

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV



**ESTUDIO DEL PAPEL PROTECTOR DE LA
PROTEÍNA DESACOPLANTE UCP3 FRENTE AL
ESTRÉS OXIDATIVO EN MITOCONDRIAS DE
MÚSCULO ESQUELÉTICO Y CORAZÓN DE
RATONES TRATADOS CON ENDOTOXINA Y EN
CARDIOMIOCITOS DE RATA.**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Enara Aguirre Laso

Bajo la dirección de la doctora

Susana Cadenas Álvarez

Madrid, 2010

- ISBN: 978-84-693-2374-8

Universidad Complutense de Madrid
Facultad de Veterinaria
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV



**ESTUDIO DEL PAPEL PROTECTOR DE LA PROTEÍNA
DESACOPLANTE UCP3 FRENTE AL ESTRÉS OXIDATIVO
EN MITOCONDRIAS DE MÚSCULO ESQUELÉTICO Y
CORAZÓN DE RATONES TRATADOS CON ENDOTOXINA
Y EN CARDIOMIOCITOS DE RATA**

**Memoria presentada por la licenciada Enara Aguirre Laso para optar
al grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid**

Madrid, 2009

*Maítasun osoz, nire guraso eta nebei,
beti gogorarazi didatelako zer den garrantzitsua,
eta nire Aingeru zaindariari, hori aurkitzen laguntzeagatik.*

*Con todo mi cariño, a mis padres y hermanos,
por recordarme siempre qué es lo verdaderamente importante,
y a mi Ángel de la guarda, por ayudarme tanto a conseguirlo.*



Agradecimientos

En el año 2004, la Dra. Susana Cadenas me ofreció la oportunidad de formar parte del CNIC, integrándome bajo su dirección en el Laboratorio de Biología del Óxido Nítrico. Desde entonces debo agradecerle la formación científica que he adquirido durante estos años en este centro, sin olvidar que me facilitara los medios físicos, instrumentales y económicos necesarios para la realización de casi la totalidad de este trabajo.

Todo esto ha sido posible gracias al apoyo que hemos recibido por parte del CNIC, de los compañeros que forman parte de sus servicios y unidades, que hacen con su trabajo mucho más fácil el nuestro, así como de los integrantes de los tres laboratorios de los que hemos formado parte: el Laboratorio de Biología del Óxido Nítrico en el edificio de Tres Cantos, el actualmente conocido como Dpto. de Biología vascular e Inflamación de la primera planta del edificio CNIC y, dos pisos más arriba, el Dpto. de Cardiología Regenerativa.

Otros laboratorios e instituciones a los que también agradecemos su colaboración en la realización de este estudio son el Laboratorio del Dr. Martín Brand, del Medical Research Council Dunn Human Nutrition Unit (Cambridge, Reino Unido), en especial a Julie Buckingham y Nadeene Parker, y el Laboratorio del Dr. Daniel Sanchís del Dpto. de Ciencias Médicas Básicas de la Universidad de Lérida.

Este trabajo de tesis doctoral se presenta en la Universidad Complutense a través del Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular IV, donde la amabilidad de la Dra. Esmeralda García siempre me ha facilitado la realización de todos los trámites administrativos necesarios para que llegara este momento, agradeciéndole especialmente sus constantes ánimos y muestras de apoyo.

Empecé mi primer día en el laboratorio de Tres Cantos conociendo a Félix, mi compañero durante todos estos años y con el que he compartido tantas cosas. Allí también me esperaban Carlitos, sus pacientes consejos y su buen humor para emprender cualquier cosa que se proponía, así como el entusiasmo y la simpatía de Marta. Las conversaciones científicas y atléticas con Jesús han sido todo un regalo, entre tanta sabiduría, nunca pensé que acabaría memorizando el record del mundo de maratón. En Patricia encontré una buena compañera en el laboratorio, aunque esto apenas tiene importancia sabiendo que realmente encontré una buena amiga en la vida.

Entonces nos llegó la mudanza al edificio "excelente", y cambiamos nuestro pequeño laboratorio por un gran espacio compartido con los Juanmís, los Alíciós y los Miguel-Angelos. En este entorno he tenido la suerte de conocer a gente tan fantástica como Salomón y Laura, que nos hicieron camino a los que veníamos detrás. También a Iñigo, que desde Barakaldo me trajo montones de buenos ratos dentro y fuera del laboratorio, y muchos ánimos para que esta historia

no terminara antes de tiempo. Y especialmente a Araceli que, desde el principio al final, desde dentro y desde fuera, ha estado acompañándome a lo largo de esta historia. Por todo, mil gracias, doñita! Y que habría sido de mí sin Vanessa y su energía positiva, y todos los buenos ratos pasados con Ana, Antonio, Ángela, Asier, Dolo, Esther, Marta, María, Miguel, Olívia, Pilar, Raffaele, Vanessa, Vicky... Que fácil me hicisteis trabajar a vuestro lado! Gracias a todos por ayudarme y comprenderme tanto! Y que bien lo pasé en nuestras escapadas!

Y cuando ya parecía que estábamos muy bien instalados... nos volvimos a mudar. Esta vez al Dpto. de Cardiología Regenerativa, donde nos reencontramos con muchos tricantinos y descubrimos a los Bernades. Esta mudanza supuso una nueva oportunidad para conocer a Juan Carlos y Fátima, cuyos consejos y constantes muestras de apoyo me han sido de gran ayuda en todo momento. Además, me tocó sentarme junto a Óscar, y ahora sé que difícilmente podría haber tenido un compañero con el corazón más grande que el suyo. Tener como vecinas a Cris y Yoli ha sido todo un gustazo, no tiene precio recibir tantas cosas buenas desde el otro lado del pasillo. Y después de tantos años desde que me explicaba cómo extraer un plásmido, que alegría reencontrarme con Alberto! Sigo pensando que de mayor quiero ser como tú! Y que suerte la mía, en el laboratorio también descubrí a Alfonso, Ceci, Celia, Dani, Gemma, Mónica, Juancho, Nieves, Paqui, Raquelita, Sara, Sonso, Tania, Tarín, Vanessa... con los que he podido compartir tantas conversaciones amistosas, risas, chascarrillos, cafés y meriendas, hilo musical... Gracias, compís, por saber crear tan buen ambiente a vuestro alrededor, por todos los buenos momentos que me habéis aportado, y también ayudarme a sobrellevar los que no lo han sido tanto.

Aunque no he tenido tiempo de mudarme también a su laboratorio, no puedo olvidarme de los Proteómicos, Juan Antonio, Emilio y Enrique, con el don de encontrarte el lado positivo a todo y hacernos disfrutar con su ironía constructiva-destructiva. Gracias por todos los buenos ratos que me habéis hecho pasar! También he tenido la suerte de poder disfrutar de la amabilidad de Sergio y del Servicio de Genómica, así como de la colaboración de Irene, Abel y Santi de la Unidad de Zootecnia. Y en la recta final, las súper-bibliotecarias Alicia e Irene me han prestado una ayuda increíble. Muchísimas gracias a todos!

Finalmente, quiero dedicar especialmente este momento a Miguel Tesouro y a todos los integrantes del Servicio de Diagnóstico de Leishmaniosis y Ehrlichiosis Canina del Hospital Clínico Veterinario de la Universidad Complutense de Madrid, a los de siempre y a los que vinisteis más tarde. Ya sabéis que los primeros capítulos de mi tesis se empezaron a escribir con vosotros. Y de corazón, gracias por darme la oportunidad de aprender tantas cosas a vuestro lado, de hacerme sentir que realmente formaba parte de un equipo, y darle siempre un sentido al trabajo que hacíamos juntos. Tenéis sin límite mi admiración profesional y mi cariño personal. Y en este momento no puedo olvidarme de la estrella de Miriam, para que el recuerdo de sus sonrisas continúe iluminando los pasillos por los que tantas veces nos hemos cruzado.

A todos vosotros, por todas las cosas estupendas que me habéis aportado, por pensar que este trabajo merece la pena, pero especialmente, a aquellos que además de pensarlo, hacéis algo para que las cosas cambien.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	15
RESUMEN	19
SUMMARY	23
INTRODUCCIÓN	27
1. EL DESACOPLAMIENTO MITOCONDRIAL	29
1.1. La fosforilación oxidativa.....	29
1.2. La conductancia de la membrana mitocondrial interna a los protones.....	30
2. LAS PROTEÍNAS DESACOPLANTES	32
2.1. La proteína desacoplante 1 (UCP1).....	33
2.2. Las proteínas homólogas de la UCP1.....	34
2.3. La regulación de la expresión de las UCPs.....	33
3. LA FUNCIÓN DE LOS HOMÓLOGOS DE LA UCP1	38
3.1. La regulación de la termogénesis, el gasto energético y el peso corporal.....	38
3.2. El metabolismo de los ácidos grasos.....	40
3.3. El metabolismo de la glucosa.....	41
3.4. La protección frente al daño oxidativo.....	43
3.4.1. El desacoplamiento mitocondrial como sistema de protección celular frente al daño oxidativo.....	43
3.4.2. Implicación de las UCPs en la conductancia basal a los protones.....	46
3.4.3. La activación de las UCPs por el radical superóxido.....	47
3.4.4. La activación de las UCPs por el 4-hidroxinonenal.....	49
3.4.5. Papel protector de las UCPs en las patologías que cursan con estrés oxidativo: los procesos de isquemia-reperusión.....	53
3.5. La regulación de la apoptosis.....	55
3.6. El transporte de calcio.....	56
4. LA UTILIZACIÓN DE ENDOTOXINA COMO MODELO DE INDUCCIÓN DE LAS UCPs	57
5. LA UTILIZACIÓN DE ENDOTOXINA COMO MODELO DE INDUCCIÓN DE LA ÓXIDO NÍTRICO SINTASA MITOCONDRIAL	60

5.1. La síntesis de óxido nítrico.....	60
5.2. La detección de la óxido nítrico sintasa mitocondrial.....	62
5.3. El estado de sepsis como modelo de inducción de la óxido nítrico sintasa mitocondrial.....	63
OBJETIVOS.....	67
MATERIALES Y MÉTODOS.....	71
1. ANIMALES.....	73
1.1. Ratón.....	73
1.1.1. Genotipado de los ratones deficientes en la proteína UCP3.....	73
1.1.2. Protocolo de inoculación de endotoxina.....	74
1.1.3. Obtención de muestras tisulares.....	75
1.2. Rata.....	75
2. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA.....	75
2.1. Estudio de la expresión del ARN.....	75
2.1.1. Extracción de ARN.....	75
2.1.2. Determinación de la concentración, pureza e integridad del ARN.....	76
2.1.3. Retrotranscripción.....	77
2.1.4. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real	77
2.1.4.1. Cuantificación relativa mediante el método comparativo del ciclo umbral (Ct).....	77
2.1.4.2. Cebadores utilizados.....	78
2.1.4.3. Condiciones de la reacción.....	79
2.2. Estudio de la expresión de proteínas.....	79
2.2.1. Extracción de proteínas.....	79
2.2.2. Determinación de la concentración de proteínas: método de Biuret.....	79
2.2.3. Detección de la expresión de las proteínas estudiadas mediante western blot.....	80
3. ESTUDIOS REALIZADOS EN MITOCONDRIAS AISLADAS.....	82
3.1. Aislamiento de mitocondrias.....	82
3.1.1. Aislamiento de mitocondrias a partir del tejido muscular esquelético.....	82
3.1.2. Aislamiento de mitocondrias a partir del corazón	83
3.2. Medidas de consumo de oxígeno.....	83
3.2.1. Control respiratorio.....	83

3.2.2. Capacidad máxima de la respiración mitocondrial.....	84
3.2.3. Actividad de los diferentes complejos de la cadena respiratoria mitocondrial.....	85
3.2.4. Determinación del consumo de oxígeno tras un proceso de anoxia-reoxigenación.....	87
3.3. Medida de la conductancia de la membrana mitocondrial interna a los protones.....	87
3.3.1. Fundamento de la técnica.....	87
3.3.2. Protocolos utilizados.....	89
3.3.2.1. Estudio del efecto del radical superóxido sobre la conductancia de la membrana mitocondrial interna a los protones.....	89
3.3.2.2. Estudio del efecto del 4-hidroxinonal sobre la conductancia de la membrana mitocondrial interna a los protones.....	90
3.3.2.3. Estudio del efecto del GDP y el carboxiatractilósido sobre la conductancia basal de la membrana mitocondrial interna a los protones.....	91
3.3.3. Análisis de los datos.....	92
3.4. Detección del óxido nítrico producido por la óxido nítrico sintasa mitocondrial y estudio de sus efectos sobre la respiración mitocondrial.....	92
3.4.1. Caracterización del protocolo utilizado: inducción de la óxido nítrico sintasa inducible y producción de óxido nítrico.....	92
3.4.2. Detección del óxido nítrico producido por la óxido nítrico sintasa mitocondrial mediante la utilización de un electrodo de óxido nítrico.....	94
3.4.3. Detección del óxido nítrico producido por la óxido nítrico sintasa mitocondrial mediante el estudio de sus efectos sobre la respiración y el cálculo de la p_{50}	94
4. ESTUDIOS REALIZADOS EN CARDIOMIOCITOS NEONATALES DE RATA.....	95
4.1. Aislamiento de cardiomiocitos neonatales de rata.....	95
4.2. Pre-cultivo para la eliminación de fibroblastos.....	96
4.3. Detección específica de cardiomiocitos mediante inmunofluorescencia..	96
4.4. Transfección de cardiomiocitos.....	97
4.4.1. Obtención de lentivirus.....	97
4.4.2. Infección de cardiomiocitos.....	99
4.5. Determinación del consumo de oxígeno tras un proceso de anoxia-reoxigenación.....	100

5. ESTUDIO INSTRUMENTAL COMPARATIVO ENTRE UN RESPIRÓMETRO CONVENCIONAL Y UN RESPIRÓMETRO DE ALTA RESOLUCIÓN.....	101
5.1. Medida del flujo de oxígeno instrumental.....	101
5.2. Medida de la producción de óxido nítrico.....	101
5.2.1. Calibración del electrodo de óxido nítrico	101
5.2.2. Cuantificación de la producción de óxido nítrico	102
5.2.3. Determinación de la inhibición de la respiración celular por el óxido nítrico.....	103
RESULTADOS.....	105
1. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE LA UCP3, LA UCP2 Y EL ANT.....	107
1.1. Estudio de la expresión génica de <i>ucp3</i>, <i>ucp2</i>, <i>ant1</i> y <i>ant2</i> en ratones de tipo silvestre.....	107
1.1.1. Expresión génica de <i>ucp3</i> tras la inoculación de endotoxina	107
1.1.2. Expresión génica de <i>ucp2</i> , <i>ant1</i> y <i>ant2</i> tras la inoculación de endotoxina.....	108
1.2. Estudio de la expresión génica de <i>ucp3</i>, <i>ucp2</i>, <i>ant1</i> y <i>ant2</i> en ratones mutantes UCP3KO.....	109
1.3. Estudio de la expresión de las proteínas UCP3 y ANT en ratones de tipo silvestre.....	111
1.4. Estudio de la expresión de las proteínas UCP3 y ANT en ratones mutantes UCP3KO.....	114
2. MEDIDAS DE CONSUMO DE OXÍGENO EN MITOCONDRIAS AISLADAS DEL MÚSCULO ESQUELÉTICO Y EL CORAZÓN DE RATÓN	115
2.1. Integridad de las mitocondrias aisladas.....	115
2.2. Capacidad máxima de la respiración mitocondrial.....	117
2.3. Actividad de los diferentes complejos de la cadena respiratoria mitocondrial.....	118
3. ESTUDIO DEL PAPEL DE LA PROTEÍNA UCP3 FRENTE AL ESTRÉS OXIDATIVO.....	120
3.1. Implicación de la UCP3 en la activación de la conductancia de la membrana mitocondrial interna a los protones inducida por el radical superóxido.....	120
3.2. Implicación de la UCP3 en la activación de la conductancia de la membrana mitocondrial interna a los protones inducida por el 4-hidroxinonenal.....	123
3.2.1. Implicación de la UCP3 en la activación de la conductancia a	

los protones inducida por el 4-hidroxinonenal en mitocondrias de músculo esquelético.....	124
3.2.2. Implicación de la UCP3 en la activación de la conductancia a los protones inducida por el 4-hidroxinonenal en mitocondrias de corazón.....	129
3.3. Efecto de los inhibidores GDP y carboxiatractilósido sobre la conductancia basal de la membrana mitocondrial interna a los protones.....	133
3.3.1. Efecto de los inhibidores GDP y carboxiatractilósido sobre la conductancia basal a los protones en mitocondrias de músculo esquelético.....	133
3.3.2. Efecto de los inhibidores GDP y carboxiatractilósido sobre la conductancia basal a los protones en mitocondrias de corazón.....	136
4. ESTUDIO DEL PAPEL DE LA PROTEÍNA UCP3 EN LOS PROCESOS DE ISQUEMIA-REPERFUSIÓN.....	138
4.1. Estudio del papel de la UCP3 en un proceso de anoxia-reoxigenación en mitocondrias aisladas a partir del corazón.....	138
4.2. Estudio del papel de la UCP3 en un proceso de anoxia-reoxigenación en cardiomiocitos neonatales de rata.....	140
5. ESTUDIO DE LA POSIBLE PRESENCIA DE LA ÓXIDO NÍTRICO SINTASA MITOCONDRIAL EN EL MÚSCULO ESQUELÉTICO.....	142
5.1. Determinación de las condiciones óptimas para el estudio de la óxido nítrico sintasa mitocondrial: estudio instrumental comparativo entre un respirómetro convencional y uno de alta resolución	143
5.1.1. Medida del flujo de oxígeno instrumental	143
5.1.2. Calibración del electrodo de óxido nítrico	144
5.1.3. Cuantificación de la producción de óxido nítrico	147
5.1.4. Determinación de la inhibición de la respiración celular por el óxido nítrico	148
5.2. Detección de la óxido nítrico sintasa mitocondrial en un respirómetro de alta resolución.....	150
5.2.1. Caracterización del modelo de estudio.....	150
5.2.2. Detección directa de óxido nítrico mediante la utilización de un electrodo de óxido nítrico	152
5.2.3. Detección indirecta de óxido nítrico mediante la determinación de la inhibición de la respiración mitocondrial y sus efectos sobre la p_{50}	153

DISCUSIÓN	157
1. IMPLICACIÓN DE LA UCP3 EN LA CONDUCTANCIA BASAL DE LA MEMBRANA MITOCONDRIAL INTERNA A LOS PROTONES Y EN EL AUMENTO DE LA CONDUCTANCIA INDUCIDO POR EL RADICAL SUPERÓXIDO Y EL COMPUESTO 4-HIDROXINONENAL	160
2. PAPEL DE LA UCP3 EN LOS PROCESOS DE ISQUEMIA-REPERFUSIÓN EN MITOCONDRIAS AISLADAS A PARTIR DEL CORAZÓN Y EN CARDIOMIOCITOS NEONATALES DE RATA	172
3. PRESENCIA DE LA ÓXIDO NÍTRICO SINTASA MITOCONDRIAL EN EL MÚSCULO ESQUELÉTICO DE RATONES TRAS LA ADMINISTRACIÓN DE ENDOTOXINA: PRODUCCIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO Y EFECTOS SOBRE LA RESPIRACIÓN	174
CONCLUSIONES	181
BIBLIOGRAFÍA	185

ABREVIATURAS

$\Delta\rho$	Gradiente electroquímico de protones
$\Delta\psi_m$	Potencial de membrana mitocondrial interna
AAPH	Dihidroclicóricó-2,2-azobis(2-metilpropionamidina)
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ADP	Adenosín difosfato
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
ANT	Transportador de nucleótidos de adenina
ARN	Ácido ribonucleico
ARNasa	Ribonucleasa
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ARNr	Ácido ribonucleico ribosómico
ATP	Adenosín trifosfato
BSA	Albúmina sérica bovina
CAT	Carboxiatractilósido
C/EBP	Factor de transcripción que se une a secuencias CCAAT y potenciadoras
cGMP	Guanosín monofosfato cíclico
Ct	Ciclo umbral
Da	Dalton (s)
DAF-FM	4-amino-5-metilamino-2-7-difluorfluoresceína diacetato
DEPC	Dietilpirocarbonato
DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTP	Desoxinucleósidos trifosfato
Ds	Desviación estándar
eNOS	Óxido nítrico sintasa endotelial
FADH₂	Flavina adenina dinucleótido
FCCP	Carbonilcianida-p-trifluorometoxifenilhidrazona
GDP	Guanosín difosfato
GTP	Guanosín trifosfato
GCs	Guanilato ciclasa soluble
Gy	Gray
4HB	Tetrahidrobiopterina
HBSS	Solución salina de Hanks
HEPES	Ácido N-2-hidroxietilpiperacina-N-2-etanosulfónico
HNE	4-Hidroxinonenal
IL	Interleuquina
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
i.p.	Intraperitoneal
IP	Ioduro de propidio

kDa	Kilodalton (s)
L-arg	L-arginina
L-NAME	N-Nitro-L-arginina-metil-ester
L-NMMA	N-monometil-L-arginina
LPS	Lipopolisacárido de <i>Escherichia coli</i>
mA	Miliamperio (s)
MitoPBN	Bromuro 4-[(1,1-Dimetiletil)-oxidoimino]metil]fenoxibutil]-trifenilfosfonio
MitoQ	10-(6-ubiquinonil)deciltrifenilfosfonio
MitoVit E	Bromuro 2-[2-(trifenilfosfonio)etil]-3,4-dihidotetrametil-2benzopiranol
MnSOD	Manganeso superóxido dismutasa
mtNOS	Óxido nítrico sintasa mitocondrial
mV	Milivoltio (s)
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
NF-$\kappa$$\beta$	Factor nuclear κ β
nm	Nanómetro (s)
nNOS	Óxido nítrico sintasa neuronal
NO	Oxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintasa
pA	Picoamperio (s)
PBS	Solución salina de fosfato
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PGC-1α	Coactivador transcripcional 1 α de PPAR γ
Pi	Fósforo inorgánico
Post-AR	Posteriormente a la anoxia y reoxigenación
PPAR	Receptores activados por la proliferación de los peroxisomas
ppb	Partes por billón
Pre-AR	Anteriormente a la anoxia y reoxigenación
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RT-PCR	Transcripción reversa seguida de PCR cuantitativa
SDS	Sodio dodecil sulfato
SDS-PAGE	Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida con SDS
SEM	Error estándar de la media
SOD	Superóxido dismutasa
Th	Temperatura de hibridación
TNF-α	Factor de necrosis tumoral α
TPMP	Trifenilmetilfosfonio
U	Unidad de actividad enzimática
u.a.	Unidades arbitrarias
UCP	Proteína desacoplante

RESUMEN

Desde la identificación en 1997 de la proteína desacoplante 3 (UCP3), se han postulado diferentes hipótesis en relación a su función y se han realizado numerosos estudios encaminados a determinar los factores que regulan la expresión y la activación de esta proteína. En el presente trabajo de tesis doctoral se ha intentado determinar el posible papel protector de la proteína UCP3 frente al estrés oxidativo en el músculo esquelético y el corazón de ratón a través de la medida de la conductancia de la membrana mitocondrial interna a los protones en presencia del radical superóxido y del compuesto 4-hidroxinonenal (HNE), ambos descritos previamente como activadores de las proteínas desacoplantes. Estas medidas se realizaron en mitocondrias aisladas a partir de ratones de tipo silvestre en las que la proteína UCP3 se expresaba a niveles basales, en mitocondrias aisladas a partir de estos mismos ratones tras la administración de endotoxina con el fin de incrementar los niveles de expresión de la UCP3, y en mitocondrias que no expresaban esta proteína al provenir de ratones mutantes deficientes en la UCP3. Los resultados obtenidos en las mitocondrias de músculo esquelético indicaron que el aumento en la conductancia de la membrana mitocondrial interna a los protones en presencia del radical superóxido estaba catalizado por el transportador de nucleótidos de adenina (ANT), mientras que el aumento inducido por el HNE estaba catalizado parcialmente por la UCP3 y parcialmente por el ANT. Sin embargo, en las mitocondrias de corazón, la activación inducida por el HNE no estaba catalizada a través de la UCP3, sino que el incremento en la conductancia a los protones estaba mediado por el ANT y otras vías diferentes a este transportador y a la UCP3. Por otro lado, el papel protector de la UCP3 frente al estrés oxidativo se determinó también en los procesos de isquemia-reoxigenación mediante la aplicación de un protocolo de anoxia-reoxigenación en cardiomiocitos neonatales de rata transfectados con el gen que codifica la proteína UCP3 y en mitocondrias aisladas a partir del corazón de ratones de tipo silvestre, con un nivel basal de expresión de la UCP3, y mutantes deficientes en la expresión de la UCP3. Los resultados indicaron que la expresión de la proteína UCP3 en los cardiomiocitos neonatales de rata y en las mitocondrias aisladas a partir del corazón de ratón en presencia de succinato se asociaban a una mejor recuperación de la función respiratoria tras un proceso de anoxia-reoxigenación. Sin embargo, en presencia de ADP, la expresión de la UCP3 dificultaba la recuperación de la función respiratoria tras un proceso de anoxia-reoxigenación en las mitocondrias aisladas a partir del corazón de ratón. Finalmente, se estudió la presencia de la óxido nítrico sintasa mitocondrial (mtNOS) en el músculo esquelético de ratones tratados con endotoxina mediante la detección del efecto inhibitor del óxido nítrico sobre la respiración, utilizando respirometría de alta resolución. Se observó una inhibición de la respiración a concentraciones de oxígeno bajas (10 μ M) y un aumento en el valor de la p_{50} en comparación con los ratones control.

SUMMARY

Since the identification of the uncoupling protein 3 (UCP3) in 1997, different theories have emerged with the aim of explaining the function of this protein, and different studies have been performed in order to identify the factors that regulate the expression and activation of UCP3. In this study, the protective role of UCP3 against oxidative stress in mice skeletal muscle and heart has been evaluated by measuring the proton conductance of the mitochondrial inner membrane in the presence of superoxide radical and the compound 4-hydroxynonenal (HNE), which have been previously characterized as uncoupling proteins activators. These assays were performed on mitochondria isolated from wild-type mice in which UCP3 was expressed at the basal level, on mitochondria isolated from wild-type mice after endotoxin administration with the aim of up-regulating UCP3 expression, and on mitochondria isolated from mutant mice deficient in UCP3 expression. The results obtained in skeletal muscle mitochondria isolated from wild-type mice showed that superoxide-induced increase in the proton conductance of the mitochondrial inner membrane was catalysed by the adenine nucleotide translocase (ANT), while the experiments carried out on skeletal muscle mitochondria isolated from wild-type and UCP3-deficient mice revealed that HNE-stimulated proton leak was partially catalysed by UCP3 and partially catalysed by ANT. However, HNE-induced proton conductance in mice heart mitochondria was not mediated by UCP3, instead of that, uncoupling occurs through ANT and other pathways. Besides, the protective role of UCP3 against oxidative stress was assessed in ischemia-reperfusion processes by using an anoxia-reoxygenation protocol in rat neonatal cardiomyocytes transfected with *ucp3* gene and in heart mitochondria isolated from wild-type mice, which express basal levels of UCP3 protein, and heart mitochondria isolated from UCP3-deficient mice. Our results indicated that UCP3 expression in rat neonatal cardiomyocytes and in mice heart mitochondria that have been incubated with succinate correlated with an improved recovery of respiratory function after an anoxia-reperfusion process. However, in the presence of ADP, UCP3 expression in mice heart mitochondria impaired the recovery of respiratory function after an anoxia-reperfusion process. Finally, the presence of mitochondrial nitric oxide synthase (mtNOS) in skeletal muscle of endotoxin-treated mice was assessed by studying the inhibitory effect of nitric oxide on respiration using high-resolution respirometry. We observed an inhibition of respiration at low oxygen concentrations (10 μ M) and an increase in the value of p_{50} compared to control mice.

INTRODUCCIÓN

1. EL DESACOPPLAMIENTO MITOCONDRIAL

1.1. LA FOSFORILACIÓN OXIDATIVA

La mitocondria es un orgánulo presente en el citoplasma de las células eucariotas, encargado de suministrar la mayor parte de la energía necesaria para la actividad celular mediante el proceso denominado **fosforilación oxidativa**. Las rutas metabólicas del catabolismo celular (el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, la β -oxidación de los ácidos grasos y la oxidación de los aminoácidos) conducen a la síntesis de los donadores de electrones NADH y FADH₂. Estos sustratos, en la matriz mitocondrial, donan sus electrones a una serie de proteínas localizadas en la membrana mitocondrial interna y agrupadas en complejos que constituyen la **cadena de transporte de electrones mitocondrial**.

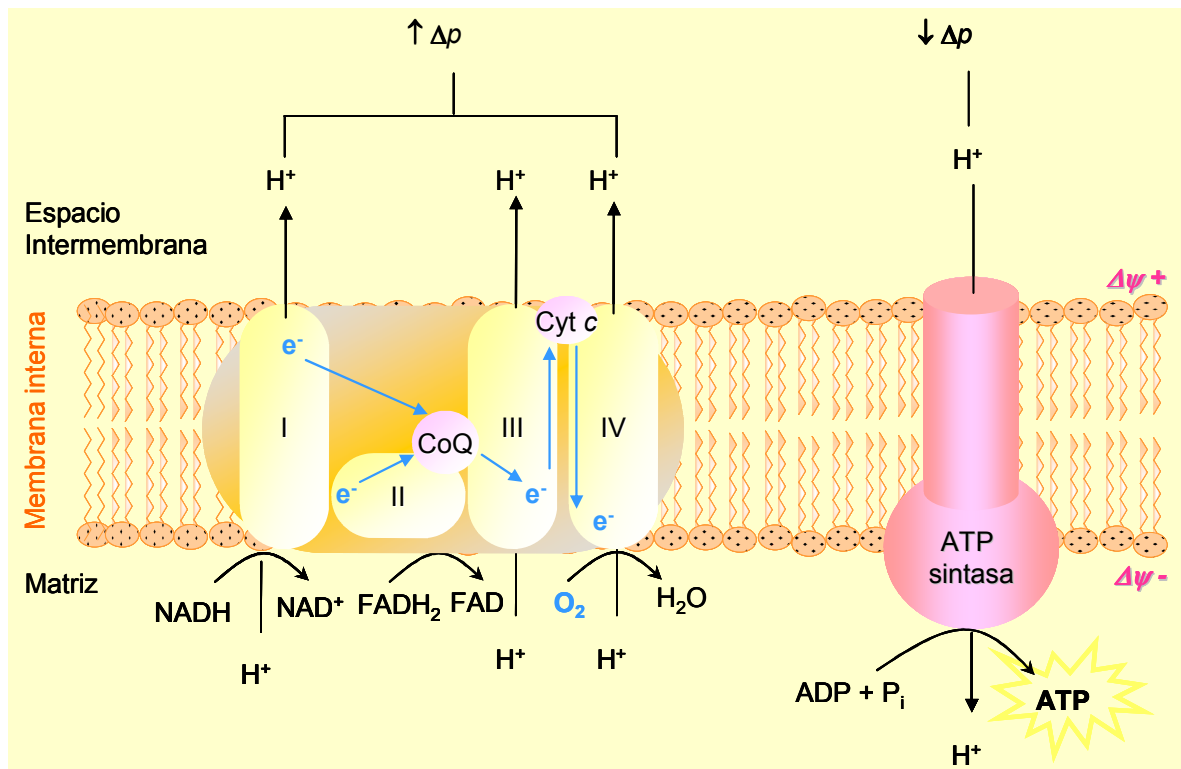


Figura I.1. Esquema de la cadena de transporte de electrones y la ATP sintasa en la membrana mitocondrial interna. Asociado al flujo de electrones (e^-) se crea un gradiente de protones (Δp) a ambos lados de la membrana mitocondrial interna que es utilizado por la ATP sintasa para la síntesis de ATP en la matriz mitocondrial a partir de ADP y fósforo inorgánico (Pi).

En la cadena de transporte de electrones, el Complejo I o NADH deshidrogenasa recibe los electrones del NADH mientras que el Complejo II o succinato deshidrogenasa recibe los electrones del FADH₂. Ambos complejos ceden a su vez los electrones a la coenzima Q o ubiquinona, para ser transferidos seguidamente al Complejo III o citocromo bc_1 . Desde este

complejo, los electrones son cedidos al citocromo *c* y al Complejo IV o citocromo *c* oxidasa. Esta enzima transfiere finalmente los electrones al oxígeno molecular para producir 2 moléculas de agua. La transferencia de electrones a través de la cadena de transporte de electrones se encuentra acoplada a un bombeo de protones desde la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembrana, originándose así un **gradiente electroquímico de protones** ($\Delta\rho$) a ambos lados de la membrana mitocondrial interna. En esta membrana también se encuentra el Complejo de la ATP sintasa, que cataliza la síntesis de ATP a partir de ADP y fósforo inorgánico (Pi) utilizando la energía del gradiente de protones. A este proceso se le denomina **fosforilación oxidativa** (Figura I.1).

En 1961, Peter Mitchell formuló la denominada **hipótesis quimiosmótica de la fosforilación oxidativa** (Mitchell 1961), en la que describió que la oxidación del NADH y el FADH₂, así como el consumo de oxígeno a través de la cadena de transporte de electrones se encuentran acoplados a la síntesis de ATP, siendo el gradiente electroquímico de protones el nexo de unión entre ambos procesos. Peter Mitchell recibió el Premio Nobel de Química en 1978 por la formulación de esta teoría.

1.2. LA CONDUCTANCIA DE LA MEMBRANA MITOCONDRIAL INTERNA A LOS PROTONES

Como se ha mencionado anteriormente, la oxidación del NADH y el FADH₂ por la cadena de transporte de electrones se encuentra acoplada a un bombeo de protones desde la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembrana, generándose así un gradiente electroquímico de protones o fuerza protón motriz ($\Delta\rho$) a ambos lados de la membrana mitocondrial interna (Figura I.1). Durante la fosforilación oxidativa, los protones regresan a la matriz mitocondrial a través de la ATP sintasa y la energía de la fuerza protón motriz es utilizada para la síntesis de ATP. Sin embargo, algunos protones regresan a la matriz mitocondrial por otras vías independientes de la ATP sintasa, provocando una disminución de la fuerza protón motriz no acoplada a la síntesis de ATP. A la disociación entre la respiración y la síntesis de ATP se le denomina **desacoplamiento mitocondrial**.

El desacoplamiento mitocondrial se asocia al fenómeno de "**proton leak**" o fuga de protones, consistente en que los protones bombeados hacia el espacio intermembrana regresan a la matriz a través de vías independientes de la síntesis de ATP (Brand et al., 1994b). La importancia fisiológica de la fuga de protones se refleja en el hecho de que supone el 20-30% del consumo total de oxígeno en los hepatocitos aislados de rata (Brand et al., 1994b) y alrededor del 50% del consumo de total oxígeno en el músculo esquelético de rata (Rolfe and Brand 1996). En condiciones basales se ha determinado que la conductancia a los protones del hígado y el músculo esquelético de rata supone un 20-25% de la tasa metabólica basal (Rolfe

and Brand 1996; 1997), mientras que en situaciones de actividad, como la gluconeogénesis y la ureagénesis en el hígado y la contracción tetánica máxima en el músculo, se sigue produciendo cierta fuga de protones y la conductancia a los protones supone entonces un 15% de la tasa metabólica basal (Rolfe et al., 1999).

La **conductancia basal** determina la difusión no catalizada de iones a través de una bicapa fosfolipídica (Garlid et al., 1989). Este fenómeno no cumple la ley de Ohm, es decir, no depende linealmente de su fuerza motriz (el potencial de membrana), sino que la conductancia aumenta en gran medida a potenciales de membrana elevados (Nicholls 1974). Inicialmente se consideró que la conductancia basal era un suceso biofísico no catalizado por proteínas, aunque posteriormente se ha determinado que varios transportadores mitocondriales, como el transportador de adenina y el de glutamato-aspartato, pueden catalizar una fuga de protones dependiente de ácidos grasos (Brand et al., 1999).

La conductancia basal a los protones de la membrana mitocondrial interna se encuentra altamente relacionada con la composición de los ácidos grasos de los fosfolípidos de la membrana (Brand et al., 1991; Brand et al., 1992; Brand et al., 1994a; Fontaine et al., 1996; Porter et al., 1996; Brookes et al., 1998). Sin embargo, al reconstituir vesículas fosfolipídicas a partir de lípidos mitocondriales, se determinó que la conductancia a los protones era únicamente el 2-25% de la conductancia observada en las mitocondrias de las que provenían dichos lípidos y, además, dicho porcentaje no se veía afectado por los cambios en la composición de los fosfolípidos (Brookes et al., 1997a; Brookes et al., 1997b). Este hecho parecía indicar que, junto con el área de la superficie de la membrana mitocondrial interna y la composición de los fosfolípidos, existía otro factor que condicionaba la conductancia a los protones de la membrana mitocondrial interna. Este factor podría ser una proteína de la membrana mitocondrial interna y, en este contexto, se ha estudiado el papel de las **proteínas desacoplantes mitocondriales** (apartado 2 de la Introducción) (Nicholls et al., 1978; Locke et al., 1982; Cannon and Nedergaard 1985; Gong et al., 1997; Boss et al., 1998; Cadenas et al., 1999; Jekabsons et al., 1999; Nicholls and Rial 1999; Gong et al., 2000; Vidal-Puig et al., 2000; Yu et al., 2000; Cadenas et al., 2002; Couplan et al., 2002; Parker et al., 2008a).

En presencia de ciertos compuestos activadores de la conductancia de la membrana mitocondrial a los protones como el radical superóxido (Couplan et al., 2002; Echtay et al., 2002b; Krauss et al., 2003) y el compuesto 4-hidroxinonenal (Echtay et al., 2003; Zhang et al., 2006b; Parker et al., 2008b) se determina la **conductancia inducida**. En las mitocondrias del tejido adiposo pardo, la conductancia inducida está catalizada por la **proteína desacoplante 1 (UCP1)**, y es muy dependiente de los ácidos grasos y los nucleótidos (Nicholls 1976; Locke and Nicholls 1981; Locke et al., 1982; Nicholls and Rial 1999).

2. LAS PROTEÍNAS DESACOPLANTES

Las **proteínas desacoplantes mitocondriales** o “*uncoupling proteins*” (UCPs) pertenecen a la superfamilia de transportadores de aniones localizados en la membrana mitocondrial interna. En esta superfamilia también se incluyen otros transportadores como los de nucleótidos de adenina (ANT), fósforo inorgánico (Pi), piruvato, oxoglutarato, glutamato-aspartato, citrato, dicarboxilatos, glutamato, glutamina, carnitina y ornitina. En la Tabla I.1 se reflejan los transportadores pertenecientes a esta familia que presentan un mayor porcentaje de similitud en su secuencia de aminoácidos con la proteína desacoplante 1 (UCP1).

Proteína	Nº acceso	% identidad con UCP1	Función de transporte
UCP1	P25874	100	Uniporte de H ⁺ y aniones (Cl ⁻ , NO ₃ ⁻) al interior de la matriz
UCP2	P55851	59	Uniporte de H ⁺ y aniones (Cl ⁻ , NO ₃ ⁻) al interior de la matriz
UCP3	P55916	57	Uniporte de H ⁺ y aniones (Cl ⁻ , NO ₃ ⁻) al interior de la matriz
Transportador de dicarboxilato	Q9UBX3	35	Transporte electroneutro de dicarboxilatos al interior de la matriz, por Pi o compuestos azufrados (sulfato, tiosulfato).
UCP5 o BMCP1	O95258	34	Uniporte de H ⁺ y aniones (Cl ⁻ , NO ₃ ⁻) al interior de la matriz
Transportador de oxalato-malato	Q02978	32	Antiporte de 2-oxoglutarato al espacio intermembrana, y malato al interior de la matriz
UCP4	O95847	30	Uniporte de H ⁺ y aniones (Cl ⁻ , NO ₃ ⁻) al interior de la matriz
Transportador de carnitina	O43772	26	Antiporte de carnitina al espacio intermembrana, y acilcarnitina al interior de la matriz
Transportador de citrato	P53007	24	Antiporte de malato al espacio intermembrana, y citrato y un H ⁺ al interior de la matriz
Transportador de ornitina	Q9Y619	24	Transporte electroneutro de ornitina al interior de la matriz por un H ⁺ ; antiporte de ornitina al interior de la matriz, y citrulina al citosol.
ANT1	P12235	19	Intercambia el ATP generado en la matriz por ADP citoplásmico
ANT2	P05141	20	Intercambia el ATP generado en la matriz por ADP citoplásmico
ANT3	P12236	20	Intercambia el ATP generado en la matriz por ADP citoplásmico
Transportador de fosfato	Q00325	16	Antiporte de OH ⁻ al espacio intermembrana y Pi a la matriz; simporte de H ⁺ y Pi a la matriz.

Tabla I.1. Representación del grado de identidad en la secuencia de aminoácidos entre la UCP1 y otros miembros de la familia de proteínas transportadoras de la membrana mitocondrial interna. Adaptado de Krauss *et al.* (2005).

2.1. LA PROTEÍNA DESACOPLANTE UCP1

La primera proteína desacoplante identificada fue la **termogenina** o **proteína desacoplante 1 (UCP1)** (Nicholls et al., 1978). Esta proteína se expresa exclusivamente en el tejido adiposo pardo, donde ejerce su función fisiológica en la **termogénesis adaptativa**. La UCP1 desacopla la respiración de la síntesis de ATP, disipando el gradiente de protones y generando calor (Nicholls and Locke 1984; Nicholls and Rial 1999; Cannon and Nedergaard 2004).

El **tejido adiposo pardo** se encuentra en mamíferos de pequeño tamaño, como los roedores, así como en neonatos de grandes mamíferos, como los humanos. Su localización en el organismo es dispersa, y sus principales depósitos se detectan en la zona interescapular, axilar, renal, torácica y cervical. La fuga de protones mediada por la UCP1 desde el espacio intermembrana hacia la matriz mitocondrial está controlada por el **sistema nervioso simpático**. Al producirse la estimulación de los receptores β -adrenérgicos por las catecolaminas, se activa la UCP1 en los adipocitos del tejido adiposo pardo y, al mismo tiempo, aumenta el transporte, movilización y oxidación de sustratos, así como la producción de NADH y FADH₂. Este aumento en el suministro de sustratos se produce debido a un aumento en el transporte de glucosa hacia los adipocitos y a un aumento de la lipólisis (Marette and Bukowiecki 1989; Omatsu-Kanbe and Kitasato 1992).

El transporte de protones a través de la membrana mitocondrial interna mediado por la UCP1 se activa en presencia de **ácidos grasos** (Nicholls and Rial 1999; Klingenberg et al., 2001). Sin embargo, el mecanismo por el cual la función de la UCP1 es activada por los ácidos grasos no se encuentra completamente aclarado, y a este respecto se han propuesto dos hipótesis:

1. Los ácidos grasos funcionan como **grupos prostéticos** de la UCP1, según la hipótesis conocida en inglés como "*proton-buffering model*", de manera que la UCP1 dispone de un canal de translocación a través del cual los protones entran en la matriz mitocondrial. Este transporte de protones se realizaría con la ayuda de aminoácidos tamponadores que aceptarían protones en el espacio intermembrana y los liberarían en la matriz mitocondrial, siendo el papel de los ácidos grasos la donación de protones a los aminoácidos tamponadores del canal de translocación (Winkler and Klingenberg 1994; Gonzalez-Barroso et al., 1998; Klingenberg and Huang 1999; Rial et al., 2004).
2. La UCP1 **transporta los ácidos grasos** en forma de aniones desde la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembrana, donde aceptarían un protón. Los ácidos grasos en su forma protonada pueden atravesar la membrana mitocondrial mediante un proceso de "*flip-flop*" y regresar a la matriz, donde el protón sería liberado y comenzaría de nuevo el ciclo. Esta hipótesis es conocida en inglés como "*fatty acid model*" (Jezek et al., 1994; Garlid et al., 1998).

Por otro lado, la función de transporte de protones de la UCP1 a través de la membrana mitocondrial interna se inhibe en presencia de **nucleótidos de purina** (Nicholls and Rial 1999; Klingenberg et al., 2001). Los nucleósidos difosfato y trifosfato como el ATP, el ADP, el GTP y el GDP (a diferencia de los nucleósidos monofosfato AMP y GMP) se unen con alta afinidad a la UCP1. Esta unión se produce en el lado citosólico de la membrana mitocondrial interna (Nicholls 1976).

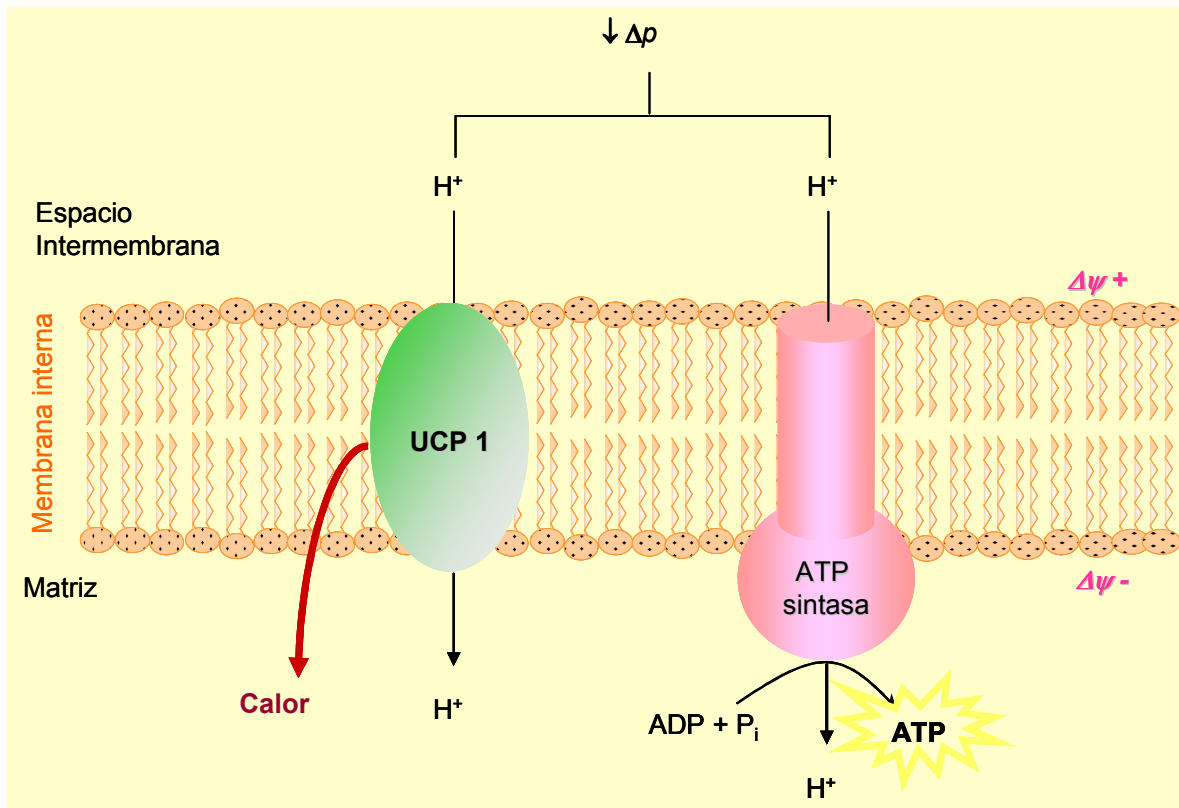


Figura I.2. Disipación del gradiente de protones en la membrana mitocondrial interna. La energía contenida en el gradiente de protones (Δp) es utilizada por la ATP sintasa para la síntesis de ATP, pero el gradiente también es disipado por la UCP1 en el tejido adiposo pardo, destinándose dicha energía a la generación de calor.

2.2. LAS PROTEÍNAS HOMÓLOGAS DE LA UCP1

Tras la identificación de la UCP1, se describieron otras proteínas cuya secuencia de aminoácidos presentaba un alto porcentaje de identidad con la secuencia de la UCP1. En 1997, se describió una proteína que presentaba un 59% de identidad en su secuencia de aminoácidos con la UCP1, que fue denominada **proteína desacoplante 2 (UCP2)** (Fleury et al., 1997). El ARNm de la UCP2 se ha detectado en numerosos tejidos, encontrándose fundamentalmente en el bazo, el timo, las células β pancreáticas, el corazón, los pulmones, el tejido adiposo blanco y pardo, el estómago y los testículos. En menor cantidad, se ha detectado también el ARNm de la UCP2 en el cerebro, los riñones, el hígado y el músculo esquelético (Echtay 2007). Sin embargo, a pesar de haberse detectado el ARNm de la UCP2 en

numerosos tejidos, la detección de la proteína es mucho más limitada. Así, en tejidos como el corazón, el músculo esquelético o el tejido adiposo pardo, no se ha conseguido detectar la proteína (Pecqueur et al., 2001).

En el mismo año en el que se determinó la existencia de la UCP2, se describió una nueva proteína que presentaba un 57% de identidad en su secuencia de aminoácidos con la UCP1 y, a su vez, un 73% de identidad con la secuencia de aminoácidos de la UCP2 (Boss et al., 1997). Esta proteína fue denominada **proteína desacoplante 3 (UCP3)**, y tanto la expresión de su ARNm como la propia proteína se han detectado en el músculo esquelético y en el corazón. El ARNm de la UCP3 se ha detectado también en el tejido adiposo pardo; sin embargo, la expresión de la proteína UCP3 en este tejido es controvertida (Echtay 2007).

La regulación de la actividad de las proteínas UCP2 y UCP3 por los **ácidos grasos** fue estudiada mediante la expresión de estas proteínas en liposomas, determinándose que los ácidos grasos ejercían un efecto activador sobre la actividad de las mismas (Jaburek et al., 1999; Echtay et al., 2001; Zackova et al., 2003). Sin embargo, este efecto no se ha observado *in vivo* (Krauss et al., 2005), y recientemente se ha determinado que en la estructura de la UCP1 existe un lazo o "loop" central en la matriz mitocondrial asociado con la alta afinidad con la que esta proteína es activada por los ácidos grasos (Jimenez-Jimenez et al., 2006), no existiendo dicho lazo en la estructura de la UCP2 y la UCP3. En cambio, existen numerosas evidencias experimentales en relación al efecto inhibitorio que ejercen los **nucleótidos de purina** sobre la actividad de las proteínas UCP2 y UCP3, tanto en condiciones basales (Jaburek et al., 1999; Echtay et al., 2001; Cadenas et al., 2002; Jekabsons et al., 2002; Zackova et al., 2003; Parker et al., 2008a), como en presencia del radical superóxido (Echtay et al., 2002a; Echtay et al., 2002b; Krauss et al., 2003; Talbot et al., 2004) y el compuesto 4-hidroxinonenal (Echtay et al., 2003; Parker et al., 2008b), los cuales activan la conductancia a los protones mediada a través de estas proteínas (apartados 3.4.3 y 3.4.4. de la Introducción). Además, estructuralmente, los aminoácidos de la UCP1 con los que interaccionan los nucleótidos de purina al ejercer su efecto inhibitorio se encuentran totalmente conservados en todas las UCPs (Echtay 2007).

Posteriormente, se describió otro transportador mitocondrial que se expresaba exclusivamente en el cerebro y que presentaba alrededor de un 30% de similitud en su secuencia de aminoácidos con las proteínas UCP1, UCP2 y UCP3. Esta proteína fue denominada **proteína desacoplante 4 (UCP4)** (Mao et al., 1999).

Previamente a la identificación de la UCP4, se describió un nuevo homólogo de las UCPs que se expresaba fundamentalmente en el sistema nervioso central al que se denominó **proteína desacoplante 5 (UCP5)** o "**brain mitochondrial carrier protein 1**" (**BMCP1**). Este

transportador mitocondrial presentaba un porcentaje de identidad del 34, 38 y 39% con la secuencia de aminoácidos de la UCP1, la UCP2 y la UCP3, respectivamente (Sanchis et al., 1998).

Tras la detección de estas proteínas con un alto grado de identidad con la UCP1 en mamíferos, se identificó en aves, en concreto en la especie *Gallus gallus*, una nueva proteína desacoplante a la que se denominó **avUCP**. Esta proteína se expresaba en el músculo esquelético y presentaba un 55% de identidad con la UCP1 de mamíferos, y un 70% con la UCP2 y la UCP3 de mamíferos (Raimbault et al., 2001). Al mismo tiempo, en la especie aviar *Eupetomena macroura*, se describió la proteína desacoplante **HmUCP** en el músculo, el corazón y el hígado. Esta proteína presentaba un 50, 70 y 72% de identidad con la UCP1, la UCP2 y la UCP3 de mamíferos, respectivamente (Vianna et al., 2001).

Debido a la clara implicación de la UCP1 en la termogénesis, fue sorprendente la identificación de proteínas homólogas de la UCP1 en animales ectotermos, hecho que sugería la implicación de las UCPs en otras funciones distintas a la de generar calor. En peces, inicialmente se identificó la UCP2 en las especies *Danio rerio* y *Cyprinus carpio*. Esta proteína presentaba un 82% de identidad con la UCP2 de mamíferos, un 70% con la UCP3 y un 60% con la UCP1 (Stuart et al., 1999). En otro estudio realizado en la especie *Oncorhynchus mykiss*, se identificaron los genes **ucp2a** y **ucp2b** (Coulibaly et al., 2006). Posteriormente, en la especie *Cyprinus carpio*, se detectó también la presencia de la UCP3 en el músculo esquelético, y la UCP1 fundamentalmente en el hígado (Jastroch et al., 2005). En reptiles, en la especie *Lacerta vivipara*, se describió en el músculo esquelético la proteína **repUCP** que presentaba un 55, 72 y 77% de identidad con la UCP1, la UCP2 y la UCP3 de mamíferos, respectivamente, así como un 73% de identidad con las UCPs de aves y peces (Rey et al., 2008). En plantas se describió la primera UCP en 1997, en concreto en la especie *Solanum tuberosum* que fue denominada **StUCP** (Laloi et al., 1997). En otra especie vegetal, *Arabidopsis thaliana*, se describió otra proteína homóloga de las UCPs, **AtUCP**, que presentaba un 89% de identidad con StUCP (Maia et al., 1998). Posteriormente, mediante la utilización de anticuerpos destinados a la detección de UCPs en plantas, se detectó un nuevo homólogo de las UCPs en el protozoo *Acanthamoeba castellanii*, denominado **AcUCP** (Jarmuszkiewicz et al., 1999).

2.3. LA REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LAS UCPs

El control transcripcional de la expresión de los genes de las UCPs determina los niveles de expresión de dichas proteínas en los diferentes tejidos. En los últimos años se ha determinado que los **receptores activados por la proliferación de los peroxisomas** o “*peroxisome proliferator-activated receptors*” (PPAR) ejercen un importante papel en la regulación de la transcripción de los genes *ucp1*, *ucp2* y *ucp3*.

En el **tejido adiposo pardo** se expresan los tres subtipos de los PPAR: PPAR α , PPAR δ y PPAR γ . Sin embargo, los pre-adipocitos expresan únicamente PPAR δ y PPAR γ , no detectándose la expresión de PPAR α hasta alcanzarse el fenotipo celular claramente diferenciado (Valmaseda et al., 1999). Por otro lado, la expresión de los diferentes subtipos de PPAR se regula de diferente manera ante un mismo estímulo, como el ácido retinoico, que aumenta la expresión de PPAR α mientras que disminuye la expresión de PPAR γ (Valmaseda et al., 1999). La activación de PPAR γ induce la diferenciación de los adipocitos en el tejido adiposo pardo y blanco, puesto que PPAR γ regula la expresión de diversos genes implicados en la adipogénesis y en el metabolismo de los lípidos (Rosen et al., 2000). Entre los genes que regula PPAR γ se encuentra el gen **ucp1**, el cual está regulado además por los factores de transcripción de la familia C/EBP o “CCAAT-enhancer binding protein” (C/EBP α , C/EBP δ y C/EBP γ) (Yubero et al., 1994; Sears et al., 1996; Carmona et al., 2005). La expresión del coactivador transcripcional 1 α de PPAR γ o “peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 α ” (PGC-1 α) se induce en el tejido adiposo pardo en respuesta a la activación de la termogénesis (Puigserver et al., 1998). En este contexto se ha propuesto que PGC-1 α se encuentra implicado en la diferenciación de los adipocitos pardos y en la regulación de la expresión del gen **ucp1** coactivando a PPAR γ y PPAR α (Puigserver et al., 1998; Barbera et al., 2001). Sin embargo, el papel regulador de PPAR δ en la expresión del gen **ucp1** en el tejido adiposo pardo no se ha determinado claramente por el momento (Villarroya et al., 2007).

En el **músculo esquelético** y el **corazón**, la expresión del gen **ucp3** se induce a través de PPAR α en respuesta al catabolismo de los ácidos grasos (Brun et al., 1999; Pedraza et al., 2000; Finck et al., 2005; Pedraza et al., 2006). En estos tejidos también se ha descrito que PPAR δ tiene la capacidad de activar al gen **ucp3** (Luquet et al., 2003; Cheng et al., 2004; Wang et al., 2004). Tanto PPAR α como PPAR δ regulan la expresión del gen **ucp3** uniéndose a un elemento de respuesta a los PPAR localizado en la región proximal del promotor del mismo (Solanes et al., 2003; Pedraza et al., 2006). Por otro lado, al estudiar el papel regulador de PPAR γ en la expresión de este gen en el músculo esquelético y el corazón se han obtenido resultados contradictorios en diferentes trabajos (Villarroya et al., 2007), destacándose que los niveles de expresión del ARNm de la UCP3 no se ven modificados en los ratones en los que se ha deleciónado la expresión de PPAR γ en el músculo esquelético (Hevener et al., 2003).

