1$ . En conjunto, este mecanismo conduce a la translocación 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.

**-Complejo IV (citocromo c oxidasa):** cataliza la transferencia de cuatro electrones desde el citocromo c hasta el oxígeno molecular. Su sustrato, el citocromo c, es una hemoproteína hidrosoluble 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  $H_2O$ , en una reacción 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 mtDNA, realizan las funciones catalíticas y de bombeo de protones, el resto de subunidades más pequeñas rodean a las anteriores y están codificadas por el DNA nuclear. La estructura tridimensional de alta resolución por rayos X del complejo IV (Tsukihara y cols., 1995; Iwata y cols., 1995) ha permitido establecer la localización de los lugares de unión al hierro y cobre. 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 un centro de cobre bimetálico, los electrones van a pasar desde el citocromo c al centro bimetálico de

## Introducción

la subunidad II y de aquí a la subunidad I, concretamente al hemo a, y de allí al centro binuclear hemo  $a_3$ -Cu, desde donde pasarán finalmente al oxígeno (hemo  $a_3$ -Cu se encuentran también ligados a la subunidad I). La subunidad III no contiene centro redox y parece desempeñar un papel importante en el ensamblaje del complejo IV (Saraste, 1999).

Un bloqueo a nivel del complejo IV (por ejemplo, con cianuro) tienen un efecto paralizante de toda la ETC. Además, el óxido nítrico (NO<sup>•</sup>) va a tener un papel regulador de este complejo tanto en situaciones fisiológicas como fisiopatológicas.

**-Complejo V ( $F_0 F_1$  ATP sintasa):** es una enzima reversible ya que a partir de ADP y Pi puede sintetizar ATP utilizando la fuerza protón-motriz generada a través de la membrana interna o puede hidrolizar ATP para bombear protones en contra del gradiente electroquímico.

La ATP sintasa es un complejo masivo de proteínas con forma de hongo. El complejo de enzimas en mamíferos contiene 16 subunidades y posee una masa de aproximadamente 600 kDa (Rubinstein y cols., 2003). Está formada por dos fracciones,  $F_0$  y  $F_1$ :  $F_0$  está embebida en la membrana y contiene un anillo de subunidades c y el canal de protones. El pedúnculo y la parte superior esférica es llamada  $F_1$  y es el sitio donde ocurre la síntesis de ATP. La porción esférica del extremo de  $F_1$  contiene seis proteínas de dos tipos diferentes (tres subunidades  $\alpha$  y tres subunidades  $\beta$ ), mientras que el "pedúnculo" consiste solo en una proteína (subunidad  $\gamma$ ), con un extremo extendiéndose en la esfera de subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  (Leslie y Walker, 2000). Ambas subunidades,  $\alpha$  y  $\beta$  se unen a nucleótidos, pero solo la subunidad  $\beta$  cataliza la síntesis de ATP. En la base de la porción de  $F_1$  e introduciéndose en la membrana se encuentra una larga subunidad en forma de bastón que ancla las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  a la base de la enzima.

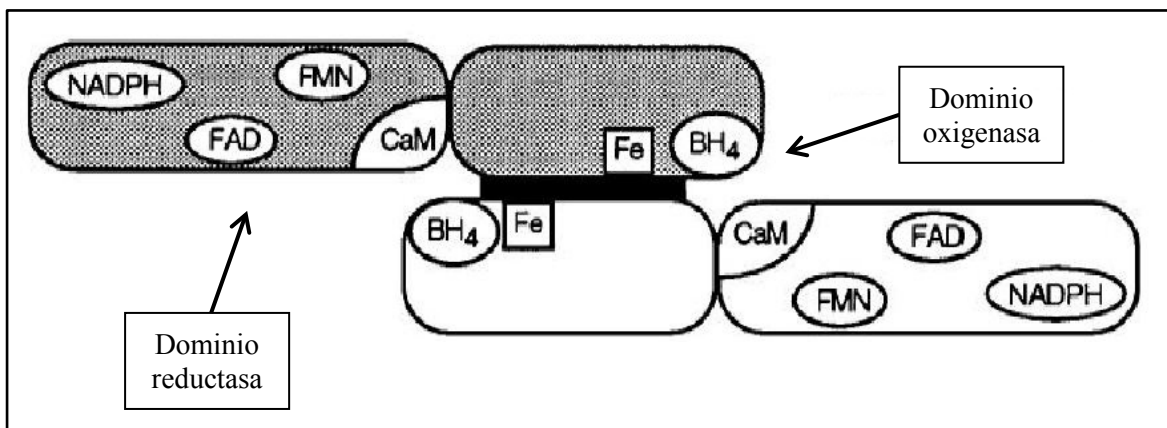
A medida que los protones atraviesan la membrana a través del canal en la base de la ATP sintasa,  $F_0$  entra en rotación (Noji y Yoshida, 2001). Esta rotación puede ser provocada por cambios en la ionización de aminoácidos en el anillo de subunidades c provocando interacciones electrostáticas que impulsan el anillo de subunidades c a través del canal de protones (Capaldi y Aggeler, 2002). Este anillo de rotación provoca la rotación del eje central (el pedúnculo de la subunidad  $\gamma$ ) dentro de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ . Estas subunidades son incapaces de rotar debido al brazo lateral que actúa como un estator. Este movimiento del extremo de la subunidad  $\gamma$  en el interior de la esfera de subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  provee de energía para los sitios activos en las subunidades  $\beta$  para llevar a cabo un ciclo de movimientos que generan y luego liberan ATP (Dimroth y colbs., 2006).

La reacción de síntesis de ATP se denomina, *mecanismo de cambio de unión*, e involucra el sitio activo de una subunidad  $\beta$  ciclando a través de tres estados (abierto, relajado y cerrado, que corresponden a un estado del centro catalítico vacío, un estado con ADP y fosforo inorgánico ( $P_i$ ) unido y a un estado con ATP unido respectivamente) (Boyer, 1997; Boyer, 2002). En el estado "abierto", el ADP y el fosfato entran en el sitio activo. La proteína luego captura las moléculas y se une a ellas, cambia su conformación nuevamente y acerca las moléculas, con el sitio activo en el estado final uniendo la recién formada molécula de ATP con una elevada afinidad. Finalmente, el sitio activo cicla de nuevo a su estado original abierto, liberando ATP y uniéndose a más ADP y fosfato, preparándose así para el próximo ciclo.

### 1.3. Óxido nítrico sintasa: Estructura y función.

La óxido nítrico sintasa, se trata en realidad de una familia de enzimas, que todas ellas catalizan la misma reacción, produciendo óxido nítrico (NO) a través de una reacción que implica la conversión de L-arginina en L-citrulina.

Presenta una estructura con dos dominios (Figura 3) los cuales se unen entre sí gracias a un sitio de reconocimiento a la calmodulina (CaM): en el extremo N-terminal del enzima se localiza el dominio oxigenasa, el cual contiene unos sitios de unión para grupos específicos necesarios para la activación de la enzima, concretamente un grupo hemo, tetrahidrobiopterina (BH<sub>4</sub>) y L-arginina; mientras, que el dominio reductasa se localiza en el extremo C-terminal y en él van a existir sitios de unión al NADPH, FAD y FMN. Además, la forma activa de la enzima se presenta como un dímero en la que cada monómero a su vez estará formado por un monómero de NOS unido a una calmodulina activa Ca-CaM.

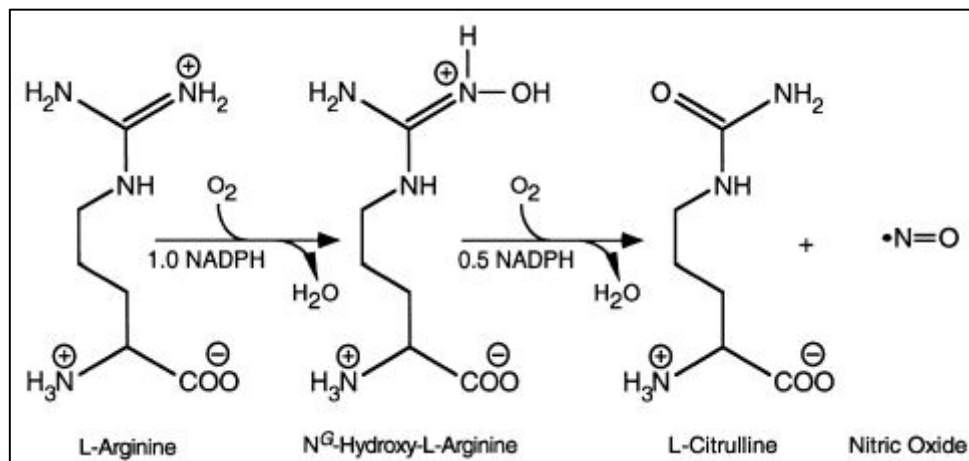


**Figura 3:** Estructura de la óxido nítrico sintasa.

Estos cofactores van a tener funciones muy importantes dentro del complejo activo: el NADPH, es el encargado de donar los electrones, es decir, proporciona el poder reductor necesario para que la reacción se lleve a cabo; la FAD y FMN, son

utilizados como puente electrónico que permiten el paso de electrones desde el NADPH al centro catalítico del enzima, el cual está constituido por un grupo hemo, concretamente una protoporfirina IX, que en su estado reducido es el sitio de unión al oxígeno molecular; la BH<sub>4</sub>, va a aumentar la afinidad del enzima por la L-arginina, permitiendo un cambio conformacional y de configuración electrónica en la NOS.

La síntesis de NO• a partir de L-arginina es una reacción que implica dos pasos de mono-oxigenación separados, con la formación de una especie intermediaria conocida como N<sup>G</sup>-hidroxiarginina (Figura 4). En el primer paso de la reacción, la isoforma L de la arginina se va a oxidar en su grupo guanidino a través de una reacción que requiere oxígeno molecular, NADPH y tetrahydrobiopterina (BH<sub>4</sub>); la especie intermedia vuelve a sufrir un nuevo proceso de oxidación para originar L-citrulina y NO•, gracias nuevamente a la participación del oxígeno molecular y NADPH.



**Figura 4:** Reacción de la óxido nítrico sintasa.

Tradicionalmente se han diferenciado tres isoformas dentro de la familia de la NOS, isoformas que son codificadas por distintos genes, con distinta localización, regulación, propiedades catalíticas y sensibilidad a inhibidores, mostrando un 51-57 % de homología entre las isoformas humanas.

Estas isoformas se denominan: nNOS (o NOS-1), isoforma que es predominante en el tejido neuronal; iNOS (o NOS-2), isoforma inducible en un amplio rango de células y tejidos; eNOS (o NOS-3), isoforma predominante en las células del endotelio vascular.

Entre las características que las distinguen, hay que destacar dos principales: primera, el tamaño de los monómeros: 134 kDa, eNOS; 160 kDa, nNOS y 130 kDa la iNOS (Alderton y cols., 2001); segunda, la dependencia o independencia de  $Ca^{+2}$  mostrada por las distintas isoformas: mientras que las isoformas constitutivas nNOS y eNOS son activadas por una elevada concentración de  $Ca^{+2}$  y unión a la CaM (Wang y Marsden, 1995), la iNOS (contiene CaM unida irreversiblemente) es independiente de  $Ca^{+2}$  (Andrew y Mayer, 1999; Alderton y cols., 2001). Esta dependencia de  $Ca^{+2}$  puede ser debida en última instancia a la presencia de una secuencia autoinhibitoria en la región de unión del FMN de las isoformas constitutivas pero no en la inducible (Salerno y cols., 1997).

Además, a mediados de los 90 se postuló la existencia de una isoforma mitocondrial (Bates y cols., 1995; Kobzik y cols., 1995; Frandsen y cols., 1996), lo que ha creado ciertas diferencias de opinión sobre su naturaleza y regulación, ya que los primeros estudios indicaron que la mtNOS se correspondía con la eNOS (Bates y cols., 1995; Kobzik y cols., 1995); posteriormente la identificaron como iNOS (Tatoyan y Giulivi, 1998; French y cols., 2001), y también como nNOS (Kanai y cols., 2001;

Elfering y colbs., 2002; Riobo y colbs., 2002; Giulivi, 2003; Kanai y colbs., 2004; Lores-Arnaiz y colbs., 2004). Más tarde, nuestro grupo demostró la existencia de dos isoformas en mitocondrias de hígado y pulmón de rata, nNOS e iNOS (Escames y colbs., 2003). Datos apoyados posteriormente por otros estudios con resultados similares en mitocondrias de riñón de ratas (Boveris y colbs., 2003) y en mitocondrias de células tumorales (Galli y colbs., 2003). También se han identificado eNOS e iNOS en mitocondrias de corazón de ratas (Zanella y colbs., 2004). Incluso, hay autores que no encuentran ninguna isoforma de la NOS en mitocondria (Tay y colbs., 2004; Lacza y colbs., 2004; Lacza y colbs., 2006; Venkatakrisnan y colbs., 2009). Frente a este panorama se ha llegado a cuestionar desde la metodología utilizada para purificar las mitocondrias, ya que si existe contaminación citosólica se podría estar detectando las isoformas citosólicas en lugar de la mitocondrial (Brookes, 2004), hasta los métodos analíticos utilizados (Brookes, 2004; Venkatakrisnan y colbs., 2010). Para evitar contaminación citosólica, Giulivi y colb. diseñaron un método de centrifugación diferencial con gradiente de densidad con el que obtenían un alto rendimiento en la purificación mitocondrial estableciendo como mucho un límite de 4% de contaminación (Giulivi y colbs., 1998), procedimiento usado también por nuestro grupo para caracterizar la iNOS/eNOS mitocondriales (Escames y colbs., 2003). A pesar de ello, el problema de la contaminación sigue siendo motivo de duda. Otro problema son los anticuerpos utilizados para detectar las distintas isoformas mediante “western blotting” o inmunocitoquímica, ya que 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, 2004). Por último, la medida de actividad de la mtNOS mediante radioisótopos también se ha puesto en duda. Este método cuantifica la cantidad de L-



(<sup>3</sup>H)-citrulina (o L-(<sup>14</sup>C)-citrulina) formada a partir de L-(<sup>3</sup>H)-arginina (o L-(<sup>14</sup>C)-arginina) adicionada al medio, pero esa L-(<sup>3</sup>H)-citrulina (o L-(<sup>14</sup>C)-citrulina) también puede provenir del ciclo de la urea (Brookes, 2004; Venkatakrisnan y cols., 2010). Sin embargo, esta posible interferencia sólo puede darse en el hígado que es donde tiene lugar el ciclo de la urea y no en otros tejidos donde nuestro grupo ha caracterizado dichas isoformas mitocondriales (Escames y cols., 2003; Escames y cols., 2006b; Escames y cols., 2007; López y cols., 2006b). En cualquier caso, aún se requerirá mucho trabajo para esclarecer toda la polémica suscitada en torno a la mtNOS, incluyendo la regulación de su expresión y actividad.

Escames y colb. defienden que por un lado encontramos una isoforma constitutiva (c-mtNOS) y por otro una isoforma inducible (i-mtNOS), como en la mitocondria no existen genes que codifiquen para éstas proteínas, éstas deben provenir del exterior para luego ser introducidas dentro de la mitocondria, de hecho, la c-mtNOS se trata de una nNOS con algunas modificaciones post-traslacionales: una acilación por ácido mirístico que puede tener su función en la unión a la membrana interna de la mitocondria, 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 cols., 2002; Haynes y cols., 2004), igualmente ocurre con la i-mtNOS que parece provenir de la iNOS citosólica. Éstas isoformas mitocondriales, de la misma forma que sus homologas citosólicas van a compartir la misma característica sobre su Ca<sup>2+</sup> dependencia, ya que la c-mtNOS va a ser Ca<sup>2+</sup> dependiente (como su homóloga citosólica nNOS) y la i-mtNOS Ca<sup>2+</sup> independiente como su homóloga citosólica iNOS). Estudios posteriores nos permitieron identificar que efectivamente i-mtNOS y c-mtNOS provienen de la iNOS y nNOS citosólicas, y están codificadas por los mismos genes que ellas (López y cols., 2006b; Escames y cols., 2006b).

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

En química, un radical libre es una especie química (orgánica o inorgánica), extremadamente inestable y, por tanto, con gran poder reactivo por poseer un electrón desapareado en su última capa de valencia (IUPAC, 1997). Esta característica va a provocar que posean una gran avidez por captar o donar un electrón con cualquier molécula adyacente, obteniendo una configuración electrónica más estable, pero convirtiendo a ésta otra molécula en un nuevo radical (Proctor y Reynolds, 1984). El daño biológico de éstas especies depende de varios factores: de la concentración local que pueden alcanzar, de la capacidad de difusión que va a venir 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 (ROS) y las especies reactivas de nitrógeno (RNS). La mitocondria está considerada como la principal fuente de radicales libres, tanto ROS, como RNS, debido a que es la productora mayoritaria de anión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), también referido como especie reactiva de oxígeno primaria, por su capacidad para reaccionar y formar nuevas ROS (Valko y cols., 2007), en comparación con otras vías de formación de dicho radical (Echtay, 2007). Esta generación de radicales libres es consecuencia directa del metabolismo oxidativo y síntesis de ATP, es decir, que parte del  $O_2$  que llega a la mitocondria no va a ser reducido totalmente a  $H_2O$  por el complejo IV mitocondrial, sino parcialmente por uno, dos o tres electrones, generándose anión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y radical hidroxilo ( $OH^{\bullet}$ ), respectivamente (Barja, 1999). Dado que el potencial de reducción de  $O_2$  a  $O_2^{\bullet-}$  es de  $-0.16$  V (Wood, 1988) y debido a que la ETC incluye

## Introducción

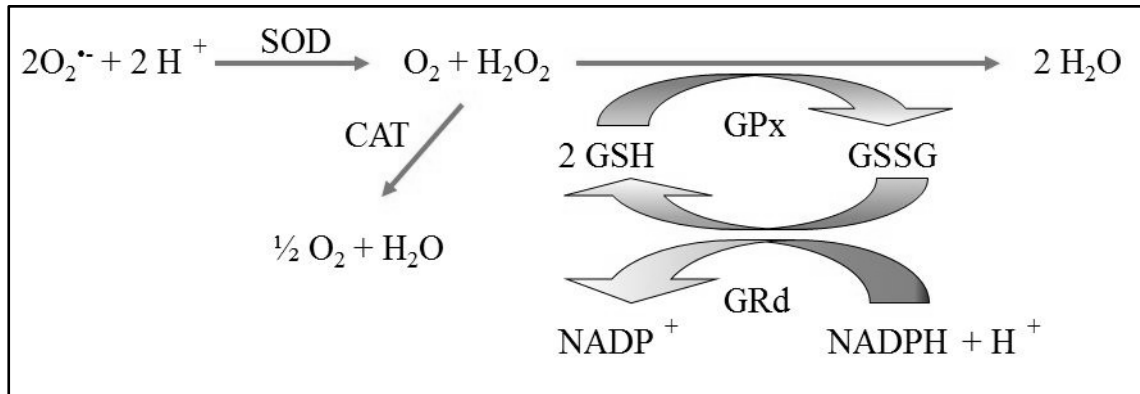
varios centros redox con un potencial de reducción que varía entre los  $-0.32$  V del NADPH y los  $+0.39$  V del citocromo  $a_3$  del complejo IV, además de que el ambiente intramitocondrial es altamente reductor, parece probable que varios componentes respiratorios, incluyendo flavoproteínas, centros FeS y la ubisemiquinona, sean termodinámicamente capaces de transferir un electrón al  $O_2$ . Además, muchos de los pasos de la ETC contienen reacciones que implican un solo electrón, favoreciendo así la reducción monovalente del  $O_2$  (Turrens, 2003).

Hemos hablado también de RNS, entre ellos se encuentra el óxido nítrico ( $NO^{\bullet}$ ) y el producto de la reacción de éste con el  $O_2^{\bullet -}$  los peroxinitritos ( $ONOO^-$ ), los cuales son altamente citotóxicos debido a su enorme poder oxidante. Los efectos del  $NO^{\bullet}$  en la mitocondria, sobre todo a nivel de la ETC en la respiración, se llevan estudiando desde mediados de la década de 1990 y vienen a dar más consistencia a la existencia de la mtNOS. El  $NO^{\bullet}$  compite con el oxígeno por el mismo sitio de unión al complejo IV, es decir, a la forma reducida del centro binuclear citocromo  $a_3$  ( $Fe^{+2}$ ) - CuB ( $Cu^+$ ). Se trata por tanto de una forma de regulación del complejo IV, mediante inhibición reversible de la citocromo oxidasa (Brown, 2001; Brookes y cols., 2002). En condiciones fisiológicas los tejidos están oxigenados en el rango de  $20 \mu M$  de  $O_2$  con un índice  $[O_2] / [NO^{\bullet}]$  entre 500 y 1000, lo que supone que en esta situación el complejo IV está inhibido entre un 16 y un 26 % (Boveris y cols., 2000). Además de esta inhibición del C-IV en condiciones fisiológicas, con concentraciones mayores de  $NO^{\bullet}$ , lo cual puede darse en determinadas patologías como sepsis y enfermedades neurodegenerativas (Acuna-Castroviejo y cols., 2001; Acuna-Castroviejo y cols., 2002), éste se une al segmento  $bc_1$  del C-III produciendo efectos similares a la antimicina, y aún a mayores concentraciones el  $NO^{\bullet}$  puede reaccionar con el ubiquinol formando ubisemiquinona (Cadenas (Cadenas y cols., 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  $O_2^{\cdot-}$  formando  $ONOO^{\cdot}$ . Estos  $ONOO^{\cdot}$  inhiben irreversiblemente todos los complejos de la ETC, incluyendo la ATP sintasa, por mecanismos aún no conocidos en detalle (Lizasoain y colbs., 1996; Brown, 1999; Brown y Borutaite, 2002; Brown y Borutaite, 2004). En conjunto, todas estas especies reactivas que pueden formarse en la mitocondria van a actuar dañando proteínas, el mtDNA y oxidando lípidos, en definitiva provocando disfunción mitocondrial, mitoptosis y apoptosis (Brown y Borutaite, 2001; Turrens, 2003).

Frente a esta generación de radicales libres, la mitocondria tiene sus propios sistemas de defensa antioxidante que pueden clasificarse dentro de distintas categorías: mecanismos que previenen la formación de ROS/RNS, mecanismos que eliminan ROS/RNS y por último mecanismos de reparación moléculas o estructuras dañadas.

Uno de los mecanismos que previenen la formación de ROS/RNS, es el desacoplamiento que se produce en la ETC cuando hay un incremento en los niveles de  $O_2^{\cdot-}$ , evitando de esta forma un incremento de la fuerza protón motriz y, por tanto, que nuevos electrones sigan escapando. Más numerosos son los sistemas que van a trabajar eliminando ROS/RNS, entre algunos de ellos podemos encontrar la acción antioxidante del citocromo c disuelto en el espacio intermembranal que va a oxidar el  $O_2^{\cdot-}$  a  $O_2$  y la dismutación por parte de la superóxido dismutasa (Mn-SOD) convirtiendo el  $O_2^{\cdot-}$  en  $H_2O_2$ , el cual puede ser finalmente oxidado a  $H_2O$  bien vía catalasa o bien vía sistema glutatión. Este sistema glutatión reducido (GSH) / glutatión oxidado (GSSG) ejercido por la glutatión peroxidasa (GPx) y la glutatión reductasa (GRd) está considerado esencial y principal sistema antioxidante mitocondrial, protegiendo a la mitocondria y la célula del daño oxidativo (Figura 5) (Skulachev, 1999).



**Figura 5:** Esquema ciclo glutation.

Finalmente, existen numerosos estudios que atribuyen a la melatonina y sus metabolitos, una potente acción antioxidante y una importante acción protectora a nivel mitocondrial frente al daño oxidativo (Acuna-Castroviejo y colbs., 2001; Reiter y colbs., 2003b; León y colbs., 2004; Acuna-Castroviejo y colbs., 2007).

En resumen, las mitocondrias son una fuente importante de radicales libres, sobre todo de ROS y RNS, frente a los cuales posee una amplia maquinaria de sistemas antioxidantes. Cuando el balance entre radicales libres y sistemas antioxidantes tiende hacia los primeros, se producirán daños en distintas estructuras y componentes de la mitocondria provocando una disfunción mitocondrial, fallo en la bioenergética y en último caso muerte celular.

## **2. Sepsis.**

### **2.1. Definición e importancia sanitaria de la sepsis.**

La sepsis grave es un síndrome complejo de definir, diagnosticar y tratar. Tradicionalmente, sepsis se ha definido como la respuesta sistémica del huésped frente a la infección, entendiéndose ésta como un fenómeno microbiano caracterizado por una respuesta inflamatoria desencadenada bien frente a la presencia de microorganismos o de sus productos tóxicos en el organismo huésped o bien frente a la invasión de tejidos normalmente estériles. (Balk y Bone, 1989; Matot y Sprung, 2001).

Debido a la disparidad de criterios y definiciones utilizados históricamente para describir ésta enfermedad, el “*American College of Chest Physicians*” y la “*Society of Critical Care Medicine*” organizó en 1992 una conferencia consenso, donde se establecieron diferentes términos para diferenciar según la gravedad los estados clínicos de ésta enfermedad. Con esta unificación de criterios se pretendía conseguir no sólo una correcta comunicación entre clínicos e investigadores, sino también: una correcta detección e intervención terapéutica temprana, mejor conocimiento de los mecanismos moleculares e inmunológicos implicados en la sepsis, estandarización de los protocolos de investigación y comparativa de los resultados de ensayos clínicos de nuevas terapias (Bone y cols., 1992).

En esta conferencia nace dentro de la terminología, el concepto de síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), entendiéndola como las distintas manifestaciones clínicas de la enfermedad ocasionadas tanto por causas infecciosas como no infecciosas, dentro de las cuales podemos mencionar: pancreatitis, isquemia, traumas, shock hemorrágico y la administración exógena de factor de necrosis tumoral y otras citoquinas. (Bone y cols., 1992). Éstas manifestaciones clínicas son:

## Introducción

- Temperatura mayor de 38,3 °C o menor de 36 °C
- Más de 90 latidos de corazón por minuto.
- Más de 20 inspiraciones por minuto o una presión arterial parcial de CO<sub>2</sub> menor de 32 mmHg.
- Cantidad de glóbulos blancos mayor de 12x10<sup>9</sup> por litro, menor de 40x10<sup>9</sup> por litro o más de un 10 % de formas inmaduras.

También se estableció que para ser diagnosticada una enfermedad como sepsis deberían diagnosticarse dos o más de las condiciones o criterios descritos anteriormente, siempre en ausencia de causas conocidas para tales anomalías, como por ejemplo quimioterapia, neutropenia inducida o leucopenia.

Y se hizo una clasificación de la enfermedad atendiendo a su gravedad:

- a) Sepsis:** Dos o más condiciones indicadas para SIRS mas evidencia de la infección.
- b) Sepsis severa:** Sepsis asociada con disfunción orgánica, hipoperfusión o hipotensión, incluyendo acidosis láctica, oliguria o alteración aguda del estado mental.
- c) Shock séptico:** Hipotensión inducida por sepsis a pesar de un adecuado remplazo de fluido, junto con presencia de alteraciones en la perfusión que pueden incluir acidosis láctica, oliguria o alteración aguda del estado mental.
- d) MODS:** Presencia de función orgánica alterada en enfermos agudos en los que la homeostasis no puede ser mantenida sin intervención.

Conferencias posteriores, han seguido manteniendo la misma clasificación en los distintos estadios de la enfermedad (Levy y cols., 2003).

No hay muchos datos epidemiológicos sobre la enfermedad, podemos encontrar algunos datos de 1995 de Estados Unidos en el que se realizó un estudio donde se evidenció que anualmente 751.000 personas se ven afectadas al año, de las cuales fallecen 210.000 personas, es decir, con una mortalidad media del 28 % (Angus y cols., 2001), datos más recientes en España, dentro de la Comunidad de Madrid, describen que en 2001 se registraron 6.968 episodios de sepsis grave con una mortalidad media del 33 % y un coste hospitalario de 70 millones de euros, lo que supone un gasto medio superior a 10.000 € por paciente (Inigo y cols., 2006). Aquí hay que tener en cuenta varios aspectos; el primero es que el riesgo de fallecimiento durante la enfermedad aumenta a medida que se pasa de sepsis a sepsis grave, y de ésta a shock séptico, fase en la que la mortalidad alcanza el 45-50 % y por otro que el riesgo también se eleva debido al aumento de edad del paciente.

Aunque los avances terapéuticos están permitiendo disminuir el porcentaje de pacientes que fallecen a consecuencia de la sepsis (Angus y cols., 2001), el aumento de su incidencia está dando lugar a un incremento en el número total de fallecimientos (Martín y cols., 2003). Lo que es más importante, sigue siendo la primera causa de mortalidad en las UCIs de cualquier hospital del mundo.

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 (Weycker y cols., 2003). En costes globales supondría alrededor de 16,7 billones de dólares para el sistema sanitario estadounidense (Angus y cols., 2001). Todos estos datos en conjunto muestran la enorme importancia que tiene la sepsis para el sistema sanitario de cualquier país y la necesidad de seguir avanzando en el conocimiento de la enfermedad y en su progreso terapéutico, reduciendo así los tiempos y costes sanitarios.



## **2.2. Mecanismo de la respuesta inflamatoria frente a la infección.**

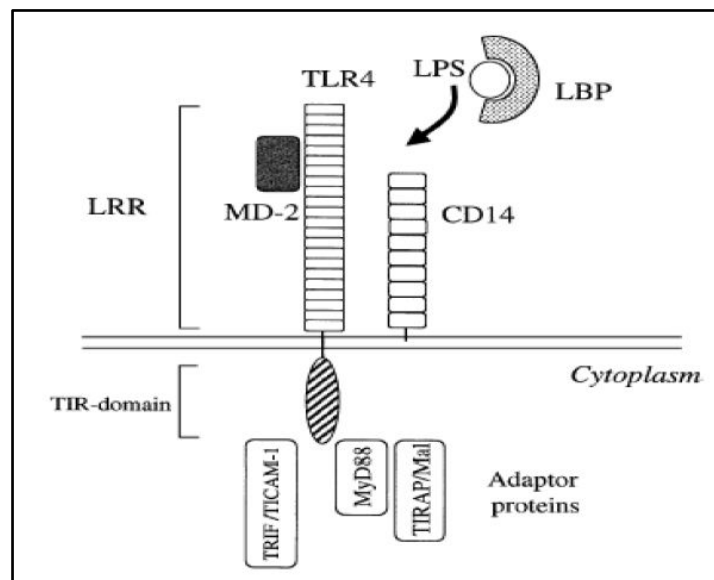
La sepsis se desencadena debido a un inapropiado o exagerado incremento de la respuesta inmune innata, la cual utiliza macrófagos, neutrófilos y células NK actuando de manera directa frente a los patógenos y erradicándolos sin intervención de la respuesta inmune adaptativa (Oberholzer y cols., 2001).

### **2.2.1. Reconocimiento de PAMPs microbianos.**

El sistema inmune innato es capaz de diferenciar entre los productos producidos por los microorganismos y los propios de las células eucariotas y para ello se basa en el reconocimiento de patrones moleculares comunes muy conservados evolutivamente y por tanto compartidos por microorganismos patógenos, no patógenos, y bacterias. Dentro de estos patrones, denominados PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*), se incluyen endotoxinas (lipopolisacárido (o LPS) de bacterias gram-negativas, lipoproteínas, proteínas de membrana externa, peptidoglicano, ácido lipoteico de bacterias gram-positivas, etc.) y productos liberados tras la lisis de las bacterias (principalmente proteínas de choque térmico y fragmentos de DNA) (Cohen, 2002; Adib-Conquy y Cavaillon, 2007).

Tras una infección por bacterias gram-negativas, los lipopolisacáridos de la pared celular se unen primero a unas proteínas plasmáticas llamadas proteínas LBP (*lipopolisacharide binding protein*), las cuales se van a unir a los receptores de la membrana celular CD14, fundamentalmente de macrófagos, pero también monocitos y células mieloides (Bermejo y Duarte, 2003). En las células donde no existen receptores CD14, como en las células endoteliales, células dendríticas, fibroblastos o células del músculo liso, este complejo LPS-LBP se puede unir a CD14 soluble circulante en el plasma, tanto si CD14 permanece anclado en la membrana como si esta en forma

soluble, parecen tener la misma función y capacidad para discriminar entre los distintos productos bacterianos y fijar sus señales a diferentes tipos de receptores TLR (*Toll like receptor*). Estos receptores TLR constituyen otro de los componentes del complejo receptor de LPS (Figura 6).



**Figura 6.** Esquema del complejo receptor de LPS de macrófagos (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 (*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 la señal tras reconocer al LPS (Fujihara y cols., 2003). Aunque CD14 y TLR4 fueron inicialmente descritos en el reconocimiento de LPS, estudios posteriores han confirmado que

también están implicados en el reconocimiento de otros tipos de PAMPs (Fujihara y colbs., 2003).

Otro componente esencial en el complejo receptor de LPS es el llamado MD-2 (*myeloid differentiation protein-2*). Se trata de una proteína pequeña que está asociada al dominio extracelular del TLR4 y sin dominio transmembrana (Figura 6), cuya función está ligada a la distribución celular del TLR4. Además, se ha demostrado que MD-2 también está directamente implicado 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; Perera y colbs., 2001; Takeuchi y Akira, 2001; Triantafilou y colbs., 2001; Triantafilou y Triantafilou, 2002; Fujihara y colbs., 2003; Beutler, 2004).

### **2.2.2. Respuesta inmune y señales de amplificación.**

Según lo descrito anteriormente, tras la activación de los complejos receptores por el LPS, éstos van a coordinarse para iniciar las señales intracelulares a través de los diferentes TLRs. Estas señales, basadas fundamentalmente en reclutamientos y fosforilaciones de proteínas, culminarán con la síntesis de moléculas proinflamatorias que puedan combatir y erradicar la infección.

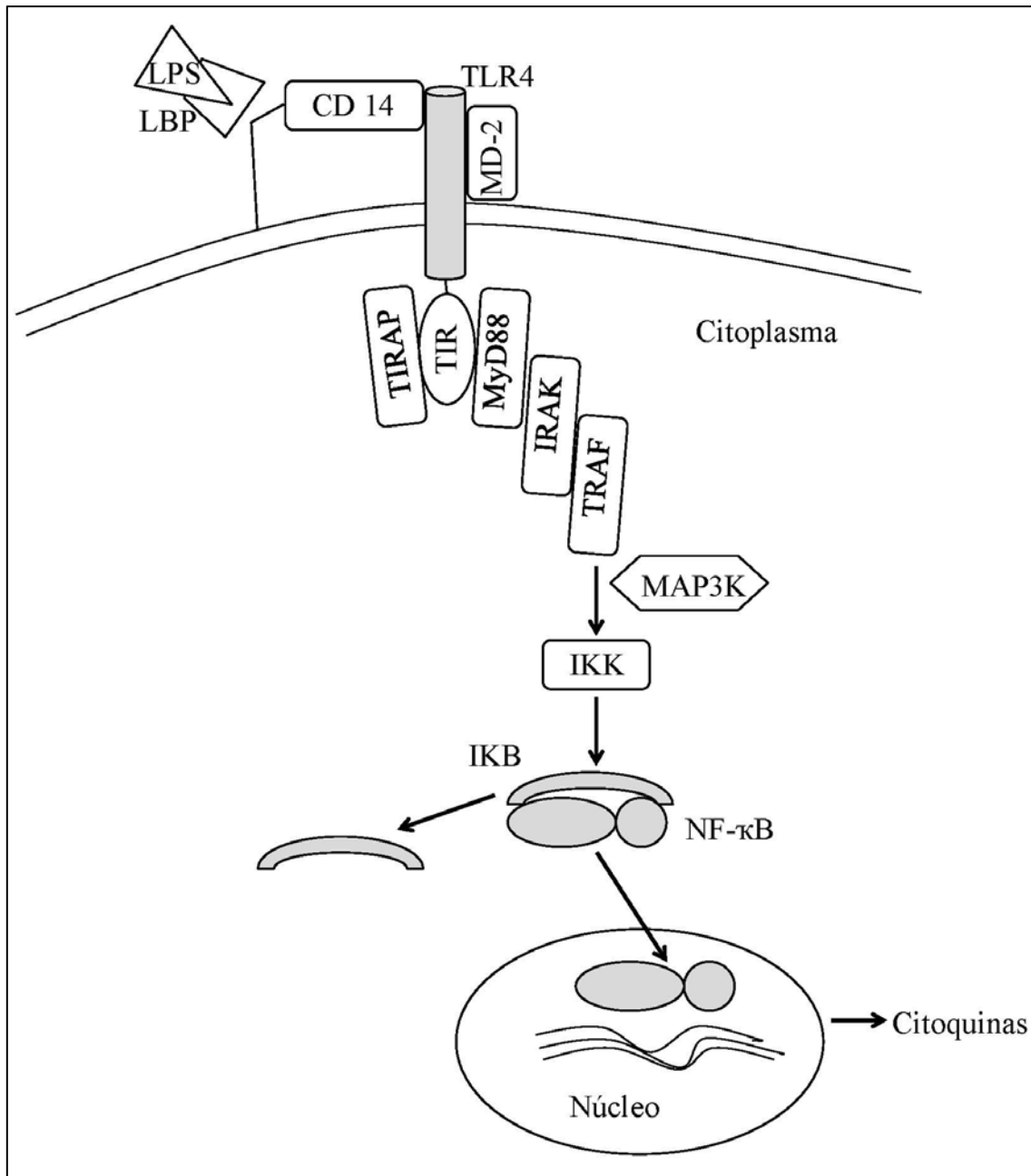
#### **2.2.2.1. Vías dependientes de MyD88.**

Ésta se inicia en el dominio intracelular de TLR4, denominado TIR (*Toll/IL-1 receptor homology domain*) junto a una quinasa asociada, IRAK (*IL-1 receptor-*

*associated kinase*). La unión de IRAK a TIR requiere de dos proteínas de adaptación, las llamadas MyD88 (*myeloid differentiation protein 88*) y TIRAP (*TIR domain containing adapter protein*), llamada también Mal (*MyD88-adapter-like protein*). Estudios realizados con ratones deficientes en MyD88 han demostrado que, tras la administración de LPS, no eran capaces de producir citoquinas inflamatorias y fallaban en la proliferación de células B así como en la inducción de shock endotóxico. Estos resultados van a sugerir el importante papel de MyD88 en la inducción de citoquinas inflamatorias en respuesta al LPS (Kawai y Akira, 2005).

Una vez unido IRAK al dominio TIR de TLR4, se produce un proceso de fosforilación y reclutamiento de otra proteína, TRAF6 (*Tumor necrosis factor receptor associated factor-6*) que va a activar factores de transcripción a través de dos vías principales (Fujihara y cols., 2003):

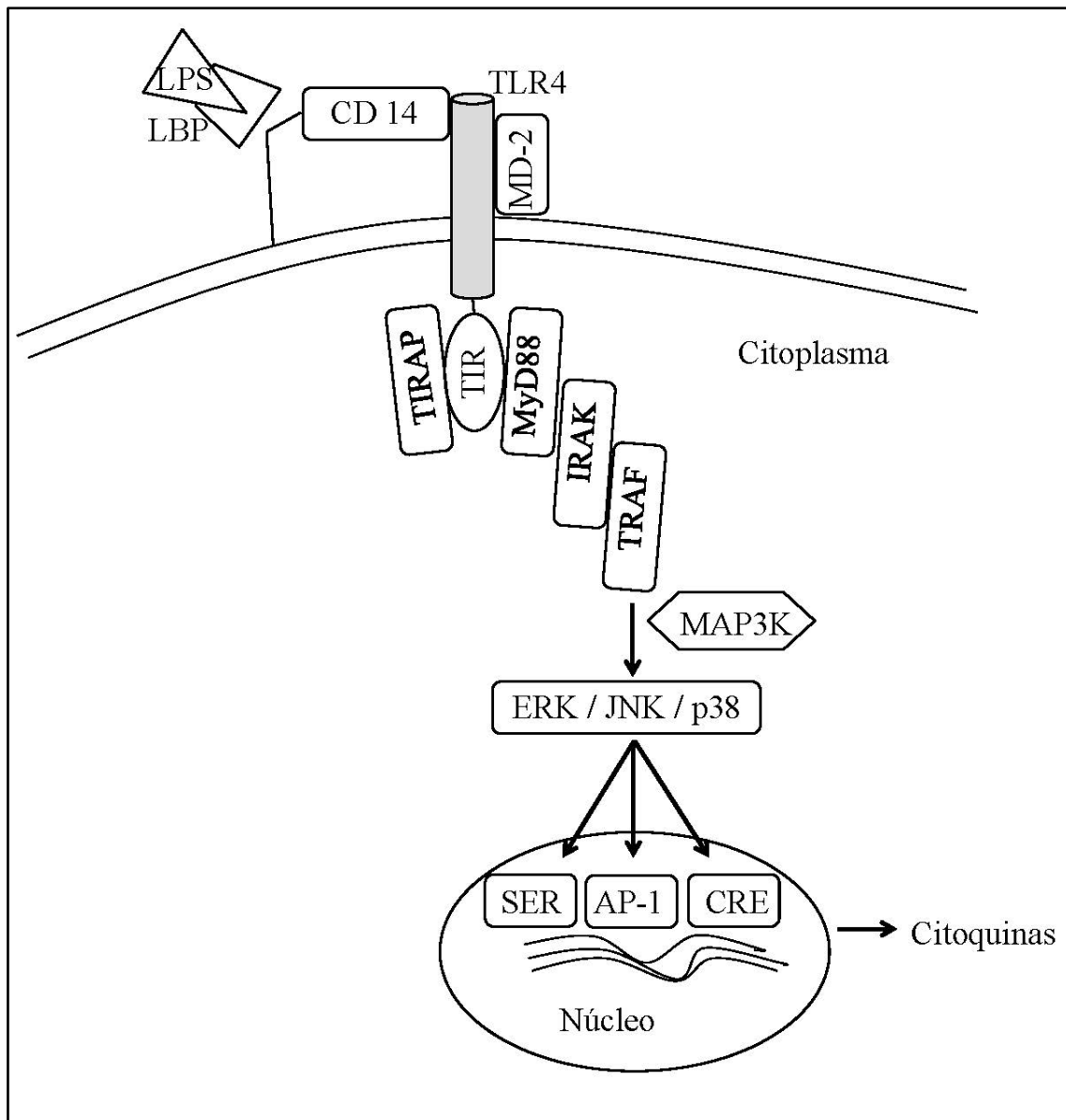
a) Una primera vía que conduce a la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B, factor nuclear clave en la coordinación de las respuestas inmune innata y adquirida en sepsis al regular la expresión génica de numerosos mediadores celulares (Zingarelli, 2005). Paralelo, TRAF6 va a activar al complejo IKK (*inhibitor of  $\kappa$ B kinase complex*); este complejo, induce la fosforilación del inhibidor de  $\kappa$ B (I $\kappa$ B) y su posterior degradación proteosómica, para que se liberen los dímeros del NF- $\kappa$ B y permita la traslación, transcripción y producción de un mRNA mensajero que induzca la producción de citoquinas y otras moléculas efectoras (Cohen, 2002), incluyendo el factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) e I $\kappa$ B. Este último a su vez inhibirá a NF- $\kappa$ B, disminuyendo su actividad transcritora (Silverman y Maniatis, 2001). De este modo, teóricamente una sepsis debe persistir mientras continúe la translocación nuclear de NF- $\kappa$ B (Figura 7).



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

b) Una segunda vía conduce a la activación de la proteína activadora 1 (AP-1, *activator protein-1*), el elemento de respuesta a suero (SER, *serum response element*) y el elemento de respuesta a AMPc (CRE, *cAMP responsive element*), todos ellos factores

de transcripción activados a través de las tres rutas MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) (Guha y colbs., 2001; Fujihara y colbs., 2003) (Figura 8).

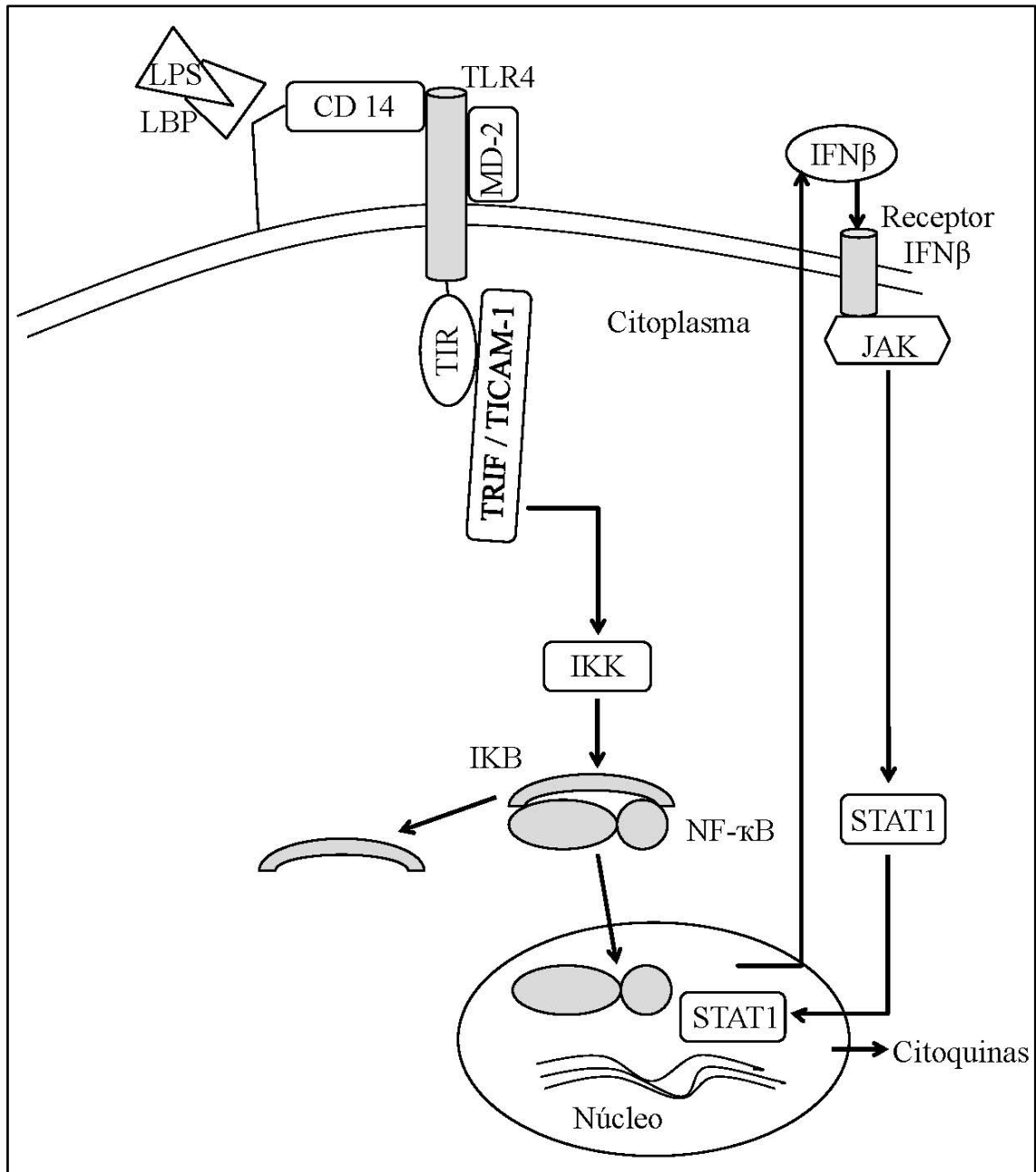


**Figura 8:** Esquema de las señales intracelulares dependientes del factor MyD88 en respuesta a LPS en macrófagos.

#### 2.2.2.2. Vías independientes de MyD88.

El MyD88 es esencial para la producción de citoquinas inflamatorias en respuesta a una variedad de componentes microbianos, pero el LPS puede inducir activación del NF- $\kappa$ B en macrófagos que no expresan MyD88. Esto va a sugerir que aunque el MyD88 es importante en la producción de citoquinas inducida por LPS, existe una o más vías que no depende de MyD88 y que serían capaces de participar en la señalización a partir del TLR4. Dicha vía también podría activar la transcripción de genes de IFN.

Tras el reconocimiento del LPS por el complejo receptor, el dominio TIR del TLR4 va a interactuar con una proteína adaptadora llamada TRIF/TICAM-1 (*TIR domain-containing adaptor inducing IFN- $\beta$ /TIR domain-containing adaptor molecule-1*) activándose una vía que conduce a la translocación de NF- $\kappa$ B, (Figura 9) constituyendo así una vía alternativa de activación de NF- $\kappa$ B independiente de MyD88, pero la principal función de TRIF/TICAM-1 va a ser activar el factor de transcripción IRF3 (*IFN regulatory factor 3*), el cual va a inducir la transcripción, y posterior traducción, de los genes para el IFN $\beta$  (interferón- $\beta$ ) (Figura 9). Éste una vez sintetizado, sale al exterior de la célula donde puede interactuar con su receptor celular, activando unas quinasas citoplasmáticas llamadas JAKs (*janus kinases*). Estas quinasas van a fosforilar restos de tirosina presentes tanto del receptor del interferón como del factor de transcripción denominado STAT1 (*signal transducer and activator of transcription*) (Figura 9). STAT1 una vez fosforilado se dimeriza y translocase al núcleo donde activará la expresión de todos aquellos genes dependientes de él, entre ellos el gen codificante para la iNOS (Yamamoto y cols., 2003; Fujihara y cols., 2003).



**Figura 9:** Esquema de las señales intracelulares independientes del factor MyD88 en respuesta a LPS en macrófagos.



### **2.2.2.3. Otras vías implicadas.**

Las células eucariotas poseen otras vías de respuesta frente a la infección microbiana a través de receptores intracelulares. Los NLRs (*NOD-like receptors*, siglas de *nucleotide-binding oligomerization domain receptors*) presentan dominios ricos en leucina y son capaces de inducir la liberación citoquinas pro y antiinflamatorias en monocitos humanos mediante la activación de NF- $\kappa$ B (Fritz y cols., 2005). Los receptores NLRs están codificados por una larga familia de genes multitud de especies animales, en humanos existen al menos 20 genes que codifican para NLRs. Muchos de ellos sirven como receptores de reconocimiento de patrones microbianos PRRs (*pattern recognition receptors*) en el citoplasma celular, por lo que van a tener un papel importante en respuesta inmune no específica (Ting y Davis, 2005).

Existen 2 subfamilias de NLRs: Por un lado la familia NLRCs (o NOD), donde a NLRC1 y NLRC2 se les conoce con el nombre de NOD1 y NOD2 respectivamente. NOD1 reconoce una molécula llamada ácido meso-diaminopimélico (meso-DAP), un componente único del peptidoglicano de bacterias gramnegativas, mientras que NOD2 va a reconocer muramil dipéptido (MDP), que es un componente del peptidoglicano de bacterias grampositivas y gramnegativas (Inohara y Nunez, 2003; Strober y cols., 2006). Y por otro lado la subfamilia NLRPs, también involucrados en el reconocimiento de patógenos microbianos. En humanos existen 14 familias (NLRP1 a NLRP14) (Tschopp y cols., 2003). NLRP3 puede ser activado por PRRs, y, recientemente, se demostró su activación específica por ROS mitocondriales y mtDNA (Zhou y cols., 2011). Su activación está involucrada en procesos de inflamación y apoptosis (Latz, 2010; Schroder y Tschopp, 2010).

Todos estos receptores NLRs, pueden ser activados por microorganismos patógenos y funcionar como activadores de NF- $\kappa$ B, por lo tanto inducir la expresión de moléculas proinflamatorias, incluida la iNOS.

En resumen, las diferentes vías de señalización 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- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleuquina 1- $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-6, IL-10, interferón  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), factor de activación plaquetaria (PAF), molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1), quimioquinas, NO $\cdot$  y otras especies reactivas de nitrógeno y oxígeno (Bhatia y Mochhala, 2004). Todos estos mediadores de la inflamación van a ejercer diferentes funciones con el fin de erradicar la infección.

De todos ellos, para nuestro estudio nos centraremos en el NO $\cdot$  y cómo se va a producir a partir de la inducción de las enzimas que lo sintetizan, la óxido nítrico sintasas.

### **2.3. NOS, NO $\cdot$ y disfunción mitocondrial en la sepsis.**

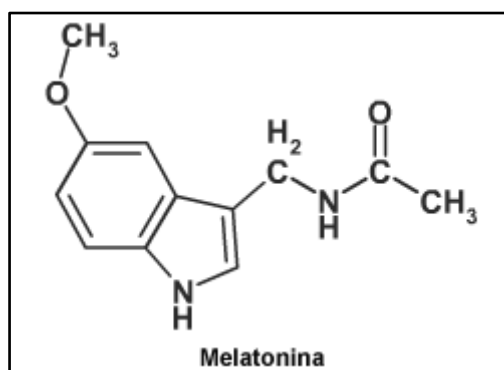
Durante la sepsis hay una importante inducción de la iNOS con el consiguiente aumento en la producción de NO $\cdot$ , el cual tiene a altas concentraciones efectos nocivos sobre la función mitocondrial (Escames y cols., 2006a; López y cols., 2006b). Son numerosos los estudios que han descrito una inhibición de los complejos de la ETC durante la sepsis (Gellerich y cols., 2002; Brealey y cols., 2002; Brealey y cols., 2004; Nin y cols., 2004; Callahan y Supinski, 2005; López y cols., 2006b; Escames y cols., 2006b; Escames y cols., 2007) con una respiración mitocondrial alterada (Taylor y cols., 1998; Boczkowski y cols., 1999; Callahan y cols., 2001; Gellerich y cols., 2002; Davies y cols., 2003; Callahan y Supinski, 2005), así como una

disminución de los niveles de ATP (Brealey y cols., 2004; López y cols., 2006a). Con la entrada en juego de la mtNOS, se sugirió que ésta podría ser la responsable de los desequilibrios mitocondriales y aumento intramitocondrial de  $\text{NO}^{\bullet}$  en la sepsis (Boveris y cols., 2002; López y cols., 2006b). Escames y cols. observaron un incremento en la expresión y actividad de la i-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 i-mtNOS provocó una inhibición de los complejos I y IV (Escames y cols., 2003). Álvarez y cols., 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  $\text{O}_2^{\bullet-}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $\text{ONNO}^{\bullet}$ , lo cual puede ser consecuencia del daño en la ETC (Álvarez y Boveris, 2004). Este incremento en los niveles intramitocondriales de  $\text{H}_2\text{O}_2$  ya había sido detectado en trabajos previos (Taylor y cols., 1995; Taylor y Piantadosi, 1995; Boczkowski y cols., 1999) aunque sin implicar directamente al  $\text{NO}^{\bullet}$  producido por el aumento de actividad de la i-mtNOS en sepsis. Este aumento de actividad de la mtNOS y el consiguiente incremento en los niveles intramitocondriales de  $\text{NO}^{\bullet}$  van a provocar un intenso estrés oxidativo que conlleva a daño mitocondrial con caída en la producción de ATP y depleción energética celular responsable del fallo orgánico o multiorgánico producido en el shock séptico.

### 3. Melatonina.

Se estima que la melatonina o N-acetil-5-metoxitriptamina (aMT) es una molécula que apareció en los seres vivos hace al menos dos mil millones de años (Poeggeler y Hardeland, 1994; Macías y colbs., 1999), está presente en todos los animales y plantas donde se ha buscado, con la misma estructura molecular, situación que muy extraña vez sucede en la naturaleza. Se cree que apareció con la misión fundamental de “neutralizar el efecto dañino del oxígeno” como productor de radicales libres, debido a su potente efecto antioxidante (Acuna-Castroviejo y colbs., 2001). Con el transcurso del tiempo fue capaz de ir adquiriendo otras funciones propias de hormona. Fue descrita inicialmente por McCord (McCord C.P. y Allen F.B., 1917) y aislada por Lerner (Lerner A.B. y colbs., 1958) a partir de extractos de la glándula pineal.

Químicamente se trata de un cristal orgánico de color blanco amarillento, con punto de fusión entre 116-118 °C, poco hidrosoluble y muy soluble en etanol (Szmuskowicz y Heinzelman, 1960).



**Figura 10:** Estructura química de la melatonina.

Aunque en un principio solo se encuadró a la melatonina en la fisiología circadiana y de la reproducción, estudios posteriores han permitido encuadrarla en otros aspectos de la fisiología intracelular independientes de su acción extracelular como hormona. Así, se observó que la melatonina es un potente depurador de radicales libres (Tan y cols., 1993); también se han caracterizado receptores nucleares para la melatonina en órganos periféricos (Acuna-Castroviejo y cols., 1993; Becker-Andre y cols., 1994; Hirose y cols., 1994; Wiesenberg y cols., 1998) y en el sistema nervioso central (Acuna-Castroviejo y cols., 1993; Giguere y cols., 1994; Carlberg y Wiesenberg, 1995); se observó la capacidad que posee la melatonina de unirse a algunas proteínas intracelulares como la proteína quinasa C, (Benítez-King y cols., 1996; Anton-Tay y cols., 1998), la calmodulina (León y cols., 2000; Huerto-Delgadillo y cols., 1994; Pozo y cols., 1994), y la calreticulina (Macías y cols., 2003); por último, también se ha visto la importancia de la melatonina en el mantenimiento de la homeostasis mitocondrial (Martín y cols., 2000a; Martín y cols., 2002; Acuna-Castroviejo y cols., 2001; Acuna y cols., 2002; León y cols., 2004; León y cols., 2005).

### **3.1. Mecanismos de acción de la melatonina.**

Debido a que se trata de una molécula altamente lipofílica, es capaz de atravesar membranas celulares, y llevar a cabo funciones que a otras moléculas más hidrofílicas no les va a ser posible, además se ha podido observar que es capaz de acumularse en ciertos compartimentos subcelulares como la mitocondria (Acuna y cols., 2002; Acuna-Castroviejo y cols., 2003; León y cols., 2004). Entre las funciones mitocondriales más importantes que posee la melatonina podemos encontrar: una

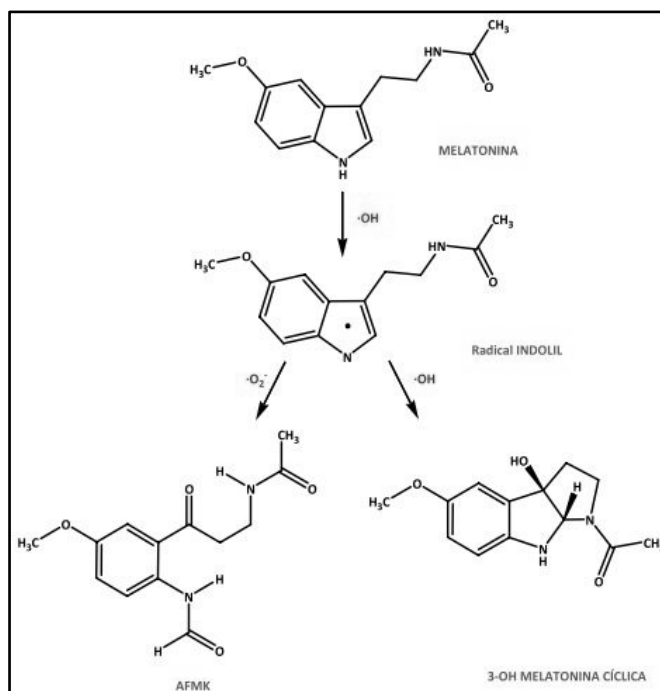
función como antioxidante de acción directa, como antioxidante de acción indirecta, una función sobre la NOS y acciones en la fisiología mitocondrial.

### **3.1.1. Antioxidante de acción directa.**

La existencia de melatonina en seres unicelulares y bacterias (Manchester y colbs., 1995; Tilden y colbs., 1997) hace reforzar la hipótesis de que la melatonina es un protector celular muy conservado evolutivamente (Reiter, 1997). Más allá de la capacidad de la melatonina de interactuar junto a receptores o proteínas intracelulares, debido a su capacidad antioxidante intrínseca, tanto la melatonina como algunos de sus metabolitos, entre los que se encuentran N1-acetil-5-metoxikinuramina (AMK) y N1-acetil-N2-formil-5-metoxikinuramina (AFMK) (Acuna-Castroviejo y colbs., 2001; Reiter y colbs., 2003b; León y colbs., 2004) van a ser capaz de depurar radicales libres, tanto de oxígeno (ROS) como de nitrógeno (RNS).

La melatonina es una molécula rica en electrones y puede ceder uno de ellos al grupo hidroxilo ( $\text{OH}^\bullet$ ) (Tan y colbs., 1993; Tan y colbs., 2000a), originando un radical indolil; este radical indolil puede a su vez volver a depurar otro  $\text{OH}^\bullet$  transformándose en 3-hidroximelatonina cíclica, que es excretada por la orina, o de purar un radical superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) y originar otro metabolito activo de la melatonina, el AFMK (Hardeland y colbs., 1993; Poeggeler y colbs., 1994). Tanto la 3-hidroximelatonina cíclica como el AFMK poseen también capacidad antioxidante, aumentando por tanto el valor de la melatonina como potente depurador de radicales libres (Acuna-Castroviejo y colbs., 2001; Reiter y colbs., 2003b).

La 3-hidroximelatonina cíclica se excreta vía urinaria y puede ser utilizado como indicador de estrés oxidativo en el organismo vivo (Tan y colbs., 1998; Roberts y colbs., 1998).



**Figura 11:** Metabolización de la melatonina como antioxidante.

La melatonina es capaz de reaccionar con otros radicales de oxígeno como el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), produciendo de nuevo AFMK (Tan y colbs., 2000a), que por medio de la catalasa se puede metabolizar a AMK, que se excreta por la orina. Además de radicales de oxígeno, la melatonina también va a ser capaz de reaccionar con radicales de nitrógeno como peroxinitritos ( $\text{ONOO}^\cdot$ ) (Zhang y colbs., 1999), dando como resultado 6-hidroximelatonina, molécula que también posee propiedades antioxidantes (Qi y colbs., 2000; Maharaj y colbs., 2003a; Maharaj y colbs., 2003b).

La melatonina puede depurar radicales peróxido ( $\text{LOO}^\cdot$ ), 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 peróxido. No obstante, es altamente eficaz para reducir los niveles de peroxidación lipídica, tanto basales como estimulados por estrés oxidativo (Reiter y colbs., 2003a).

### 3.1.2. Antioxidante de acción indirecta.

Además, de la propiedad de depurar radicales libres de forma directa, la melatonina tiene capacidad antioxidante indirecta, y esto es debido a que es capaz de estimular la expresión y/o actividad de algunas enzimas antioxidantes, muchas de ellas muy importantes dado que se encuentran en la mitocondria que es el orgánulo celular donde se producen más del 90 % de los radicales libres (Yu y colbs., 1992). Entre ellas aumenta la actividad de las enzimas responsables del ciclo del glutati3n como glutati3n peroxidasa (GPx) y glutati3n reductasa (GRd) (Barlow-Walden y colbs., 1995; Reiter, 1995; Blask y colbs., 1997; Mart3n y colbs., 2000a; Escames y colbs., 2006b; Escames y colbs., 2007); estimula la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD), encargada de generar el NADPH necesario para reciclar el GSSG a GSH por la GRd; aumenta la expresi3n de  $\gamma$ -glutamilcisteina, enzima limitante en la s3ntesis de glutati3n reducido (Urata y colbs., 1999); glutati3n s-transferasa, un antioxidante capaz de detoxificar xenobi3ticos; Mn-super3xido dismutasa (Mn-SOD) y Cu,Zn-super3xido dismutasa (Antol3n y colbs., 1996) capaces de dismutar  $O_2^{\cdot -}$  a  $H_2O_2$  y tambi3n aumenta la catalasa (Acuna-Castroviejo y colbs., 2001; Reiter y colbs., 2003b; Le3n y colbs., 2004). Adem3s ejerce una acci3n sin3rgica con otros antioxidantes como la vitamina E y la vitamina C (Reiter y colbs., 2003b).

En resumen, sea por acci3n directa y/o indirecta, la melatonina es un potente antioxidante con importantes propiedades para actuar en la mitocondria y, en consecuencia, proteger el ADN mitocondrial, las membranas lip3dicas y las prote3nas mitocondriales del da3o oxidativo.



### **3.1.3. Función sobre la NOS.**

La melatonina presenta también efectos inmunoreguladores, (Guerrero y Reiter, 2002; Hardeland, 2008), entre ellos su efecto antiinflamatorio está bien demostrado (Mayo y colbs., 2005; Escames y colbs., 2006b). En procesos inflamatorios agudos como la sepsis, este aumento en la expresión de la iNOS es muy elevado (Escames y colbs., 2003; López y colbs., 2006b), sin embargo, la melatonina parece capaz de inhibir la activación de NF- $\kappa$ B (Cuzzocrea y Reiter, 2001; Guerrero y Reiter, 2002; Hardeland, 2008) y su translocación al núcleo (Chuang y colbs., 1996), puede actuar a nivel de las MAPKs (mitogen-activated protein kinases) (Cuzzocrea y Reiter, 2001), reduciendo de esta manera la inducción de la expresión de la iNOS, siendo además capaz de reducir la expresión de la iNOS a nivel transcripcional (Cuzzocrea y Reiter, 2001). En este sentido, la administración de melatonina va a reducir la expresión de la iNOS en el modelo de sepsis experimental por administración de LPS (Crespo y colbs., 1999).

Escames y colbs. (2003) encuentran que la actividad y expresión de la i-mtNOS están elevadas en hígado y pulmón durante la sepsis, mientras que el tratamiento con melatonina inhibe tanto la expresión como su actividad, al igual que ocurre con la iNOS citosólica (Crespo y colbs., 1999). En cualquier caso, los mecanismos por los que la melatonina inhibe la actividad de la iNOS aún no son del todo conocidos. Además, Escames y colbs. (2003) también encuentran en la mitocondria una isoforma derivada de la nNOS cuya actividad no aumenta en la sepsis. 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 dímero activo de la enzima. Por tanto, la melatonina va a ser capaz de inhibir la producción de NO<sup>\*</sup> que se produce en las sepsis, manteniendo la función mitocondrial y previniendo el fallo multiorgánico.

### **3.1.4. Acciones sobre la fisiología mitocondrial.**

Debido a que la melatonina posee tanto carácter lipofílico (Reiter, 1991) como hidrofílico (Shida y cols., 1994), va a ser capaz de atravesar las membranas celulares y subcelulares con cierta facilidad, concentrándose en distintos compartimentos subcelulares (Venegas y cols., 2011), incluida la mitocondria, donde puede acumularse en altas concentraciones (Acuna y cols., 2002; Acuna-Castroviejo y cols., 2003; León y cols., 2004; Venegas y cols., 2011). Ya que la mitocondria es la primera fuente de radicales libres en las células eucariotas (Yu y cols., 1992), parece razonable pensar que la mitocondria acumula melatonina para protegerse frente a radicales libres, pero la influencia de la melatonina en la homeostasis de la mitocondria no se limita a su poder antioxidante dentro de ella, sino que también interactúa directamente con la cadena de transporte electrónico (ETC), varios estudios han demostrado que la melatonina incrementa la actividad de los complejos I y IV de la cadena de transporte de electrones en las mitocondrias hepáticas y cerebrales (Martín y cols., 2000b; Acuna-Castroviejo y cols., 2001; Acuna-Castroviejo y cols., 2005). Pero no solo es capaz de aumentar la actividad de los complejos en mitocondrias sanas (López y cols., 2009), sino que se ha demostrado que este aumento de actividad es mucho más acusado en mitocondrias previamente dañadas (Escames y cols., 2003; Escames y cols., 2006b; Escames y cols., 2007). Todos estos estudios y teniendo en cuenta el alto potencial redox que posee la melatonina (0,94 V) (Tan y cols., 2000b), podríamos pensar que ésta no solo estimula la actividad de los complejos de la ETC, sino que también podría ser capaz de donar y aceptar electrones por si misma aumentando el flujo electrónico.

Podemos encontrar otros múltiples efectos de la melatonina sobre la fisiología mitocondrial, como: aumentar la biogénesis mitocondrial mediante su administración crónica (Decker y Quay, 1982); estabilizar la membrana interna mitocondrial (García y

colbs., 1999), aumentar la producción de ATP mitocondrial (Martín y colbs., 2002; López y colbs., 2006a), estabilizar la membrana mitocondrial frente a las ROS (Karbownik y colbs., 2000), prevenir la apoptosis modulando funciones mitocondriales (Baydas y colbs., 2005; Sourdeval y colbs., 2006) incluyendo los efectos en la homeostasis del calcio y el potencial de membrana mitocondrial (Xu y Ashraf, 2002; Sourdeval y colbs., 2006), y también inhibiendo el poro de transición mitocondrial (Andrabi y colbs., 2004). Finalmente, la administración crónica de melatonina estimula la respiración mitocondrial en hígado y cerebro de ratones con envejecimiento acelerado (Okatani y colbs., 2002a; Okatani y colbs., 2002b; Okatani y colbs., 2003a; Okatani y colbs., 2003b) y previene del daño oxidativo producido en éstos ratones (Rodríguez y colbs., 2007a; Rodríguez y colbs., 2007b).

En resumen, la melatonina es un potente antioxidante, sea por acción directa y/o indirecta, con importantes propiedades para actuar sobre la mitocondria, y en consecuencia, protegerá al mtDNA, las membranas lipídicas y las proteínas mitocondriales del daño oxidativo. Lo que en conjunto va a tener una gran importancia fisiológica y se va a traducir en un aumento en los niveles de ATP (Martín y colbs., 2002; López y colbs., 2006a) y por tanto de supervivencia de la célula.

### **3.2. Papel terapéutico de la melatonina en la sepsis.**

Según la fisiopatología de la sepsis y las propiedades y acciones de la melatonina, parece obvio que la administración farmacológica de la indolamina podría tener efectos beneficiosos en el estado séptico. La sepsis se caracteriza por llevar al enfermo a poseer un estrés oxidativo muy alto y disfunción mitocondrial, que puede llevarlo a fallo multiorgánico y a la muerte. La melatonina, a través de sus diversas

acciones, contrarresta el daño mitocondrial ocasionado en el proceso inflamatorio, restaurando la función mitocondrial lo que se traduce en una mayor tasa de supervivencia

Crespo y colbs. muestran que la administración de melatonina a ratas con sepsis inducida por LPS reduce la expresión de la iNOS de forma dosis-dependiente y recupera al animal del fallo multiorgánico (Crespo y colbs., 1999). Poco después, Wu y colbs. demostraron que la administración de melatonina prevenía el fallo circulatorio en ratas con endotoxemia y mejoraba la supervivencia de ratones con inyecciones letales de LPS, reduciéndose la infiltración de neutrófilos polimorfonucleares en el hígado de los animales supervivientes (Wu y colbs., 2001). Estos efectos beneficiosos de la indolamina se asociaron a su acción en la expresión de la iNOS y en la producción de anión superóxido.

Di Villa Bianca y colbs. muestran que la melatonina previene el daño endotelial y vascular en ratas con sepsis inducida por LPS (d'Emmanuele, V y colbs., 2004). Este efecto de la indolamina se relacionó con sus propiedades antioxidantes y su capacidad para inhibir la expresión de la iNOS.

A nivel mitocondrial, Escames y colbs. detectan que la melatonina reduce la expresión y actividad de la i-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 (Escames y colbs., 2003).

Dados estos efectos beneficiosos de la melatonina, cabe esperar que su administración mejoraría la supervivencia asociada a la sepsis. En este sentido, trabajos realizados con animales de experimentación, muestran una disminución de la

## Introducción

mortalidad tras el tratamiento con melatonina (Escames y colbs., 2007). 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 ileocecal 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). En nuestro grupo, hemos observado que la vida media de los ratones con sepsis aumentó un 132% y su supervivencia un 154% tras tratarlos con melatonina (Escames y colbs., 2007).

Con toda la evidencia experimental en animales, se realizó el primer estudio en humanos con administración oral de melatonina en niños neonatos con sepsis (Gitto y colbs., 2001). La melatonina (dos dosis de 10 mg/kg separadas por un intervalo de 1 hora) fué administrada vía oral dentro de las 12 horas posteriores al diagnóstico de la enfermedad. 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.

## Hipótesis y Objetivos



Existen suficientes evidencias científicas que avalan que la inducción de la iNOS e i-mtNOS provoca un aumento importante de la producción de  $\text{NO}^{\bullet}$  y  $\text{ONOO}^{-}$ , que van a causar un daño mitocondrial severo, inhibiendo la actividad de los complejos respiratorios y, por tanto, provocando un déficit funcional de la mitocondria. Esta disfunción mitocondrial puede originar a su vez una incapacidad de mantener la producción de ATP necesaria para la célula, lo que a su vez, en el caso del músculo esquelético y cardíaco, va a condicionar alteraciones de la contractibilidad muscular, pudiendo provocar fallo respiratorio y cardíaco, principales manifestaciones clínicas de la sepsis y que, en gran medida, contribuyen a la mortalidad de esta patología. No obstante, no se conoce todavía el papel que pueden jugar las isoformas constitutivas nNOS y c-mtNOS en todo este proceso y que son de vital importancia para un mejor conocimiento de la patogenia de la sepsis y, en consecuencia, para un mejor tratamiento de la misma.

Por otro lado, la melatonina inhibe la expresión y actividad de la iNOS e i-mtNOS, disminuyendo la producción de  $\text{NO}^{\bullet}$ . Además, es un importante depurador de radicales libres tanto de forma directa como indirecta, con una acción destacada a nivel mitocondrial. Por último, en diversos modelos experimentales se ha comprobado que aumenta la función de la cadena respiratoria mitocondrial y la producción de ATP.

## **1. Hipótesis.**

En consecuencia, nuestra hipótesis de trabajo es la siguiente:

- a) Tras la inducción de la sepsis experimental, hay un aumento importante en la expresión de iNOS e i-mtNOS, responsables de la disfunción mitocondrial. La ausencia de nNOS y en consecuencia en c-mtNOS (nNOS<sup>-/-</sup>) no debe afectar al desarrollo de la sepsis experimental y disfunción mitocondrial en estos ratones,



que, deberían ser igualmente sensibles a la sepsis experimental que los ratones nNOS<sup>+/+</sup>.

- b) La melatonina inhibe la expresión y actividad de la iNOS e i-mtNOS, por lo que debe proteger frente al daño oxidativo/nitrosativo mitocondrial, contrarrestando la disfunción mitocondrial en la sepsis, lo que se traducirá en una mejoría significativa del cuadro séptico de manera similar en las cepas de ratones nNOS<sup>+/+</sup> y nNOS<sup>-/-</sup>.