La expresión del gen **ucp2** en el **músculo esquelético** y el **corazón** está también regulada por PPAR α y PPAR δ (Villarroya et al., 2007). Sin embargo, la activación de la transcripción de **ucp2** dependiente de ácidos grasos también puede darse a través de mecanismos independientes de PPAR α y PPAR δ (Chevillotte et al., 2001; Medvedev et al., 2001; Villarroya et al., 2007). PPAR γ y sus ligandos activan el promotor del gen **ucp2** aunque no se ha podido detectar una

unión directa de PPAR γ , por lo que podría tratarse de un efecto indirecto (Medvedev et al., 2001).

Las **células β pancreáticas** expresan PPAR α , PPAR δ y PPAR γ , aunque su papel regulador de la expresión del gen *ucp2* en estas células no ha sido claramente establecido (Zhou et al., 1998). PPAR α parece estar implicado en la regulación de la secreción de insulina (Zhou et al., 1998; Tordjman et al., 2002; Gremlich et al., 2005). Por el contrario, el estudio del efecto de PPAR γ sobre la expresión del gen *ucp2* en las células β pancreáticas ha aportado resultados contradictorios, sin detectarse además una unión directa de PPAR γ al promotor de *ucp2* (Medvedev et al., 2001).

3. LA FUNCIÓN DE LOS HOMÓLOGOS DE LA UCP1

A pesar de la numerosa bibliografía existente sobre la identificación de los homólogos de la UCP1, existe mucha controversia en cuanto a la función real de estas proteínas. En este capítulo se describen las diferentes funciones en las que se ha implicado a los homólogos de la UCP1, en concreto, a la UCP2 y la UCP3.

Tras la identificación en el año 1997 de las proteínas UCP2 y UCP3 como proteínas que presentaban un alto grado de identidad en su secuencia de aminoácidos con la UCP1 (Boss et al., 1997; Fleury et al., 1997), se han realizado numerosos estudios encaminados a determinar los factores que regulan su expresión, función y activación. Sin embargo, a la hora de interpretar los resultados obtenidos en muchos de estos trabajos, se debe tener en cuenta que los niveles de expresión del ARNm de la UCP2 o la UCP3 no se relacionan necesariamente con los niveles de expresión de dichas proteínas (Sivitz et al., 1999; Pecqueur et al., 2001). Por lo tanto, la detección del ARNm de la UCP2 y la UCP3 o los cambios que se puedan determinar en sus niveles de expresión deberían ser también confirmados en relación a la expresión de la proteína a la hora de asociar un papel bioquímico o fisiológico a la UCP2 y la UCP3 (Echtay 2007).

3.1. LA REGULACIÓN DE LA TERMOGÉNESIS, EL GASTO ENERGÉTICO Y EL PESO CORPORAL

Debido a que la UCP1 cataliza la termogénesis adaptativa en el tejido adiposo pardo de numerosos mamíferos induciendo un aumento en la conductancia a los protones de la membrana mitocondrial interna (Nicholls and Rial 1999), se ha estudiado la relación entre los niveles de expresión de la UCP2 y la UCP3 y la **termogénesis**, el **gasto energético** y el

control del **peso corporal**. Sin embargo, en la mayoría de los estudios se han obtenido resultados que se oponen a la implicación de ambas proteínas en estos procesos.

La exposición al frío supone una alteración del gasto energético del organismo y conduce a la activación de la termogénesis. Sin embargo, en ratones deficientes en la expresión de la UCP2 (UCP2KO) (Arsenijevic et al., 2000; Zhang et al., 2001) y la UCP3 (UCP3KO) (Gong et al., 2000) se ha determinado que su respuesta termogénica al frío es similar a la detectada en ratones de tipo silvestre.

En situaciones de ayuno o restricción calórica, el gasto energético del organismo disminuye. Sin embargo, los niveles de expresión del ARNm de la UCP3 aumentan en ratas sometidas a 48 (Boss et al., 1998) ó 24 h (Cadenas et al., 1999) de ayuno, detectándose dicho aumento también en la expresión de la proteína en este último trabajo. De acuerdo con estos resultados, los niveles de expresión de la UCP3 se ven afectados por el ayuno de forma opuesta a la esperada en el caso de que esta proteína estuviera implicada en el gasto energético.

En relación al control del peso corporal, no existen diferencias entre los ratones de tipo silvestre y mutantes UCP2KO (Arsenijevic et al., 2000; Zhang et al., 2001), ni entre los ratones de tipo silvestre y mutantes UCP3KO (Gong et al., 2000; Vidal-Puig et al., 2000; Cadenas et al., 2002). Sorprendentemente, los ratones que sobreexpresan la UCP3 presentan un peso corporal inferior al detectado en los animales de tipo silvestre a pesar de presentar hiperfagia (Clapham et al., 2000). Por otro lado, los ratones UCP2KO (Arsenijevic et al., 2000) y UCP3KO (Vidal-Puig et al., 2000; Hoeks et al., 2006) responden a una dieta rica en grasas de manera similar a los ratones de tipo silvestre.

En ensayos en los que se inoculó tri-iodo-tironina o un β 3-agonista a los ratones UCP3KO se detectó un aumento en el consumo de oxígeno y en la temperatura corporal similar al observado en los ratones de tipo silvestre (Gong et al., 2000). De manera similar, la inoculación de noradrenalina a una estirpe de hámster deficiente en la expresión de la UCP3 en el tejido adiposo pardo, producía una respuesta termogénica idéntica a la observada en hámsteres de tipo silvestre (Liebig et al., 2004). Estos resultados indicaban que la UCP3 no se encuentra implicada en la regulación de la temperatura corporal ni en el control de la tasa metabólica basal.

Por otro lado, la identificación de proteínas homólogas a la UCP2 y a la UCP3 en organismos que no requieren de la termogénesis, como peces, reptiles y plantas (apartado 2.2 de la Introducción), sugería que las UCPs podrían tener otra función diferente a la de generar calor.

3.2. EL METABOLISMO DE LOS ÁCIDOS GRASOS

En concordancia con el modelo propuesto por Garlid y colaboradores (Garlid et al., 1996), sobre el mecanismo de transporte de protones por la UCP1, se ha sugerido que la UCP3 podría estar implicada en el **transporte de los ácidos grasos** desde la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembrana. Cuando el aporte de ácidos grasos excede la capacidad mitocondrial para ser oxidados, se produce la acumulación de acil-coenzima A en la mitocondria. En este punto, la acil-coenzima A tioesterasa mitocondrial libera el coenzima A del grupo acil-coenzima A, permitiéndose así que el coenzima A vuelva a participar en el ciclo de Krebs y en la β -oxidación de los ácidos grasos (Alexson and Nedergaard 1988). En relación a este hecho se ha propuesto que la UCP3 ejercería el papel de exportar los aniones de los ácidos grasos desde la matriz mitocondrial hacia el citosol, donde serían reactivados por las acil-coenzima A sintasas, favoreciendo la disponibilidad de coenzima A y permitiéndose así el mantenimiento de una alta tasa de oxidación de los ácidos grasos (Himms-Hagen and Harper 2001; Bezaire et al., 2007).

Una hipótesis relacionada sugiere que, cuando existe un elevado aporte de ácidos grasos, el gradiente de pH facilita su acumulación en el interior de la mitocondria, donde no pueden ser metabolizados debido a la ausencia de acil-coenzima A sintasa y ejercen un efecto tóxico. En este contexto el transporte de ácidos grasos mediado por la UCP3 ejercería un **papel protector frente a lipotoxicidad**, al evitar su acumulación en la matriz y disminuir la posibilidad de que se produzca un daño mitocondrial, considerándose entonces el transporte de protones como un efecto secundario asociado al circuito que se establece en la matriz mitocondrial de entrada de ácidos grasos protonados y salida de ácidos grasos desprotonados (Schrauwen and Hesselink 2004).

Estas hipótesis concuerdan con el hecho de que la UCP3 tiene la capacidad de transportar aniones (Garlid et al., 2000; Klingenberg and Echtay 2001; Esteves and Brand 2005) y con la observación de un aumento en los niveles de expresión de su ARNm en estados asociados a un incremento en el catabolismo de las grasas, como el ayuno o el ejercicio. En este sentido, diversos estudios realizados en humanos han determinado que tanto el ayuno (Millet et al., 1997), como el ejercicio (Schrauwen et al., 2002) o la ingesta de dietas con alto contenido en grasa (Schrauwen et al., 2001b) aumentan los niveles de expresión del ARNm de la UCP3. En roedores se han obtenido resultados similares al inducir un aumento en el metabolismo de las grasas mediante el mantenimiento de los animales en ayuno (Boss et al., 1998; Cadenas et al., 1999), o al someterlos a la realización de ejercicio (Tsuboyama-Kasaoka et al., 1998) o a la ingesta de dietas con alto contenido en grasa (Matsuda et al., 1997; Vidal-Puig et al., 2000). Además, las mitocondrias aisladas a partir del músculo esquelético de ratones que sobreexpresan la UCP3 presentan un aumento en la tasa de oxidación de ácidos grasos y un descenso en las reservas intramusculares de triglicéridos (Wang et al., 2003; Bezaire et al.,

2005). Sin embargo, estudios realizados en ratones UCP3KO determinaron que estos animales presentaban unos niveles de triglicéridos similares a los detectados en los ratones de tipo silvestre (Gong et al., 2000), no tenían disminuida la capacidad de oxidar ácidos grasos (Gong et al., 2000; Vidal-Puig et al., 2000) y, por lo tanto, la función de la UCP3 no debía ser esencial para el mantenimiento de una tasa de oxidación lipídica normal.

La hipótesis sobre la implicación de la UCP3 en el transporte de los aniones de los ácidos grasos como mecanismo de protección frente a lipotoxicidad no ha sido totalmente evidenciada y, por otro lado, resultados obtenidos por otros autores se oponen a dicha hipótesis. Seifert y colaboradores han determinado recientemente que la UCP3 no se requiere para la oxidación de los ácidos grasos, y que el transporte y la reoxidación de los aniones de los ácidos grasos ante una elevada tasa de oxidación de los mismos es independiente de los niveles de expresión de la UCP3 (Seifert et al., 2008). También en discordancia con el papel transportador de los ácidos grasos de las UCPs se encuentra el hecho de que en levaduras los ácidos grasos aumentan la capacidad desacoplante de la UCP1, pero sin ser esenciales para dicha actividad desacoplante (Gonzalez-Barroso et al., 1998). En otro trabajo posteriormente realizado, además de confirmarse la actividad desacoplante de la UCP1 independiente de ácidos grasos, se determinó que los compuestos alquil-sulfonados, incapaces de atravesar las bicapas lipídicas, tenían la capacidad de activar a la UCP1 (Rial et al., 2004).

3.3. EL METABOLISMO DE LA GLUCOSA

La **secreción de insulina** por parte de las células β pancreáticas ejerce un papel muy importante en la homeostasis de la glucosa. Ante una elevada concentración de glucosa en sangre, se produce un aumento de la relación ATP/ADP, cerrándose los canales de potasio dependientes de ATP. Este hecho induce la despolarización de la membrana plasmática y la entrada de calcio en el citosol de las células β pancreáticas, desencadenando la liberación de insulina (Ashcroft and Gribble 1999). En diversos estudios se ha determinado que la UCP2 disminuye la generación de ATP a partir del metabolismo de la glucosa en las células pancreáticas y, como consecuencia, se modifica la relación ATP/ADP y se dificulta la secreción de insulina (Chan et al., 2001; Zhang et al., 2001; Krauss et al., 2002). Experimentalmente se ha determinado que la sobreexpresión de la UCP2 en los islotes pancreáticos de rata inhibe la secreción de insulina (Chan et al., 1999; Chan et al., 2001), mientras que, en los islotes pancreáticos aislados a partir de ratones UCP2KO, se ha detectado una mayor secreción de insulina frente a una determinada concentración de glucosa en comparación con los niveles de insulina detectados en los islotes aislados a partir de animales de tipo silvestre (Zhang et al., 2001). Además, los ratones UCP2KO presentan en sangre niveles de glucosa inferiores y niveles de insulina superiores a los detectados en los ratones de tipo silvestre (Zhang et al., 2001). Estas observaciones indican que la UCP2 ejerce un papel **regulador negativo** de la secreción de insulina.

La implicación de la UCP2 en el metabolismo de la glucosa ha hecho que diferentes autores hayan analizado el papel de esta proteína en la etiología de la **diabetes mellitus**, un síndrome multisistémico caracterizado por un aumento de los niveles de glucosa en sangre debido a un déficit en la secreción de insulina por destrucción autoinmune de las células β pancreáticas (diabetes tipo I) o a grados variables de resistencia a la acción de esta hormona o de déficit en su secreción (diabetes tipo II). Debido a que la UCP2 ejerce un efecto regulador negativo sobre la secreción de insulina, se ha propuesto que el aumento en la expresión de esta proteína en las células β pancreáticas podría generar una disfunción de estas células induciendo el desarrollo de una diabetes tipo II. Esta afirmación está apoyada por la detección de niveles elevados de la UCP2 (tanto de ARNm como de proteína) en los islotes pancreáticos de distintos modelos animales en los que se ha estudiado esta enfermedad (Kassis et al., 2000; Zhang et al., 2001; Joseph et al., 2002; Laybutt et al., 2002; Winzell et al., 2003). Por ejemplo, en los islotes pancreáticos de los ratones *ob/ob* (animales deficientes en la producción de leptina que son utilizados como modelo de diabetes inducida por obesidad), la expresión de la UCP2 se encuentra aumentada (Zhang et al., 2001). Por otro lado, la administración de una dieta rica en grasas permitió determinar que los ratones UCP2KO presentan una mayor capacidad de secretar insulina que los ratones de tipo silvestre. Por tanto, la ausencia de la UCP2 protege frente a la disfunción celular inducida por una dieta rica en grasas (Joseph et al., 2002). Los autores de este estudio propusieron que la UCP2 podría tener un papel en la progresión de la diabetes tipo II.

El tejido muscular interviene forma muy importante en el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa y, debido a la expresión específica de la UCP3 en este tejido, se han realizado diversos estudios sobre la posible implicación de la UCP3 en el metabolismo de la glucosa.

La exposición al frío o la realización de ejercicio inducen un aumento en el consumo de glucosa en el músculo esquelético. En este sentido se ha determinado en roedores un aumento en la expresión del ARNm de la UCP3 y del transportador de glucosa GLUT4 tras la exposición al frío (Lin et al., 1998) y tras la realización de ejercicio (Tsuboyama-Kasaoka et al., 1998). Estos resultados indican que en el músculo esquelético existe una relación entre la expresión de la UCP3 y el metabolismo de la glucosa. Con la finalidad de clarificar esta relación, se analizaron los niveles de glucosa plasmática y de insulina en ratones que sobreexpresan la UCP3, detectándose una disminución de los mismos (Clapham et al., 2000). Por el contrario, utilizando este mismo modelo animal, otros autores han determinado que la sobreexpresión de la UCP3 se encuentra asociada a un aumento en la oxidación de la glucosa (Wang et al., 2003).

Cuando se ha tratado de evaluar el efecto de la sobreexpresión de esta proteína sobre el metabolismo de la glucosa en la línea celular mioblástica L6, los resultados obtenidos han sido variables dependiendo de los estudios. Así, MacLellan y colaboradores (MacLellan et al.,

2005), no detectaron ningún efecto sobre el metabolismo de la glucosa en dicha línea celular a pesar de la sobreexpresión de la UCP3, mientras que Huppertz y colaboradores (Huppertz et al., 2001) encontraron en este mismo modelo celular un aumento en la expresión del transportador de glucosa GLUT4 en la superficie celular y, como consecuencia, un incremento del transporte de glucosa al interior de la célula.

Los estudios realizados en animales UCP3KO indicaron que la ausencia de esta proteína no modifica los niveles de insulina en sangre (Gong et al., 2000), y que estos animales tienen una respuesta a la glucosa y una resistencia a la acción de la insulina similar a la observada en los animales de tipo silvestre (Costford et al., 2006).

La posible implicación de la UCP3 en el metabolismo de la glucosa ha hecho que diferentes autores hayan analizado el papel de la UCP3 en la etiología de la *diabetes mellitus*. En este sentido, al determinar los niveles de expresión del ARNm de la UCP3 en pacientes diabéticos tipo II, se han obtenido resultados contradictorios. Mientras que en algunos estudios se ha detectado una disminución en la expresión de la UCP3 en estos pacientes (Krook et al., 1998), en otros trabajos se ha detectado un aumento en la expresión del gen *ucp3* (Bao et al., 1998; Vidal et al., 1999). En un trabajo realizado posteriormente, se determinaron los niveles de expresión de la proteína UCP3 en sujetos control y pacientes diabéticos tipo II, observándose que éstos últimos expresaban un 50% menos la proteína UCP3 (Schrauwen et al., 2001a). Aunque de forma muy preliminar, esta observación permitiría establecer una relación entre la UCP3 y la etiología de la *diabetes mellitus*, abriéndose las posibilidades de tratamiento de esta enfermedad mediante la utilización de fármacos dirigidos a inducir un aumento de la expresión de la UCP3 (Schrauwen and Hesselink 2002).

Sin embargo, en otro estudio realizado recientemente, se obtuvieron resultados diferentes, ya que se determinó que las mitocondrias aisladas a partir del músculo esquelético y el corazón de ratas diabéticas expresaban un aumento de 2-4 veces en el contenido de la proteína UCP3 (Herlein et al., 2008). No obstante, en contra de lo esperado, el estudio de la conductancia a los protones determinó que dichas mitocondrias se encontraban más acopladas que las mitocondrias aisladas a partir de los animales control.

3.4. LA PROTECCIÓN FRENTE AL DAÑO OXIDATIVO

3.4.1. El desacoplamiento mitocondrial como sistema de protección celular frente al daño oxidativo

En las mitocondrias, al producirse la oxidación de los sustratos y el transporte de electrones a lo largo de los diferentes complejos de la cadena de transporte de electrones mitocondrial, algunos electrones escapan de este sistema provocando la reducción del oxígeno molecular de

forma incompleta y dando lugar a la formación del **anión superóxido** ($O_2^{\cdot-}$) (Beckman and Koppenol 1996). Este radical libre puede inducir la producción de nuevas **especies reactivas del oxígeno** o “*reactive oxygen species*” (ROS), como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Esta molécula, a su vez, en presencia del ión Fe^{2+} y mediante la reacción de Fenton, puede originar el radical altamente reactivo hidroxilo (HO^{\cdot}). Cuando se produce un incremento excesivo en los niveles de ROS, se induce un estado de **daño o estrés oxidativo**, al producirse la oxidación de proteínas, ácidos nucleicos y lípidos (Urso and Clarkson 2003).

Frente a este daño oxidativo, la célula dispone de **sistemas de defensa antioxidantes** con el objetivo de disminuir la concentración de ROS o el daño producido por los mismos. Los sistemas antioxidantes que protegen a la célula pueden ser enzimáticos y no enzimáticos. Entre los **sistemas enzimáticos** se encuentra la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa, la glutatión-peroxidasa, la peroxirredoxina y la tioredoxina. Existen varias formas de la SOD: la MnSOD, que se localiza en la matriz mitocondrial, y la Cu,Zn-SOD, que se localiza en el citoplasma celular, catalizando ambas la reacción de dismutación del superóxido a oxígeno y peróxido de hidrógeno (Macmillan-Crow and Cruthirds 2001; Kinnula and Crapo 2004). La catalasa se localiza preferentemente en los peroxisomas y cataliza la reacción de conversión del peróxido de hidrógeno a agua (Goth et al., 2004). La glutatión-peroxidasa se localiza tanto en el citoplasma celular como en la mitocondria, y cataliza la reducción del peróxido de hidrógeno y otros peróxidos convirtiendo el glutatión reducido a su forma oxidada (Imai and Nakagawa 2003). El sistema de las peroxirredoxinas (Wood et al., 2003) y tioredoxinas (Arner and Holmgren 2000) cataliza la reducción de peróxidos, encontrándose en la mitocondria algunos de sus componentes. Entre los **sistemas no enzimáticos** se agrupan una serie de moléculas que evitan la propagación de las reacciones de los radicales libres, como el glutatión, la vitamina E, la vitamina C, los β -carotenos, el ácido úrico, la bilirrubina y la albúmina (Jacob et al., 1995).

La generación de ROS por parte de la mitocondria se encuentra íntimamente relacionada con el potencial de la membrana mitocondrial (Papa and Skulachev 1997). Al aumentar dicho potencial, se produce un enlentecimiento del flujo electrónico a través de la cadena de transporte de electrones, lo que favorece las reducciones incompletas del oxígeno y la formación de ROS. En este contexto, se ha propuesto que un ligero **desacoplamiento mitocondrial** mediado a través de las UCPs podría actuar como un sistema de protección celular frente al daño oxidativo. Esta hipótesis propone que el desacoplamiento entre la respiración y la síntesis de ATP mediado a través de las UCPs impediría que el potencial de la membrana mitocondrial se elevara excesivamente y se produjera la formación de ROS. Esta hipótesis fue sugerida tras la observación de que la preincubación con GDP (inhibidor de las UCPs) inducía un aumento en el potencial de la membrana mitocondrial y en la producción de peróxido de hidrógeno en las mitocondrias aisladas a partir del tejido adiposo pardo (tejido que expresa la UCP1), el bazo y el timo (tejidos que expresan la UCP2); mientras que dichos

efectos no se observaron en las mitocondrias aisladas a partir del hígado (tejido que no expresa las UCPs) (Negre-Salvayre et al., 1997). En un estudio posterior se evidenció que los ratones UCP2KO eran resistentes a la infección por *Toxoplasma gondii* (Arsenijevic et al., 2000). Los autores determinaron que la producción de ROS por parte de los macrófagos de los ratones UCP2KO se encontraba incrementada, confiriendo a estas células mayor capacidad para eliminar el parásito. Dicho aumento en la producción de ROS podía estar asociado a la ausencia de la UCP2 y, por tanto, a un potencial de la membrana mitocondrial más elevado (Arsenijevic et al., 2000).

En relación a la UCP3, existen diversos trabajos en los que se ha observado que la inhibición o deleción del gen que codifica esta proteína inducía un aumento en el potencial de la membrana mitocondrial, en la producción de ROS y en el daño oxidativo. En mitocondrias aisladas a partir del músculo esquelético de rata, el potencial de membrana y la producción de superóxido se encuentran significativamente elevados en presencia del nucleótido de purina GDP y, por consiguiente, la UCP3 podría limitar la producción endógena de superóxido (Talbot et al., 2004). Asimismo, las mitocondrias aisladas a partir del músculo esquelético de los ratones UCP3KO tienen los niveles de ROS elevados (Vidal-Puig et al., 2000), así como los marcadores de daño oxidativo a proteínas (Brand et al., 2002), en comparación con los niveles detectados en los ratones de tipo silvestre, lo que sugiere que la UCP3 actuaría como defensa antioxidante celular. Por el contrario, los ratones que sobreexpresaban la UCP3 no presentan niveles inferiores de los marcadores de daño oxidativo a proteínas en comparación con los detectados en los ratones de tipo silvestre, lo cual indica que la sobreexpresión de esta proteína no proporciona una protección adicional frente al daño oxidativo (Brand et al., 2002). Los trabajos realizados en líneas celulares han aportado resultados contradictorios. Algunos estudios han determinado que la producción de ROS también se encuentra disminuida en mioblastos L6 que sobreexpresan la UCP3 dentro del rango fisiológico de expresión de esta proteína (MacLellan et al., 2005). Sin embargo, en otro trabajo en el que se utilizó la misma aproximación metodológica, la sobreexpresión de la UCP3 se asociaba con un ligero aumento en la producción de ROS (Duval et al., 2007). Por otro lado, la sobreexpresión de la UCP3 en la línea celular ovárica CHO inducía unos niveles de producción de ROS similares a los detectados en las células control (Mozo et al., 2006). Los resultados contradictorios obtenidos en estos trabajos se han intentado explicar proponiendo la existencia de ciertas diferencias en la expresión basal de ROS, de manera que los niveles de ROS en los animales o células de tipo silvestre se encontrarían por debajo del umbral de detección de la UCP3 y, por lo tanto, la sobreexpresión de esta proteína no aportaría una protección adicional frente al daño oxidativo (Echtay 2007).

A pesar de que la implicación de las UCP3 en la protección frente al daño oxidativo es una hipótesis muy interesante, actualmente no se dispone de datos convincentes obtenidos *in vivo* que demuestren su importancia fisiológica o patofisiológica. En este sentido se debe señalar

que la expresión de la UCP3 se detecta exclusivamente en determinados tejidos, y que además, su expresión representa únicamente el 0,01% de la totalidad de la proteína mitocondrial (Harper et al., 2002). Por lo tanto, resulta difícil asociar a esta proteína la capacidad de catalizar todo el desacoplamiento mitocondrial necesario como para desarrollar esta función protectora frente al daño oxidativo (Cannon et al., 2006).

3.4.2. Implicación de las UCPs en la conductancia basal a los protones

A pesar de que la implicación de la UCP1 en la termogénesis adaptativa está aceptada de forma generalizada (Nicholls and Rial 1999), la función de las proteínas UCP2 y UCP3 no ha podido ser completamente aclarada. Inicialmente, debido a la gran similitud existente en la secuencia de aminoácidos entre la UCP1, la UCP2 y la UCP3, se sugirió que tanto la UCP2 como la UCP3 podrían catalizar la **conductancia basal** a los protones de la membrana mitocondrial interna.

Inicialmente, la implicación de la UCP3 en la conductancia basal a los protones fue apoyada por estudios en los que se determinó que la sobreexpresión de la UCP3 en levaduras (Gong et al., 1997) y en mioblastos de la línea celular C2C12 (Boss et al., 1998) inducía una disminución en el potencial de la membrana mitocondrial, lo que indicaba que la UCP3 ejercía un papel desacoplante. Por otro lado, en trabajos en los que se reconstituyeron la UCP2 y la UCP3 en liposomas se determinó que ambas proteínas presentaban una tasa de conductancia a los protones similar a la de la UCP1, y que dicha actividad era inhibida por nucleótidos de purina (Echtay et al., 2001; Jaburek and Garlid 2003). Además, la sobreexpresión de la UCP3 en mitocondrias aisladas a partir del músculo esquelético inducía un aumento en la tasa de respiración (Clapham et al., 2000). Sin embargo, posteriormente se demostró que la inserción de la proteína sobreexpresada podría generar un desacoplamiento no específico y no regulado; por lo tanto, la sobreexpresión de las UCPs en levaduras (Heidkaemper et al., 2000; Harper et al., 2002) y en animales transgénicos (Cadenas et al., 2002) parecía ser un artefacto en lugar de reflejar la función nativa de la proteína.

El papel de la UCP2 en la conductancia basal a los protones se estudió en mitocondrias aisladas a partir del pulmón y el bazo de ratones de tipo silvestre y ratones UCP2KO, y no se encontraron diferencias en la conductancia a los protones entre las mitocondrias aisladas a partir de ambos genotipos (Couplan et al., 2002). En relación a los estudios realizados en mitocondrias aisladas a partir del músculo esquelético, algunos trabajos mostraron que las mitocondrias de los animales UCP3KO presentaban una conductancia a los protones inferior a la detectada en las mitocondrias de los animales de tipo silvestre (Gong et al., 2000; Vidal-Puig et al., 2000). Estos resultados hacían presuponer que la UCP3 mediaba de alguna manera la conductancia basal a los protones. Sin embargo, en otro estudio se determinó que la UCP3 no mediaba la conductancia basal a los protones puesto que no se detectaron diferencias, en la

conductancia a los protones, entre las mitocondrias aisladas a partir del músculo esquelético de los animales de tipo silvestre y los animales UCP3KO (Cadenas et al., 2002). En concordancia con esta conclusión se encuentran los resultados obtenidos en otros estudios en los que se aumentaron los niveles de expresión de la UCP3 de manera fisiológica, mediante el ayuno (Cadenas et al., 1999) o la inoculación de endotoxina (Yu et al., 2000), sin detectarse cambios en la conductancia basal a los protones en las mitocondrias de músculo esquelético.

Posteriormente, se determinó que la conductancia basal a los protones de las mitocondrias de músculo esquelético estaba catalizada en un 50-66% por otro transportador de la membrana mitocondrial interna, el **ANT** (Brand et al., 2005), dado que la conductancia se reducía a la mitad en los ratones deficientes en la expresión del ANT (ANT1KO). Además, la sobreexpresión o subexpresión del ANT en las mitocondrias de *Drosophila melanogaster* inducía, respectivamente, un aumento o una disminución de la conductancia a los protones (Brand et al., 2005). Este papel del ANT en la catalización de la conductancia basal a los protones de la membrana mitocondrial interna fue confirmado en un estudio posterior en el que se determinó que, en presencia de un sustrato respiratorio como el succinato, la conductancia mitocondrial a los protones se veía activada de forma endógena. Esta activación se incrementaba con el tiempo de incubación en presencia del sustrato, requería de un alto potencial de membrana y estaba catalizada en un 50-55% por el ANT, y en un 15-20% por la UCP3 (Parker et al., 2008a). Sorprendentemente, en este mismo trabajo se determinó que el GDP (inhibidor clásicamente considerado específico de las UCPs) no inhibía exclusivamente a la UCP3 sino que inhibía también al ANT y que, además, los inhibidores específicos del ANT (el carboxiatractilósido y el ácido bongkrékico) inhibían también a la UCP3.

3.4.3. La activación de las UCPs por el radical superóxido

A diferencia de la UCP1, varios estudios indicaron que la UCP3 no presentaba capacidad desacoplante de forma endógena (Cadenas et al., 1999; Jekabsons et al., 1999; Yu et al., 2000). Sin embargo, surgieron nuevas posibilidades de implicar a la UCP3 en el desacoplamiento mitocondrial tras la identificación del **radical superóxido** como activador de la conductancia a los protones mediada tanto por la UCP1, como por la UCP2 y la UCP3, (Echtay et al., 2002b).

El papel activador del superóxido sobre la conductancia mitocondrial a los protones mediada específicamente por la **UCP1** se determinó inicialmente en mitocondrias aisladas a partir del tejido adiposo pardo (Echtay et al., 2002b). Sin embargo, debido a la posible existencia de otras UCPs en este tejido (Ricquier and Bouillaud 2000), se estudió también el papel activador del superóxido sobre la conductancia a los protones a través de la UCP1 en mitocondrias aisladas de levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*) que habían sido transfectadas con el gen *ucp1*.

La activación específica de la **UCP2** por el superóxido se analizó mediante el aislamiento de mitocondrias a partir del hígado y el corazón, órganos en los que no se expresa la proteína UCP2 (Pecqueur et al., 2001), y en los que no se observó ningún aumento en la conductancia a los protones en presencia de superóxido (Echtay et al., 2002b). Por el contrario, en mitocondrias aisladas a partir del riñón, el bazo (Pecqueur et al., 2001) y las células β pancreáticas (Zhang et al., 2001), que expresan la proteína UCP2, se observó una activación de la conductancia a los protones tras la adición de superóxido (Echtay et al., 2002b). El papel del superóxido como activador de la conductancia a los protones mediada por la UCP2 fue confirmado en las células β pancreáticas en un trabajo posterior (Krauss et al., 2003). Por el contrario, en otro estudio realizado en mitocondrias aisladas a partir del pulmón y el bazo, se observó que el superóxido no activaba la conductancia a los protones a través de la UCP2 (Couplan et al., 2002).

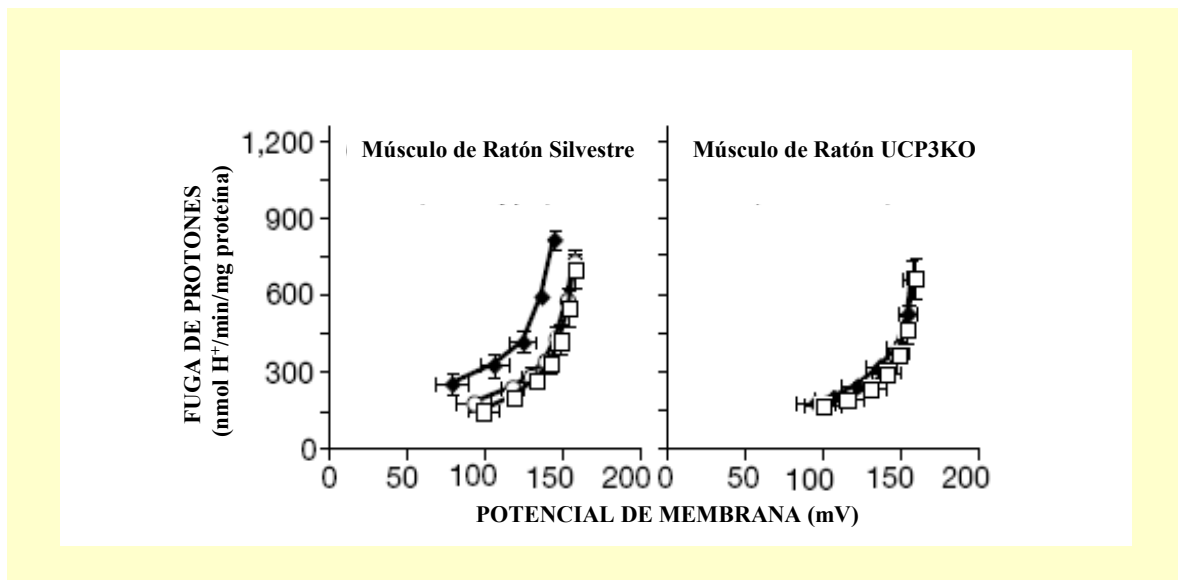


Figura I.3. Activación de la conductancia de la membrana mitocondrial interna a los protones en presencia de superóxido en mitocondrias aisladas a partir del músculo esquelético de ratones de tipo silvestre y de ratones que carecen del gen *ucp3* (UCP3KO). Leyenda: □, control; ♦, adición de xantina y xantina-oxidasa; ○, adición de xantina, xantina-oxidasa y GDP (Echtay et al., 2002b).

Finalmente, el papel activador del superóxido sobre la conductancia a los protones mediada a través de la **UCP3** se determinó en mitocondrias aisladas a partir del tejido muscular esquelético de ratones de tipo silvestre y de genotipo mutado que carecían del gen *ucp3* (UCP3KO), observándose un aumento en la conductancia a los protones en presencia del radical superóxido únicamente en las mitocondrias que expresaban la UCP3 (Echtay et al., 2002b). Además, en este mismo trabajo, en las mitocondrias aisladas a partir del músculo esquelético de ratas sometidas a 24 h de ayuno se detectó un aumento en la expresión de la UCP3 asociado a un aumento en la conductancia a los protones en presencia del radical superóxido.

En todos los casos, la activación de la conductancia a los protones inducida por el superóxido era dependiente de ácidos grasos y se inhibía en presencia de nucleótidos de purina (como el GDP); es decir, dicha activación estaba regulada por los mismos factores que clásicamente regulan la actividad de las UCPs. En un trabajo posterior, mediante la utilización de antioxidantes unidos covalentemente a cationes trifenílfosfonio de manera que se dirigen de forma específica a la matriz mitocondrial (MitoQ y MitoVitE), se determinó que la activación ejercida por el superóxido sobre el transporte de protones mediado por las UCPs se producía específicamente en el lado de la matriz de la membrana mitocondrial interna (Echtay et al., 2002a). En este trabajo, al igual que en el que se describió inicialmente el papel del superóxido como activador de las UCPs (Echtay et al., 2002b), el superóxido utilizado era generado exógenamente mediante la adición al medio de incubación de xantina y xantina-oxidasa. Sin embargo, en un estudio posterior se determinó que el superóxido generado **endógenamente** en la matriz mitocondrial a través del Complejo I de la cadena de transporte de electrones, también activaba la conductancia a los protones mediada por la UCP3 (Talbot et al., 2004).

3.4.4. La activación de las UCPs por el 4-hidroxinonenal

En determinadas situaciones fisiológicas (como el envejecimiento y la realización de ejercicio) o patológicas (como la sepsis), el daño oxidativo aumenta debido al incremento en la producción de ROS. Cuando estos radicales interactúan con los fosfolípidos de las membranas mitocondriales y celulares se produce su peroxidación, originándose diferentes aldehídos reactivos, entre ellos el compuesto **4-hidroxinonenal** (HNE). El HNE era considerado como un compuesto con una amplia toxicidad biológica puesto que inhibía la síntesis del ADN y de las proteínas, inactivaba ciertas enzimas, modificaba lipoproteínas de baja densidad y modulaba la expresión génica (Esterbauer et al., 1991). Sin embargo, en un trabajo reciente, se descubrió su papel como un compuesto activador de la conductancia a los protones mediada a través de la UCP1, la UCP2, la UCP3 y el ANT (Echtay et al., 2003).

En este estudio, el papel activador del HNE sobre la conductancia a los protones de la membrana mitocondrial interna mediada específicamente a través de la **UCP1** se determinó en mitocondrias aisladas a partir del tejido adiposo pardo. Esta activación era revertida totalmente en presencia de GDP y tan solo parcialmente en presencia del inhibidor del ANT, carboxiatractilósido (CAT). Sin embargo, debido a la posible existencia de otras UCPs en este tejido (Ricquier and Bouillaud 2000), se comprobó también el papel activador del HNE sobre la conductancia a los protones mediada por la UCP1 en mitocondrias aisladas a partir de levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*) que habían sido transfectadas con el gen *ucp1*.

La activación de la conductancia a los protones mediada por la **UCP2** e inducida por el HNE se determinó mediante el aislamiento de mitocondrias a partir del riñón, el hígado y el corazón (Echtay et al., 2003). La activación inducida por el HNE era inhibida por el GDP en las

mitocondrias aisladas a partir del riñón (tejido que expresa la UCP2), mientras que este compuesto no inhibía la activación inducida por el HNE en las mitocondrias aisladas a partir del hígado y el corazón (tejidos que no expresan la UCP2). Por el contrario, la adición de CAT revertía totalmente la activación inducida por el HNE en las mitocondrias aisladas a partir de los tres tejidos.

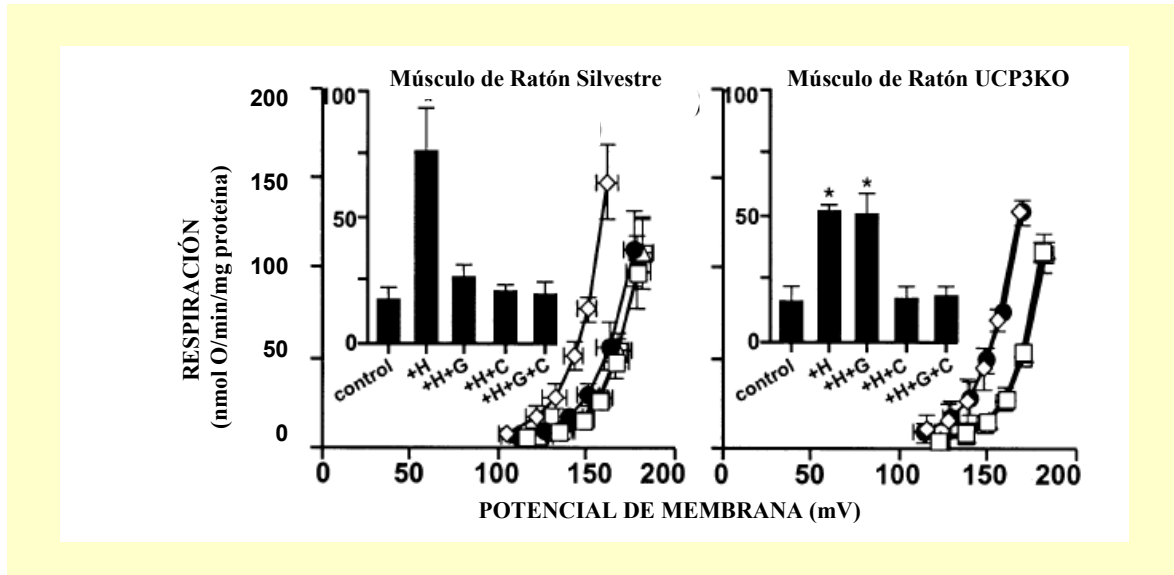


Figura I.4. Activación de la conductancia de la membrana mitocondrial interna a los protones en presencia de HNE en mitocondrias aisladas a partir del músculo esquelético de ratones de tipo silvestre y de ratones que carecen del gen *ucp3* (UCP3KO). Leyenda: □, control; ◇, adición de HNE; ●, adición de HNE y GDP; △, adición de HNE y CAT (Echtay et al., 2003).

Finalmente, el papel activador del HNE sobre la conductancia a los protones mediada a través de la **UCP3** se determinó en las mitocondrias aisladas a partir del tejido muscular esquelético de ratones de tipo silvestre y de genotipo mutado que carecían del gen *ucp3* (UCP3KO), observándose un aumento en la conductancia a los protones inducido por el HNE que únicamente era revertido con la adición de GDP en las mitocondrias que expresaban la UCP3 (Echtay et al., 2003). Sin embargo, la adición de CAT inhibía totalmente la activación inducida por el HNE en las mitocondrias aisladas a partir de ambos genotipos.

En conclusión, Echtay y colaboradores determinaron que el HNE aumentaba la conductancia de la membrana mitocondrial interna a los protones a través de la UCP1, la UCP2 y la UCP3, inhibiéndose este efecto en presencia de nucleótidos de purina (Echtay et al., 2003).

En un estudio posterior se propuso que la activación inducida por el superóxido sobre las UCPs compartía con el HNE la **misma vía de señalización celular** (Murphy et al., 2003). En este trabajo se utilizaron antioxidantes como el MitoPBN, el cual bloquea la activación de las UCPs inducida por el radical superóxido sin afectar a la activación que el HNE induce sobre estas proteínas. Se observó que el compuesto generador de radicales centrados en átomos de

carbono dihidroclórico-2,2-azobis(2-metilpropionamida) (AAPH) inducía la activación de las UCPs, y que dicha activación era inhibida en presencia de MitoPBN, al reaccionar este antioxidante con los radicales centrados en átomos de carbono y evitando, por tanto, la peroxidación lipídica. Los autores de este estudio propusieron que el superóxido produciría la liberación del átomo de hierro de los centros Fe-S de ciertas proteínas, como la aconitasa, y estos cationes (Fe^{2+}) interactuarían con el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) producido por la superóxido-dismutasa (MnSOD), generando radicales hidroxilo (HO^\cdot). Estos radicales iniciarían una serie de reacciones de peroxidación de los fosfolípidos de la membrana mitocondrial que conduciría a la síntesis de aldehídos reactivos como el HNE, los cuales activarían a las UCPs. En la Figura I.5 aparece reflejado un esquema en el que se representa la vía de señalización común del superóxido y el HNE en su papel de activadores de las UCPs.

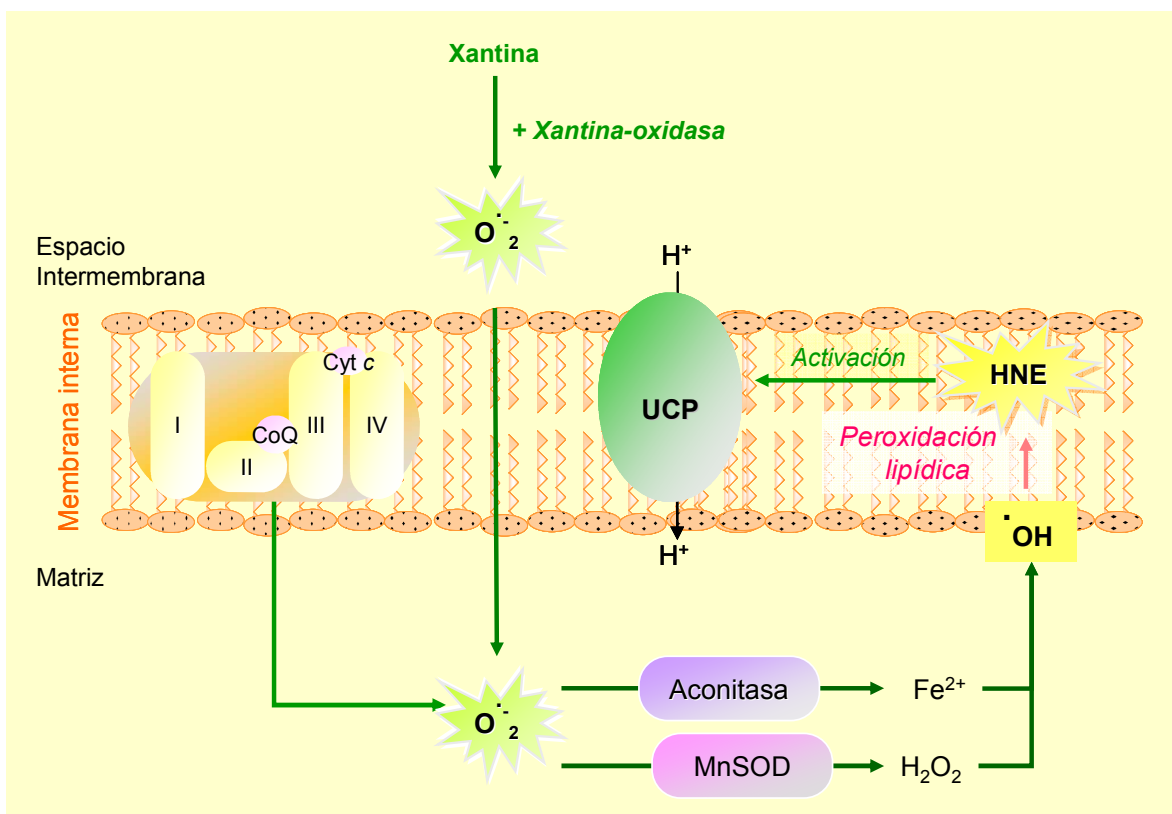


Figura I.5. Esquema del mecanismo común de activación de las UCPs por parte del superóxido y el HNE. El superóxido (O_2^\cdot) generado en la cadena de transporte de electrones o mediante la adición de xantina y xantina-oxidasa interactúa con la proteína aconitasa induciendo la liberación de Fe^{2+} . El radical superóxido también es transformado por la superóxido-dismutasa (MnSOD) en H_2O_2 . Mediante la reacción de Fenton, el Fe^{2+} y el H_2O_2 dan lugar a radicales hidroxilo (OH^\cdot). Estos radicales inician la peroxidación lipídica de los fosfolípidos de la membrana dando lugar al HNE. Adaptado de Murphy et al (2003).

Por otro lado, el hecho de que la adición de CAT produjese siempre una inhibición del aumento en la conductancia a los protones inducido por el HNE, independientemente del origen tisular de las mitocondrias y su correspondiente expresión de las UCPs, condujo a la conclusión de que existía otro transportador implicado en el aumento en la conductancia a los protones inducido por el HNE, el **ANT**. La implicación específica del ANT en el aumento en la

conductancia mitocondrial a los protones inducido por el HNE se analizó en mitocondrias aisladas a partir de varios mutantes de *Drosophila melanogaster* que expresaban diferentes cantidades del ANT (Echtay et al., 2003). Con este modelo experimental se observó que la activación inducida por el HNE era directamente proporcional al nivel de expresión del ANT. Además, dicha activación era inhibida en presencia de CAT mientras que no lo era en presencia de GDP (Echtay et al., 2003).

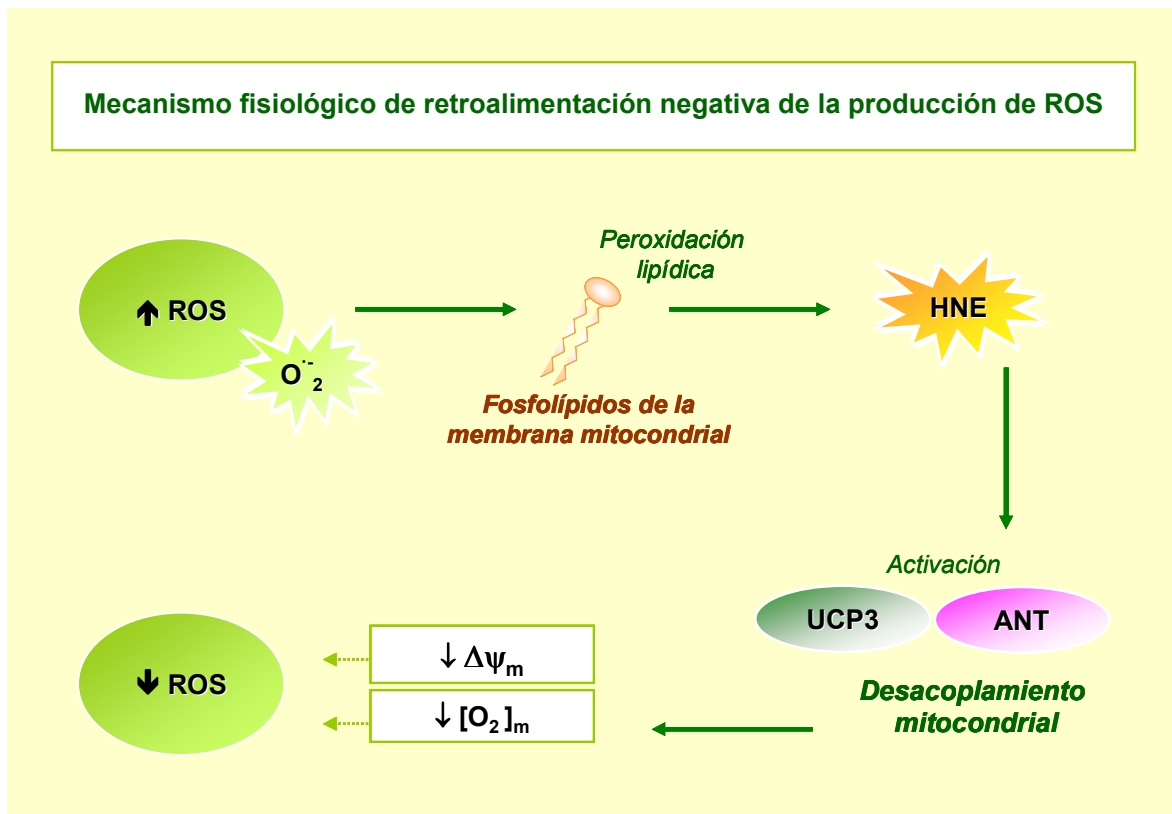


Figura I.6. Esquema del mecanismo de señalización del HNE. Las ROS, como el superóxido ($O_2^{\cdot-}$), inducen la peroxidación lipídica de los fosfolípidos de la membrana mitocondrial dando lugar al HNE. Este compuesto activa a las UCPs y al ANT induciendo un ligero desacoplamiento mitocondrial, lo cual provoca un descenso del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) y un aumento en la tasa de respiración y, por lo tanto, disminuye la concentración de oxígeno en la mitocondria ($[O_2]_m$). Ambos factores conducen a una disminución en la producción de ROS. Adaptado de Echtay et al (2003).

Teniendo en cuenta los resultados anteriormente expuestos, se propuso que las **UCPs** y el **ANT** podían formar parte de los sistemas de **protección celular frente al daño oxidativo**. Esta hipótesis propone que, ante un aumento en la producción de ROS (como el superóxido), se produce la peroxidación lipídica de las membranas celulares, generándose HNE. Este compuesto activa a las UCPs y al ANT induciendo un ligero **desacoplamiento mitocondrial**, el cual conduce a una disminución del potencial de la membrana mitocondrial que, a su vez, induciría un aumento en la tasa de respiración mitocondrial. Al aumentar el consumo de oxígeno por parte de la mitocondria, se produciría una disminución en la concentración de oxígeno, así como una tendencia a la oxidación de los componentes de la cadena de transporte de electrones y, por lo tanto, se produciría una disminución en la producción de ROS

(Echtay et al., 2003; Echtay and Brand 2007). Un esquema de este mecanismo de **retroalimentación negativa**, inducido por un aumento en la producción de ROS y mediado a través de la activación de las UCPs y el ANT, aparece reflejado en la Figura I.6.

El mecanismo de activación y las condiciones necesarias para que el HNE active la conductancia a los protones mediada por las UCPs y el ANT no han sido claramente establecidos. En este sentido se determinó recientemente que el aumento en el tiempo de incubación de las mitocondrias en presencia de un sustrato respiratorio (como el succinato) aumentaba la activación inducida por el HNE (Parker et al., 2008b). Asimismo, las mitocondrias requerían de un alto potencial de membrana para que el HNE activara el desacoplamiento (Parker et al., 2008b). En este mismo trabajo se precisó además que la conductancia a los protones inducida en presencia de HNE en las mitocondrias aisladas a partir del músculo esquelético estaba mediada en un 64% a través del ANT, en un 11% a través de la UCP3 y en un 25% por otras vías.

3.4.5. Papel protector de las UCPs en las patologías que cursan con estrés oxidativo: los procesos de isquemia-reperfusión

El daño oxidativo inducido por ROS se ha visto implicado en diversas situaciones fisiológicas, como el envejecimiento (Harman 1968; Sastre et al., 2000), o fisiopatológicas, como la diabetes asociada a la disfunción de las células β pancreáticas (Bindokas et al., 2003; Krauss et al., 2003), el cáncer (Busquets et al., 2005; Degasperis et al., 2006), ciertas enfermedades neurodegenerativas (Moreira et al., 2008; Zhou et al., 2008), la aterosclerosis (Giordano 2005; Madamanchi et al., 2005) y el daño por isquemia-reperfusión (Zweier et al., 1987; Zweier et al., 1989; Levraut et al., 2003), entre otras.

Cuando el miocardio se encuentra en situación de **isquemia**, se produce una disminución progresiva en la concentración de oxígeno tisular acompañada de una rápida generación de ROS (Levraut et al., 2003). Esta situación de daño oxidativo se puede incrementar al **reperfundir** el tejido isquémico, pudiéndose inducir entonces un incremento de hasta 6 veces en la producción de ROS (Zweier et al., 1987; Zweier et al., 1989).

De acuerdo con la hipótesis expuesta en el apartado 3.4.1, las UCPs podrían proteger frente al daño oxidativo al inducir una disminución en la producción de ROS en los procesos de isquemia-reperfusión. De hecho, la funcionalidad de los corazones de ratones transgénicos que expresan elevadas cantidades de la UCP1 se recupera mejor tras 40 min de isquemia seguidos de perfusión que los corazones de ratones de tipo silvestre (Hoerter et al., 2004). En concreto, la contractibilidad cardíaca de los corazones de los ratones transgénicos era dos veces superior a la detectada en los corazones de los ratones de tipo silvestre transcurrida 1 h desde el proceso de isquemia-reperfusión. Estos resultados indicaron que la UCP1 protege frente a los procesos de isquemia-reperfusión, probablemente debido a que la UCP1 disminuye

el potencial de membrana mitocondrial generándose una menor cantidad de ROS (Hoerter et al., 2004).

En este contexto, se ha estudiado el papel protector de la UCP3 frente al daño oxidativo que se origina en los procesos de **isquemia-reperfusión** cardiaca. Debido a que una ligera despolarización de la membrana mitocondrial interna (indicado en la Figura I.7 como $\downarrow \Delta \Psi_m$) mediada a través de la UCP3 induciría una disminución en la producción de ROS, la UCP3 podría tener un papel protector frente al daño inducido en un proceso de isquemia-reperfusión (Sack 2006).

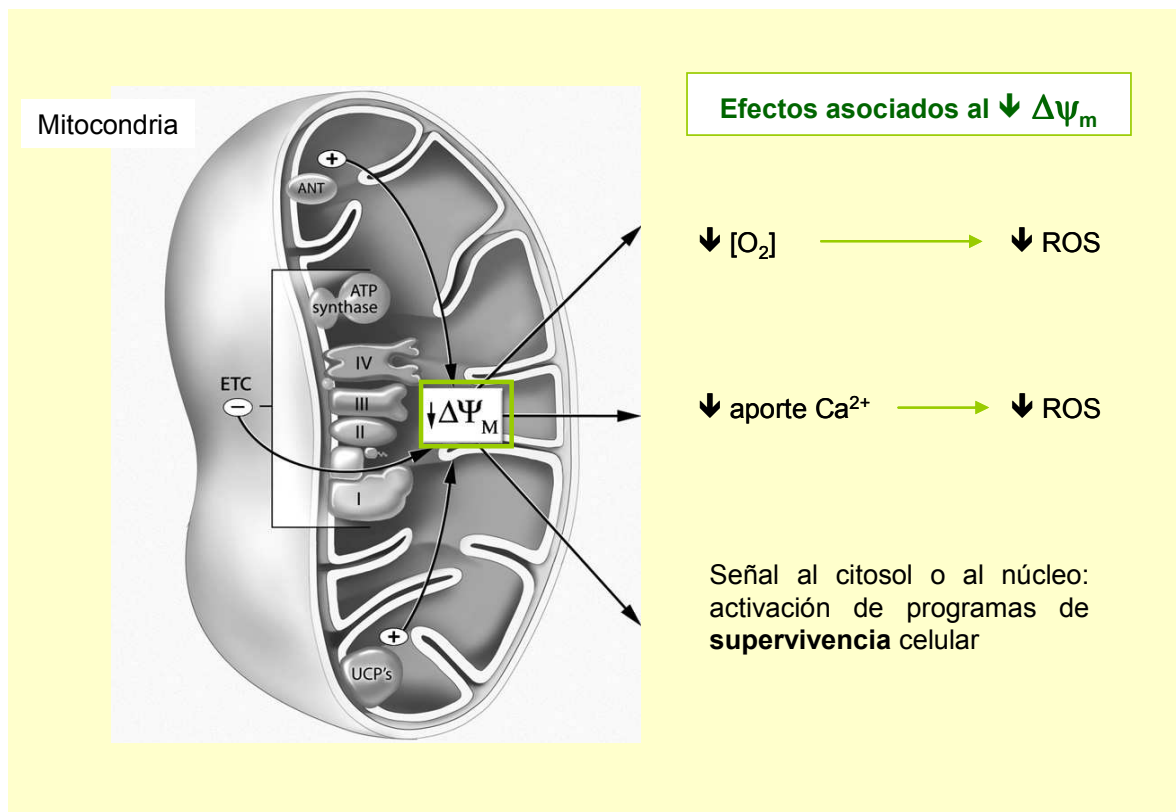


Figura I.7. Esquema que refleja los mediadores de una ligera despolarización mitocondrial y las posibles respuestas adaptativas a esta despolarización. Adaptado de Sack (2006).