## **2. Objetivos.**

Para comprobar esta hipótesis nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Evaluar la participación las isoformas constitutivas de la NOS, nNOS y c-mtNOS, en la función mitocondrial del corazón durante la sepsis experimental.
2. Evaluar el daño mitocondrial ocurrido durante la sepsis experimental en el músculo cardíaco, mediante el estudio de distintos marcadores de estrés oxidativo/nitrosativo y daño a estructuras celulares, así como la funcionabilidad de las mitocondrias mediante el estudio de la actividad de los complejos de la cadena de transporte electrónico.
3. Evaluar el papel protector y mecanismos de acción de la melatonina en el daño mitocondrial inducido en la sepsis experimental mediante la determinación de todos los parámetros anteriores en ratones, tanto nNOS<sup>+/+</sup> como nNOS<sup>-/-</sup>, tratados con melatonina.

## Materiales y métodos



## **1. Animales, procedimiento quirúrgico y tratamiento.**

### **1.1. Animales y grupos experimentales.**

Para la realización del presente estudio se empleó la cepa de ratones Nos1<sup>tm1Plh</sup> deficiente en la isoforma neuronal de la óxido nítrico sintasa (nNOS<sup>-/-</sup>) y su respectiva cepa control B6129SF2/J (nNOS<sup>+/+</sup>), obtenidas ambas de Jackson's Laboratory a través de Charles Rivers Labs, Barcelona, España. El mantenimiento de dichas cepas se lleva a cabo en el animalario de la Universidad de Granada, en condiciones estériles, bajo un ambiente de fotoperiodo (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 medio que oscila entre los 22-27 g. Todos los experimentos se han realizado acorde a las guías española y europea de cuidado de animales.

Para cada cepa se establecieron 3 grupos experimentales, constituido cada uno de ellos por una población de entre 4-6 ratones:

- a) Grupo control.
- b) Grupo de sepsis.
- c) 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). Tras anestesiarse a los animales con equithesin administrado intraperitonealmente (0,1 mg/kg), se procede a abrir 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. Tras estos pasos, se liga el ciego justo por debajo de la válvula ileocecal y se punciona la superficie cecal antimesentérica. Finalmente, se recoloca el paquete intestinal y se sutura la pared abdominal, aplicándose povidona yodada a la herida.

El tratamiento con melatonina se realiza en base a su administración en 4 dosis de 30 mg/kg de forma secuencial: 30 minutos antes de la operación (vía intraperitoneal), inmediatamente tras la cirugía, y 4 y 8 horas después de la operación (vía subcutánea). Tanto en el grupo de sepsis como en el de sepsis tratado con melatonina, los animales se sacrifican por dislocación cervical pasadas 24 horas de la inducción de la sepsis y, rápidamente y siempre en frío, se extrae el corazón a partir del cual procederemos al aislamiento de la fracción mitocondrial.

## **2. Obtención de la fracción mitocondrial.**

Para el correcto aislamiento de la fracción mitocondrial se emplearon dos métodos; el primero de ellos se caracteriza por ser un método de centrifugación diferencial que nos permitirá la obtención de mitocondrias crudas válidas para todas aquellas medidas en las que no haya interferencia con una posible contaminación citosólica, como es el caso de la determinación de la actividad de los complejos de la cadena de transporte electrónico.

El segundo método igualmente se basa en centrifugaciones diferenciales pero además incorpora un gradiente de densidad de Percoll para así obtener mitocondrias puras, libres de contaminación citosólica. Este método será el usado para la realización del resto de técnicas reflejadas en el presente informe.

## **2.1. Aislamiento de la fracción mitocondrial por centrifugación diferencial.**

Una vez sacrificados los animales y extraído el corazón, se procede a su lavado en solución salina fría y a una breve digestión de 30 segundos en una solución de proteinasa K (1 mg/mL en tampón de aislamiento que contiene sacarosa 250 mM, EDTA 2 mM y Tris 10 mM, ajustado a un pH de 7.4). Seguidamente se vuelve a lavar, pero esta vez con una solución de lavado que contienen albúmina al 0.5 % en tampón de aislamiento. Tras trocear el tejido, se homogeniza 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 (*Beckman Avanti<sup>TM</sup> 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 y a la misma temperatura. El pellet así obtenido se resuspende en 1 mL de tampón de aislamiento y se centrifuga dos veces a 13.000 g durante 3 minutos a 4 °C (*Beckman Avanti<sup>TM</sup> 30, rotor de ángulo fijo F3602*). El pellet resultante corresponde con la fracción mitocondrial cruda que será congelada a -80 °C hasta su posterior utilización.

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

Tras el lavado del tejido en solución salina fría, se realiza una breve digestión de 30 segundos 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 %, ajustado a un pH de 7.4). A

continuación se lava con tampón A, se trocea el tejido y se homogeniza en un homogenizador de teflón (*Stuart Scientific, mod SS2*) a 800 rpm que contiene 6 mL de tampón A. Como en el anterior protocolo de extracción, todas las manipulaciones se realizan en agua helada para mantener una temperatura estable de 4 °C.

Después de dos centrifugaciones (*Beckman Avanti<sup>TM</sup> 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 y a la misma temperatura. El pellet así obtenido se resuspende en 0.5 mL de tampón A y se vierte en un tubo de centrifuga en el cual, previamente, se habrá creado el gradiente de Percoll en base a 1.4 mL de tampón B (manitol 225 mM, EGTA 1mM, HEPES 25 mM y albúmina 0.1%, pH 7.4) y 0.6 mL de Percoll. Se centrifuga (*Beckman Coulter Optima<sup>TM</sup> L-90K, rotor de ángulo fijo 90 TI*) a 95.000 g durante 30 minutos a 4 °C. La banda resultante, 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), se recoge y lava dos veces con tampón A para eliminar restos de Percoll a 10.300 g durante 10 minutos a 4 °C (*Beckman Avanti<sup>TM</sup> 30, rotor de ángulo fijo F3602*). El pellet obtenido corresponde a la fracción mitocondrial pura y será conservada a -80 °C hasta su posterior utilización.

### **3. Metodología analítica.**

#### **3.1. 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 ( $\text{NO}^{\bullet}$  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-( $^3\text{H}$ )-arginina en L-( $^3\text{H}$ )-citrulina durante un tiempo determinado (Bredt y Snyder, 1989).

#### Protocolo:

La fracción mitocondrial se descongela, se resuspende (0,1 g/mL) en un tampón frío compuesto por Tris-HCl 25 mM, DTT 0,5 mM, leupeptina 10  $\mu\text{g/mL}$  (tomada de una disolución inicial de 1 mg/mL en  $\text{H}_2\text{O}$ ), pepstatina 10  $\mu\text{g/mL}$  (tomada de una disolución inicial de 1 mg/mL en DMSO), aprotinina 10  $\mu\text{g/mL}$  (tomada de una disolución inicial de 1 mg/mL en  $\text{H}_2\text{O}$ ) y PMSF 1 mM (tomado de una disolución inicial 500 mM en etanol), a pH 7,6 y se sónica (*Sonuplus HD-2070*). Las muestras se centrifugan entonces a 2.500 g durante 5 min a 4 °C (*Beckman Avanti<sup>TM</sup> 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  $\mu\text{L}$  de estas alícuotas y se les añade (volumen final de reacción 100  $\mu\text{L}$ ):

- 50  $\mu\text{L}$  de un tampón compuesto por Tris-HCl 25 mM, DTT 1 mM,  $\text{H}_4$ -biopterina 30  $\mu\text{M}$ , FAD 10  $\mu\text{M}$ , inosina 0,5 mM, BSA 0,5 mg/mL, cloruro de



calcio 0,1 mM, L-arginina 10  $\mu$ M y L-( $^3$ H)-arginina 40 nM, pH 7,6 (como concentraciones finales en 100  $\mu$ L).

- 10  $\mu$ L de EDTA 10 mM (como concentración final en 100  $\mu$ L) en los tubos para medir iNOS y 10  $\mu$ L de agua en los tubos para medir la NOS total (constitutiva + inducible).

- Agua hasta completar un volumen final de 90  $\mu$ L.

Los tubos se calientan a 37 °C durante 30 minutos a partir de la incorporación de 10  $\mu$ L 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  $\mu$ L 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  $\mu$ L resultantes de todo el proceso, 400  $\mu$ L 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 lava con 1,2 mL de agua. La eficacia de retención de la L-( $^3$ H)-arginina por la columna es superior al 98 %.

Para cuantificar la cantidad de L-( $^3$ H)-citrulina formada se mide la radiación emitida en un contador de radiaciones E, mezclando 600  $\mu$ L del lavado final con 4 mL de líquido de centelleo. El valor de actividad total es proporcionado por la medida de 50  $\mu$ L 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\*mg prot).

### 3.2. Determinación de nNOS e iNOS por western blot.

Una vez descongelada la muestra, e independientemente de que se trate de fracción citosólica o mitocondrial, se resuspende en un tampón de homogenización Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM pH 8 y un cóctel de inhibidores de proteasas compuesto por: leupeptina 10 µg/mL (tomada de una disolución inicial de 1 mg/mL en H<sub>2</sub>O), pepstatina 10 µg/mL (tomada de una disolución inicial de 1mg/mL en DMSO), aprotinina 10 µg/mL (tomada de una disolución inicial de 1 mg/mL en H<sub>2</sub>O) y PMSF 1 mM (tomado de una disolución inicial 500 mM en etanol). Las muestras resuspendidas se sonicán (*Sonuplus HD-2070*). A continuación, tomaremos una pequeña alícuota para determinación de proteínas (Lowry y cols., 1951) y al resto de la muestra se le añadirá SDS 2,5 %, β-mercaptoetanol 5 % y azul de bromofenol 0,01 %, se llevarán a 99 °C durante 5 minutos, se alicuotarán y congelarán a -80 °C hasta la realización del experimento.

Para realizar los western blots se ha utilizado el equipo *Phastsystem<sup>TM</sup>* de *GE Healthcare*, tanto para electroforesis (geles de acrilamida del 7,5%) como electrotransferencia. Una vez transferidas las proteínas a la membrana (*Hybond<sup>TM</sup>-ECL<sup>TM</sup> Nitrocellulose membrane, Amersham Biosciences*), la incubamos 2 horas a temperatura ambiente para bloquearla con un tampón que contiene 5% de leche en polvo, tras lo cual la incubaremos overnight (aproximadamente 14-16 h) en cámara fría con un anticuerpo específico anti-iNOS (*rabbit pAb, Cat. sc-651, Santa Cruz*

*Biotechnology*) (dilución 1/500) o anti-nNOS (*rabbit pAb, Cat. N° 610311, B D Bioscience Pharmingen*) (dilución 1/500) en el mismo medio anterior, lavaremos 3 veces con PBS-Tween durante 5 minutos, realizaremos una incubación con un segundo anticuerpo (*Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)HRP de Thermo SCIENTIFIC*) (dilución 1/5000) en PBS-Tween durante 1 hora, tras lo cual volveremos a lavar igual que antes y añadiremos un reactivo de quimioluminiscencia (*Western Lightning<sup>TM</sup> Plus-ECL de PerkinElmer Inc*) según instrucciones del fabricante. La imagen la digitalizamos en un equipo de imagen (*Image Station 2000R, Eastman Kodak Company*).

### **3.3. Determinación de los niveles intramitocondriales de nitritos.**

Dado que el NO<sup>•</sup> 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<sup>•</sup> reacciona rápidamente con el agua para producir nitritos, siendo su concentración directamente proporcional a la cantidad de NO<sup>•</sup>.

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 se guardan a  $-80^{\circ}\text{C}$  para medir la concentración de proteínas (Lowry y colbs., 1951) o se utilizan inmediatamente para medir la concentración de nitritos. Ésta se mide siguiendo la reacción de Griess (Green y colbs., 1981). Se incubaba en la microplaca 100  $\mu\text{L}$  de reactivo de Griess con 100  $\mu\text{L}$  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<sub>x</sub> 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. 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-hidroxiálquenal (4-HDA), a una temperatura de  $45^{\circ}\text{C}$ . 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, se resuspende en agua y se sonica (*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 N-metil-2-fenilindol 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 exactamente 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 espectrofotómetro de placa (*Bio-Tek Power-Wave<sub>x</sub> 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.

### **3.5. Determinación de proteínas nitrosiladas por western blot.**

Una vez descongelada la muestra, e independientemente de que se trate de fracción citosólica o mitocondrial, se resuspenden en un tampón de homogenización Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM pH 8 y un cóctel de inhibidores de proteasas compuesto por: leupeptina 10 µg/mL (tomada de una disolución inicial de 1 mg/mL en H<sub>2</sub>O), pepstatina 10 µg/mL (tomada de una disolución inicial de 1mg/mL en DMSO), aprotinina 10 µg/mL (tomada de una disolución inicial de 1 mg/mL en H<sub>2</sub>O) y PMSF 1

mM (tomado de una disolución inicial 500 mM en etanol). Las muestras resuspendidas se sonicán (*Sonuplus HD-2070*). A continuación, tomaremos una pequeña alícuota para determinación de proteínas (Lowry y cols., 1951) y al resto de la muestra se le añadirá SDS 2,5 %,  $\beta$ -mercaptoetanol 5 % y azul de bromofenol 0,01 %, se llevarán a 99 °C durante 5 minutos, se alicuotarán y congelarán a -80 °C hasta la realización del experimento.

Para realizar los western blot se ha utilizado el equipo *Phastsystem<sup>TM</sup>* de *GE Healthcare*, tanto para electroforesis (geles de acrilamida del 12,5%) como electrotransferencia. Una vez transferidas las proteínas a la membrana (*Hybond<sup>TM</sup>-ECL<sup>TM</sup> Nitrocellulose membrane, Amersham Biosciences*), la incubamos 2 horas a temperatura ambiente para bloquearla con un tampón que contiene 5% de leche en polvo, tras lo cual la incubaremos overnight (aproximadamente 14-16 h) en cámara fría con un anticuerpo *Anti-Nitrotyrosine Rabbit pAb de Calbiochem* (dilución 1/500) en el mismo medio anterior, lavaremos 3 veces con PBS-Tween durante 5 minutos, realizaremos una incubación con un segundo anticuerpo (*Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)HRP de Thermo SCIENTIFIC*) (dilución 1/5000) en PBS-Tween durante 1 hora, tras lo cual volveremos a lavar igual que antes y añadiremos un reactivo de quimioluminiscencia (*Western Lightning<sup>TM</sup> Plus-ECL de PerkinElmer Inc*) según instrucciones del fabricante. La imagen la digitalizamos en un equipo de imagen (*Image Station 2000R, Eastman Kodak Company*).

### **3.6. Determinación de proteínas carboniladas en mitocondria y citosol.**

Consiste en un western blot en el que vamos a poder visualizar y cuantificar la cantidad de proteínas que se han oxidado por carbonilación, para ello se ha utilizado un

kit comercial Oxibot™ (*Oxyblot Protein Oxidation Detection Kit, Chemicon; Millipore*), basado en el hecho de que una hidracina es capaz de unirse a un grupo carbonilo en medio ácido para dar lugar a una hidrazona, en nuestro caso la dinitrofenilhidrazina se va a unir al grupo carbonilo producido en la oxidación de la proteína para dar lugar a una dinitrofenilhidrazona, éste posteriormente puede ser reconocido por un anticuerpo específico que nos va a poder permitir valorar la cantidad de proteínas que se han oxidado durante el proceso inflamatorio.

#### Protocolo:

Cada fracción mitocondrial se descongela y resuspende en un tampón acuoso con TRIS 10 mM, sacarosa 0,25 mM, EDTA 5 mM, NaCl 50 mM, pirofosfato sódico 30 mM, fluoruro sódico 50 mM, ortovanadato sódico 100  $\mu$ M, con pH 7,4. En el día de su uso se añade DTT 50 mM, y un cóctel de inhibidores de proteasas compuesto por: leupeptina 10  $\mu$ g/mL (tomada de una disolución inicial de 1 mg/mL en H<sub>2</sub>O), pepstatina 10  $\mu$ g/mL (tomada de una disolución inicial de 1mg/mL en DMSO), aprotinina 10  $\mu$ g/mL (tomada de una disolución inicial de 1 mg/mL en H<sub>2</sub>O) y PMSF 1 mM (tomado de una disolución inicial 500 mM en etanol). A la fracción citosólica solamente se añadirá DTT 50 mM y el mismo cóctel de inhibidores de proteasas. Se sonica la fracción mitocondrial (*Sonuplus HD-2070*) y se mide la concentración de proteínas de las muestras (Lowry y cols., 1951), si es necesario se diluirán hasta conseguir una concentración de proteínas de 15-16 mg/mL.

Una vez obtenida la concentración de proteínas requerida pasamos a derivatizar la muestra; para ello se toman 5  $\mu$ L de muestra en un eppendorf pequeño, añadimos 5  $\mu$ L de SDS 12 %, 10  $\mu$ L de dinitrofenilhidrazina y dejaremos incubar la muestra 15 minutos a temperatura ambiente, tras los cuales añadiremos 7,5  $\mu$ L de solución de

neutralización hasta cambio de color del indicador (amarillo a naranja-rojizo). Una vez preparadas las muestras se procede a realizar el western blot, para lo que hemos utilizado un equipo *Phastsystem<sup>TM</sup>* de *GE Healthcare*, tanto para electroforesis (gel acrilamida del 12,5%) como electrotransferencia. Una vez transferidas las proteínas a la membrana (*Hybond<sup>TM</sup>-ECL<sup>TM</sup> Nitrocellulose membrane, Amersham Biosciences*), la bloquearemos durante 2 horas y media a temperatura ambiente con un tampón PBS-Tween que contiene 1% de BSA, tras lo cual la incubaremos overnight (aproximadamente 14-16 h) en cámara fría con anticuerpo 1° (dilución 1/150), capaz de reconocer los grupos dinitrofenilhidrazonas en las proteínas, en el mismo tampón anterior; lavaremos 3 veces con PBS-Tween durante 5 minutos, realizaremos una incubación con anticuerpo secundario (dilución 1/300) en PBS-Tween durante 1 hora, tras lo cual volveremos a lavar igual que antes y añadiremos un reactivo de quimioluminiscencia (*Western Lightning<sup>TM</sup> Plus-ECL de PerkinElmer Inc*) según instrucciones del fabricante. La imagen la digitalizamos en un equipo de imagen (*Image Station 2000R, Eastman Kodak Company*).

### **3.7. Determinación de la actividad de la glutatión peroxidasa (GPx) mitocondrial.**

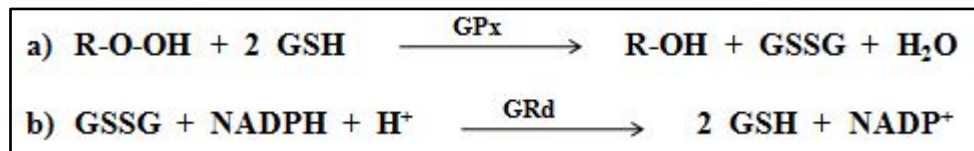
Existen dos tipos de GPx, una dependiente de selenio (Se-GPx) y otra independiente de selenio (iGPx). Ambos tipos pueden usar hidroperóxidos orgánicos (t-BHP, cumeno hidroperóxido) como sustratos, pero sólo la Se-GPx es capaz de utilizar la forma inorgánica (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Lawrence y Burk, 1976).

Algunos autores han descrito que en la mitocondria sólo existe la Se-GPx, mientras que la 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 substrato 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 substrato (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.

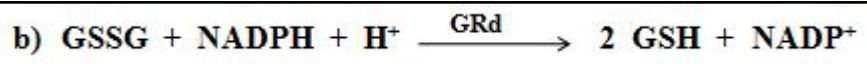
Protocolo:

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 sonicado (*Sonuplus HD-2070*). Alícuotas de estas muestras se guardan a -80 °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 °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 (*Bio-Tek Power-Wave, 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.

### **3.8. Determinación de la actividad de la glutathion reductasa (GRd) mitocondrial.**

La determinación de la actividad de la GRd se realizó siguiendo el método de Jaskot (Jaskot y colbs., 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  $\mu\text{L}$  de esta muestra se añade a 465  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  de solución de trabajo por tampón A. La actividad de la GRd es expresada en nmol NADPH oxidado/min . mg prot.

### **3.9. Medida de los niveles intramitocondriales de glutathion oxidado (GSSG) y glutathion reducido (GSH).**

La cuantificación de GSH y GSSG se realiza mediante el método fluorimétrico de Hissin con algunas leves modificaciones (Hissin y Hilf, 1976). Tras resuspender las fracciones mitocondriales en tampón fosfato-EDTA 100 mM, pH 8; EDTA-Na 2.5 mM, se realizan alícuotas que serán empleadas bien para la determinación de proteínas por el método de Lowry (Lowry y cols., 1951) o bien para cuantificar los niveles intramitocondriales de GSSG y GSH. En este último caso, las muestras a analizar se someten a un proceso de desproteinización con una solución fría de TCA al 10% y se centrifugan a 20.000 g durante 15 minutos (*Beckman Avanti<sup>TM</sup> 30, rotor de ángulo fijo F3602*). Los sobrenadantes así obtenidos serán empleados para la determinación de GSH y GSSG.

Para la cuantificación del GSSG intramitocondrial, se añade a la muestra 12  $\mu\text{L}$  de N-etil maleimida (NEM) preparado como una solución de 40 mM en agua milliQ. A continuación, se incuba durante 40 minutos a temperatura ambiente y, pasado este tiempo, se añade NaOH 0.15 N en el volumen necesario para realizar una dilución 1:3. De aquí, tomamos un volumen de 45  $\mu\text{L}$  y le añadimos 145  $\mu\text{L}$  NaOH 0.15 N y 10  $\mu\text{L}$  de o-phthalaldehído (OPT), realizando en este caso una dilución 1:4.444. El OPT debe prepararse el mismo día del ensayo como una solución de 1 mg/mL en etanol. Se incuba exactamente durante 15 minutos a temperatura ambiente y se mide la fluorescencia empleándose una longitud de excitación de 350 nm y otra de emisión de 420 nm en un espectrofluorímetro de placa (*Bio-Tek FLx800 Fluorescence Microplate Reader*).

En cuanto a los niveles de GSH, 10  $\mu\text{L}$  del sobrenadante obtenido de la centrifugación inicial se incuban con 10  $\mu\text{L}$  de OPT (1mg/mL en etanol) y 180  $\mu\text{L}$  de

buffer fosfato (100 mM fosfato sódico, 5 mM EDTA- $\text{Na}_2$ , pH 8) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Pasado el tiempo de incubación, medimos la fluorescencia emitida por la muestra en un lector de fluorescencia (*Bio-Tek FLx800 Fluorescence Microplate Reader*). empleándose una longitud de excitación de 350 nm y otra de emisión de 420 nm.

En ambos casos, las concentraciones de GSH y GSSG se calculan de acuerdo a curvas estándar de concentraciones conocidas, expresándose los resultados obtenidos en nmol de GSSG o GSH/ mg prot.

### **3.10. Medida de la actividad de los complejos de la ETC.**

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

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

2. Se trata de técnicas colorimétricas, que presentan todas las ventajas de selectividad, reproducibilidad y sensibilidad que derivan de las leyes de Lambert.

3. 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.

### **3.10.1. Determinación de la actividad específica de la NADH ubiquinona oxidorreductasa (complejo I).**

El día de realización de los experimentos, cada fracción mitocondrial se descongela, se resuspende en 350  $\mu\text{L}$  de medio de incubación para la técnica de cada complejo, y se sonica (*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).

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  $\mu\text{M}$  y antimicina 0,8  $\mu\text{M}$ , pH 7,4. La reacción se inicia por la adición de NADH 100  $\mu\text{M}$  (volumen final de reacción 500  $\mu\text{L}$ ) 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 (*Shimadzu spectrophotometer*) (Barrientos, 2002).

### **3.10.2. Determinación de la actividad específica de la succinato:dicloroindofenol oxidorreductasa (complejo II).**

Protocolo:

Para medir la actividad del complejo II (succinato:dicloroindofenol oxidorreductasa, expresado en nmol de dicloroindofenol 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 añaden antimicina 0,8  $\mu\text{M}$ , rotenona 50  $\mu\text{M}$ , KCN 2  $\mu\text{M}$  y DCIP 50  $\mu\text{M}$ .

La reacción se inicia con la adición de decilubiquinona 50  $\mu\text{M}$  (volumen final de reacción 1 mL) y la actividad del complejo II se mide siguiendo la reducción de 2,6-DCIP a 600 nm (*UV1603 Shimadzu spectrophotometer*) (Brusque y cols., 2002).

### **3.10.3. Determinación de la actividad específica de la ubiquinol: citocromo c oxidorreductasa (complejo III).**

Protocolo:

Para medir la actividad del complejo del complejo III (ubiquinol: citocromo c oxidorreductasa, (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,  $\text{MgCl}_2$  5 mM, 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  $\mu\text{M}$  (volumen final de reacción 1 mL). La actividad del complejo III se mide siguiendo la reducción del citocromo c a 550 nm (*UV1603 Shimadzu spectrophotometer* (modificado por nuestro laboratorio de (Brusque y cols., 2002)).

### **3.10.4. Determinación de la actividad específica de la citocromo c oxidasa (complejo IV).**

Protocolo:

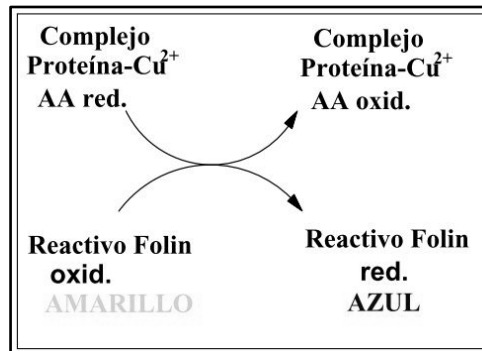
Para medir la actividad específica del complejo IV (citocromo c oxidasa, expresado en nmol citocromo c oxidado/min . mg prot) se incuban alícuotas de la fracción submitocondrial (0,1 mg / mL) en un medio que contiene fosfato potásico 50 mM, pH 6,8. La reacción se inicia por la adición de citocromo c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

### **3.11. Determinación de la concentración de proteínas: Método de Lowry.**

Todos los resultados obtenidos en este trabajo se expresan en función de la concentración de proteínas de la muestra mitocondrial analizada. Para calcular esta concentración de proteínas se utiliza el método de Lowry (Lowry y cols., 1951) con las modificaciones del método de Biuret (Layne, 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 microplacas. Para hacer la recta patrón se utiliza albúmina sérica bovina como estándar (disuelta en TRIS 20 mM) a concentraciones entre 0,05-0,6 mg/mL. En primer lugar, se pone en los pocillos 50  $\mu$ L de blanco, patrones o muestras. A continuación se añade 200  $\mu$ L 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 (*1296-001 Delphia Plateshake*). Finalmente, la reacción se revela con 50  $\mu$ L 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<sub>x</sub> Microplate Scanning Spectrophotometer*). Todas las determinaciones se realizan por duplicado.

#### 4. Análisis estadístico.

Las variables cuantitativas se definieron mediante dos parámetros; la media aritmética, como medida de la tendencia central, y el error estándar, como medida de la dispersión, siendo utilizados de cuatro a seis experimentos por duplicado. Para comparar la media entre los diferentes grupos se ha usado un análisis ANOVA y en



## Materiales y Métodos

cada grupo de estudio se comprobó la hipótesis de normalidad de las distribuciones mediante el test de la t de Student, considerando un valor de P menor de 0,05 como estadísticamente significativo.

## Resultados



## **1. Cambios en la actividad y expresión de las isoformas de la NOS durante la sepsis experimental en ratones nNOS<sup>+/+</sup> y nNOS<sup>-/-</sup>.**

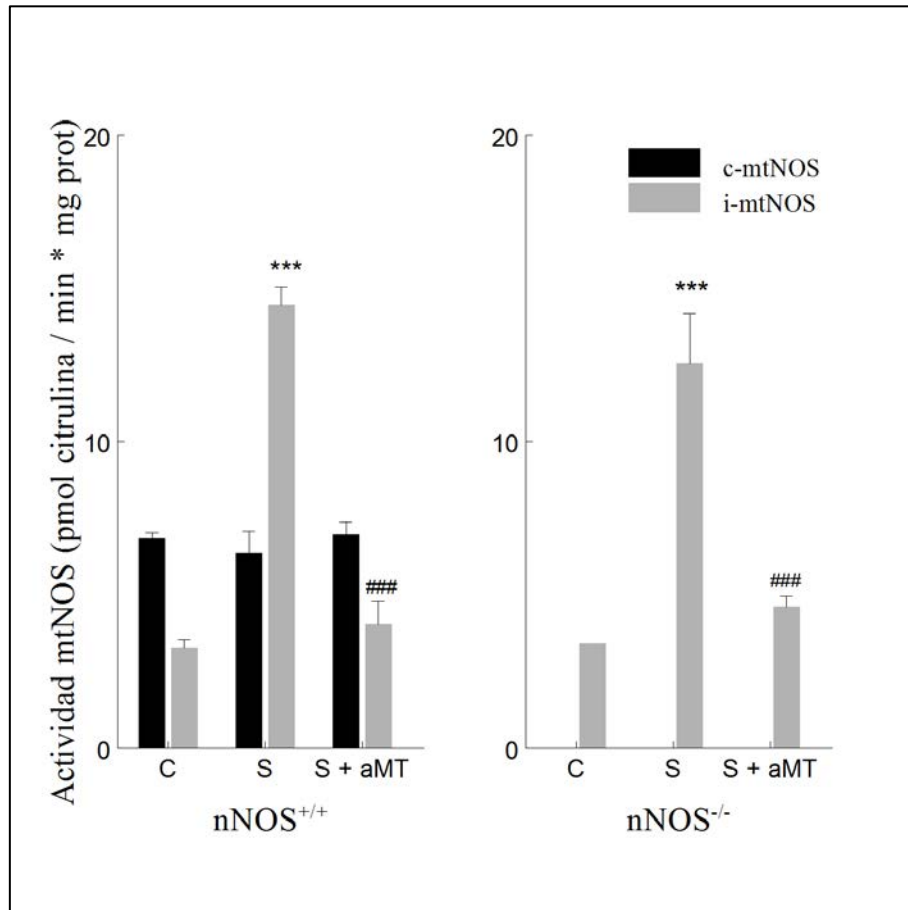
Para estudiar la participación de la nNOS en la fisiopatología mitocondrial de la sepsis experimental, evaluamos primeramente los cambios en la actividad y expresión de la iNOS y nNOS tanto mitocondrial como citosólica en ratones nNOS<sup>+/+</sup> y ratones nNOS<sup>-/-</sup>, así como comprobar los efectos que tiene el tratamiento con aMT durante el shock séptico en la regulación de estas enzimas.

### **1.1. Efecto de deficiencia de nNOS en la actividad de la NOS mitocondrial.**

Los ratones nNOS<sup>+/+</sup> expresan de forma constitutiva dos componentes de la mtNOS en las mitocondrias cardíacas (Figura 1). Estos componentes corresponden a la actividad de la mtNOS Ca<sup>2+</sup>-dependiente (c-mtNOS) y a la actividad Ca<sup>2+</sup>-independiente (i-mtNOS). Como cabía esperar, los ratones deficientes en nNOS sólo expresan i-mtNOS.

Durante la sepsis, tanto los ratones nNOS<sup>+/+</sup> como los nNOS<sup>-/-</sup> muestran un aumento muy significativo ( $P < 0,001$ ) de la actividad i-mtNOS (Figura 1), mientras que la c-mtNOS no va a presentar ningún cambio tras la sepsis comparado con sus respectivos controles.

La administración de melatonina reduce significativamente la actividad de la i-mtNOS ( $P < 0,001$ ) hasta los niveles controles (Figura 1), mientras que no modifica la actividad c-mtNOS.



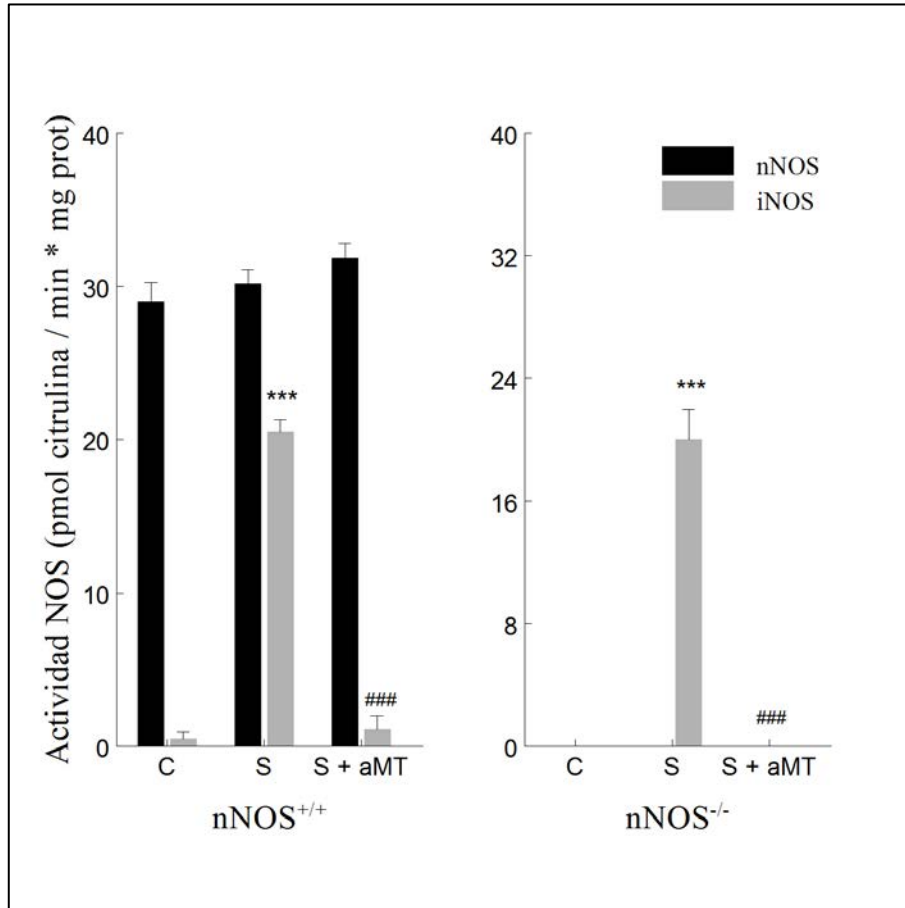
**Figura 1:** Cambios en la actividad de la c-mtNOS e i-mtNOS durante la sepsis en músculo cardíaco de ratones normales (nNOS<sup>+/+</sup>) y ratones deficientes en nNOS (nNOS<sup>-/-</sup>). C= control; S = sepsis; S+aMT = sepsis + melatonina. \*\*\*  $P < 0,001$  vs. control; ###  $P < 0,001$  vs. sepsis.

## 1.2. Efecto de deficiencia de nNOS en la actividad de la NOS citosólica.

Los ratones nNOS<sup>+/+</sup> controles expresan en citosol solamente el componente Ca<sup>2+</sup>-dependiente de la NOS (nNOS) (Figura 2), y esta isoforma desaparece en los ratones nNOS<sup>-/-</sup>.

Durante la sepsis, tanto en ratones nNOS<sup>+/+</sup> como nNOS<sup>-/-</sup>, existe un aumento muy significativo ( $P < 0,001$ ) de la actividad iNOS en citosol de músculo cardíaco, (Figura 2), mientras que la nNOS no cambia en ninguna de las cepas.

La administración de melatonina reduce significativamente la actividad iNOS ( $P < 0,001$ ), hasta alcanzar los niveles controles (Figura 2), mientras que no modifica la actividad nNOS.

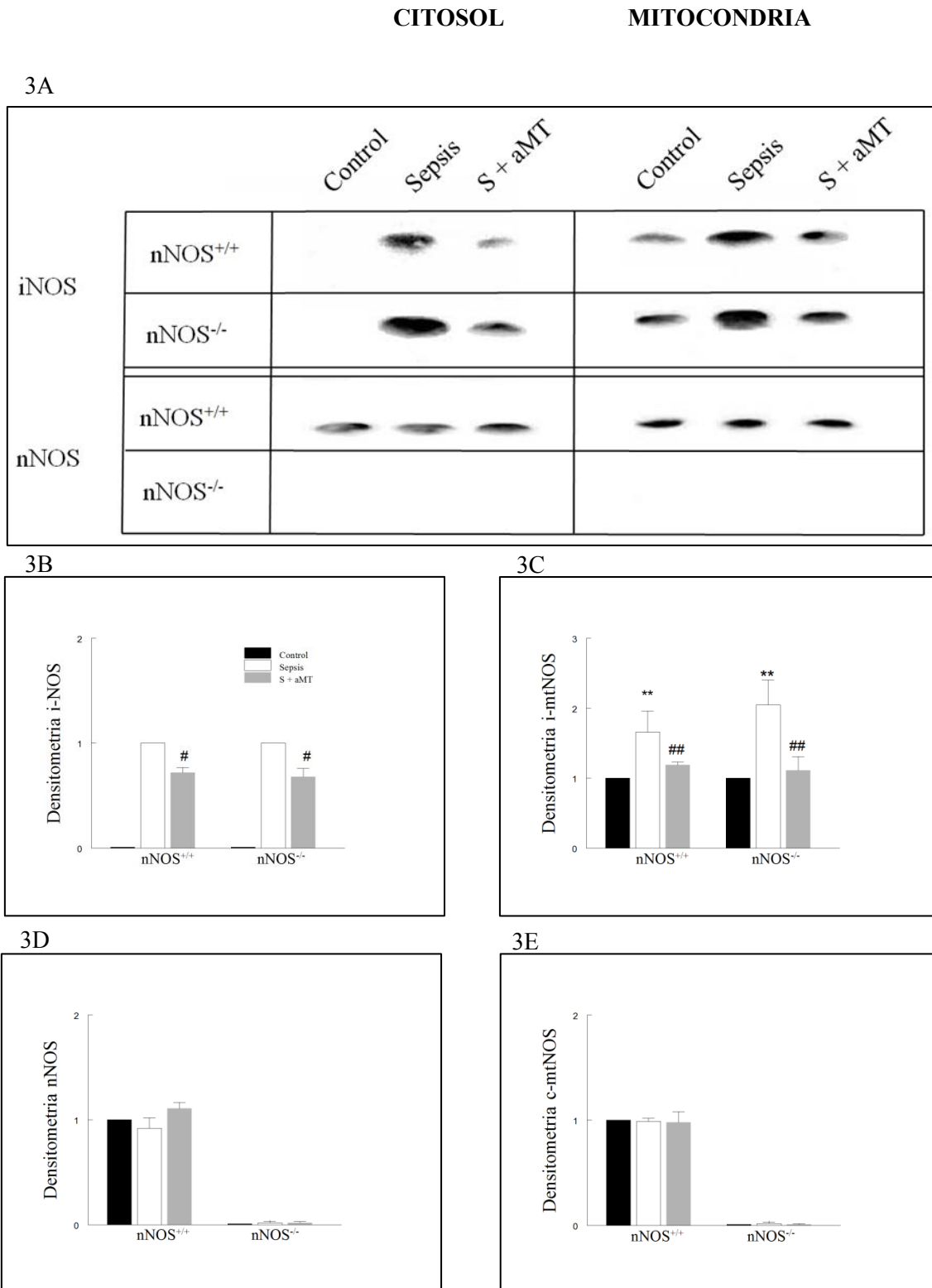


**Figura 2:** Cambios en la actividad iNOS y nNOS durante la sepsis en músculo cardiaco de ratones normales (nNOS<sup>+/+</sup>) y ratones deficientes en nNOS (nNOS<sup>-/-</sup>). C= control; S = sepsis; S+aMT = sepsis + melatonina. \*\*\*  $P < 0,001$  vs. control; ###  $P < 0,001$  vs. sepsis.

### **1.3. Efecto de deficiencia de nNOS en la expresión de la NOS citosólica y mitocondrial mediante western blot.**

La expresión de las distintas isoformas de la NOS se va a comportar de manera análoga a como lo hacen sus respectivas actividades. En efecto, podemos observar la ausencia de expresión de iNOS en citosol de músculo cardíaco de ratones nNOS<sup>+/+</sup> y nNOS<sup>-/-</sup> controles, mientras que la i-mtNOS se expresa constitutivamente en mitocondrias (Figura 3A, 3B y 3C). En cualquier caso, la sepsis experimental produce un aumento importante de la expresión de iNOS y de i-mtNOS, que se previene en los ratones tratados con melatonina.

En cuanto a la expresión de nNOS, no se observaron cambios significativos ni en citosol ni en mitocondria de ratones nNOS<sup>+/+</sup> controles, ratones sépticos o ratones sépticos tratados con melatonina. En ratones deficientes en nNOS, no se detectó expresión de nNOS ni de c-mtNOS (Figura 3A, 3D y 3E).

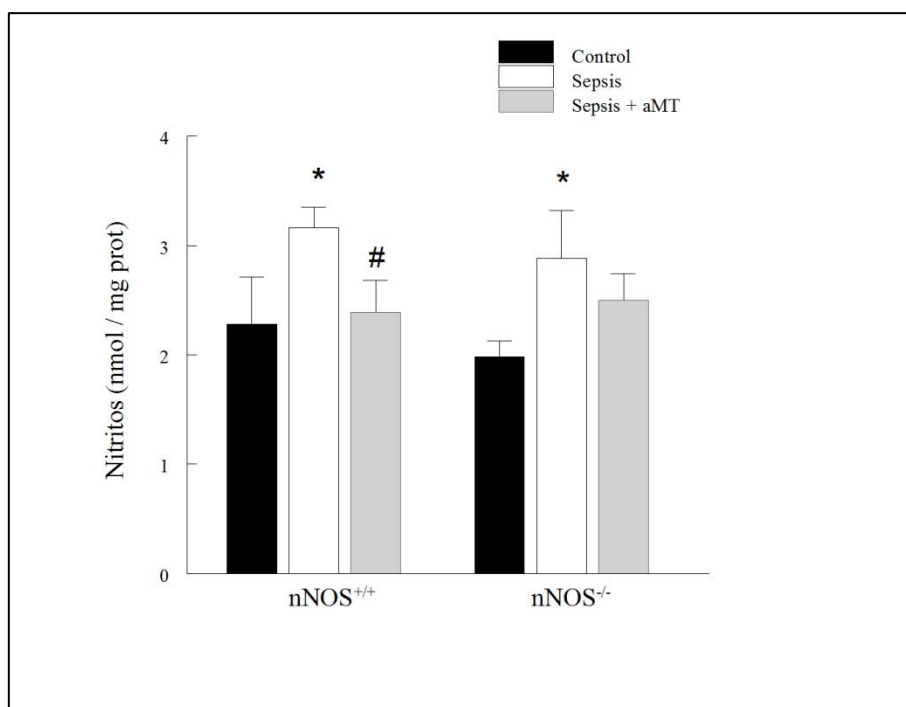


**Figura 3:** Cambios en la expresión iNOS/i-mtNOS y nNOS/c-mtNOS durante la sepsis en músculo cardiaco de ratones normales (nNOS<sup>+/+</sup>) y ratones deficientes en nNOS (nNOS<sup>-/-</sup>). C= control; S = sepsis; S+aMT = sepsis + melatonina. <sup>\*\*</sup>  $P < 0,01$  vs. control; <sup>##</sup>  $p < 0,01$  vs. sepsis; <sup>#</sup>  $p < 0,05$  vs. sepsis



#### 1.4. Efecto de deficiencia de nNOS en los niveles de nitritos en mitocondrias.

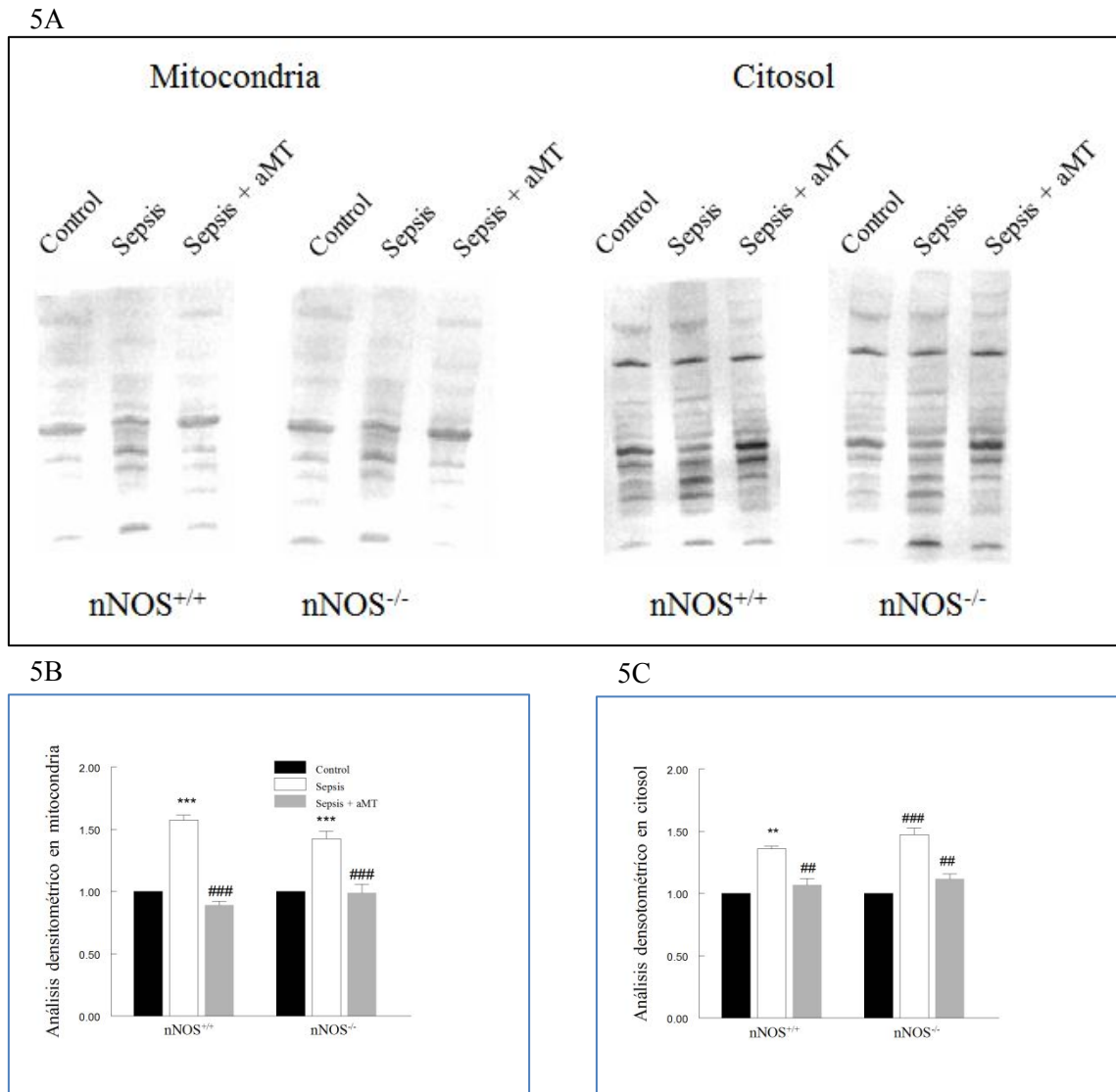
La cantidad de  $\text{NO}^{\bullet}$  formado va a depender de la expresión y actividad de la NOS. Los nitritos son una medida indirecta de la cantidad de  $\text{NO}^{\bullet}$  presente en nuestro caso dentro de la mitocondria y se puede observar que la cantidad de nitritos existentes dentro de la mitocondria se corresponde perfectamente con los resultados descritos anteriormente para la actividad y expresión de la i-mtNOS. Efectivamente, se observa un aumento de  $\text{NO}^{\bullet}$  en mitocondrias de ratones sépticos, tanto  $\text{nNOS}^{+/+}$  como  $\text{nNOS}^{-/-}$ . La administración de melatonina, que previene el aumento de expresión y actividad de la i-mtNOS, también contrarresta el aumento de  $\text{NO}^{\bullet}$ .



**Figura 4:** Cambios en los niveles de nitritos durante la sepsis en mitocondrias de músculo cardíaco de ratones  $\text{nNOS}^{+/+}$   $\text{nNOS}^{-/-}$ . C= control; S = sepsis; S+aMT = sepsis + melatonina. \*  $P < 0,05$  vs. control; #  $< 0,05$  vs. sepsis.

### **1.5. Efecto de deficiencia de nNOS en los niveles citosólicos y mitocondriales de peroxinitritos.**

El  $\text{NO}^{\bullet}$  producido en exceso durante el shock séptico puede reaccionar con el  $\text{O}_2^{\bullet-}$  para dar  $\text{ONOO}^-$ . Ya que los peroxinitritos nitrosilan proteínas, una manera de valorar la cantidad de  $\text{ONOO}^-$  formados en la mitocondria es evaluar la cantidad de proteínas s-nitrosiladas mediante western-blot, utilizando un anticuerpo capaz de reconocer a estas proteínas s-nitrosiladas. Nuestros resultados indican una elevación significativa de los niveles de proteínas s-nitrosiladas tanto en mitocondria como en citosol durante la sepsis en ratones  $\text{nNOS}^{+/+}$  y ratones  $\text{nNOS}^{-/-}$  (Figura 5A, 5B y 5C). Aquí de nuevo se observa cómo la administración de melatonina, al reducir los niveles de  $\text{NO}^{\bullet}$ , también reduce la cantidad de  $\text{ONOO}^-$  producido y por tanto de proteínas s-nitrosiladas.



**Figura 5:** Cambios en los niveles de proteínas s-nitrosiladas durante la sepsis en músculo cardiaco de ratones normales (nNOS<sup>+/+</sup>) y ratones deficientes en nNOS (nNOS<sup>-/-</sup>). C= control; S = sepsis; S+aMT = sepsis + melatonina. \*\*\*  $P < 0,001$  vs. control; \*\*  $P < 0,01$  vs. control; ###  $P < 0,001$  vs. sepsis; ##  $P < 0,01$  vs. sepsis

## **2. Estado redox mitocondrial durante la sepsis experimental en ratones**

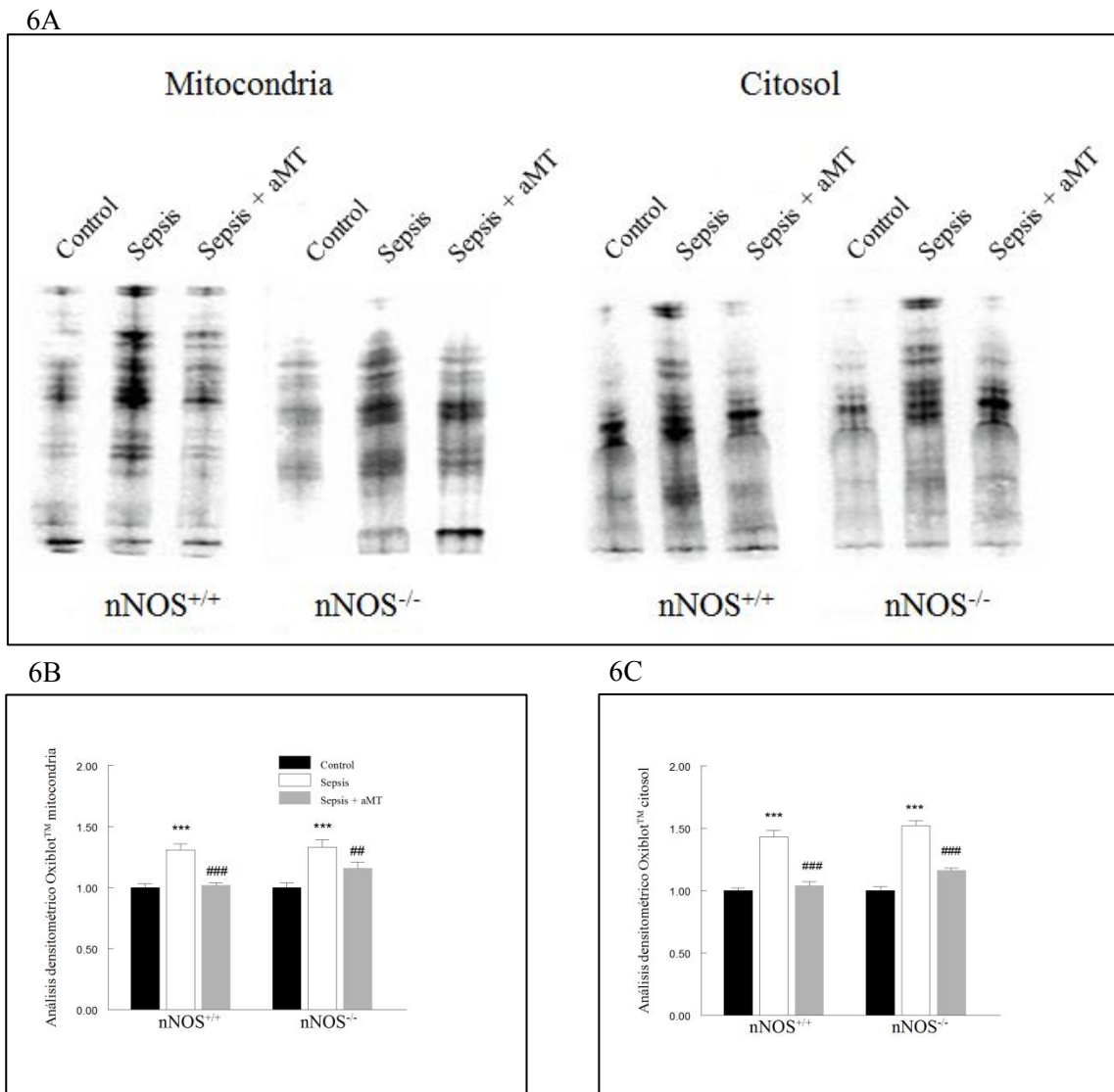
### **nNOS<sup>+/+</sup> y nNOS<sup>-/-</sup>.**

Una vez conocidos los efectos en la regulación de la NOS en la sepsis experimental, el siguiente paso va a ser medir el estado redox en el que se encuentra la mitocondria. Para ello, vamos a utilizar dos parámetros que nos van a dar idea por un lado del grado de oxidación en membranas y por otro del grado de daño en proteínas.

#### **2.1. Efecto de deficiencia de nNOS en los niveles de proteínas oxidadas por carbonilación.**

Es un buen método para determinar daño oxidativo en estructuras como las proteínas. Para ello se realiza un western-blot donde se utiliza un anticuerpo que nos va a permitir visualizar la cantidad de grupos carbonilos presentes en las proteínas a consecuencia del daño por oxidación de algún grupo funcional.

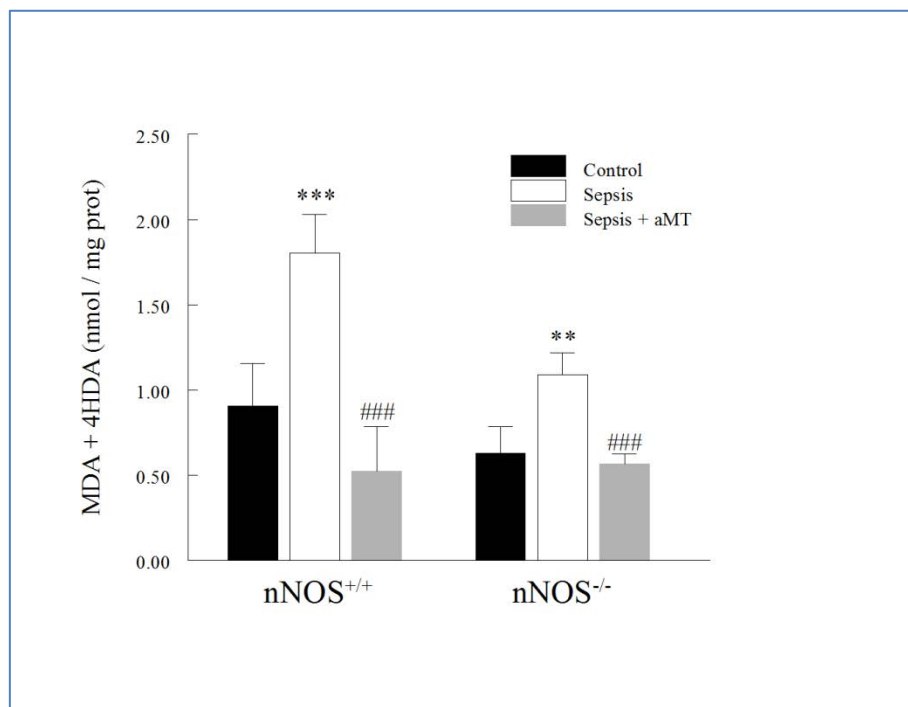
Tanto en citosol como en mitocondria encontramos el mismo comportamiento: existe un aumento significativo ( $P < 0,001$ ) de la cantidad de proteínas dañadas en ratones sépticos, tanto nNOS<sup>+/+</sup> como nNOS<sup>-/-</sup> (Figura 6A, 6B y 6C). Este aumento producido por el proceso oxidativo que acompaña a la sepsis es neutralizado casi por completo mediante la administración de melatonina.



**Figura 6:** Cambios en los niveles de proteínas carboniladas durante la sepsis en músculo cardiaco de ratones normales (nNOS<sup>+/+</sup>) y deficientes en nNOS (nNOS<sup>-/-</sup>). C= control; S = sepsis; S+aMT = sepsis + melatonina. \*\*\*  $P < 0,001$  vs. control; ###  $P < 0,001$  vs. sepsis; ##  $P < 0,01$  vs. sepsis.

## 2.2. Efecto de deficiencia de nNOS en los niveles de peroxidación lipídica.

La peroxidación lipídica nos va a indicar oxidación a membranas, lo que va a influir en su fluidez y por tanto a la funcionalidad de las mismas, por lo que se puede considerar como un buen marcador de daño oxidativo. Midiendo lipoperóxidos en mitocondrias de músculo cardíaco encontramos un aumento significativo en ratones sépticos, tanto nNOS<sup>+/+</sup> ( $P < 0,001$ ) como en ratones nNOS<sup>-/-</sup> ( $P < 0,01$ ). Aquí se pone de nuevo de manifiesto el gran poder antioxidante que posee la melatonina, ya que no sólo es capaz de prevenir la oxidación de las membranas sino que incluso rebaja sus niveles por debajo del control.



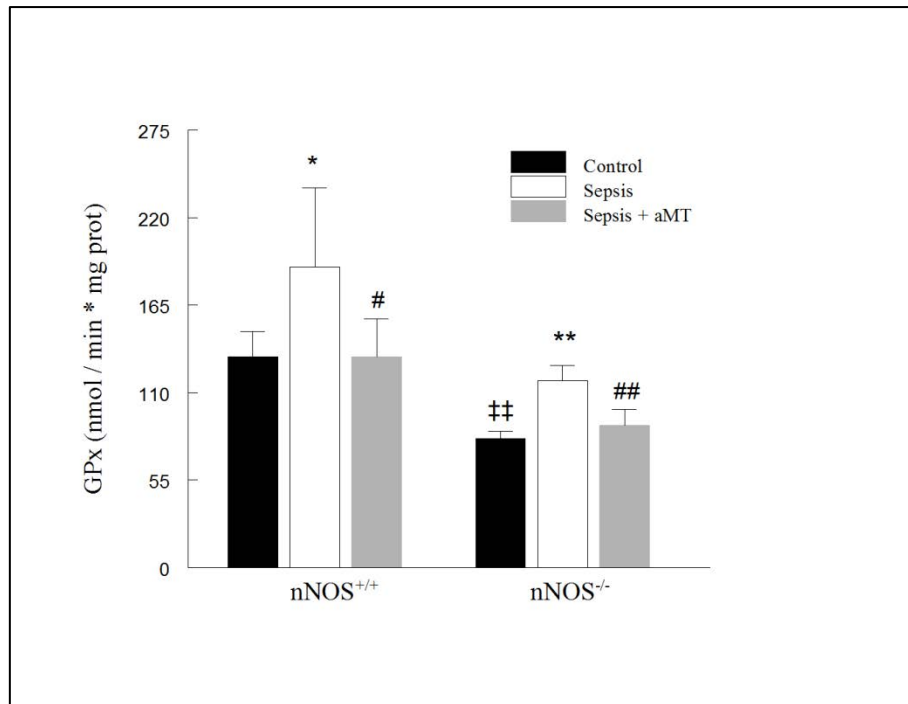
**Figura 7:** Cambios en los niveles de peroxidación lipídica durante la sepsis en músculo cardíaco de ratones normales (nNOS<sup>+/+</sup>) y ratones deficientes en nNOS (nNOS<sup>-/-</sup>). C= control; S = sepsis; S+aMT = sepsis + melatonina. \*\*\*  $P < 0,001$  vs. control; \*\*  $P < 0,01$  vs. control; ###  $P < 0,001$  vs. sepsis.

Para conocer bien el estado redox de un sistema no solo es interesante conocer parámetros que nos indique un mayor o menor estado redox, sino que también se debe conocer en qué estado se mantienen sus sistemas antioxidantes con los que va a combatir la posible alteración de este estado redox. Para ello, vamos a medir el sistema antioxidante del ciclo del glutatión, uno de los más importantes a nivel mitocondrial.

### **2.3. Efecto de deficiencia de nNOS en la regulación de la actividad de glutatión peroxidasa y glutatión reductasa.**

La glutatión peroxidasa es una enzima antioxidante que toma su poder reductor a partir de GSH. En ratones sépticos encontramos un aumento de la actividad de esta enzima, lo que nos va a indicar que la mitocondria está sometida a un alto estrés oxidativo y está utilizando GSH para intentar combatirlo. La administración de melatonina previene este aumento de actividad de la enzima, ya que la propia melatonina es capaz de depurar radicales libres (Figura 8).

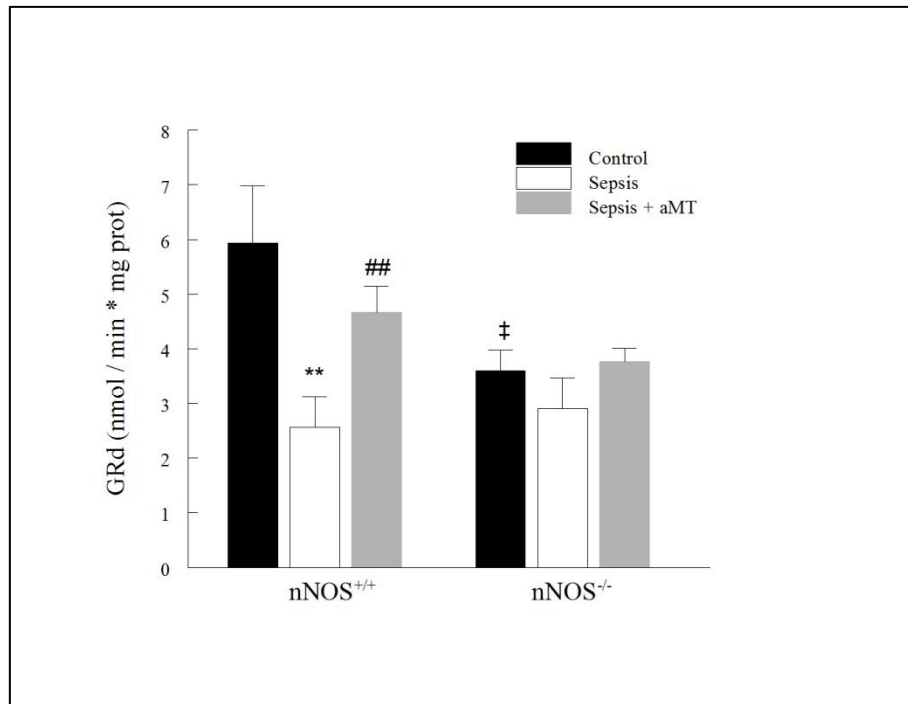
La glutatión reductasa es una enzima antioxidante encargada de reducir el GSSG producido por la glutatión peroxidasa a GSH y así poder ser reutilizarlo de nuevo como poder reductor. En ratones sépticos encontramos una disminución de la actividad de la glutatión reductasa (Figura 9), lo que implica que la glutatión reductasa va a ver mermada su capacidad de reciclaje de GSSG a GSH agravando por tanto el estrés oxidativo mitocondrial. La administración de melatonina también previene la caída en la actividad de la glutatión reductasa.



**Figura 8:** Cambios en la actividad de la glutatión peroxidasa durante la sepsis en mitocondrias de músculo cardiaco de ratones normales (nNOS<sup>+/+</sup>) y ratones deficientes en nNOS (nNOS<sup>-/-</sup>). C= control; S = sepsis; S+aMT = sepsis + melatonina. \*\*  $P < 0,01$  vs. control; \*  $P < 0,05$  vs. control; ##  $P < 0,01$  vs. sepsis; #  $P < 0,05$  vs. sepsis; ††  $P < 0,001$  vs. control nNOS<sup>+/+</sup>.



## Resultados



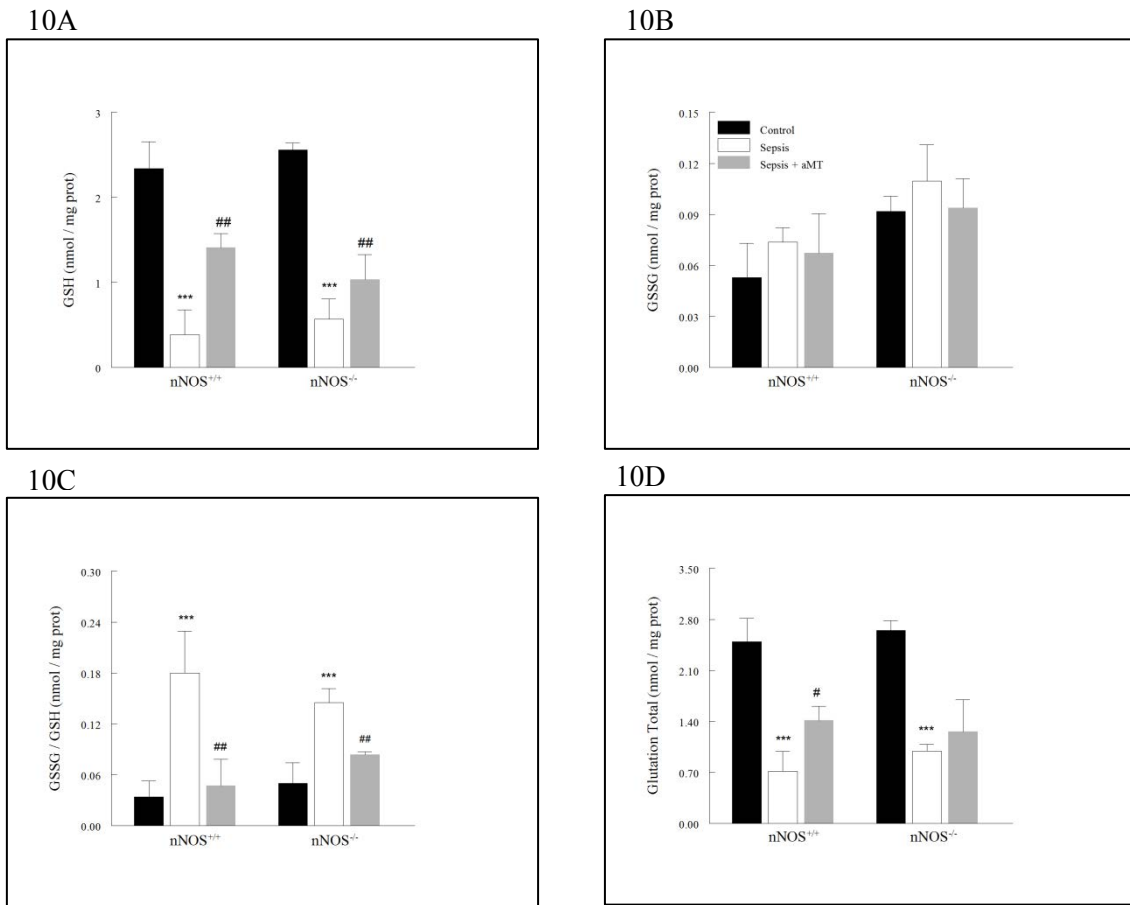
**Figura 9:** Cambios en la actividad de la glutatión reductasa durante la sepsis en mitocondrias de músculo cardiaco de ratones normales (nNOS<sup>+/+</sup>) y ratones deficientes en nNOS (nNOS<sup>-/-</sup>). C= control; S = sepsis; S+aMT = sepsis + melatonina. \*\*  $P < 0,01$  vs. control; ##  $P < 0,01$  vs. sepsis; ‡  $P < 0,01$  vs. control nNOS<sup>+/+</sup>.

#### **2.4. Efecto de deficiencia de nNOS en la regulación de los niveles de glutathion reducido y glutathion oxidado.**

Lo primero que podemos observar es una disminución muy significativa ( $P < 0,001$ ) de los niveles de GSH tanto en ratones nNOS<sup>+/+</sup> y ratones nNOS<sup>-/-</sup> durante la sepsis (Figura 10A). Al mismo tiempo, la sepsis produjo una subida, aunque no significativa, del GSSG (Figura 10B). Estos datos indican que existe una bajada en los niveles totales de glutathion de los que dispone la mitocondria ( $P < 0,001$ ), debido a que no todo el glutathion reducido presente en la mitocondria consigue pasar a su forma oxidada, es decir, hay destrucción de glutathion durante el shock séptico. La administración de melatonina es capaz de prevenir parcialmente este descenso de glutathion durante la sepsis.

Un marcador que define muy bien el estado redox de un sistema es el índice GSSG/GSH. En nuestro caso, encontramos un aumento muy significativo ( $P < 0,001$ ) de dicho cociente en ratones nNOS<sup>+/+</sup> y ratones nNOS<sup>-/-</sup> tras la sepsis (Figura 10C), que de nuevo es contrarrestado por la melatonina.

## Resultados



**Figura 10:** Cambios en los niveles de glutatión reducido, glutatión oxidado e índice GSSG / GSH durante la sepsis en mitocondrias de músculo cardíaco de ratones normales (nNOS<sup>+/+</sup>) y ratones deficientes en nNOS (nNOS<sup>-/-</sup>). C= control; S = sepsis; S+aMT = sepsis + melatonina. \*\*\*  $P < 0,001$  vs. control; \*\*  $P < 0,01$  vs. sepsis; #  $P < 0,05$  vs. sepsis.

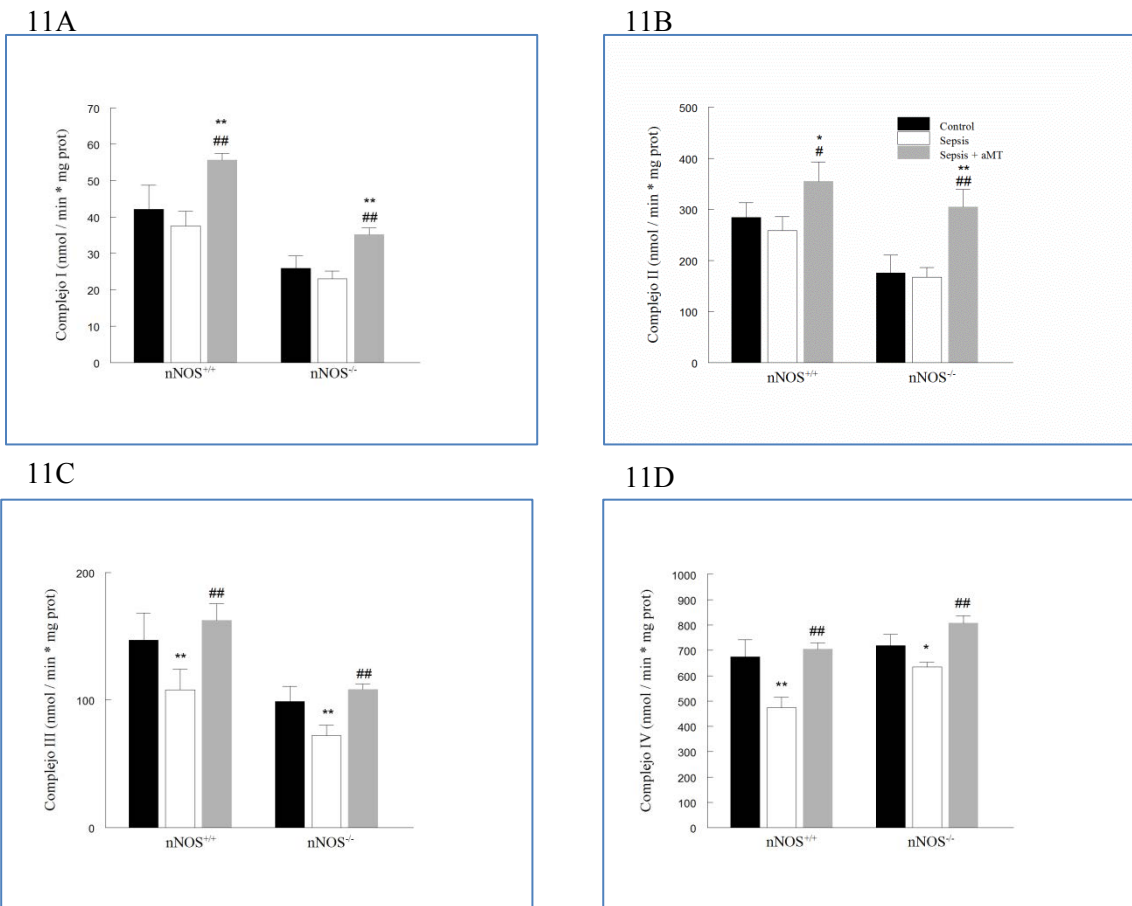
### **3. Cambios en la bioenergética mitocondrial durante la sepsis experimental en ratones nNOS<sup>+/+</sup> y nNOS<sup>-/-</sup>.**

Una vez definido el estado redox en el que se encuentra la mitocondria, nos propusimos medir como se afectaba la función mitocondrial durante la sepsis en ausencia del gen para la nNOS. Para ello, se midió la actividad de los cuatro complejos de la cadena de transporte electrónico.

#### **3.1. Efecto de deficiencia de nNOS en la regulación de la actividad de los complejos de la cadena de transporte electrónico.**

Observamos que la actividad de los complejos III y IV disminuye significativamente durante la sepsis tanto en ratones nNOS<sup>+/+</sup> ( $P < 0,01$ ) como nNOS<sup>-/-</sup> (CI  $P < 0,01$ ; CII  $P < 0,05$ ) (Figura 11C y 11D). La actividad de los complejos I y II (Figura 11A y 11B) también disminuye en ambas cepas durante la sepsis, aunque no de manera significativa. En cualquier caso lo que sí es significativo es el aumento de actividad de todos los complejos respiratorios tras el tratamiento con melatonina, llegando en la mayoría de los casos por encima del valor de actividad de los controles respectivos.

## Resultados



**Figura 11:** Cambios en la actividad de los cuatro complejos que componen la cadena de transporte electrónico durante la sepsis en músculo cardiaco de ratones normales (nNOS<sup>+/+</sup>) y ratones deficientes en nNOS (nNOS<sup>-/-</sup>). C= control; S = sepsis; S+aMT = sepsis + melatonina. \*\*  $P < 0,01$  vs. control; \*  $P < 0,05$  vs. control; ##  $P < 0,01$  vs. sepsis.