El miocardio puede protegerse frente a la isquemia mediante un proceso denominado **preacondicionamiento isquémico** que consiste en repetidas y transitorias exposiciones a periodos breves de isquemia (Murry et al., 1986). Este efecto protector está mediado por antioxidantes como las superóxido dismutasas y el glutatión (Yamashita et al., 1994; Peralta et al., 2002) o mediadores vasoactivos como la adenosina y el óxido nítrico (Jenkins et al., 1995; Peralta et al., 1997; Peralta et al., 1999). En las células preacondicionadas, las mitocondrias se encuentran desacopladas (tienen un menor potencial de membrana mitocondrial), unos niveles inferiores de ATP y un mayor consumo de oxígeno (Minners et al., 2001). En la fase **temprana** del preacondicionamiento isquémico (entre las 2-4 h), la conductancia a los protones de las mitocondrias aisladas a partir del corazón de rata se encuentra aumentada en relación a la

conductancia medida en las mitocondrias control, siendo este aumento inhibido en presencia de GDP (inhibidor de las UCPs) y carboxiatractilósido (inhibidor del ANT); por lo tanto, podría sugerirse la implicación de ambas proteínas en el fenómeno de preconditionamiento isquémico (Nadtochiy et al., 2006). En la fase **tardía** del preconditionamiento isquémico (pasadas 12-72 h), el potencial de la membrana mitocondrial interna de las mitocondrias aisladas a partir del corazón de rata sufre un ligero aumento, y dichas mitocondrias responden mejor frente a un proceso de anoxia-reoxigenación que las mitocondrias no preconditionadas (McLeod et al., 2004). Los mismos autores determinaron en un estudio posterior que, tras el proceso de preconditionamiento cardiaco, se inducía un aumento en los niveles de expresión del ARNm de la UCP3 y la UCP2, acompañado de una disminución en la producción de ROS así como del tamaño del infarto. De acuerdo con estos resultados, las UCPs se encontrarían implicadas en la tolerancia a la isquemia y ejercerían una función protectora formando parte de los sistemas de defensa antioxidantes de la célula (McLeod et al., 2005).

3.5. LA REGULACIÓN DE LA APOPTOSIS

La **apoptosis** o muerte celular programada es un proceso en el que participan múltiples factores y se ha propuesto que la UCP3 podría tener un papel modulador debido a su posible influencia sobre el potencial de membrana y la producción de ROS.

El primer miembro de la familia de las UCPs que se intentó asociar con cierto papel en la regulación de la apoptosis fue la UCP2, al observarse que aumentaba el nivel de expresión de su ARNm al irradiar una línea celular linfocítica murina con una dosis de 5 Gy durante 4 h (Voehringer et al., 2000). En este trabajo se proponía que en el proceso de apoptosis participaban múltiples genes, entre ellos *ucp2*, con la finalidad de inducir el desacoplamiento mitocondrial y la consiguiente pérdida del potencial de membrana, activándose así la cascada proapoptótica de las caspasas.

Por el momento se han realizado pocos estudios enfocados a determinar la implicación de la UCP3 en la regulación de la apoptosis. En algunos de ellos se estudió la relación entre la sobreexpresión de la UCP3 y la protección neuronal frente a la apoptosis, detectándose que la expresión de esta proteína en neuronas protegía a la membrana mitocondrial frente a la hiperpolarización inducida tras la exposición a cantidades elevadas de glucosa, así como a la formación de ROS y la inducción de la apoptosis (Vincent et al., 2004). Por el contrario, en otro trabajo se observó que la expresión de la UCP3 en la línea celular HEK 293 no inducía la apoptosis por sí misma, pero favorecía la respuesta celular frente a un estímulo apoptótico, ya que la expresión de esta proteína aumentaba la activación de la caspasa 3 y la caspasa 9, facilitaba la liberación del citocromo *c*, aumentaba la relación Bax/Bcl-2 en la mitocondria y favorecía la apertura del poro de transición de la permeabilidad mitocondrial (Dejean et al., 2004). Además de la obtención de estos resultados tan dispares, también se ha descrito que la sobreexpresión de la UCP3, tanto en la línea celular de mioblastos murinos C2C12 como en

cultivos primarios de células musculares humanas, no se encuentra asociada con cambios implicados en un proceso de apoptosis (Busquets et al., 2006). En resumen, la implicación de la UCP3 en la regulación de la apoptosis parece depender del tipo celular y del estímulo proapoptótico utilizado, aunque por el momento no existen suficientes evidencias experimentales que apoyen esta hipótesis.

3.6. EL TRANSPORTE DE CALCIO

La entrada de calcio en la mitocondria es fundamental para la tasa de la fosforilación oxidativa (Jouaville et al., 1999), la regulación en el tiempo de numerosas señales de calcio citosólicas (Parekh 1998; Hoth et al., 2000) y la apoptosis (Gunter et al., 2000).

En un trabajo recientemente publicado se propuso que la UCP2 y la UCP3 estaban implicadas en la **homeostasis del calcio** al mediar ambas proteínas en el transporte de este ión desde el citosol hacia el interior de la mitocondria (Trenker et al., 2007). En este trabajo se determinó que la UCP2 y la UCP3 estaban implicadas en el secuestro de calcio por parte de la mitocondria en respuesta a determinados estímulos celulares, y mediante la utilización de diferentes técnicas de sobreexpresión y silenciamiento de la UCP2 y la UCP3, tanto en células como en levaduras, así como mediante la utilización de mitocondrias aisladas a partir del hígado de ratones de tipo silvestre y ratones deficientes en la expresión de la UCP2. Esta hipótesis surgió a partir del hecho de que, en condiciones fisiológicas, la cantidad de calcio secuestrada por la mitocondria depende del potencial de la membrana mitocondrial (Scarpa and Azzone 1970), ajustándose este uniporte de calcio a las ecuaciones electroquímicas que predicen el potencial de la membrana en relación a la difusión de un catión (Wingrove et al., 1984; Gunter and Pfeiffer 1990). Por lo tanto, los autores proponían que, al producirse un estímulo celular, la UCP2 y la UCP3 mediarían en el estado bioenergético de la mitocondria, aumentando la capacidad mitocondrial para captar calcio (Trenker et al., 2007). En este estudio se afirmaba que las células que sobreexpresaban la UCP2 y la UCP3 tenían incrementado el transporte de calcio al interior de la mitocondria así como la capacidad de producir ATP (Trenker et al., 2007), enfrentándose este último hallazgo a la función clásicamente asociada a las UCPs de desacoplar la respiración de la producción de ATP mediando en la conductancia de la membrana mitocondrial interna a los protones (Graier et al., 2008).

En consonancia con la implicación de la UCP3 y la UCP2 en la homeostasis del calcio, se encuentra el hecho de que estas proteínas son activadas por los ácidos grasos e inhibidas por los nucleósidos de purina difosfato y trifosfato (Jezek 1999; 2002; Brand and Esteves 2005; Lombardi et al., 2008), habiéndose descrito un mecanismo de regulación similar para el transportador de calcio mitocondrial sensible a rojo de rutenio (Litsky and Pfeiffer 1997; Zhang et al., 2006a).

4. LA UTILIZACIÓN DE ENDOTOXINA COMO MODELO DE INDUCCIÓN DE LAS UCPs

En la fase aguda de un **proceso infeccioso o inflamatorio** se produce un aumento en la temperatura corporal acompañado de un aumento en el gasto energético. En un modelo animal, mediante la inoculación de **endotoxina** bacteriana, como el lipopolisacárido (LPS) de *Escherichia coli*, se consigue inducir una respuesta similar a la observada en un proceso de inflamación, es decir, la síntesis de las citoquinas IL-1, IL-6 y TNF- α (Dinarello 1996).

Con el fin de identificar los mecanismos moleculares implicados en el gasto energético y en la producción de calor en un proceso de inflamación, se estudió en ratones el efecto de la inoculación de LPS, IL-1 β y TNF- α sobre los niveles de expresión del ARNm de la UCP2 (Faggioni et al., 1998). En este trabajo se determinó que la inoculación intraperitoneal (i.p.) de una dosis de LPS de 100 μ g y 16 h de incubación inducía en los animales un aumento en la expresión del ARNm de la UCP2 de 28 veces en el hígado, y de 5 veces en el músculo y el tejido adiposo blanco. Estos resultados sugieren que la UCP2 podría estar implicada en la producción de calor y en el aumento del gasto energético que se produce en un proceso inflamatorio. Sin embargo, en este trabajo no se estudiaron los niveles de expresión de la proteína UCP2.

Los niveles de expresión del ARNm de la UCP2 también se analizaron en otro estudio en el que se aislaron hepatocitos a partir de ratas inoculadas con LPS a una dosis de 0,5 mg/kg de peso corporal (i.p.) y tras 24 h de incubación. En este trabajo se determinó que la endotoxina producía un aumento en los niveles de expresión del ARNm de la UCP2 a través de un mecanismo en el que estaba implicada la citoquina TNF- α (Cortez-Pinto et al., 1998). Resultados similares se obtuvieron en otro trabajo en el que, mediante la inoculación intravenosa a ratas de una dosis de TNF- α de 100 μ g/kg de peso corporal y 6 h de incubación, se indujo el aumento de los niveles de expresión del ARNm de la UCP2 (242%) y la UCP3 (113%) en el músculo esquelético (Busquets et al., 1998). Estos resultados sugirieron, según los autores, que las proteínas UCP2 y UCP3 tenían un papel en el aumento del gasto energético asociado a la inoculación de la citoquina.

La inoculación por vía i.p. a ratas de una dosis de TNF- α de 6 nmol/kg de peso corporal y 16 h de incubación, además de provocar un incremento en los niveles de expresión del ARNm de la UCP2 en el músculo esquelético, induce un aumento en los niveles de expresión de este gen en los tejidos adiposos pardo y blanco (Masaki et al., 1999). Sin embargo, los niveles de expresión del ARNm de la UCP3 aumentan en el músculo esquelético sin modificarse los niveles de expresión de este gen en ambos tipos de tejido adiposo, mientras que los niveles de expresión del ARNm de la UCP1 en el tejido adiposo pardo apenas se ven modificados (Masaki et al., 1999). Estos resultados indicaron que el TNF- α modifica la expresión de las distintas

UCPs de manera diferente y, además, en función del tejido en el que se exprese cada UCP (Masaki et al., 1999). Por el contrario, la delección de los genes de los receptores de TNF- α producía un inesperado aumento de los niveles de expresión del ARNm de la UCP2 en los ratones *ob/ob* (deficientes en la producción de leptina) (Memon et al., 2000). De manera que no puede asociarse el aumento en la expresión del ARNm de la UCP2 con un incremento en la expresión de esta citoquina.

En un estudio posterior, mediante la inoculación i.p. de LPS (4 mg/kg de peso corporal y 10-24 h de incubación) a ratones, se determinó que los niveles de expresión de la proteína UCP2 están aumentados tanto en el pulmón como en el estómago (Pecqueur et al., 2001). Sin embargo, los niveles de expresión del ARNm de la UCP2 en estos tejidos no se veían afectados por la administración de endotoxina.

En otro trabajo, en el que se utilizó también un modelo murino de inoculación de LPS (6 mg/kg de peso corporal por vía i.p.), se analizaron las variaciones a lo largo del tiempo de los niveles de expresión del ARNm de la UCP2 y la UCP5 en el hígado y el músculo esquelético, así como del ARNm de la UCP3 en el músculo esquelético (Yu et al., 2000). En este estudio se relacionaron las variaciones detectadas en los niveles de expresión de estos genes con cambios en la temperatura corporal de los animales y con cambios en la conductancia a los protones de las mitocondrias aisladas a partir del hígado y el músculo esquelético.

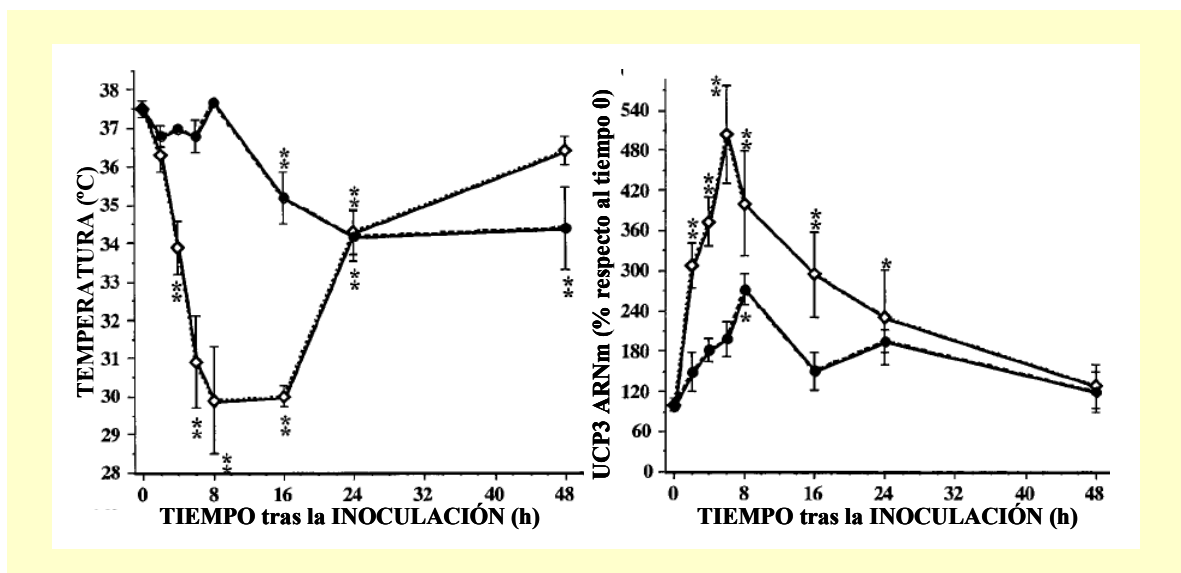


Figura I.8. Variación a lo largo del tiempo de la temperatura corporal (gráfico de la izquierda) y de los niveles de expresión del ARNm de la UCP3 en músculo esquelético (gráfico de la derecha), en ratones control (puntos en negro) y ratones inoculados con una dosis de endotoxina de 6 mg/kg de peso corporal por vía i.p. (puntos en blanco) (Yu et al., 2000).

Los autores determinaron que, durante las 8 h siguientes a la inoculación de LPS, la temperatura corporal de los animales descendía progresivamente, acompañada de una

disminución en la expresión del ARNm de la UCP2 y la UCP5 en el hígado (4-5 veces), y un aumento en la expresión del ARNm de la UCP3 en el músculo esquelético (5 veces). En cambio, a partir de las 8-16 h tras la administración de LPS, la temperatura corporal comenzaba a incrementarse, llegando a superar el valor basal. Simultáneamente, se detectó un aumento en la expresión del ARNm de la UCP2 y la UCP5 en el hígado, así como una disminución en los niveles de expresión del ARNm de la UCP3. En la Figura 1.8 puede observarse el efecto de la administración de endotoxina sobre la temperatura corporal y los niveles de expresión del ARNm de la UCP3 (Yu et al., 2000). Según estos resultados, la UCP3 no parece estar implicada en la regulación de la temperatura corporal debido a que no existe una correlación entre sus niveles de expresión y la temperatura corporal.

En este mismo trabajo, al estudiar la conductancia a los protones de las mitocondrias aisladas a partir del hígado y el músculo esquelético, no se detectaron diferencias entre las mitocondrias obtenidas de los ratones control y las mitocondrias aisladas de los ratones inoculados con LPS (Yu et al., 2000). Estos resultados fueron similares a los publicados en otro trabajo en el que se determinó la conductancia a los protones de las mitocondrias aisladas a partir del pulmón de ratones control y ratones inoculados con una dosis de LPS de 4 mg/kg de peso corporal (i.p.) y 15 h de incubación (Couplan et al., 2002).

El papel de las UCPs también se ha estudiado en diferentes líneas celulares tratadas con endotoxina. En la línea celular macrofágica RAW 264, se observó que los niveles de expresión de la UCP2 (ARNm y proteína) disminuían al administrar un tratamiento con LPS de 1 µg/ml durante 24 h (Kizaki et al., 2002). Estos resultados sugirieron que la adición de LPS suprime la expresión de la UCP2, induciendo un aumento en la producción de ROS intracelulares, lo cual activa la cascada de transducción de señales para la expresión de la **isoforma inducible de la óxido nítrico sintasa (iNOS)**, con la finalidad de generar una respuesta celular rápida y eficiente frente a un agente infeccioso (Kizaki et al., 2002). De acuerdo con estos resultados, la incubación de células dendríticas obtenidas a partir de médula ósea de ratón con una dosis de LPS de 0,1 µg/ml durante 48 h provoca una disminución en la expresión del ARNm de la UCP2, estando este efecto acompañado de un aumento en la expresión del ARNm de la iNOS (Chen et al., 2002). La inhibición de la expresión de la proteína UCP2 tras la adición de LPS fue confirmada en un trabajo posterior realizado en células inmunes del bazo y el pulmón de ratón (Alves-Guerra et al., 2003). En este trabajo se determinó que la expresión de la proteína UCP2 disminuía inicialmente tras la administración a los ratones de una dosis de endotoxina de 10 mg/kg de peso corporal, mientras que transcurridas 14 h de incubación, se producía un aumento en la expresión de la UCP2, que tendría la finalidad de proteger a la célula del daño oxidativo (Alves-Guerra et al., 2003).

Además de la utilización de la endotoxina como modelo de inducción de un estado de sepsis enfocado al estudio del papel de las UCPs, se han realizado otros estudios en los que se

conseguía inducir el estado de **sepsis mediante un modelo quirúrgico** de ligación del ciego y posterior punción. De este modo, en el corazón de la rata se determinó que los niveles de expresión del ARNm de la UCP2 aumentaban un 52%, 12 h tras la realización del abordaje quirúrgico, en comparación con las ratas control. Sin embargo, no se detectó la proteína UCP2, tanto en los animales control como en los animales que desarrollaron un proceso séptico (Roshon et al., 2003). La misma aproximación metodológica se utilizó en otro estudio en el que se analizaron los niveles de expresión de la UCP3 en el músculo esquelético de la rata. En este caso, en los animales en los que se indujo un estado de sepsis, los niveles de expresión de la UCP3 (tanto del ARNm como de la proteína) resultaron ser 2-3 veces superiores a los detectados en los animales control (Sun et al., 2003).

5. LA UTILIZACIÓN DE ENDOTOXINA COMO MODELO DE INDUCCIÓN DE LA ÓXIDO NÍTRICO SINTASA MITOCONDRIAL

5.1. LA SÍNTESIS DE ÓXIDO NÍTRICO

El **óxido nítrico (NO)** es un radical libre gaseoso que actúa como mensajero intercelular en diversos tejidos y que presenta una gran variedad de funciones fisiológicas, como la modulación del tono vascular, la inhibición de la agregación plaquetaria, la regulación de la adhesión plaquetaria al endotelio vascular, la inhibición de la oxidación de lípidos, el papel de actuar como neurotransmisor en el sistema nervioso central y periférico, la regulación de la apoptosis, la activación de la citotoxicidad macrófaga y actuar como defensa natural del organismo formando parte del sistema inmune (Bosca and Hortelano 1999; Ignarro 1999; Moncada and Erusalimsky 2002; Bosca et al., 2005; Moncada and Higgs 2006; Lowenstein 2007). El NO ejerce muchos de estos efectos fisiológicos uniéndose a la **guanilato ciclasa soluble (GCs)**. Esto se traduce en una serie de cambios conformacionales en la enzima que suponen la generación de **GMP cíclico (cGMP)**, un potente segundo mensajero que transmite los efectos del NO a otros efectores de la cascada de señalización celular, como proteínas quinasas dependientes de cGMP, fosfodiesterasas reguladas por cGMP y canales iónicos regulados por cGMP (Denninger and Marletta 1999; Koesling et al., 2004). Entre los efectos ejercidos por el NO a través de su unión a la GCs se encuentra la relajación del músculo liso vascular, la inhibición de la agregación plaquetaria y la adhesión de leucocitos (Gewaltig and Kojda 2002; Hoenicka and Schmid 2008).

Por otro lado, el NO también ejerce diversos efectos sobre la **cadena de transporte de electrones**; entre ellos, inhibe la actividad del Complejo IV o citocromo c oxidasa compitiendo por el sitio de unión del oxígeno, inhibe la transferencia de electrones entre el citocromo b y c del Complejo III aumentando la producción de superóxido, e inhibe la transferencia de

electrones y la función del Complejo I (Brown 1995; Boveris et al., 2000). La inhibición que ejerce el NO sobre la actividad de la citocromo c oxidasa es **reversible** (Cleeter et al., 1994), siendo el grado de inhibición ejercido por el NO dependiente de la concentración de oxígeno, puesto que el NO y el oxígeno **compiten** por el mismo sitio de unión en el centro reactivo de la citocromo c oxidasa (Brown and Cooper 1994; Cleeter et al., 1994; Takehara et al., 1995; Koivisto et al., 1997).

La síntesis de NO celular está mediada por una familia de enzimas denominadas **sintasas del óxido nítrico (NOS)** que catalizan la oxidación de la L-arginina para producir NO y L-citrulina (Palmer et al., 1988). Esta reacción requiere de la presencia de oxígeno y de cofactores como la tetrahidrobiopterina (BH₄) y la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) (Michel and Feron 1997). Dentro de esta familia de enzimas se han descrito distintas isoformas: la **nNOS** (neuronal o Tipo I) que originalmente fue purificada y clonada en cerebelo de rata (Bredt and Snyder 1990; Bredt et al., 1991), la **iNOS** (inducible o Tipo II) que se expresa fundamentalmente en macrófagos aunque también en otros tipos celulares como las células de la glía (Gross et al., 1990; Stuehr et al., 1991; Yui et al., 1991), y la **eNOS** (endotelial o Tipo III) que se expresa fundamentalmente en el endotelio vascular (Palmer et al., 1988; Gross et al., 1990; Seidel et al., 1997). La nNOS y la eNOS se expresan de manera constitutiva, y sintetizan niveles bajos de NO en respuesta a un aumento en la concentración de calcio intracelular. Por el contrario, la iNOS se induce ante un proceso inflamatorio, y sintetiza niveles elevados de NO en respuesta a diversos estímulos como las citoquinas inflamatorias (interferón- γ , la IL-1 β y el TNF- α), la endotoxina (LPS) y el daño oxidativo.

En 1997, Ghafourifar y Richter identificaron una nueva isoforma de la NOS en las mitocondrias aisladas a partir del hígado de rata, que catalizaba la síntesis de NO a partir de L-arginina de manera dependiente de calcio, y que denominaron **mtNOS** (NOS mitocondrial) (Ghafourifar and Richter 1997). Esta enzima catalizaba la síntesis de. En un estudio posterior, realizado también en mitocondrias de hígado de rata, se concretó además que esta enzima se localiza en la membrana mitocondrial interna (Tatoyan and Giulivi 1998). Además de en el hígado, en trabajos más recientes se ha detectado la presencia de la mtNOS en las mitocondrias aisladas a partir de otros tejidos como el músculo esquelético (Alvarez and Boveris 2004; Escames et al., 2006), el timo (Bustamante et al., 2000), el cerebro (Riobo et al., 2001; Riobo et al., 2002), el corazón (Kanai et al., 2001; Boveris et al., 2003a; Boveris et al., 2003b; Alvarez and Boveris 2004; Zanella et al., 2004; Xu et al., 2005), el riñón (Boveris et al., 2003b) y el pulmón (Escames et al., 2003).

Por otro lado, también se ha descrito que la mitocondria es capaz de producir **NO de manera independiente de las NOS**, debido a que los nitritos se pueden reducir a NO al aceptar los equivalentes reductores de la ubisemiquinona en el Complejo *bc*₁ (Kozlov et al., 1999). Asimismo se ha observado que la mitocondria es capaz de producir, de manera independiente

de L-arginina y en presencia de inhibidores de las NOS, cantidades significativas de **especies reactivas de nitrógeno**, las cuales pueden generarse al producirse NO en presencia de cantidades excesivas de ROS (Lacza et al., 2006a).

5.2. LA DETECCIÓN DE LA ÓXIDO NÍTRICO SINTASA MITOCONDRIAL

Para la detección de la mtNOS se han utilizado diferentes aproximaciones experimentales dirigidas a detectar directamente esta enzima o, de forma indirecta, el NO producido por la mtNOS y los efectos que ejerce sobre la respiración.

En relación a la detección **directa** de la mtNOS, se ha conseguido aislar y purificar esta enzima (Ghafourifar and Richter 1997; Tatoyan and Giulivi 1998). La utilización de anticuerpos mono- y policlonales frente a las diferentes isoformas de las NOS también ha sido aplicada en la detección y caracterización de la mtNOS (Tatoyan and Giulivi 1998; Boveris et al., 2003b; Lacza et al., 2003). Por otro lado, como aproximación **indirecta**, se han empleado diversas técnicas orientadas a la detección del NO producido por la mtNOS. Entre ellas, técnicas basadas en la oxidación de la mioglobina (Giulivi et al., 1998; Boveris et al., 2003a), marcapjes con sondas específicas para el NO como el fluorocromo 4-amino-5-metilamino-2-7-difluorfluoresceína diacetato (DAF-FM) (Lopez-Figueroa et al., 2000; Lacza et al., 2003), resonancia paramagnética de electrones o “*spin-trapping*” (Giulivi et al., 1998; Boveris et al., 2003b), detección electroquímica mediante la utilización de un electrodo sensible al NO (Kanai et al., 2001; Schild et al., 2003) y ensayos de actividad enzimática, mediante la determinación de la respiración mitocondrial en presencia del sustrato L-arginina o el inhibidor de las NOS N-monometil-L-arginina (L-NMMA) (Giulivi 1998; Kanai et al., 2001; Boveris et al., 2003b; Lacza et al., 2003).

A pesar de los resultados obtenidos en los trabajos citados anteriormente, todavía existe cierta **controversia en relación a la existencia de la mtNOS**, debido a que se han obtenido resultados contradictorios a partir de diferentes aproximaciones experimentales (Brown 2001; Brookes 2004; Tay et al., 2004). Además, debe tenerse en cuenta que la fiabilidad de los resultados obtenidos en algunos estudios en los que se afirma la existencia de la mtNOS está cuestionada, debido a que dichos resultados raramente han sido reproducidos por otros grupos de investigadores (Lacza et al., 2006b). Un ejemplo de la obtención de resultados negativos en relación a la existencia de la mtNOS fue un estudio realizado en mitocondrias aisladas a partir del hígado de rata en el que se determinó que la adición del sustrato L-arginina o el inhibidor L-NMMA no producía ningún efecto sobre la tasa de respiración, tanto en el Estado III como en el Estado IV (Tay et al., 2004). En este mismo trabajo tampoco se consiguió detectar la producción de NO por la mtNOS a pesar de realizar ensayos de oxidación de la mioglobina y utilizar un electrodo de NO. Los autores concluyeron que las mitocondrias utilizadas en su estudio no expresaban una NOS activa o que la producción de NO por parte de la mtNOS era

insignificante y, por tanto, por debajo del nivel de detección de las técnicas empleadas en su estudio. En otro trabajo realizado en mitocondrias aisladas a partir del cerebro de ratón también se determinó que dichas mitocondrias no expresan la mtNOS, basándose los autores en la imposibilidad de detectar el NO mediante la utilización del fluorocromo DAF-FM y de un electrodo sensible al NO (Lacza et al., 2004). Recientemente, en un estudio orientado a la detección de la mtNOS en mitocondrias de corazón de ratón y de humanos, no se consiguió identificar esta enzima por western blot mediante la utilización de 7 anticuerpos diferentes anti-NOS, ni tampoco mediante inmunoprecipitación. Además, se estimó que la producción de NO por parte de la mtNOS debía ser inferior a 2 ppb en 45 min, es decir, estaría por debajo del límite de detección de su ensayo (Csordas et al., 2007).

5.3. EL ESTADO DE SEPSIS COMO MODELO DE INDUCCIÓN DE LA ÓXIDO NÍTRICO SINTASA MITOCONDRIAL

En diversos estudios se ha utilizado la **endotoxina** como modelo de inducción de la mtNOS con la finalidad de detectarla y posteriormente caracterizarla bioquímica y funcionalmente (Callahan et al., 2001; Boveris et al., 2002; Escames et al., 2003; Alvarez and Boveris 2004; Xu et al., 2005). Como se ha mencionado anteriormente, al administrar endotoxina a un organismo, se induce un estado de sepsis acompañado de una importante respuesta inflamatoria, activándose la vía del NF- κ B y la transcripción de genes pro-inflamatorios que conducen a la síntesis de mensajeros intracelulares, como el NO y diversas citoquinas (Alvarez and Evelson 2007).

En un estudio realizado en ratas en el que se administró una dosis de endotoxina de 10 mg/kg de peso corporal (i.p.) se observó, transcurridas 6 h de incubación, un aumento en la producción de peróxido de hidrógeno en mitocondrias aisladas a partir del músculo diafragmático (Boczkowski et al., 1999). Además, en dichas mitocondrias se detectó un aumento en el desacoplamiento mitocondrial y, por tanto, una disminución de la capacidad fosforilativa de la mitocondria, siendo estos efectos atenuados con la administración de L-NMMA (8 mg/kg de peso corporal por vía intravenosa). Los autores de este trabajo concluyeron que estos efectos eran debidos al NO y a la generación de ROS durante la endotoxemia, formándose peroxinitrito (ONOO⁻), el cual daña la función mitocondrial contribuyendo a la alteración de la contractibilidad muscular (Boczkowski et al., 1999).

En mitocondrias aisladas a partir del músculo diafragmático de ratas a las que se les había administrado una dosis de LPS de 8 mg/kg de peso corporal (i.p.) y 48 h de incubación se observó que la respiración de dichas mitocondrias se encontraba inhibida debido a un descenso en la tasa respiratoria en el Estado III, sin modificarse la respiración en el Estado IV, lo que indicaba que no existía desacoplamiento, ni se modificaba la relación ADP:O (síntesis de ATP en relación al consumo de oxígeno en el Estado III) (Callahan et al., 2001). La implicación

del NO en dichos efectos se concluyó a partir de la observación de que el efecto inhibitor de la administración de endotoxina sobre el Estado III de la respiración era abolido al administrar a los animales una dosis de 1 mg/kg de peso corporal (i.p.) del inhibidor de las NOS, L-NAME (N-Nitro-L-arginina-metil-ester) (Callahan et al., 2001).

En otro trabajo, mediante técnicas espectrofotométricas basadas en la oxidación de la hemoglobina, se determinó la producción de NO por la mtNOS en las mitocondrias aisladas a partir del músculo diafragmático de ratas a las que se les había administrado una dosis de endotoxina de 10 mg/kg de peso corporal y 6 h de incubación (Boveris et al., 2002). En este estudio se determinó que el NO producido inhibía la respiración mitocondrial, induciendo un descenso en el consumo de oxígeno en el Estado III y en la producción de ATP (Boveris et al., 2002).

En estos estudios, la inhibición de la transferencia de electrones se puede explicar asociándola a un aumento en la producción de NO por la mtNOS, que conduce a un efecto irreversible del NO y el peroxinitrito sobre la NADH-ubiquinona reductasa y la ubiquinol-citocromo c reductasa, y a una inhibición reversible y competitiva con el oxígeno de la citocromo c oxidasa.

En mitocondrias aisladas a partir del pulmón de ratas inoculadas por vía intravenosa con una dosis de endotoxina de 10 mg/kg de peso corporal se observó que la expresión y actividad de la mtNOS, así como la producción de NO inferida a partir de la cuantificación de nitritos, se encontraban incrementadas transcurridas 6 h desde la inoculación de la endotoxina (Escames et al., 2003). Un aumento en la actividad de la mtNOS también fue observado en mitocondrias aisladas a partir del corazón de ratas a las que se les había administrado una dosis de LPS de 10 mg/kg de peso corporal (i.p.) y 6 h de incubación (Xu et al., 2005).

Posteriormente, en mitocondrias aisladas a partir del corazón y el músculo diafragmático de ratas en estado de endotoxemia se estimó que el valor de la K_m (constante de Michaelis-Mentes que se corresponde con la concentración de sustrato a la cual la velocidad de una reacción enzimática es la mitad de la velocidad máxima) de la mtNOS para el oxígeno era de 3,3 μM en las mitocondrias de corazón y de 4,6 μM en las mitocondrias del músculo diafragmático (Alvarez and Boveris 2004). Asimismo se determinó el pH óptimo para la actividad de la mtNOS, siendo 7,0 en las mitocondrias aisladas a partir del corazón y 6,5 en las mitocondrias aisladas a partir del diafragma.

El estado de sepsis orientado a la detección y caracterización de la mtNOS, además de inducirse mediante la administración de endotoxina, se ha provocado en algunos estudios mediante el **procedimiento quirúrgico** de ligación y punción del ciego (Llesuy et al., 1994; Xu et al., 2005; Escames et al., 2006). Esta aproximación metodológica se encuentra asociada a un descenso en la actividad de las enzimas antioxidantes en el músculo esquelético (MnSOD,

catalasa, glutation-peroxidasa) y en el hígado (catalasa) (Llesuy et al., 1994). Además, las mitocondrias aisladas a partir del músculo esquelético y el hígado de ratas a las que se les indujo dicho procedimiento quirúrgico presentaban una disminución de la respiración en el Estado III, sin afectarse la respiración en el Estado IV, y un aumento en la producción de peróxido de hidrogeno, siendo ambos efectos más marcados en las mitocondrias de músculo que en las mitocondrias de hígado (Llesuy et al., 1994).

Utilizando este método, se encontró en otro trabajo que la actividad de la mtNOS del corazón de rata se veía incrementada en un estado de shock séptico, relacionándose además este incremento con una disminución de los parámetros hemodinámicos ventriculares (Xu et al., 2005). Los autores determinaron la actividad de la mtNOS mediante la utilización de un kit comercial (*Nanking Jiancheng Bioengineering Institute*). En otro estudio, tras aplicar el mismo procedimiento, se determinó que las mitocondrias aisladas a partir del músculo esquelético de ratones de tipo silvestre mostraban un incremento en la actividad de la mtNOS y la producción de nitritos, mientras que la actividad de la cadena de transporte de electrones se encontraba disminuida. Sin embargo, en las mitocondrias aisladas a partir de ratones deficientes en la expresión de la iNOS y sometidos al mismo procedimiento, no se detectó ninguno de estos cambios (Escames et al., 2006). Estos datos sugirieron que la mtNOS está codificada por el mismo gen que la iNOS y es responsable de la disfunción mitocondrial observada en un estado de sepsis (Escames et al., 2006).

OBJETIVOS

En el presente trabajo se han planteado los siguientes objetivos:

1. Determinar la implicación de la proteína desacoplante 3 (UCP3) en la conductancia basal de la membrana mitocondrial interna a los protones, así como en el aumento de la conductancia inducido por el radical superóxido y el compuesto 4-hidroxinonenal (HNE), originado tras la peroxidación de los lípidos de la membrana mitocondrial.
 - Analizar el efecto de la inoculación de endotoxina sobre los niveles de expresión de la UCP3, así como del transportador de nucleótidos de adenina (ANT), en las mitocondrias aisladas a partir del músculo esquelético y el corazón de ratón.
 - Caracterizar los parámetros: control respiratorio, capacidad máxima de la respiración mitocondrial y actividad de los diferentes complejos de la cadena respiratoria mitocondrial, en las mitocondrias aisladas a partir del músculo esquelético y el corazón de ratones de tipo silvestre y ratones deficientes en la expresión de la UCP3, en presencia y en ausencia de endotoxina.
 - Investigar la implicación de la UCP3 en la conductancia basal de la membrana mitocondrial interna a los protones, mediante la utilización de mitocondrias aisladas a partir del músculo esquelético y el corazón de ratones de tipo silvestre y mutantes deficientes en la expresión de la UCP3.
 - Estudiar la implicación de la UCP3 en el aumento de la conductancia a los protones inducido por el superóxido y el HNE mediante la utilización de mitocondrias aisladas a partir del músculo esquelético y el corazón de ratones de tipo silvestre y mutantes deficientes en la expresión de la UCP3, en presencia y ausencia de endotoxina, así como mediante la adición del inhibidor de las proteínas desacoplantes, GDP, y del inhibidor del ANT, carboxiatractilósido.
2. Estudiar el papel de la UCP3 en los procesos de isquemia-reperfusión mediante la aplicación de un protocolo de anoxia-reoxigenación en mitocondrias aisladas a partir del corazón de ratón y en cardiomiocitos neonatales de rata.
3. Determinar la posible presencia de la óxido nítrico sintasa mitocondrial en el músculo esquelético de ratón tras la administración de endotoxina.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. ANIMALES

En la realización de este estudio se utilizaron dos modelos de experimentación animal: el **ratón**, con el objetivo de realizar el estudio de la expresión génica y diferentes determinaciones con mitocondrias aisladas a partir del tejido muscular esquelético y el corazón, y la **rata**, con la finalidad de cultivar cardiomiocitos neonatales y estudiar la respiración celular.

1.1. RATÓN

Los ratones de tipo silvestre o “*wild type*” (WT) utilizados en este trabajo fueron proporcionados por la casa comercial Charles River Laboratories, Inc. Todos los experimentos se realizaron a partir de muestras procedentes de ratones macho de la línea C57BL/6 de 8-10 semanas de edad y 25-30 g de peso. Estos animales fueron mantenidos a una temperatura de 22°C y con un ciclo de alternancia de luz-oscuridad de 12 h. Asimismo, tuvieron libre acceso a la ingestión de pienso y de agua de bebida.

Los animales mutantes que carecen del gen *ucp3*, o “*knock-out*” para *ucp3* (KO), fueron obtenidos en el animalario del CNIC a partir de 3 parejas de ratones C57BL/6 heterocigotos para este gen. Estos 6 animales fueron amablemente cedidos por el Dr. Martin D. Brand, del Medical Research Council-Dunn Human Nutrition Unit (Cambridge, Reino Unido).

1.1.1. Genotipado de los ratones deficientes en la proteína UCP3

El genotipado de los ratones obtenidos en los diferentes cruces fue realizado a partir de ADN genómico extraído de muestras de la cola, siguiendo las instrucciones del kit comercial REDEExtract-N-Amp Tissue PCR kit (Sigma-Aldrich Chemical). El ADN extraído fue testado mediante una doble PCR utilizando los cebadores indicados en la Tabla M.1.

Cebador	Secuencia	Alelo	Localización
Ucp3koF1	5'-GCAAAACCAAATTAAGGG-3'	Mutado	p1
Ucp3koF2	5'-CATAGGCAGCAAAGGAAC-3'	Normal	p2
Ucp3koR3	5'-CTTTATGGTTTACACAGC-3'	Ambos	p3

Tabla M.1. Cebadores utilizados en el genotipado de los ratones deficientes en la proteína UCP3.

En el esquema de la Figura M.1 se muestra el lugar de inserción del vector de disrupción en el gen *ucp3* y la localización de los cebadores utilizados. En cada reacción de PCR se utilizaron 100 pmol de cada cebador, 6 µl de Jump Start Red Taq Ready Mix Reaction Mix for PCR

(Sigma-Aldrich Chemical), 2 µl de ADN y agua ultra-pura hasta completar un volumen final de reacción de 20 µl.

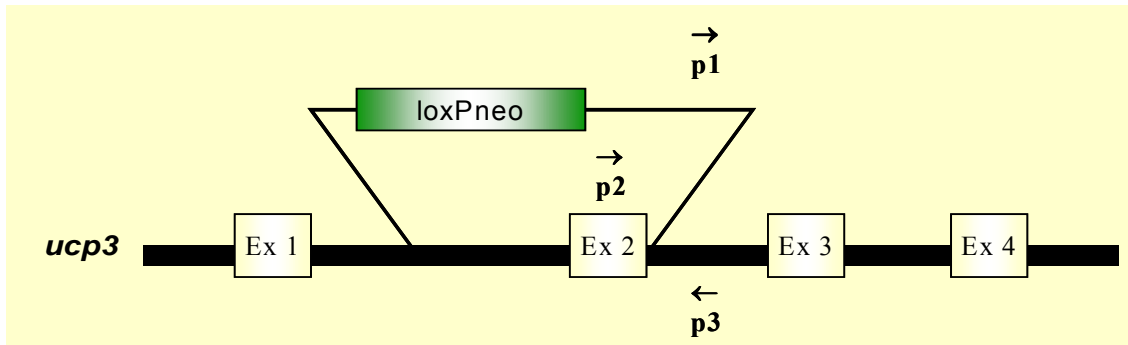


Figura M.1. Esquema del lugar de inserción del vector de interrupción en el gen *ucp3* y localización de los cebadores utilizados en el genotipado de los ratones deficientes en *ucp3*.

El ciclo de PCR aplicado fue una desnaturalización inicial de 5 min a 95°C, seguida de 35 ciclos de 30 s a 95°C, 30 s a 55°C y 30 s a 72°C, y de una elongación final de 5 min a 72°C. Los productos de PCR resultantes fueron visualizados con luz ultravioleta en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio (Figura M.2).

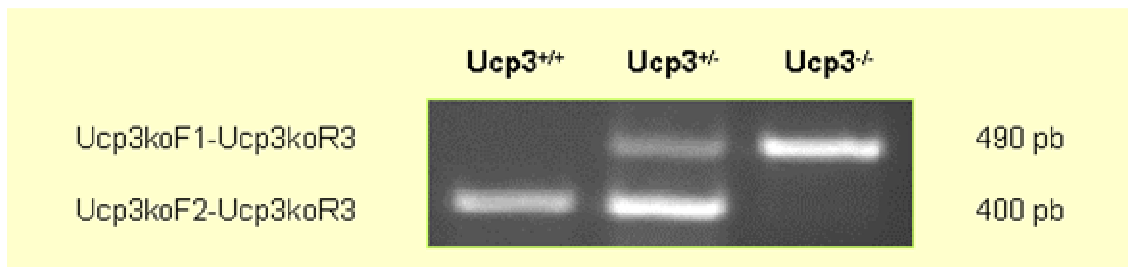


Figura M.2. Gel de agarosa al 2% en el que se visualizan los fragmentos amplificados mediante PCR para la realización del genotipado de los ratones: una única banda de 400 pb en el genotipo silvestre, dos bandas de 400 y 490 pb en el genotipo heterocigoto, y una única banda de 490 pb en el genotipo mutado.

1.1.2. Protocolo de inoculación de endotoxina

Dentro de cada tipo de animales, WT y KO, se hicieron dos grupos: animales sin tratamiento y animales tratados con endotoxina. A los animales sin tratamiento se les inyectó intraperitonealmente 100 µl de solución salina estéril. A los animales tratados con endotoxina se les inoculó por la misma vía una dosis de lipopolisacárido (LPS) de 12 mg/kg de peso corporal. La solución de LPS inoculada se preparó con endotoxina de *Escherichia coli* serotipo O55:B5 (Sigma-Aldrich Chemical) disuelta en solución salina estéril a una concentración de 3 mg/ml. Tras la inoculación se mantuvo a los ratones a una temperatura constante de 22°C y con libre acceso a la ingestión de agua y pienso.

1.1.3. Obtención de muestras tisulares

Pasadas 24 h tras la inoculación de LPS, se procedió al sacrificio de los animales mediante dislocación cervical. Inmediatamente se extrajo el tejido muscular esquelético de ambas extremidades posteriores y el corazón. Estas muestras tisulares fueron utilizadas en tres tipos de procedimientos: extracción de ARN, extracción de proteínas y aislamiento de mitocondrias.

Las muestras destinadas a la extracción de ARN y proteínas fueron conservadas a -80°C hasta su procesamiento, mientras que las muestras destinadas al aislamiento de mitocondrias fueron procesadas en el momento de ser obtenidas.

1.2. RATA

Las ratas utilizadas en la realización de este estudio fueron obtenidas a partir de diferentes cruces de ratas adultas de la línea Wistar proporcionadas por la casa comercial Charles River Laboratories, Inc. Tras el apareamiento de diferentes parejas de ratas adultas y un periodo de gestación de 20-22 días, se obtuvieron camadas de 6-10 crías. Estos animales fueron mantenidos a una temperatura de 21°C y con un ciclo de alternancia luz-oscuridad de 12 h, permitiendo su amamantamiento hasta el día de la realización del experimento.

2. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

El estudio de la expresión génica en ratones de tipo silvestre y mutantes UCP3KO se llevó a cabo analizando los niveles de expresión del ARNm, así como los niveles de expresión de la proteína.

2.1. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DEL ARN

2.1.1. Extracción de ARN

La extracción de ARN se realizó utilizando el reactivo TRIzol® (Invitrogen). Este reactivo es una solución monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina y el protocolo de extracción está basado en el método ideado por Chomczynski y Sacchi (Chomczynski and Sacchi 1987).

Las muestras de tejido muscular esquelético (músculo gastrocnemio) y corazón fueron homogeneizadas en 1 ml de TRIzol® con un homogenizador Ultra Turrax (IKA-Labortechnik) a 4°C. A continuación, se centrifugó el homogeneizado resultante durante 10 min a 12000 g y 4°C. El sobrenadante fue recogido e incubado 5 min a temperatura ambiente.

Seguidamente se añadieron 200 μ l de cloroformo y se centrifugó durante 15 min a 12000 g y 4°C. De esta manera se separó la solución en tres fases: una fase superior acuosa (transparente), una interfase (blanquecina) y una fase inferior orgánica (rosa). La fase acuosa se recogió en otro tubo y se añadieron 500 μ l de alcohol isopropílico con la finalidad de precipitar el ARN. Tras una incubación de 10 min a 4°C se volvieron a centrifugar las muestras a 12000 g durante 10 min. Se retiró el sobrenadante y se lavó el sedimento con 1 ml de etanol al 75% en agua tratada con DEPC (dietilpicrocarbonato) al 0,1%. A continuación se centrifugó a 4°C durante 5 min a 7500 g. Finalmente se retiró el sobrenadante de esta última centrifugación y se procedió a secar las muestras a 37°C durante 5 o 10 min con la finalidad de evaporar la mayor cantidad posible de etanol. A continuación se resuspendió el sedimento en 50 μ l de agua tratada con DEPC al 0,1% mediante la incubación a 60°C durante 10 min.

Todo el proceso de extracción de ARN se llevó a cabo poniendo especial cuidado en mantener la zona de trabajo libre de ARNasas, y desechando el material utilizado cuando se pudiera producir una posible contaminación. Las muestras de ARN finalmente obtenidas fueron congeladas a -80°C y mantenidas a esta temperatura hasta su posterior procesado.

2.1.2. Determinación de la concentración, pureza e integridad del ARN

La concentración y pureza del ARN extraído fueron determinadas con el espectrofotómetro ND-1000 (NanoDrop Technologies) a partir de 1 μ l de muestra. La **concentración** del ARN fue calculada a través del valor de absorbancia a 260 nm (máximo de absorbancia de los ácidos nucleicos) teniendo en cuenta que una unidad de absorbancia a esta longitud de onda equivale a 40 μ g de ARN por ml. La **pureza** del ARN se determinó mediante la relación de la absorbancia medida a 260 y a 280 nm (máximo de absorbancia de las proteínas). Una muestra de ARN fue considerada con un grado de pureza óptimo cuando la relación de absorbancia $_{260/280}$ fue de 2,0. La **integridad** del ARN se verificó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Las muestras de ARN en buenas condiciones (no degradadas) presentaron el patrón de bandas nítidas de ARNr (28S y 18S) que se observa en la Figura M.3.



Figura M.3. Gel de agarosa al 1% en el que se visualiza el patrón de migración de varias muestras de ARN extraídas para la realización de este estudio.

2.1.3. Retrotranscripción

La retrotranscripción consiste en la formación de ADN complementario (ADNc) a partir de ARN mediante la acción de la enzima transcriptasa reversa (RT). Esta reacción se llevó a cabo con el sistema Super Script First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen) utilizando hexanucleótidos al azar o “*random hexanucleotides*” como cebadores.

Todos los reactivos y el material utilizado fueron preparados libres de RNAsas. En un volumen final de reacción de 10 μ l se añadió 1 μ g de ARN, 100 ng de hexanucleótidos y dNTPs 1 mM en agua tratada con DEPC. Para desnaturalizar el ARN se incubó esta mezcla a 65°C durante 5 min, e inmediatamente se puso en hielo. En otro tubo, como control de contaminación genómica, se llevó a cabo una reacción paralela sin transcriptasa reversa. Seguidamente se añadieron 2 μ l del tampón de la enzima RT (Invitrogen), 4 μ l de MgCl₂ 25 mM, 2 μ l de DTT 0,1 M y 40 U del inhibidor de RNAsas (RNaseOUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor, Invitrogen), y se incubó a temperatura ambiente durante 2 min. A continuación se añadió 1 μ l de la enzima RT SuperScript II (50 U) y se incubó a temperatura ambiente durante 10 min, a 42°C durante 50 min y a 70°C durante 15 min. Tras refrigerar las muestras en hielo, se añadió 1 μ l de RNasa H para eliminar el ARN que pudiera quedar mezclado con el ADNc sintetizado y se incubó a 37°C durante 20 min. Finalmente, el ADNc obtenido fue conservado a -20°C hasta la realización de la PCR cuantitativa.

2.1.4. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

La reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real permite la cuantificación de ácidos nucleicos. Este método está basado en la monitorización de la PCR mediante técnicas de fluorescencia, de manera que la señal fluorescente visualizada es proporcional a la cantidad de producto de PCR obtenido. Esta señal es generada por fluoróforos específicos de ADN bicatenario (como el SYBR-Green) o por sondas específicas de la secuencia a amplificar. Con este sistema se puede detectar en qué momento cada reacción de PCR alcanza su fase exponencial de amplificación, la cual se correlaciona con la cantidad de copias del ADN diana que había inicialmente en la muestra.

2.1.4.1. Cuantificación relativa mediante el método comparativo del ciclo umbral (Ct)

La metodología utilizada en la cuantificación de la expresión de los genes de interés en las muestras de tejido muscular esquelético y corazón requirió elegir otro gen cuya expresión no variara con la aplicación del tratamiento de LPS, es decir, un gen de expresión constitutiva o de referencia, y se eligió el gen *β -actina*. De esta manera, las diferencias en la expresión de los genes diana entre las muestras fueron determinadas tras haber tenido en cuenta la expresión

del gen β -actina en cada una de ellas. De este modo, se consiguió corregir las posibles diferencias en la concentración inicial de ADNc.

Este método de cuantificación relativa permitió determinar en los animales tratados con LPS la cantidad de ADN de un gen diana (*ucp3*, *ucp2*, etc.) normalizado respecto de un gen de referencia (β -actina) y de forma relativa a la expresión de dicho gen en los animales sin tratamiento. Esta cuantificación se realizó a través de la fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$, siendo Ct el número de ciclos necesarios para que la cantidad de ADN amplificada alcance un valor umbral o de saturación. Del mismo modo se pudo cuantificar en los animales *knock-out* para *ucp3* la expresión de un gen diana normalizado respecto de β -actina y de forma relativa a la expresión de dicho gen en los animales de tipo silvestre.

2.1.4.2. Cebadores utilizados

Para el diseño de los cebadores utilizados en este estudio se empleó el programa informático Primer3 (Rozen and Skaletsky 2000). Las secuencias de ADN de ratón sobre las que se diseñaron los cebadores se obtuvieron de la base de datos GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank): NM007393 para β -actina, NM009464 para *ucp3*, NM011671 para *ucp2*, NM007450 para *ant1* y NM007451 para *ant2*. En la Tabla M.2 aparecen reflejadas las secuencias de los cebadores utilizados, así como las temperaturas de hibridación (Th) y el tamaño de los productos amplificados

Cebador	Secuencia	Th (°C)	Producto amplificado
β -Actina sentido	5'-CACCTTCCAGCAGATGTGGA-3'	60°	74 pb
β -Actina antisentido	5'-AGCACTTGCGGTGCACGATGG-3'		
UCP3 sentido	5'-CCTGTGGAAAGGGACTTGG-3'	58°	126 pb
UCP3 antisentido	5'-CAGGGGAAGTTGTCTAGTAAACAG-3'		
UCP2 sentido	5'-CAGTTCTACACCAAGGGCTCAG-3'	60°	629 pb
UCP2 antisentido	5'-CATGGAGAGGCTCAGAAAGGTGC-3'		
ANT1 sentido	5'-CCAGGGCATCATCATCTACA-3'	55°	119 pb
ANT1 antisentido	5'-TCACACTCTGGGCAATCATC-3'		
ANT2 sentido	5'-TCATCTACCGAGCTGCCTACTT-3'	58°	166 pb
ANT2 antisentido	5'-ATCATCATACGACGGCGAAC-3'		

Tabla M.2. Cebadores utilizados en el estudio de la expresión génica mediante RT-PCR.

2.1.4.3. Condiciones de la reacción

Una vez obtenidas las muestras de ADNc de tejido muscular esquelético y corazón se procedió a realizar las reacciones de PCR por triplicado y en un volumen total de 20 μ l. En cada pocillo de una placa óptica se añadió SYBR-Green PCR Master Mix 2X (Applied Biosystems), 0,4 μ M de cada cebador y agua bidestilada estéril hasta completar un volumen final de 19 μ l. En último lugar se añadió 1 μ l de ADNc de cada muestra. En las mismas condiciones, se preparó una reacción con ARN en lugar de ADNc como control negativo de cada muestra. También se incluyó en cada placa otro control negativo únicamente con agua. Se selló la placa con una lámina óptica y se introdujo en el sistema ABI PRISM 7900HT (Applied Biosystems). El ciclo aplicado consistió en 2 min a 50°C y 10 min a 95°C, seguidos de 40 ciclos de 15 s a 95°C, 30 s a 55-60°C y 30 s a 72°C.

Los resultados obtenidos fueron analizados con el programa informático SDS 2.1 asociado al sistema ABI (Applied Biosystems). El estudio estadístico se realizó aplicando el test de la *t* de Student, considerándose estadísticamente significativas las diferencias con un valor de $p < 0,05$.

2.2. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS

2.2.1. Extracción de proteínas

La extracción de proteínas a partir del tejido muscular esquelético y el corazón se realizó en un tampón RIPA comercial (Sigma-Aldrich Chemical) suplementado con ditioneitol 1 mM, Pefabloc 100 mM (Roche Diagnostics) y un cóctel de inhibidores de proteasas (Complete Mini, Roche Diagnostics). La solución RIPA fue añadida a las muestras congeladas en función de su peso: 4 ml por cada g de tejido muscular esquelético y 5 ml por cada g de tejido cardíaco. A continuación se homogeneizaron las muestras con un homogeneizador Ultra-Turrax (IKA-Labortechnik) y se incubaron en hielo durante 20 min. Posteriormente los extractos obtenidos fueron centrifugados 2 veces durante 10 min a 12000 g. Todo el proceso fue realizado a 4°C. El sobrenadante obtenido se congeló a -80°C tras determinar su concentración de proteínas.

2.2.2. Determinación de la concentración de proteínas: método de Biuret

La concentración de proteínas se determinó mediante el método de Biuret. Este método se basa en que el ión cúprico del reactivo de Biuret, en un medio fuertemente alcalino, se coordina con los enlaces peptídicos (CO-NH) de las proteínas formando un complejo de color violeta, que presenta un máximo de absorción a 540 nm. La intensidad de este color depende de la concentración de proteínas existente en la muestra.

Inicialmente se elaboró una recta patrón con cantidades conocidas de la proteína albúmina sérica bovina (BSA). Para ello, diferentes diluciones de BSA (dentro del rango de 2 a 22 mg/ml) se incubaron durante 30 min con desoxicolato sódico y reactivo de Biuret. Pasado este tiempo, se determinó su absorbancia a 540 nm en un espectrofotómetro (U-2001, Hitachi Instruments, Inc). Mediante la representación de estos datos se calculó la pendiente de la recta (K) que relaciona la absorbancia con la concentración de BSA (Figura M.4).

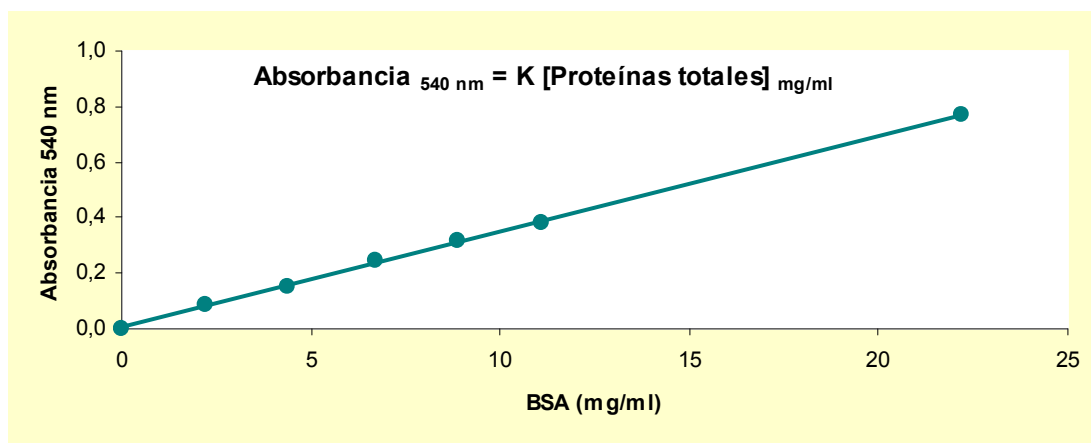


Figura M.4. Recta patrón para la determinación de la concentración de proteínas mediante el método de Biuret. La representación gráfica de diferentes concentraciones de BSA y su absorbancia medida a 540 nm permite el cálculo de la pendiente de la recta (K), que relaciona la absorbancia de una muestra con su concentración de proteínas.