Discusión



Los resultados de este estudio aportan evidencias clarificadoras sobre la participación de la isoforma de la óxido nítrico sintasa neuronal, nNOS, en el fallo mitocondrial durante la sepsis. Hemos elegido el músculo cardíaco para este estudio debido a la gran importancia que va a tener el corazón en el desarrollo del fallo multiorgánico en la sepsis (Levy, 2007), así como el profundo daño mitocondrial que hemos podido observar en células cardíacas durante la sepsis en trabajos anteriores (López y colbs., 2006b; Escames y colbs., 2007; Escames y colbs., 2006b). Nuestros datos muestran que, después de inducir la sepsis a ratones mediante ligadura y punción ileocecal, modelo experimental que produce una serie de cambios bioquímicos y hemodinámicos que se asemejan mucho a los presentes en la clínica humana (Remick y colbs., 2000; Riedemann y colbs., 2003; Overhaus y colbs., 2004), tanto los ratones nNOS<sup>+/+</sup> como los nNOS<sup>-/-</sup> presentan el mismo grado de daño mitocondrial. Ello sugiere que la nNOS/c-mtNOS no va a tener una participación significativa en el proceso inflamatorio cardíaco tras la sepsis, que depende principalmente de la iNOS/i-mtNOS. Además nuestro estudio demuestra los efectos beneficiosos de la administración de melatonina, que devuelve la función mitocondrial a su estado normal. Los resultados asimismo muestran que los efectos de la melatonina provienen no sólo de sus efectos antioxidantes (Tan y colbs., 1993; Reiter, 1997; Tan y colbs., 2000b; Reiter y colbs., 2003b) sino también de su capacidad de inhibir la expresión de iNOS/i-mtNOS, protegiendo frente al aumento excesivo de NO<sup>•</sup> (Crespo y colbs., 1999; Escames y colbs., 2006b; Escames y colbs., 2006a; López y colbs., 2006b; Alonso y colbs., 2006; Escames y colbs., 2007; Acuna-Castroviejo y colbs., 2007; Acuna-Castroviejo, D. y colb., 2008; Tamura y colbs., 2009), y aumentar la actividad de la cadena respiratoria (López y colbs., 2006a; López y colbs., 2006b; Escames y colbs., 2007).



En este trabajo hemos medido la actividad de la mtNOS y cuál puede ser su implicación en la función mitocondrial durante la sepsis. Escames y colbs. defienden que dentro de la mitocondria podemos encontrar una isoforma constitutiva (c-mtNOS) y otra inducible (i-mtNOS) de la NOS (Escames y colbs., 2006b). Nuestros resultados apoyan la existencia de esas dos isoformas dentro de la mitocondria. Una, la c-mtNOS, que va a producir NO<sup>•</sup> en concentraciones adecuadas para regular la respiración a través de la modulación de la actividad del complejo IV, y cuya actividad no se va a afectar durante la sepsis, y otra, la i-mtNOS, que se activa y produce una alta concentración de NO<sup>•</sup> que va a conllevar un estado alto de estrés oxidativo/nitrosativo durante la sepsis. La administración de melatonina disminuye la actividad de la i-mtNOS en ratones normales tras la sepsis (Escames y colbs., 2003; López y colbs., 2006b), mientras que afecta mínimamente a la isoforma constitutiva; en los ratones deficientes en nNOS, la melatonina ejerce el mismo efecto que en ratones normales, disminuyendo la actividad de la isoforma inducible. En estos ratones deficientes en nNOS, como era de esperar, no encontramos actividad constitutiva. Esos datos, basados en la medida de la actividad y expresión de ambas isoformas de la NOS, demuestran una vez más la inexistencia de la banda correspondiente a la c-mtNOS en mitocondrias cardíacas de ratones deficientes de nNOS, lo que apoya todavía más que la c-mtNOS proviene de su homóloga citosólica nNOS (Elfering y colbs., 2002; Haynes y colbs., 2004). Cuando se administra melatonina disminuye la expresión de la i-mtNOS en ratones nNOS<sup>+/+</sup> y nNOS<sup>-/-</sup> sépticos hasta los niveles basales, mientras que la isoforma constitutiva no se ve alterada en los primeros.

Tras la sepsis, esta inducción de la i-mtNOS debería traducirse en una elevación de los niveles intramitocondriales de NO<sup>•</sup>. Efectivamente, cuando valoramos los niveles de nitritos, una medida indirecta de la concentración de NO<sup>•</sup> presente en el medio,

encontramos una elevación de aquellos en el grupo de ratones séptico. Aquí tenemos que resaltar que aunque existe una elevación de sus niveles, ésta es menor que la que se produce en otros tejidos como diafragma y músculo esquelético, donde dicha elevación es más aparente (Escames y colbs., 2006c; López y colbs., 2006b). Para intentar explicar este comportamiento, hay que tener en cuenta que el músculo cardíaco es un tejido que requiere una gran demanda energética y por tanto necesita una proporción de mitocondrias mayor que otros tejidos, con lo que podemos suponer que también producirá una mayor cantidad de  $O_2^{\cdot-}$ . Éste reacciona rápidamente con el  $NO^{\cdot}$  formando  $ONOO^-$  (Cadenas y colbs., 2000) y disminuyendo por tanto su concentración. Además, los  $ONOO^-$  pueden reaccionar con la  $BH_4$ , un cofactor necesario para la activación de las óxido nítrico sintasas, conduciendo a la formación de radical  $BH_3^{\cdot}$  (Kuzkaya y colbs., 2003). Por tanto, la oxidación de la  $BH_4$  por parte de los  $ONOO^-$  es causa de disociación parcial de la NOS, lo cual a su vez incide en un descenso de la producción de  $NO^{\cdot}$  y un aumento paralelo de la producción de  $O_2^{\cdot-}$  (Kuzkaya y colbs., 2003; Kumagai y colbs., 2004). Todo ello llevaría a un aumento de los niveles de  $ONOO^-$ . Para verificar esta hipótesis, medimos la cantidad de proteínas s-nitrosiladas por  $ONOO^-$  presentes en la mitocondria, lo que nos indicó que efectivamente existe un aumento de dichas proteínas tanto en ratones  $nNOS^{+/+}$  como  $nNOS^{-/-}$ . Estos datos se demuestran también tras el tratamiento con melatonina que, al inhibir la expresión y actividad de la i-mtNOS sin afectar a la c-mtNOS, reduce también los niveles de nitritos tanto en los ratones  $nNOS^{+/+}$  como los  $nNOS^{-/-}$ . En este caso, también disminuyen las proteínas s-nitrosiladas.

Todos estos cambios bioquímicos que se producen en la mitocondria de ratones sépticos van a resultar en un aumento importante de estrés oxidativo que tiene que soportar la mitocondria y la célula. Dos parámetros importantes que se pueden utilizar

## Discusión

para describir el estado redox de un sistema son: la medida de grupos carbonilos, concretamente un método basado en western blot en la que utilizamos un anticuerpo para determinar proteínas que han sido oxidadas por carbonilación (Levine y cols., 2000), y los niveles de lipoperóxidos, que nos van a indicar oxidación de los lípidos de las membranas, que pueden afectar a su fluidez y por tanto a su funcionalidad (Szabo, 2003). Nuestros resultados muestran un aumento en la proporción de proteínas oxidadas, tanto en las células de ratones sépticos nNOS<sup>+/+</sup> como en ratones nNOS<sup>-/-</sup>, lo que también se corresponde con un aumento paralelo en los niveles de lipoperóxidos en mitocondrias de corazón. En consecuencia, el alto estrés oxidativo que tiene que soportar la célula durante la sepsis va a provocar daño en estructuras clave como proteínas y lípidos (Viner y cols., 1999), lípidos (Radi y cols., 1991; Rubbo y cols., 1994; Stadtman y Levine, 2003) e incluso ADN (Byun y cols., 1999), con lo que se altera el normal funcionamiento de la célula.

La administración de melatonina, bien conocida como antioxidante y antiinflamatorio, previene los daños producidos por el elevado estrés oxidativo que tiene que soportar la mitocondria y la célula en general durante la sepsis, mejorando incluso los valores basales en el caso de los lipoperóxidos de membrana, con lo que la mitocondria mejora su función, previniendo una posible depleción energética y muerte celular (Brown y Borutaite, 2001; Turrens, 2003).

Durante la sepsis se afecta significativamente la cadena de transporte electrónico mitocondrial. En condiciones fisiológicas el NO<sup>•</sup> actúa como regulador de complejo IV mediante una inhibición reversible por competición con el oxígeno al sitio de unión a este complejo (Boveris y cols., 2000; Brown, 2001). En estas condiciones, los tejidos se oxigenan en el rango de 20  $\mu$ M de O<sub>2</sub>, con una relación [O<sub>2</sub>] / [NO<sup>•</sup>] de 500 a 1000. En estas condiciones, el complejo IV se inhibe entre un 16 y un 26% (Boveris y cols.,

2000). Sin embargo, en la sepsis, el NO<sup>•</sup> producido en exceso por la iNOS/i-mtNOS provoca una importante disfunción mitocondrial (Brealey y colbs., 2004; Callahan y Supinski, 2005; Escames y colbs., 2006a; López y colbs., 2006a; López y colbs., 2006b; Escames y colbs., 2007; Levy, 2007), debido al daño producido por radicales libres en membranas y complejos de la cadena de transporte electrónico. Además, los niveles elevados de NO<sup>•</sup> inhiben aún más el complejo IV, llegando incluso a inhibir al resto de complejos de la cadena respiratoria (Poderoso y colbs., 1996). Esta inhibición de la transferencia electrónica trae como consecuencia un mayor escape de electrones y la formación de más O<sub>2</sub><sup>•-</sup> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Poderoso y colbs., 1996; Poderoso y colbs., 1998) que pueden dañar nuevos componentes mitocondriales y/o difundir fuera de la mitocondria y actuar como señal de apoptosis (Carreras y Poderoso, 2007). A su vez, el NO<sup>•</sup> reacciona con el O<sub>2</sub><sup>•-</sup> formando ONOO<sup>-</sup> que dañan irreversiblemente todos los complejos de la cadena de transporte electrónico (Brown, 1999; Brown, 2001). Por tanto, podemos ver que los efectos mitotóxicos ocurren cuando la sobreexpresión de la i-mtNOS y el consiguiente aumento en los niveles de NO<sup>•</sup> y ONOO<sup>-</sup> producen inactivación de proteínas mitocondriales, s-nitrosilaciones y daño en centros FeS (Pearce y colbs., 2001; Brown y Borutaite, 2004).

Todas estas observaciones son perfectamente aplicables a nuestros resultados ya que el aumento de la expresión de la i-mtNOS va acompañado de un aumento en los niveles de NO<sup>•</sup> que va a provocar una reducción cercana al 30% de los complejos III y IV de la cadena de transporte electrónico tanto en ratones nNOS<sup>+/+</sup>, como en ratones nNOS<sup>-/-</sup>, y una menor reducción de la actividad de los complejos I y II.

Ya hemos visto antes que la melatonina es capaz de inhibir la expresión y la actividad de la iNOS e i-mtNOS durante la sepsis, previniendo de una elevación de los niveles de NO<sup>•</sup>, por lo que también debe prevenir el daño producido por este NO<sup>•</sup> sobe

la cadena respiratoria. En efecto, nuestros resultados muestran que incluso la actividad de los complejos respiratorios aumenta por encima de los controles, lo que ya se había demostrado en otros modelos experimentales, y que depende de la dosis de melatonina (Martín y colbs., 2000b; Acuna-Castroviejo y colbs., 2001; Acuna-Castroviejo y colbs., 2005). En los complejos I y II este aumento de la actividad es especialmente notorio. En estos efectos de la melatonina sobre la actividad de los complejos respiratorios podríamos pensar que no sólo depende del efecto estimulante de la melatonina sobre ellos, sino que también hay que tener en cuenta el alto potencial redox de la hormona (0,74 V) (Tan y colbs., 2000b), lo que podría permitirle donar y aceptar electrones por sí misma aumentando el flujo electrónico. El hecho de que la melatonina se pueda intercalar entre los lípidos de las membranas celulares y, en este caso, de la membrana interna mitocondrial, avala esta hipótesis (Venegas y colbs., 2011).

Para contrarrestar la generación de ROS y RNS y protegerse de ellos, la mitocondria posee sus propios sistemas antioxidantes, entre los que destaca el ciclo del glutatión. Este sistema es uno de los más importantes debido a que es la principal vía mitocondrial para depurar el  $H_2O_2$ . El sistema del glutatión 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. Nosotros hemos observado un aumento de GPx en ratones nNOS<sup>+/+</sup> y ratones nNOS<sup>-/-</sup> durante la sepsis, lo que conlleva al consumo por oxidación del GSH presente en la mitocondrias. Además, existe una disminución de la actividad de la GRd mitocondrial en ratones sépticos, ya que este enzima se daña fácil e irreversiblemente por los radicales libres. Por tanto, el GSSG generado por la GPx no puede volver a ser reciclado a GSH, mermando su capacidad antioxidante (Martín y colbs., 2000a; Anderson y Sims, 2002; Brealey y colbs., 2002). Todo ello se va a reflejar en un aumento del cociente GSSG/GSH, que es un marcador muy fiable del estado redox de la

mitocondria, lo que deja en evidencia que el sistema antioxidante del glutathion no va ser capaz de depurar todos los radicales libres que se producen durante la sepsis. Nuestros resultados confirman que la sepsis promueve la producción de radicales libres y aumento de estrés oxidativo en la mitocondria (Álvarez y Boveris, 2004), y que la producción de  $\text{NO}^{\bullet}$  va a jugar un papel crucial en el fallo mitocondrial durante la enfermedad (Crouser y cols., 2002; Crouser, 2004). Álvarez y Bóveris (2004) 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 la detoxificación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en la mitocondria ocurre principalmente por el sistema del glutathion y no por la catalasa (Antunes y cols., 2002), pero hay que tener en cuenta que ante un aumento importante de  $\text{NO}^{\bullet}$  y  $\text{O}_2^{\bullet-}$  como el producido durante la sepsis, la SOD también se va a afectar, inhibiéndose (Demicheli y cols., 2007).

Los efectos antioxidantes e inflamatorios que posee la melatonina tanto en mitocondrias como en células (Tan y cols., 2000a; Acuna-Castroviejo y cols., 2001; Acuna-Castroviejo y cols., 2002; Reiter y cols., 2003b), con especial referencia al músculo esquelético y cardíaco (Rodríguez y cols., 2007a; Giacomo y Antonio, 2007), posibilitan el aumento de la actividad de los complejos respiratorios mitocondriales (Escames y cols., 2003; Escames y cols., 2006b; Escames y cols., 2007; López y cols., 2009). Además, su capacidad de prevenir la oxidación de lípidos y proteínas en las mitocondrias de células cardíacas, (Tan y cols., 2000b; Tan y cols., 2000a; Acuna-Castroviejo y cols., 2002), y de restaurar el contenido de glutathion en mitocondrias incubadas *in vitro* con agentes como el t-butil hidroperóxido, un potente agente prooxidante (Martín y cols., 2000a), hacen pensar que la administración de melatonina debe ser igualmente efectiva para contrarrestar el aumento de radicales libres y el daño provocado por durante la sepsis.

Nuestros datos muestran que también *in vivo*, la administración de melatonina a ratones normales y deficientes en nNOS restaura el contenido de GSH mitocondrial al normalizar las actividades de los enzimas del ciclo redox del glutatión. Por tanto, la melatonina previene el daño mitocondrial en la sepsis actuando a varios niveles: depurando radicales libres (Tan y colbs., 1993; Tan y colbs., 2000a; Acuna-Castroviejo y colbs., 2002; Reiter y colbs., 2003a; Reiter y colbs., 2003b); estimulando los sistemas antioxidantes como los enzimas del ciclo del glutatión, GPx y GRd (Barlow-Walden y colbs., 1995; Reiter, 1995; Blask y colbs., 1997; Martín y colbs., 2000a; Escames y colbs., 2003; Escames y colbs., 2006b; Escames y colbs., 2007), y otras enzimas antioxidantes (Antolín y colbs., 1996; Acuna-Castroviejo y colbs., 2001; Reiter y colbs., 2003b; León y colbs., 2004), y previniendo el exceso de NO<sup>\*</sup> (Crespo y colbs., 1999; Escames y colbs., 2003; Escames y colbs., 2006b; López y colbs., 2006b; Acuna-Castroviejo y colbs., 2007). Además, la melatonina puede tener un efecto beneficioso adicional sobre el GSH mitocondrial, ya que aumenta la síntesis del GSH a través de la inducción de la  $\gamma$ -glutamilcisteína (Urata y colbs., 1999).

Todos estos efectos de la melatonina, en última instancia, se van a traducir en una mejora de la homeostasis mitocondrial alterada durante la sepsis (Martín y colbs., 2000b; Castillo y colbs., 2005); aumento de los niveles de ATP (López y colbs., 2006a), y disminución del estrés oxidativo que tienen que soportar las células, aumentando la supervivencia de las mismas (Escames y colbs., 2007).

En conclusión, nuestros datos sugieren que la isoforma constitutiva nNOS no está relacionada con el daño oxidativo y disfunción mitocondrial producidos en las células cardíacas de ratones durante la sepsis, ya que la ausencia de la misma no produce cambios significativos en dicho daño. Además, nuestros resultados refuerzan los datos publicados anteriormente en otros estudios indicando que la ausencia de iNOS

(en ratones deficientes en esta isoforma), protegía a los ratones de la sepsis (López y colbs., 2006a; López y colbs., 2006b; Escames y colbs., 2006b; Escames y colbs., 2007), evidenciando que el NO<sup>\*</sup> producido por la iNOS si era responsable directo de la disfunción mitocondrial. En el desarrollo de la sepsis, la disfunción cardiaca es un elemento importante que puede elevar su mortalidad (Blanco y colbs., 2008), por lo que un mejor conocimiento de la fisiopatología de la sepsis ayudará a combatirla en mejores condiciones. En este sentido, el empleo de melatonina podría ayudar significativamente a prevenir la disfunción mitocondrial durante la sepsis, ayudando a reducir la mortalidad de esta patología (Escames y colbs., 2007).

Los resultados de este estudio demuestran que la inhibición del estrés oxidativo mitocondrial por la administración de melatonina va pararelo a la inhibición del proceso inflamatorio durante la sepsis, lo que resulta en la normalización de la bioenergética mitocondrial y de la función cardíaca (Zang y colbs., 2012)





**Conclusiones**



1. Las mitocondrias del miocardio poseen una mtNOS con dos isoformas, i-mtNOS y c-mtNOS. Ambas isoformas se expresan constitutivamente en condiciones normales. La sepsis experimental produce un aumento significativo en la actividad y expresión de la iNOS/i-mtNOS, sin cambios en la nNOS/c-mtNOS.
2. Como consecuencia de ello, la sepsis experimental conlleva un aumento de los niveles de NOx y LPO, y un desequilibrio del ciclo del glutatión, lo que va a provocar un estrés oxidativo/nitrosativo y disminución de la actividad de la cadena respiratoria mitocondrial.
3. El daño oxidativo/nitrosativo y la disfunción mitocondrial es similar en los ratones nNOS<sup>+/+</sup> y nNOS<sup>-/-</sup>, por lo que se puede deducir que la c-mtNOS no va a influir en el daño mitocondrial ocurrido durante la sepsis experimental.
4. La administración de melatonina inhibe la actividad y expresión de la iNOS/i-mtNOS, contrarrestando el estado hiperoxidativo y normalizando la función mitocondrial.
5. Los efectos de la melatonina fueron similares en ambas cepas de ratones, nNOS<sup>+/+</sup> y nNOS<sup>-/-</sup>, lo que indica que su principal mecanismo de acción depende de la inhibición de la iNOS/i-mtNOS.
6. La inhibición del estrés oxidativo mitocondrial por la administración de melatonina va paralelo a la inhibición del proceso inflamatorio durante la sepsis, lo que resulta en la normalización de la bioenergética mitocondrial y de la función cardíaca. Estos resultados proporcionan nuevas bases experimentales para el uso clínico de la melatonina en la sepsis.



## Bibliografía



- Acuna C D, Escames G, Carazo A, León J, Khaldy H, Reiter R J. Melatonin, mitochondrial homeostasis and mitochondrial-related diseases. *Curr Top Med Chem* 2002; 2(2): 133-151.
- Acuna-Castroviejo D, Escames G, Carazo A, León J, Khaldy H, Reiter R J. Melatonin, mitochondrial homeostasis and mitochondrial-related diseases. *Curr Top Med Chem* 2002;(2): 133-152.
- Acuna-Castroviejo D, Escames G, León J, Carazo A, Khaldy H. Mitochondrial regulation by melatonin and its metabolites. *Adv Exp Med Biol* 2003; 527: 549-557.
- Acuna-Castroviejo D, Escames G, López L C, Hitos A B, León J. Melatonin and nitric oxide: two required antagonists for mitochondrial homeostasis. *Endocrine* 2005; 27(2): 159-168.
- Acuna-Castroviejo D, Escames G, López L C, Rodríguez M I. Therapeutic potential of melatonin in inflammation. In: *Free radical pathophysiology. Transworld research network, 2008*; 271-308.
- Acuna-Castroviejo D, Escames G, Rodríguez M I, López L C. Melatonin role in the mitochondrial function. *Front Biosci* 2007; 12: 947-963.
- Acuna-Castroviejo D, Martín M, Macías M, Escames G, León J, Khaldy H, Reiter R J. Melatonin, mitochondria, and cellular bioenergetics. *J Pineal Res* 2001; 30(2): 65-74.
- Acuna-Castroviejo D, Pablos M I, Menendez-Pelaez A, Reiter R J. Melatonin receptors in purified cell nuclei of liver. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1993; 82(2): 253-256.
- Adib-Conquy M, Cavillon J M. Stress molecules in sepsis and systemic inflammatory response syndrome. *FEBS Lett* 2007; 581(19): 3723-3733.
- Alderton W K, Cooper C E, Knowles R G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 2001; 357(Pt 3): 593-615.
- Alonso M, Collado P S, Gonzalez-Gallego J. Melatonin inhibits the expression of the inducible isoform of nitric oxide synthase and nuclear factor kappa B activation in rat skeletal muscle. *J Pineal Res* 2006; 41(1): 8-14.
- Álvarez S, Boveris A. Mitochondrial nitric oxide metabolism in rat muscle during endotoxemia. *Free Radic Biol Med* 2004; 37(9): 1472-1478.
- Anderson M F, Sims N R. The effects of focal ischemia and reperfusion on the glutathione content of mitochondria from rat brain subregions. *J Neurochem* 2002; 81(3): 541-549.
- Anderson S, Bankier A T, Barrell B G, de Bruijn M H, Coulson A R, Drouin J, Eperon I C, Nierlich D P, Roe B A, Sanger F, Schreier P H, Smith A J, Staden R, Young I G. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 1981; 290(5806): 457-465.
- Andrabi S A, Sayeed I, Siemen D, Wolf G, Horn T F. Direct inhibition of the mitochondrial permeability transition pore: a possible mechanism responsible for anti-apoptotic effects of melatonin. *FASEB J* 2004; 18(7): 869-871.
- Andrew P J, Mayer B. Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovasc Res* 1999; 43(3): 521-531.
- Angus D C, Linde-Zwirble W T, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky M R. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med* 2001; 29(7): 1303-1310.
- Antolín I, Rodríguez C, Sainz R M, Mayo J C, Uria H, Kotler M L, Rodríguez-Colunga M J, Tolivia D, Menendez-Pelaez A. Neurohormone melatonin prevents cell damage: effect on gene expression for antioxidant enzymes. *FASEB J* 1996; 10(8): 882-890.



## Bibliografía

- Anton-Tay F, Ramirez G, Martínez I, Benítez-King G. In vitro stimulation of protein kinase C by melatonin. *Neurochem Res* 1998; 23(5): 601-606.
- Antunes F, Han D, Cadenas E. Relative contributions of heart mitochondria glutathione peroxidase and catalase to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detoxification in in vivo conditions. *Free Radic Biol Med* 2002; 33(9): 1260-1267.
- Balk R A, Bone R C. The septic syndrome. Definition and clinical implications. *Crit Care Clin* 1989; 5(1): 1-8.
- Barja G. Mitochondrial oxygen radical generation and leak: sites of production in states 4 and 3, organ specificity, and relation to aging and longevity. *J Bioenerg Biomembr* 1999; 31(4): 347-366.
- Barlow-Walden L R, Reiter R J, Abe M, Pablos M, Menendez-Pelaez A, Chen L D, Poeggeler B. Melatonin stimulates brain glutathione peroxidase activity. *Neurochem Int* 1995; 26(5): 497-502.
- Barrientos A. In vivo and in organello assessment of OXPHOS activities. *Methods* 2002; 26(4): 307-316.
- Bates T E, Loesch A, Burnstock G, Clark J B. Immunocytochemical evidence for a mitochondrially located nitric oxide synthase in brain and liver. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 213(3): 896-900.
- Baydas G, Reiter R J, Akbulut M, Tuzcu M, Tamer S. Melatonin inhibits neural apoptosis induced by homocysteine in hippocampus of rats via inhibition of cytochrome c translocation and caspase-3 activation and by regulating pro- and anti-apoptotic protein levels. *Neuroscience* 2005; 135(3): 879-886.
- Becker-Andre M, Wiesenberg I, Schaeren-Wiemers N, Andre E, Missbach M, Saurat J H, Carlberg C. Pineal gland hormone melatonin binds and activates an orphan of the nuclear receptor superfamily. *J Biol Chem* 1994; 269(46): 28531-28534.
- Benítez-King G, Rios A, Martínez A, Anton-Tay F. In vitro inhibition of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent kinase II activity by melatonin. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1290(2): 191-196.
- Bermejo A, Duarte J. Mechanisms of transduction of lipopolysaccharide. *ARS Pharmaceutica* 2003; 44(2): 121-139.
- Beutler B. Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. *Nature* 2004; 430(6996): 257-263.
- Bhatia M, Mochhala S. Role of inflammatory mediators in the pathophysiology of acute respiratory distress syndrome. *J Pathol* 2004; 202(2): 145-156.
- Blanco J, Muriel-Bombin A, Sagredo V, Taboada F, Gandia F, Tamayo L, Collado J, García-Labattut A, Carriedo D, Valledor M, De F M, López M J, Caballero A, Guerra J, Álvarez B, Mayo A, Villar J. Incidence, organ dysfunction and mortality in severe sepsis: a Spanish multicentre study. *Crit Care* 2008; 12(6): R158.
- Blasko D E, Wilson S T, Zalatan F. Physiological melatonin inhibition of human breast cancer cell growth in vitro: evidence for a glutathione-mediated pathway. *Cancer Res* 1997; 57(10): 1909-1914.
- Boczkowski J, Lisdero C L, Lanone S, Samb A, Carreras M C, Boveris A, Aubier M, Poderoso J J. Endogenous peroxynitrite mediates mitochondrial dysfunction in rat diaphragm during endotoxemia. *FASEB J* 1999; 13(12): 1637-1646.
- Bone R C, Balk R A, Cerra F B, Dellinger R P, Fein A M, Knaus W A, Schein R M, Sibbald W J. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis.

- The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest* 1992; 101(6): 1644-1655.
- Boveris A, Álvarez S, Navarro A. The role of mitochondrial nitric oxide synthase in inflammation and septic shock. *Free Radic Biol Med* 2002; 33(9): 1186-1193.
- Boveris A, Costa L E, Poderoso J J, Carreras M C, Cadenas E. Regulation of mitochondrial respiration by oxygen and nitric oxide. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 899: 121-135.
- Boveris A, Valdez L B, Álvarez S, Zaobornyj T, Boveris A D, Navarro A. Kidney mitochondrial nitric oxide synthase. *Antioxid Redox Signal* 2003; 5(3): 265-271.
- Boyer P D. The ATP synthase--a splendid molecular machine. *Annu Rev Biochem* 1997; 66: 717-749.
- Boyer P D. Catalytic site occupancy during ATP synthase catalysis. *FEBS Lett* 2002; 512(1-3): 29-32.
- Braun H P, Schmitz U K. Are the 'core' proteins of the mitochondrial bcl complex evolutionary relics of a processing protease? *Trends Biochem Sci* 1995; 20(5): 171-175.
- Brealey D, Brand M, Hargreaves I, Heales S, Land J, Smolenski R, Davies N A, Cooper C E, Singer M. Association between mitochondrial dysfunction and severity and outcome of septic shock. *Lancet* 2002; 360(9328): 219-223.
- Brealey D, Karyampudi S, Jacques T S, Novelli M, Stidwill R, Taylor V, Smolenski R T, Singer M. Mitochondrial dysfunction in a long-term rodent model of sepsis and organ failure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004; 286(3): R491-R497.
- Bredt D S, Snyder S H. Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86(22): 9030-9033.
- Brookes P S. Mitochondrial nitric oxide synthase. *Mitochondrion* 2004; 3(4): 187-204.
- Brookes P S, Levonen A L, Shiva S, Sarti P, Darley-Usmar V M. Mitochondria: regulators of signal transduction by reactive oxygen and nitrogen species. *Free Radic Biol Med* 2002; 33(6): 755-764.
- Brown G C. Nitric oxide and mitochondrial respiration. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1411(2-3): 351-369.
- Brown G C. Regulation of mitochondrial respiration by nitric oxide inhibition of cytochrome c oxidase. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1504(1): 46-57.
- Brown G C, Borutaite V. Nitric oxide, mitochondria, and cell death. *IUBMB Life* 2001; 52(3-5): 189-195.
- Brown G C, Borutaite V. Nitric oxide inhibition of mitochondrial respiration and its role in cell death. *Free Radic Biol Med* 2002; 33(11): 1440-1450.
- Brown G C, Borutaite V. Inhibition of mitochondrial respiratory complex I by nitric oxide, peroxynitrite and S-nitrosothiols. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1658(1-2): 44-49.
- Brusque A M, Borba R R, Schuck P F, Dalcin K B, Ribeiro C A, Silva C G, Wannmacher C M, Dutra-Filho C S, Wyse A T, Briones P, Wajner M. Inhibition of the mitochondrial respiratory chain complex activities in rat cerebral cortex by methylmalonic acid. *Neurochem Int* 2002; 40(7): 593-601.
- Byun J, Henderson J P, Mueller D M, Heinecke J W. 8-Nitro-2'-deoxyguanosine, a specific marker of oxidation by reactive nitrogen species, is generated by the myeloperoxidase-hydrogen peroxide-nitrite system of

## Bibliografía

- activated human phagocytes. *Biochemistry* 1999; 38(8): 2590-2600.
- Cadenas E, Poderoso J J, Antunes F, Boveris A. Analysis of the pathways of nitric oxide utilization in mitochondria. *Free Radic Res* 2000; 33(6): 747-756.
- Callahan L A, Stofan D A, Szweda L I, Nethery D E, Supinski G S. Free radicals alter maximal diaphragmatic mitochondrial oxygen consumption in endotoxin-induced sepsis. *Free Radic Biol Med* 2001; 30(1): 129-138.
- Callahan L A, Supinski G S. Sepsis induces diaphragm electron transport chain dysfunction and protein depletion. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172(7): 861-868.
- Capaldi R A, Aggeler R. Mechanism of the F(1)F(0)-type ATP synthase, a biological rotary motor. *Trends Biochem Sci* 2002; 27(3): 154-160.
- Carlberg C, Wiesenberg I. The orphan receptor family RZR/ROR, melatonin and 5-lipoxygenase: an unexpected relationship. *J Pineal Res* 1995; 18(4): 171-178.
- Carreras M C, Poderoso J J. Mitochondrial nitric oxide in the signaling of cell integrated responses. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007; 292(5): C1569-C1580.
- Castillo C, Salazar V, Ariznavarreta C, Vara E, Tresguerres J A. Effect of melatonin administration on parameters related to oxidative damage in hepatocytes isolated from old Wistar rats. *J Pineal Res* 2005; 38(4): 240-246.
- Chuang J I, Mohan N, Meltz M L, Reiter R J. Effect of melatonin on NF-kappa-B DNA-binding activity in the rat spleen. *Cell Biol Int* 1996; 20(10): 687-692.
- Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature* 2002; 420(6917): 885-891.
- Crespo E, Macías M, Pozo D, Escames G, Martín M, Vives F, Guerrero J M, Acuna-Castroviejo D. 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* 1999; 13(12): 1537-1546.
- Crouser E D. Mitochondrial dysfunction in septic shock and multiple organ dysfunction syndrome. *Mitochondrion* 2004; 4(5-6): 729-741.
- Crouser E D, Julian M W, Blaho D V, Pfeiffer D R. Endotoxin-induced mitochondrial damage correlates with impaired respiratory activity. *Crit Care Med* 2002; 30(2): 276-284.
- Cuzzocrea S, Reiter R J. Pharmacological action of melatonin in shock, inflammation and ischemia/reperfusion injury. *Eur J Pharmacol* 2001; 426(1-2): 1-10.
- d'Emmanuele d, V, Marzocco S, Di P R, Autore G, Pinto A, Cuzzocrea S, Sorrentino R. Melatonin prevents lipopolysaccharide-induced hyporeactivity in rat. *J Pineal Res* 2004; 36(3): 146-154.
- Davies N A, Cooper C E, Stidwill R, Singer M. Inhibition of mitochondrial respiration during early stage sepsis. *Adv Exp Med Biol* 2003; 530: 725-736.
- Decker J F, Quay W B. Stimulatory effects of melatonin on ependymal epithelium of choroid plexuses in golden hamsters. *J Neural Transm* 1982; 55(1): 53-67.
- Demicheli V, Quijano C, Álvarez B, Radi R. Inactivation and nitration of human superoxide dismutase (SOD) by fluxes of nitric oxide and superoxide. *Free Radic Biol Med* 2007; 42(9): 1359-1368.
- Dimroth P, von B C, Meier T. Catalytic and mechanical cycles in F-ATP synthases. Fourth in the Cycles Review Series. *EMBO Rep* 2006; 7(3): 276-282.
- Echtay K S. Mitochondrial uncoupling proteins--what is their physiological

- role? *Free Radic Biol Med* 2007; 43(10): 1351-1371.
- Elfering S L, Sarkela T M, Giulivi C. Biochemistry of mitochondrial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem* 2002; 277(41): 38079-38086.
- Escames G, León J, Macías M, Khaldy H, Acuna-Castroviejo D. Melatonin counteracts lipopolysaccharide-induced expression and activity of mitochondrial nitric oxide synthase in rats. *FASEB J* 2003; 17(8): 932-934.
- Escames G, López L C, Ortiz F, López A, García J A, Ros E, Acuna-Castroviejo D. Attenuation of cardiac mitochondrial dysfunction by melatonin in septic mice. *FEBS J* 2007; 274(8): 2135-2147.
- Escames G, López L C, Ortiz F, Ros E, Acuna-Castroviejo D. Age-dependent lipopolysaccharide-induced iNOS expression and multiorgan failure in rats: effects of melatonin treatment. *Exp Gerontol* 2006a; 41(11): 1165-1173.
- Escames G, López L C, Tapias V, Utrilla P, Reiter R J, Hitos A B, León J, Rodríguez M I, Acuna-Castroviejo D. Melatonin counteracts inducible mitochondrial nitric oxide synthase-dependent mitochondrial dysfunction in skeletal muscle of septic mice. *J Pineal Res* 2006b; 40(1): 71-78.
- Escames G, López L C, Tapias V, Utrilla P, Reiter R J, Hitos A B, León J, Rodríguez M I, Acuna-Castroviejo D. Melatonin counteracts inducible mitochondrial nitric oxide synthase-dependent mitochondrial dysfunction in skeletal muscle of septic mice. *J Pineal Res* 2006c; 40(1): 71-78.
- Esterbauer H, Cheeseman K H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol* 1990; 186: 407-421.
- Frandsen U, López-Figueroa M, Hellsten Y. Localization of nitric oxide synthase in human skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 227(1): 88-93.
- Frazier A E, Kiu C, Stojanovski D, Hoogenraad N J, Ryan M T. Mitochondrial morphology and distribution in mammalian cells. *Biol Chem* 2006; 387(12): 1551-1558.
- French S, Giulivi C, Balaban R S. Nitric oxide synthase in porcine heart mitochondria: evidence for low physiological activity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 280(6): H2863-H2867.
- Friedrich T, Steinmuller K, Weiss H. The proton-pumping respiratory complex I of bacteria and mitochondria and its homologue in chloroplasts. *FEBS Lett* 1995; 367(2): 107-111.
- Fritz J H, Girardin S E, Fitting C, Werts C, Mengin-Lecreux D, Caroff M, Cavaillon J M, Philpott D J, Adib-Conquy M. Synergistic stimulation of human monocytes and dendritic cells by Toll-like receptor 4 and. *Eur J Immunol* 2005; 35(8): 2459-2470.
- Fujihara M, Muroi M, Tanamoto K, Suzuki T, Azuma H, Ikeda H. Molecular mechanisms of macrophage activation and deactivation by lipopolysaccharide: roles of the receptor complex. *Pharmacol Ther* 2003; 100(2): 171-194.
- Galli S, Labato M I, Bal de Kier J E, Carreras M C, Poderoso J J. Decreased mitochondrial nitric oxide synthase activity and hydrogen peroxide relate persistent tumoral proliferation to embryonic behavior. *Cancer Res* 2003; 63(19): 6370-6377.
- García J J, Reiter R J, Pie J, Ortiz G G, Cabrera J, Sainz R M, Acuna-Castroviejo D. Role of pinoline and melatonin in stabilizing hepatic microsomal membranes against oxidative stress. *J Bioenerg Biomembr* 1999; 31(6): 609-616.
- Gellerich F N, Trumbeckaite S, Opalka J R, Gellerich J F, Chen Y, Neuhof C, Redl