La determinación de la concentración de proteínas totales se realizó, tanto en los extractos proteicos tisulares como en las preparaciones de mitocondrias aisladas, aplicando la fórmula $[\text{Proteínas totales}]_{(\text{mg/ml})} = K^{-1} \times F \times A$, siendo K la pendiente de la recta, F el factor de dilución y A el valor de la absorbancia medido a 540 nm.

2.2.3. Detección de la expresión de proteínas mediante western blot

Tras determinar la concentración de proteínas totales de cada muestra, éstas se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) en presencia de SDS, utilizando diferentes porcentajes de acrilamida/bisacrilamida en función del peso molecular de la proteína que se deseara detectar en cada caso (Tabla M.3).

Inicialmente, los extractos proteicos y las preparaciones de mitocondrias aisladas se hirvieron durante 5 min en un tampón de carga compuesto por SDS al 2%, glicerol al 10%, 2-mercaptoetanol al 5%, azul de bromofenol al 0,002% y Tris-HCl 62,5 mM a pH 6,8.

Después de cargar en cada gel la misma cantidad de proteína de cada una de las muestras (100 μg), se llevaron a cabo la electroforesis y la transferencia utilizando el sistema Mini Protean 3 (Bio-Rad Laboratories) y las soluciones tampón recomendadas por el fabricante.

Proteína	Peso molecular	Gel %
iNOS	130 kDa	9
Actina	42 kDa	-
UCP3	34 kDa	12
ANT	33 kDa	12
Porina	30 kDa	12

Tabla M.3. Proteínas detectadas mediante western blot en este estudio. Se indican los pesos moleculares y el porcentaje de acrilamida/bisacrilamida utilizado en los geles en los que se resolvieron dichas proteínas.

La electroforesis se realizó a 120 V a temperatura ambiente, mientras que la transferencia se realizó a 350 mA a 4°C. Las proteínas en el gel fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (GE Healthcare) o de polivinildifluoruro (Hybond-P, GE Healthcare).

Tras la transferencia, las membranas fueron bloqueadas con leche desnatada en polvo disuelta al 5% en TBS-T (Tris-HCl 20 mM a pH 7,2, NaCl 150 mM, Tween-20 0,1%) durante 2 h e incubadas posteriormente durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario correspondiente diluido en la solución de bloqueo. En la Tabla M.4 aparecen reflejados los anticuerpos primarios y las diluciones a las que fueron utilizados.

Proteína	Anticuerpo primario	Dilución
iNOS	BD Transduction Laboratorios	1:2000
Actina	Sigma Aldrich Chemical	1:5000
UCP3	Affinity BioReagents	1:1000
ANT	Santa Cruz Biotechnology	1:1000
Porina	Molecular Probes, Invitrogen	1:10000

Tabla M.4. Proteínas detectadas mediante western blot en este estudio. Se indican los anticuerpos primarios y las diluciones a las que fueron utilizados.

Al finalizar la incubación con el anticuerpo primario, se lavaron las membranas con TBS-T y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario conjugado a una peroxidasa de rábano en leche desnatada al 5% en TBS-T. En la Tabla M.5 aparecen reflejados los anticuerpos secundarios y las diluciones a las que fueron utilizados.

Finalmente, tras volver a lavar con TBS-T, se visualizaron las bandas de proteínas utilizando un método quimioluminiscente basado en la oxidación del luminol por acción del peróxido de hidrógeno catalizado por la peroxidasa de rábano (ECL western blotting detection reagents, GE Healthcare).

Proteína	Anticuerpo secundario	Dilución
iNOS	Anti-IgG de conejo (Vector Laboratories)	1:5000
Actina	Anti-IgG de ratón (Santa Cruz Biotechnology)	1:2500
UCP3	Anti-IgG de conejo (Vector Laboratories)	1:5000
ANT	Anti-IgG de cabra (Santa Cruz Biotechnology)	1:2500
Porina	Anti-IgG de ratón (Santa Cruz Biotechnology)	1:2500

Tabla M.5. Proteínas detectadas mediante western blot en este estudio. Se indican los anticuerpos secundarios y las diluciones a las que fueron utilizados.

Mediante la realización de un densitometrado de las bandas visualizadas, utilizando el programa informático Quantity One (Bio-Rad Laboratories), se cuantificó el nivel de expresión de las proteínas. El estudio estadístico de los datos obtenidos se realizó aplicando el test de la *t* de Student, considerándose estadísticamente significativas las diferencias con un valor de $p < 0,05$.

3. ESTUDIOS REALIZADOS EN MITOCONDRIAS AISLADAS

3.1. AISLAMIENTO DE MITOCONDRIAS

Para la realización de este estudio fue necesario el aislamiento de mitocondrias a partir del tejido muscular esquelético y el corazón de ratón. En ambos casos el sacrificio de los animales se realizó por dislocación cervical y sin la administración de anestésicos.

3.1.1. Aislamiento de mitocondrias a partir del tejido muscular esquelético

Tras el sacrificio de los animales (3 ratones por preparación), se extrajo el tejido muscular esquelético de las extremidades posteriores y se conservó en la solución CP1 (KCl 100 mM, Tris-HCl 50 mM y EGTA 2 mM, a pH 7,4) (Cadenas and Brand 2000). Inmediatamente se realizó una rotura inicial de las fibras musculares sobre una superficie rígida. Seguidamente, se disgregó el tejido de manera más minuciosa, a la vez que se lavaba con medio CP1. Este proceso, al igual que todas las fases del protocolo de aislamiento, se realizó manteniendo las muestras a 4°C. Tras estos lavados, se retiró la solución CP1 y se añadió solución CP2 (KCl 100 mM, Tris-HCl 50 mM, EGTA 2 mM, BSA 0,5% libre de ácidos grasos, MgCl₂ 5 mM, ATP 1 mM y 10 U/g tejido de proteasa, a pH 7,4). Tras mantener la muestra en agitación durante 2 min, la preparación obtenida se homogeneizó con la ayuda de un émbolo de vidrio manual (10

pases). A continuación se centrifugó este homogeneizado durante 10 min a 429 g. El sobrenadante obtenido fue filtrado y nuevamente centrifugado durante 10 min a 10382 g. El sedimento se resuspendió en CP1 y se volvió a centrifugar durante 10 min a 10382 g. El sedimento obtenido volvió a ser resuspendido en CP1 y finalmente centrifugado durante 10 min a 3842 g. Todas las centrifugaciones se realizaron a 4°C. El sedimento resultante de esta última centrifugación fue resuspendido en 150 µl de la solución CP1. A continuación se determinó la concentración de proteínas de la preparación de mitocondrias obtenida mediante el método de Biuret.

3.1.2. Aislamiento de mitocondrias a partir del corazón

Tras el sacrificio de los animales (8 ratones por preparación), se extrajo el tejido cardiaco y se conservó en la solución MS1 (manitol 230 mM, sacarosa 70 mM, Tris-HCl 5 mM y EDTA 1 mM, a pH 7,4) (Han et al., 2003) en hielo. Tras un proceso de troceado sobre una superficie rígida, se realizaron diversos lavados con medio MS1 para eliminar la sangre del tejido. Este proceso y las siguientes fases del aislamiento se realizaron manteniendo las muestras a 4°C. Tras los lavados se retiró la solución MS1 y se añadió la solución MS2 (manitol 230 mM, sacarosa 70 mM, Tris-HCl 5 mM, EDTA 1 mM y 40,4 U/g tejido de proteasa, a pH 7,4). Tras mantener la muestra en agitación durante 2 min, la preparación obtenida se homogeneizó con la ayuda de un émbolo de vidrio manual (5 pases). A continuación se filtró y centrifugó este homogeneizado en las mismas condiciones que en el protocolo de aislamiento de mitocondrias de músculo esquelético. El sedimento resultante de la última centrifugación fue resuspendido en 100 µl de MS1. A continuación se determinó la concentración de proteínas de la preparación de mitocondrias obtenida mediante el método de Biuret.

3.2. MEDIDAS DE CONSUMO DE OXÍGENO

3.2.1. Control respiratorio

El control respiratorio es un indicador de la integridad y el acoplamiento mitocondrial y, por lo tanto, de la calidad de las mitocondrias aisladas. Este índice se define como la relación entre el consumo de oxígeno en el Estado III y en el Estado IV, es decir, la relación entre el consumo de oxígeno en presencia de sustrato y ADP (Estado III) y el consumo de oxígeno tras la adición de oligomicina (Estado IV).

Para determinar el control respiratorio, las mitocondrias fueron incubadas en medio KHE, compuesto por KCl 120 mM, KH₂PO₄ 5 mM, HEPES 3 mM, EGTA 1 mM y BSA 0,3% libre de ácidos grasos, a pH 7,2 (Cadenas and Brand 2000). Para el cálculo del control respiratorio en las mitocondrias de músculo esquelético se utilizaron 0,35 mg de proteína/ml de medio,

mientras que para el cálculo del control respiratorio en las mitocondrias de corazón se utilizaron 0,25 mg de proteína/ml de medio.

En la valoración del control respiratorio se utilizó succinato como sustrato, a una concentración saturante de 4 mM. Puesto que este sustrato dona directamente los electrones al Complejo II de la cadena respiratoria, se añadió también rotenona (2 μ M), con el fin de evitar el transporte retrógrado de electrones hacia el Complejo I. Tras la adición de succinato, se inició el consumo de oxígeno, el cual se vio incrementado con la posterior adición de ADP (250 μ M). Finalmente se añadió oligomicina (1 μ g/ml) que, al inhibir la síntesis de ATP, produce secundariamente una ralentización en el consumo de oxígeno. Estas medidas de consumo de oxígeno se realizaron en medio KHE y a 37°C.

3.2.2. Capacidad máxima de la respiración mitocondrial

La capacidad máxima de respiración de las mitocondrias aisladas se determinó en el respirómetro de alta resolución Oroboros Oxygraph-2k. En las cámaras del respirómetro, se añadieron 50 μ g/ml de la suspensión mitocondrial a un volumen de 2 ml de medio KHE con 0,3% BSA y a 37°C. Tras cerrar la cámara del respirómetro y estabilizarse la señal recogida por el mismo, se añadió rotenona 2 μ M, succinato 5 mM y el agente desacoplante FCCP (carbonilcianida-p-trifluorometoxifenilhidrazona). El FCCP disipa el gradiente electroquímico de protones de la membrana mitocondrial interna y estimula así la respiración hasta su nivel máximo.

Se realizaron experimentos preliminares para determinar la dosis de FCCP a la que se obtenía una velocidad de respiración máxima para las mitocondrias aisladas a partir del músculo esquelético (Figura M.5.A) y del corazón (Figura M.5.B). Tras la adición de rotenona (R) y succinato (S), las mitocondrias iniciaron la respiración. Con la adición secuencial de FCCP 0,1 μ M, el flujo basal aumentó, hasta alcanzar un valor máximo, y seguidamente disminuyó. La concentración de FCCP a la que se alcanzó el flujo máximo fue 0,6 μ M en mitocondrias de músculo esquelético y 0,8 μ M en mitocondrias de corazón. Por lo tanto, se utilizaron dichas concentraciones de FCCP en los experimentos de determinación de la capacidad máxima de la respiración mitocondrial.

Los valores de respiración obtenidos (nmol O₂/(min·mg de proteína)) fueron determinados como el valor medio de la respiración a lo largo de 1 min tras la adición de FCCP. El estudio estadístico se realizó aplicando el test de la *t* de Student, considerándose estadísticamente significativas las diferencias con un valor de $p < 0,05$.

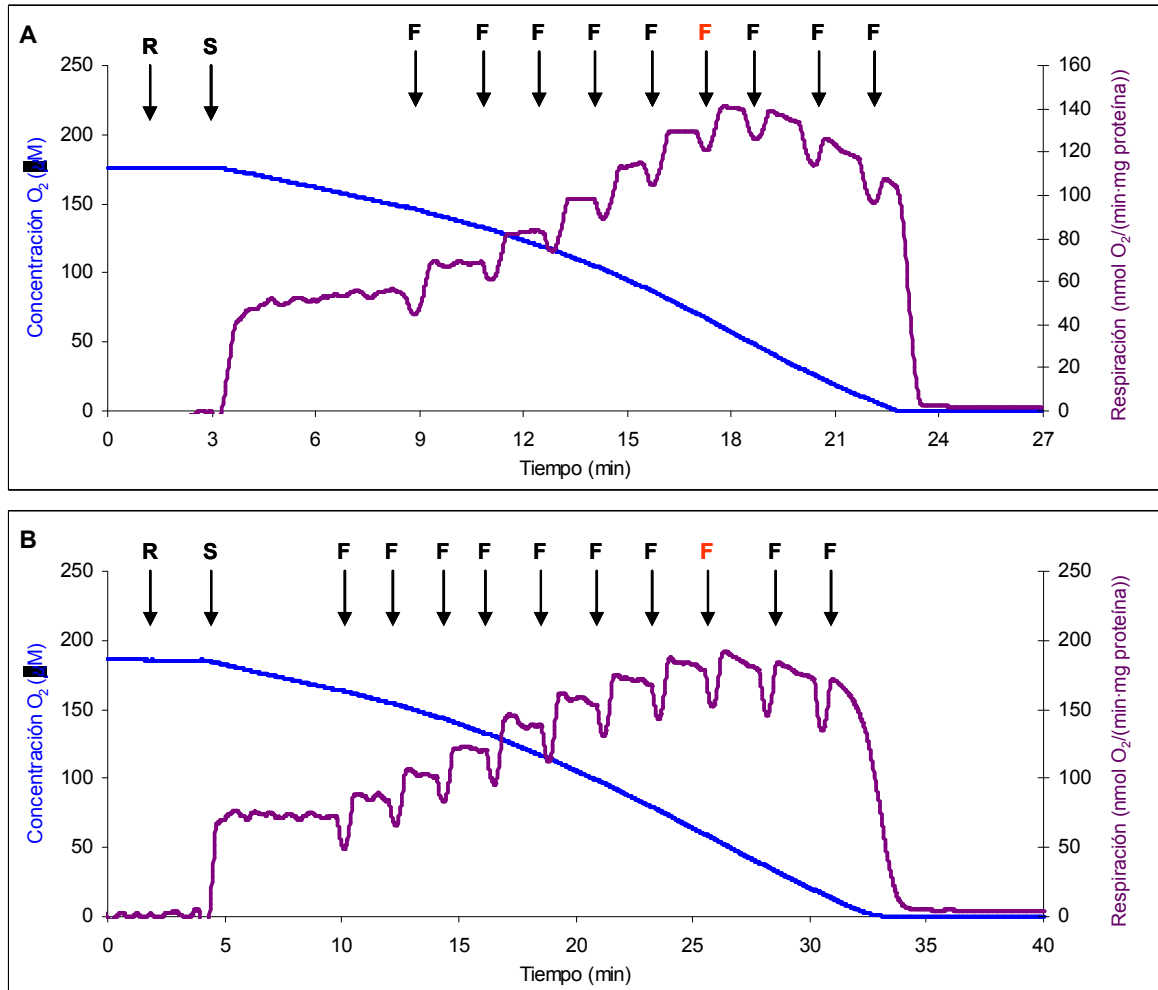


Figura M.5. Determinación de la dosis de FCCP necesaria para alcanzar la capacidad de respiración máxima en mitocondrias de músculo esquelético (A) y de corazón (B). Tras la adición de rotenona 2 μM (R) y succinato 5 mM (S), se realizaron varias adiciones de FCCP 0,1 μM (F) hasta alcanzar la capacidad máxima de respiración mitocondrial. La línea azul representa la concentración de oxígeno (μM) mientras que la línea morada representa la respiración mitocondrial (nmol O₂/(min-mg proteína)).

3.2.3. Actividad de los diferentes complejos de la cadena respiratoria mitocondrial

Los experimentos para la determinación de la actividad de los diferentes complejos de la cadena de transporte de electrones mitocondrial fueron realizados utilizando respirometría de alta resolución (Oroboros Oxygraph-2k). En las cámaras del respirómetro, las mitocondrias fueron incubadas en medio KHE con 0,3% BSA a una concentración de 50 μg/ml, y fueron mantenidas en agitación a 37°C. Tras cerrar la cámara del respirómetro y estabilizarse la señal recogida por el mismo, se añadieron diferentes sustratos e inhibidores en el siguiente orden: piruvato 5 mM o glutamato 10 mM, malato 2 mM, ADP 1 mM, citocromo *c* 10 μM, rotenona 2 μM, succinato 5 mM, antimicina A 2,5 μM, ascorbato 2 mM, TMPD (tetrametil-p-fenilenediamina) 500 μM y cianuro potásico 1 mM.

La oxidación del piruvato o el glutamato por parte de las mitocondrias es un indicador de la actividad del Complejo I. El malato facilita la entrada de estos sustratos al interior de la mitocondria. Tras la adición de ADP, comienza la síntesis de ATP por parte de la ATP sintasa. Si las mitocondrias se encuentran en buen estado, el valor de la respiración en este punto debe ser similar al observado al añadir citocromo *c* al medio. Con la adición de rotenona queda inhibido el Complejo I al bloquearse la transferencia de electrones entre la flavina y la ubiquinona. El succinato es oxidado por el Complejo II hasta la adición de antimicina A, que bloquea la transferencia de electrones entre el citocromo *b* y el citocromo *c*₁, inhibiéndose el Complejo III. El TMPD dona sus electrones a la citocromo *c* oxidasa (Complejo IV), permitiendo la reducción del oxígeno. El ascorbato a su vez dona electrones al TMPD, de modo que la adición conjunta de estos dos compuestos tras la inhibición del Complejo III, permite estimar la actividad de la enzima. Finalmente, el cianuro potásico actúa sobre el grupo hemo *a*₃ de la citocromo *c* oxidasa impidiendo su interacción con el oxígeno.

La adición del sistema ascorbato/TMPD al medio supone una disminución en la concentración de oxígeno ajena al consumo de oxígeno por parte de la mitocondria. Este valor fue corregido determinando el flujo del medio KHE con 0,3% BSA a 37°C en ausencia de mitocondrias.

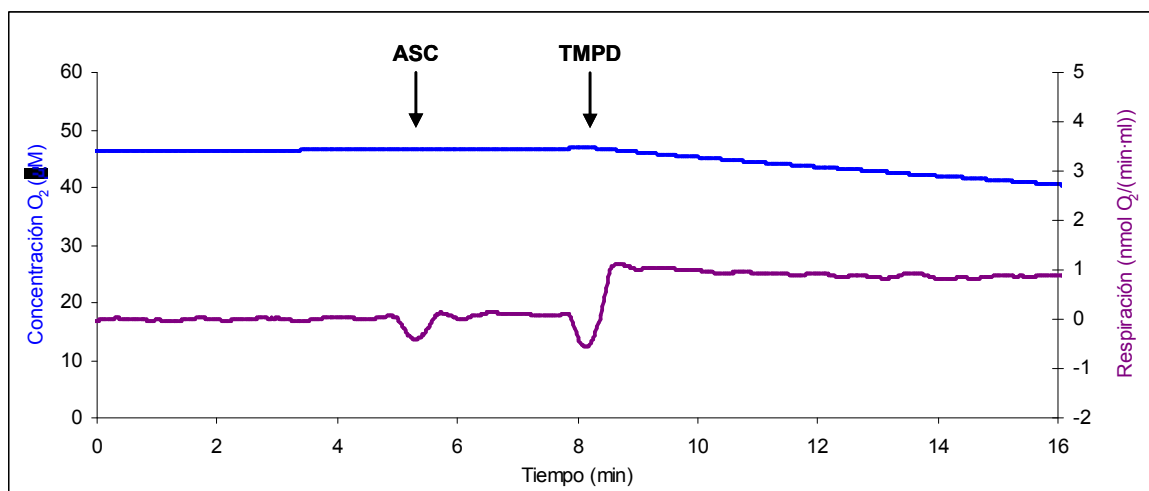


Figura M.6. Determinación del flujo de oxígeno tras la adición al medio de ascorbato (ASC, 2 mM) y TMPD (500 μM). La línea azul representa la concentración de oxígeno (μM) mientras que la línea morada representa el flujo (nmol O₂/(min·ml)).

Tras la adición de ascorbato y TMPD, el flujo medido fue de $0,74 \pm 0,04$ nmol/(min·ml). Este valor fue restado del valor de la respiración mitocondrial tras la adición de ascorbato y TMPD.

El valor de la respiración (nmol O₂/(min·mg de proteína)) fue determinado como el valor medio de la respiración a lo largo de 1 min tras la adición de cada uno de los sustratos. El estudio estadístico se realizó aplicando el test de la *t* de Student, considerándose estadísticamente significativas las diferencias con un valor de $p < 0,05$.

3.2.4. Determinación del consumo de oxígeno tras un proceso de anoxia-reoxigenación

Con la finalidad de determinar si la proteína UCP3 pudiera tener algún papel en la respuesta frente a un proceso de anoxia-reoxigenación, se realizó este estudio en mitocondrias aisladas a partir del corazón de ratones de tipo silvestre (WT, expresan la UCP3) y de mutantes que no expresan la UCP3 (KO).

El aislamiento de las mitocondrias se realizó según se ha descrito en el apartado 3.1.2.1 de esta sección de Materiales y Métodos. Tras determinar la concentración de proteínas, las mitocondrias se incubaron en medio KHE suplementado con 0,3% BSA a una concentración de 0,2 mg/ml de medio a 37°C.

Las mitocondrias fueron sometidas a un proceso de anoxia y reoxigenación. El protocolo aplicado fue el siguiente: inicialmente se añadió rotenona 5 μM y succinato 4 mM, y cuando la concentración de oxígeno de la cámara alcanzó el valor de 100 μM , se añadió ADP 1 mM. Tras consumirse la totalidad del oxígeno de la cámara, las mitocondrias fueron mantenidas en **anoxia durante 20 min**. Transcurrido este tiempo, se recogieron las mitocondrias, se lavaron mediante centrifugado (5 min a 4000 g) y posterior resuspensión en medio KHE fresco, y se volvieron a colocar en la cámara del respirómetro. Tras la reoxigenación de las mitocondrias y el cerrado de la cámara, se añadió de nuevo rotenona, succinato y ADP (a las mismas concentraciones anteriormente indicadas), y se esperó a que se volviera a consumir el oxígeno. Finalmente se determinaron los valores de la respiración ($\text{nmol O}_2/(\text{min}\cdot\text{mg de proteína})$) antes y después del proceso de anoxia-reoxigenación, tras la adición de succinato y tras la adición de ADP a 30 μM de oxígeno. El estudio estadístico se realizó aplicando el test de la t de Student, considerándose estadísticamente significativas las diferencias con un valor de $p < 0,05$.

3.3. MEDIDA DE LA CONDUCTANCIA DE LA MEMBRANA MITOCONDRIAL INTERNA A LOS PROTONES

3.3.1. Fundamento de la técnica

Cuando la ATP sintasa está inhibida, la tasa de respiración mitocondrial es proporcional a la tasa a la que los protones regresan a la matriz mitocondrial a través de la membrana mitocondrial interna. La respuesta cinética de la conductancia de la membrana mitocondrial interna a los protones en relación a su fuerza motriz (el potencial de membrana mitocondrial) puede ser medida, por tanto, como la relación entre la tasa de respiración y el potencial, al ir variando el potencial mediante la inhibición gradual de la cadena de transporte de electrones (Nicholls 1974; Brand 1990).

En nuestro laboratorio, la tasa de respiración y el potencial de membrana fueron medidos simultáneamente mediante un electrodo de oxígeno y un electrodo sensible al catión lipofílico

trifenilmetilfosfonio (TPMP⁺) (Brand 1995). Este catión atraviesa la membrana mitocondrial interna y se acumula en la matriz mitocondrial, debido al valor negativo del potencial de membrana en la matriz (Lieberman et al., 1969). Al variar el potencial de membrana, se producirá una variación en la cantidad de catión acumulado en el interior de la mitocondria, hasta alcanzarse un estado de equilibrio entre la concentración del catión en el interior y el exterior de la mitocondria. Este equilibrio en respuesta al potencial de membrana mitocondrial se puede determinar mediante la **ecuación de Nernst**, donde intervienen una serie de variables como la constante R (constante de los gases, 8,31 J/mol), el valor de T (temperatura absoluta en °K), la constante F (constante de Faraday, 96,406 J/V) y el logaritmo de la relación entre la concentración de un catión en el interior y el exterior de la mitocondria (Figura M.7).

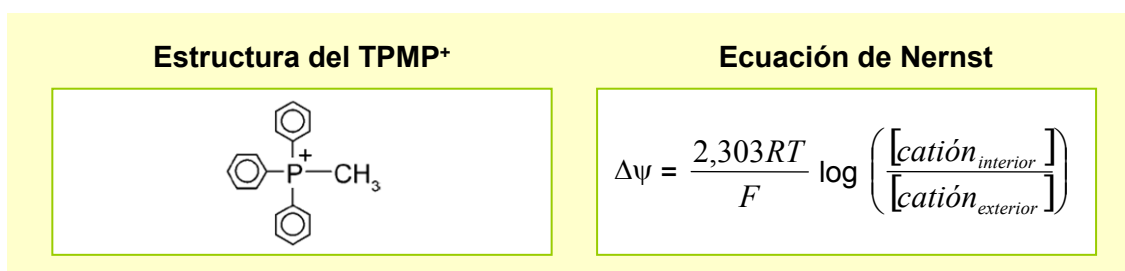


Figura M.7. Estructura química del TPMP⁺ y ecuación de Nernst aplicada al cálculo de un potencial ($\Delta\psi$).

Para la determinación de la cantidad de catión en el interior de la mitocondria es necesario tener en cuenta que el potencial de membrana mitocondrial produce una redistribución del catión dentro de la mitocondria, desde la superficie de la membrana externa hacia la superficie interna de la membrana interna, pero sin verse modificada la cantidad total de catión asociada al interior de la mitocondria (Ross et al., 2005). Por lo tanto, la cantidad constante de catión en la matriz mitocondrial se puede determinar aplicando un factor de corrección que tiene en cuenta el volumen mitocondrial y el grado de unión del TPMP⁺ a la membrana mitocondrial. El factor de corrección aplicado en nuestros estudios, tanto en las mitocondrias del tejido muscular esquelético como en las del corazón, fue de 0,35 (Rolfe et al., 1994).

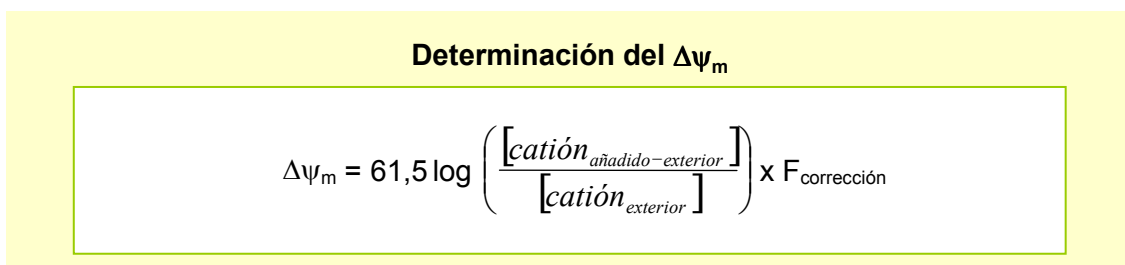


Figura M.8. Ecuación de Nernst aplicada al cálculo del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) a 37°C.

Una vez determinada la cantidad de catión en la matriz mitocondrial y en el medio extramitocondrial (mediante el electrodo de TPMP⁺), el potencial de membrana mitocondrial

puede ser calculado mediante la ecuación de Nernst (Brand 1995), donde el producto de $(2,303 \cdot R \cdot T / F)$ medido a 37°C tiene el valor de 61,5 (Figura M.8).

El electrodo de TPMP⁺ va asociado a un electrodo de referencia (CE2 pH electrode, Unicam) y ambos se introducen en la cámara del electrodo de oxígeno, que dispone de un sistema de agitación magnética (Rank Brothers Ltd) y se encuentra termostata a 37°C. Los tres electrodos se conectan a un sistema de adquisición de datos en tiempo real (PowerLab, ADInstruments) que permite su visualización y registro mediante el programa informático Chart 4.0 (ADInstruments).

El electrodo de oxígeno tipo Clark (Rank Brothers Ltd.) fue calibrado con medio KHE saturado de oxígeno (en equilibrio con el aire) y asumiendo que su contenido en oxígeno era de 406 nmol O/ml a 37°C (Reynafarje et al., 1985). El electrodo de TPMP⁺ fue calibrado mediante sucesivas adiciones de TPMP⁺ 0,5 μM hasta alcanzar una concentración final en el medio de 2,5 μM.

3.3.2. Protocolos utilizados

Los experimentos realizados con mitocondrias de tejido muscular se llevaron a cabo a 37°C con 0,35 mg de proteína/ml de KHE, mientras que los experimentos realizados con mitocondrias de corazón se llevaron a cabo a la misma temperatura con 0,25 mg de proteína/ml. En todos los casos, tras añadir las mitocondrias al medio de incubación, se añadió rotenona 5 μM (inhibidor del Complejo I), oligomicina 1 μg/ml (inhibidor de la ATP sintasa) y nigericina 100 nM (inhibidor del gradiente de pH). Salvo en los casos en los que específicamente se indica, los reactivos utilizados en estos experimentos fueron adquiridos de la casa comercial Sigma-Aldrich Chemical, eligiendo siempre los productos de la mayor pureza disponible.

3.3.2.1. Estudio del efecto del radical superóxido sobre la conductancia de la membrana mitocondrial interna a los protones

El efecto del superóxido se estudió generando este radical mediante la adición de xantina y xantina-oxidasa al medio de incubación de las mitocondrias (KHE). Inicialmente se suplementó el medio con xantina 50 μM y los inhibidores rotenona, oligomicina y nigericina. Seguidamente se añadieron 0,002 U ó 0,01 U (Echtay et al., 2002b) de xantina-oxidasa, enzima que cataliza la producción de superóxido a partir de la xantina y el oxígeno disueltos en el medio. A continuación se hicieron 5 adiciones de TPMP⁺ 0,5 μM a intervalos de 2 min hasta alcanzar una concentración de 2,5 μM. Tras la adición de succinato 4 mM (sustrato del Complejo II) se inhibió gradualmente la respiración con malonato (inhibidor competitivo de la oxidación del

succinato por la succinato deshidrogenasa) hasta alcanzar una concentración final en el medio de 0,457 mM. Finalmente se añadió FCCP (carbonilcianida-p-trifluorometoxifenilhidrazona) 0,2 μ M para disipar el potencial de membrana, liberar el TPMP⁺ al medio y de esta manera corregir la deriva del electrodo.

La especificidad de la activación inducida fue estudiada mediante la adición de inhibidores específicos de las UCPs (GDP 0,5 mM, preincubando 5 min) y del ANT (carboxiatractilósido 2,5 μ M, 1 min de preincubación; Calbiochem). Estos compuestos fueron añadidos tras la adición de los inhibidores (rotenona, oligomicina y nigericina), y previamente a la adición de xantina-oxidasa. En el listado siguiente aparecen reflejados los reactivos y concentraciones utilizados en estas determinaciones, ordenados según el momento de adición al medio de incubación que contenía xantina 50 μ M.

<u>Reactivo</u>	<u>Concentración</u>	<u>Tiempo de incubación</u>
Rotenona	5 μ M	-
Oligomicina	1 μ g/ml	-
Nigericina	100 nM	-
GDP	500 μ M	5 min
Carboxiatractilósido	2,5 μ M	1 min
Xantina-oxidasa	0,01 ó 0,002 U	1 min
TPMP ⁺ (x5 adiciones)	2,5 μ M	2 min entre cada adición
Succinato	4 mM	3 min
Malonato (x5 adiciones)	457 μ M	1 min entre cada adición
FCCP	0,2 μ M	1 min

3.3.2.2. Estudio del efecto del 4-hidroxinonenal sobre la conductancia de la membrana mitocondrial interna a los protones

En estos estudios se utilizó 4-hidroxinonenal (HNE) (Cayman Chemical) a la concentración de 35 μ M (Echtay et al., 2003). Este compuesto fue añadido al medio KHE tras la adición de los inhibidores (rotenona, oligomicina y nigericina) y, seguidamente, se hicieron 5 adiciones de TPMP⁺ 0,5 μ M a intervalos de 1 min hasta alcanzar una concentración de 2,5 μ M. Tras añadir succinato 4 mM se inhibió gradualmente la respiración con malonato hasta alcanzar una concentración final en el medio de 2,29 mM. Finalmente se añadió FCCP 0,2 μ M.

La especificidad de la activación inducida fue estudiada mediante la adición de inhibidores específicos de las UCPs (GDP 0,5 mM, preincubando 5 min) y del ANT (carboxiatractilósido 2,5

μM , 1 min de preincubación). Estos compuestos fueron añadidos tras los inhibidores rotenona, oligomicina y nigericina, y previamente a la adición de 4-hidroxinonenal. En el siguiente listado se reflejan los reactivos y concentraciones utilizados en estas determinaciones, ordenados según el momento de adición al medio de incubación.

<u>Reactivo</u>	<u>Concentración</u>	<u>Tiempo de incubación</u>
Rotenona	5 μM	-
Oligomicina	1 $\mu\text{g/ml}$	-
Nigericina	100 nM	-
GDP	500 μM	5 min
Carboxiatractilósido	2,5 μM	1 min
4-hidroxinonenal	35 μM	-
TPMP ⁺ (x5 adiciones)	2,5 μM	1 min entre cada adición
Succinato	4 mM	2 min
Malonato (x5 adiciones)	2,3 mM	1 min entre cada adición
FCCP	0,2 μM	1 min

3.3.2.3. Estudio del efecto del GDP y el carboxiatractilósido sobre la conductancia basal de la membrana mitocondrial interna a los protones

En las mismas condiciones, en medio KHE suplementado con BSA al 0,3% y en presencia de los inhibidores rotenona, oligomicina y nigericina, se determinó si la adición de GDP o carboxiatractilósido tenía algún efecto sobre la conductancia de la membrana mitocondrial interna a los protones en ausencia de los activadores superóxido y 4-hidroxinonenal. En el siguiente listado se reflejan los reactivos y las concentraciones utilizados en estas determinaciones, ordenados según el momento de adición al medio de incubación.

<u>Reactivo</u>	<u>Concentración</u>	<u>Tiempo de incubación</u>
Rotenona	5 μM	-
Oligomicina	1 $\mu\text{g/ml}$	-
Nigericina	100 nM	-
GDP	500 μM	5 min
Carboxiatractilósido	2,5 μM	1 min
TPMP ⁺ (x5 adiciones)	2,5 μM	1 min entre cada adición
Succinato	4 mM	2 min
Malonato (x5 adiciones)	2,3 mM	1 min entre cada adición
FCCP	0,2 μM	1 min

3.3.3. Análisis de los datos

Para calcular la cinética de la conductancia a los protones se representó la tasa de respiración (nmol O/(min·mg proteína)) frente al potencial de membrana (mV). En las figuras de la sección de Resultados, cada punto representa el valor medio \pm error estándar (SEM) obtenido a partir de, como mínimo, cuatro experimentos diferentes. Cada experimento fue realizado por duplicado, siguiendo un orden cronológico inverso con cada una de las curvas, con el fin de evitar el desplazamiento hacia la izquierda (mayor respiración frente a un mismo potencial de membrana) que se produce a lo largo del tiempo.

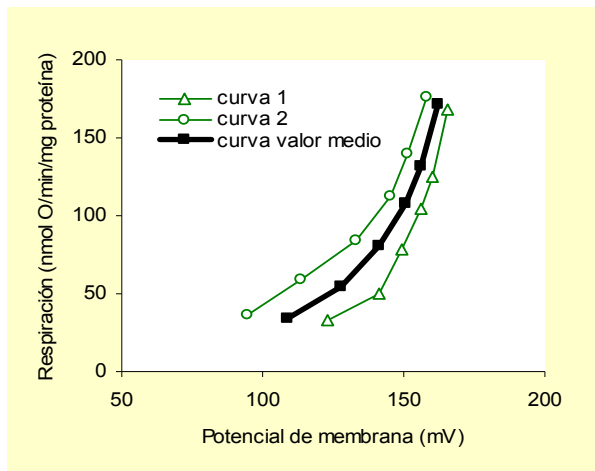


Figura M.9. En la figura de la izquierda puede observarse como, a partir de la misma preparación de mitocondrias, se obtienen dos curvas diferentes (una desplazada respecto de la otra) debido al transcurso de varias horas entre la realización de cada una de ellas.

Además de la representación gráfica de las curvas, se calculó el valor de la respiración a un determinado potencial de membrana con la finalidad de comparar y cuantificar las diferentes condiciones estudiadas: a los potenciales de 145 mV en las mitocondrias de músculo esquelético, y de 150 mV en las mitocondrias de corazón. Finalmente se realizó el estudio estadístico aplicando el test de la *t* de Student. Los valores de $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

3.4. DETECCIÓN DEL ÓXIDO NÍTRICO PRODUCIDO POR LA ÓXIDO NÍTRICO SINTASA MITOCONDRIAL Y ESTUDIO DE SUS EFECTOS SOBRE LA RESPIRACIÓN MITOCONDRIAL

3.4.1. Caracterización del protocolo utilizado: inducción de la óxido nítrico sintasa inducible y producción de óxido nítrico

Las mitocondrias utilizadas en este estudio fueron aisladas a partir del músculo esquelético de ratones C57BL6 inyectados con solución salina estéril (WT) o endotoxina a una dosis de 12 mg/kg de peso corporal (WT LPS), y en las mismas condiciones que las explicadas en el apartado 3.1.1.

Previamente al aislamiento se comprobó que la inoculación de endotoxina producía en estos animales un proceso inflamatorio que inducía la expresión de la iNOS en el músculo esquelético. Esta comprobación se realizó mediante la detección de la proteína iNOS por western blot (ver metodología en el apartado 2.2.3), así como mediante la detección de NO por microscopía confocal. Los experimentos de microscopía confocal se realizaron nada más sacrificar a los animales, a partir de pequeños fragmentos de músculo esquelético lavados con solución salina, e incubados durante 1 h a 37°C en una solución de PBS con los fluorocromos y a las concentraciones indicados en la Tabla M.6.

Fluorocromo	Concentración	Láser	λ de excitación
Hoescht-33342	10 μ g/ml	Diodo azul	405 nm
Ioduro de propidio	0,0001%	Argón	488 nm
DAF-FM	5 μ M	Argón	488 nm

Tabla M.6. Fluorocromos utilizados en los experimentos de microscopía confocal.

El **Hoescht-33342** se une a los ácidos nucleicos, por lo que la detección de su fluorescencia permite la localización de los núcleos de las fibras musculares. El **ioduro de propidio** (IP) tiñe los núcleos de las células cuya membrana está alterada, es decir, las células muertas. Por lo tanto, mediante el análisis de la fluorescencia emitida por este fluorocromo se determinó la viabilidad de las células utilizadas. La producción de NO se detectó con **DAF-FM diacetato**, un fluorocromo específico y sensible para NO (Nagano and Yoshimura 2002). Este compuesto es permeable a la membrana plasmática y, una vez dentro de la célula, es hidrolizado por las esterasas citosólicas para dar DAF-FM, que no es permeable y queda "atrapado" en el interior de la célula. En presencia de NO y oxígeno, el DAF-FM, que es relativamente poco fluorescente, se convierte en su forma triazólica, que es foto-estable y muy fluorescente. De este modo, la fluorescencia emitida resulta ser directamente proporcional a la concentración de NO.

La medida de la fluorescencia se realizó al terminar la incubación de 1 h a 37°C, directamente sobre las muestras de tejido con un microscopio confocal Radiance 2100 (Bio-Rad Laboratories) montado con un microscopio invertido Nikon TE300. La cuantificación de la fluorescencia emitida fue analizada con el programa informático Confocal Assistant 4.02 (Todd Clark Brelje).

Además de determinar que el tratamiento con LPS producía un aumento en la expresión de la iNOS y en la producción de NO en el tejido muscular, se comprobó la pureza de las

mitocondrias aisladas mediante el estudio por western blot de la expresión de las proteínas actina e iNOS en los extractos mitocondriales (ver apartado 2.2.3).

3.4.2. Detección del óxido nítrico producido por la óxido nítrico sintasa mitocondrial mediante la utilización de un electrodo de óxido nítrico

Inicialmente se determinaron las condiciones óptimas para la detección del óxido nítrico y sus efectos sobre la respiración comparando las medidas realizadas en un respirómetro convencional (Hansatech Instruments, Kyng's Lynn, Reino Unido) y en un respirómetro de alta resolución (Oxygraph-2k, Oroboros Instruments, Austria). Una vez determinadas estas condiciones (ver apartado 5 de Materiales y Métodos), se procedió a determinar la producción de óxido nítrico de mitocondrias aisladas a partir del músculo esquelético de ratones de tipo silvestre sin tratar (WT) y tratados con endotoxina a una dosis de 12 mg/kg de peso corporal (WT LPS), mediante un electrodo de NO ISO-NOP (World Precision Instruments Inc.) introducido en la cámara cerrada de un respirómetro de alta resolución.

Las mitocondrias fueron añadidas a la cámara a una concentración de 0,25 mg de proteína/ml de medio KHE con 0,3% de BSA a 37°C. Tras el cierre de la cámara se añadió tetrahidrobiopterina 10 μ M (4HB, el cofactor esencial en la función catalítica de las tres isoformas de la óxido nítrico sintasa), rotenona 5 μ M y succinato 4 mM, iniciándose la respiración mitocondrial. Cuando la concentración de oxígeno en la cámara fue de 60 μ M, se añadió L-arginina 1 mM. La producción de NO se estudió además en presencia de ADP 1 mM, añadido al medio previamente a la adición de L-arginina.

Estos experimentos se hicieron con ambos tipos de mitocondrias, procedentes de ratones WT y WT LPS, y en presencia y ausencia del inhibidor competitivo de la NOS, N-monometil-L-arginina (L-NMMA), a una concentración de 1 mM.

3.4.3. Detección del óxido nítrico producido por la óxido nítrico sintasa mitocondrial mediante el estudio de sus efectos sobre la respiración y el cálculo de la p_{50}

Simultáneamente al registro de la producción de NO con el electrodo ISO-NOP, se registró en el respirómetro Oroboros la concentración de oxígeno y la respiración mitocondrial. Inicialmente se determinó si la respiración mitocondrial resultaba inhibida por el NO mediante la medida del flujo a 30 y 10 μ M de oxígeno, en mitocondrias de músculo WT y WT LPS. A continuación, mediante el programa informático DatLab2 (Oroboros), se determinó si el NO ejercía algún efecto sobre el valor de la p_{50} de la respiración.

4. ESTUDIOS REALIZADOS EN CARDIOMIOCITOS NEONATALES DE RATA

Con la finalidad de determinar si la proteína UCP3 tiene algún papel en la respuesta frente a un proceso de anoxia-reoxigenación, se desarrolló un estudio similar al realizado en las mitocondrias de corazón en un modelo celular: cardiomiocitos neonatales de rata. En estas células se consiguió inducir la expresión de la proteína UCP3 mediante infección con lentivirus, y determinar si la expresión de esta proteína tenía algún efecto sobre la respiración celular tras un periodo de anoxia-reoxigenación.

4.1. AISLAMIENTO DE CARDIOMIOCITOS NEONATALES DE RATA

El aislamiento de cardiomiocitos se realizó a partir de corazones de ratas Wistar de 1-3 días de edad. Tras el sacrificio de los animales mediante decapitación, se procedió a la extracción, troceado y lavado con HBSS de los corazones, manteniéndolos en todo momento a 4°C.

En condiciones de esterilidad, los corazones se introdujeron en tubos que contenían 1 ml de HBSS y 50 U de colagenasa tipo II (Worthington Biochemical Corporation). Estos tubos se incubaron durante 15 min a 37°C mientras eran agitados a 1100 rpm (Thermomixer, Eppendorf). El medio resultante de este proceso fue depositado en otro tubo al que se añadió medio CM compuesto por 21% de medio M199 (Gibco BRL), 64% de DMEM (Gibco BRL), 1% de penicilina-estreptomicina (Gibco BRL), 9% de suero fetal equino (Gibco BRL), 4% de suero fetal bovino (Seratech) y 1% de HEPES (Gibco BRL), hasta completar un volumen final de 10 ml. A continuación, con la finalidad de retirar la colagenasa, se centrifugó este tubo durante 4 min a 130 g y temperatura ambiente. Se retiró el sobrenadante y los cardiomiocitos del sedimento fueron resuspendidos en 3 ml de medio CM y mantenidos a 37°C. El sedimento con los restos de corazón que no fueron digeridos en la incubación inicial con colagenasa se volvió a trocear y se sometió a una segunda digestión con una concentración de la enzima de 75 U/ml, en las mismas condiciones que la digestión inicial. Los cardiomiocitos así obtenidos fueron resuspendidos en 3 ml de medio CM y mantenidos a 37°C. Finalmente, el sedimento obtenido tras la segunda digestión fue troceado e incubado una tercera vez con colagenasa a una concentración de 100 U/ml. El sobrenadante obtenido tras esta incubación fue procesado de la misma manera que el obtenido en las dos digestiones anteriores. Los cardiomiocitos se resuspendieron en 3 ml de medio CM y fueron mantenidos a 37°C.

4.2. PRE-CULTIVO PARA LA ELIMINACIÓN DE FIBROBLASTOS

Con el fin de eliminar en lo posible el crecimiento de fibroblastos en el cultivo de cardiomiocitos, se realizó un pre-cultivo. Para ello, en una placa p100 se depositaron los 3 ml de suspensión

celular suplementado con 1 ml más de medio CM. A continuación se incubó la placa a 37°C en un incubador con CO₂ al 5% durante 45 min. Durante este tiempo, se estimó que los fibroblastos se adherieron a la placa mientras que la mayoría de los cardiomiocitos permanecieron en suspensión. Pasado este tiempo se recogió el medio y se depositó en una placa p100 nueva, y se incubó nuevamente durante 45 min a 37°C y en atmósfera de 5% CO₂. Tras finalizar esta incubación, se recogió el medio y se centrifugó durante 4 min a 130 g. El sedimento con los cardiomiocitos fue resuspendido en 3 ml de medio CM. A continuación, utilizando una cámara de Neubauer, se determinó el número de cardiomiocitos aislados por ml además de su porcentaje de viabilidad con una tinción 1:4 con azul tripán 0,2%.

Tras tratar con gelatina al 0,1% cada uno de los pocillos de una placa p6, se sembraron 750000 cardiomiocitos en cada pocillo. A continuación se añadieron 2 ml de medio CM y 10 µg/ml de mitomicina C (Sigma-Aldrich Chemical) con la finalidad de inhibir el crecimiento de los fibroblastos. Se incubó la placa p6 durante 4 h a 37°C y en atmósfera al 5% de CO₂. Transcurrido este tiempo se retiró el medio y se sustituyó por medio fresco con la finalidad de eliminar la mitomicina. En este punto también se realizó la transfección de los cardiomiocitos (ver apartado 4.4.) para conseguir la expresión de la proteína UCP3, permitiendo así el estudio de la implicación de esta proteína en los procesos de anoxia-reoxigenación.

4.3. DETECCIÓN ESPECÍFICA DE CARDIOMIOCITOS MEDIANTE INMUNOFLORESCENCIA

Con el fin de confirmar que el aislamiento de cardiomiocitos se había obtenido con un grado de pureza adecuado, se realizó un marcaje específico para cardiomiocitos que permitió la identificación de este tipo celular mediante inmunofluorescencia.

En un pocillo de la placa p6 se añadió como fijador paraformaldehído al 4% en PBS y se incubó a temperatura ambiente durante 15 min. Tras lavar repetidas veces con PBS se bloqueó el pocillo incubando 1 h a temperatura ambiente con una solución de PBS suplementada con 2% de suero de caballo, 0,1% de tritón y 2% de albúmina sérica bovina (solución de bloqueo). Tras el bloqueo se incubó durante 1 h a temperatura ambiente con el anticuerpo primario anti- α -actinina (Sigma-Aldrich Chemical) a una concentración de 1:1000 en solución de bloqueo. A continuación se hicieron 3 lavados con solución de bloqueo y se incubó con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón (Molecular Probes, Invitrogen) a una concentración de 1:500, también en solución de bloqueo. Se volvió a lavar 3 veces con PBS y se incubó con el fluorocromo Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich Chemical) a una concentración de 0,25 ng/ml, durante 20 min y en oscuridad. Este compuesto se une al ADN de doble cadena permitiendo la identificación del núcleo de los diferentes tipos celulares presentes en el pocillo.

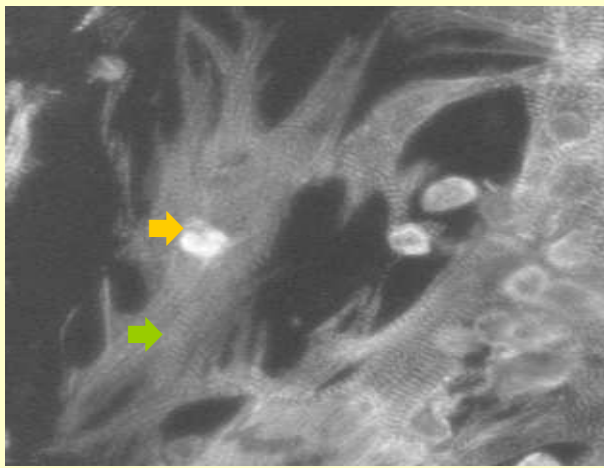


Figura M.10. Inmunofluorescencia específica de cardiomiocitos marcados con el anticuerpo anti- α -actinina

- ➔ Marcaje con Hoechst 33258 (núcleo)
- ➔ Marcaje con α -actinina (citoplasma)

Seguidamente, se volvió a lavar con PBS, se añadió una gota de medio de montaje especial para fluorescencia (Vectashield, Vector Laboratories Inc), y se cubrió con un cubreobjetos antes de su observación en el microscopio de fluorescencia (Figura M.10).

Mediante esta técnica se visualizaron los cardiomiocitos marcados específicamente con actinina, y se pudo contrastar su número en referencia al total de células existentes en el pocillo, determinado a través del número de núcleos teñidos.

4.4. TRANSFECCIÓN DE CARDIOMIOCITOS

La transfección de cardiomiocitos se realizó mediante infección con lentivirus. Estos virus contenían en su interior la secuencia de ADN que codifica la proteína UCP3, por lo que al integrarse en el genoma de los cardiomiocitos se consiguió la expresión de la misma.

4.4.1. Obtención de lentivirus

Los lentivirus fueron obtenidos tras la transfección de la línea celular HEK 293 (células embrionarias humanas de riñón) con tres plásmidos amablemente cedidos por el Dr. Daniel Sanchís, del Departamento de Ciencias Médicas Básicas de la Universidad de Lérida:

psPAX2 - contiene todas las proteínas necesarias para el empaquetamiento del virus

pMD2G - codifica la cápside del virus

pEIGW - contiene el material genético que se quiere expresar en los cardiomiocitos infectados (el gen *ucp3*)

El plásmido pEIGW lleva insertado el gen que codifica para la isoforma de la UCP3 presente en la rata (Gen Bank:NM_013167). Las secuencias de los cebadores utilizados para amplificar dicho gen fueron: UCP3Sb *sentido*: 5'-AAGAATTCAAAGGAACCAGGCCATC-3', y UCP3Sb

antisentido: 5'-AATCTAGAGGCCTGCTTGCCTTG-3'. Además, este plásmido codifica una proteína fluorescente (green fluorescence protein, GFP), de modo que se puede comprobar el éxito de la transfección gracias a la fluorescencia emitida por la célula transfectada, que es detectada con un microscopio de fluorescencia.

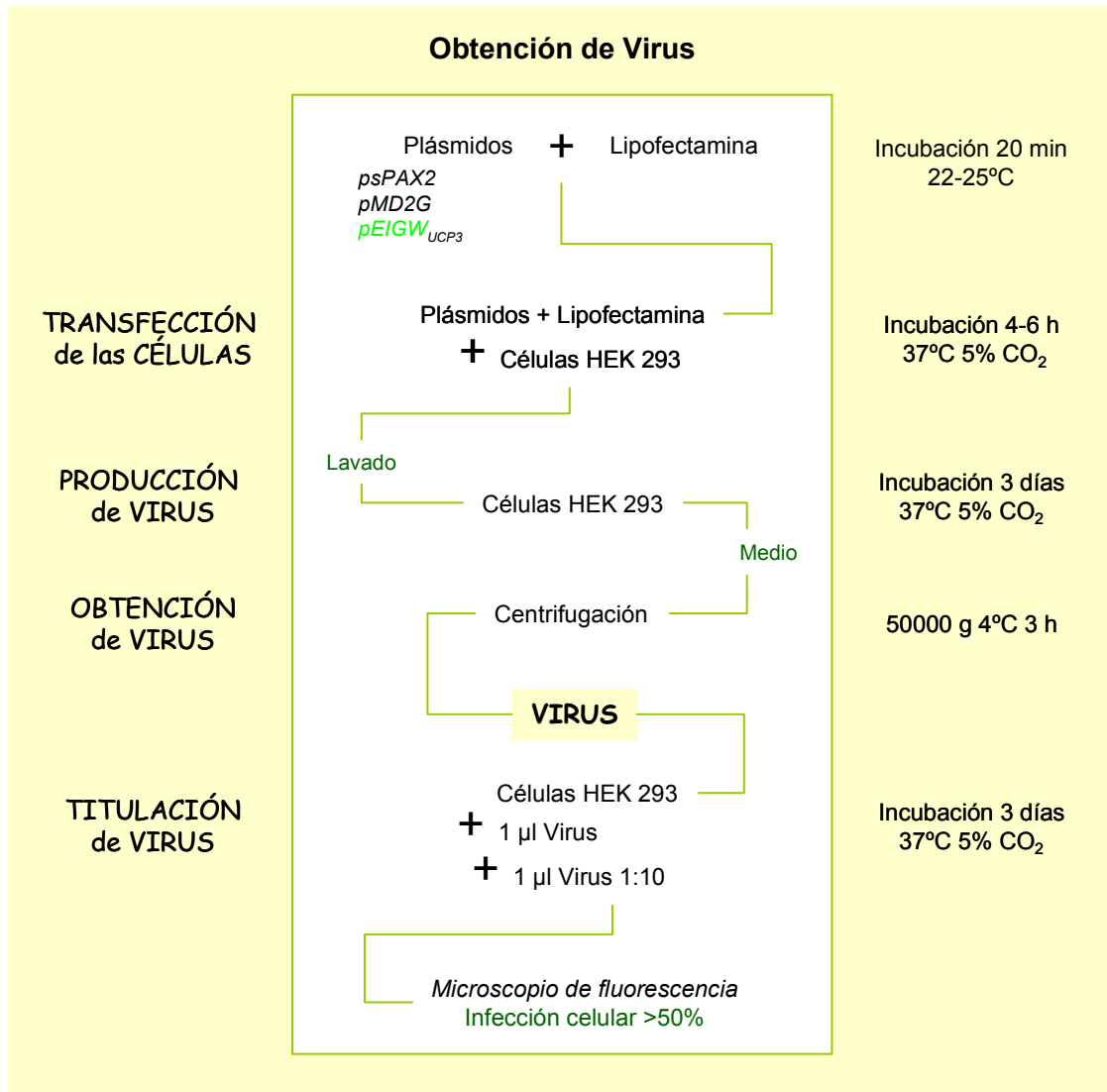


Figura M.11. Esquema del protocolo utilizado en la obtención de lentivirus.

La transfección de las células HEK 293 se realizó en placas p100 pre-tratadas con gelatina al 0,1% en las que el día anterior se sembraron 5×10^6 células por placa. Estas placas fueron incubadas con medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino, 1% de penicilina-estreptomicina y 1% de piruvato. El día de la transfección se retiró el medio y se añadió de nuevo DMEM con 1% de piruvato que no contenía suero ni antibióticos. Se incubó en estas condiciones a 37°C durante 1 h. Transcurrida esta incubación se preparó para cada placa p100 una mezcla con 7 µg del plásmido pMD2G, 13 µg del plásmido psPAX2 y 20 µg del plásmido

pEIGW. Esta mezcla se incubó en 1,5 ml de DMEM durante 5 min a temperatura ambiente. Por otro lado, también en 1,5 ml de DMEM, se diluyó el volumen de lipofectamina (Lipofectamine 2000, Invitrogen) necesario para la transfección, según la relación: $\mu\text{g de ADN} = 2 \times \mu\text{l de lipofectamina}$. Este compuesto es un lípido catiónico que encapsula al ADN y que interacciona con la membrana plasmática de la célula, entrando en su interior.

Tras la preparación de ambas mezclas por separado, se juntaron en un solo tubo y se incubaron durante 20 min a temperatura ambiente. A continuación, se añadió la mezcla resultante (3 ml) a la placa p100 y se incubó durante 4-6 horas a 37°C y 5% de CO₂. Transcurrido este tiempo se retiró el medio con ADN y lipofectamina, y se añadió DMEM con suero, antibióticos y piruvato. En estas condiciones se incubaron las placas durante 3 días para permitir la producción de virus.

Tras la incubación, se recogió el medio de las placas y, con la finalidad de eliminar los restos celulares que pudiera haber en suspensión, se centrifugó a 1260 g durante 5 min a 4°C y se pasó por un filtro de 0,45 μm . Finalmente, para concentrar los virus en un volumen menor, se centrifugó el sobrenadante a 50000 g en una ultracentrífuga (Beckman-Coulter Optima L-100 XP) durante 3 h y a 4°C. Los virus depositados en el sedimento fueron resuspendidos en 100 μl de PBS suplementado al 1% con albúmina sérica bovina y guardados a -80°C hasta su posterior utilización.

Para la comprobación del correcto estado de los virus obtenidos se hizo una titulación mediante la infección de células HEK 293. Para ello, se sembraron 2 pocillos de una placa p24 con 30000 células en cada uno. En uno de los pocillos se añadió 1 μl de la suspensión de virus, mientras que en el otro pocillo se añadió 1 μl de una dilución 1:10. Las células infectadas fueron incubadas en medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino, 1% de penicilina-estreptomicina y 1% de piruvato, a 37°C y en atmósfera al 5% de CO₂. Transcurridas 72 h, se determinó que los virus obtenidos se encontraban en buen estado si, al observar las células con el microscopio de fluorescencia, el porcentaje de infección celular era superior al 50% en el pocillo infectado con la dilución 1:10.

4.4.2. Infección de cardiomiocitos

Para la infección de los cardiomiocitos se utilizaron 12 μl de la suspensión viral por cada pocillo de una placa p6, con la finalidad de obtener un nivel de expresión de la proteína UCP3 similar al observado en el corazón de rata adulta. En las mismas condiciones también se infectaron cardiomiocitos con el vector vacío (sin ningún inserto), que fueron considerados cardiomiocitos control, puesto que a partir de ellos se determinaron los valores basales de respiración de estas células.

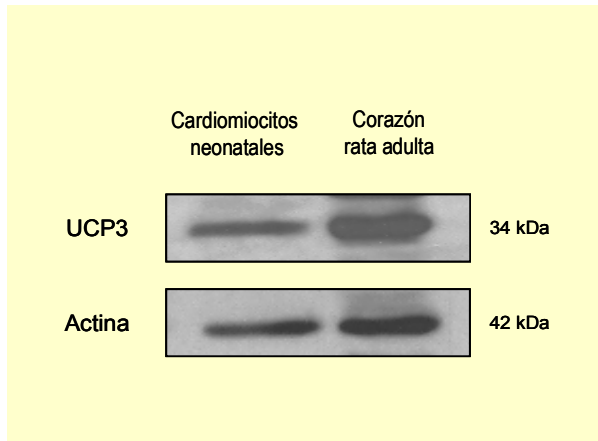


Figura M.12. El nivel de expresión de la proteína UCP3 en los cardiomiocitos neonatales de rata infectados con 12 μ l de suspensión viral es similar al nivel de expresión de esta proteína en el corazón de rata adulta. El western blot de esta figura fue realizado utilizando 15 μ g de proteína y según se explica en el apartado 2.2 de la sección de Materiales y Métodos.

Los cardiomiocitos fueron infectados con los lentivirus el mismo día de su aislamiento, cuando su adhesión a la placa p6 aun no era completa. Tras la infección (48 h), los cardiomiocitos se incubaron en medio CM durante 4 días a 37°C y en atmósfera al 5% de CO₂, realizando cada dos días un cambio del medio de incubación.

4.5. DETERMINACIÓN DEL CONSUMO DE OXÍGENO TRAS UN PROCESO DE ANOXIA-REOXIGENACIÓN

Los cardiomiocitos fueron infectados con el gen *ucp3*, como se ha descrito en el apartado anterior y, a los 4 días tras la infección de 48 h, se lavaron los pocillos de la placa p6 con 1 ml de HBSS y se trataron con 150 μ l de tripsina durante 5 min. A continuación se añadió 1 ml de medio CM en cada pocillo para neutralizar la tripsina. Los cardiomiocitos de tres pocillos se recogieron y se centrifugaron a 130 g durante 4 min. Finalmente, se resuspendieron en HBSS suplementado con HEPES 25 mM y se determinó su concentración.

El consumo de oxígeno se determinó mediante respirometría de alta resolución (Oroboros Oxygraph-2k) a 37°C. Las medidas se realizaron simultáneamente en las dos cámaras del respirómetro, poniendo en una de las cámaras cardiomiocitos transfectados con el vector de expresión de la proteína UCP3 y en la otra cardiomiocitos transfectados con el mismo vector sin inserto. Cuando los cardiomiocitos consumieron todo el oxígeno de la cámara, fueron mantenidos en **anoxia durante 20 min** y, a continuación, se reabrió la cámara permitiendo la entrada de oxígeno y la reoxigenación de los mismos. Seguidamente se volvió a cerrar la cámara y se observó cómo los cardiomiocitos infectados consumían nuevamente el oxígeno de la cámara. Finalmente, se determinó el valor de la respiración a la concentración de 30 μ M de oxígeno, previa y posteriormente al periodo de anoxia-reoxigenación.

5. ESTUDIO INSTRUMENTAL COMPARATIVO ENTRE UN RESPIRÓMETRO CONVENCIONAL Y UN RESPIRÓMETRO DE ALTA RESOLUCIÓN

5.1. MEDIDA DEL FLUJO DE OXÍGENO INSTRUMENTAL

Con la finalidad de comparar el flujo de oxígeno instrumental en un respirómetro convencional (Hansatech Instruments) y en un respirómetro de alta resolución (Oxygraph-2k, Oroboros Instruments), se determinó el flujo de oxígeno a las concentraciones aproximadas de este gas de 172 μM , 100 μM , 50 μM y 25 μM .

La cámara de ambos respirómetros se mantuvo a una temperatura constante de 37°C con HBSS (1 ml en el respirómetro Hansatech y 2 ml en el respirómetro Oroboros). Tras la estabilización de la señal del flujo se cerraron ambas cámaras y se mantuvieron 20 min en estas condiciones. Transcurrido este tiempo se reabrieron las cámaras para gasear con nitrógeno el HBSS y bajar la concentración de oxígeno hasta 100 μM . Se volvieron a cerrar las cámaras y se esperó 20 min. El proceso se repitió dos veces más, para bajar la concentración de oxígeno a 50 μM y 25 μM .

Al final de estos cuatro periodos de 20 min, se midió el flujo y la concentración de oxígeno, y se representaron estos valores en una gráfica que relaciona ambas variables. Mediante el cálculo de la recta definida por estos puntos se pudo determinar el flujo de oxígeno instrumental en ambos respirómetros en todo el rango de concentraciones de oxígeno.

5.2. MEDIDA DE LA PRODUCCIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO

5.2.1. Calibración del electrodo de óxido nítrico

Las medidas de óxido nítrico (NO) se realizaron con un electrodo ISO-NOP (World Precision Instruments Inc.) calibrado a 37°C con concentraciones conocidas de NaNO_2 en condiciones reductoras ($\text{KI}/\text{H}_2\text{SO}_4$). A partir de los pA registrados por el electrodo y las concentraciones conocidas de NO, se elaboró una recta de calibración del tipo: $\text{pA} = \mathbf{b}[\text{NO}] + \mathbf{a}$, que permitió la cuantificación de la producción de NO extrapolando los valores de pA medidos en dicha recta de calibración.

Inicialmente se evaluaron dos factores que podrían afectar a las medidas de NO: en primer lugar, el **estado de la cámara** (abierta o cerrada) y, en segundo lugar, la **concentración de oxígeno** a la que se realizan las medidas de NO.

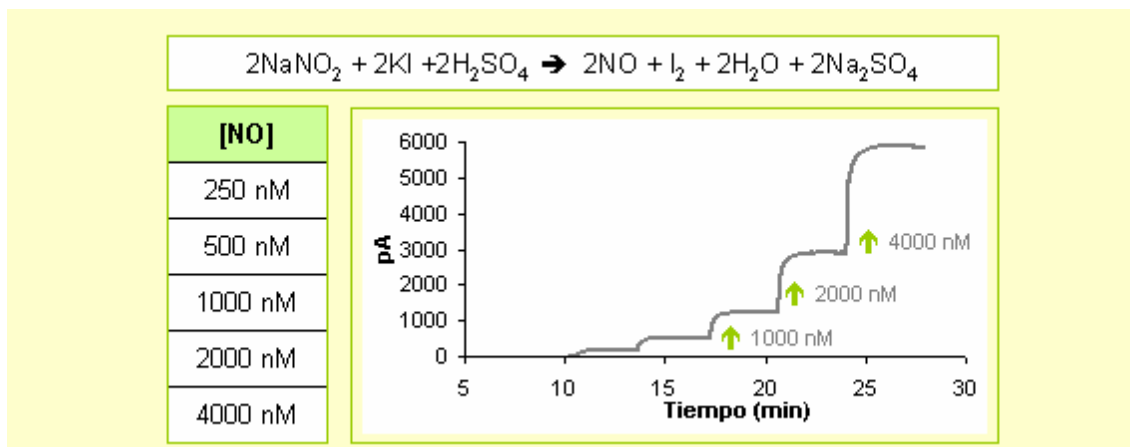


Figura M.13. Calibración del electrodo de NO. Con cada adición de NaNO_2 se genera en el medio una concentración de NO (tabla de la izquierda) proporcional al incremento de la señal eléctrica (pA) recogida por el electrodo de NO (gráfico de la derecha).

Para estudiar el efecto del estado de la cámara, se calibró el electrodo de NO en el respirómetro Hansatech, en un volumen de 1 ml y a 37°C . Las medidas con la cámara abierta y cerrada se realizaron en el mismo día y utilizando las mismas soluciones de calibrado.

Para la determinación de la influencia de la concentración de oxígeno en las medidas de NO, se calibró el electrodo de NO en el respirómetro Hansatech con la cámara cerrada a dos concentraciones diferentes de oxígeno: 21% y 7%. La concentración de oxígeno al 7% fue obtenida tras gasear el medio con argón durante varios minutos. Las medidas en ambas condiciones se realizaron en el mismo día y utilizando las mismas soluciones de calibrado.

Posteriormente, se compararon los valores de la calibración obtenidos en ambos respirómetros, Hansatech y Oroboros. Se determinaron los valores de pA tras la adición de NaNO_2 (valor máximo de pA) y también transcurridos 5 min desde esta adición, para determinar si la señal obtenida se mantenía constante a lo largo del tiempo. Las comparaciones se hicieron con las cámaras cerradas a 37°C , en un volumen de 1 ml en el respirómetro Hansatech y de 2 ml en el respirómetro Oroboros. Las medidas se realizaron en el mismo día en ambos respirómetros, utilizando las mismas soluciones de calibrado.

5.2.2. Cuantificación de la producción de óxido nítrico

En cada uno de los respirómetros (con la cámara cerrada) se midió la producción de NO generado químicamente con un donador de NO, en concreto DETA-NO $80 \mu\text{M}$ (Alexis Biochemicals) en medio HBSS, y también con un sistema celular de producción endógena de NO regulado por tetraciclina (células Tet-iNOS 293, (Mateo et al., 2003)). En este sistema, las células (10^7 células/ml) fueron tratadas con una dosis de 40 ng/ml de tetraciclina, y se

determinó la producción de NO tras la adición del sustrato de la iNOS, L-arginina (1 mM), en medio HBSS suplementado con 25 mM de HEPES.

Las medidas se realizaron en el mismo día en ambos respirómetros y se determinó la recta de calibración para cada uno de ellos utilizando las mismas soluciones de calibrado. La cuantificación de la producción de NO registrada por el electrodo se realizó aplicando la recta de calibración obtenida en cada respirómetro.

5.2.3. Determinación de la inhibición de la respiración celular por el óxido nítrico

Utilizando la línea celular Tet-iNOS 293 se calculó la inhibición de la respiración inducida por el NO a concentraciones fisiológicas de oxígeno (30 μ M). Para ello, se utilizaron células control (sin tratamiento con tetraciclina) y células tratadas con 40 ng/ml de tetraciclina que se dispusieron en ambos respirómetros a una concentración de 10^7 células/ml en HBSS suplementado con 25 mM de HEPES.

En las células control no se adicionó L-arginina (determinación de la **respiración basal**), mientras que en las células tratadas con 40 ng/ml de tetraciclina se adicionó L-arginina 1 mM a la concentración de oxígeno de 60 μ M (determinación de la **respiración en presencia de NO**). En ambas condiciones se determinó el valor de la respiración a concentraciones fisiológicas de oxígeno (30 μ M) en los dos respirómetros. A partir de estos datos se calculó el porcentaje de inhibición de la respiración celular inducida por el NO. Todas las medidas se realizaron en ambos respirómetros en el mismo día, utilizando los mismos reactivos y suspensiones celulares.

En todos los casos (apartado 5.2 de la sección de Materiales y Métodos), el estudio estadístico se realizó aplicando el test de la *t* de Student, considerándose estadísticamente significativas las diferencias con un valor de $p < 0,05$.

RESULTADOS

1. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE LA UCP3, LA UCP2 Y EL ANT

1.1. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE *UCP3*, *UCP2*, *ANT1* Y *ANT2* EN RATONES DE TIPO SILVESTRE

1.1.1. Expresión génica de *ucp3* tras la inoculación de endotoxina

La primera aproximación realizada en nuestro estudio fue determinar el periodo de incubación necesario para que al inocular a los ratones de tipo silvestre (WT) una dosis de endotoxina (LPS) de 12 mg/kg de peso corporal se obtuviese una clara inducción de la proteína UCP3.

A pesar de que los niveles de expresión de una proteína no se correlacionan estrictamente con los niveles de expresión de su ARNm, la cuantificación de los niveles de expresión del ARNm de la UCP3 mediante RT-PCR nos permitió hacer una primera estimación del tiempo de incubación necesario desde la inoculación de LPS hasta la detección de cambios significativos en los niveles de expresión de la proteína. Por lo tanto, en el tejido muscular esquelético y el corazón se determinó la variación en los niveles de expresión génica de *ucp3* tras la inoculación de LPS en un rango de tiempo de 0 (control) a 24 horas.

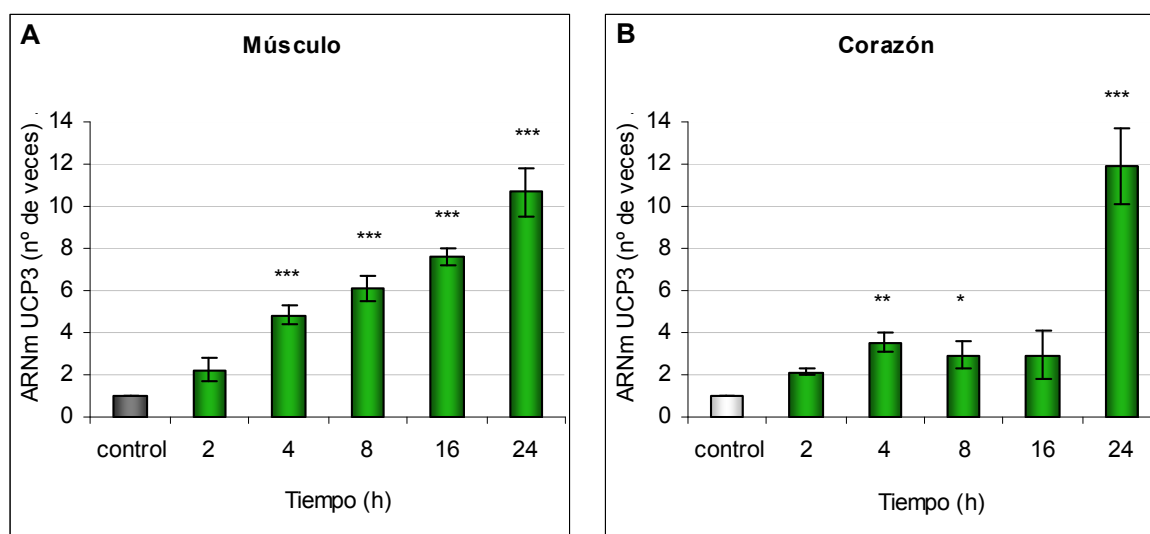


Figura R.1. Niveles de expresión del ARN de la UCP3 a lo largo del tiempo tras la inoculación de LPS (12 mg/kg) en el músculo esquelético (A) y el corazón (B). Valor medio \pm SEM (n=7) respecto de los valores obtenidos para las muestras control, a las que se les asignó el valor arbitrario 1. Diferencias significativas respecto de las muestras control (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$).

Los resultados obtenidos fueron normalizados respecto de los niveles de expresión del ARN de β -actina, y su representación gráfica se realizó respecto de los valores obtenidos para las muestras control, a las que se les asignó el valor arbitrario 1. En ambos tejidos, la inoculación de LPS indujo a lo largo del tiempo un aumento en la expresión génica de *ucp3*, obteniéndose a las **24 horas** el mayor nivel de expresión de este gen (Figura R.1).

1.1.2. Expresión génica de *ucp2*, *ant1* y *ant2* tras la inoculación de endotoxina

En estas mismas muestras de ARNm de músculo y corazón se determinaron los niveles de expresión génica de otros transportadores de la membrana mitocondrial interna como la UCP2, el ANT1 y el ANT2. Los resultados obtenidos fueron normalizados respecto de los niveles de expresión del ARN de β -actina, y su representación se realizó respecto de los valores obtenidos para las muestras control, a las que se les asignó el valor arbitrario 1 (Figura R.2).

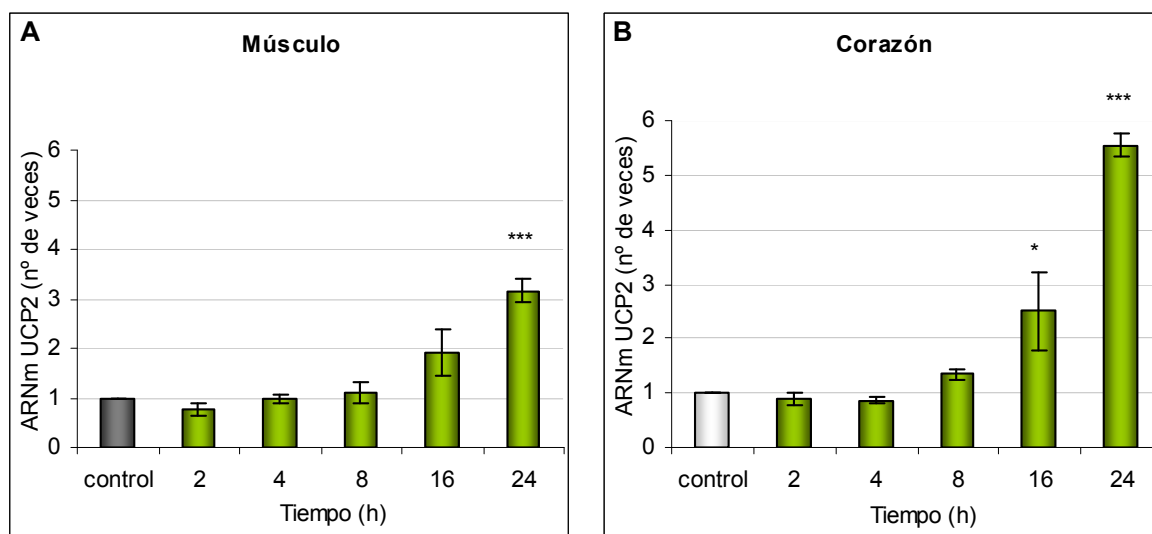


Figura R.2. Niveles de expresión del ARN de la UCP2 a lo largo del tiempo tras la inoculación de LPS (12 mg/kg) en el músculo esquelético (A) y el corazón (B). Valor medio \pm SEM (n=7) respecto de los valores obtenidos para las muestras control, a las que se les asignó el valor arbitrario 1. Diferencias significativas respecto de las muestras control (*, p<0,05; ***, p<0,001).

Como se observa en la Figura R.2, la expresión del ARNm de *ucp2* también aumentó en ambos tejidos con la inoculación de LPS. Sin embargo, este aumento fue menor en relación al aumento observado en la expresión génica de *ucp3*.

En el músculo esquelético, a las 24 h tras la inoculación de LPS, el aumento en la expresión génica de *ucp3* fue más de 3 veces superior al observado en *ucp2*, mientras que en el corazón el aumento en la expresión génica de *ucp3* a las 24 h fue de aproximadamente 2 veces superior al observado en *ucp2*.

Por otro lado, la expresión génica de *ant1* y *ant2* en el músculo esquelético y el corazón no se vio afectada por la inoculación de LPS en los intervalos de tiempo estudiados (Figura R.3).

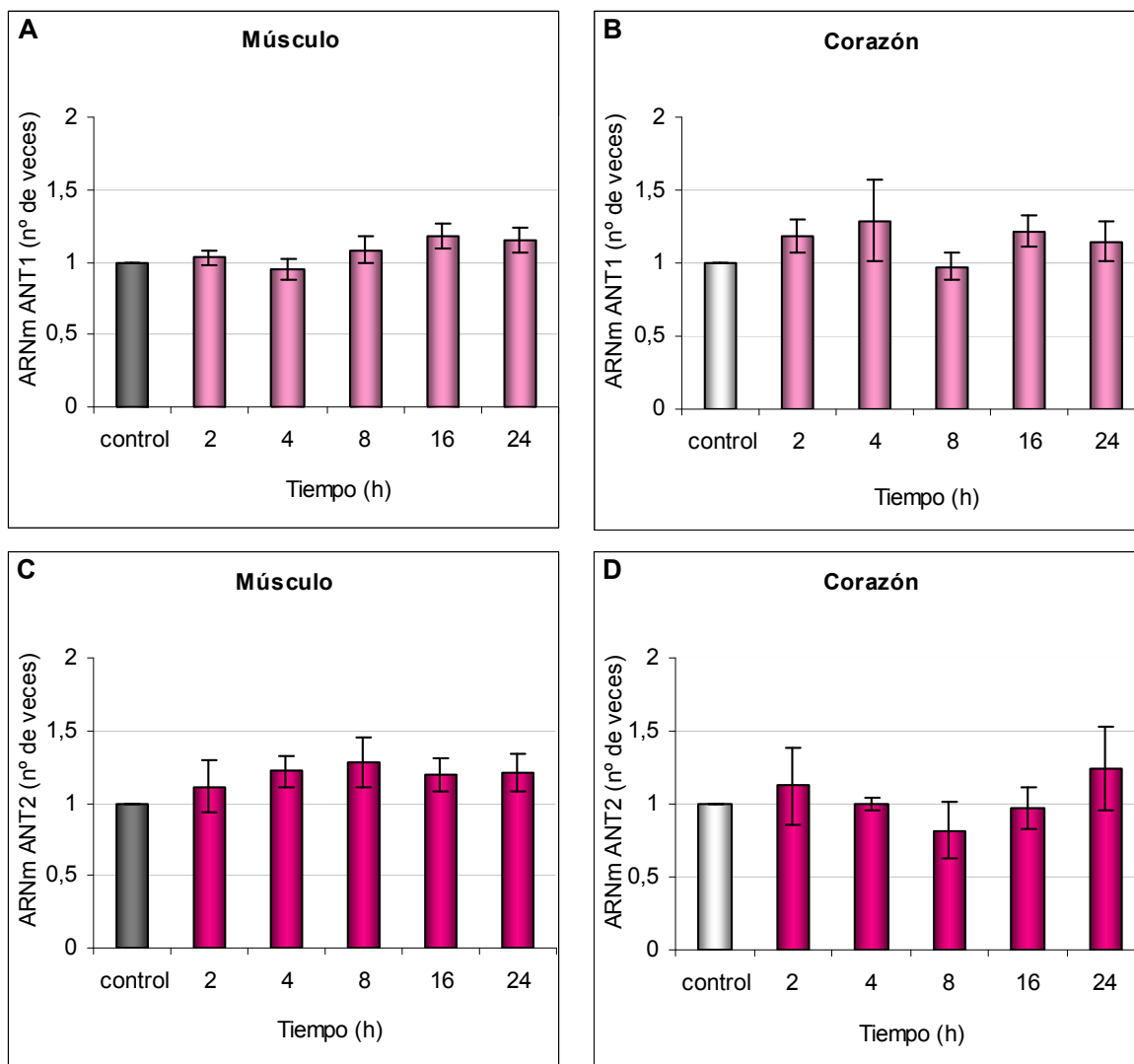


Figura R.3. Niveles de expresión del ARN de ANT1 a lo largo del tiempo tras la inoculación de LPS (12 mg/kg) en el músculo esquelético (A) y el corazón (B), así como del ANT2 en el músculo esquelético (C) y el corazón (D). Valor medio \pm SEM (n=7) respecto de los valores obtenidos para las muestras control, a las que se les asignó el valor arbitrario 1. No se detectaron diferencias estadísticamente significativas.

1.2. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE *UCP3*, *UCP2*, *ANT1* Y *ANT2* EN RATONES MUTANTES *UCP3KO*

Dentro del rango de tiempo estudiado (0 a 24 h), en los animales de tipo silvestre, la inoculación de una dosis de LPS de 12 mg/kg inducía a las **24 h** de incubación el mayor aumento en la expresión génica de *ucp3* (Figura R.1). Por lo tanto, en los animales mutantes, se decidió determinar en condiciones basales (KO) y tras 24 h desde la inoculación de la endotoxina (KO LPS), las variaciones en la expresión génica de *ucp2*, *ant1* y *ant2*. Los resultados obtenidos fueron normalizados respecto de los niveles de expresión del ARN de β -actina y su representación gráfica se realizó respecto de los valores obtenidos para las muestras WT, a las que se les asignó el valor arbitrario 1.

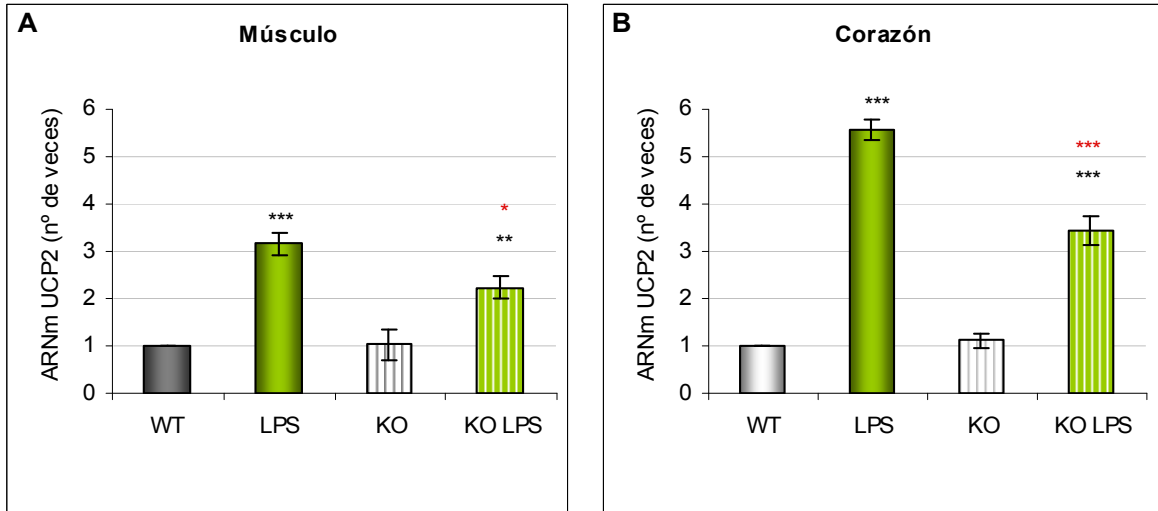


Figura R.4. Niveles de expresión del ARN de la UCP2 a las 24 horas tras la inoculación de LPS (12 mg/kg) en animales WT y KO, en el músculo esquelético (A) y el corazón (B). Valor medio \pm SEM (n=7) respecto de los valores obtenidos para las muestras WT, a las que se les asignó el valor arbitrario 1. Diferencias significativas respecto a WT (**, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$). Diferencias significativas respecto a KO (*, $p < 0,05$; ***, $p < 0,001$).

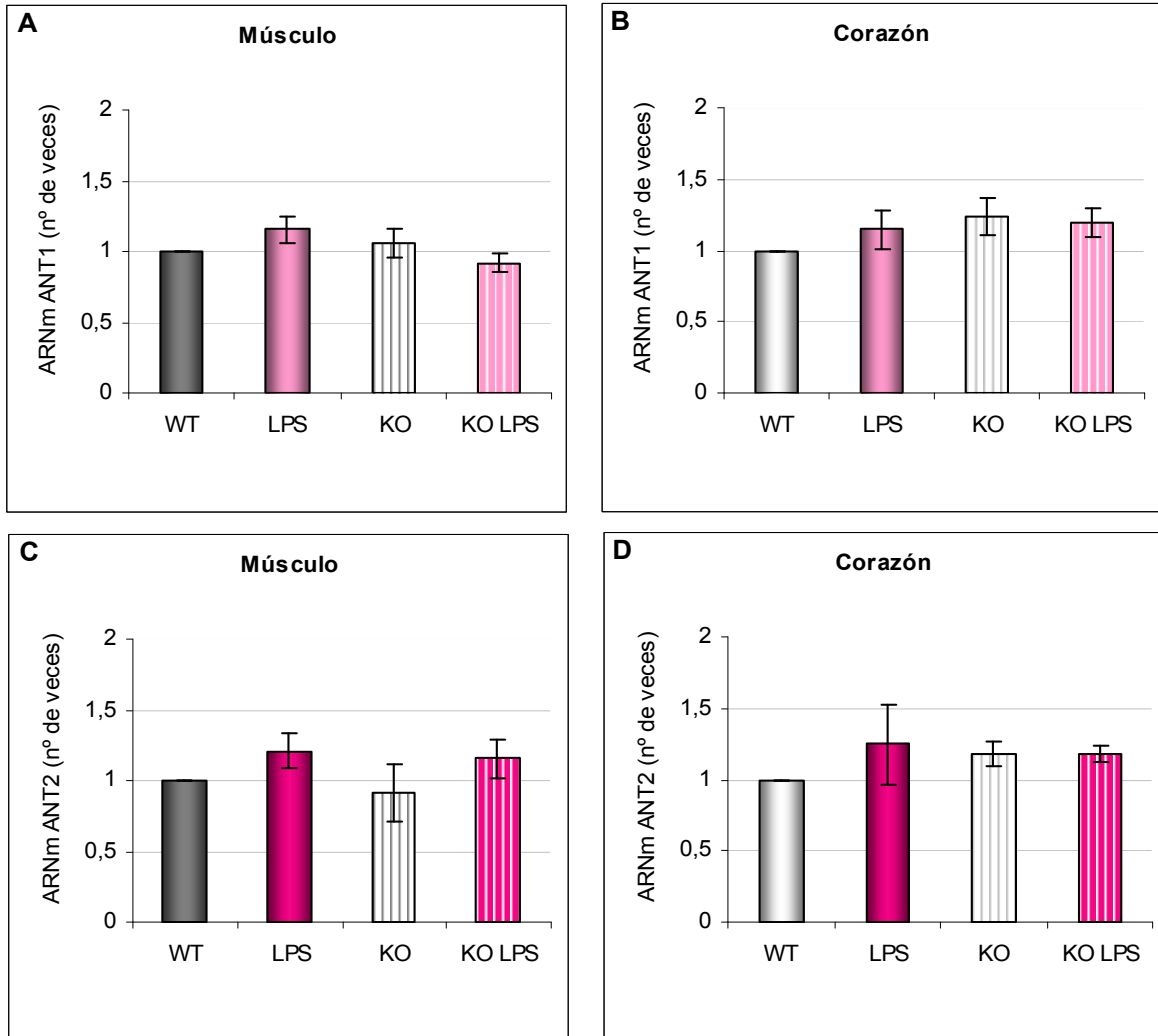


Figura R.5. Niveles de expresión del ARN del ANT1 a las 24 horas tras la inoculación de LPS (12 mg/kg) en animales WT y KO en el músculo esquelético (A) y el corazón (B), así como del ANT2 en el músculo esquelético (C) y el corazón (D). Valor medio \pm SEM (n=7) respecto de los valores obtenidos para las muestras WT, a las que se les asignó el valor arbitrario 1. No se detectaron diferencias estadísticamente significativas respecto a WT ni respecto a KO.

En la Figura R.4 puede observarse, tanto en el músculo esquelético como en el corazón, que los niveles de expresión génica de *ucp2* en los animales WT no difieren significativamente de los niveles detectados en los animales KO. Al inocular la endotoxina a los animales de ambos genotipos se observó un aumento en la expresión de *ucp2*, siendo este aumento en el músculo esquelético de alrededor de 3 veces en los animales WT, y de alrededor de 2 veces en los animales KO. En el corazón, con la inoculación de LPS, el aumento en la expresión de *ucp2* en los animales WT fue superior a 5 veces, mientras que en los animales KO fue de alrededor de 3 veces.

En relación con la expresión génica de *ant1* y *ant2*, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre animales WT y KO, tanto en el músculo esquelético como en el corazón. Al inocular LPS a los animales de ambos genotipos, tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas respecto a los WT y, por tanto, tampoco respecto a los KO (Figura R.5).

1.3. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS UCP3 Y ANT EN RATONES DE TIPO SILVESTRE

En el músculo esquelético y el corazón, dentro del rango de tiempo estudiado, la inoculación de 12 mg/kg de LPS inducía a las 24 h el mayor aumento en la expresión del ARNm de *ucp3*. Por lo tanto, se utilizó este tiempo de incubación en la determinación de la variación de la expresión de la proteína UCP3 tras la administración de LPS.

Con esta finalidad se procesaron mediante western blot extractos proteicos obtenidos a partir del músculo esquelético y el corazón (tanto de tejido como de mitocondrias aisladas), procedentes de animales WT (inyectados con solución salina) y WT LPS (inoculados con 12 mg/kg de LPS y 24 h de incubación).

En las Figuras R.6 y R.7 puede observarse que la inoculación de LPS aumentó la expresión de la proteína **UCP3** en el músculo esquelético y el corazón. En concreto, en el tejido muscular esquelético de los animales WT LPS se detectó 1,76 veces más proteína UCP3 que en los animales WT, mientras que en las mitocondrias aisladas a partir del músculo, el aumento observado fue de 1,83 veces (Figura R.6). En cuanto a la expresión de la UCP3 en el corazón, se detectó en el tejido cardíaco de los animales WT 1,49 veces más esta proteína que en los animales WT LPS, mientras que en las mitocondrias aisladas a partir del corazón, el aumento fue de 1,79 veces (Figura R.7).

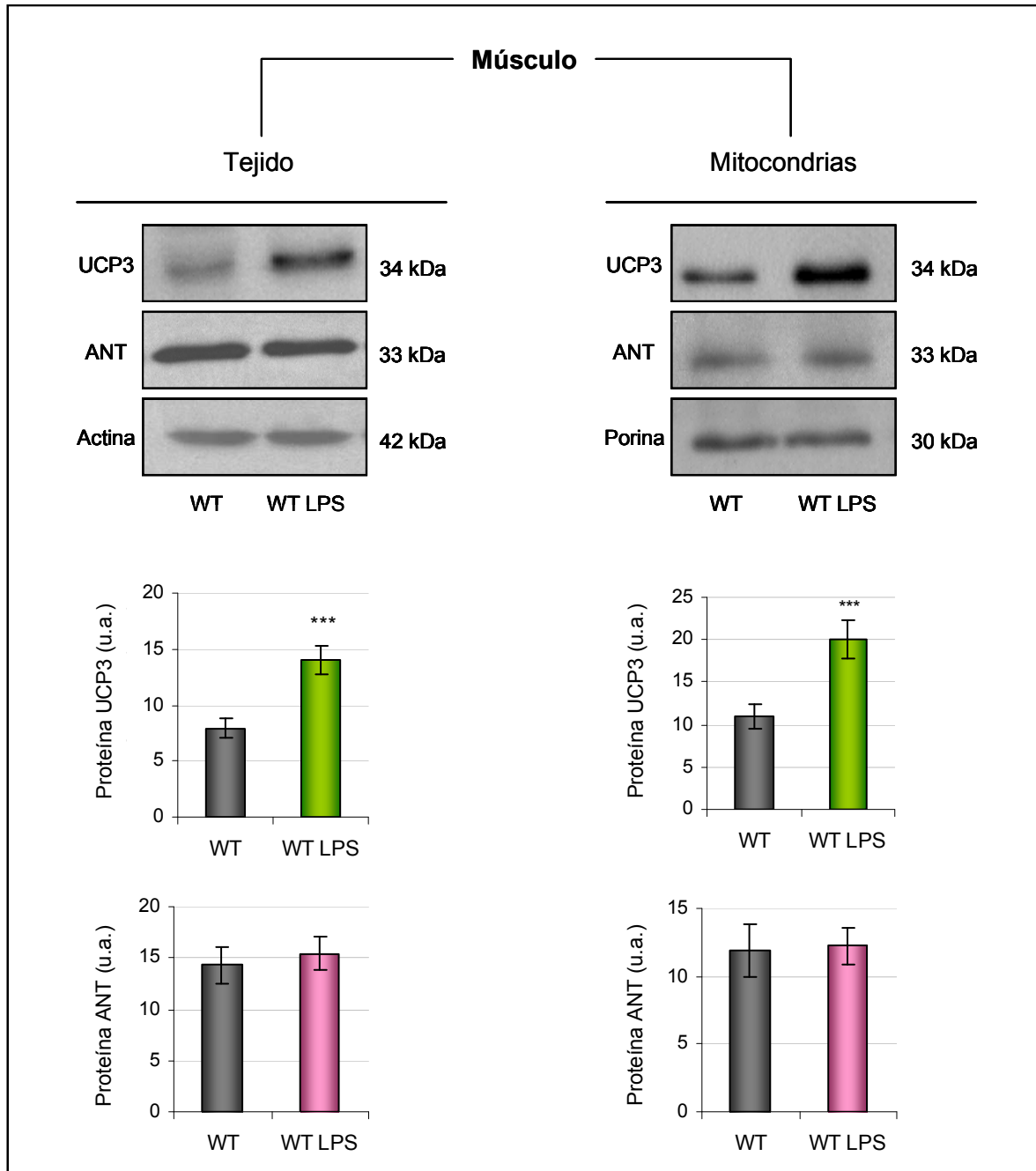


Figura R.6. Niveles de expresión de las proteínas UCP3 y ANT en ratones WT y WT LPS en tejido y mitocondrias de músculo esquelético. Como control de carga se determinó la expresión de actina y porina en los extractos proteicos de tejido y mitocondrias, respectivamente. La cuantificación de dichos niveles de expresión se realizó mediante densitometrado de las imágenes obtenidas, encontrándose diferencias significativas entre WT y WT LPS (***, $p < 0,001$) en la expresión de la UCP3, mientras que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la expresión del ANT.

En las mismas condiciones se determinó si la inoculación de LPS tenía algún efecto sobre los niveles de expresión de la proteína **ANT**, no encontrándose diferencias entre los animales WT y WT LPS, tanto en el tejido como en las mitocondrias de músculo esquelético (Figura R.6) y corazón (Figura R.7).

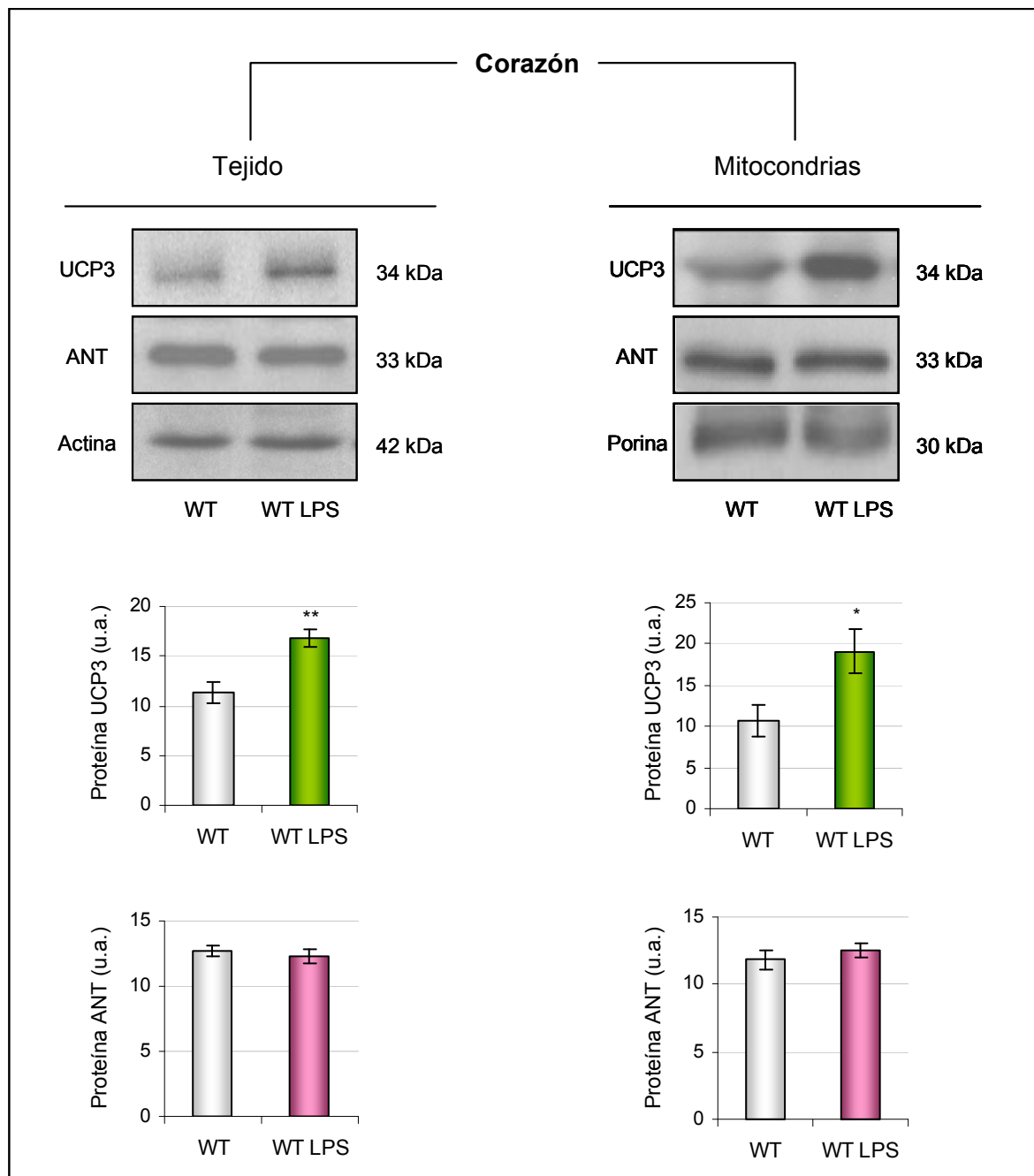


Figura R.7. Niveles de expresión de las proteínas UCP3 y ANT en ratones WT y WT LPS en tejido y mitocondrias de corazón. Como control de carga se determinó la expresión de actina y porina en los extractos proteicos de tejido y mitocondrias, respectivamente. La cuantificación de dichos niveles de expresión se realizó mediante densitometrado de las imágenes obtenidas, encontrándose diferencias significativas entre WT y WT LPS (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$) en la expresión de la UCP3, mientras que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la expresión del ANT.

En nuestro estudio también se determinó la relación entre el nivel de expresión de la proteína UCP3 en el músculo esquelético y el detectado en el corazón. Con esta finalidad, mediante western blot, se estudiaron los niveles de expresión de la UCP3 en muestras de tejido de músculo esquelético y corazón de animales WT, normalizados respecto de los niveles de expresión de actina (Figura R.8). La cuantificación de la relación entre los niveles de expresión de la UCP3, normalizados respecto de los niveles de expresión de actina, determinó que la UCP3 se expresaba de 6-7 veces más en el músculo esquelético que en el corazón.

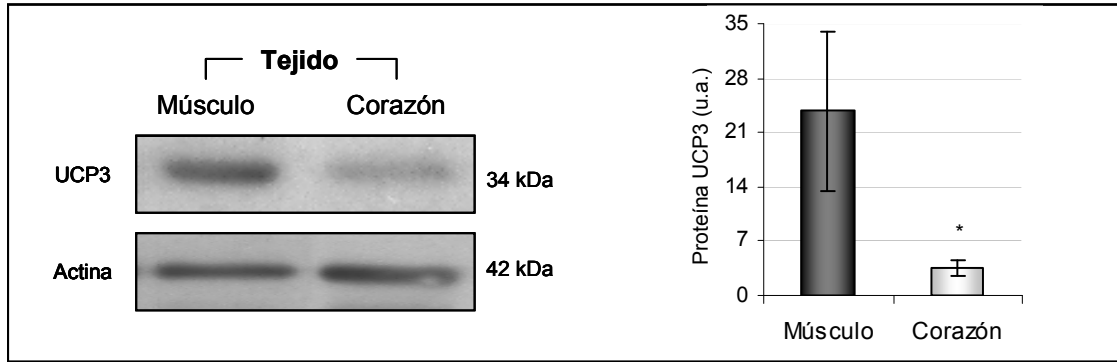


Figura R.8. Niveles de expresión de la proteína UCP3 en tejido muscular y cardiaco de ratones WT. La cuantificación de la diferente expresión de la UCP3 en ambos tejidos se realizó tras normalizar respecto de los niveles de expresión de actina. Diferencias significativas respecto al músculo (*, $p < 0,05$).

1.4. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS UCP3 Y ANT EN RATONES MUTANTES UCP3KO

La confirmación del genotipo mutado para la proteína UCP3 de los animales utilizados en este estudio se realizó mediante western blot de muestras procedentes del músculo esquelético (Figura R.9, A) y el corazón (Figura R.9, B), tanto de tejido como de mitocondrias. También se determinó en dichas muestras que los animales mutantes (KO y KO LPS) presentaban niveles de expresión de la proteína **ANT** similares a los detectados en los animales WT y WT LPS.

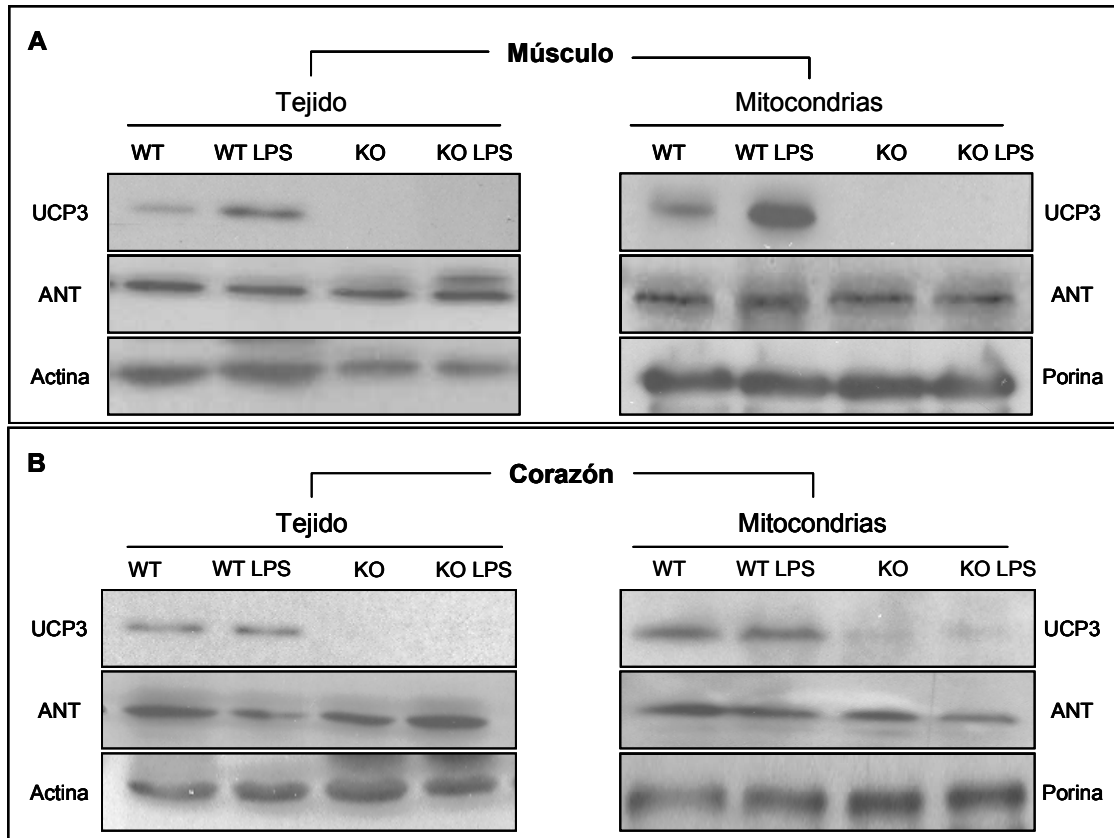


Figura R.9. Niveles de expresión de las proteínas UCP3 y ANT en ratones WT, WT LPS, KO y KO LPS en tejido y mitocondrias de músculo esquelético (A) y corazón (B). Como control de carga se determinó la expresión de actina y porina en los extractos de tejido y mitocondrias, respectivamente.

2. MEDIDAS DE CONSUMO DE OXÍGENO EN MITOCONDRIAS AISLADAS DEL MÚSCULO ESQUELÉTICO Y EL CORAZÓN DE RATÓN

Una vez caracterizados los niveles de expresión génica y de proteína en los ratones de genotipo WT y KO (tanto en ausencia como en presencia de endotoxina), se realizaron medidas de consumo de oxígeno mediante respirometría de alta resolución en mitocondrias aisladas a partir del músculo esquelético y el corazón.

2.1. INTEGRIDAD DE LAS MITOCONDRIAS AISLADAS

La primera determinación realizada con cada preparación de mitocondrias fue la del **control respiratorio**, un indicador de la integridad de las mitocondrias aisladas. Para ello, se determinó el valor de la respiración en el Estado III (tras la adición de ADP e iniciarse la síntesis de ATP) y en el Estado IV (tras la adición de oligomicina e inhibirse la síntesis de ATP). El protocolo utilizado aparece reflejado en el registro de la Figura R.10.

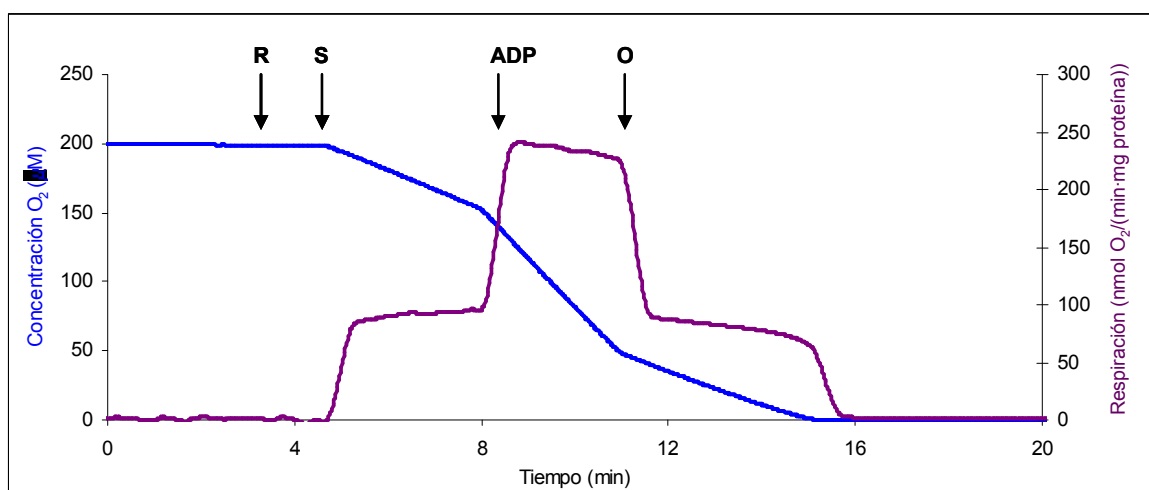


Figura R.10. Control respiratorio. Tras añadir las mitocondrias a la cámara del respirómetro, se adicionó rotenona $2 \mu\text{M}$ (R) y succinato 4 mM (S) iniciándose la respiración. Transcurridos unos minutos, se adicionó ADP $250 \mu\text{M}$, incrementándose la tasa de respiración. Finalmente, se añadió oligomicina $1 \mu\text{g/ml}$ (O), ralentizándose de nuevo la respiración. La línea azul representa la concentración de oxígeno (μM) mientras que la línea morada representa la respiración mitocondrial ($\text{nmol O}_2/(\text{min} \cdot \text{mg proteína})$).

Los valores de respiración obtenidos en las mitocondrias aisladas del músculo esquelético ($0,35 \text{ mg de proteína/ml}$) y el corazón ($0,25 \text{ mg de proteína/ml}$), se representaron en la Figura R.11, donde se observa que las mitocondrias aisladas a partir de los animales inoculados con LPS presentan tasas respiratorias más bajas a las observadas en las mitocondrias aisladas de los animales a los que no se les administró endotoxina. Esta tendencia no es estadísticamente significativa en las mitocondrias de músculo esquelético (Figura R.11, A), mientras que sí lo es en las mitocondrias de corazón (Figura R.11, B).

A partir de estos datos, se determinó el control respiratorio mediante el cálculo de la relación entre la respiración en el Estado III y en el Estado IV.

En el músculo esquelético (Figura R.11, C), el valor del control respiratorio Estado III/Estado IV de las mitocondrias WT fue de $3,69 \pm 0,16$ (valor medio \pm SEM), no encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre estas mitocondrias y las aisladas de animales WT LPS, KO y KO LPS.

En el corazón (Figura R.11, D), el valor del control respiratorio Estado III/Estado IV fue de $3,80 \pm 0,03$ (valor medio \pm SEM), no encontrándose tampoco diferencias estadísticamente significativas entre estas mitocondrias y las aisladas de animales WT LPS, KO y KO LPS.

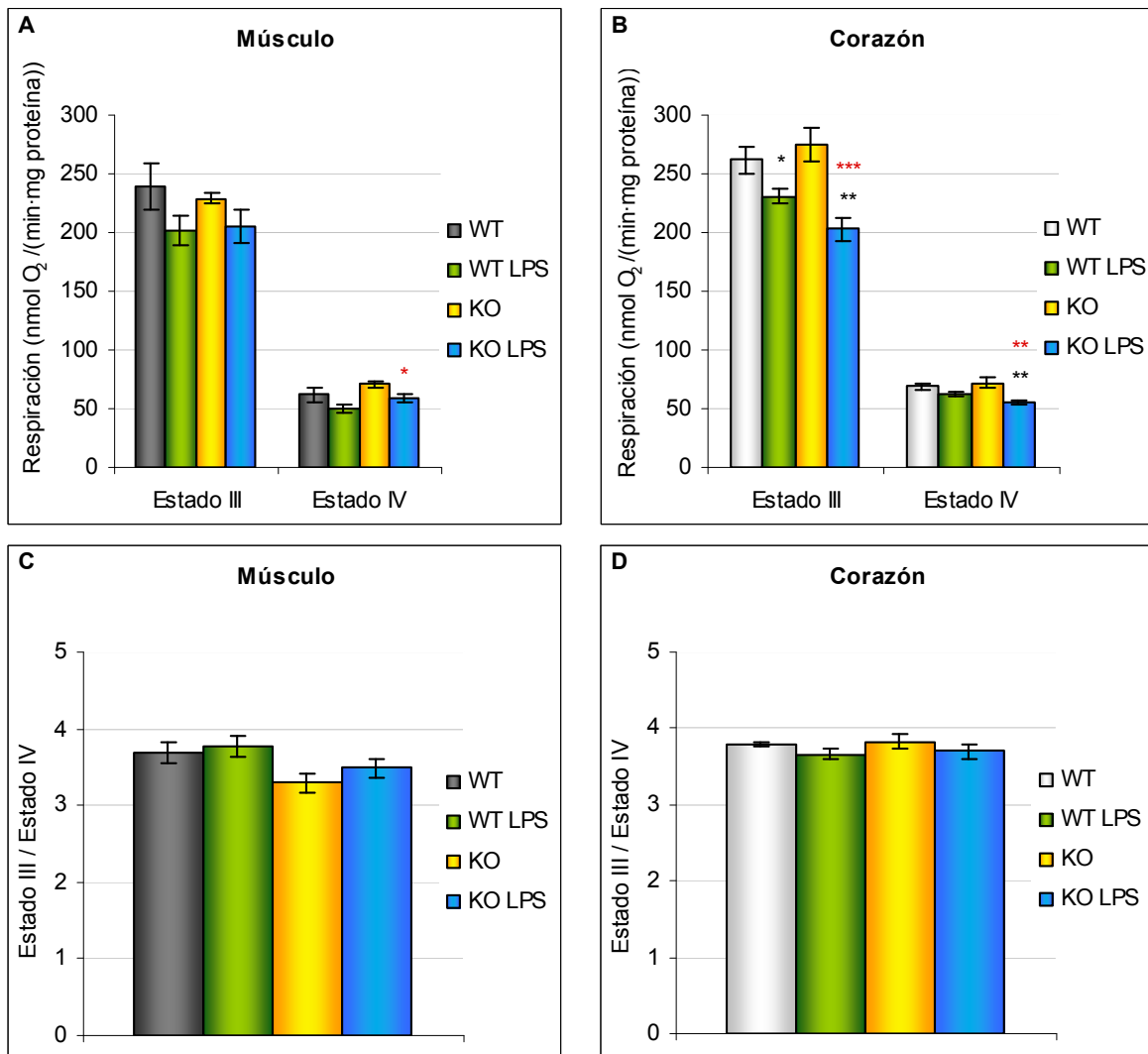


Figura R11. Valores de respiración de mitocondrias aisladas a partir del músculo esquelético (A) y del corazón (B) en el Estado III (tras la adición de ADP) y el Estado IV (tras la adición de oligomicina). A partir de estos datos se determinó el control respiratorio en mitocondrias de músculo esquelético (C) y de corazón (D). Representación del valor medio \pm SEM (n=8). Diferencias estadísticamente significativas respecto a WT (*, p<0,05; **, p<0,01). Diferencias significativas respecto a KO (*, p<0,05; **, p<0,01; ***, p<0,001).

2.2. CAPACIDAD MÁXIMA DE LA RESPIRACIÓN MITOCONDRIAL

En las mitocondrias de músculo esquelético y corazón también se determinó la **capacidad máxima** de la respiración mitocondrial. Con este fin, se dispusieron las mitocondrias (50 μg de proteína/ml) en la cámara del respirómetro, adicionándose rotenona, succinato y el agente desacoplante FCCP. El protocolo utilizado aparece reflejado en el registro de la Figura R.12. Los valores obtenidos al medir el consumo de oxígeno tras la adición de succinato y FCCP aparecen reflejados en la Figura R.13.