## Bibliografía

- H, Werdan K, Zierz S. Mitochondrial dysfunction in sepsis: evidence from bacteraemic baboons and endotoxaemic rabbits. *Biosci Rep* 2002; 22(1): 99-113.
- Giacomo C G, Antonio M. Melatonin in cardiac ischemia/reperfusion-induced mitochondrial adaptive changes. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets* 2007; 7(3): 163-169.
- Giguere V, Tini M, Flock G, Ong E, Evans R M, Otulakowski G. Isoform-specific amino-terminal domains dictate DNA-binding properties of ROR alpha, a novel family of orphan hormone nuclear receptors. *Genes Dev* 1994; 8(5): 538-553.
- Gitto E, Karbownik M, Reiter R J, Tan D X, Cuzzocrea S, Chiurazzi P, Cordaro S, Corona G, Trimarchi G, Barberi I. Effects of melatonin treatment in septic newborns. *Pediatr Res* 2001; 50(6): 756-760.
- Giulivi C. Characterization and function of mitochondrial nitric-oxide synthase. *Free Radic Biol Med* 2003; 34(4): 397-408.
- Giulivi C, Poderoso J J, Boveris A. Production of nitric oxide by mitochondria. *J Biol Chem* 1998; 273(18): 11038-11043.
- Green L C, Ruiz de L K, Wagner D A, Rand W, Istfan N, Young V R, Tannenbaum S R. Nitrate biosynthesis in man. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981; 78(12): 7764-7768.
- Guenebaut V, Vincentelli R, Mills D, Weiss H, Léonard K R. Three-dimensional structure of NADH-dehydrogenase from *Neurospora crassa* by electron microscopy and conical tilt reconstruction. *J Mol Biol* 1997; 265(4): 409-418.
- Guerrero J M, Reiter R J. Melatonin-immune system relationships. *Curr Top Med Chem* 2002; 2(2): 167-179.
- Guha M, O'Connell M A, Pawlinski R, Hollis A, McGovern P, Yan S F, Stern D, Mackman N. Lipopolysaccharide activation of the MEK-ERK1/2 pathway in human monocytic cells mediates tissue factor and tumor necrosis factor alpha expression by inducing Elk-1 phosphorylation and Egr-1 expression. *Blood* 2001; 98(5): 1429-1439.
- Hagerhall C. Succinate: quinone oxidoreductases. Variations on a conserved theme. *Biochim Biophys Acta* 1997; 1320(2): 107-141.
- Hardeland R. Melatonin, hormone of darkness and more: occurrence, control mechanisms, actions and bioactive metabolites. *Cell Mol Life Sci* 2008; 65(13): 2001-2018.
- Hardeland R, Reiter R J, Poeggeler B, Tan D X. The significance of the metabolism of the neurohormone melatonin: antioxidative protection and formation of bioactive substances. *Neurosci Biobehav Rev* 1993; 17(3): 347-357.
- Haynes V, Elfering S, Traaseth N, Giulivi C. Mitochondrial nitric-oxide synthase: enzyme expression, characterization, and regulation. *J Bioenerg Biomembr* 2004; 36(4): 341-346.
- Hirose T, Smith R J, Jetten A M. ROR gamma: the third member of ROR/RZR orphan receptor subfamily that is highly expressed in skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 205(3): 1976-1983.
- Hissin P J, Hilf R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem* 1976; 74(1): 214-226.
- Hofhaus G, Weiss H, Léonard K. Electron microscopic analysis of the peripheral and membrane parts of mitochondrial NADH dehydrogenase (complex I). *J Mol Biol* 1991; 221(3): 1027-1043.
- Huerto-Delgadillo L, Anton-Tay F, Benítez-King G. Effects of melatonin on microtubule assembly depend on

- hormone concentration: role of melatonin as a calmodulin antagonist. *J Pineal Res* 1994; 17(2): 55-62.
- Inigo J, Sendra J M, Diaz R, Bouza C, Sarria-Santamera A. Epidemiology and costs of severe sepsis in Madrid. A hospital discharge study. *Med Intensiva* 2006; 30(5): 197-203.
- Inohara N, Nunez G. NODs: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis. *Nat Rev Immunol* 2003; 3(5): 371-382.
- IUPAC. Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. - The Gold Book. 1997.
- Iwata S, Ostermeier C, Ludwig B, Michel H. Structure at 2.8 Å resolution of cytochrome c oxidase from *Paracoccus denitrificans*. *Nature* 1995; 376(6542): 660-669.
- Jaskot R H, Charlet E G, Grose E C, Grady M A, Roycroft J H. An automated analysis of glutathione peroxidase, S-transferase, and reductase activity in animal tissue. *J Anal Toxicol* 1983; 7(2): 86-88.
- Kanai A, Epperly M, Pearce L, Birder L, Zeidel M, Meyers S, Greenberger J, de G W, Apodaca G, Peterson J. Differing roles of mitochondrial nitric oxide synthase in cardiomyocytes and urothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; 286(1): H13-H21.
- Kanai A J, Pearce L L, Clemens P R, Birder L A, VanBibber M M, Choi S Y, de Groat W C, Peterson J. Identification of a neuronal nitric oxide synthase in isolated cardiac mitochondria using electrochemical detection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98(24): 14126-14131.
- Karbownik M, Reiter R J, García J J, Tan D X, Qi W, Manchester L C. Melatonin reduces rat hepatic macromolecular damage due to oxidative stress caused by delta-aminolevulinic acid. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1523(2-3): 140-146.
- Karbowski M, Youle R J. Dynamics of mitochondrial morphology in healthy cells and during apoptosis. *Cell Death Differ* 2003; 10(8): 870-880.
- Kawai T, Akira S. Toll-like receptor downstream signaling. *Arthritis Res Ther* 2005; 7(1): 12-19.
- Kobzik L, Stringer B, Balligand J L, Reid M B, Stamler J S. Endothelial type nitric oxide synthase in skeletal muscle fibers: mitochondrial relationships. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 211(2): 375-381.
- Kumagai Y, Kikushima M, Nakai Y, Shimojo N, Kunimoto M. 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: implication for oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 2004; 37(3): 350-357.
- Kuzkaya N, Weissmann N, Harrison D G, Dikalov S. Interactions of peroxynitrite, tetrahydrobiopterin, ascorbic acid, and thiols: implications for uncoupling endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem* 2003; 278(25): 22546-22554.
- Lacza Z, Horn T F, Snipes J A, Zhang J, Roychowdhury S, Horvath E M, Figueroa J P, Kollai M, Szabo C, Busija D W. Lack of mitochondrial nitric oxide production in the mouse brain. *J Neurochem* 2004; 90(4): 942-951.
- Lacza Z, Kozlov A V, Pankotai E, Csordas A, Wolf G, Redl H, Kollai M, Szabo C, Busija D W, Horn T F. Mitochondria produce reactive nitrogen species via an arginine-independent pathway. *Free Radic Res* 2006; 40(4): 369-378.
- Latz E. The inflammasomes: mechanisms of activation and function. *Curr Opin Immunol* 2010; 22(1): 28-33.
- Lawrence R A, Burk R F. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 1976; 71(4): 952-958.

## Bibliografía

- Lawrence R A, Burk R F. Species, tissue and subcellular distribution of non Se-dependent glutathione peroxidase activity. *J Nutr* 1978; 108(2): 211-215.
- Layne E. Spectrophotometric and Turbidimetric Methods for Measuring Proteins. *Methods in Enzymology* 10 1957; 447-455.
- León J, Acuna-Castroviejo D, Escames G, Tan D X, Reiter R J. Melatonin mitigates mitochondrial malfunction. *J Pineal Res* 2005; 38(1): 1-9.
- León J, Acuna-Castroviejo D, Sainz R M, Mayo J C, Tan D X, Reiter R J. Melatonin and mitochondrial function. *Life Sci* 2004; 75(7): 765-790.
- León J, Macías M, Escames G, Camacho E, Khaldy H, Martín M, Espinosa A, Gallo M A, Acuna-Castroviejo D. Structure-related inhibition of calmodulin-dependent neuronal nitric-oxide synthase activity by melatonin and synthetic kynurenes. *Mol Pharmacol* 2000; 58(5): 967-975.
- Lerner A.B., Case J.D., Takahashi Y, Lee T.H., Mori W. Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. *Journal of the American Chemical Society* 1958; 80: 2587.
- Leslie A G, Walker J E. Structural model of F1-ATPase and the implications for rotary catalysis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2000; 355(1396): 465-471.
- Levine R L, Wehr N, Williams J A, Stadtman E R, Shacter E. Determination of carbonyl groups in oxidized proteins. *Methods Mol Biol* 2000; 99: 15-24.
- Levy M M, Fink M P, Marshall J C, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, Opal S M, Vincent J L, Ramsay G. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Intensive Care Med* 2003; 29(4): 530-538.
- Levy R J. Mitochondrial dysfunction, bioenergetic impairment, and metabolic down-regulation in sepsis. *Shock* 2007; 28(1): 24-28.
- Lizasoain I, Moro M A, Knowles R G, Darley-Usmar V, Moncada S. Nitric oxide and peroxynitrite exert distinct effects on mitochondrial respiration which are differentially blocked by glutathione or glucose. *Biochem J* 1996; 314 ( Pt 3): 877-880.
- López A, García J A, Escames G, Venegas C, Ortiz F, López L C, Acuna-Castroviejo D. Melatonin protects the mitochondria from oxidative damage reducing oxygen consumption, membrane potential, and superoxide anion production. *J Pineal Res* 2009; 46(2): 188-198.
- López L C, Escames G, Ortiz F, Ros E, Acuna-Castroviejo D. Melatonin restores the mitochondrial production of ATP in septic mice. *Neuro Endocrinol Lett* 2006a; 27(5): 623-630.
- López L C, Escames G, Tapias V, Utrilla P, León J, Acuna-Castroviejo D. Identification of an inducible nitric oxide synthase in diaphragm mitochondria from septic mice: its relation with mitochondrial dysfunction and prevention by melatonin. *Int J Biochem Cell Biol* 2006b; 38(2): 267-278.
- Lores-Arnaiz S, D'Amico G, Czerniczyniec A, Bustamante J, Boveris A. Brain mitochondrial nitric oxide synthase: in vitro and in vivo inhibition by chlorpromazine. *Arch Biochem Biophys* 2004; 430(2): 170-177.
- Lowry O H, Rosebrough H N, Farr A L, Randall R J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 1: 265-275.
- Macías M, Escames G, León J, Coto A, Sbihi Y, Osuna A, Acuna-Castroviejo D. Calreticulin-melatonin. An unexpected relationship. *Eur J Biochem* 2003; 270(5): 832-840.

- Macías M, Rodríguez-Cabezas M N, Reiter R J, Osuna A, Acuna-Castroviejo D. Presence and effects of melatonin in *Trypanosoma cruzi*. *J Pineal Res* 1999; 27(2): 86-94.
- Maestroni G J. Melatonin as a therapeutic agent in experimental endotoxic shock. *J Pineal Res* 1996; 20(2): 84-89.
- Maharaj D S, Limson J L, Daya S. 6-Hydroxymelatonin converts Fe (III) to Fe (II) and reduces iron-induced lipid peroxidation. *Life Sci* 2003a; 72(12): 1367-1375.
- Maharaj D S, Walker R B, Glass B D, Daya S. 6-Hydroxymelatonin protects against cyanide induced oxidative stress in rat brain homogenates. *J Chem Neuroanat* 2003b; 26(2): 103-107.
- Manchester L C, Poeggeler B, Alvares F L, Ogden G B, Reiter R J. Melatonin immunoreactivity in the photosynthetic prokaryote *Rhodospirillum rubrum*: implications for an ancient antioxidant system. *Cell Mol Biol Res* 1995; 41(5): 391-395.
- Martín G S, Mannino D M, Eaton S, Moss M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med* 2003; 348(16): 1546-1554.
- Martín M, Macías M, Escames G, León J, Acuna-Castroviejo D. Melatonin but not vitamins C and E maintains glutathione homeostasis in t-butyl hydroperoxide-induced mitochondrial oxidative stress. *FASEB J* 2000a; 14(12): 1677-1679.
- Martín M, Macías M, Escames G, Reiter R J, Agapito M T, Ortiz G G, Acuna-Castroviejo D. 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* 2000b; 28(4): 242-248.
- Martín M, Macías M, León J, Escames G, Khaldy H, Acuna-Castroviejo D. Melatonin increases the activity of the oxidative phosphorylation enzymes and the production of ATP in rat brain and liver mitochondria. *Int J Biochem Cell Biol* 2002; 34(4): 348-357.
- Matot I, Sprung C L. Definition of sepsis. *Intensive Care Med* 2001; 27 Suppl 1: S3-S9.
- Mayo J C, Sainz R M, Tan D X, Hardeland R, León J, Rodríguez C, Reiter R J. Anti-inflammatory actions of melatonin and its metabolites, N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine (AFMK) and N1-acetyl-5-methoxykynuramine (AMK), in macrophages. *J Neuroimmunol* 2005; 165(1-2): 139-149.
- McCord C.P., Allen F.B. Evidences associating pineal gland function with alterations in pigmentation. *Journal of Experimental Zoology* 1917; 13: 207.
- Nin N, Cassina A, Boggia J, Alfonso E, Botti H, Peluffo G, Trostchansky A, Batthyany C, Radi R, Rubbo H, Hurtado F J. Septic diaphragmatic dysfunction is prevented by Mn(III)porphyrin therapy and inducible nitric oxide synthase inhibition. *Intensive Care Med* 2004; 30(12): 2271-2278.
- Nisoli E, Clementi E, Moncada S, Carruba M O. Mitochondrial biogenesis as a cellular signaling framework. *Biochem Pharmacol* 2004; 67(1): 1-15.
- Noji H, Yoshida M. The rotary machine in the cell, ATP synthase. *J Biol Chem* 2001; 276(3): 1665-1668.
- Oberholzer A, Oberholzer C, Moldawer L L. Sepsis syndromes: understanding the role of innate and acquired immunity. *Shock* 2001; 16(2): 83-96.
- Okatani Y, Wakatsuki A, Reiter R J. Melatonin protects hepatic mitochondrial respiratory chain activity in senescence-accelerated mice. *J Pineal Res* 2002a; 32(3): 143-148.
- Okatani Y, Wakatsuki A, Reiter R J, Enzan H, Miyahara Y. Protective effect of



## Bibliografía

- melatonin against mitochondrial injury induced by ischemia and reperfusion of rat liver. *Eur J Pharmacol* 2003a; 469(1-3): 145-152.
- Okatani Y, Wakatsuki A, Reiter R J, Miyahara Y. Hepatic mitochondrial dysfunction in senescence-accelerated mice: correction by long-term, orally administered physiological levels of melatonin. *J Pineal Res* 2002b; 33(3): 127-133.
- Okatani Y, Wakatsuki A, Reiter R J, Miyahara Y. Acutely administered melatonin restores hepatic mitochondrial physiology in old mice. *Int J Biochem Cell Biol* 2003b; 35(3): 367-375.
- Overhaus M, Togel S, Pezzone M A, Bauer A J. Mechanisms of polymicrobial sepsis-induced ileus. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 287(3): G685-G694.
- Pearce L L, Epperly M W, Greenberger J S, Pitt B R, Peterson J. Identification of respiratory complexes I and III as mitochondrial sites of damage following exposure to ionizing radiation and nitric oxide. *Nitric Oxide* 2001; 5(2): 128-136.
- Perera P Y, Mayadas T N, Takeuchi O, Akira S, Zaks-Zilberman M, Goyert S M, Vogel S N. CD11b/CD18 acts in concert with CD14 and Toll-like receptor (TLR) 4 to elicit full lipopolysaccharide and taxol-inducible gene expression. *J Immunol* 2001; 166(1): 574-581.
- Poderoso J J, Carreras M C, Lisdero C, Riobo N, Schopfer F, Boveris A. Nitric oxide inhibits electron transfer and increases superoxide radical production in rat heart mitochondria and submitochondrial particles. *Arch Biochem Biophys* 1996; 328(1): 85-92.
- Poderoso J J, Peralta J G, Lisdero C L, Carreras M C, Radisic M, Schopfer F, Cadenas E, Boveris A. Nitric oxide regulates oxygen uptake and hydrogen peroxide release by the isolated beating rat heart. *Am J Physiol* 1998; 274(1 Pt 1): C112-C119.
- Poeggeler B, Hardeland R. Detection and quantification of melatonin in a dinoflagellate, *Gonyaulax polyedra*: solutions to the problem of methoxyindole destruction in non-vertebrate material. *J Pineal Res* 1994; 17(1): 1-10.
- Poeggeler B, Saarela S, Reiter R J, Tan D X, Chen L D, Manchester L C, Barlow-Walden L R. Melatonin--a highly potent endogenous radical scavenger and electron donor: new aspects of the oxidation chemistry of this indole accessed in vitro. *Ann N Y Acad Sci* 1994; 738: 419-420.
- Pozo D, Reiter R J, Calvo J R, Guerrero J M. Physiological concentrations of melatonin inhibit nitric oxide synthase in rat cerebellum. *Life Sci* 1994; 55(24): L455-L460.
- Proctor P H, Reynolds E S. Free radicals and disease in man. *Physiol Chem Phys Med NMR* 1984; 16(3): 175-195.
- Qi W, Reiter R J, Tan D X, Manchester L C, Siu A W, García J J. Increased levels of oxidatively damaged DNA induced by chromium(III) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: protection by melatonin and related molecules. *J Pineal Res* 2000; 29(1): 54-61.
- Radi R, Beckman J S, Bush K M, Freeman B A. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch Biochem Biophys* 1991; 288(2): 481-487.
- Reiter R J. Melatonin: That ubiquitously acting pineal hormone. *NIPS* 1991; 223-227.
- Reiter R J. Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the aging brain. *FASEB J* 1995; 9(7): 526-533.

- Reiter R J. Antioxidant actions of melatonin. *Adv Pharmacol* 1997; 38: 103-117.
- Reiter R J. Oxidative damage in the central nervous system: protection by melatonin. *Prog Neurobiol* 1998; 56(3): 359-384.
- Reiter R J, Tan D X, Manchester L C, López-Burillo S, Sainz R M, Mayo J C. Melatonin: detoxification of oxygen and nitrogen-based toxic reactants. *Adv Exp Med Biol* 2003a; 527: 539-548.
- Reiter R J, Tan D X, Mayo J C, Sainz R M, León J, Czarnocki Z. Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanisms and pathophysiological implications in humans. *Acta Biochim Pol* 2003b; 50(4): 1129-1146.
- Remick D G, Newcomb D E, Bolgos G L, Call D R. Comparison of the mortality and inflammatory response of two models of sepsis: lipopolysaccharide vs. cecal ligation and puncture. *Shock* 2000; 13(2): 110-116.
- Reynolds F D, Dauchy R, Blask D, Dietz P A, Lynch D, Zuckerman R. The pineal gland hormone melatonin improves survival in a rat model of sepsis/shock induced by zymosan A. *Surgery* 2003; 134(3): 474-479.
- Riedemann N C, Guo R F, Ward P A. The enigma of sepsis. *J Clin Invest* 2003; 112(4): 460-467.
- Riobo N A, Melani M, Sanjuan N, Fiszman M L, Gravielle M C, Carreras M C, Cadenas E, Poderoso J J. The modulation of mitochondrial nitric-oxide synthase activity in rat brain development. *J Biol Chem* 2002; 277(45): 42447-42455.
- Roberts J E, Hu D N, Wishart J F. Pulse radiolysis studies of melatonin and chloromelatonin. *J Photochem Photobiol B* 1998; 42(2): 125-132.
- Rodríguez M I, Escames G, López L C, García J A, Ortiz F, López A, Acuna-Castroviejo D. Melatonin administration prevents cardiac and diaphragmatic mitochondrial oxidative damage in senescence-accelerated mice. *J Endocrinol* 2007a; 194(3): 637-643.
- Rodríguez M I, Escames G, López L C, López A, García J A, Ortiz F, Acuna-Castroviejo D. Chronic melatonin treatment reduces the age-dependent inflammatory process in senescence-accelerated mice. *J Pineal Res* 2007b; 42(3): 272-279.
- Rubbo H, Radi R, Trujillo M, Telleri R, Kalyanaraman B, Barnes S, Kirk M, Freeman B A. Nitric oxide regulation of superoxide and peroxyxynitrite-dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives. *J Biol Chem* 1994; 269(42): 26066-26075.
- Rubinstein J L, Walker J E, Henderson R. Structure of the mitochondrial ATP synthase by electron cryomicroscopy. *EMBO J* 2003; 22(23): 6182-6192.
- Salerno J C, Harris D E, Irizarry K, Patel B, Morales A J, Smith S M, Martasek P, Roman L J, Masters B S, Jones C L, Weissman B A, Lane P, Liu Q, Gross S S. An autoinhibitory control element defines calcium-regulated isoforms of nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 1997; 272(47): 29769-29777.
- Saraste M. Oxidative phosphorylation at the fin de siècle. *Science* 1999; 283(5407): 1488-1493.
- Schroder K, Tschopp J. The inflammasomes. *Cell* 2010; 140(6): 821-832.
- Schulte U, Fecke W, Krull C, Nehls U, Schmiede A, Schneider R, Ohnishi T, Weiss H. In vivo dissection of the mitochondrial respiratory NADH: ubiquinone oxidoreductase (complex I). *Biochim Biophys Acta* 1994; 1187(2): 121-124.
- Shida C S, Castrucci A M, Lamy-Freund M T. High melatonin solubility in aqueous

## Bibliografia

- medium. *J Pineal Res* 1994; 16(4): 198-201.
- Silverman N, Maniatis T. NF-kappaB signaling pathways in mammalian and insect innate immunity. *Genes Dev* 2001; 15(18): 2321-2342.
- Skulachev V P. Mitochondrial physiology and pathology; concepts of programmed death of organelles, cells and organisms. *Mol Aspects Med* 1999; 20(3): 139-184.
- Sourdeval M, Lemaire C, Deniaud A, Taysse L, Daulon S, Breton P, Brenner C, Boisvieux-Ulrich E, Marano F. Inhibition of caspase-dependent mitochondrial permeability transition protects airway epithelial cells against mustard-induced apoptosis. *Apoptosis* 2006; 11(9): 1545-1559.
- Stadtman E R, Levine R L. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids* 2003; 25(3-4): 207-218.
- Strober W, Murray P J, Kitani A, Watanabe T. Signalling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2. *Nat Rev Immunol* 2006; 6(1): 9-20.
- Szabo C. Multiple pathways of peroxynitrite cytotoxicity. *Toxicol Lett* 2003; 140-141: 105-112.
- Szmuskowicz A W, Heinzelman R V. Synthesis of N-acetilmethoxytryptamine. *J Org Chem* 1960; 25: 287.
- Tait S W, Green D R. Mitochondria and cell signalling. *J Cell Sci* 2012; 125(Pt 4): 807-815.
- Takeuchi O, Akira S. Toll-like receptors; their physiological role and signal transduction system. *Int Immunopharmacol* 2001; 1(4): 625-635.
- Tamura E K, Cecon E, Monteiro A W, Silva C L, Markus R P. Melatonin inhibits LPS-induced NO production in rat endothelial cells. *J Pineal Res* 2009; 46(3): 268-274.
- Tan D X, Chen L D, Poeggeler B, Manchester L C, Reiter R J. Melatonin: a potent, endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocrine Journal* 1993; 1: 57.
- Tan D X, Manchester L C, Reiter R J, Plummer B F, Hardies L J, Weintraub S T, Vijayalaxmi, Shepherd A M. A novel melatonin metabolite, cyclic 3-hydroxymelatonin: a biomarker of in vivo hydroxyl radical generation. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 253(3): 614-620.
- Tan D X, Manchester L C, Reiter R J, Plummer B F, Limson J, Weintraub S T, Qi W. Melatonin directly scavenges hydrogen peroxide: a potentially new metabolic pathway of melatonin biotransformation. *Free Radic Biol Med* 2000a; 29(11): 1177-1185.
- Tan D X, Manchester L C, Reiter R J, Qi W B, Karbownik M, Calvo J R. Significance of melatonin in antioxidative defense system: reactions and products. *Biol Signals Recept* 2000b; 9(3-4): 137-159.
- Tatoyan A, Giulivi C. Purification and characterization of a nitric-oxide synthase from rat liver mitochondria. *J Biol Chem* 1998; 273(18): 11044-11048.
- Tay Y M, Lim K S, Sheu F S, Jenner A, Whiteman M, Wong K P, Halliwell B. Do mitochondria make nitric oxide? no? *Free Radic Res* 2004; 38(6): 591-599.
- Taylor D E, Ghio A J, Piantadosi C A. Reactive oxygen species produced by liver mitochondria of rats in sepsis. *Arch Biochem Biophys* 1995; 316(1): 70-76.
- Taylor D E, Kantrow S P, Piantadosi C A. Mitochondrial respiration after sepsis and prolonged hypoxia. *Am J Physiol* 1998; 275(1 Pt 1): L139-L144.
- Taylor D E, Piantadosi C A. Oxidative metabolism in sepsis and sepsis syndrome. *J Crit Care* 1995; 10(3): 122-135.

- Tilden A R, Becker M A, Amma L L, Arciniega J, McGaw A K. Melatonin production in an aerobic photosynthetic bacterium: an evolutionarily early association with darkness. *J Pineal Res* 1997; 22(2): 102-106.
- Ting J P, Davis B K. CATERPILLER: a novel gene family important in immunity, cell death, and diseases. *Annu Rev Immunol* 2005; 23: 387-414.
- Triantafilou K, Triantafilou M, Dedrick R L. A CD14-independent LPS receptor cluster. *Nat Immunol* 2001; 2(4): 338-345.
- Triantafilou M, Triantafilou K. Lipopolysaccharide recognition: CD14, TLRs and the LPS-activation cluster. *Trends Immunol* 2002; 23(6): 301-304.
- Trumpower B L. The protonmotive Q cycle. Energy transduction by coupling of proton translocation to electron transfer by the cytochrome bc<sub>1</sub> complex. *J Biol Chem* 1990; 265(20): 11409-11412.
- Tschopp J, Martinon F, Burns K. NALPs: a novel protein family involved in inflammation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; 4(2): 95-104.
- Tsukihara T, Aoyama H, Yamashita E, Tomizaki T, Yamaguchi H, Shinzawa-Itoh K, Nakashima R, Yaono R, Yoshikawa S. Structures of metal sites of oxidized bovine heart cytochrome c oxidase at 2.8 Å. *Science* 1995; 269(5227): 1069-1074.
- Turrens J F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* 2003; 552(Pt 2): 335-344.
- Urata Y, Honma S, Goto S, Todoroki S, Iida T, Cho S, Honma K, Kondo T. Melatonin induces gamma-glutamylcysteine synthetase mediated by activator protein-1 in human vascular endothelial cells. *Free Radic Biol Med* 1999; 27(7-8): 838-847.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin M T, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39(1): 44-84.
- Venegas C, García J A, Escames G, Ortiz F, López A, Doerrier C, García-Corzo L, López L C, Reiter R J, Acuna-Castroviejo D. Extrapineal melatonin: analysis of its subcellular distribution and daily fluctuations. *J Pineal Res* 2011.
- Venkatakrishnan P, Nakayasu E S, Almeida I C, Miller R T. Absence of nitric-oxide synthase in sequentially purified rat liver mitochondria. *J Biol Chem* 2009; 284(30): 19843-19855.
- Venkatakrishnan P, Nakayasu E S, Almeida I C, Miller R T. Arginase activity in mitochondria--An interfering factor in nitric oxide synthase activity assays. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 394(3): 448-452.
- Viner R I, Williams T D, Schoneich C. Peroxynitrite modification of protein thiols: oxidation, nitrosylation, and S-glutathiolation of functionally important cysteine residue(s) in the sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase. *Biochemistry* 1999; 38(38): 12408-12415.
- Walker J E. Determination of the structures of respiratory enzyme complexes from mammalian mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1995; 1271(1): 221-227.
- Wang Y, Marsden P A. Nitric oxide synthases: gene structure and regulation. *Adv Pharmacol* 1995; 34: 71-90.
- West A P, Shadel G S, Ghosh S. Mitochondria in innate immune responses. *Nat Rev Immunol* 2011; 11(6): 389-402.
- Weycker D, Akhras K S, Edelsberg J, Angus D C, Oster G. Long-term mortality and medical care charges in patients with severe sepsis. *Crit Care Med* 2003; 31(9): 2316-2323.

## Bibliografia

- Wichmann M W, Haisken J M, Ayala A, Chaudry I H. Melatonin administration following hemorrhagic shock decreases mortality from subsequent septic challenge. *J Surg Res* 1996; 65(2): 109-114.
- Wichterman K A, Baue A E, Chaudry I H. Sepsis and septic shock--a review of laboratory models and a proposal. *J Surg Res* 1980; 29(2): 189-201.
- Wiesenberg I, Missbach M, Carlberg C. The potential role of the transcription factor RZR/ROR as a mediator of nuclear melatonin signaling. *Restor Neurol Neurosci* 1998; 12(2-3): 143-150.
- Wood P M. The potential diagram for oxygen at pH 7. *Biochem J* 1988; 253(1): 287-289.
- Wu C C, Chiao C W, Hsiao G, Chen A, Yen M H. Melatonin prevents endotoxin-induced circulatory failure in rats. *J Pineal Res* 2001; 30(3): 147-156.
- Xu M, Ashraf M. Melatonin protection against lethal myocyte injury induced by doxorubicin as reflected by effects on mitochondrial membrane potential. *J Mol Cell Cardiol* 2002; 34(1): 75-79.
- Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Hoshino K, Kaisho T, Sanjo H, Takeuchi O, Sugiyama M, Okabe M, Takeda K, Akira S. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* 2003; 301(5633): 640-643.
- Yu B P, Suescun E A, Yang S Y. Effect of age-related lipid peroxidation on membrane fluidity and phospholipase A2: modulation by dietary restriction. *Mech Ageing Dev* 1992; 65(1): 17-33.
- Zanella B, Giordano E, Muscari C, Zini M, Guarnieri C. Nitric oxide synthase activity in rat cardiac mitochondria. *Basic Res Cardiol* 2004; 99(3): 159-164.
- Zang Q S, Sadek H, Maass D L, Martínez B, Ma L, Kilgore J A, Williams N S, Frantz D E, Wigginton J G, Nwariaku F E, Wolf S E, Minei J P. Specific Inhibition of Mitochondrial Oxidative Stress Suppresses Inflammation and Improves Cardiac Function in a Rat Pneumonia-related Sepsis Model. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2012.
- Zhang H, Squadrito G L, Uppu R, Pryor W A. Reaction of peroxynitrite with melatonin: A mechanistic study. *Chem Res Toxicol* 1999; 12(6): 526-534.
- Zhou R, Yazdi A S, Menu P, Tschopp J. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature* 2011; 469(7329): 221-225.
- Zingarelli B. Nuclear factor-kappaB. *Crit Care Med* 2005; 33(12 Suppl): S414-S416.

# Apéndice I



# *Mitochondrial DNA and inflammatory diseases*

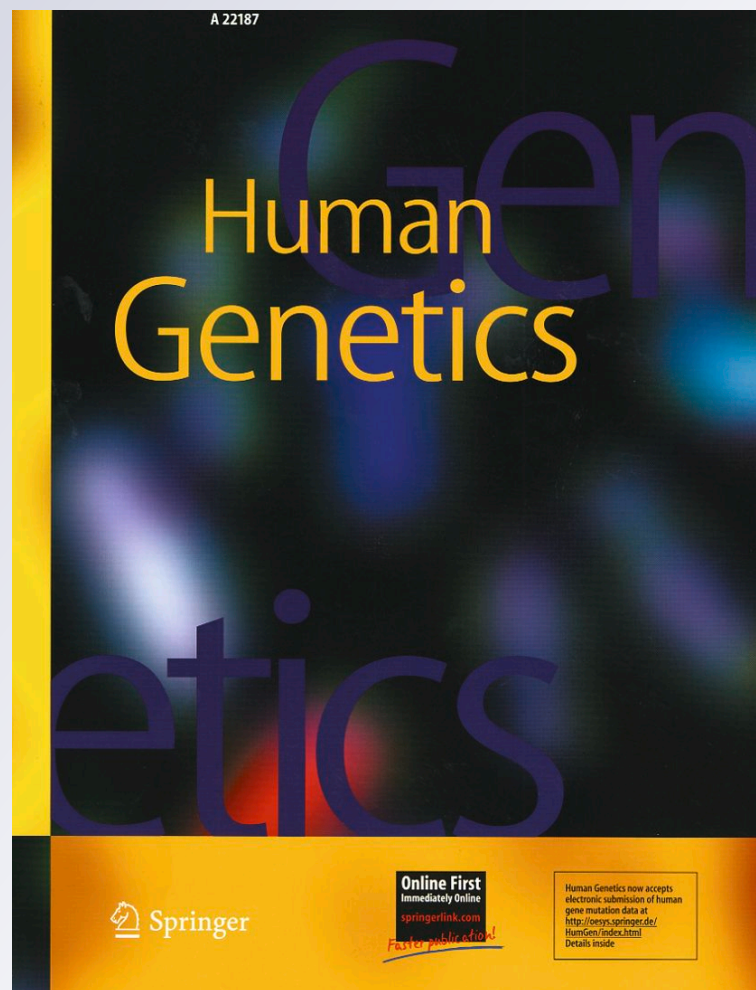
*Germaine Escames, Luis Carlos López,  
José Antonio García, Laura García-  
Corzo, Francisco Ortiz & Darío Acuña-  
Castroviejo*

**Human Genetics**

ISSN 0340-6717

Hum Genet

DOI 10.1007/s00439-011-1057-  
y





**Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by Springer-Verlag. This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your work, please use the accepted author's version for posting to your own website or your institution's repository. You may further deposit the accepted author's version on a funder's repository at a funder's request, provided it is not made publicly available until 12 months after publication.**

## Mitochondrial DNA and inflammatory diseases

Germaine Escames · Luis Carlos López ·  
José Antonio García · Laura García-Corzo ·  
Francisco Ortiz · Darío Acuña-Castroviejo

Received: 10 May 2011 / Accepted: 26 June 2011  
© Springer-Verlag 2011

**Abstract** Increasing experimental evidence supports a connection between inflammation and mitochondrial dysfunction. Both acute and chronic inflammatory diseases course with elevated free radicals production that may affect mitochondrial proteins, lipids, and mtDNA. The subsequent mitochondrial impairment produces more reactive oxygen species that further reduce the ATP generation, increasing the probability of cell death. Mitochondrial impairment is now considered a key factor in inflammation because (1) there are specific pathologies directly derived from mtDNA mutations, causing chronic inflammatory diseases such as neuromuscular and neurodegenerative disorders, (2) there are neurodegenerative, metabolic, and other inflammatory diseases in which their progression is accompanied by mitochondrial dysfunction, which is directly involved in the cell death. Recently, a direct implication of mitochondrial reactive oxygen species and, particularly, mtDNA in the innate immune response has been reported. Thus, the mitochondria should be considered targets for new therapies related to the treatment of acute and chronic inflammatory diseases, including the auto-inflammatory ones.

### Introduction: inflammatory clues and mtDNA

Although inflammation constitutes a defensive response of the organism against noxious stimuli, occasionally it can become in a deleterious reaction responsible for tissue injury in a variety of inflammatory diseases including the so-called auto-inflammatory diseases (McMorrow and Murphy 2011). Tissue damage, infection, and stressor signals are sensed by the innate immune system through pattern recognition receptors (PRRs), which initiate defense and repair programs (Tschopp 2011). Normally, the acute inflammatory response should be able to repair the damage, preventing further injury to the cell or tissue. However, when the acute inflammatory response is excessive, there is a progressive damage and multiorgan failure. A third condition, i.e. chronic inflammation, takes place when a progressive cell death cannot be counteracted by the acute response of the innate immune system. The latter underlies a number of diseases, including neurodegenerative and metabolic diseases, and it is also applicable to aging itself.

Inflammatory diseases course with increased reactive oxygen (ROS) and nitrogen (RNS) species production that may affect mitochondrial proteins, lipids, and DNA (Crimi et al. 2006). Moreover, inducible nitric oxide synthase (iNOS) induction during inflammation led to increased mitochondrial iNOS (i-mtNOS) enzyme activity, producing high levels of nitric oxide (NO<sup>·</sup>) responsible for the respiratory chain (RC) inhibition, ATP reduction (Escames et al. 2003; Lopez et al. 2006b), and mtDNA damage (Bartz et al. 2011), all of them related to the severity of the inflammatory process (Brealey et al. 2002). In these conditions, mitochondrial impairment produces ROS and RNS that in turn reduces mitochondrial bioenergetics, favoring cell damage and death (Escames et al. 2007; Lopez et al.

---

G. Escames · L. C. López · J. A. García · L. García-Corzo ·  
F. Ortiz · D. Acuña-Castroviejo (✉)  
Instituto de Biotecnología, Centro de Investigación Biomédica,  
Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud,  
Universidad de Granada, Avenida del Conocimiento s/n,  
18100 Armilla, Granada, Spain  
e-mail: dacuna@ugr.es

G. Escames · L. C. López · J. A. García · L. García-Corzo ·  
F. Ortiz · D. Acuña-Castroviejo  
Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina,  
Universidad de Granada, Granada, Spain

2006b). On the other hand, there are specific pathophysiological conditions directly derived from mtDNA mutations, causing chronic inflammatory diseases including neuromuscular and neurodegenerative disorders (Acuna et al. 2011; DiMauro 2010; Muller et al. 2010; Reddy 2008). There are also multiple neurodegenerative, metabolic, and other inflammatory diseases that course with progressive mitochondrial dysfunction and cell death (Reddy 2008). Finally, a direct implication of mitochondrial ROS and, specifically, mtDNA in the innate immune response has been recently showed (Nakahira et al. 2011; Zhou et al. 2011). Thus, the mitochondria-inflammation interplay in these diseases will be revised here.