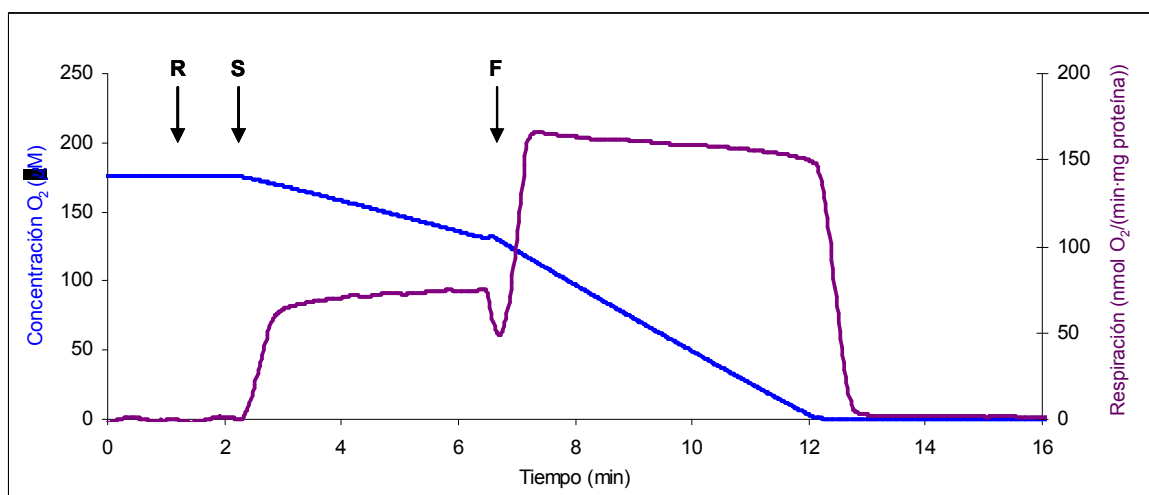


Figura R.12. Capacidad máxima de respiración mitocondrial. Tras añadir las mitocondrias a la cámara del respirómetro, se adicionó rotenona 2 μM (R) y succinato 5 mM (S) iniciándose la respiración. Transcurridos 5 minutos, se adicionó FCCP 0,6 μM (músculo) ó 0,8 μM (corazón) (F), alcanzándose la capacidad máxima de la respiración mitocondrial. La línea azul representa la concentración de oxígeno (μM) mientras que la línea morada representa la respiración mitocondrial ($\text{nmol O}_2/(\text{min} \cdot \text{mg proteína})$).

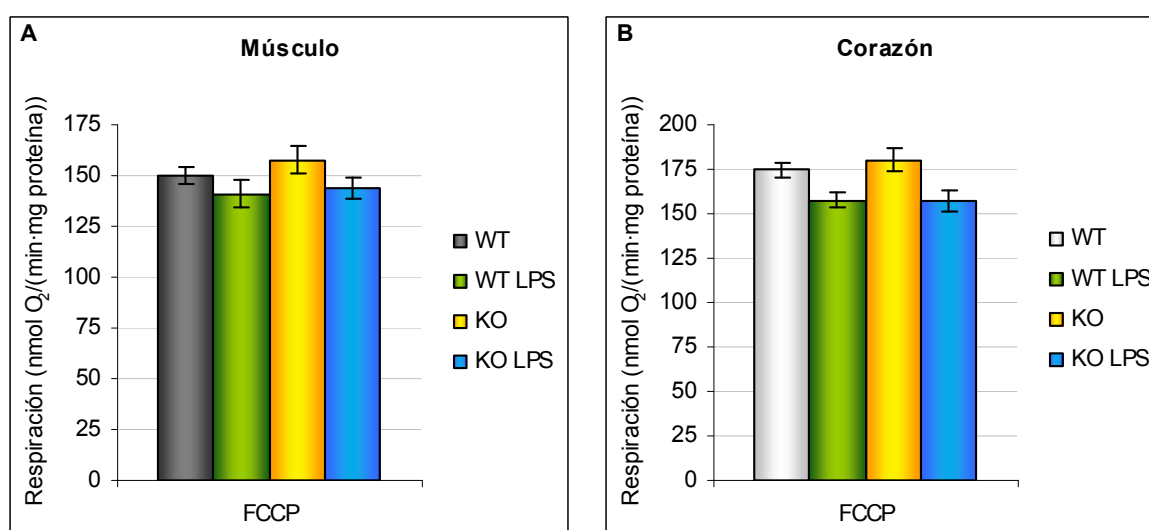


Figura R.13. Valores de respiración de mitocondrias aisladas a partir del músculo esquelético (A) y del corazón (B) tras la adición de FCCP. Representación del valor medio \pm SEM (n=8). No se detectaron diferencias estadísticamente significativas respecto a WT ni respecto a KO.

En las mitocondrias WT aisladas a partir del músculo esquelético, la capacidad máxima respiratoria fue de $150,21 \pm 9,45$ nmol O₂/(min·mg de proteína). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las mitocondrias WT, WT LPS, KO y KO LPS en relación a su capacidad respiratoria máxima.

En las mitocondrias WT aisladas a partir del corazón, la capacidad máxima respiratoria fue de $174,42 \pm 11,42$ nmol O₂/(min·mg de proteína). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las mitocondrias WT, WT LPS, KO y KO LPS en relación a su capacidad respiratoria máxima.

2.3. ACTIVIDAD DE LOS DIFERENTES COMPLEJOS DE LA CADENA RESPIRATORIA MITOCONDRIAL

Para estudiar la **actividad** de los diferentes complejos de la **cadena respiratoria mitocondrial** se incubaron mitocondrias aisladas a partir del músculo esquelético y el corazón (50 µg de proteína/ml) con diferentes sustratos e inhibidores, siguiendo el protocolo reflejado en la Figura R.14.

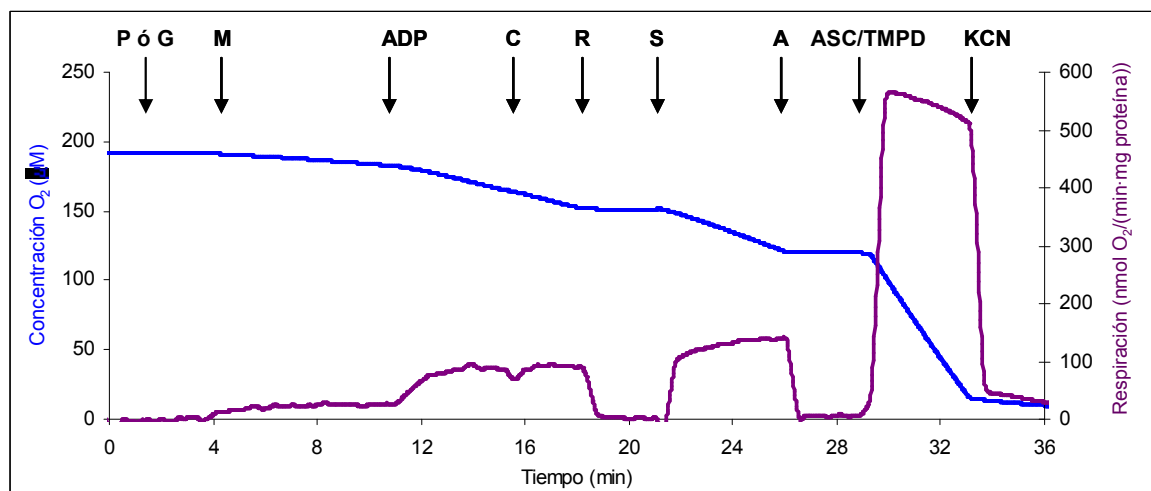


Figura R.14. Actividad de los diferentes complejos de la cadena respiratoria mitocondrial. Tras añadir las mitocondrias a la cámara del respirómetro, se fueron adicionando distintos sustratos e inhibidores: piruvato 5 mM o glutamato 10 mM (P ó G), malato 2 mM (M), ADP 1 mM, citocromo-c 10 µM (C), rotenona 2 µM (R), succinato 5 mM (S), antimicina A 2,5 µM (A), ascorbato 2 mM (ASC), TMPD 500 µM, y KCN 1 mM. La línea azul representa la concentración de oxígeno (µM) mientras que la línea morada representa la respiración mitocondrial (nmol O₂/(min·mg proteína)).

En la Figura R.15 aparecen reflejados los resultados obtenidos al utilizar piruvato-malato como sustrato del Complejo I en las mitocondrias aisladas a partir del músculo esquelético (A) y el corazón (B), así como los resultados obtenidos al utilizar glutamato-malato como sustrato del Complejo I en las mitocondrias aisladas a partir del músculo esquelético (C) y el corazón (D).

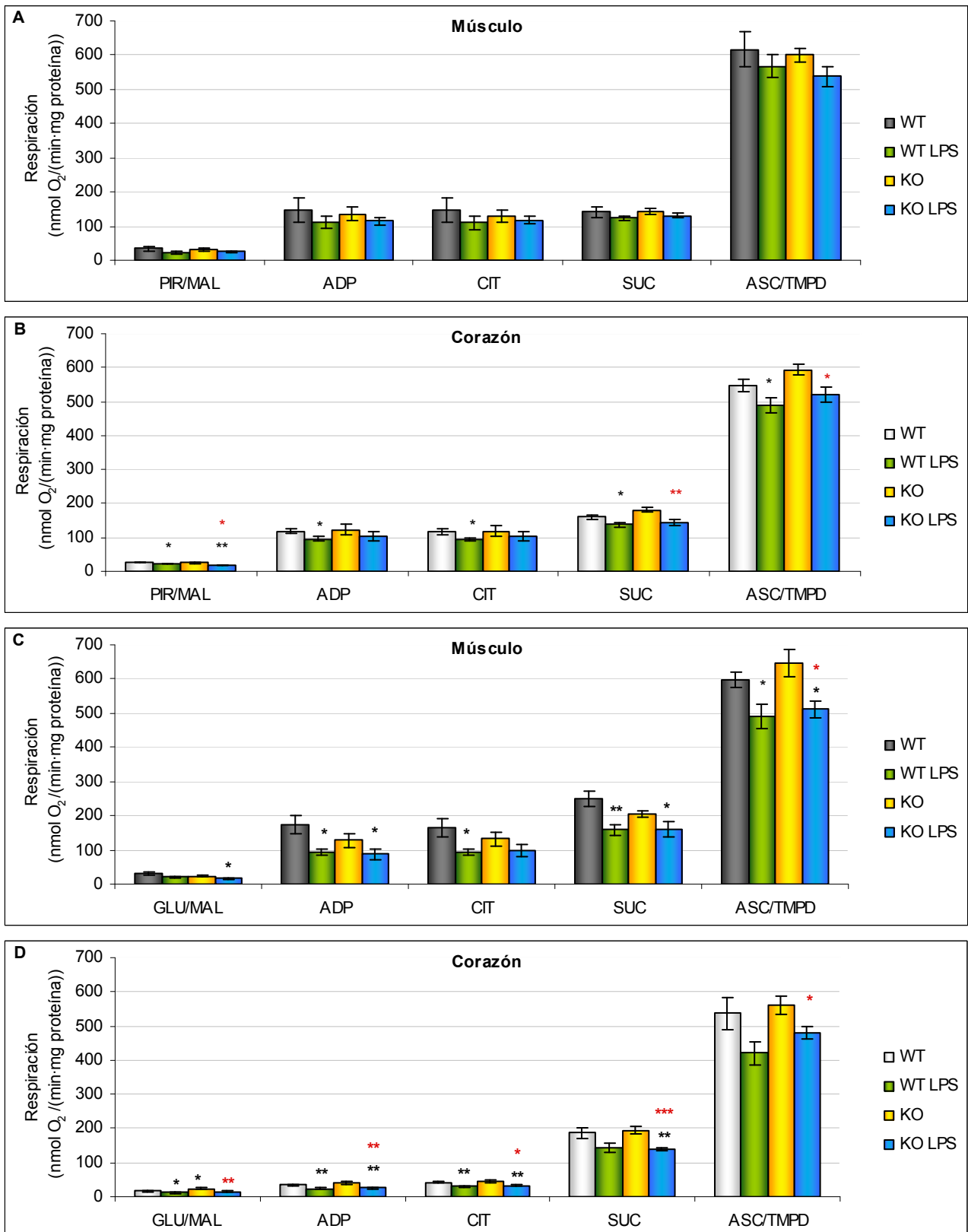


Figura R.15. Valores de respiración de mitocondrias aisladas a partir del músculo esquelético (A y C) y del corazón (B y D) tras la adición de diferentes sustratos: piruvato (PIR), glutamato (GLU), ADP, citocromo-c (CIT), succinato (SUC), ascorbato (ASC) y KCN. Representación del valor medio \pm SEM (n=10). Diferencias estadísticamente significativas respecto a WT (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$). Diferencias significativas respecto a KO (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$).

En resumen, en las mitocondrias aisladas a partir de ambos tipos de tejido se observa que la administración de endotoxina, tanto a animales de genotipo WT como KO, produce una disminución de la tasa de respiración en todos los complejos de la cadena transportadora de electrones.

3. ESTUDIO DEL PAPEL DE LA PROTEÍNA UCP3 FRENTE AL ESTRÉS OXIDATIVO

Para determinar el papel de la proteína UCP3 frente al estrés oxidativo, se decidió estudiar la implicación de esta proteína en la conductancia de la membrana mitocondrial interna a los protones inducida por el radical **superóxido** y por el compuesto originado tras la peroxidación lipídica **4-hidroxinonenal**. Ambos compuestos han sido descritos en la bibliografía como activadores de las proteínas desacoplantes (Echtay et al., 2002b; Echtay et al., 2003).

La activación específica de la proteína UCP3 en presencia del radical superóxido y del 4-hidroxinonenal se estudió mediante la utilización de diferentes inhibidores, como el GDP (inhibidor específico de las proteínas desacoplantes) y el carboxiatractilósido (inhibidor específico del ANT).

La medida de la conductancia a los protones se realizó a través de la determinación simultánea del consumo de oxígeno y el potencial de membrana, como se ha descrito en el apartado 3.3 de Materiales y Métodos. Estas medidas, en presencia de superóxido, se hicieron en mitocondrias aisladas a partir del músculo esquelético de animales WT y WT LPS, mientras que las medidas en presencia de 4-hidroxinonenal se hicieron en mitocondrias aisladas tanto a partir del músculo esquelético como del corazón de animales WT, WT LPS, KO y KO LPS.

3.1. IMPLICACIÓN DE LA UCP3 EN LA ACTIVACIÓN DE LA CONDUCTANCIA DE LA MEMBRANA MITOCONDRIAL INTERNA A LOS PROTONES INDUCIDA POR EL RADICAL SUPERÓXIDO

Las mitocondrias utilizadas en estos experimentos fueron aisladas a partir del músculo esquelético de animales de tipo silvestre, con un nivel de expresión de la UCP3 basal (WT), y con un aumento de 2 veces en los niveles de expresión de esta proteína asociado a la inoculación de endotoxina (WT LPS).

El radical **superóxido** se generó en el medio de incubación de las mitocondrias a partir del sistema enzimático xantina y xantina-oxidasa. Para ello, se utilizaron dos concentraciones diferentes de xantina-oxidasa: 0,002U y 0,01U (Echtay et al., 2002b).

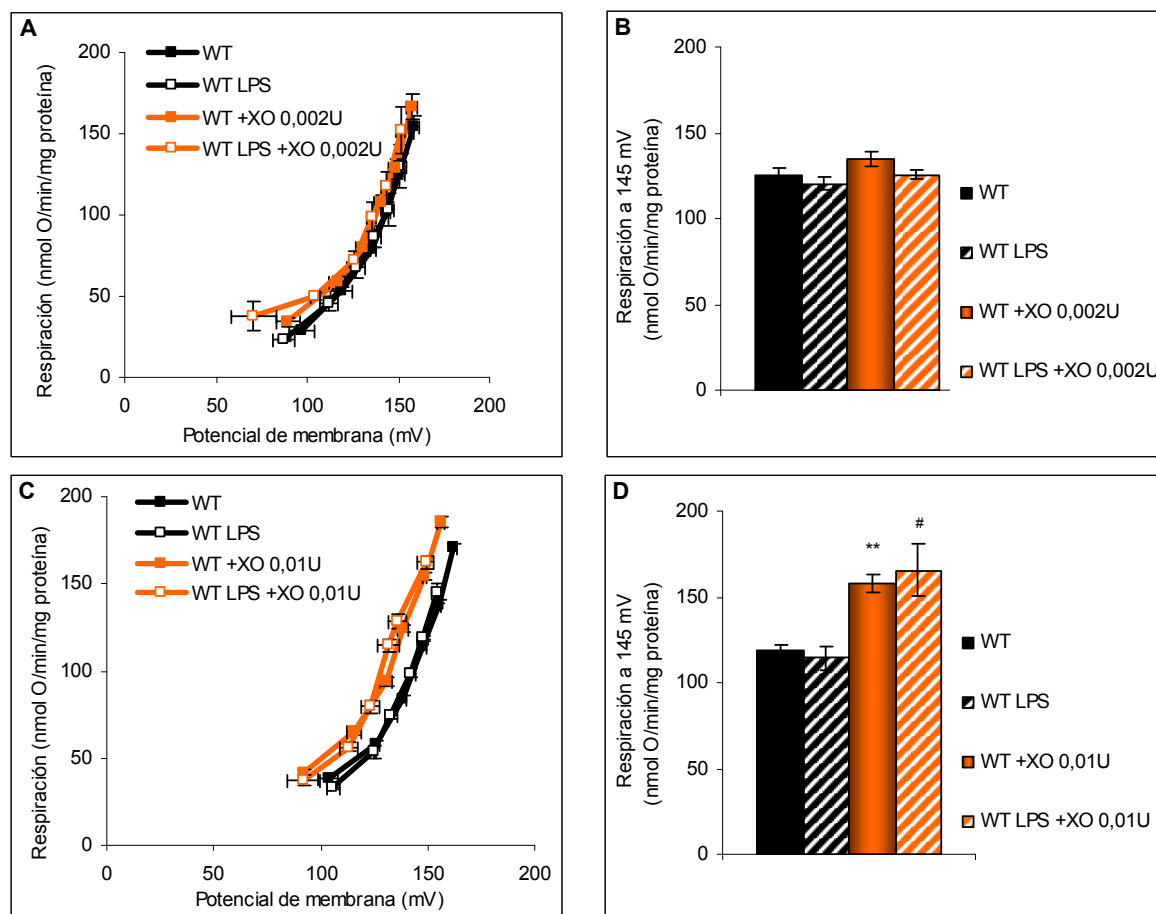


Figura R.16. Efecto del superóxido sobre la conductancia de la membrana mitocondrial interna a los protones en mitocondrias de músculo WT y WT LPS. El superóxido fue generado con el sistema xantina y xantina-oxidasa (XO) utilizando 0,002 U (A, B) y 0,01 U (C, D). Conductancia basal y activación con superóxido (A, C). Valor medio \pm SEM de la respiración medido a un potencial de membrana de 145 mV (B, D). Diferencias significativas respecto a WT (**, $p < 0,01$). Diferencias significativas respecto a WT LPS (#, $p < 0,05$). No se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre WT y WT LPS, ni entre WT +XO y WT LPS +XO ($n=4$).

En la Figura R.16 puede observarse que no se detectaron diferencias estadísticamente significativas en la conductancia basal a los protones entre las mitocondrias de músculo WT y WT LPS. Al generarse superóxido en el medio con 0,002 U de xantina-oxidasa (+XO 0,002 U), no se modificó la conductancia a los protones de manera apreciable. Por el contrario, la dosis de 0,01 U de xantina-oxidasa (+XO 0,01 U) aumentó la conductancia a los protones, sin detectarse diferencias estadísticamente significativas entre ambos tipos de mitocondrias.

Para estudiar la implicación de la UCP3 en el aumento de la conductancia a los protones inducido por el superóxido al añadir una dosis de xantina-oxidasa de 0,01 U, se utilizó **GDP**, un inhibidor específico de las proteínas desacoplantes. Según los resultados de la Figura R.17, el aumento en la conductancia a los protones inducido por el superóxido no pudo ser revertido con la adición de GDP 500 μ M, tanto en las mitocondrias WT como WT LPS.

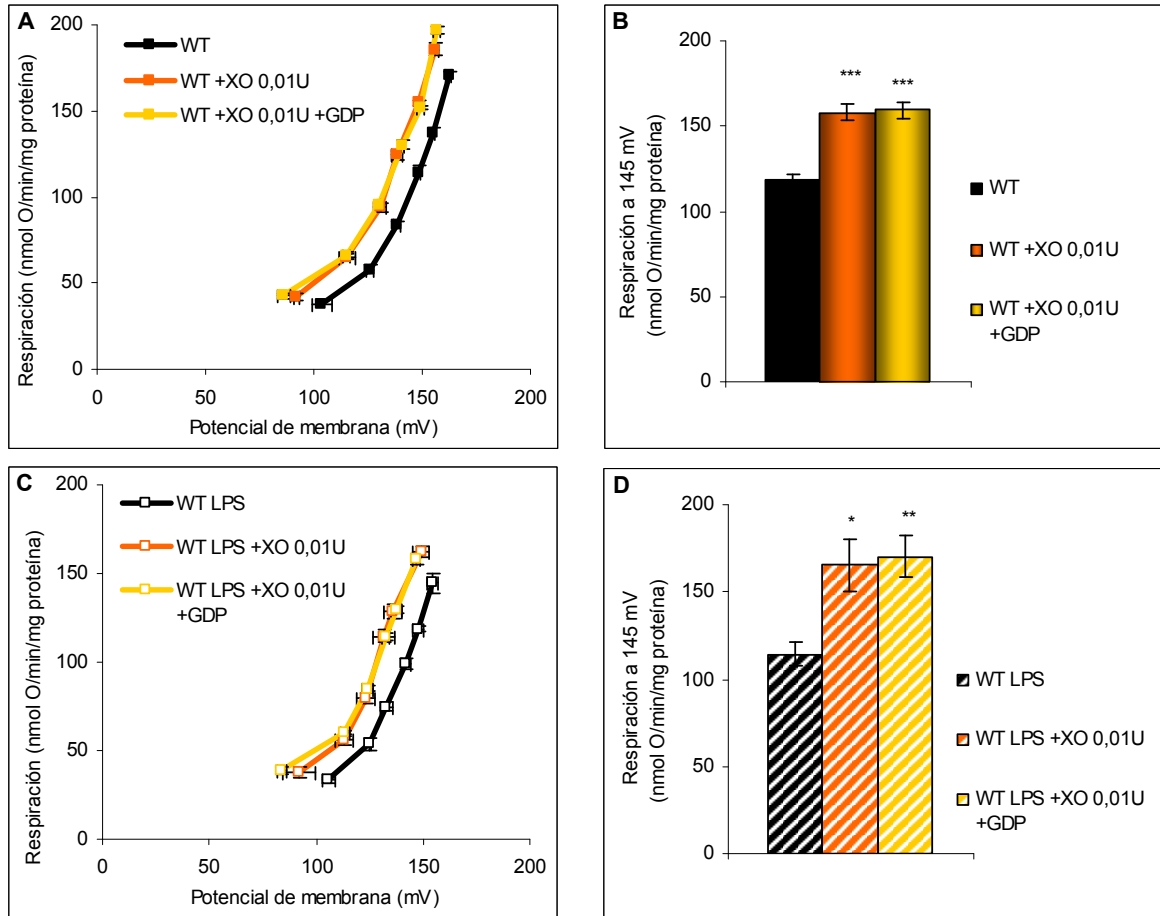


Figura R.17. Reversión con GDP de la activación inducida por el superóxido generado con la adición de xantina y 0,01 U de xantina-oxidasa en mitocondrias de músculo WT (A,B) y WT LPS (C,D). Conductancia basal, activación con superóxido y efecto del GDP 500 μ M (A,C). Valor medio \pm SEM de la respiración medido a un potencial de membrana de 145 mV (B,D). Diferencias significativas respecto a WT o WT LPS (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$). No se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre WT +XO y WT +XO+GDP, ni entre WT LPS +XO y WT LPS +XO+GDP (n=4).

Seguidamente se estudió si dicha activación podía ser inhibida con **carboxiatractilósido** (CAT), un inhibidor específico del transportador de nucleótidos de adenina (ANT). En este caso, utilizando la dosis de 0,01 U de xantina-oxidasa, la adición de CAT 2,5 μ M inhibió la totalidad de la activación inducida por el superóxido (Figura R.18).

Debido a que toda la activación en la conductancia a los protones inducida por el superóxido era inhibida únicamente por CAT (inhibidor de ANT) y no por GDP (inhibidor de las proteínas desacoplantes), no pudo atribuirse a la UCP3 un papel en este aumento de la conductancia. En cambio, según los resultados obtenidos, el ANT mediaba claramente el aumento en la conductancia de la membrana mitocondrial interna a los protones inducido por el radical superóxido.

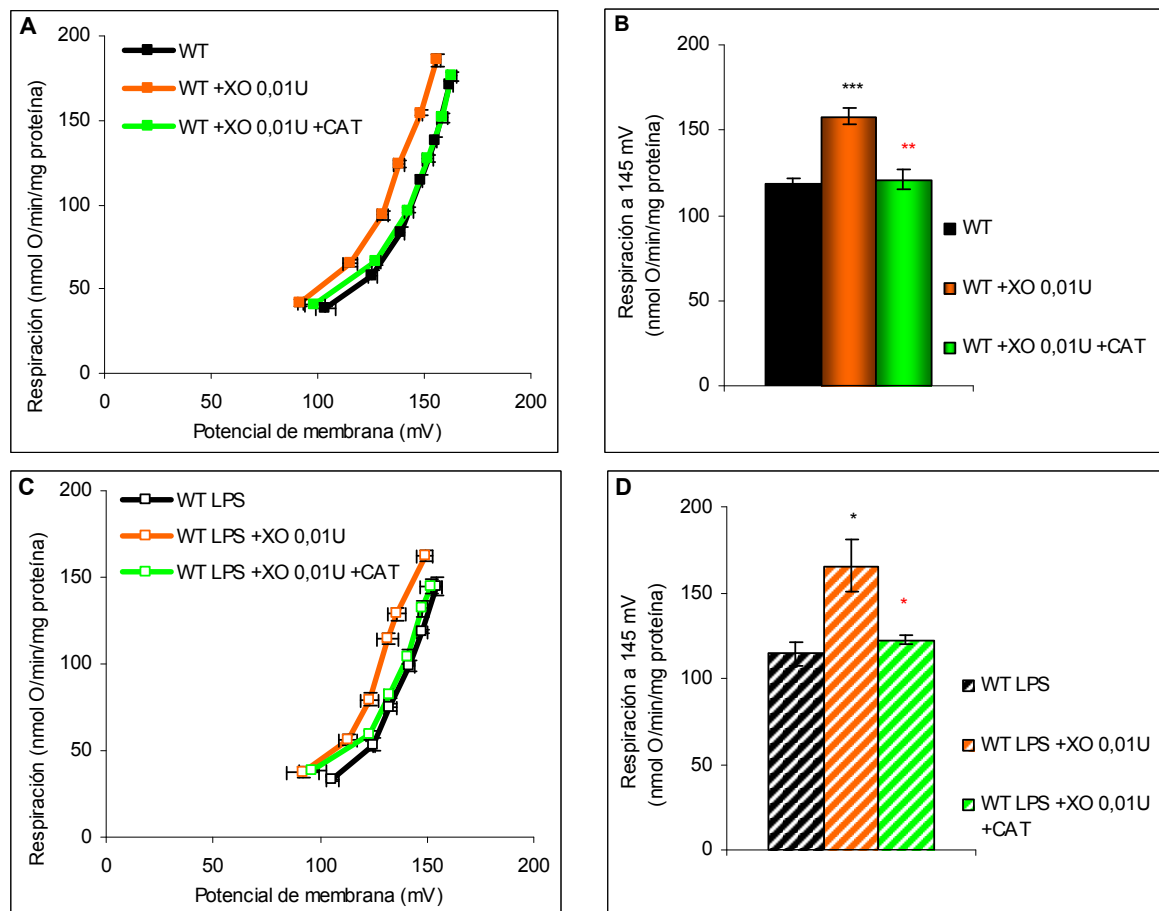


Figura R.18. Reversión con CAT de la activación inducida por el superóxido generado con la adición de xantina y 0,01 U de xantina-oxidasa en mitocondrias de músculo WT (A,B) y WT LPS (C,D). Conductancia basal, activación con superóxido y efecto del CAT 2,5 μ M (A,C). Valor medio \pm SEM de la respiración medido a un potencial de membrana de 145 mV (B,D). Diferencias significativas respecto a WT o WT LPS (*, $p < 0,05$; ***, $p < 0,001$). Diferencias significativas respecto a WT +XO o WT LPS +XO (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$) ($n=4$).

Estos mismos experimentos se realizaron utilizando otro sistema de activación de la conductancia de la membrana mitocondrial interna a los protones, la adición del compuesto 4-hidroxi-nonal, con la finalidad de determinar si este aumento en la conductancia a los protones estaba mediado por la UCP3.

3.2. IMPLICACIÓN DE LA UCP3 EN LA ACTIVACIÓN DE LA CONDUCTANCIA DE LA MEMBRANA MITOCONDRIAL INTERNA A LOS PROTONES INDUCIDA POR EL 4-HIDROXINONENAL

Los experimentos de activación con el **4-hidroxi-nonal** (HNE) se realizaron en mitocondrias aisladas a partir del músculo esquelético y el corazón de ratones de tipo silvestre y ratones deficientes en la expresión de la UCP3, a los que se les administró solución salina o endotoxina. La activación específica de la UCP3 en presencia de HNE se determinó mediante la utilización de GDP (inhibidor específico de las proteínas desacoplantes) y carboxiatractilósido (inhibidor específico del ANT) en mitocondrias aisladas a partir de ambos

tejidos de ratones WT (expresión basal de la proteína UCP3), WT LPS (expresión incrementada 2 veces en músculo esquelético y 1,5 veces en corazón), KO (sin expresión) y KO LPS (sin expresión).

3.2.1. Implicación de la UCP3 en la activación de la conductancia a los protones inducida por el 4-hidroxinonenal en mitocondrias de músculo esquelético

Inicialmente se aislaron mitocondrias a partir del músculo esquelético de los animales WT y WT LPS. En condiciones basales, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas en la conductancia a los protones entre las mitocondrias WT y WT LPS. Sin embargo, al añadir HNE, se detectó en las mitocondrias WT LPS un aumento en la conductancia a los protones superior al incremento observado en las mitocondrias WT (Figura R.19).

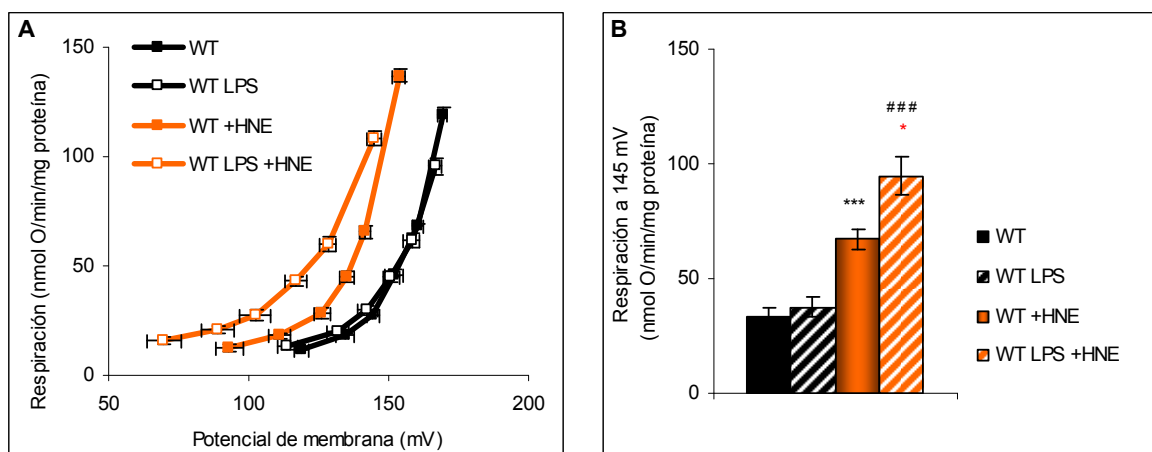


Figura R.19. Efecto del HNE sobre la conductancia de la membrana mitocondrial interna a los protones en mitocondrias de músculo WT y WT LPS. Conductancia basal y activación con HNE 35 μ M (A). Valor medio \pm SEM de la respiración medido a un potencial de 145 mV (B). Diferencias significativas respecto a WT (***, $p < 0,001$). Diferencias significativas respecto a WT LPS (###, $p < 0,001$). Diferencias significativas respecto a WT +HNE (*, $p < 0,05$). No se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre WT y WT LPS ($n=8$).

Con el fin de determinar si el aumento en la conductancia a los protones observado estaba mediado por la UCP3 o por el ANT, se trató de inhibir la activación inducida por el HNE con **GDP** y **carboxiatractilósido** (CAT).

En la Figura R.20 puede observarse que, en las mitocondrias WT de músculo esquelético, el GDP inhibió parcialmente la activación inducida por el HNE ($56 \pm 6\%$). Sin embargo, al añadir CAT (o CAT+GDP), la activación inducida por el HNE fue totalmente revertida. En las mitocondrias WT LPS de músculo, la adición de GDP también inhibió parcialmente la activación inducida por el HNE ($46 \pm 5\%$). Sin embargo, la inhibición conseguida con la adición de CAT fue sólo parcial ($59 \pm 4\%$) y se hizo necesaria la adición conjunta de GDP y CAT para conseguir una reversión total del aumento en la conductancia a los protones inducido por el HNE.

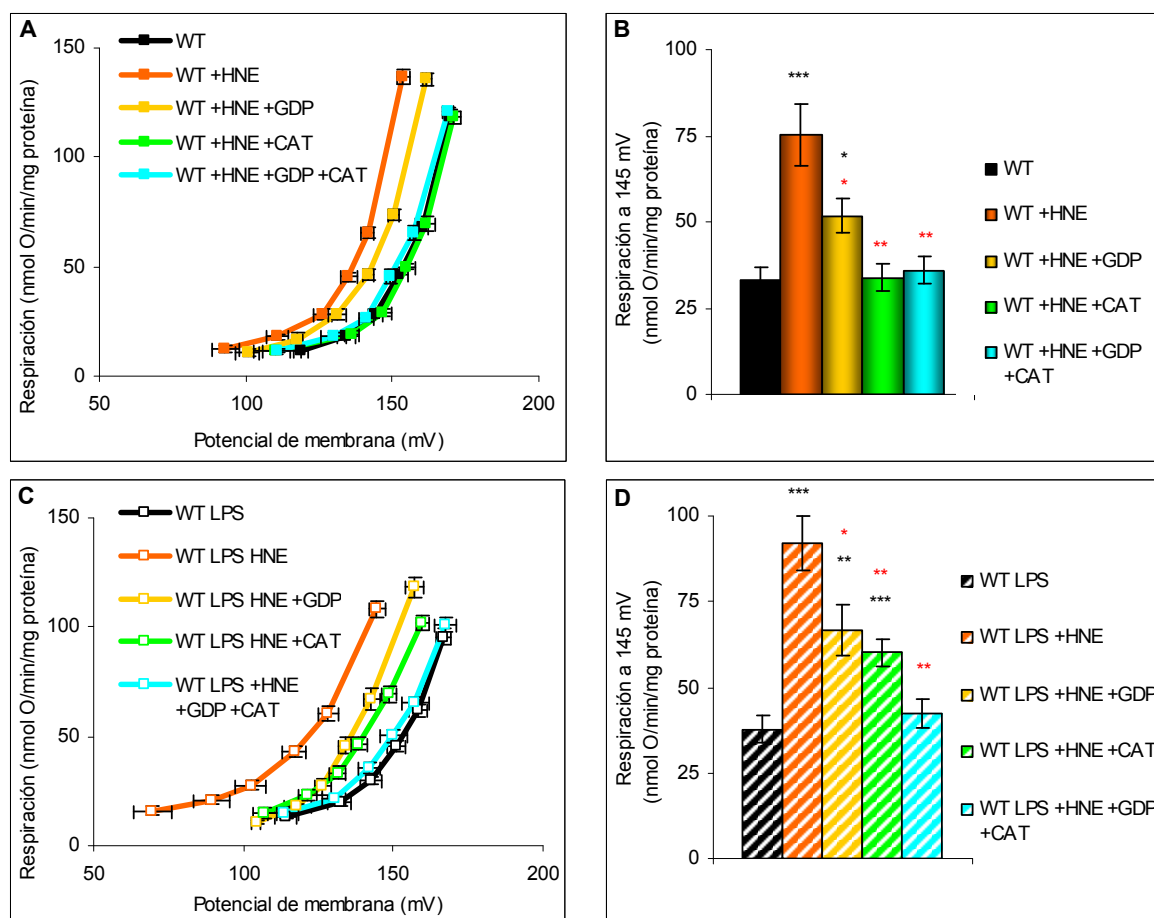


Figura R.20. Reversión con GDP y CAT de la activación inducida con HNE 35 μ M en mitocondrias de músculo WT (A,B) y WT LPS (C,D). Conductancia basal, activación con HNE y efecto del GDP, CAT y GDP+CAT (A,C). Valor medio \pm SEM de la respiración medido a un potencial de membrana de 145 mV (B,D). Diferencias significativas respecto a WT o WT LPS (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$). Diferencias significativas respecto a WT +HNE o WT LPS +HNE (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$) ($n=8$).

Según estos resultados, en las mitocondrias WT de músculo, el potencial de membrana mitocondrial estaría mediado en parte por la UCP3 (al ser revertido por GDP), y en parte por el ANT (al ser revertido en su totalidad con la adición de CAT). Sin embargo, en las mitocondrias WT LPS de músculo, en las que la expresión de la UCP3 se encuentra incrementada, la adición de GDP o de CAT produce una reversión parcial de la activación inducida por el HNE, siendo necesaria la adición conjunta de GDP y CAT para conseguir una reversión total.

Con la finalidad de determinar si la UCP3 catalizaba específicamente este aumento de la conductancia a los protones inducida por el HNE, se hicieron los mismos experimentos con mitocondrias aisladas a partir del músculo esquelético de ratones deficientes en la expresión de la UCP3 (KO y KO LPS).

Inicialmente se estudió si la conductancia a los protones se veía afectada en las mitocondrias aisladas a partir de los animales KO en relación a la conductancia medida en los animales WT.

También se analizó cómo afectaba la adición del activador HNE a la conductancia a los protones en las mitocondrias de músculo aisladas a partir de ambos tipos de animales.

En la Figura R.21 puede observarse que, en condiciones basales (en ausencia de HNE) no hay diferencias estadísticamente significativas en la conductancia a los protones entre las mitocondrias WT y KO. En esta figura también se aprecia que, al añadir HNE al medio de incubación, la conductancia a los protones aumenta en ambos tipos de mitocondrias, detectándose un mayor incremento en las mitocondrias WT respecto al observado en las mitocondrias KO.

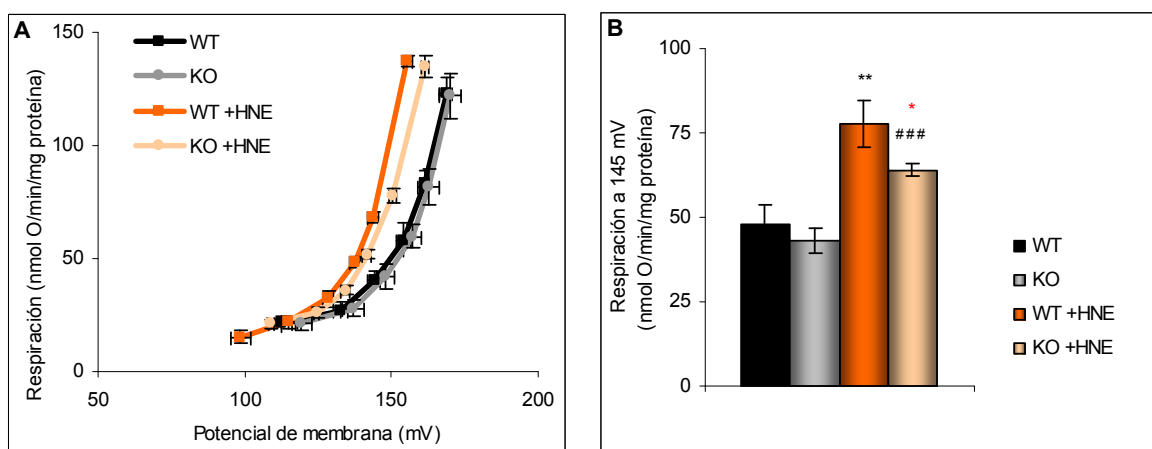


Figura R.21. Efecto del HNE sobre la conductancia de la membrana mitocondrial interna a los protones en mitocondrias de músculo WT y KO. Conductancia basal y activación con HNE 35 μ M (A). Valor medio \pm SEM de la respiración medido a un potencial de 145 mV (B). Diferencias significativas respecto a WT (**, $p < 0,01$). Diferencias significativas respecto a KO (###, $p < 0,001$). Diferencias significativas respecto a WT + HNE (*, $p < 0,05$). No se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre WT y KO ($n = 10$).

A continuación se determinó en las mitocondrias aisladas a partir del músculo esquelético de los animales KO si el tratamiento con endotoxina producía algún tipo de efecto sobre la conductancia a los protones. En la Figura R.22 se puede observar que, en condiciones basales, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la conductancia a los protones entre las mitocondrias KO y KO LPS. Al adicionar el compuesto HNE, se detectó un aumento en la conductancia a los protones en ambos tipos de mitocondrias, siendo la intensidad de dicho aumento similar en las mitocondrias KO y KO LPS.

De la misma manera que con las mitocondrias WT, también en las mitocondrias KO se determinó la especificidad del aumento en la conductancia a los protones inducido por el HNE, mediante la adición de los inhibidores GDP y CAT. En la Figura R.23 puede observarse que la adición de GDP no inhibió el aumento en la conductancia a los protones inducido por el HNE, tanto en mitocondrias KO como KO LPS. La adición de CAT (única o conjuntamente con GDP), inhibió la totalidad del efecto del HNE, tanto en las mitocondrias KO como KO LPS.

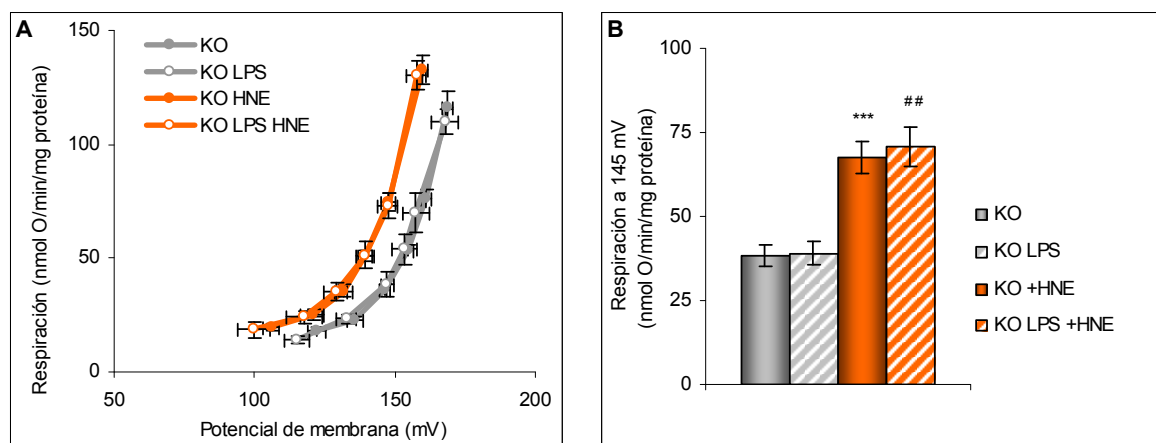


Figura R.22. Efecto del HNE sobre la conductancia de la membrana mitocondrial interna a los protones en mitocondrias de músculo KO y KO LPS. Conductancia basal y activación con HNE 35 μ M (A). Valor medio \pm SEM de la respiración medido a un potencial de 145 mV (B). Diferencias significativas respecto a KO (***, $p < 0,001$). Diferencias significativas respecto a KO LPS (##, $p < 0,01$). No se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre KO y KO LPS, ni entre KO +HNE y KO LPS +HNE ($n=6$).

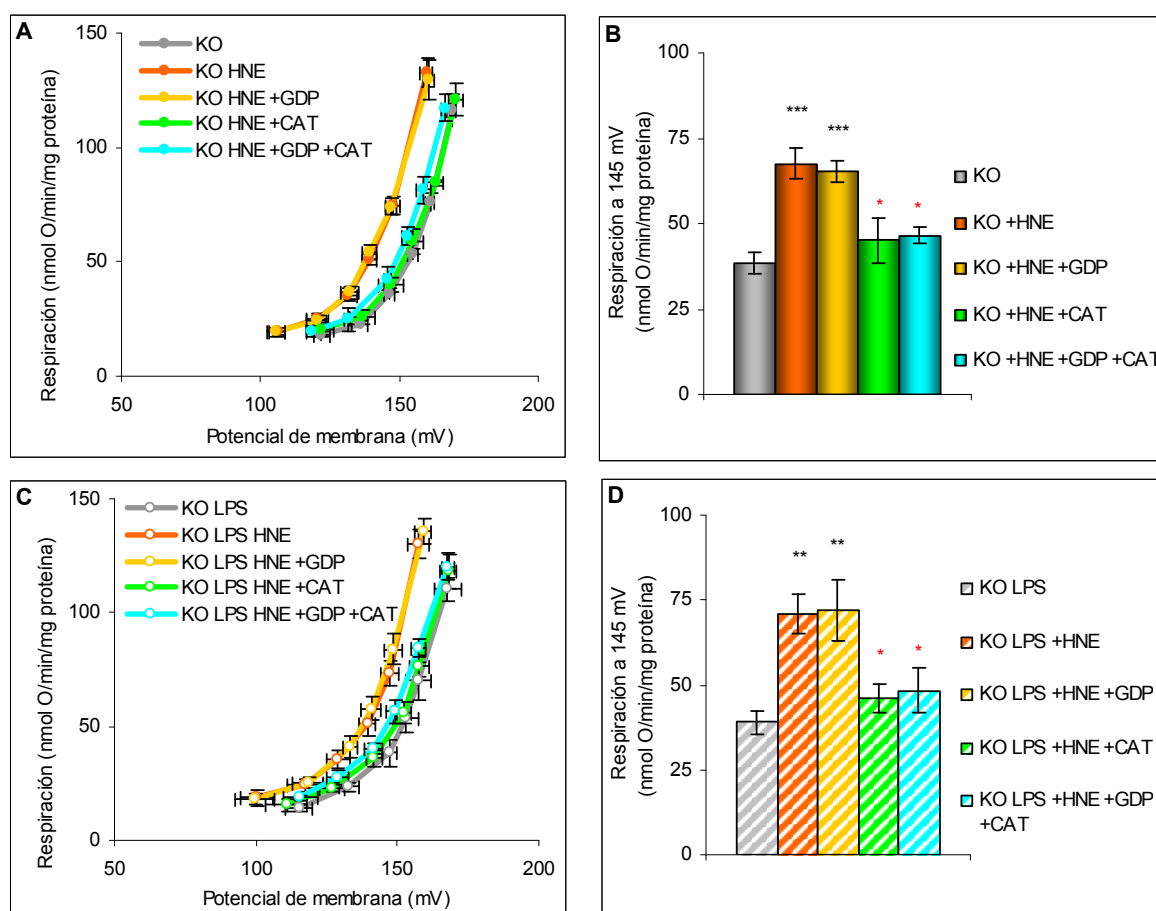


Figura R.23. Reversión con GDP y CAT de la activación inducida con HNE 35 μ M en mitocondrias de músculo KO (A,B) y KO LPS (C,D). Conductancia basal, activación con HNE y efecto del GDP, CAT y GDP+CAT (A,C). Valor medio \pm SEM de la respiración medido a un potencial de membrana de 145 mV (B,D). Diferencias significativas respecto a KO o KO LPS (**, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$). Diferencias significativas respecto a KO +HNE o KO LPS +HNE (*, $p < 0,05$) ($n=6$).

Estos resultados indicaban que el aumento en la conductancia a los protones inducido por el HNE en las mitocondrias aisladas de los ratones deficientes en la expresión de la UCP3 estaba totalmente mediado por el ANT, puesto que este aumento de la conductancia era revertido por CAT y no lo era por GDP, tanto en las mitocondrias KO como KO LPS.

Finalmente, a partir de los resultados reflejados en la Figura R. 21, se cuantificó la contribución de la UCP3 en la conductancia basal y en el aumento de la conductancia inducido por el HNE, restándole al valor de la respiración medido al potencial de 145 mV de las mitocondrias aisladas a partir del músculo esquelético de los ratones WT, el valor de la respiración medido al mismo potencial de las mitocondrias aisladas a partir del músculo esquelético de los ratones KO (Figura R. 24).

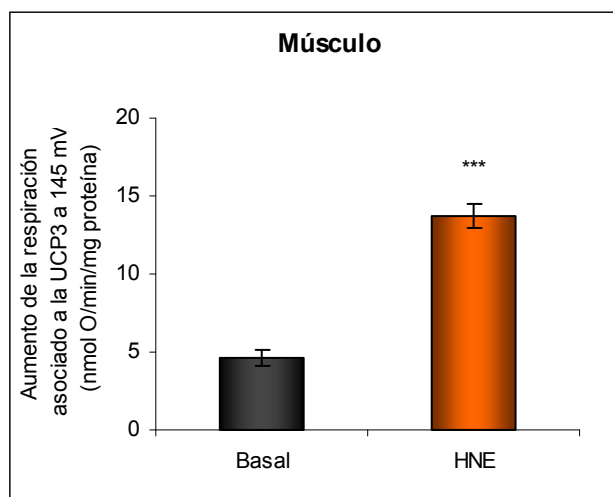


Figura R.24. Cuantificación de la implicación de la UCP3 en la conductancia basal y en el aumento de la conductancia a los protones inducido por el HNE en las mitocondrias del músculo esquelético. Datos obtenidos tras restar el valor de la respiración medido al potencial de membrana de 145 mV de las mitocondrias aisladas a partir del músculo esquelético de los ratones WT menos el valor de la respiración de las mitocondrias aisladas a partir del músculo esquelético de los ratones KO. Representación de los valores medios \pm SEM (n=10). Diferencias significativas respecto a la conductancia basal (***, $p < 0,05$) (n=10).

Según estos cálculos, la UCP3 cataliza el 10% ($4,59 \pm 0,49$ nmol O/(min·mg proteína)) de la conductancia a los protones en condiciones basales, incrementándose la implicación de esta proteína al adicionar HNE ($13,70 \pm 0,82$ nmol O/(min·mg proteína)).

La cuantificación del incremento en la tasa de respiración inducido por el HNE al potencial de membrana de 145 mV se determinó a partir de los resultados reflejados en la Figura R.21, restando el valor de la respiración en presencia de HNE del valor de la respiración en ausencia de HNE, tanto en las mitocondrias aisladas de ratones de tipo silvestre (30 nmol O/(min·mg proteína)) como en las mitocondrias aisladas de ratones UCP3KO (21 nmol O/(min·mg proteína)). A partir de estos dos incrementos, en presencia y en ausencia de la proteína UCP3, se determinó que la UCP3 cataliza en el músculo esquelético el 30% del aumento en la conductancia a los protones inducido por el HNE.

3.2.2. Implicación de la UCP3 en la activación de la conductancia a los protones inducida por el 4-hidroxinonenal en mitocondrias de corazón

Debido a que en el corazón también se expresa la UCP3, se procedió a realizar los mismos experimentos de activación con HNE que se hicieron en el músculo esquelético en mitocondrias aisladas a partir del corazón de ratones WT y KO, tratados y sin tratar con endotoxina.

En las mitocondrias aisladas a partir del corazón de ratones WT y WT LPS no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la conductancia basal de la membrana mitocondrial interna a los protones. En presencia del activador HNE, a diferencia de lo que ocurría en las mitocondrias aisladas del músculo esquelético, tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la conductancia a los protones de las mitocondrias WT y WT LPS (Figura R.25).

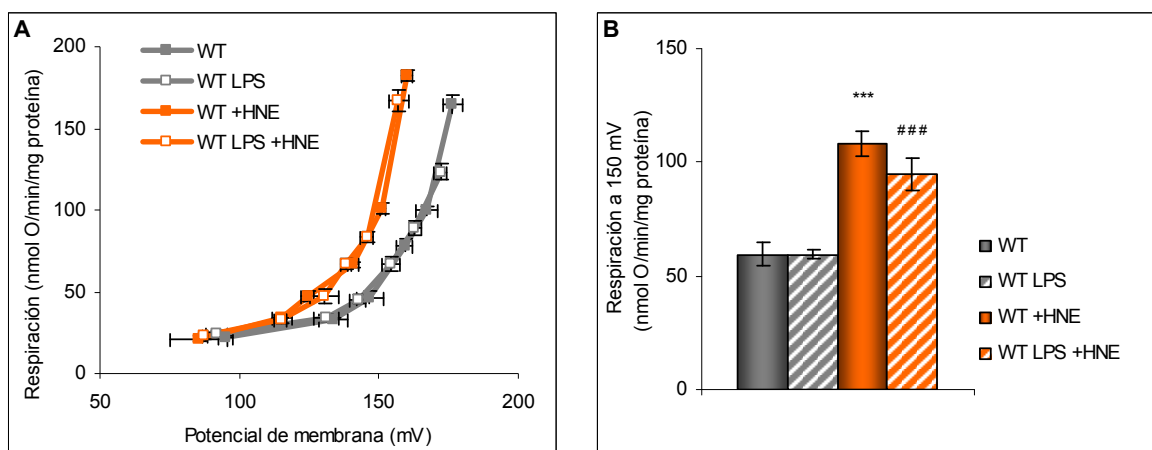


Figura R.25. Efecto del HNE sobre la conductancia de la membrana mitocondrial interna a los protones en mitocondrias de corazón WT y WT LPS. Conductancia basal y activación con HNE 35 μ M (A). Valor medio \pm SEM de la respiración medido a un potencial de 150 mV (B). Diferencias significativas respecto a WT (***, $p < 0,001$). Diferencias significativas respecto a WT LPS (###, $p < 0,001$). No se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre WT y WT LPS, ni entre WT +HNE y WT LPS +HNE ($n=6$).

Al igual que en el músculo, en las mitocondrias de corazón se intentó determinar si el aumento en la conductancia a los protones observado por la adición del HNE estaba mediado por la UCP3 o el ANT, mediante la adición de los inhibidores específicos de estas proteínas, **GDP** y **CAT**, respectivamente.

En la Figura R.26 puede observarse que con la adición de GDP no se consiguió revertir el efecto del HNE, tanto en las mitocondrias de corazón WT como en de WT LPS. En cambio, con la adición de CAT, un alto porcentaje del aumento en la conductancia a los protones inducido por el HNE fue revertido ($52 \pm 2\%$ en WT y $65 \pm 4\%$ en WT LPS). Con la adición conjunta de GDP y CAT, se obtuvo el mismo resultado que con la adición de únicamente CAT, es decir, una reversión parcial de la conductancia a los protones inducida por el HNE.

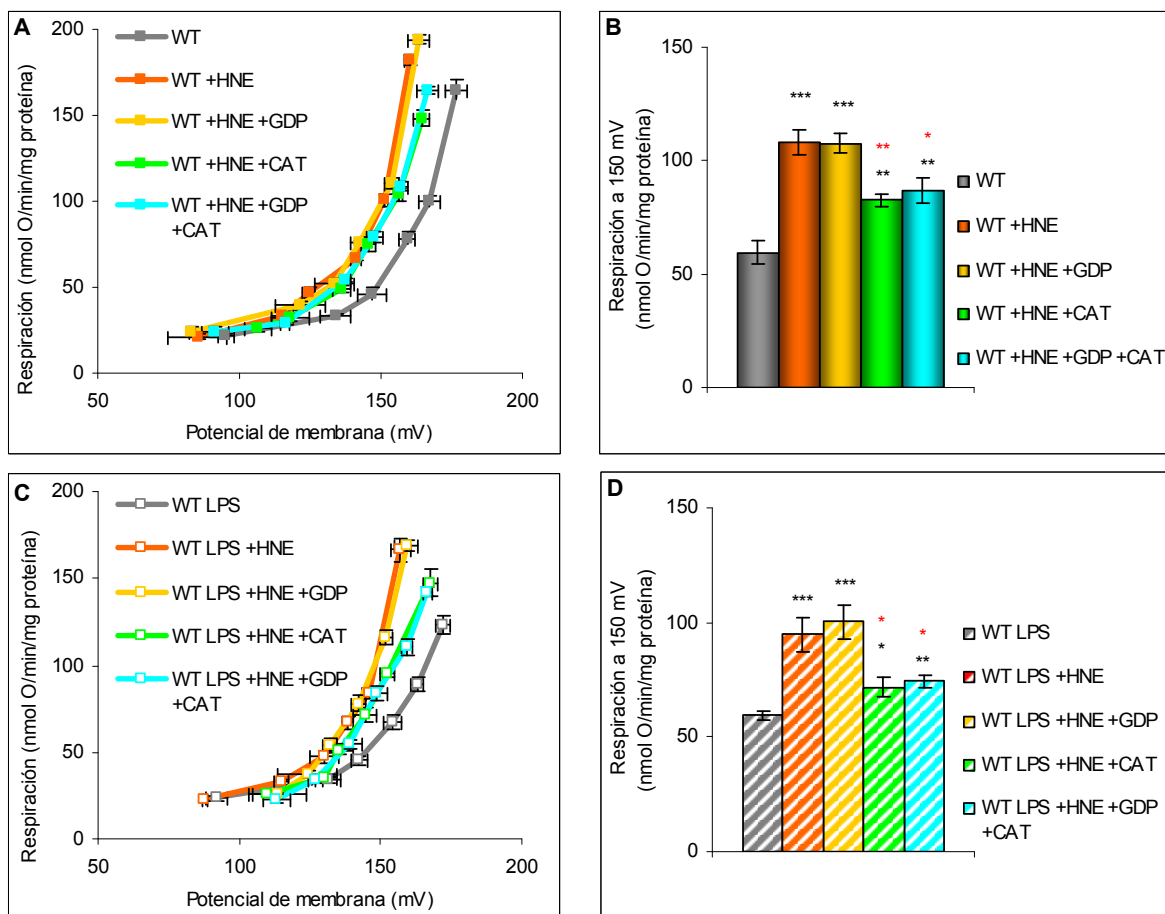


Figura R.26. Reversión con GDP y CAT de la activación inducida con HNE 35 μ M en mitocondrias de corazón WT (A,B) y WT LPS (C,D). Conductancia basal, activación con HNE y efecto del GDP, CAT y GDP+CAT (A,C). Valor medio \pm SEM de la respiración medido a un potencial de membrana de 150 mV (B,D). Diferencias significativas respecto a WT o WT LPS (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$). Diferencias significativas respecto a WT +HNE o WT LPS +HNE (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$) (n=6).

En resumen, en las mitocondrias de corazón WT y WT LPS se obtuvieron resultados muy similares. El HNE produjo una activación de la conductancia a los protones que no pudo ser revertida con GDP, y sólo parcialmente con la adición de CAT o la adición conjunta de GDP y CAT.

En las mitocondrias aisladas a partir del corazón de los ratones KO también se analizó la conductancia a los protones en condiciones basales, así como en presencia del activador HNE. En la Figura R.27 se compara la conductancia a los protones entre las mitocondrias de corazón WT y KO, en ausencia de endotoxina. Según estos datos, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las mitocondrias de ambos genotipos, tanto en condiciones basales como en presencia del activador HNE.

De la misma manera que en las mitocondrias de corazón WT, se aislaron mitocondrias a partir de animales KO a los que se les inyectó solución salina (KO) y endotoxina (KO LPS). Tanto en condiciones basales como en presencia de HNE, se determinó que no existen diferencias

estadísticamente significativas en la conductancia a los protones entre las mitocondrias procedentes de animales KO y KO LPS (Figura R.28).

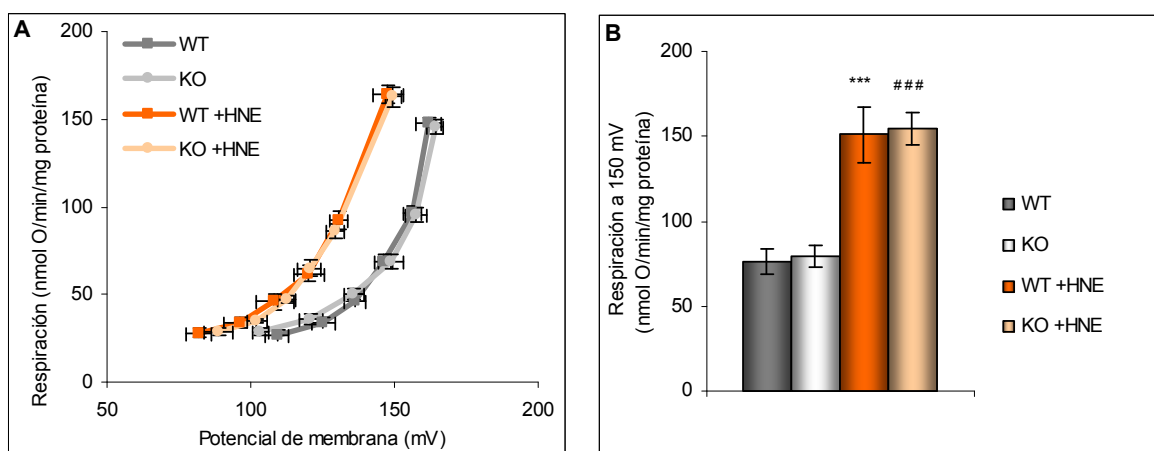


Figura R.27. Efecto del HNE sobre la conductancia de la membrana mitocondrial interna a los protones en mitocondrias de corazón WT y KO. Conductancia basal y activación con HNE 35 μ M (A). Valor medio \pm SEM de la respiración medido a un potencial de 150 mV (B). Diferencias significativas respecto a WT (***, $p < 0,001$). Diferencias significativas respecto a KO (###, $p < 0,001$). No se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre WT y KO, ni entre WT + HNE y KO + HNE ($n = 6$).

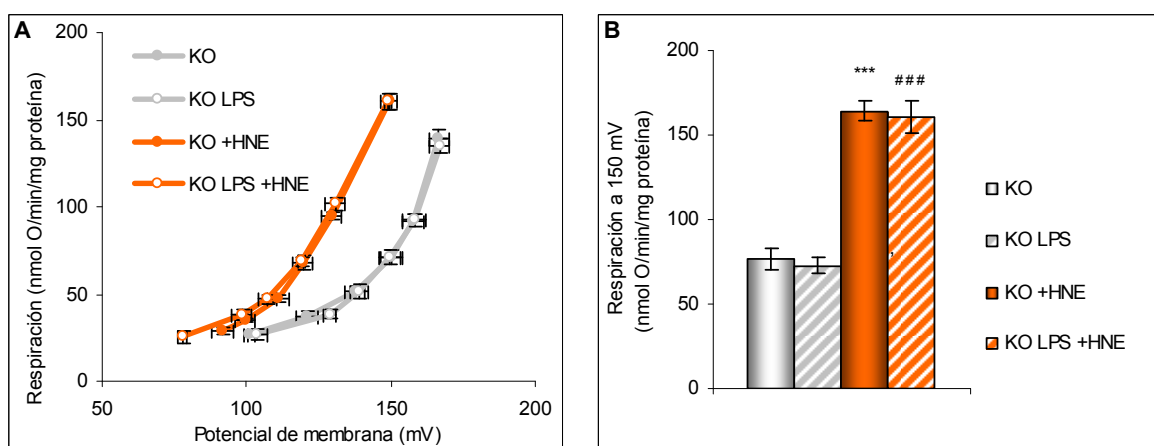


Figura R.28. Efecto del HNE sobre la conductancia de la membrana mitocondrial interna a los protones en mitocondrias de corazón KO y KO LPS. Conductancia basal y activación con HNE 35 μ M (A). Valor medio \pm SEM de la respiración medido a un potencial de 150 mV (B). Diferencias significativas respecto a KO (***, $p < 0,001$). Diferencias significativas respecto a KO LPS (###, $p < 0,001$). No se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre KO y KO LPS, ni entre KO + HNE y KO LPS + HNE ($n = 6$).

El aumento en la conductancia a los protones inducido por el HNE en las mitocondrias de corazón KO y KO LPS se intentó revertir con GDP y CAT. Como puede observarse en la Figura R.29, tanto en las mitocondrias KO, como KO LPS, con la adición de GDP no se consiguió revertir el aumento en la conductancia a los protones inducido por el HNE, mientras que la adición de CAT produjo una reversión parcial del aumento inducido por el HNE ($73 \pm 6\%$ en KO y $67 \pm 7\%$ en KO LPS). La adición conjunta de GDP y CAT produjo un efecto similar al observado al añadir únicamente CAT, tanto en las mitocondrias procedentes de animales KO como KO LPS.

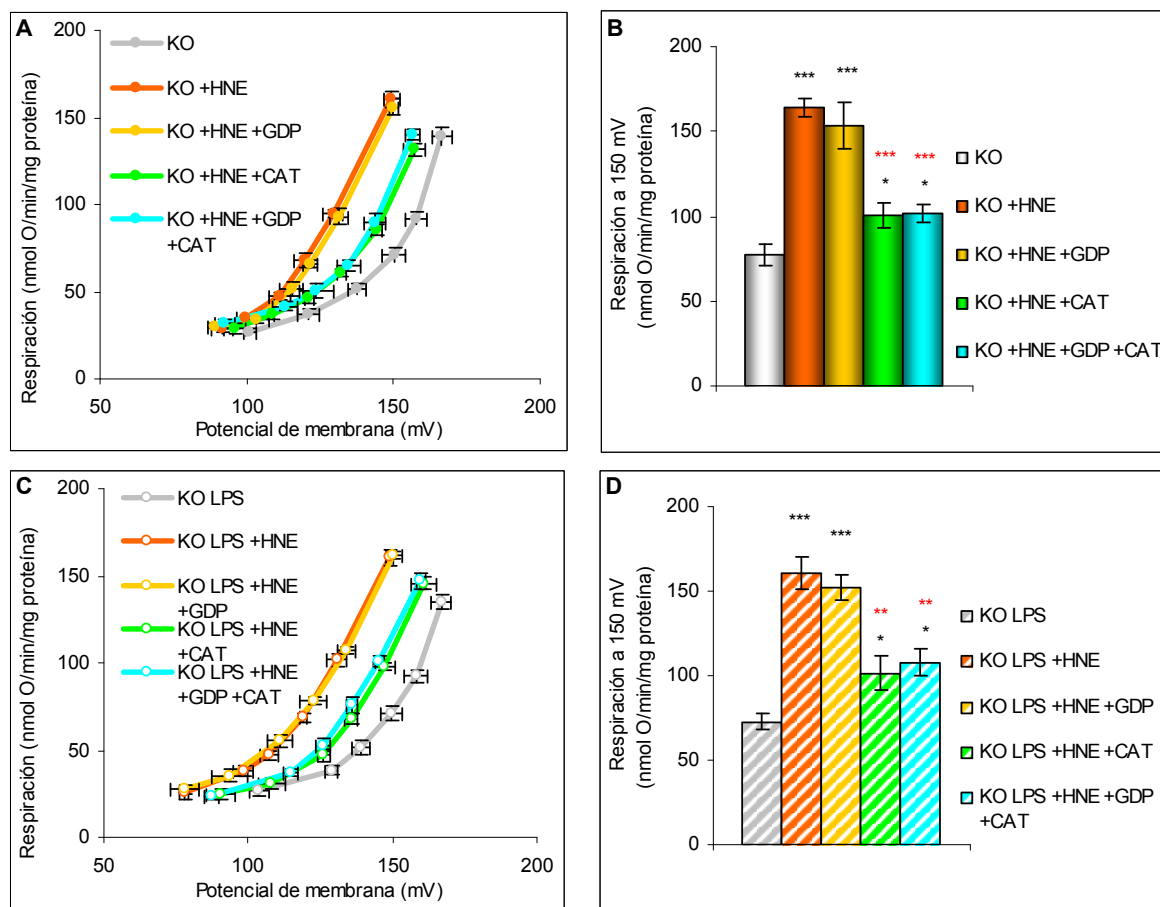


Figura R.29. Reversión con GDP y CAT de la activación inducida con HNE 35 μ M en mitocondrias de corazón KO (A,B) y KO LPS (C,D). Conductancia basal, activación con HNE y efecto del GDP, CAT y GDP+CAT (A,C). Valor medio \pm SEM de la respiración medido a un potencial de membrana de 150 mV (B,D). Diferencias significativas respecto a KO o KO LPS (*, $p < 0,05$; ***, $p < 0,001$). Diferencias significativas respecto a KO +HNE o KO LPS +HNE (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$) ($n = 6$).

En conclusión, en las mitocondrias de corazón KO y KO LPS se obtuvieron resultados muy similares entre sí y, a su vez, similares a los resultados obtenidos en las mitocondrias de corazón WT y WT LPS, es decir, el aumento en la conductancia a los protones inducido por el HNE no era inhibido por GDP y tan sólo parcialmente por CAT o la adición conjunta de CAT y GDP.

Finalmente, al cuantificar la contribución de la UCP3 en la conductancia basal y en el aumento en la conductancia a los protones inducido por el HNE en las mitocondrias aisladas a partir del corazón (al igual que se realizó para las mitocondrias del músculo esquelético en la Figura R.24) mediante la resta del valor de la respiración medido a 150 mV de las mitocondrias WT menos el valor de las mitocondrias KO de los datos representados en la Figura R.27, se determinó que en el corazón la UCP3 no catalizaba de manera significativa la conductancia de la membrana mitocondrial interna a los protones en nuestras condiciones experimentales.

3.3. EFECTO DE LOS INHIBIDORES GDP Y CARBOXIATRACTILÓSIDO SOBRE LA CONDUCTANCIA BASAL DE LA MEMBRANA MITOCONDRIAL INTERNA A LOS PROTONES

Con la finalidad de determinar si la UCP3 o el ANT ejercen algún efecto sobre la conductancia basal de la membrana mitocondrial interna a los protones, se realizaron diferentes ensayos en presencia de los inhibidores GDP y CAT, y en ausencia de los activadores superóxido y HNE, en mitocondrias aisladas a partir del músculo esquelético y el corazón de ratones WT, WT LPS, KO y KO LPS.

3.3.1. Efecto de los inhibidores GDP y carboxiatractilósido sobre la conductancia basal a los protones en las mitocondrias de músculo esquelético

En ausencia de los activadores superóxido y HNE, el efecto de la adición de GDP y CAT sobre la conductancia basal a los protones en las mitocondrias del músculo esquelético de los animales WT y WT LPS aparece reflejado en la Figura R.30, mientras que el efecto de la adición de dichos inhibidores sobre la conductancia basal a los protones en las mitocondrias del músculo esquelético de los animales KO y KO LPS aparece reflejado en la Figura R.31.

A partir de los resultados de los apartados A, B, C y D de la Figura R.30 se calculó el valor de la respiración al potencial de 145 mV (apartados E y F), observándose un valor de respiración menor en presencia de GDP y de CAT, siendo dicha tendencia más marcada con la adición de este segundo inhibidor. Sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la ausencia o presencia de los inhibidores, tanto en las mitocondrias aisladas a partir de los ratones WT (Figura R.30, E) como de los ratones WT LPS (Figura R.30, F).

Por otro lado, a partir de los resultados de los apartados A, B, C y D de la Figura R.31 se calculó el valor de la respiración al potencial de 145 mV (apartados E y F), observándose un valor de respiración menor en presencia de GDP, a pesar de no acompañarse esta tendencia de significación estadística. Este valor de respiración es menor en presencia de CAT, encontrándose en este caso diferencias estadísticamente significativas entre los valores de respiración obtenidos en condiciones basales y en presencia de este inhibidor, tanto en las mitocondrias aisladas de a partir de los ratones KO (Figura R.31, E) como de los ratones KO LPS (Figura R.31, F).

Estos resultados implican que el CAT ejerce cierto efecto inhibitor sobre la conductancia basal de la membrana mitocondrial interna a los protones en las condiciones estudiadas y que, por tanto, el ANT está implicado en la conductancia basal.

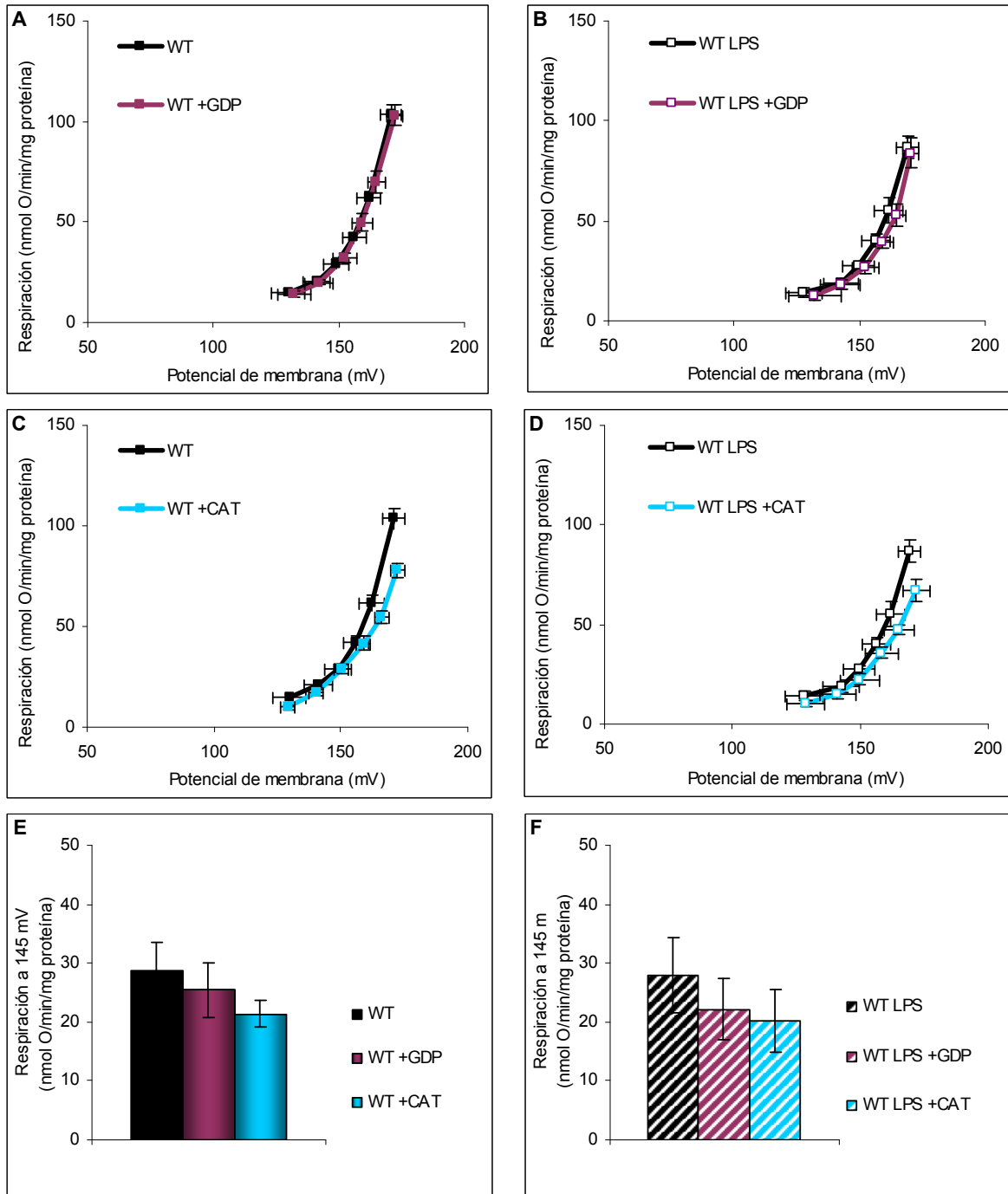


Figura R.30. Efecto del GDP y el CAT sobre la conductancia basal de la membrana mitocondrial interna a los protones en mitocondrias de músculo WT (A,C,E) y WT LPS (B,D,F). Conductancia basal en presencia y ausencia de GDP 0,5 mM (A,B). Conductancia basal en presencia y ausencia de CAT 2,5 μ M (C,D). Valor medio \pm SEM de la respiración medido a un potencial de 145 mV (E,F). No se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre WT y la adición de los inhibidores, ni entre WT LPS y la adición de los inhibidores (n=6).

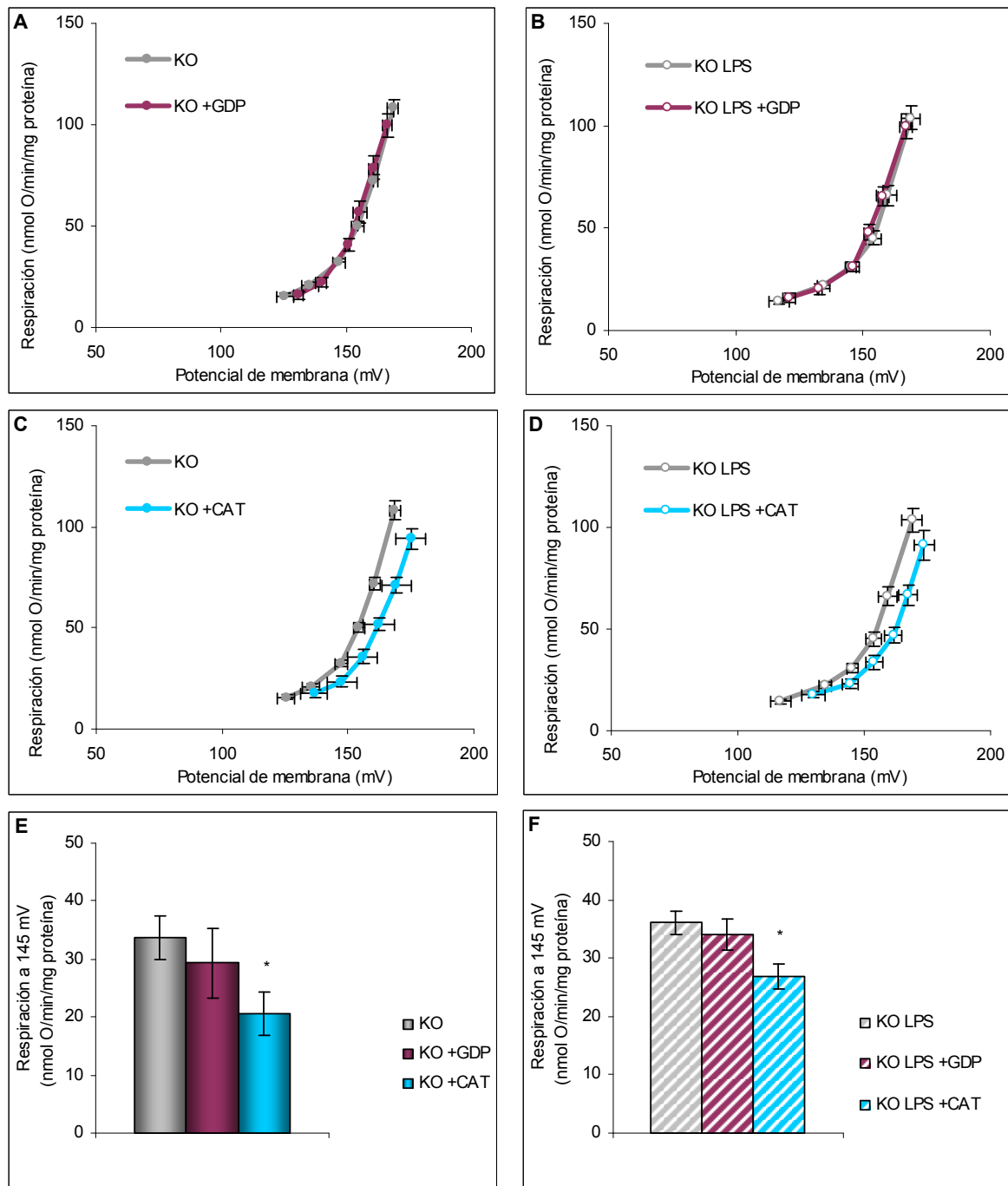


Figura R.31. Efecto del GDP y el CAT sobre la conductancia basal de la membrana mitocondrial interna a los protones en mitocondrias de músculo KO (A,C,E) y KO LPS (B,D,F). Conductancia basal en presencia y ausencia de GDP 0,5 mM (A,B). Conductancia basal en presencia y ausencia de CAT 2,5 μ M (C,D). Valor medio \pm SEM de la respiración medido a un potencial de 145 mV (E,F). Diferencias estadísticamente significativas respecto a KO o KO LPS (*, $p < 0,05$) ($n=6$).

3.3.2. Efecto de los inhibidores GDP y carboxiatractilósido sobre la conductancia basal a los protones en las mitocondrias de corazón

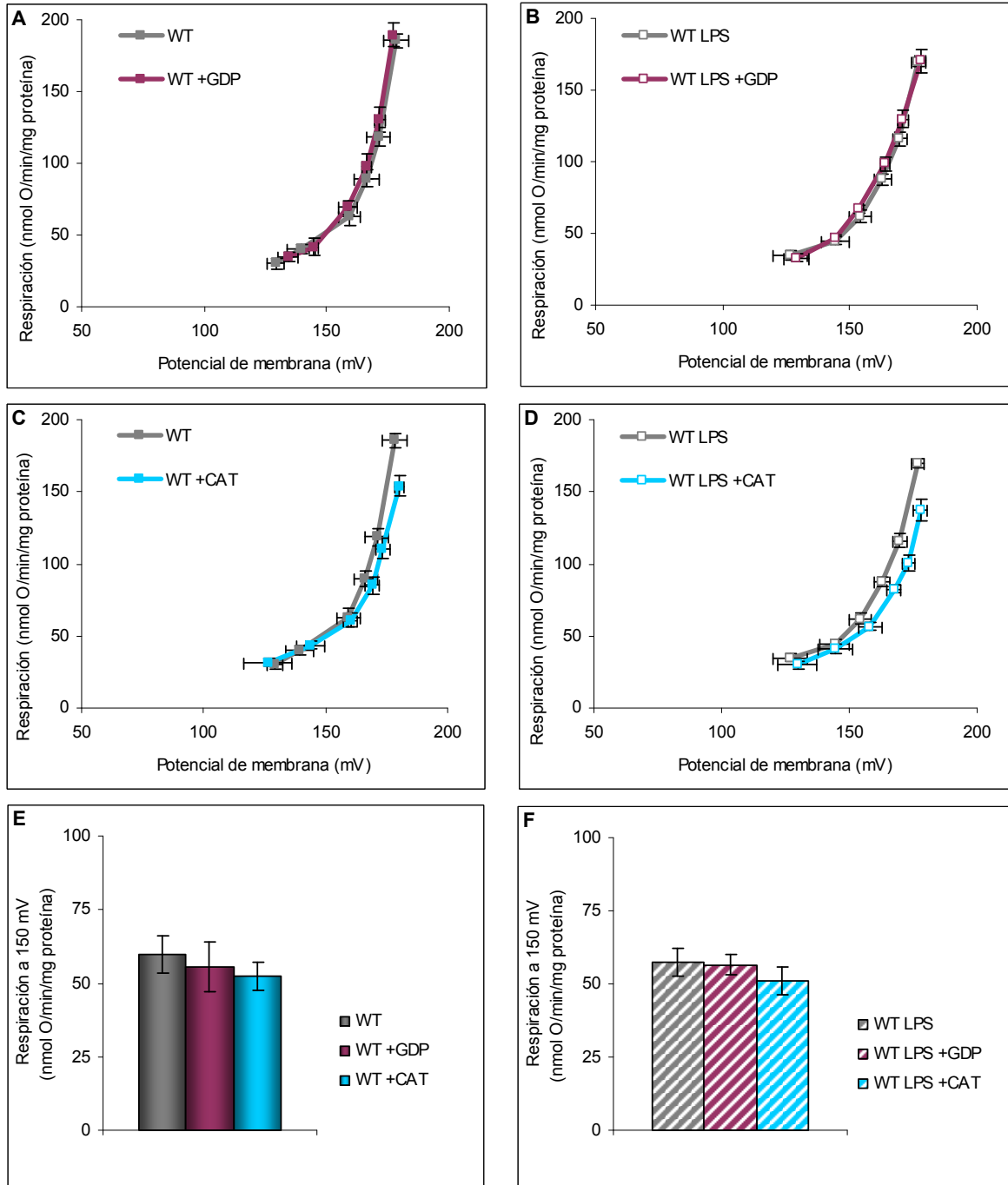


Figura R.32. Efecto del GDP y el CAT sobre la conductancia basal de la membrana mitocondrial interna a los protones en mitocondrias de corazón WT (A,C,E) y WT LPS (B,D,F). Conductancia basal en presencia y ausencia de GDP 0,5 mM (A,B). Conductancia basal en presencia y ausencia de CAT 2,5 μ M (C,D). Valor medio \pm SEM de la respiración medido a un potencial de 150 mV (E,F). No se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre WT y la adición de los inhibidores, ni entre WT LPS y la adición de los inhibidores (n=6).

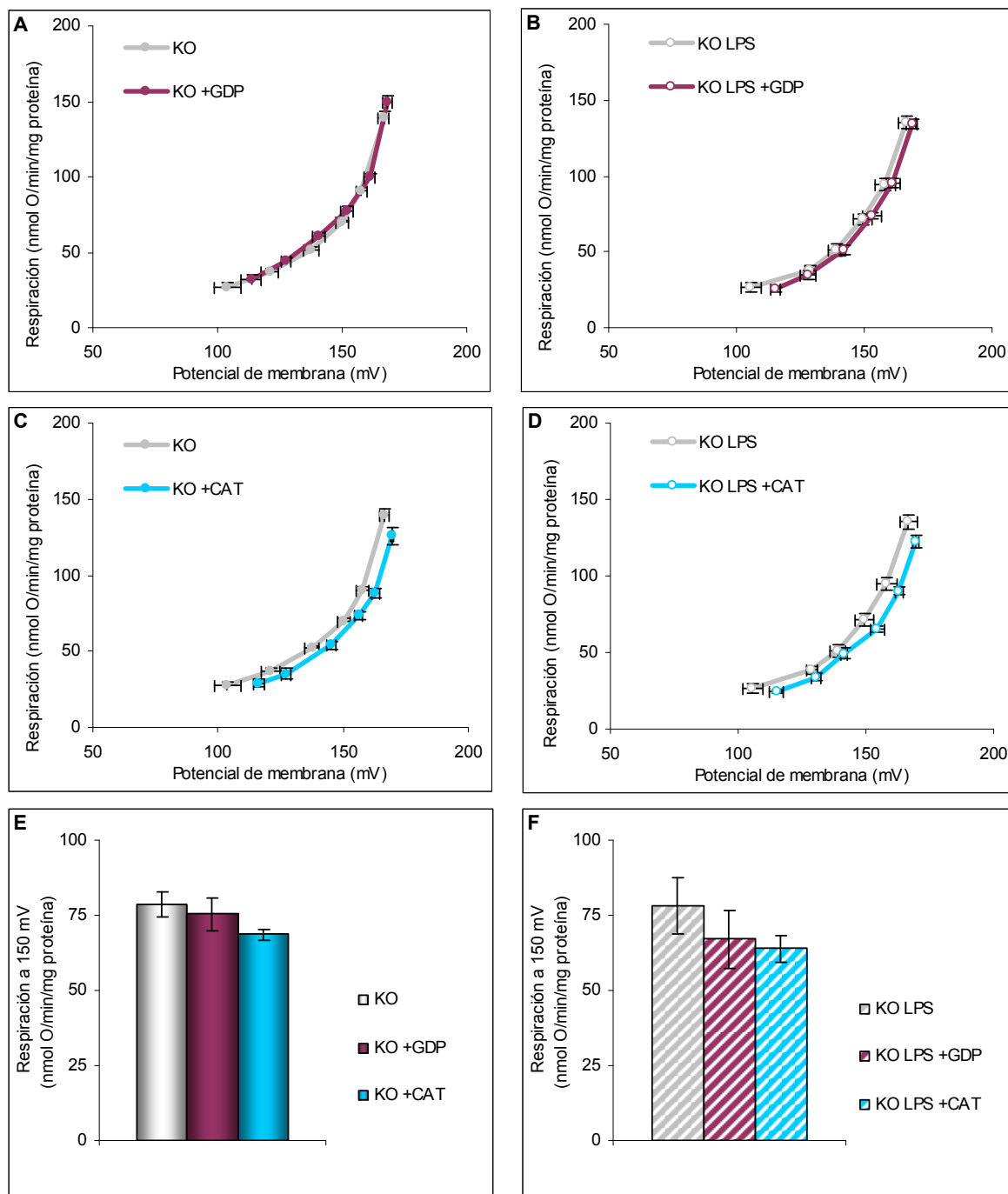


Figura R.33. Efecto del GDP y el CAT sobre la conductancia basal de la membrana mitocondrial interna a los protones en mitocondrias de corazón KO (A,C,E) y KO LPS (B,D,F). Conductancia basal en presencia y ausencia de GDP 0,5 mM (A,B). Conductancia basal en presencia y ausencia de CAT 2,5 μ M (C,D). Valor medio \pm SEM de la respiración medido a un potencial de 150 mV (E,F). No se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre KO y la adición de los inhibidores, ni entre KO LPS y la adición de los inhibidores (n=6).

En condiciones basales, el efecto de la adición de GDP y CAT sobre la conductancia a los protones en las mitocondrias del corazón de los animales WT y WT LPS aparece reflejado en la Figura R.32, mientras que el efecto de la adición de dichos inhibidores sobre la conductancia basal a los protones en las mitocondrias del corazón de los animales KO y KO LPS aparece reflejado en la Figura R.33.

A partir de los resultados de los apartados A, B, C y D de las Figuras R.32 y R.33 se calculó el valor de la respiración al potencial de 150 mV (apartados E y F), observándose una ligera tendencia a presentar una respiración menor en presencia de GDP (apenas perceptible) y de CAT (algo más marcada). Sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la ausencia o presencia de los inhibidores, tanto en las mitocondrias aisladas a partir de los ratones WT (Figura R.32, E) como de los ratones WT LPS (Figura R.32, F), KO (Figura R.33, E) y KO LPS (Figura R.33, F).

Estos resultados indicaron que, en el corazón, la conductancia basal de la membrana mitocondrial interna a los protones presenta cierta tendencia a ser inhibida en presencia de CAT y que, por lo tanto, el ANT está implicado en la conductancia basal.

4. ESTUDIO DEL PAPEL DE LA PROTEÍNA UCP3 EN LOS PROCESOS DE ISQUEMIA-REPERFUSIÓN

Con el objetivo de determinar si la proteína UCP3 tiene algún papel en la respuesta frente a un proceso de isquemia-reperfusión, se aplicó un protocolo de **anoxia-reoxigenación in vitro** en mitocondrias aisladas a partir del corazón de ratones de tipo silvestre, que expresan la UCP3 (WT), y mitocondrias aisladas a partir del corazón de ratones deficientes en la expresión de la UCP3 (KO). El mismo protocolo de anoxia-reoxigenación fue aplicado también en cardiomiocitos neonatales de rata transfectados con el gen que codifica la proteína UCP3.

4.1. ESTUDIO DEL PAPEL DE LA UCP3 EN UN PROCESO DE ANOXIA-REOXIGENACIÓN EN MITOCONDRIAS AISLADAS A PARTIR DEL CORAZÓN

Con la finalidad de determinar si la proteína UCP3 tiene algún papel en la respuesta frente a un proceso de anoxia-reoxigenación, se aislaron mitocondrias a partir del corazón de ratones de tipo silvestre (WT) y ratones deficientes en la expresión de la UCP3 (KO). Ambos tipos de mitocondrias se dispusieron en cada una de las cámaras del respirómetro (0,2 mg de proteína/ml de medio KHE con 0,3% BSA), adicionándose rotenona 5 μ M, succinato 4 mM y ADP 1 mM. Una vez que las mitocondrias consumieron todo el oxígeno existente en la cámara, se incubaron durante **20 min en anoxia**. Tras este periodo, las mitocondrias se lavaron

mediante centrifugación, se reoxigenaron y se volvieron a incubar en presencia de rotenona, succinato y ADP. El protocolo utilizado aparece reflejado en el registro de la Figura R.34.

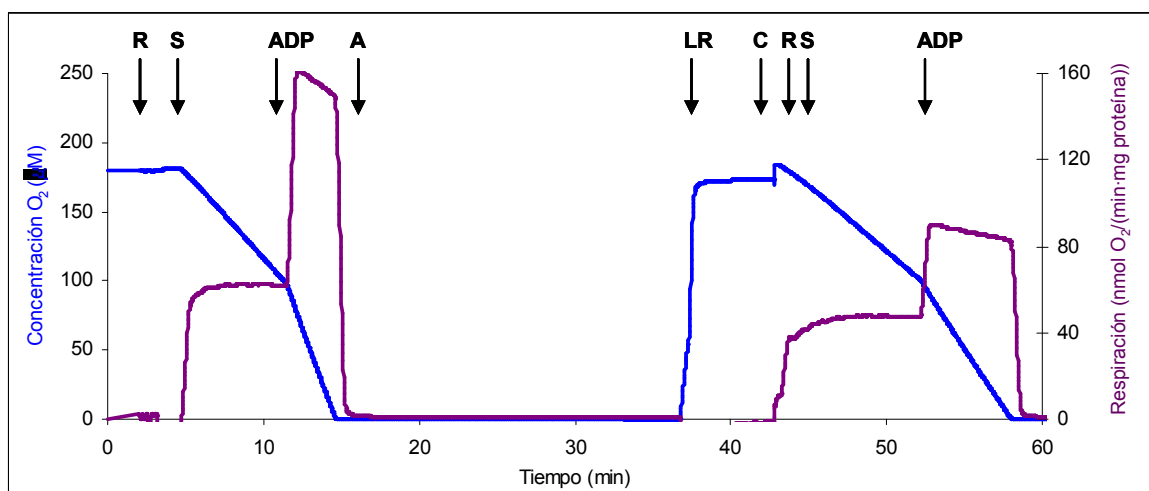


Figura R.34. Respuesta frente a un proceso de anoxia-reoxigenación en mitocondrias aisladas a partir del corazón. Tras adicionar las mitocondrias a la cámara del respirómetro, se añadió rotenona 5 μ M (R) y succinato 4 mM (S), iniciándose la respiración. Tras la adición de ADP 1 mM, el consumo de oxígeno se incrementó, hasta alcanzarse el estado de anoxia (A). En estas condiciones las mitocondrias se incubaron durante 20 min. Seguidamente, las mitocondrias se lavaron y reoxigenaron (LR), se cerró la cámara (C), y se volvió a incubar con R, S y ADP. La línea azul representa la concentración de oxígeno (μ M) mientras que la línea morada representa la respiración mitocondrial (nmol O_2 /(min·mg proteína)).

Tras la realización de los experimentos, se determinó el valor de la respiración en presencia de succinato y ADP, tanto previamente (Pre-AR) como posteriormente (Post-AR) al proceso de anoxia-reoxigenación. Estos datos aparecen reflejados en la Figura R.35, donde se puede observar que la tasa de respiración Pre-AR y Post-AR es muy similar en presencia de succinato, mientras que con la adición de ADP, las mitocondrias aisladas a partir del corazón de ratones KO presentan un valor de respiración superior al observado en las mitocondrias aisladas a partir del corazón de ratones WT.

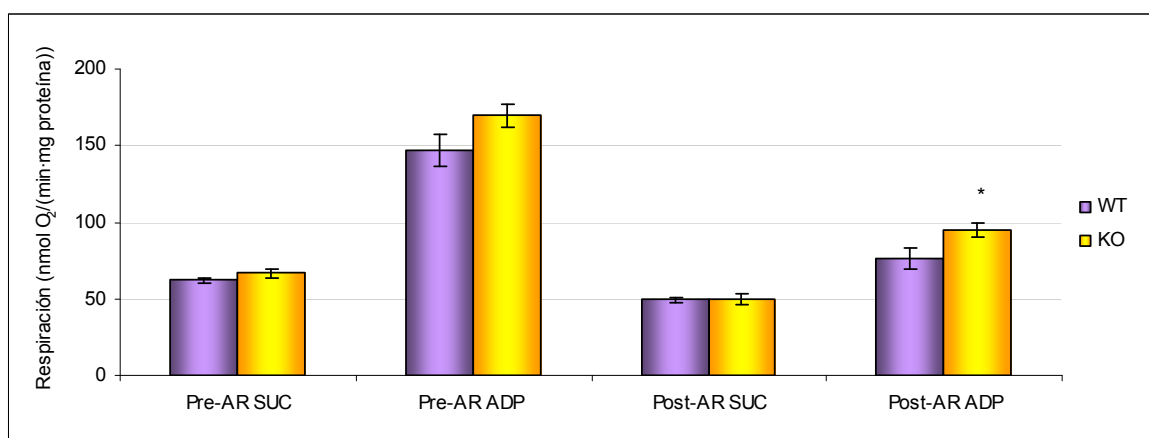


Figura R.35. Valores de respiración de mitocondrias aisladas a partir del corazón de ratones WT y KO. Dichos valores fueron medidos previa- (Pre-AR) y posteriormente (Post-AR) a un proceso de anoxia-reoxigenación, en presencia de succinato (SUC) y ADP. Representación del valor medio \pm SEM (n=8). Diferencias estadísticamente significativas respecto a WT (*, $p < 0,05$).

A partir de estos datos se determinó la relación entre la tasa de respiración en presencia de succinato más ADP y en presencia de únicamente succinato, previa- y posteriormente al proceso de anoxia-reoxigenación (Figura R.36, A), así como la relación entre la tasa de respiración medida posterior- y previamente al proceso de anoxia-reoxigenación, en presencia de succinato, y en presencia de succinato más ADP (Figura R.36, B).

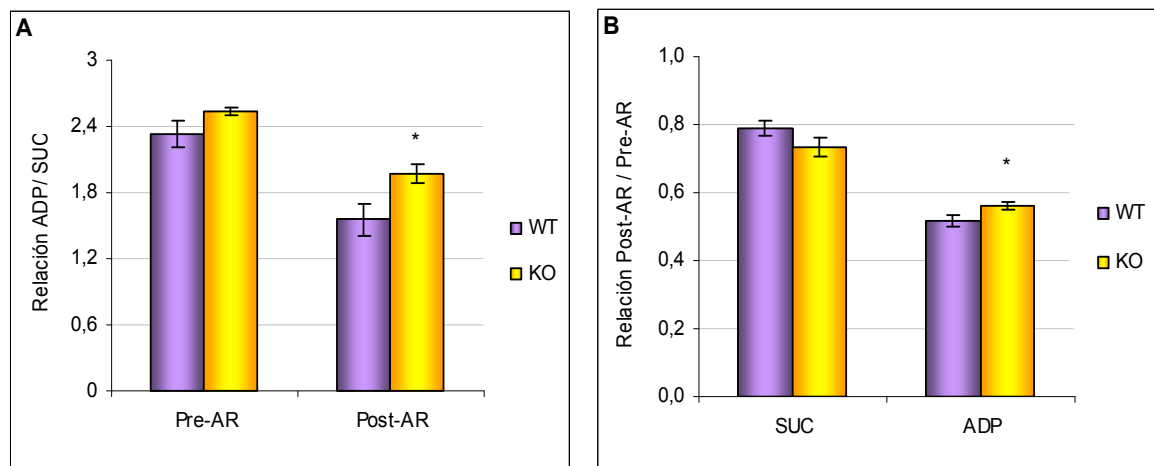


Figura R.36. Relación entre el valor de la respiración medido en presencia de succinato (SUC) más ADP y el valor medido en presencia de únicamente SUC de mitocondrias de ratones WT y KO aisladas a partir del corazón, y obtenidos previa- (Pre-AR) y posteriormente (Post-AR) a un proceso de anoxia-reoxigenación (A). Relación entre el valor de la respiración medido posterior- y previamente a un proceso de anoxia-reoxigenación en mitocondrias WT y KO, aisladas a partir del corazón, en presencia de SUC y en presencia de SUC más ADP (B). Valor medio \pm SEM (n=8). Diferencias estadísticamente significativas respecto a WT (*, $p < 0,05$).

Al comparar los valores de respiración Pre-AR y Post-AR (Figura R.36), se determinó que, en presencia de succinato el valor de la respiración disminuyó un 21% en las mitocondrias de ratones WT, y un 27% en las mitocondrias de ratones KO, no considerándose estadísticamente significativa esta diferencia ($p > 0,05$). Sin embargo, en presencia de ADP, la tasa de respiración disminuyó un 48% en las mitocondrias de ratones WT y un 44% en las mitocondrias de ratones KO, resultando esta diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$). Estos resultados sugieren que, en presencia de succinato, las mitocondrias procedentes de animales WT recuperan mejor la función respiratoria tras un proceso de anoxia-reoxigenación que las mitocondrias obtenidas de animales KO, a pesar de no ser estadísticamente significativa esta diferencia. Sin embargo, en presencia de ADP, la función respiratoria tras un proceso de anoxia-reoxigenación es mejor recuperada en las mitocondrias de ratones KO que en las de tipo silvestre, considerándose estadísticamente significativa esta diferencia ($p < 0,05$).

4.2. ESTUDIO DEL PAPEL DE LA UCP3 EN UN PROCESO DE ANOXIA-REOXIGENACIÓN EN CARDIOMIOCITOS NEONATALES DE RATA

Un estudio similar se llevó a cabo en un modelo celular: cardiomiocitos neonatales de rata. En estas células se expresó la proteína UCP3 mediante infección con lentivirus, con la finalidad de

determinar si la expresión de esta proteína tenía algún efecto sobre la respiración celular tras un proceso de anoxia-reoxigenación.

Los cardiomiocitos neonatales de rata fueron aislados según se indica en el apartado 4.1 de Materiales y Métodos, e infectados con lentivirus el mismo día de su aislamiento. Para estos ensayos se utilizaron lentivirus transfectados con un vector que codifica la proteína UCP3, y lentivirus transfectados con el mismo vector vacío (sin ningún inserto). Tras la infección (48 h), los cardiomiocitos fueron incubados en medio CM durante 4 días a 37°C y en atmósfera al 5% de CO₂ (apartado 4.4.2 de Materiales y Métodos).

Transcurrido este tiempo, se recogieron los cardiomiocitos de 3 pocillos de la placa p6 en la que habían sido cultivados, se contaron (aproximadamente $2 \cdot 10^6$) y se dispusieron en la cámara del respirómetro de alta resolución a 37°C. Inicialmente se permitió la oxigenación de los cardiomiocitos durante 3 min, para seguidamente cerrar la cámara del respirómetro y dejar que las células consumieran la totalidad del oxígeno existente en la cámara. Transcurridos 20 min en anoxia, se abrió la cámara del respirómetro permitiendo la entrada de oxígeno y la reoxigenación de los cardiomiocitos. A continuación, se volvió a cerrar la cámara y se observó cómo los cardiomiocitos infectados consumían nuevamente el oxígeno de la cámara. El protocolo utilizado aparece reflejado en el registro de la Figura R.37.

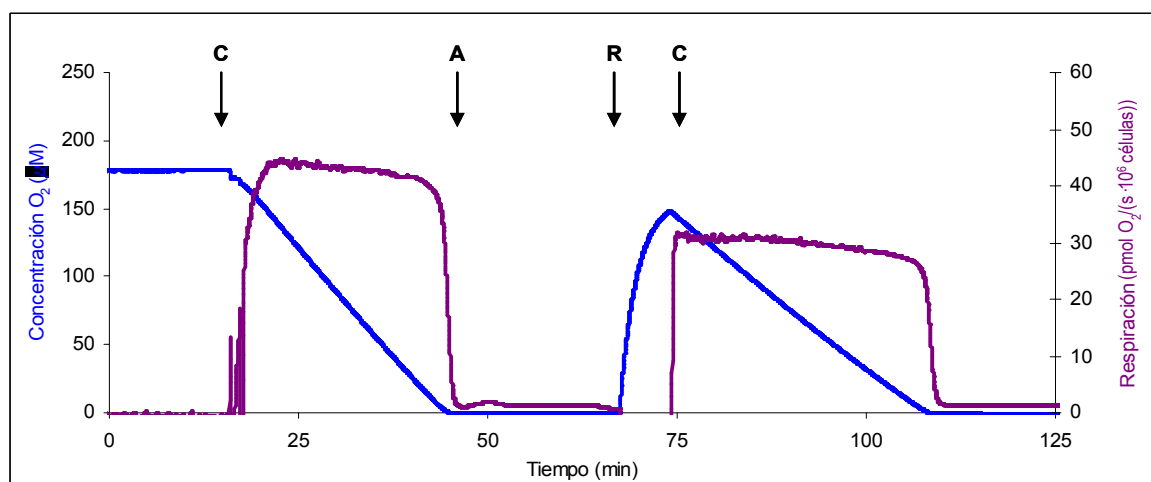


Figura R. 37. Respuesta frente a un proceso de anoxia-reoxigenación en cardiomiocitos neonatales de rata. Tras resuspender los cardiomiocitos en la cámara del respirómetro, se cerró (C) y se esperó a que los cardiomiocitos consumieran el oxígeno disuelto en la cámara. A continuación los cardiomiocitos se incubaron en anoxia (A) durante 20 min. Seguidamente, se abrió la cámara para la reoxigenación de los cardiomiocitos (R) y, a continuación, se volvió a cerrar (C), dejando que las células consumieran de nuevo el oxígeno de la cámara. La línea azul representa la concentración de oxígeno (μM), mientras que la línea morada representa la respiración celular ($\text{pmol O}_2/(\text{s} \cdot 10^6 \text{ células})$).

A partir de estos registros, se determinó el valor de la respiración a la concentración de 30 μM de oxígeno previa- (Pre-AR) y posteriormente (Post-AR) al proceso de anoxia-reoxigenación en cardiomiocitos transfectados con el vector de la UCP3 y cardiomiocitos transfectados con el

vector vacío (sin inserto). Además, se determinó la relación entre el valor de la respiración Post-AR y Pre-AR en ambos grupos de cardiomiocitos (Figura R.38).

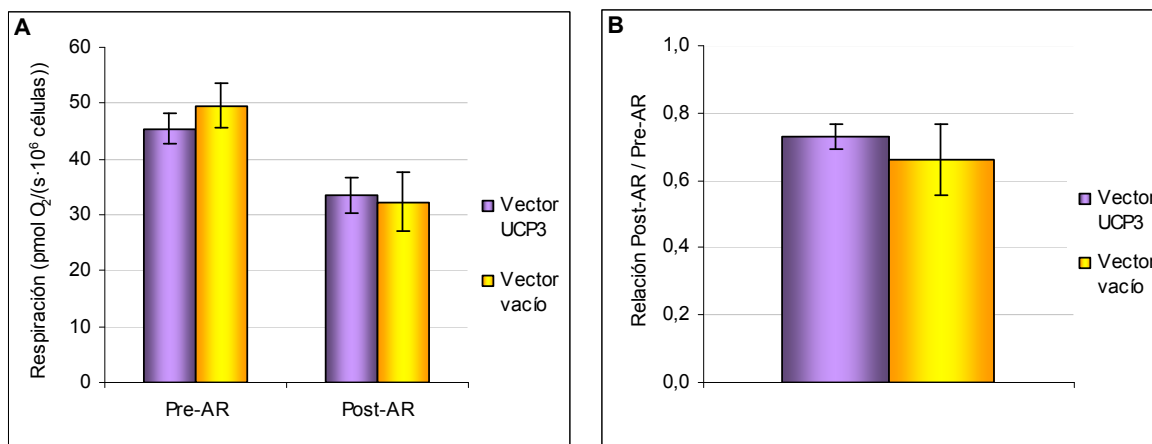


Figura R.38. Valores de respiración de cardiomiocitos neonatales de rata, previa- (Pre-AR) y posteriormente (Post-AR) a un proceso de anoxia-reoxigenación (A). Relación entre el valor de la respiración medido posterior- (Post-AR) y previamente (Pre-AR) a un proceso de anoxia-reoxigenación en cardiomiocitos neonatales de rata (B). Representación del valor medio \pm SEM. No se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los cardiomiocitos transfectados con el vector de UCP3 y los transfectados con el vector vacío (n=5).

En la Figura R.38 se observa que la tasa de respiración en los cardiomiocitos transfectados con el vector de la UCP3 y los cardiomiocitos transfectados con el vector vacío (sin inserto) es similar, y que, tras el proceso de anoxia-reoxigenación, presentan una tasa de respiración también parecida. Sin embargo, al calcular la relación entre el valor de la respiración Post-AR y Pre-AR para ambos grupos de cardiomiocitos, los que expresan la UCP3 tienden a recuperar mejor la función respiratoria tras el proceso de anoxia-reoxigenación (73%) que los que no lo hacen (66%), aunque esta tendencia no alcanzó la significación estadística.

5. ESTUDIO DE LA POSIBLE PRESENCIA DE LA ÓXIDO NÍTRICO SINTASA MITOCONDRIAL EN EL MÚSCULO ESQUELÉTICO

La existencia de la isoforma mitocondrial de la enzima óxido nítrico sintasa (mtNOS) es controvertida. Con la finalidad de estudiar la posible existencia de esta enzima en el músculo esquelético, se aislaron mitocondrias a partir de ratones de tipo silvestre a los cuales se les había inoculado 24 h antes una dosis de endotoxina de 12 mg/kg de peso corporal.

El estudio de la mtNOS se realizó a través de dos aproximaciones: una directa, mediante la cuantificación de la producción de óxido nítrico (NO) por esta enzima, y otra indirecta, mediante la medida de la inhibición de la respiración que se produce en presencia de este gas. Ambas aproximaciones precisaron de una optimización previa de las condiciones experimentales, por

lo que se realizó un **estudio instrumental comparativo**, en relación a las medidas de consumo de oxígeno y de producción de NO, entre un respirómetro convencional tipo Clark (Hansatech) y un respirómetro de alta resolución (Oxygraph-2k, Oroboros).

5.1. DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS PARA EL ESTUDIO DE LA ÓXIDO NÍTRICO SINTASA MITOCONDRIAL: ESTUDIO INSTRUMENTAL COMPARATIVO ENTRE UN RESPIRÓMETRO CONVENCIONAL Y UNO DE ALTA RESOLUCIÓN

Inicialmente se determinaron las condiciones óptimas para la detección del NO producido por la mtNOS, así como sus efectos sobre la respiración mitocondrial, comparando las medidas de detección de NO y de consumo de oxígeno realizadas en la cámara de un respirómetro convencional (**Hansatech**) y en la cámara de un respirómetro de alta resolución (**Oroboros**).

En el estudio comparativo entre ambos respirómetros se analizaron las diferencias con relación al flujo de oxígeno instrumental, a la calibración del electrodo de NO, a la cuantificación de la producción del NO y a la medida de la inhibición de la respiración celular inducida por el NO.

5.1.1. Medida del flujo de oxígeno instrumental

Con la finalidad de comparar el consumo de oxígeno por el propio electrodo, así como la difusión de este gas entre el aire exterior y la cámara del electrodo, se determinó el **flujo de oxígeno instrumental** en cada uno de los respirómetros, en medio HBSS y a 37°C (Figura R39, A y B).

Los datos obtenidos en cada uno de los respirómetros se representaron en una gráfica en la que se relacionó la concentración de oxígeno (μM) con el flujo obtenido ($\text{pmol}/(\text{s}\cdot\text{ml})$) (Figura R.39, C y D). A partir de estos puntos se pudo calcular la ecuación de una recta del tipo: Flujo = $b [\text{O}_2] + a$. Seguidamente, a través de las rectas obtenidas, se determinó el flujo a dos concentraciones de oxígeno: a la concentración atmosférica ($172 \mu\text{M}$) y a la concentración tisular ($30 \mu\text{M}$).

En el respirómetro Hansatech, el flujo a $172 \mu\text{M}$ de oxígeno fue $4,51 \pm 1,29 \text{ pmol}/(\text{s}\cdot\text{ml})$, y a $30 \mu\text{M}$ de oxígeno fue $-5,22 \pm 0,97 \text{ pmol}/(\text{s}\cdot\text{ml})$ (valores medios \pm SEM, $n=6$). En el respirómetro Oroboros, el flujo a $172 \mu\text{M}$ de oxígeno fue $2,69 \pm 0,13 \text{ pmol}/(\text{s}\cdot\text{ml})$, y a $30 \mu\text{M}$ de oxígeno fue $-1,44 \pm 0,18 \text{ pmol}/(\text{s}\cdot\text{ml})$ (valores medios \pm SEM, $n=6$).

Según estos datos, en condiciones saturantes de oxígeno ($172 \mu\text{M}$), se produce un mayor consumo de oxígeno por parte del electrodo del respirómetro Hansatech que del electrodo del respirómetro Oroboros. Además, al bajar la concentración de oxígeno a $30 \mu\text{M}$, la difusión de

este gas desde el exterior al interior de la cámara del electrodo es mayor en el respirómetro Hansatech que en el respirómetro Oroboros. Por ambos motivos, en los experimentos de detección de la mtNOS, se decidió realizar las medidas de consumo de oxígeno en el respirómetro Oroboros.

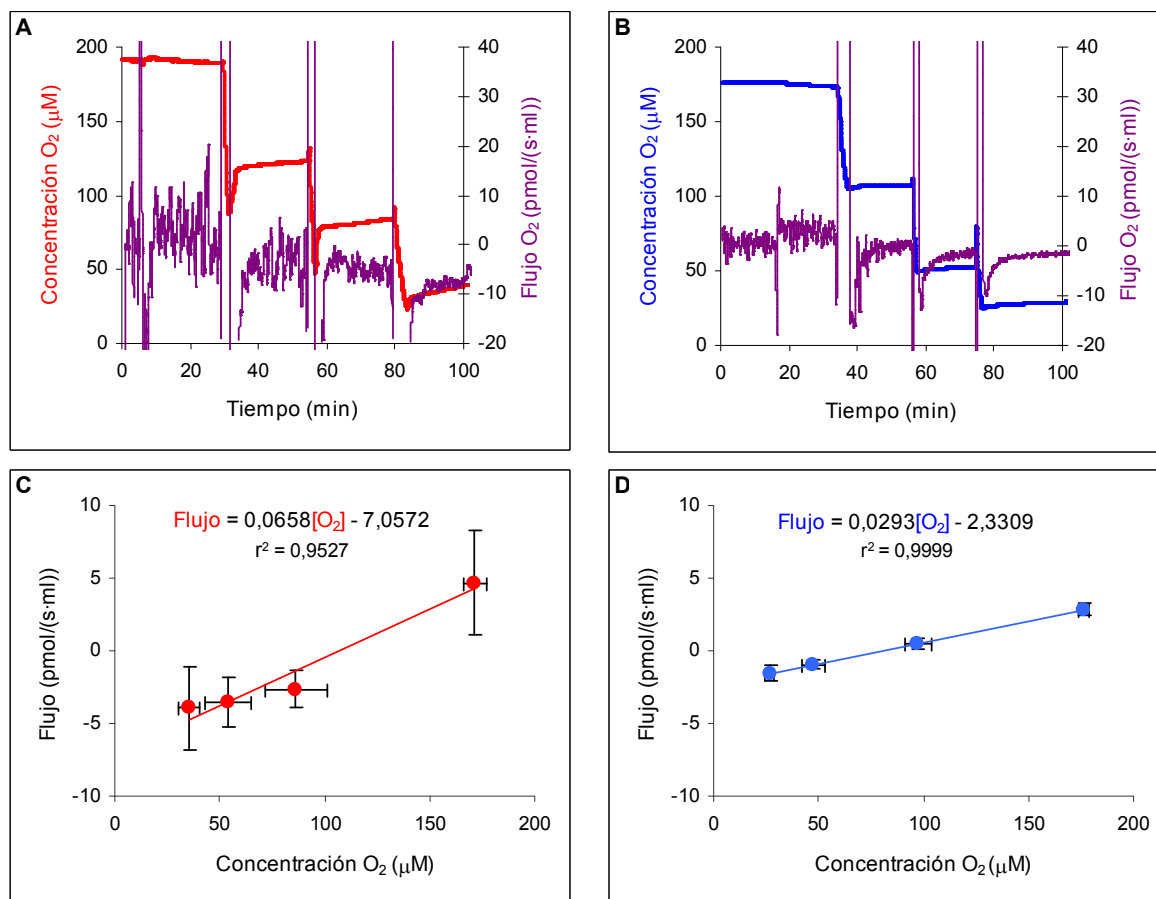


Figura R.39. Determinación del flujo de oxígeno instrumental en el respirómetro Hansatech (A) y en el respirómetro Oroboros (B). El flujo (línea morada) se calculó a partir de la pendiente de la concentración de oxígeno (línea roja en el respirómetro Hansatech y línea azul en el respirómetro Oroboros). Cálculo de la ecuación de la recta que relaciona la concentración de oxígeno con el flujo en el respirómetro Hansatech (C) y Oroboros (D). Valores medios \pm Ds (n=6).