### Mitochondrial DNA

Mitochondrion, the main energetic source of the cell, is the unique mammalian organelle that contains its own genetic material, i.e. mtDNA. Human mtDNA is a 16.569-kb circular, double-stranded molecule ([H]eavy and [L]ight strands), which contains 37 genes: 2 rRNA genes, 22 tRNA genes, and 13 structural genes encoding subunits of the mitochondrial respiratory chain complexes (Anderson et al. 1981). The genetics bases of mtDNA differ from Mendelian genetics in some factors: (1) the mtDNA is polyploid; (2) normal cells harbor homoplasmic mtDNA copies but mutated cells harbor heteroplasmic mtDNA copies; (3) at cell division, the proportion of mutant mtDNAs in daughter cells may shift and the regulation of this process (if any) is misunderstood. This phenomenon is called mitotic segregation; and (4) the mtDNA is exclusively inherited from the mother (Chen et al. 1995; DiMauro 2004; Van 2004).

Because mtDNA only codes 13 structural proteins, its maintenance, replication and transcription totally depend on nuclear DNA (nDNA)-encoded proteins that are imported into mitochondria. Some of these proteins are packaged together with mtDNAs in a macrocomplex called nucleoid (Iborra et al. 2004; Legros et al. 2004). It has been described that each mammal nucleoid is composed of 1–10 copies of mtDNA (Holt et al. 2007) and associated proteins, which at least include major mtDNA binding proteins involved in mtDNA maintenance, such as TFAM, mtSSB, polymerase  $\gamma$ , the mitochondrial helicase Twinkle, mitochondrial RNA polymerase, TFBM1, TFBM2, Terf1 and mitochondrial topoisomerase I (Bogenhagen 2010; Chen and Butow 2005; Wang and Bogenhagen 2006). Other proteins with helicase motifs and some factors involved in protein folding and quality control have been also identified as components of the mitochondrial nucleoids (Mootha et al. 2003; Wang and Bogenhagen 2006). In addition, an antioxidant system composed by manganese-dependent

superoxide dismutase (Mn-SOD) and glutathione peroxidase (GPx) seems to be an integral constituent of mitochondrial nucleoids (Kienhofer et al. 2009). These antioxidant enzymes may protect mtDNA from oxidative damage.

Using the nucleoid machinery, mtDNA is replicated in a different way that nDNA. Two different models have been purposed to explain the mtDNA replication mechanism: (1) an asynchronous strand displacement model, and (2) a strand-coupled bidirectional replication model (Brown et al. 2005). In both models, the DNA polymerization reaction is performed by polymerase  $\gamma$ , which needs a mitochondrial deoxynucleotide triphosphates (dNTPs) pool for the mtDNA synthesis. Interestingly, mitochondria have their own biochemical pathway to produce the necessary dNTPs for mtDNA replication. This biochemical pathway, which is called *salvage pathway*, is independent of the cell cycle because mtDNA is continuously replicating even in postmitotic cells (Marti et al. 2003). Interestingly, defects in the enzymes involved in the *salvage pathway* cause mitochondrial diseases (Mandel et al. 2001; Nishino et al. 1999; Saada et al. 2001).

Besides mtDNA replication machinery, mtDNA also needs a transcription process perfectly regulated by nDNA-encoded transcription factors. This mtDNA transcription has a particular characteristic because transcription from both light strand promoter and heavy strand promoter is polycistronic and produces near genome-length transcripts (no individual gene transcription), which are processed to release the individual RNA molecules. Several transcription factors can regulate the initiation of the transcription, including PGC1 $\alpha$ , NRF-1, NRF-2, TFAM, TFB1M and TFB2M; but also some important transcription factors can regulate the mtDNA transcription termination, including MTERF-1, -2, -3 and -4 (Falkenberg et al. 2007).

Together with mtDNA, all proteins and factors that regulate mtDNA replication and transcription are modulated to respond to the cell energy demand and pathophysiological conditions including inflammatory disease and oxidative stress related disorders.

### The NLRP3 inflammasome-mtDNA connection

In the process of energy generation by the oxidative phosphorylation system, mitochondria generate ROS in such way that they are considered the main ROS-generating organelle in the cell. Besides ATP/heat production, last years have provided evidences that imply mitochondria in calcium homeostasis and apoptosis/necrosis regulation. With the recent finding showing that NLRP3 (NLR-related protein 3 nucleotide-binding domain leucine-rich repeat containing receptors-related protein 3) inflammasome

(Mariathasan et al. 2004; Martinon et al. 2002) can be activated by mitochondrial ROS/mtDNA, an unexpected new function for these organelle in controlling the innate immune response is now emerging.

#### A particular case of inflammation: cryopyrinopathies

Cryopyrinopathies are a group of autoinflammatory diseases different from autoimmune diseases that include familial cold auto-inflammatory syndrome, Muckle–Wells syndrome and chronic infantile neurologic cutaneous articular syndrome (they are also grouped under CAPS, cryopyrin-associated periodic syndromes). They are characterized by recurrent episodes of fever and systemic inflammation of tissues, such as joints and skin (Neven et al. 2008).

Cryopyrinopathies are caused by inherited mutations in the NLRP3 gene that encodes NLRP3/NALP3 protein or cryopyrin (Hoffman et al. 2001), which belongs to the family of NLR (nucleotide-binding domain and leucine-rich-repeat containing) proteins (Ting et al. 2006). As a difference with the NF- $\kappa$ B pathway activation, which is initiated by stimulation of the Toll-like membrane receptors (TLRs), the NLRP3 proteins act as intracellular sensors of stressors to form a complex called the inflammasome (Martinon et al. 2002). NF- $\kappa$ B and NLRP3 constitute part of the innate immune responses and work together to activate inflammatory cytokines, such as IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-18, and IL-33. Mutations in the NLRP3 gene result in an inappropriate activation of the inflammasome, leading to excessive IL-1 $\beta$  release and manifestation of CAPS symptoms (Aganna et al. 2002; Hoffman et al. 2001; Kubota and Koike 2010). Although there are IL-1 $\beta$  inhibitors able to counteract most of the symptoms of these diseases (Gabay et al. 2010), the patients display symptoms, probably dependent on other inflammatory mediators activated by NLRP3, which remain after the treatment. From a preventive point of view, the development of successful therapies for cryopyrinopathies should include, besides IL-1 $\beta$  antagonists, molecules targeting mitochondria to reduce their production of ROS and, thus, disabling the inflammasome activation.

#### A view of the NLRP3–mtDNA relationship

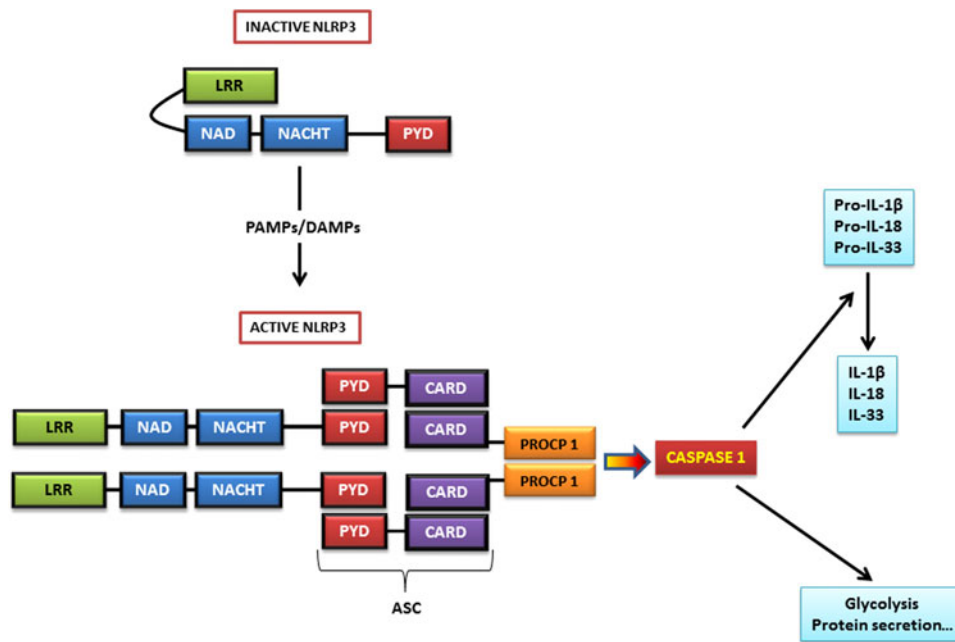
Pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) such as bacterial lipopolysaccharides (LPS), and damage-associated molecular patterns (DAMPs), such as uric acid and extracellular ATP, bind and activate specific pattern recognition membrane (TLRs) or cytosolic (NLRs) receptors. One of the most characterized NLRs is NLRP3, which acts as a cytosolic receptor sensing stressor signals, including ROS, ATP and mtDNA (Dunne 2011; Masters et al. 2009),

and its activation leads to the inflammasome formation and caspase-1 activation (Fig. 1).

NLRP3 or NALP3 contains an amino terminal pyrin domain, a carboxyl terminal LRR domain (ligand binding leucine-rich repeat domain), and a central NACHT domain (nucleotide-binding and oligomerization) (Agostini et al. 2004; Cassel et al. 2009). When activated, NLRP acts as a multiprotein complex named NLRP3 inflammasome, constituted by NLRP3 protein, the ASC coupling protein (apoptosis-associated speck-like protein containing CARD, caspase activation and recruitment domain) and caspase-1 (Agostini et al. 2004). Once constituted, the inflammasome activates caspase-1 that cleavages pro-IL-1 $\beta$ , pro-IL-18, and pro-IL-33, yielding the corresponding active forms of these cytokines (Mariathasan 2007). IL-18 induces TNF $\alpha$  and INF $\gamma$ , which enhance the NF- $\kappa$ B inflammatory pathway (Nakanishi et al. 2001; Takeda et al. 1998). The combination of the NF- $\kappa$ B and NLRP3 inflammasome pathways yields to a overstimulation of the inflammatory response (Tsutsui et al. 2010).

Although the causative effect of ROS on NLRP3 inflammasome activation was recognized some years ago (Schroder et al. 2010), it was not until recently when Zhou et al. (2011) and Nakahira et al. (2011) demonstrated that mitochondria can modulate the innate immunity through the direct activation of the NLRP3 inflammasome. Nakahira et al. (2011) reported that autophagy inhibits the NLRP3 inflammasome activation preventing the accumulation of dysfunctional mitochondria. Zhou et al. showed that mitochondrial ROS trigger the NLRP3 inflammasome. Together, these data suggest that autophagy/mitophagy inhibit the NLRP3 inflammasome by removing ROS-producer dysfunctional mitochondria. A link between NLRP3 inflammasome and mitochondria is also supported by the subcellular location of the organelle. Under resting conditions, NLRP3 and ASC proteins are associated with the endoplasmic reticulum (Zhou et al. 2011). Once activated, the NLRP3 inflammasome moves to a perinuclear distribution together with mitochondria (Zhou et al. 2011) (Fig. 2).

The inflammasome activation also occurs in response to cytosolic bacterial, viral and mammalian DNA, although the sensing molecule is ASC and not NLRP3 (Muruve et al. 2008). mtDNA can act as a DAMP (Zhang et al. 2010) because the activation of the NLRP3 inflammasome is impaired in macrophages depleted from mtDNA (Nakahira et al. 2011). Besides IL-1 $\beta$ , cytosolic mtDNA also increases IL-18 secretion. Before mtDNA release to the cytosol, mitochondrial ROS open the mitochondrial permeability transition pore (MTP). The mtDNA copy number in the cytosolic fraction is increased with LPS (and ATP) treatment, whereas antioxidants such as Mito-TEMPO, or cyclosporine A, which closes the MTP, reduce the presence



**Fig. 1** Schematic representation of the NLRP3 components assembly during the inflammasome activation. In its inactive form, NLRP3 is constitutively expressed in the cytoplasm (*upper*). A series of PAMPs or DAMPs may induce conformational modifications in NALP3, which rapidly interacts with ASC through their respective pyrin domains. Then, ASC can interact with procaspase 1 through their caspase recruitment domains, activating caspase 1. In turn, active caspase 1 activates the pro-inflammatory cytokines pro-IL-1 $\beta$  and pro-IL-18 to their active IL-1 $\beta$  and IL-18 forms, respectively. In addition, caspase 1 also can mediate several other cell functions, including glycolysis, protein secretion, etc. ASC apoptosis-associated

speck-like protein containing a caspase recruitment domain, *CARD* caspase recruitment domain, *DAMPs* danger-associated molecular patterns, *IL* interleukins, *LRR* leucine-rich-repeat domain, *NACHT* Nucleotide-binding oligomerization domain, leucine-rich-repeat family, Apoptosis inhibitory protein, Class II, major histocompatibility complex transactivator, *Het-E* incompatibility locus protein from *Podospora anserina*, *Telomerase-associated protein 1*, *NAD* NACHT-associated domain, *NALP3* NACHT leucine-rich repeat and pyrin domains containing protein 3, *PAMPs* pathogen-associated molecular pattern, *PROCP 1* procaspase 1, *PYD* pyrin domain

of mtDNA in the cytosol. The activation of caspase-1 was directly related to the amount of mtDNA in the cytosol, suggesting a role of mtDNA as a coactivator of caspase-1. Interestingly, deficiency in NLRP3 suppresses the mtDNA release into the cytosol in response to LPS, although the generation of ROS by mitochondria was not affected by NLRP3 deficiency. Together with additional experiments, Nakahira et al. (2011) suggested that the NALP3 inflammasome is required for MPT opening and mtDNA translocation to the cytosol in response to LPS plus ATP. In any case, deficiency in the autophagic/mitophagic process leads to the accumulation of dysfunctional mitochondria and increased NARLP3 inflammasome activation. Therefore, autophagy/mitophagy represents a survival mechanism for the cell, removing damaged mitochondria and preventing ROS/mtDNA-induced NLRP3 activation.

### Mitochondrial DNA alterations in chronic inflammatory diseases

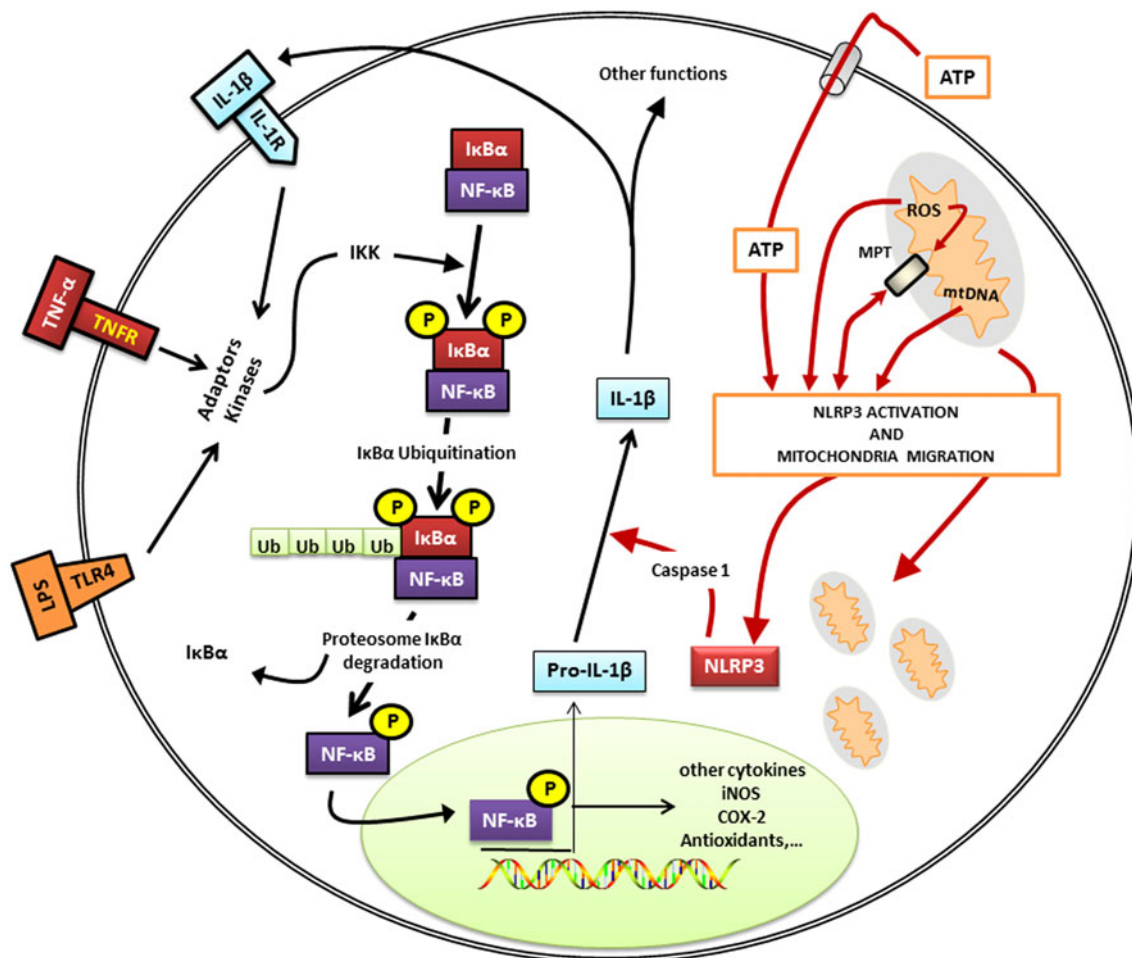
The relationships between mtDNA and NLRP3-inflammasome activation suggest the participation of this innate

immune activation pathway in pathologies coursing with mitochondrial dysfunction, but different from the autoinflammatory diseases. In this regards, we focus here on some conditions involving chronic inflammation and mitochondrial hyperoxidative status, including neurodegenerative disorders, and metabolic diseases. Specifically, the NLRP3 inflammasome–mitochondria interplay as a common inflammatory pathway in these diseases will be analyzed. Other pathologies that may involve inflammation, such as primary mitochondrial disorders (DiMauro and Schon 2008) and autoimmune disorders (Roifman et al. 2011), will be not considered here.

### Neurodegenerative diseases

A common feature in neurodegenerative diseases is the presence of oxidative/nitrosative stress, inflammation, and mitochondrial impairment. Neurodegenerative disorders include diseases that display mtDNA and nDNA mutations, although in some of them it is yet unclear whether these mutations are cause or consequence of the disease. Some examples include Alzheimer's disease (AD) and Parkinson's disease (PD).





**Fig. 2** Cooperation between NF-κB and NLRP3 inflammasome in the innate immune response. In canonical NF-κB (left), stimulation of the TLR4 or TNFR receptors lead to activation of a series of adaptor proteins and kinases that activate IKK complexes. IKKs phosphorylate IκB proteins, targeting them for polyubiquitination and posterior degradation by the proteasome. As a result, the p50/p65 heterodimer of the NF-κB is released, and enters the nucleus, activating gene transcription. Among others, NF-κB induces the expression of pro-IL-1β that, after activated to IL-1β, may act through its specific membrane receptor to further increase the NF-κB pathway. In parallel, the inflammatory condition that triggers the NF-κB pathway also may induce mitochondrial damage and ROS production, which in

turn induces mtDNA damage and open the MPT pore. The releases of ROS and mtDNA to the cytoplasm activate the NLRP3 inflammasome, activating caspase 1 that is responsible for the production of IL-1β from the pro-IL-1β induced by NF-κB. Once activated, NLRP3 inflammasome also participates in the MPT opening. Other factors, including LPS and mediated NLRP3 activation. Interestingly, activated NLRP3 inflammasome moves with mitochondria to a perinuclear location. IκBα NF-κB inhibitor α, IL-1β interleukin 1β, IL-1R IL-1β receptor, LPS lipopolysaccharide, MPT mitochondrial permeability transition pore, NF-κB nuclear factor kappa B, ROS reactive oxygen species, TLR4 toll-like receptor 4, TNF-α tumor necrosis factor α, TNFR TNF-α receptor, Ub ubiquitination

The mitochondria participate in the pathophysiology of AD, although the exact mechanism is yet unclear (Reddy and Beal 2008). Typically, AD shows accumulation of extracellular β-amyloid (Aβ), and hyper-phosphorylated forms of the microtubule-associated protein tau (Twig et al. 2008). Mitochondrial accumulation of Aβ induces ROS generation and that may explain the early mitochondrial failure and cell death in AD (Caspersen et al. 2005; Chen and Yan 2010; Devi et al. 2006; Manczak et al. 2006). Inversely, mitochondrial inheritance was related to the risk of AD (Chen et al. 2000; Swerdlow et al. 2010). Anyway, attempts to identify mtDNA mutations in

AD brains have not given conclusive results (Aliev et al. 2008). Recent data support a role of mitochondrial fusion/fission impairment in the pathogenesis of AD (Manczak et al. 2011; Wang et al. 2009). Mitochondrial dynamics change mitochondrial morphology and, depending on the energy demand of the cell, mitochondria can move through the cytosol (Frazier et al. 2006). Interestingly, it was reported the accumulation of mitochondria in the perinuclear area of hippocampal neurons over-expressing APP (Wang et al. 2008), which resembles the mitochondrial redistribution after NLRP3 inflammasome activation. These data aims in studying the participation of

mitochondrial ROS and mtDNA in the NLRP3 inflammasome activation during AD.

The mitochondrial involvement in Parkinson's disease (PD) is related to the deficiency of mitochondrial complex I (C-I) activity in substantia nigra (Schapira 1999), with a reduction in GSH levels, suggesting the existence of oxidative stress and subsequent nDNA and mtDNA damage. Together, these pathogenic mechanisms may lead to the dopaminergic degeneration and death (Swerdlow et al. 2010). The existence of mtDNA and POLG mutations in early-onset Parkinsonism in different families (Davidzon et al. 2006) support the mitochondria connection in PD. Anyway, there are no currently convincing proofs for a primary role of mtDNA mutations in this disorder (Howell et al. 2005). Mutations in a series of nuclear genes (PARK2, PARK7, PINK1, SNCA, LRRK2 and HTRA2) have been found to be associated with the familial form of PD (DiMauro and Schon 2008). These genes coded for a series of proteins involved in mitochondrial function, oxidative stress damage, and control of MPT (Hardy et al. 2006). Following to dopaminergic death in substantia nigra, there is an inflammatory reaction depending on the induction of cytosolic iNOS (Liberatore et al. 1999) and mitochondrial iNOS (i-mtNOS), yielding high amounts of NO<sup>-</sup> responsible for the inhibition of the respiration (Acuna-Castroviejo et al. 2007; Tapias et al. 2009). The consequence is an overproduction of mitochondrial ROS, mtDNA damage and MPT opening that maintains the inflammatory process. Any treatment of PD, from pharmacological therapy to stem cell transplantation, lacks efficacy due to the sustained hyperoxidative status and inflammation in the substantia nigra. Moreover, no beneficial effects were found after administration of anti-inflammatory drugs to PD or AD patients (Driver et al. 2011; Sonnen et al. 2010). Consequently, inflammation in these neurodegenerative diseases should be beyond from the usual targets of the anti-inflammatory drugs. In this regard, the participation of NLRP3 inflammasome in the pathogenesis of PD should be now seriously considered.

#### Neurogenesis and mtDNA

Neurogenesis continues throughout life, with thousands of new neurons generated daily in the dentate gyrus subgranular zone (Cameron and McKay 2001; Gage 2000) and in the subventricular area (Alvarez-Buylla and Lois 1995). It is known that neural cells have higher aerobic metabolic rate than the neural stem cells (NSCs) (Siggins et al. 2008). Stem cells have few mitochondria with poorly developed cristae, and low mtDNA content (Baharvand and Matthaehi 2003; Cho et al. 2006; St John et al. 2005), and tend to localize in perinuclear groups. When cells differentiate, they show larger mitochondria with distinct cristae. It has

been proposed that the mitochondrial perinuclear arrangement might be a cellular marker for stemness (Lonergan et al. 2006) whereas an elevation in ATP content may reflect a loss of stemness and subsequent onset of differentiation (Lonergan et al. 2007). Increased aerobic activity required for ATP production produces ROS that can potentially influence the differentiation process, rendering mitochondrial macromolecules vulnerable to oxidation damage (Wang et al. 2010). Thus, the differentiation process may damage mtDNA, whereas mtDNA integrity is required for the initial development of RC complexes I, III, and IV (Stuart et al. 2005). Consequently, equilibrium between mitochondrial maturation and ROS production should be strictly maintained during neurogenesis.

Neural precursor cells die within a short period of time after mtDNA depletion (Fike et al. 2009). Inhibition of mitochondrial RC promotes rapid loss of mitochondrial membrane potential in neurons (Bolanos and Almeida 2006), opening the MPT and initiating apoptosis. Complex I defects are enough to decrease differentiation of ES cells into the functional neurons (Kirby et al. 2009). Therefore, mitochondrial inactivation has been suggested to be a critical mechanism of cellular damage in neurodegenerative diseases (Fukui and Moraes 2008). Voloboueva et al. (2010) observed that 24 h of mitochondrial inhibition produced no significant changes in astrocytes or oligodendrocyte viability, but reduced viability of mature neurons by 30%, and reduced survival of immature neurons by 60%. These authors showed that protecting the mitochondrial function reverses the inflammation-associated impairment on neurogenesis.

These results suggest that mitochondrial function might play an important role in neurogenesis. NSCs may play a therapeutic role in some neurodegenerative diseases, such as PD (Kim et al. 2002), as well as in the repair and regeneration process after neurological damage secondary to ischemia or injury (Johansson et al. 1999). But mitochondrial ROS and mtDNA damage produced during neuronal differentiation, resulting in defective mitochondrial maturation and inflammation, limits the beneficial therapy with NSCs. Therefore, the connection between dysfunctional mitochondria, which produce ROS and release mtDNA to the cytosol after MPT opening, and the NLRP3 inflammasome, should be explored during NSCs differentiation. If this connection exists, we will get a new therapeutical strategy to improve the NSC survival.

#### Metabolic diseases

The metabolic syndrome, comprising obesity, insulin resistance, and type-2 diabetes mellitus (Lim et al. 2010), is closely associated with chronic inflammation (Hotamisligil et al. 1993). Insulin resistance is also related to the

production of ROS (Goldstein et al. 2005), and mitochondrial dysfunction (Frojdo et al. 2009; Semple et al. 2004). Some data suggest that reduced OXPHOS and ATP production following mtDNA reduction, and increased ROS formation, precede the development of type-2 diabetes mellitus (Lee et al. 1998; Morino et al. 2005; Stienstra et al. 2010).

Alteration in the expression of PGC-1 $\alpha$  during the inflammatory process of metabolic syndrome further supports a role of mtDNA in this disease. PGC-1 $\alpha$  is an activator of mitochondrial biogenesis and OXPHOS, and its expression is reduced during type-2 diabetes. Moreover, the OXPHOS genes that are dysregulated in type-2 diabetes are under transcriptional regulation of PGC-1 $\alpha$  (Handschin et al. 2007). Skeletal muscle-specific PGC-1 $\alpha$  knockout mice showed increased expression of pro-inflammatory genes, which in turn suppresses glucose-stimulated insulin secretion (Handschin et al. 2007). The deficiency of PGC-1 $\alpha$  may be directly related with decreased mtDNA and elevated production of ROS, both of them associated with the NLRP3 inflammasome (Zhou et al. 2011), which acts as a sensor of metabolic stress (Schroder et al. 2010). NLRP3 agonists stimulate the association of NLRP3 with thioredoxin-interactin protein (TXNIP). TXNIP, which is normally bound to thioredoxin, is dissociated in the presence of ROS. Once dissociated from thioredoxin, TXNIP interacts with NLRP3 in a ROS-dependent manner (Zhou et al. 2010). A connection between TXNIP, NLRP3 and IL-1 $\beta$  is now stated (Schroder et al. 2010). In this sense, TXNIP expression is induced by glucose and repressed by insulin, and it is elevated in type-2 diabetes (Chen et al. 2008). Therefore, ROS induce TXNIP dissociation and binding to NLRP3, activating the inflammasome that triggers IL-1 $\beta$ , and leading to pancreatic  $\beta$ -cell death.

These data suggest that glucose excess drives ROS production by increasing the activity of the mitochondrial RC (Nishikawa and Araki 2007), and the expression of TXNIP. The activation of NLRP3 inflammasome and the reduction in PGC-1 $\alpha$  further favor mitochondrial dysfunction and mtDNA depletion, facilitating IL-1 $\beta$  release and pancreatic  $\beta$ -cell death. This vicious cycle contributes to type-2 diabetes mellitus progression and suggests that mitochondria ROS/mtDNA and NLRP3 inflammasome are new targets for therapeutic intervention in metabolic syndrome.

### Mitochondrial DNA alterations in acute inflammatory diseases

The recognition of pathogen-derived molecules by the innate immune system is mediated by a number of receptors, including members of the TLR (Toll-like receptor)

and of the NLR (NOD-like receptor) families. Whereas Toll-like membrane receptors are linked to the recognition of bacterial lipopolysaccharides (LPS) and other PAMPs, NLRP3, a subtype of NLRs, acts as a cytosolic receptor sensing stressor signals, including ROS, ATP and mtDNA (Dunne 2011; Masters et al. 2009). As revised above, activation of NLRP3 receptors leads to the assembly of the inflammasome, activating caspase-1 that in turn activates a series of pro-inflammatory cytokines. But before caspase-1 could act, the pro-cytokines should be produced through the NF- $\kappa$ B pathway. Thus, the NF- $\kappa$ B-NLRP3 connection is of great importance to understand the innate immune response during inflammation.

Sepsis: a typical acute inflammatory disease

Sepsis constitutes the main cause of death in the intensive care units across the world and consists in a pathological process produced by the presence of bacteria in blood (Angus and Wax 2001). NF- $\kappa$ B is a transcription factor that plays a critical role in the innate immune response during sepsis, controlling the expression of multiple genes. Primarily described in 1986 (Sen and Baltimore 1986), cytosolic NF- $\kappa$ B is expressed in most of the cells in an inactive form associated with the inhibitory protein I- $\kappa$ B. Once released from its inhibitor, NF- $\kappa$ B translocate to the nucleus, where it regulates the expression of a series of genes related with the immune and inflammatory responses (Zingarelli 2005). Among others, these NF- $\kappa$ B-regulated genes comprise cytokines, such as IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-18, and TNF $\alpha$  (Sen and Baltimore 1986; Zingarelli et al. 2003; Zingarelli 2005), and the pro-inflammatory enzymes iNOS and COX-2 (Fig. 2). Once produced, IL-1 $\beta$  and TNF $\alpha$  can also activate NF- $\kappa$ B, constituting a vicious cycle that increases the severity and duration of the inflammatory response. The NF- $\kappa$ B-dependent transcription of I- $\kappa$ B $\alpha$ , yields a negative feedback circuit that limits the activation of the former (Sen and Baltimore 1986; Zingarelli et al. 2003; Zingarelli 2005).

The initial steps in the sepsis induced by LPS depend on the neutrophil activation, yielding high amounts of ROS and inflammatory mediators, such as TNF $\alpha$ , the latter under NF- $\kappa$ B control (Janssen-Heininger et al. 2000; Zhou et al. 2001). Moreover, ROS produced during sepsis also activate antioxidant enzymes, such as SOD, GPx and CAT, attempting to control the hyperoxidative status (Asehnoun et al. 2004; Biolo et al. 2007; Delerive et al. 2001; Harris 1992).

The pro-inflammatory mediators as well as ROS produced during sepsis, directly impair the mitochondrial RC causing lipids, proteins and mtDNA damage, and ATP depletion (Suliman et al. 2003, 2005). The impairment of mitochondrial function in sepsis is well documented



(Escames et al. 2003, 2007; Lopez et al. 2006a, b), and the degree of mitochondrial impairment and mortality during sepsis are well correlated (Svistunenko et al. 2006). Together with ROS, iNOS/i-mtNOS induction in sepsis enhances the production of mitochondrial NO<sup>•</sup> (Escames et al. 2003, 2007; Lopez et al. 2006a, b), causing irreversible damage to mitochondrial macromolecules (Brown 2001; Poderoso et al. 1996). The parallel failure of the RC and OXPHOS leads to energy depletion and cell death (Brealey et al. 2002; Callahan and Supinski 2005).

Structural alterations in mitochondria can be observed in different tissues during sepsis. These alterations, include swelling, cristae disruption, and elongation, reflecting the opening of the MPT caused by ROS/RNS. Septic mice show oxidative damage to mtDNA with reduced density of mtDNA (Bartz et al. 2011). As a consequence of the sepsis-induced oxidative damage, mtDNA copy number is reduced in the early phase of experimental sepsis (Haden et al. 2007). After this initial phase, mtDNA copy number is restored, suggesting an increase in mtDNA replication and mitochondrial biogenesis (Haden et al. 2007). In fact, septic mice also show high tissue levels of nuclear respiratory factor-1 (NRF-1) and NRF-2, PGC1a and TFAM (Haden et al. 2007; Suliman et al. 2004; Sweeney et al. 2010). These changes may reflect mitochondrial biogenesis and energy homeostasis recovery that takes place during the resolution phase, which is activated by innate immunity (Sweeney et al. 2010).

The signal transduction pathway that link sepsis-induced inflammation to the upregulation of mitochondrial biogenesis involves the TLR receptors (Sweeney et al. 2010). This response constitutes a pro-survival event that further protects mtDNA from oxidative damage during sepsis, whereas it recovers the energy demands of the cell. However, the relationships between mtDNA and sepsis are not reduced to the mtDNA damage by ROS/RNS during the response of the innate immune system. In fact, as it was discussed above, mitochondrial damage by ROS results in MPT opening and mtDNA release to the cytosol, that may be sensed by the mechanisms involved in the NLRP3 inflammasome activation. This is another link between canonical NF- $\kappa$ B activation by LPS, mitochondria damage during sepsis, and inflammasome activation (Fig. 2). Pharmacological interventions in sepsis should now address not only the NF- $\kappa$ B pathway, but also the control of the NLRP3 inflammasome activation.

### **Melatonin, a disruptor of the NLRP3 inflammasome-mtDNA connection?**

From the data revised here, we know that the dysfunctional mitochondria trigger the activation of the NLRP3

inflammasome, which depends on the mitochondria ROS production and mtDNA release after MPT opening. Thus, one would predict that targeting antioxidants to mitochondria may be useful in reducing the overstimulation of the innate immune response during inflammation (Galley 2010).

Whereas experimental evidence suggest that manipulating autophagy mechanisms and/or mitochondrial ROS production can reduce the NLRP3 inflammasome activation (Nakahira et al. 2011), the discovery of new pharmacological tools against this inflammatory pathway becomes essential. From a pharmacological point of view, we can act on mitochondria, reducing ROS production and/or closing MPT, or impeding NLRP3 recruitment and activation. Herein, we revise some aspects of the antioxidant melatonin as a type of molecule physiologically relevant in mitochondrial homeostasis, and with important pharmacological properties in inflammation. Although there is not information regarding a direct role of melatonin on the NLRP3 inflammasome activation, the participation of melatonin in the control of mitochondrial ROS production and autophagy (Acuna et al. 2011; Acuna-Castroviejo et al. 2007; Lopez et al. 2009; Martin et al. 2000), and its potent anti-inflammatory action (Crespo et al. 1999; Escames et al. 2003, 2006a), support its involvement in the control of the NLRP3 inflammasome activation.

Melatonin is a phylogenetic old molecule, present from unicellular organisms to mammals (Tan et al. 2010). In mammals is synthesized from tryptophan in many organs and tissues besides the pineal gland (Halberg et al. 2005; Rensing and Ruoff 2002). Whereas the pineal melatonin is related to the synchronization of endogenous rhythms (Kennaway and Wright 2002; Reiter 1980), extrapineal melatonin is related to the antioxidant and anti-inflammatory protection of the cell (Acuna et al. 2011; Acuna-Castroviejo et al. 2001).

Melatonin is a potent-free radical scavenger with antioxidant and anti-inflammatory properties (Crespo et al. 1999; Escames et al. 2003; Tan et al. 1993, 1998, 2001, 2007; Tang et al. 1998). Melatonin is a special class of antioxidant because when scavenging free radicals, it becomes in a series of metabolites that are also free radical scavengers (Hardeland et al. 2009). Melatonin is taken up by mitochondria (Lopez et al. 2009), providing an in situ protection against oxidative damage (Acuna et al. 2002, 2011; Acuna-Castroviejo et al. 2007; Jou et al. 2010; Lopez et al. 2009; Paradies et al. 2010). Under physiological and pathological conditions, the ability of melatonin to maintain mitochondrial homeostasis has been reportedly showed (Acuna et al. 2011; Acuna-Castroviejo et al. 2001; Escames et al. 2007; Lopez et al. 2006a, b). Melatonin, but not other antioxidants including vitamins C and E, and *N*-acetylcysteine, was highly efficient to maintain

mitochondrial GSH homeostasis in extremely oxidative conditions, closing the MPT (Paradies et al. 2010) and promoting mitochondrial survival (Martin et al. 2000, 2002). In normal isolated mitochondria, melatonin increased the activity of the RC complexes, reduced oxygen consumption and decreased slightly the mitochondrial inner membrane potential, decreasing ROS (Lopez et al. 2009). In the presence of t-butyl hydroperoxide (t-BHP), which depletes the mitochondrial GSH pool and blunts both GPx and GRd activities (Martin et al. 2002), 100 nM melatonin restored the GSH pool and the normal activity of the RC and ATP production. In these mitochondria, however, *N*-acetyl cysteine (NAC) and vitamins E and C had any effect despite the doses of these compounds used were 10,000 higher than melatonin (Martin et al. 2000). In vivo, melatonin also restored the normal mitochondrial function impaired in different inflammatory status, including neurodegenerative diseases (Acuna et al. 2011; Cardinali et al. 2010; Khaldy et al. 2003; Olcese et al. 2009; Tapias et al. 2009), aging (Carretero et al. 2009; Escames et al. 2010), neuromuscular disorders (Chahbouni et al. 2010), metabolic dysfunction (Cardinali et al. 2011; Kozirog et al. 2011), and sepsis (Escames et al. 2006a). In these conditions, melatonin reduces mitochondrial ROS production to normal levels, recovers the normal RC activity and ATP production, and maintains the GSH homeostasis, closing the MTP. Melatonin also blunted iNOS/i-mtNOS expression during sepsis, recovering full mitochondrial function (Crespo et al. 1999; Escames et al. 2003, 2006b, 2007; Lopez et al. 2006a, b). Although the initial mechanism proposed for these effects of melatonin therapy was related to the inhibition of the NF- $\kappa$ B pathway activation, the capability of mitochondria to concentrate melatonin, and the ability of the latter to reduce mitochondrial ROS production, suggest that the indoleamine may also inhibits the mitochondrial ROS-dependent NLRP3 inflammasome activation. The relationship between melatonin and autophagy (Coto-Montes and Tomas-Zapico 2006; Garcia et al. 2010; Yoo and Jeung 2010), which seems to involve a reduction in the oxidative stress by the indoleamine, further support this hypothesis.

### Concluding remarks and future direction

Apart from sepsis, there are a series of diseases coursing with inflammation and mitochondrial impairment, with or without mtDNA mutations, in which the exact mechanism connecting mitochondria with inflammation is yet a matter of debate. Interestingly, the common pathophysiological events in these disorders include oxidative/nitrosative stress, mitochondrial dysfunction and ROS generation, which may in turn damage the mtDNA and/or release it to

the cytosol. In the light of new data, the connection between ROS-generating mitochondria and NLRP3 inflammasome activation may explain the inflammatory process in these pathologies, opening new perspectives for therapeutical approaches.

Thus, NLRP3 inflammasome and/or mitochondria are now major targets of interest from the pharmacological management of these diseases. Herein, melatonin becomes in a class of drug that fulfills these criteria, and it may also constitute a template for the development of new anti-inflammatory molecules. These new drugs may be of utility in those diseases, such as PD and AD, in which the classical anti-inflammatory drugs have not effects (Driver et al. 2011; Sonnen et al. 2010).

**Acknowledgments** This study was partially supported by grants from the Marie Curie International Reintegration Grant Programme (COQMITMEL-266691) within the 7th European Community Framework Programme, from the Instituto de Salud Carlos III, Spain (RD06/0013/0008, PI08-1664), from the Ministerio de Ciencia e Innovación, Spain (SAF200908315) and from the Consejería de Economía, Innovación y Ciencia, Junta de Andalucía (P10-CTS-6133, P07-CTS-03135 and CTS-101).

### Bibliography

- Acuna CD, Escames G, Carazo A, Leon J, Khaldy H, Reiter RJ (2002) Melatonin, mitochondrial homeostasis and mitochondrial-related diseases. *Curr Topics Med Chem* 2:133–151
- Acuna CD, Lopez LC, Escames G, Lopez A, Garcia JA, Reiter RJ (2011) Melatonin-mitochondria interplay in health and disease. *Curr Top Med Chem* 11:221–240
- Acuna-Castroviejo D, Martin M, Macias M, Escames G, Leon J, Khaldy H, Reiter RJ (2001) Melatonin, mitochondria, and cellular bioenergetics. *J Pineal Res* 30:65–74
- Acuna-Castroviejo D, Escames G, Rodriguez MI, Lopez LC (2007) Melatonin role in the mitochondrial function. *Front Biosci* 12:947–963
- Aganna E, Martinon F, Hawkins PN, Ross JB, Swan DC, Booth DR, Lachmann HJ, Bybee A, Gaudet R, Woo P, Feighery C, Cotter FE, Thome M, Hitman GA, Tschopp J, McDermott MF (2002) Association of mutations in the NALP3/CIAS1/PYPAF1 gene with a broad phenotype including recurrent fever, cold sensitivity, sensorineural deafness, and AA amyloidosis. *Arthritis Rheum* 46:2445–2452
- Agostini L, Martinon F, Burns K, McDermott MF, Hawkins PN, Tschopp J (2004) NALP3 forms an IL-1 $\beta$ -processing inflammasome with increased activity in Muckle-Wells autoinflammatory disorder. *Immunity* 20:319–325
- Aliev G, Gasimov E, Obrenovich ME, Fischbach K, Shenk JC, Smith MA, Perry G (2008) Atherosclerotic lesions and mitochondria DNA deletions in brain microvessels: implication in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Vasc Health Risk Manage* 4:721–730
- Alvarez-Buylla A, Lois C (1995) Neuronal stem cells in the brain of adult vertebrates. *Stem Cells* 13:263–272
- Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJ, Staden R, Young IG (1981) Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290:457–465

- Angus DC, Wax RS (2001) Epidemiology of sepsis: an update. *Crit Care Med* 29:S109–S116
- Ashenoun K, Strassheim D, Mitra S, Kim JY, Abraham E (2004) Involvement of reactive oxygen species in Toll-like receptor 4-dependent activation of NF-kappa B. *J Immunol* 172:2522–2529
- Baharvand H, Matthaei KI (2003) The ultrastructure of mouse embryonic stem cells. *Reprod Biomed Online* 7:330–335
- Bartz RR, Suliman HB, Fu P, Welty-Wolf K, Carraway MS, Macgarvey NC, Withers CM, Sweeney TE, Piantadosi CA (2011) Staphylococcus aureus sepsis and mitochondrial accrual of the 8-oxoguanine DNA glycosylase DNA repair enzyme in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 183:226–233
- Biolo G, Antonione R, De CM (2007) Glutathione metabolism in sepsis. *Crit Care Med* 35:S591–S595
- Bogenhagen DF (2010) Does mtDNA nucleoid organization impact aging? *Exp Gerontol* 45:473–477
- Bolanos JP, Almeida A (2006) Modulation of astroglial energy metabolism by nitric oxide. *Antioxid Redox Signal* 8:955–965
- Brealey D, Brand M, Hargreaves I, Heales S, Land J, Smolenski R, Davies NA, Cooper CE, Singer M (2002) Association between mitochondrial dysfunction and severity and outcome of septic shock. *Lancet* 360:219–223
- Brown GC (2001) Regulation of mitochondrial respiration by nitric oxide inhibition of cytochrome *c* oxidase. *Biochim Biophys Acta* 1504:46–57
- Brown TA, Cecconi C, Tkachuk AN, Bustamante C, Clayton DA (2005) Replication of mitochondrial DNA occurs by strand displacement with alternative light-strand origins, not via a strand-coupled mechanism. *Genes Dev* 19:2466–2476
- Callahan LA, Supinski GS (2005) Sepsis induces diaphragm electron transport chain dysfunction and protein depletion. *Am J Respir Crit Care Med* 172:861–868
- Cameron HA, McKay RD (2001) Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus. *J Comp Neurol* 435:406–417
- Cardinali DP, Furio AM, Brusco LI (2010) Clinical aspects of melatonin intervention in Alzheimer's disease progression. *Curr Neuropharmacol* 8:218–227
- Cardinali DP, Cano P, Jimenez-Ortega V, Esquifino AI (2011) Melatonin and the metabolic syndrome: physiopathologic and therapeutic implications. *Neuroendocrinology* 93:133–142
- Carretero M, Escames G, Lopez LC, Venegas C, Dayoub JC, Garcia L, Acuna-Castroviejo D (2009) Long-term melatonin administration protects brain mitochondria from aging. *J Pineal Res* 47:192–200
- Caspersen C, Wang N, Yao J, Sosunov A, Chen X, Lustbader JW, Xu HW, Stern D, McKhann G, Yan SD (2005) Mitochondrial Abeta: a potential focal point for neuronal metabolic dysfunction in Alzheimer's disease. *FASEB J* 19:2040–2041
- Cassel SL, Joly S, Sutterwala FS (2009) The NLRP3 inflammasome: a sensor of immune danger signals. *Semin Immunol* 21:194–198
- Chahbouni M, Escames G, Venegas C, Sevilla B, Garcia JA, Lopez LC, Munoz-Hoyos A, Molina-Carballo A, Acuna-Castroviejo D (2010) Melatonin treatment normalizes plasma pro-inflammatory cytokines and nitrosative/oxidative stress in patients suffering from Duchenne muscular dystrophy. *J Pineal Res* 48:282–289
- Chen XJ, Butow RA (2005) The organization and inheritance of the mitochondrial genome. *Nat Rev Genet* 6:815–825
- Chen JX, Yan SS (2010) Role of mitochondrial amyloid-beta in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 20(Suppl 2):S569–S578
- Chen X, Prosser R, Simonetti S, Sadlock J, Jagiello G, Schon EA (1995) Rearranged mitochondrial genomes are present in human oocytes. *Am J Hum Genet* 57:239–247
- Chen D, Lan J, Pei W, Chen J (2000) Detection of DNA base-excision repair activity for oxidative lesions in adult rat brain mitochondria. *J Neurosci Res* 61:225–236
- Chen J, Saxena G, Mungro IN, Lusic AJ, Shalev A (2008) Thioredoxin-interacting protein: a critical link between glucose toxicity and beta-cell apoptosis. *Diabetes* 57:938–944
- Cho YM, Kwon S, Pak YK, Seol HW, Choi YM, do Park J, Park KS, Lee HK (2006) Dynamic changes in mitochondrial biogenesis and antioxidant enzymes during the spontaneous differentiation of human embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 348:1472–1478
- Coto-Montes A, Tomas-Zapico C (2006) Could melatonin unbalance the equilibrium between autophagy and invasive processes? *Autophagy* 2:126–128
- Crespo E, Macias M, Pozo D, Escames G, Martin M, Vives F, Guerrero JM, Acuna-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* 13:1537–1546
- Crimi E, Sica V, Williams-Ignarro S, Zhang H, Slutsky AS, Ignarro LJ, Napoli C (2006) The role of oxidative stress in adult critical care. *Free Radic Biol Med* 40:398–406
- Davidzon G, Greene P, Mancuso M, Klos KJ, Ahlskog JE, Hirano M, DiMauro S (2006) Early-onset familial parkinsonism due to POLG mutations. *Ann Neurol* 59:859–862
- Delerive P, Monte D, Dubois G, Trottein F, Fruchart-Najib J, Mariani J, Fruchart JC, Staels B (2001) The orphan nuclear receptor ROR alpha is a negative regulator of the inflammatory response. *EMBO Rep* 2:42–48
- Devi L, Prabhu BM, Galati DF, Avadhani NG, Anandatheerthavarada HK (2006) Accumulation of amyloid precursor protein in the mitochondrial import channels of human Alzheimer's disease brain is associated with mitochondrial dysfunction. *J Neurosci* 26:9057–9068
- DiMauro S (2004) Mitochondrial medicine. *Biochim Biophys Acta* 1659:107–114
- DiMauro S (2010) Pathogenesis and treatment of mitochondrial myopathies: recent advances. *Acta Myol* 29:333–338
- DiMauro S, Schon EA (2008) Mitochondrial disorders in the nervous system. *Annu Rev Neurosci* 31:91–123
- Driver JA, Logroscino G, Lu L, Gaziano JM, Kurth T (2011) Use of non-steroidal anti-inflammatory drugs and risk of Parkinson's disease: nested case-control study. *BMJ* 342:d198
- Dunne A (2011) Inflammasome activation: from inflammatory disease to infection. *Biochem Soc Trans* 39:669–673
- Escames G, Leon J, Macias M, Khaldy H, Acuna-Castroviejo D (2003) Melatonin counteracts lipopolysaccharide-induced expression and activity of mitochondrial nitric oxide synthase in rats. *FASEB J* 17:932–934
- Escames G, Acuna-Castroviejo D, Lopez LC, Tan DX, Maldonado MD, Sanchez-Hidalgo M, Leon J, Reiter RJ (2006a) Pharmacological utility of melatonin in the treatment of septic shock: experimental and clinical evidence. *J Pharm Pharmacol* 58:1153–1165
- Escames G, Lopez LC, Tapias V, Utrilla P, Reiter RJ, Hitos AB, Leon J, Rodriguez MI, Acuna-Castroviejo D (2006b) Melatonin counteracts inducible mitochondrial nitric oxide synthase-dependent mitochondrial dysfunction in skeletal muscle of septic mice. *J Pineal Res* 40:71–78
- Escames G, Lopez LC, Ortiz F, Lopez A, Garcia JA, Ros E, Acuna-Castroviejo D (2007) Attenuation of cardiac mitochondrial dysfunction by melatonin in septic mice. *FEBS J* 274:2135–2147
- Escames G, Lopez A, Garcia JA, Garcia L, Acuna-Castroviejo D, Garcia JJ, Lopez LC (2010) The role of mitochondria in brain aging and the effects of melatonin. *Curr Neuropharmacol* 8:182–193
- Falkenberg M, Larsson NG, Gustafsson CM (2007) DNA replication and transcription in mammalian mitochondria. *Annu Rev Biochem* 76:679–699

- Fike JR, Rosi S, Limoli CL (2009) Neural precursor cells and central nervous system radiation sensitivity. *Semin Radiat Oncol* 19:122–132
- Frazier AE, Kiu C, Stojanovski D, Hoogenraad NJ, Ryan MT (2006) Mitochondrial morphology and distribution in mammalian cells. *Biol Chem* 387:1551–1558
- Frojdo S, Vidal H, Pirola L (2009) Alterations of insulin signaling in type 2 diabetes: a review of the current evidence from humans. *Biochim Biophys Acta* 1792:83–92
- Fukui H, Moraes CT (2008) The mitochondrial impairment, oxidative stress and neurodegeneration connection: reality or just an attractive hypothesis? *Trends Neurosci* 31:251–256
- Gabay C, Lamacchia C, Palmer G (2010) IL-1 pathways in inflammation and human diseases. *Nat Rev Rheumatol* 6:232–241
- Gage FH (2000) Mammalian neural stem cells. *Science* 287:1433–1438
- Galley HF (2010) Bench-to bedside review: Targeting antioxidants to mitochondria in sepsis. *Crit Care* 14:230
- Garcia JJ, Pinol-Ripoll G, Martinez-Ballarín E, Fuentes-Broto L, Miana-Mena FJ, Venegas C, Caballero B, Escames G, Coto-Montes A, Acuna-Castroviejo D (2010) Melatonin reduces membrane rigidity and oxidative damage in the brain of SAMP(8) mice. *Neurobiol Aging* (in press)
- Goldstein BJ, Mahadev K, Wu X (2005) Redox paradox: insulin action is facilitated by insulin-stimulated reactive oxygen species with multiple potential signaling targets. *Diabetes* 54:311–321
- Haden DW, Suliman HB, Carraway MS, Welty-Wolf KE, Ali AS, Shitara H, Yonekawa H, Piantadosi CA (2007) Mitochondrial biogenesis restores oxidative metabolism during *Staphylococcus aureus* sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 176:768–777
- Halberg F, Cornelissen G, Faraone P, Poeggeler B, Harde land R, Katinas G, Schwartzkopff O, Otsuka K, Bakken EE (2005) Prokaryotic and eukaryotic unicellular chronomics. *Biomed Pharmacother* 59(Suppl 1):S192–S202
- Handschin C, Choi CS, Chin S, Kim S, Kawamori D, Kurpad AJ, Neubauer N, Hu J, Mootha VK, Kim YB, Kulkarni RN, Shulman GI, Spiegelman BM (2007) Abnormal glucose homeostasis in skeletal muscle-specific PGC-1 $\alpha$  knockout mice reveals skeletal muscle-pancreatic beta cell crosstalk. *J Clin Invest* 117:3463–3474
- Harde land R, Tan DX, Reiter RJ (2009) Kynuramines, metabolites of melatonin and other indoles: the resurrection of an almost forgotten class of biogenic amines. *J Pineal Res* 47:109–126
- Hardy J, Cai H, Cookson MR, Gwinn-Hardy K, Singleton A (2006) Genetics of Parkinson's disease and parkinsonism. *Ann Neurol* 60:389–398
- Harris ED (1992) Regulation of antioxidant enzymes. *FASEB J* 6:2675–2683
- Hoffman HM, Mueller JL, Broide DH, Wanderer AA, Kolodner RD (2001) Mutation of a new gene encoding a putative pyrin-like protein causes familial cold autoinflammatory syndrome and Muckle-Wells syndrome. *Nat Genet* 29:301–305
- Holt IJ, He J, Mao CC, Boyd-Kirkup JD, Martinsson P, Sembongi H, Reyes A, Spelbrink JN (2007) Mammalian mitochondrial nucleoids: organizing an independently minded genome. *Mitochondrion* 7:311–321
- Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM (1993) Adipose expression of tumor necrosis factor- $\alpha$ : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 259:87–91
- Howell N, Elson JL, Chinnery PF, Turnbull DM (2005) mtDNA mutations and common neurodegenerative disorders. *Trends Genet* 21:583–586
- Iborra FJ, Kimura H, Cook PR (2004) The functional organization of mitochondrial genomes in human cells. *BMC Biol* 2:9
- Janssen-Heininger YM, Poynter ME, Baeuerle PA (2000) Recent advances towards understanding redox mechanisms in the activation of nuclear factor kappaB. *Free Radic Biol Med* 28:1317–1327
- Johansson CB, Momma S, Clarke DL, Risling M, Lendahl U, Frisen J (1999) Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell* 96:25–34
- Jou MJ, Peng TI, Hsu LF, Jou SB, Reiter RJ, Yang CM, Chiao CC, Lin YF, Chen CC (2010) Visualization of melatonin's multiple mitochondrial levels of protection against mitochondrial Ca(2+)-mediated permeability transition and beyond in rat brain astrocytes. *J Pineal Res* 48:20–38
- Kennaway DJ, Wright H (2002) Melatonin and circadian rhythms. *Curr Top Med Chem* 2:199–209
- Khaldy H, Escames G, Leon J, Bikjdaouene L, Acuna-Castroviejo D (2003) Synergistic effects of melatonin and deprenyl against MPTP-induced mitochondrial damage and DA depletion. *Neurobiol Aging* 24:491–500
- Kienhofer J, Haussler DJ, Ruckelshausen F, Muessig E, Weber K, Pimentel D, Ullrich V, Burkle A, Bachschmid MM (2009) Association of mitochondrial antioxidant enzymes with mitochondrial DNA as integral nucleoid constituents. *FASEB J* 23:2034–2044
- Kim JH, Auerbach JM, Rodriguez-Gomez JA, Velasco I, Gavin D, Lumelsky N, Lee SH, Nguyen J, Sanchez-Pernaute R, Bankiewicz K, McKay R (2002) Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. *Nature* 418:50–56
- Kirby DM, Rennie KJ, Smulders-Srinivasan TK, Acin-Perez R, Whittington M, Enriquez JA, Trevelyan AJ, Turnbull DM, Lightowers RN (2009) Transmitochondrial embryonic stem cells containing pathogenic mtDNA mutations are compromised in neuronal differentiation. *Cell Prolif* 42:413–424
- Kozirog M, Poliwczak AR, Duchnowicz P, Koter-Michalak M, Sikora J, Broncel M (2011) Melatonin treatment improves blood pressure, lipid profile, and parameters of oxidative stress in patients with metabolic syndrome. *J Pineal Res* 50:261–266
- Kubota T, Koike R (2010) Cryopyrin-associated periodic syndromes: background and therapeutics. *Mod Rheumatol* 20:213–221
- Lee HK, Song JH, Shin CS, Park DJ, Park KS, Lee KU, Koh CS (1998) Decreased mitochondrial DNA content in peripheral blood precedes the development of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract* 42:161–167
- Legros F, Malka F, Frachon P, Lombes A, Rojo M (2004) Organization and dynamics of human mitochondrial DNA. *J Cell Sci* 117:2653–2662
- Liberatore GT, Jackson-Lewis V, Vukosavic S, Mandir AS, Vila M, McAuliffe WG, Dawson VL, Dawson TM, Przedborski S (1999) Inducible nitric oxide synthase stimulates dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson disease. *Nat Med* 5:1403–1409
- Lim S, Cho YM, Park KS, Lee HK (2010) Persistent organic pollutants, mitochondrial dysfunction, and metabolic syndrome. *Ann N Y Acad Sci* 1201:166–176
- Lonergan T, Brenner C, Bavister B (2006) Differentiation-related changes in mitochondrial properties as indicators of stem cell competence. *J Cell Physiol* 208:149–153
- Lonergan T, Bavister B, Brenner C (2007) Mitochondria in stem cells. *Mitochondrion* 7:289–296
- Lopez LC, Escames G, Ortiz F, Ros E, Acuna-Castroviejo D (2006a) Melatonin restores the mitochondrial production of ATP in septic mice. *Neuro Endocrinol Lett* 27:623–630
- Lopez LC, Escames G, Tapias V, Utrilla P, Leon J, Acuna-Castroviejo D (2006b) Identification of an inducible nitric oxide synthase in diaphragm mitochondria from septic mice: its

- relation with mitochondrial dysfunction and prevention by melatonin. *Int J Biochem Cell Biol* 38:267–278
- Lopez A, Garcia JA, Escames G, Venegas C, Ortiz F, Lopez LC, Acuna-Castroviejo D (2009) Melatonin protects the mitochondria from oxidative damage reducing oxygen consumption, membrane potential, and superoxide anion production. *J Pineal Res* 46:188–198
- Manczak M, Anekonda TS, Henson E, Park BS, Quinn J, Reddy PH (2006) Mitochondria are a direct site of A beta accumulation in Alzheimer's disease neurons: implications for free radical generation and oxidative damage in disease progression. *Hum Mol Genet* 15:1437–1449
- Manczak M, Calkins MJ, Reddy PH (2011) Impaired mitochondrial dynamics and abnormal interaction of amyloid beta with mitochondrial protein Drp1 in neurons from patients with Alzheimer's disease: implications for neuronal damage. *Hum Mol Genet* 20:2495–2509
- Mandel H, Szargel R, Labay V, Elpeleg O, Saada A, Shalata A, Anbinder Y, Berkowitz D, Hartman C, Barak M, Eriksson S, Cohen N (2001) The deoxyguanosine kinase gene is mutated in individuals with depleted hepatocerebral mitochondrial DNA. *Nat Genet* 29:337–341
- Mariathasan S (2007) ASC, Ipaf and Cryopyrin/Nalp3: bona fide intracellular adapters of the caspase-1 inflammasome. *Microbes Infect* 9:664–671
- Mariathasan S, Newton K, Monack DM, Vucic D, French DM, Lee WP, Roose-Girma M, Erickson S, Dixit VM (2004) Differential activation of the inflammasome by caspase-1 adaptors ASC and Ipaf. *Nature* 430:213–218
- Marti R, Nishigaki Y, Vila MR, Hirano M (2003) Alteration of nucleotide metabolism: a new mechanism for mitochondrial disorders. *Clin Chem Lab Med* 41:845–851
- Martin M, Macias M, Escames G, Leon J, Acuna-Castroviejo D (2000) Melatonin but not vitamins C and E maintains glutathione homeostasis in t-butyl hydroperoxide-induced mitochondrial oxidative stress. *FASEB J* 14:1677–1679
- Martin M, Macias M, Leon J, Escames G, Khaldy H, Acuna-Castroviejo D (2002) Melatonin increases the activity of the oxidative phosphorylation enzymes and the production of ATP in rat brain and liver mitochondria. *Int J Biochem Cell Biol* 34:348–357
- Martinon F, Burns K, Tschopp J (2002) The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol Cell* 10:417–426
- Masters SL, Simon A, Aksentijevich I, Kastner DL (2009) Horror autoinflammaticus: the molecular pathophysiology of autoinflammatory disease (\*). *Annu Rev Immunol* 27:621–668
- McMorrow JP, Murphy EP (2011) Inflammation: a role for NR4A orphan nuclear receptors? *Biochem Soc Trans* 39:688–693
- Mootha VK, Lepage P, Miller K, Bunkenborg J, Reich M, Hjerrild M, Delmonte T, Villeneuve A, Sladek R, Xu F, Mitchell GA, Morin C, Mann M, Hudson TJ, Robinson B, Rioux JD, Lander ES (2003) Identification of a gene causing human cytochrome c oxidase deficiency by integrative genomics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:605–610
- Morino K, Petersen KF, Dufour S, Befroy D, Frattini J, Shatzkes N, Neschen S, White MF, Bilz S, Sono S, Pypaert M, Shulman GI (2005) Reduced mitochondrial density and increased IRS-1 serine phosphorylation in muscle of insulin-resistant offspring of type 2 diabetic parents. *J Clin Invest* 115:3587–3593
- Muller WE, Eckert A, Kurz C, Eckert GP, Leuner K (2010) Mitochondrial dysfunction: common final pathway in brain aging and Alzheimer's disease—therapeutic aspects. *Mol Neurobiol* 41:159–171
- Muruve DA, Petrilli V, Zaiss AK, White LR, Clark SA, Ross PJ, Parks RJ, Tschopp J (2008) The inflammasome recognizes cytosolic microbial and host DNA and triggers an innate immune response. *Nature* 452:103–107
- Nakahira K, Haspel JA, Rathinam VA, Lee SJ, Dolinay T, Lam HC, Englert JA, Rabinovitch M, Cernadas M, Kim HP, Fitzgerald KA, Ryter SW, Choi AM (2011) Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome. *Nat Immunol* 12:222–230
- Nakanishi K, Yoshimoto T, Tsutsui H, Okamura H (2001) Interleukin-18 regulates both Th1 and Th2 responses. *Annu Rev Immunol* 19:423–474
- Neven B, Prieur AM, dit Quartier MP (2008) Cryopyrinopathies: update on pathogenesis and treatment. *Nat Clin Pract Rheumatol* 4:481–489
- Nishikawa T, Araki E (2007) Impact of mitochondrial ROS production in the pathogenesis of diabetes mellitus and its complications. *Antioxid Redox Signal* 9:343–353
- Nishino I, Spinazzola A, Hirano M (1999) Thymidine phosphorylase gene mutations in MNGIE, a human mitochondrial disorder. *Science* 283:689–692
- Olcese JM, Cao C, Mori T, Mamcarz MB, Maxwell A, Runfeldt MJ, Wang L, Zhang C, Lin X, Zhang G, Arendash GW (2009) Protection against cognitive deficits and markers of neurodegeneration by long-term oral administration of melatonin in a transgenic model of Alzheimer disease. *J Pineal Res* 47:82–96
- Paradies G, Petrosillo G, Paradies V, Reiter RJ, Ruggiero FM (2010) Melatonin, cardiolipin and mitochondrial bioenergetics in health and disease. *J Pineal Res* 48:297–310
- Poderoso JJ, Carreras MC, Lisdero C, Riobo N, Schopfer F, Boveris A (1996) Nitric oxide inhibits electron transfer and increases superoxide radical production in rat heart mitochondria and submitochondrial particles. *Arch Biochem Biophys* 328:85–92
- Reddy PH (2008) Mitochondrial medicine for aging and neurodegenerative diseases. *Neuromolecular Med* 10:291–315
- Reddy PH, Beal MF (2008) Amyloid beta, mitochondrial dysfunction and synaptic damage: implications for cognitive decline in aging and Alzheimer's disease. *Trends Mol Med* 14:45–53
- Reiter RJ (1980) Photoperiod: its importance as an impeller of pineal and seasonal reproductive rhythms. *Int J Biometeorol* 24:57–63
- Rensing L, Ruoff P (2002) Temperature effect on entrainment, phase shifting, and amplitude of circadian clocks and its molecular bases. *Chronobiol Int* 19:807–864
- Roifman I, Beck PL, Anderson TJ, Eisenberg MJ, Genest J (2011) Chronic inflammatory diseases and cardiovascular risk: a systematic review. *Can J Cardiol* 27:174–182
- Saada A, Shaag A, Mandel H, Nevo Y, Eriksson S, Elpeleg O (2001) Mutant mitochondrial thymidine kinase in mitochondrial DNA depletion myopathy. *Nat Genet* 29:342–344
- Schapira AH (1999) Mitochondrial involvement in Parkinson's disease, Huntington's disease, hereditary spastic paraplegia and Friedreich's ataxia. *Biochim Biophys Acta* 1410:159–170
- Schroder K, Zhou R, Tschopp J (2010) The NLRP3 inflammasome: a sensor for metabolic danger? *Science* 327:296–300
- Simple RK, Crowley VC, Sewter CP, Laudes M, Christodoulides C, Considine RV, Vidal-Puig A, O'rahilly S (2004) Expression of the thermogenic nuclear hormone receptor coactivator PGC-1alpha is reduced in the adipose tissue of morbidly obese subjects. *Int J Obes Relat Metab Disord* 28:176–179
- Sen R, Baltimore D (1986) Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell* 47:921–928
- Siggins RW, Zhang P, Welsh D, Lecapitaine NJ, Nelson S (2008) Stem cells, phenotypic inversion, and differentiation. *Int J Clin Exp Med* 1:2–21
- Sonnen JA, Larson EB, Walker RL, Haneuse S, Crane PK, Gray SL, Breitner JC, Montine TJ (2010) Nonsteroidal anti-inflammatory

- drugs are associated with increased neuritic plaques. *Neurology* 75:1203–1210
- St John JC, Ramalho-Santos J, Gray HL, Petrosko P, Rawe VY, Navara CS, Simerly CR, Schatten GP (2005) The expression of mitochondrial DNA transcription factors during early cardiomyocyte in vitro differentiation from human embryonic stem cells. *Cloning Stem Cells* 7:141–153
- Stienstra R, Joosten LA, Koenen T, van TB, van Diepen JA, van den Berg SA, Rensen PC, Voshol PJ, Fantuzzi G, Hijmans A, Kersten S, Muller M, van den Berg WB, van RN, Wabitsch M, Kullberg BJ, van der Meer JW, Kannegani T, Tack CJ, Netea MG (2010) The inflammasome-mediated caspase-1 activation controls adipocyte differentiation and insulin sensitivity. *Cell Metab* 12:593–605
- Stuart JA, Bourque BM, de Souza-Pinto NC, Bohr VA (2005) No evidence of mitochondrial respiratory dysfunction in OGG1-null mice deficient in removal of 8-oxodeoxyguanine from mitochondrial DNA. *Free Radic Biol Med* 38:737–745
- Suliman HB, Carraway MS, Piantadosi CA (2003) Postlipopolysaccharide oxidative damage of mitochondrial DNA. *Am J Respir Crit Care Med* 167:570–579
- Suliman HB, Welty-Wolf KE, Carraway M, Tatro L, Piantadosi CA (2004) Lipopolysaccharide induces oxidative cardiac mitochondrial damage and biogenesis. *Cardiovasc Res* 64:279–288
- Suliman HB, Welty-Wolf KE, Carraway MS, Schwartz DA, Hollingsworth JW, Piantadosi CA (2005) Toll-like receptor 4 mediates mitochondrial DNA damage and biogenic responses after heat-inactivated *E. coli*. *FASEB J* 19:1531–1533
- Svistunenko DA, Davies N, Brealey D, Singer M, Cooper CE (2006) Mitochondrial dysfunction in patients with severe sepsis: an EPR interrogation of individual respiratory chain components. *Biochim Biophys Acta* 1757:262–272
- Sweeney TE, Suliman HB, Hollingsworth JW, Piantadosi CA (2010) Differential regulation of the PGC family of genes in a mouse model of *Staphylococcus aureus* sepsis. *PLoS One* 5:e11606
- Swerdlow RH, Burns JM, Khan SM (2010) The Alzheimer's disease mitochondrial cascade hypothesis. *J Alzheimers Dis* 20(Suppl 2):S265–S279
- Takeda K, Tsutsui H, Yoshimoto T, Adachi O, Yoshida N, Kishimoto T, Okamura H, Nakanishi K, Akira S (1998) Defective NK cell activity and Th1 response in IL-18-deficient mice. *Immunity* 8:383–390
- Tan DX, Poeggeler B, Reiter RJ, Chen LD, Chen S, Manchester LC, Barlow-Walden LR (1993) The pineal hormone melatonin inhibits DNA-adduct formation induced by the chemical carcinogen safrole in vivo. *Cancer Lett* 70:65–71
- Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, Plummer BF, Hardies LJ, Weintraub ST, Vijayalaxmi, Shepherd AM (1998) A novel melatonin metabolite, cyclic 3-hydroxymelatonin: a biomarker of in vivo hydroxyl radical generation. *Biochem Biophys Res Commun* 253:614–620
- Tan DX, Manchester LC, Burkhardt S, Sainz RM, Mayo JC, Kohen R, Shohami E, Huo YS, Hardeland R, Reiter RJ (2001) N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine, a biogenic amine and melatonin metabolite, functions as a potent antioxidant. *FASEB J* 15:2294–2296
- Tan DX, Manchester LC, Terron MP, Flores LJ, Reiter RJ (2007) One molecule, many derivatives: a never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species? *J Pineal Res* 42:28–42
- Tan DX, Hardeland R, Manchester LC, Paredes SD, Korkmaz A, Sainz RM, Mayo JC, Fuentes-Broto L, Reiter RJ (2010) The changing biological roles of melatonin during evolution: from an antioxidant to signals of darkness, sexual selection and fitness. *Biol Rev Camb Philos Soc* 85:607–623
- Tang L, Reiter RJ, Li ZR, Ortiz GG, Yu BP, Garcia JJ (1998) Melatonin reduces the increase in 8-hydroxy-deoxyguanosine levels in the brain and liver of kainic acid-treated rats. *Mol Cell Biochem* 178:299–303
- Tapias V, Escames G, Lopez LC, Lopez A, Camacho E, Carrion MD, Entrena A, Gallo MA, Espinosa A, Acuna-Castroviejo D (2009) Melatonin and its brain metabolite N(1)-acetyl-5-methoxykynuramine prevent mitochondrial nitric oxide synthase induction in parkinsonian mice. *J Neurosci Res* 87:3002–3010
- Ting JP, Kastner DL, Hoffman HM (2006) CATERPILLERS, pyrin and hereditary immunological disorders. *Nat Rev Immunol* 6:183–195
- Tschopp J (2011) Mitochondria: sovereign of inflammation? *Eur J Immunol* 41:1196–1202
- Tsutsui H, Imamura M, Fujimoto J, Nakanishi K (2010) The TLR4/TRIF-mediated activation of NLRP3 inflammasome underlies endotoxin-induced liver injury in mice. *Gastroenterol Res Pract* 2010:641865
- Twig G, Elorza A, Molina AJ, Mohamed H, Wikstrom JD, Walzer G, Stiles L, Haigh SE, Katz S, Las G, Alroy J, Wu M, Py BF, Yuan J, Deeney JT, Corkey BE, Shirihai OS (2008) Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *EMBO J* 27:433–446
- Van BJ (2004) Mitochondria in human oogenesis and preimplantation embryogenesis: engines of metabolism, ionic regulation and developmental competence. *Reproduction* 128:269–280
- Voloboueva LA, Lee SW, Emery JF, Palmer TD, Giffard RG (2010) Mitochondrial protection attenuates inflammation-induced impairment of neurogenesis in vitro and in vivo. *J Neurosci* 30:12242–12251
- Wang Y, Bogenhagen DF (2006) Human mitochondrial DNA nucleoids are linked to protein folding machinery and metabolic enzymes at the mitochondrial inner membrane. *J Biol Chem* 281:25791–25802
- Wang X, Su B, Siedlak SL, Moreira PI, Fujioka H, Wang Y, Casadesus G, Zhu X (2008) Amyloid-beta overproduction causes abnormal mitochondrial dynamics via differential modulation of mitochondrial fission/fusion proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:19318–19323
- Wang X, Su B, Zheng L, Perry G, Smith MA, Zhu X (2009) The role of abnormal mitochondrial dynamics in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J Neurochem* 109(Suppl 1):153–159
- Wang W, Osenbroch P, Skinnies R, Esbensen Y, Bjoras M, Eide L (2010) Mitochondrial DNA integrity is essential for mitochondrial maturation during differentiation of neural stem cells. *Stem Cells* 28:2195–2204
- Yoo YM, Jeung EB (2010) Melatonin suppresses cyclosporine A-induced autophagy in rat pituitary GH3 cells. *J Pineal Res* 48:204–211
- Zhang Q, Raoof M, Chen Y, Sumi Y, Sursal T, Junger W, Brohi K, Itagaki K, Hauser CJ (2010) Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. *Nature* 464:104–107
- Zhou LZ, Johnson AP, Rando TA (2001) NF kappa B and AP-1 mediate transcriptional responses to oxidative stress in skeletal muscle cells. *Free Radic Biol Med* 31:1405–1416
- Zhou R, Tardivel A, Thorens B, Choi I, Tschopp J (2010) Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation. *Nat Immunol* 11:136–140
- Zhou R, Yazdi AS, Menu P, Tschopp J (2011) A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature* 469:221–225
- Zingarelli B (2005) Nuclear factor-kappaB. *Crit Care Med* 33:S414–S416
- Zingarelli B, Sheehan M, Wong HR (2003) Nuclear factor-kappaB as a therapeutic target in critical care medicine. *Crit Care Med* 31:S105–S111