5.1.2. Calibración del electrodo de óxido nítrico

Inicialmente se plantearon dos situaciones que podrían afectar a la **calibración del electrodo de NO** y, por tanto, a las medidas de NO: el estado de la cámara (abierta o cerrada) y la concentración de oxígeno a la que se realizaran las medidas de NO.

La influencia de realizar las medidas de NO con la cámara del respirómetro abierta o cerrada fue determinada en el respirómetro Hansatech (Figura R.40, A). Al realizar la calibración del electrodo de NO con la cámara cerrada, los valores de pA medidos resultaron ser un $16\% \pm 1$ (valor medio \pm SEM, n=3) superiores a los medidos con la cámara abierta.

Para determinar si la concentración de oxígeno en la cámara del respirómetro podía ser un factor que modificara las medidas de NO, se llevó a cabo la calibración del electrodo de NO en el respirómetro Hansatech a dos concentraciones de oxígeno diferentes: 21 y 7%. En la Figura R.40, B puede observarse que no hay diferencias estadísticamente significativas entre los resultados obtenidos a ambas concentraciones de oxígeno. De estos resultados se concluye que las medidas del electrodo de NO no se ven afectadas por la concentración de oxígeno existente en la cámara del respirómetro.

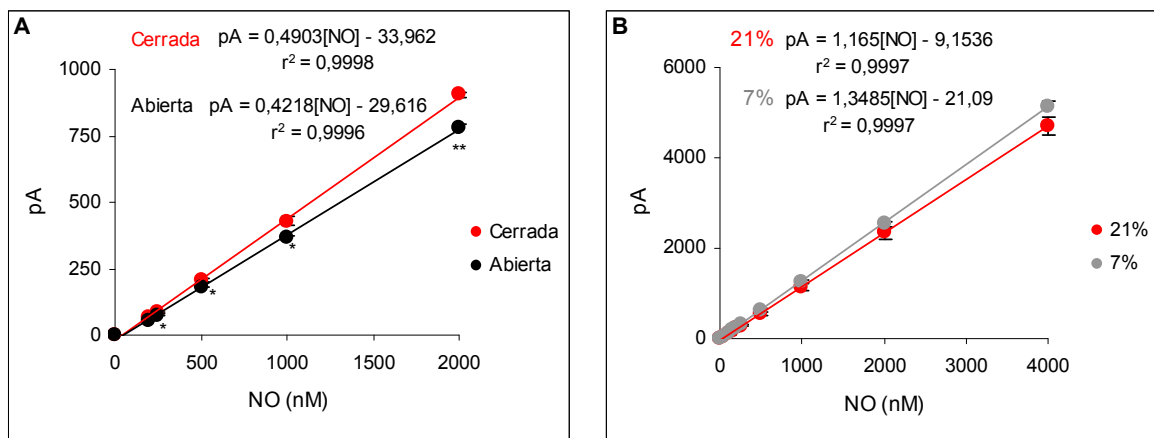


Figura R.40. Influencia del estado de la cámara (abierta o cerrada) del respirómetro Hansatech al realizar la recta de calibración del electrodo de NO (A). Valores medios \pm SEM (n=3). Diferencias significativas entre las medidas realizadas a una misma concentración de NO (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$) (A). Influencia de la concentración de oxígeno (21 ó 7%) en el respirómetro Hansatech al realizar la recta de calibración del electrodo de NO (B). Valores medios \pm SEM (n=5). No se detectaron diferencias estadísticamente significativas al realizar las medidas de NO a ambas concentraciones de oxígeno

Posteriormente, se compararon los valores de pA obtenidos al realizar la calibración del electrodo de NO en el respirómetro Hansatech y en el respirómetro Oroboros (con la cámara cerrada y a 21% de oxígeno). En la Figura R.41 se muestra un registro representativo de la calibración del electrodo de NO en el respirómetro Hansatech (A) y en el respirómetro Oroboros (B), así como las rectas de calibración calculadas a partir de dichos registros (C y D, respectivamente).

Para llevar a cabo la comparación de las calibraciones realizadas en ambos respirómetros, se determinó el valor de pA registrado por el electrodo de NO tras cada adición de $NaNO_2$ (valor máximo de pA), así como el valor de pA registrado a los 5 min de cada adición de $NaNO_2$ al medio de calibración (KI/H_2SO_4). Teniendo en cuenta ambas medidas se pudo determinar si la señal recogida por el electrodo de NO se mantenía estable transcurrido un breve periodo de tiempo. En la Figura R.42 se puede observar que el valor de pA detectado por el electrodo de NO a los 5 min de la adición de $NaNO_2$ era inferior al valor de pA registrado inicialmente (valor máximo). Sin embargo, en el respirómetro Oroboros, las diferencias entre ambos valores fueron menores, es decir, la señal recogida por el electrodo de NO se mantenía más estable transcurridos 5 min.

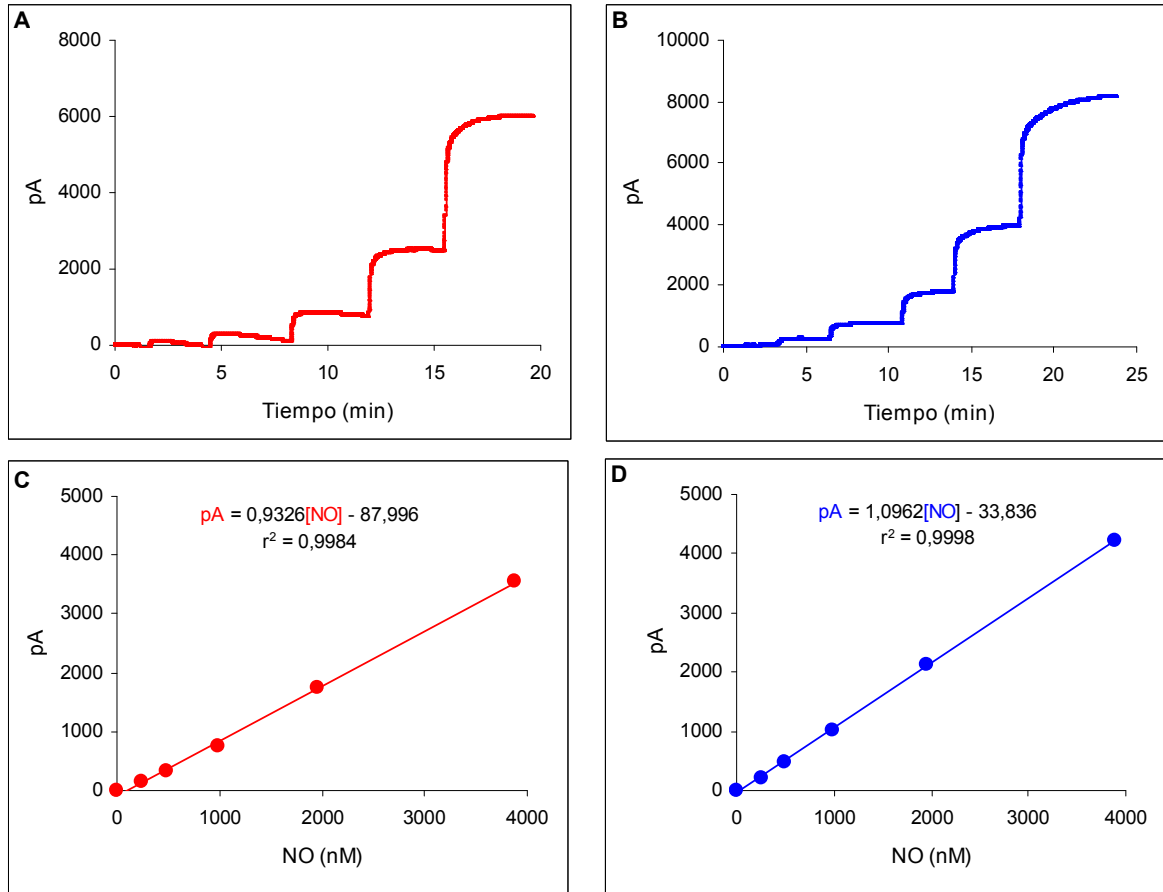


Figura R.41. Registro de la calibración del electrodo de NO en el respirómetro Hansatech (A) y en el respirómetro Oroboros (B). Cálculo de la recta de calibración del electrodo de NO en el respirómetro Hansatech a partir del registro representado en A (C), y en el respirómetro Oroboros a partir del registro representado en B (D).

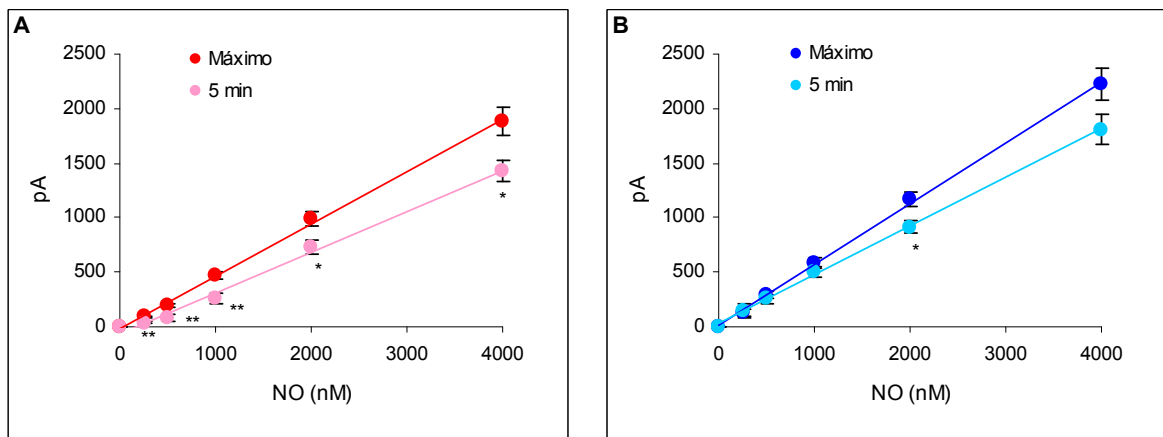


Figura R.42. Recta de calibración del electrodo de NO en el respirómetro Hansatech (A) y en el respirómetro Oroboros (B): pA máximos y pA detectados a los 5 min. Valores medios \pm SEM (n=5). Diferencias significativas entre ambas medidas para cada concentración de NO (*, p<0,05; **, p<0,01).

Al comparar los valores de pA máximos medidos en ambos respirómetros, resultaron ser significativamente más elevados los pA medidos en el respirómetro Oroboros que los obtenidos en el respirómetro Hansatech (Figura R.43, A). En la Figura R.43, B, aparece reflejado el

cálculo, en ambos respirómetros, de la relación entre los pA máximos y los pA medidos a 5 min para cada concentración de NO. En el respirómetro Hansatech, el valor de pA a 5 min oscila entre el 41 y el 76% del valor máximo, mientras que en el respirómetro Oroboros, el valor de pA a 5 min oscila entre el 78 y el 94% del valor máximo. Estas diferencias entre ambos respirómetros, en cuanto a la relación entre el valor de pA máximo y el medido a 5 min, se acentúan a las concentraciones más bajas de NO (250, 500 y 1000 nM).

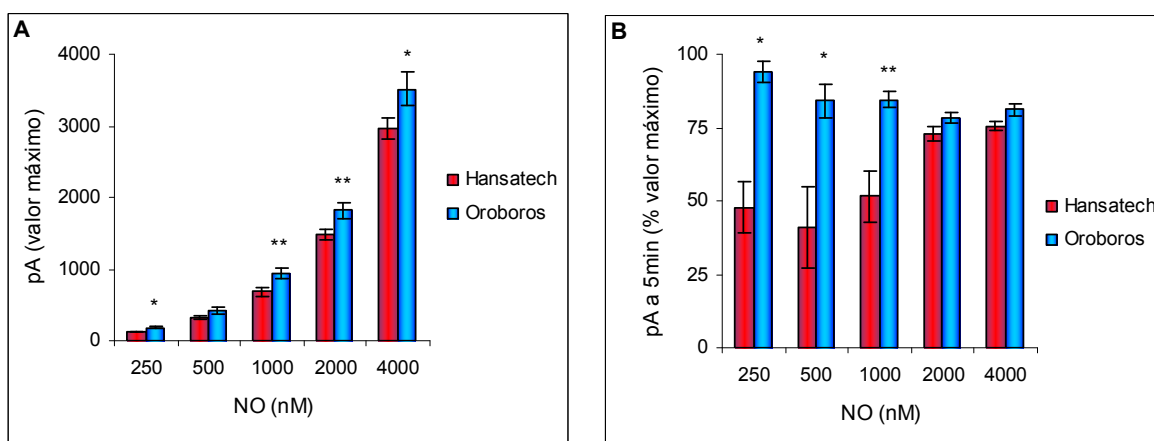


Figura R.43. pA máximos medidos para cada concentración de NO en ambos respirómetros (A). Valores medios \pm SEM (n=5). Diferencias significativas entre las medidas realizadas en cada respirómetro para cada concentración de NO (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$). Relación entre el valor de pA máximo y el valor de pA medido a 5 min en ambos respirómetros para cada concentración de NO (B). Valores medios \pm SEM (n=5). Diferencias significativas entre los valores obtenidos en cada respirómetro para cada concentración de NO (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$).

5.1.3. Cuantificación de la producción de óxido nítrico

En el respirómetro Hansatech y en el respirómetro Oroboros se midió la producción de NO generada con un donador de NO (DETA-NO), y también con un sistema celular de producción endógena de NO regulado por tetraciclina, células Tet-iNOS 293 (Mateo et al., 2003). Estas medidas se realizaron a 37°C y con las cámaras de ambos electrodos cerradas.

La cuantificación de la producción de NO generado con DETA-NO 80 μ M tras aplicar la recta de calibración correspondiente en cada uno de los respirómetros, fue de 307 ± 38 nM NO en el respirómetro Hansatech y de 330 ± 38 nM NO en el respirómetro Oroboros (valores medios \pm SEM, n=7), no encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre las medidas realizadas en ambos respirómetros (Figura R.44, A y B).

Para las medidas de NO realizadas con la línea celular Tet-iNOS 293 se trató a las células con una dosis de tetraciclina de 40 ng/ml. La producción de NO con este sistema (10^7 células/ml) se inició con la adición del sustrato de la iNOS L-arginina (1 mM). Los valores de NO fueron 883 ± 97 nM en el respirómetro Hansatech y 975 ± 88 nM en el respirómetro Oroboros (valores

medios \pm SEM, $n=9$), no encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre las medidas realizadas en ambos respirómetros (Figura R.44, C y D).

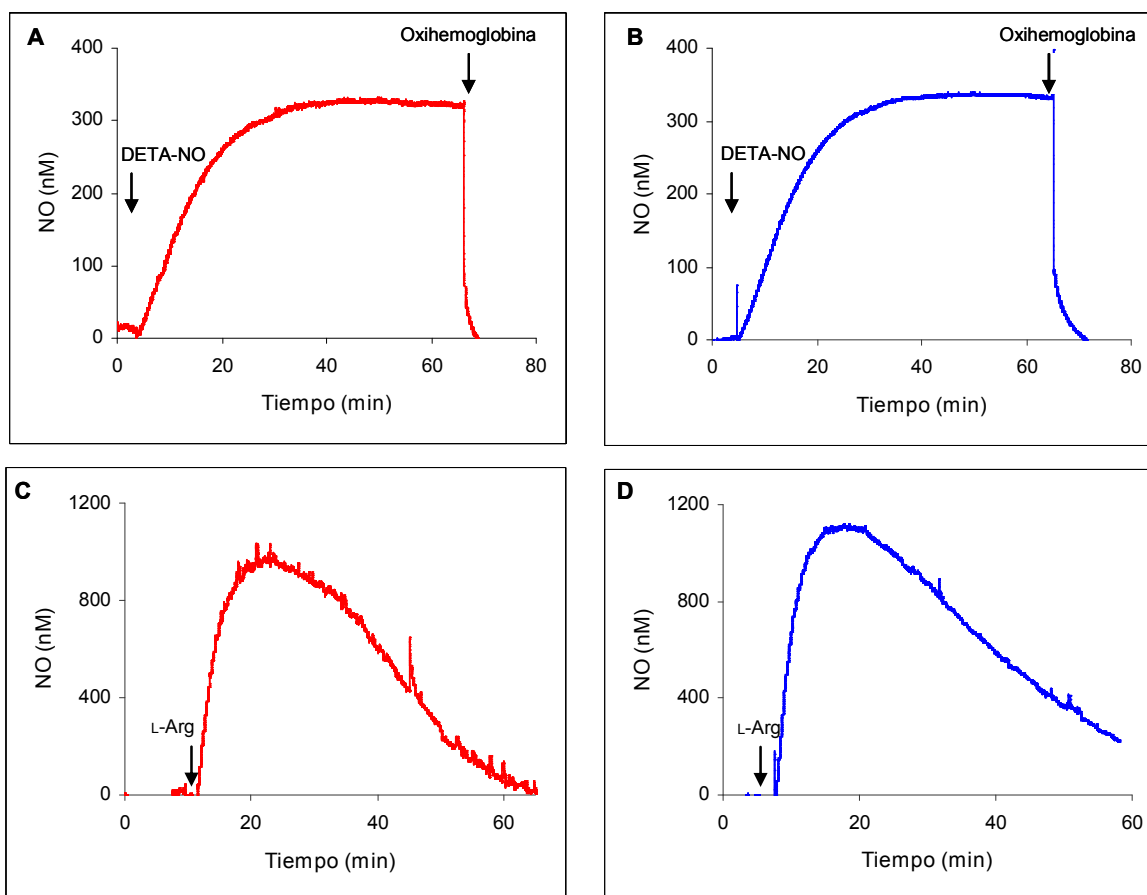


Figura R.44. Registro del electrodo de NO en el respirómetro Hansatech (A) y en el respirómetro Oroboros (B) tras la adición de DETA-NO 80 μ M. Registro del electrodo de NO en el respirómetro Hansatech (C) y en el respirómetro Oroboros (D) tras la adición de L-arginina (L-Arg) 1 mM a células Tet-iNOS 293 tratadas con 40 ng/ml de tetraciclina (10^7 células/ml).

Por lo tanto, pese a existir diferencias entre el respirómetro Hansatech y el respirómetro Oroboros en los valores obtenidos al realizar la calibración del electrodo de NO, la cuantificación de la producción de NO no se vio afectada por la realización de las medidas en uno u otro respirómetro, puesto que los cálculos de la producción de NO se realizan a partir de la recta de calibración obtenida en las mismas condiciones experimentales que las medidas de NO.

5.1.4. Determinación de la inhibición de la respiración celular por el óxido nítrico

En la misma línea celular, Tet-iNOS 293, se determinó la inhibición de la respiración inducida por el NO a concentraciones fisiológicas de oxígeno (30 μ M) en el respirómetro Hansatech y en el respirómetro Oroboros. La medida de la respiración en ausencia de NO (células control) se realizó en 10^7 células/ml (Figura R.45, A y B), mientras que la medida de la respiración en

presencia de NO se realizó en 10^7 células/ml tratadas con 40 ng/ml de tetraciclina (con la finalidad de inducir la síntesis de la enzima iNOS) y tras la adición al medio de L-arginina 1 mM a la concentración de oxígeno de $60 \mu\text{M}$ (Figura R.45, C y D).

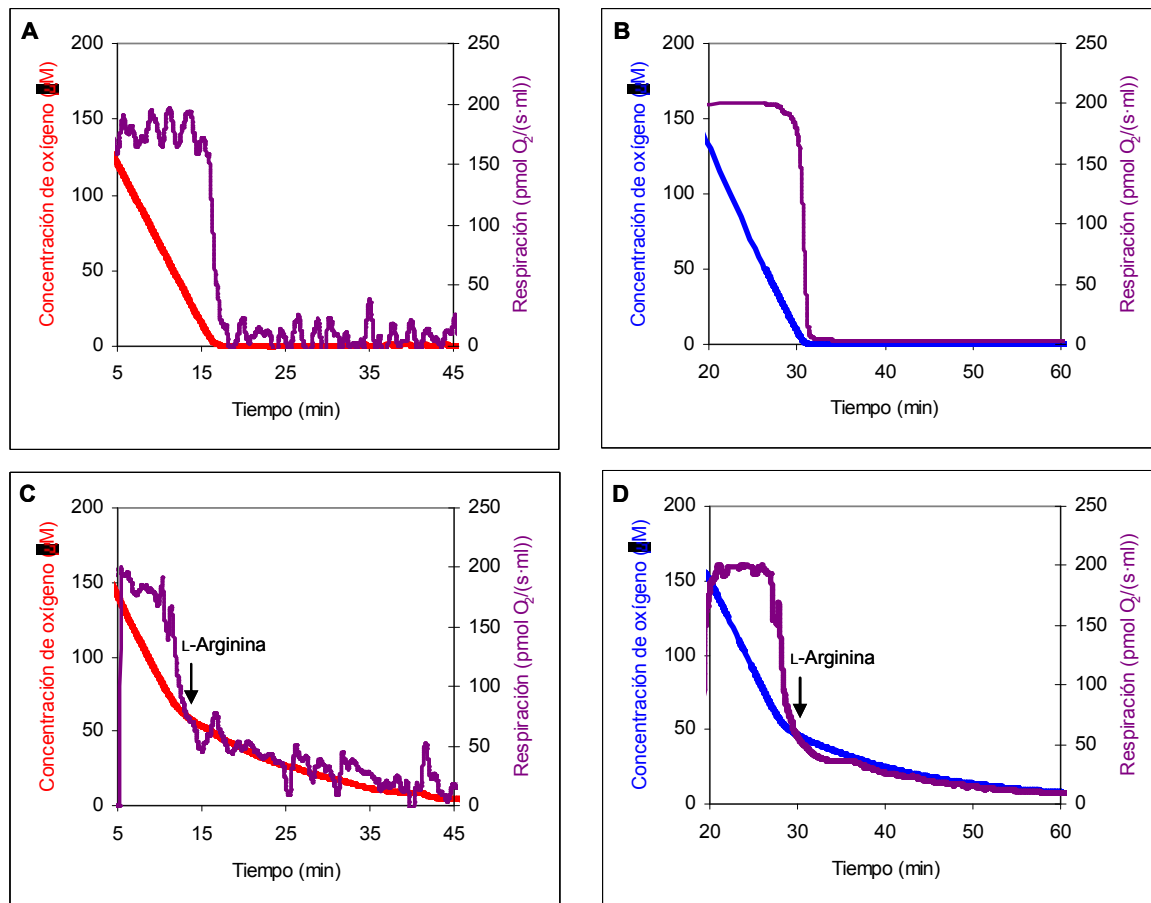


Figura R.45. Registro del consumo de oxígeno de células Tet-iNOS (10^7 células/ml) control (A,B) y tratadas con 40 ng/ml de tetraciclina (C,D) en el respirómetro Hansatech (A,C) y Oroboros (B,D). Con la adición de L-arginina comienza la síntesis de NO, inhibiéndose la respiración celular. Las líneas azul o roja representan la concentración de oxígeno (μM) mientras que la línea morada representa la respiración celular ($\text{pmol O}_2/(\text{s}\cdot\text{ml})$).

En el respirómetro Hansatech (Figura R.45, A y C), tras corregir el valor del flujo de oxígeno instrumental, la respiración de las células control medida a $30 \mu\text{M}$ de oxígeno fue $136 \pm 8 \text{ pmol O}_2/(\text{s}\cdot\text{ml})$, mientras que en las células tratadas con 40 ng/ml de tetraciclina, el valor de la respiración fue $31 \pm 6 \text{ pmol O}_2/(\text{s}\cdot\text{ml})$ (valores medios \pm SEM, $n=5$).

En el respirómetro Oroboros (Figura R.45, B y D), que proporciona automáticamente la corrección del flujo de oxígeno instrumental, la respiración de las células control medida a $30 \mu\text{M}$ de oxígeno fue $184 \pm 7 \text{ pmol O}_2/(\text{s}\cdot\text{ml})$, mientras que en las células tratadas con 40 ng/ml de tetraciclina, el valor de la respiración fue $29 \pm 2 \text{ pmol O}_2/(\text{s}\cdot\text{ml})$ (valores medios \pm SEM, $n=5$).

A partir de estos datos se calculó el porcentaje de inhibición de la respiración por el NO: $77 \pm 4\%$ en el respirómetro Hansatech, y $84 \pm 1\%$ en el respirómetro Oroboros, considerándose estadísticamente significativa ($p < 0,05$) la diferencia existente entre ambos porcentajes de inhibición.

En resumen, a concentraciones fisiológicas de oxígeno, las medidas de respiración realizadas en el respirómetro Oroboros presentan una mayor precisión en comparación con las realizadas en el respirómetro Hansatech, puesto que la inhibición de la respiración celular en presencia de NO es más elevada (10%) en el respirómetro Oroboros que en el respirómetro Hansatech.

5.2. DETECCIÓN DE LA ÓXIDO NÍTRICO SINTASA MITOCONDRIAL EN UN RESPIRÓMETRO DE ALTA RESOLUCIÓN

De acuerdo con los datos obtenidos en el estudio instrumental comparativo entre ambos respirómetros, consideramos más apropiado el uso del respirómetro de alta resolución Oroboros para la detección de la producción de NO por la mtNOS y de sus efectos sobre la respiración en mitocondrias aisladas a partir del músculo esquelético de los ratones de tipo silvestre tratados con endotoxina.

5.2.1. Caracterización del modelo de estudio

Previamente al aislamiento de las mitocondrias con la finalidad de estudiar la producción de NO y sus efectos sobre la respiración, se determinó si la dosis (12 mg/kg de peso corporal) y tiempo de incubación (24 h) de endotoxina utilizados inducían la expresión de la iNOS en el tejido muscular esquelético. Para ello, mediante western blot se determinó, además de la expresión de la proteína iNOS, la pureza de las mitocondrias aisladas, es decir, si existía contaminación celular tras el aislamiento de las mitocondrias.

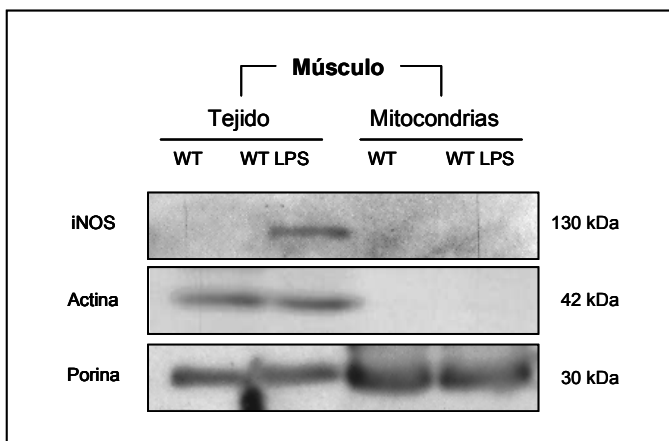


Figura R.46. Niveles de expresión de las proteínas iNOS, actina y porina en el tejido muscular y en las mitocondrias aisladas a partir del músculo esquelético de ratones WT y WT LPS.

Como control de carga de los extractos proteicos tisulares procesados por western blot se utilizó la proteína actina, y se consideró que la ausencia de esta proteína en los extractos proteicos mitocondriales era indicativa de un alto grado de pureza de las mitocondrias. Además, como control de carga de los extractos proteicos mitocondriales se utilizó la proteína de la membrana mitocondrial externa, porina. En la Figura R.46 se observa que, en el tejido muscular esquelético, la administración de LPS induce la expresión de la iNOS. En esta imagen también se aprecia que, en las mitocondrias aisladas a partir del músculo esquelético, los niveles de expresión de la iNOS y la actina son indetectables.

Por otra parte, mediante microscopía confocal, se determinó la presencia de NO en el tejido muscular esquelético gracias a la cuantificación de la fluorescencia emitida por el fluorocromo DAF-FM en muestras procedentes de ratones WT y WT LPS (en verde en la Figura R.47).

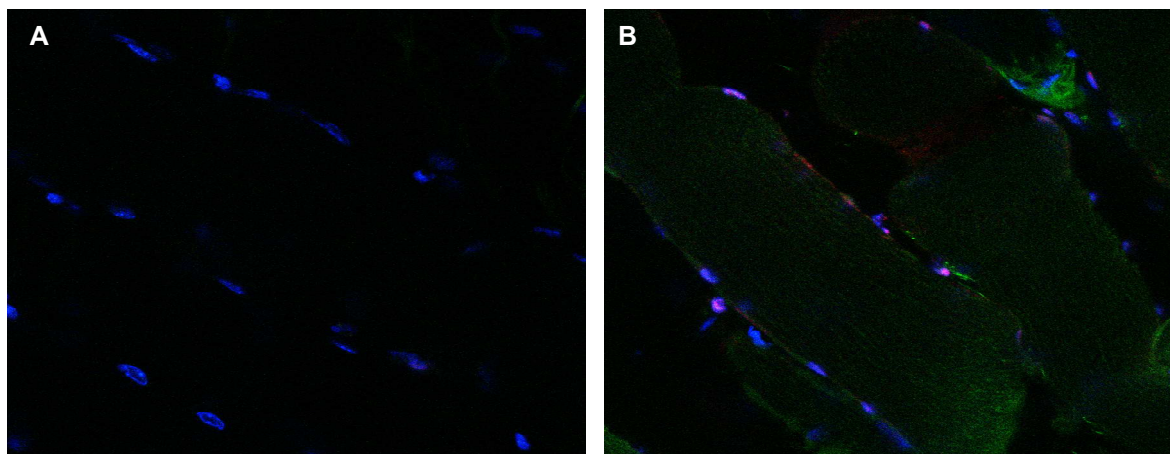


Figura R.47. Producción de NO en fibras musculares de ratones tratados con endotoxina. Fibras musculares de ratón WT (A) y WT LPS (B) teñidas con los fluorocromos Hoechst-33342 (azul), ioduro de propidio (rojo) y DAF-FM (verde).

En la Figura R.48 puede observarse que, en el tejido muscular esquelético de ratones WT LPS, la fluorescencia emitida por el fluorocromo DAF-FM es aproximadamente 2 veces superior a la detectada en el tejido de los animales WT.

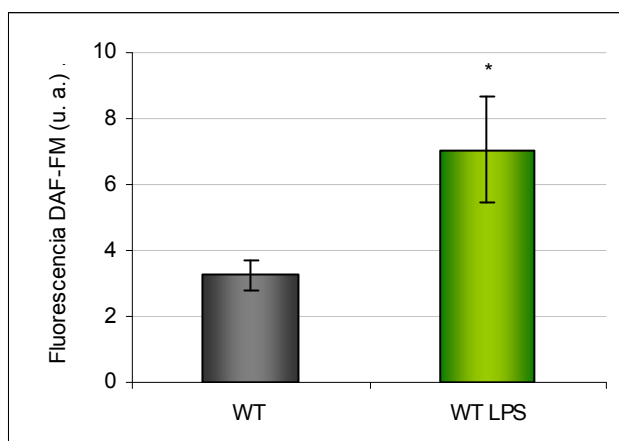


Figura R.48. Determinación de la fluorescencia emitida tras la tinción con DAF-FM. Representación del valor medio \pm SEM, n=6. Diferencias significativas respecto a WT (*, $p < 0,05$).

Tras la caracterización del modelo de estudio utilizado, se realizaron diversas determinaciones encaminadas a la detección del NO producido por la mtNOS y de los efectos de este gas sobre la respiración (detección de la inhibición de la respiración inducida por el NO y determinación del valor de la presión parcial de oxígeno a la que la respiración es la mitad de la máxima, la p_{50}).

5.2.2. Detección directa de óxido nítrico mediante la utilización de un electrodo de óxido nítrico

En el respirómetro Oroboros, con la cámara cerrada y termostatizada a 37°C, se intentó determinar la producción de NO por parte de la mtNOS en mitocondrias aisladas a partir del músculo esquelético de ratones WT y WT LPS (0,25 mg de proteína/ml). Esta aproximación se realizó introduciendo un electrodo de NO en una de las cámaras del respirómetro, lo que permitió medir simultáneamente el consumo de oxígeno y la producción de NO.

Tras la estabilización de la señal recogida por el electrodo de NO, se adicionó en la cámara del respirómetro el cofactor de las NOS tetrahidrobiopterina (4HB) 10 μ M. Seguidamente, se adicionó rotenona 5 μ M, succinato 4 mM o succinato más ADP 1 mM. Finalmente se añadió el sustrato de la enzima, L-arginina 1 mM.

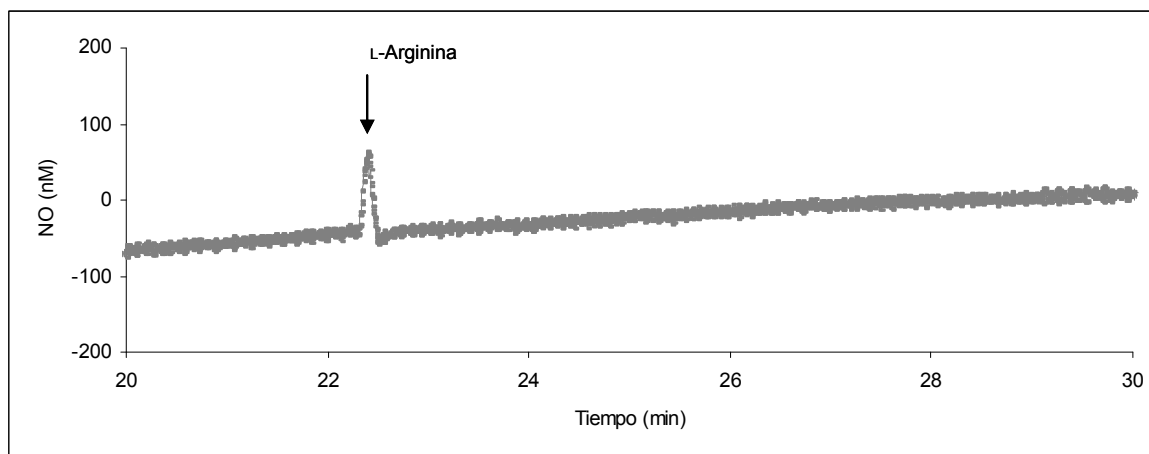


Figura R.49. Producción de NO por la mtNOS en mitocondrias de músculo esquelético. Registro del electrodo de NO: tras la adición del sustrato L-arginina 1 mM no se detectó producción de NO por las mitocondrias (0,25 mg de proteína/ml).

En la Figura R.49 aparece reflejado un registro representativo de la medida de NO, donde se observa que no se consiguió detectar ninguna señal lo suficientemente intensa o fiable por el electrodo de NO, por lo que se concluyó que la producción de NO por la mtNOS era indetectable en nuestras condiciones experimentales.

Tras la obtención de los registros, se determinó el valor de la respiración a 30 y 10 μM de oxígeno, debido a que el efecto inhibitor del NO sobre la respiración aumenta a medida que disminuye la concentración de oxígeno (Brown and Cooper 1994; Cleeter et al., 1994) y, por lo tanto, a dichas concentraciones reducidas de oxígeno resultaría más probable detectar el efecto inhibitor del NO sobre la respiración. En la Figura R.51 se observa que la respiración mitocondrial medida a 30 μM de oxígeno no se ve afectada por la adición de L-arginina 1 mM (Figura R.51, A), ni por la adición del inhibidor de las NOS N-monometil-L-arginina (L-NMMA) 1 mM (Figura R.51, B), tanto en las mitocondrias WT como en las mitocondrias WT LPS.

Sin embargo, al determinar el valor de la respiración mitocondrial a 10 μM de oxígeno, se detectó un $27 \pm 3\%$ de inhibición de la respiración de las mitocondrias WT LPS en presencia del sustrato L-arginina (Figura R.51, C). Esta inhibición de la respiración no se detectaba al adicionar al medio el inhibidor L-NMMA a la concentración de 1 mM (Figura R.51, D).

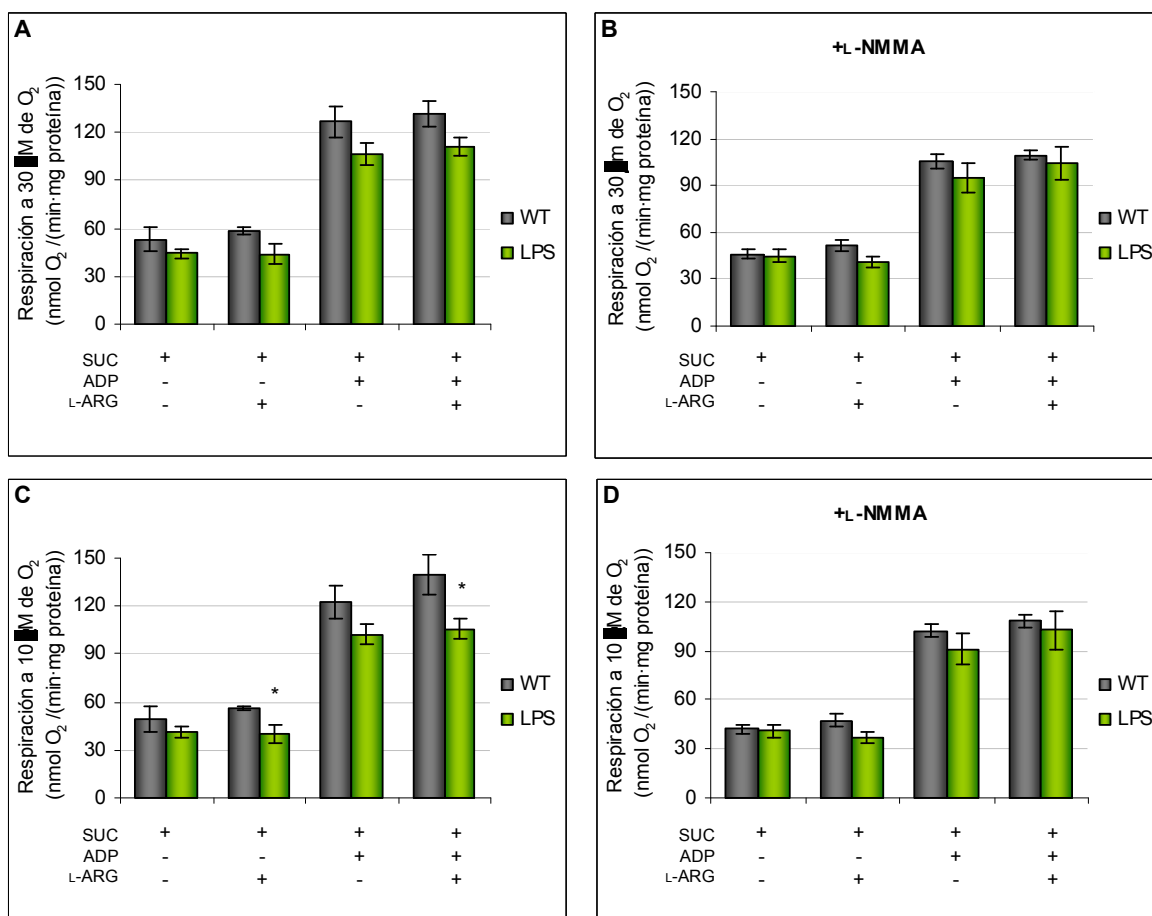


Figura R.51. Valores de respiración medidos a 30 μM (A,B) y 10 μM (C,D) de oxígeno de las mitocondrias aisladas a partir del músculo esquelético, en ausencia (A,C) y presencia (B,D) de L-NMMA 1 mM. Las medidas se realizaron tras la adición de succinato 4 mM (SUC), ADP 1 mM o L-arginina 1 mM. Representación del valor medio \pm SEM (n=4). Diferencias estadísticamente significativas respecto a WT (*, $p < 0,05$).

El valor de presión parcial de oxígeno necesario para que la respiración sea la mitad de la máxima viene definido por la p_{50} , un valor inversamente proporcional a la afinidad que presenta la citocromo c oxidasa por el oxígeno. Con el fin de detectar los efectos sobre la respiración del NO producido por la mitocondria, se estudió el valor de la p_{50} de la respiración en mitocondrias aisladas a partir del músculo esquelético de ratones WT y WT LPS, en presencia y ausencia de ADP, así como en presencia y ausencia del sustrato de la NOS, L-arginina.

En la Figura R.52, A se observa que las diferencias en el valor de la p_{50} de la respiración de las mitocondrias WT y WT LPS no son estadísticamente significativas en ausencia de L-arginina. Sin embargo, al adicionar el sustrato de la NOS al medio de incubación, el valor de la p_{50} de las mitocondrias WT LPS es significativamente superior al detectado para las mitocondrias WT. Además, esta diferencia en el valor de la p_{50} se deja de apreciar al añadir al medio el inhibidor L-NMMA (Figura R.52, B).

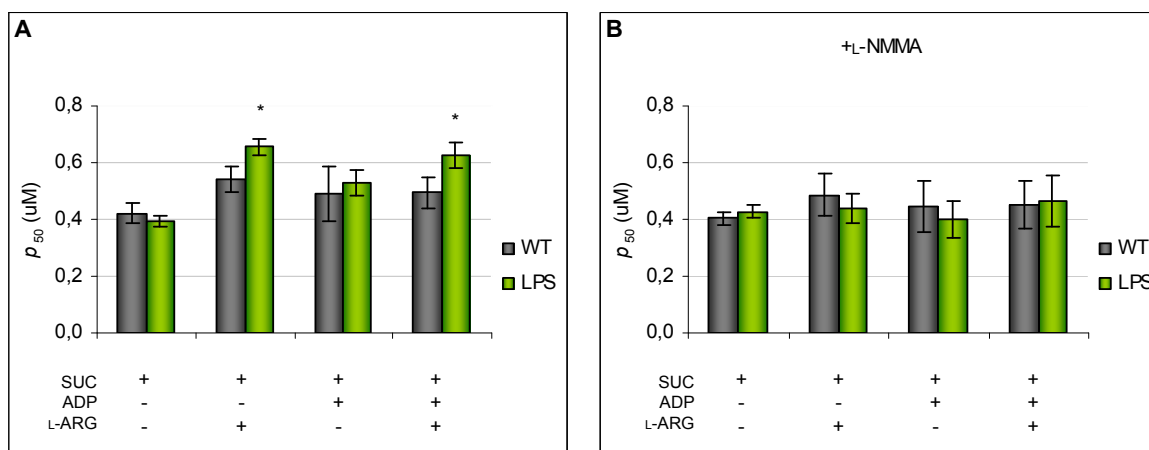


Figura R.52. Determinación del valor de la p_{50} en mitocondrias aisladas a partir del músculo esquelético, en ausencia (A) y presencia (B) de L-NMMA. En la parte inferior de la gráfica se indica si la medida se realizó tras la adición de succinato 4 mM (SUC), ADP 1 mM o L-arginina 1 mM. Representación del valor medio \pm SEM (n=4). Diferencias estadísticamente significativas respecto a WT (*, $p < 0,05$).

De los resultados obtenidos se puede deducir que, en mitocondrias aisladas a partir del músculo esquelético de ratones WT a los que se les ha administrado una dosis de 12 mg/kg de endotoxina, se induce la mtNOS y se produce la síntesis de NO. Este hecho se deduce debido a que, en presencia de L-arginina, la respiración mitocondrial (medida a 10 μ M de oxígeno) se ve inhibida y el valor de p_{50} aumenta. Además, al inhibir la enzima con L-NMMA, desaparecen los efectos anteriormente descritos.

DISCUSIÓN

En 1997 se describió una proteína que presentaba un 57% de identidad en su secuencia de aminoácidos con la proteína desacoplante 1 (UCP1) y, a su vez, un 73% de identidad con la secuencia de aminoácidos de la proteína desacoplante 2 (UCP2) (Boss et al., 1997). Esta proteína, cuya expresión es específica del músculo esquelético y el corazón, fue denominada proteína desacoplante 3 (UCP3).

A diferencia de la UCP1, cuya función en la termogénesis adaptativa se encuentra claramente definida, la función de la UCP3 no está claramente establecida. En los estudios realizados inicialmente, debido al alto grado de identidad existente entre la secuencia de aminoácidos de la UCP1 y la UCP3, se estudió la posible implicación de la UCP3 en la termogénesis, el control del gasto energético y el peso corporal (apartado 3.1 de la Introducción). Sin embargo, la mayoría de los resultados obtenidos en dichos trabajos parecían indicar que la UCP3 no se encontraba implicada en estas funciones. Posteriormente, se han formulado otras hipótesis que atribuyen a la UCP3 un papel en el metabolismo de los ácidos grasos y de la glucosa, en la protección frente al daño oxidativo, en la regulación de la apoptosis y en el transporte de calcio (apartados 3.2 a 3.6 de la Introducción). Dentro de las diferentes hipótesis planteadas en relación a la función de la UCP3, nuestro trabajo se ha centrado en el estudio del papel de esta proteína ante una situación de estrés oxidativo, valorándose su posible función protectora.

El papel protector de las UCPs frente al estrés oxidativo fue sugerido inicialmente en 1997 tras la observación de que la preincubación con GDP (inhibidor de las UCPs) de las mitocondrias aisladas a partir de tejidos que expresaban la UCP1 y la UCP2 (el tejido adiposo pardo, el bazo y el timo) inducía un aumento en el potencial de la membrana mitocondrial interna y en la producción de ROS (Negre-Salvayre et al., 1997). Diversos estudios realizados posteriormente han analizado la implicación específica de la UCP3 en la protección frente al daño oxidativo relacionando la ausencia o inhibición de esta proteína con un aumento en el potencial de la membrana mitocondrial y un aumento en la producción de ROS (Vidal-Puig et al., 2000; Brand et al., 2002; Talbot et al., 2004; MacLellan et al., 2005). Esta hipótesis se vio respaldada con la identificación del efecto activador del radical superóxido sobre la conductancia a los protones mediada a través de esta proteína (Echtay et al., 2002b), así como del compuesto originado tras la peroxidación lipídica de las membranas mitocondriales y celulares 4-hidroxinonenal (Echtay et al., 2003) (apartados 3.4.3 y 3.4.4 de la Introducción).

En nuestro estudio, con la finalidad de determinar el posible papel protector de la UCP3 frente al estrés oxidativo, se realizaron diversas aproximaciones experimentales en mitocondrias aisladas a partir del músculo esquelético y del corazón de ratones de tipo silvestre y deficientes en la expresión de la UCP3 (KO), tratados y sin tratar con endotoxina, así como en cardiomiocitos neonatales de rata transfectados con el gen que codifica la UCP3.

1. IMPLICACIÓN DE LA UCP3 EN LA CONDUCTANCIA BASAL DE LA MEMBRANA MITOCONDRIAL INTERNA A LOS PROTONES Y EN EL AUMENTO DE LA CONDUCTANCIA INDUCIDO POR EL RADICAL SUPERÓXIDO Y EL COMPUESTO 4-HIDROXINONENAL

La administración de endotoxina induce un aumento en la expresión de la proteína UCP3

Los estudios realizados en mitocondrias precisaron de una caracterización inicial de los niveles de expresión del ARNm y de la proteína UCP3, así como de otros transportadores altamente relacionados y también presentes en el tejido muscular esquelético y el corazón, la UCP2 y el transportador de nucleótidos de adenina (ANT).

Como hemos mostrado en el capítulo de Resultados, la administración de endotoxina a ratones, a una dosis de 12 mg/kg de peso corporal y tras 24 h de incubación, induce un aumento en la expresión del ARNm de la UCP3 en el músculo gastrocnemio y en el corazón (Figura R.1), así como de la proteína (Figuras R.6 y R.7). En estudios previos se había observado que la administración de endotoxina o de TNF- α inducía un aumento en la expresión del ARNm de la UCP3 en el músculo de rata (Busquets et al., 1998; Masaki et al., 1999) y de ratón (Yu et al., 2000). Sin embargo, en estos trabajos no se determinó si las variaciones en la expresión del ARNm de la UCP3 se correlacionaban con modificaciones en la expresión de la proteína UCP3, siendo necesaria la confirmación de dichos cambios a la hora de intentar asociar un papel bioquímico o fisiológico a la esta proteína (Echtay 2007), especialmente cuando también se ha descrito que la expresión del ARNm de la UCP3 no se relaciona necesariamente con la expresión de la proteína UCP3 (Sivitz et al., 1999).

Tras comprobar en nuestro modelo experimental que la administración de endotoxina inducía un aumento en la expresión de la proteína UCP3 de 2 veces en el músculo esquelético y de 1,5 veces en el corazón, comparamos el grado de expresión de esta proteína en ambos tejidos en ausencia de endotoxina. Según los resultados de la Figura R.8, el nivel de expresión de la proteína UCP3 en el músculo esquelético es 6-7 veces superior al detectado en el corazón. Esta diferente expresión de la UCP3 en el músculo esquelético y el corazón ha sido previamente descrita (Hoeks et al., 2003; Pedraza et al., 2006; Bezaire et al., 2007). Específicamente se ha determinado que la expresión de esta proteína es 13 veces superior en los músculos con alto contenido en fibras de tipo IIb (de metabolismo fundamentalmente glicolítico) en comparación con la expresión de la UCP3 en el corazón (Hoeks et al., 2003), mientras que en los músculos con alto contenido en fibras de tipo I (de metabolismo predominantemente oxidativo) la expresión de esta proteína es 3 veces superior en relación a los niveles detectados en el corazón (Hoeks et al., 2003).

La expresión de la proteína ANT no se ve afectada por la administración de endotoxina ni por la delección del gen ucp3

El ANT es la proteína transportadora más abundante de la mitocondria, representando el 1-10% del contenido total proteico de este orgánulo (Brand et al., 2005). Clásicamente, la función del ANT ha estado asociada al intercambio de ADP por ATP a través de la membrana mitocondrial interna, así como a la formación del poro de transición de la permeabilidad mitocondrial y la apoptosis (Klingenberg 1993; Halestrap 2004; Palmieri 2004). Sin embargo, recientemente se ha determinado que el contenido mitocondrial en ANT se encuentra directamente relacionado con la conductancia basal de la membrana mitocondrial interna a los protones, siendo esta proteína la responsable de catalizar el 50-66% de la conductancia basal (Brand et al., 2005). Debido a este hecho, consideramos necesario determinar en nuestro modelo de estudio si la administración de endotoxina como modelo de inducción de la UCP3 modificaba también la expresión del ANT, no encontrándose cambios en dicha expresión (Figuras R.3, R.6 y R.7). Por otro lado, en nuestro trabajo también se utilizaron animales en los que no se expresaba la UCP3 (KO y KO LPS), no detectándose diferencias en la expresión del ANT entre estos animales y los animales de tipo silvestre (Figuras R.5 y R.9).

El control respiratorio y la capacidad máxima de la respiración mitocondrial no se ven afectados por la administración de endotoxina o la delección del gen ucp3

El valor del control respiratorio (relación entre la tasa de respiración en el Estado III y en el Estado IV) es un indicador de la integridad mitocondrial y del grado de acoplamiento de la fosforilación oxidativa. La determinación de este coeficiente en el estudio de la actividad desacoplante de la proteína UCP3 ha generado resultados contradictorios entre diferentes trabajos. Inicialmente se describió que las mitocondrias aisladas a partir del músculo esquelético de los ratones deficientes en la expresión de la UCP3 (KO) se encontraban más acopladas (tenían aumentada la relación Estado III/Estado IV) (Vidal-Puig et al., 2000), mientras que en un trabajo posterior se determinó que no existían diferencias entre el valor del control respiratorio de las mitocondrias de ratones de tipo silvestre y las mitocondrias de ratones KO (Cadenas et al., 2002). Según nuestros resultados, el valor del control respiratorio no se ve afectado por el nivel de expresión de la UCP3, tanto en las mitocondrias de músculo esquelético como en las de corazón (Figura R.11). Sin embargo, una ligera capacidad desacoplante de la UCP3 no puede ser descartada con la simple determinación de este coeficiente, siendo necesaria la realización de medidas directas de la conductancia de la membrana mitocondrial interna a los protones.

Mediante la adición del agente desacoplante FCCP, se determinó también la capacidad máxima de la respiración de las mitocondrias aisladas a partir del músculo esquelético y el

corazón (Figura R.13), no encontrándose diferencias significativas en relación a esta medida de consumo de oxígeno a pesar de los diferentes niveles de expresión de la UCP3 en las mitocondrias de ambos tejidos (WT, WT LPS, KO y KO LPS).

La actividad de los Complejos I, II y IV de la cadena respiratoria mitocondrial se encuentra inhibida tras la administración de endotoxina

La utilización de endotoxina como modelo de inducción de la UCP3 conduce a un estado de sepsis caracterizado a nivel tisular por un descenso en el consumo de oxígeno (Kreymann et al., 1993), y acompañado de un aumento en la tensión de oxígeno a dicho nivel (Boekstegers et al., 1991; Rosser et al., 1995). Este hecho sugiere que principalmente existe un problema en la utilización del oxígeno por parte de la mitocondria, es decir, existe una disfunción mitocondrial en lugar de un déficit en el aporte de oxígeno que recibe la célula (Brealey et al., 2004). La disfunción mitocondrial asociada a un estado de sepsis ha sido estudiada en diversos trabajos, concluyéndose que se produce una alteración de la fosforilación oxidativa, reduciéndose la capacidad de los tejidos para utilizar el oxígeno y, por tanto, para satisfacer las necesidades metabólicas (Llesuy et al., 1994; Kantrow et al., 1997).

En nuestro estudio, mediante la adición de diversos sustratos e inhibidores específicos de cada uno de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial, determinamos que la administración de endotoxina induce una disminución en la actividad de los Complejos I, II y IV. Esta inhibición de la respiración se detectó en mitocondrias aisladas a partir del tejido muscular esquelético (Figura R.15, A y C) y el corazón (Figura R.15, B y D) de animales de tipo silvestre y deficientes en la expresión de la UCP3, siendo el efecto estadísticamente más significativo en este último tejido. Relacionar estos resultados con los obtenidos por otros autores presenta cierta dificultad debido a la gran variabilidad existente en los modelos experimentales utilizados en la inducción del estado de sepsis, lo cual ha llevado a la obtención de diferentes resultados en relación a la función mitocondrial (Singer and Brealey 1999). En este sentido, merece la pena destacar los resultados obtenidos en dos trabajos realizados en mitocondrias de rata en los que se utilizó la inoculación de endotoxina (lipopolisacárido de *Escherichia coli*) como protocolo de inducción del estado de sepsis, debido a la similitud metodológica existente entre ambos y nuestro propio estudio (Boczkowski et al., 1999; Callahan et al., 2001). En uno de ellos se determinó que la administración de una dosis de endotoxina de 10 mg/kg de peso corporal a ratas inducía a las 6 h un aumento en la producción de peróxido de hidrógeno en las mitocondrias aisladas a partir del músculo diafragmático (Boczkowski et al., 1999). Además, en dichas mitocondrias se detectó un aumento en la tasa de desacoplamiento mitocondrial y, por tanto, una disminución de la capacidad fosforilativa de la mitocondria, siendo estos efectos atenuados con la administración del inhibidor de las NOS, L-NMMA (N-monometil-L-arginina). Los autores de este trabajo concluyeron que las ROS reaccionan con el NO generado durante

la endotoxemia, formando peroxinitrito (ONOO^-), el cual daña la función mitocondrial, contribuyendo a la alteración de la contractibilidad muscular. En un estudio posterior se determinó que la administración de una dosis de endotoxina de 8 mg/kg de peso corporal a ratas inducía a las 24-48 h una depleción del contenido proteico mitocondrial y un descenso en la tasa de respiración de las mitocondrias aisladas a partir del diafragma (Callahan et al., 2001). Este efecto sobre la respiración no se asociaba a desacoplamiento, sino que se relacionaba con un aumento en la producción de ROS y peroxinitrito, induciendo un descenso en la respiración en el Estado III, con la consiguiente disminución en la producción de ATP por parte de la mitocondria. Además, el efecto inhibitorio de la administración de endotoxina sobre el Estado III de la respiración fue abolido en presencia del inhibidor de las NOS L-NAME (N-Nitro-L-arginina-metil-ester). Como se ha mencionado anteriormente, los distintos resultados obtenidos en ambos trabajos pueden ser debidos a la administración de diferentes dosis de endotoxina y/o los distintos tiempos de incubación. Sin embargo, en ambos trabajos, la administración de los inhibidores L-NMMA y L-NAME protegía de la disfunción mitocondrial inducida por la endotoxina, indicando que la síntesis de NO se encontraba directamente implicada en la disfunción mitocondrial observada en un estado de sepsis.

En nuestro estudio determinamos que la pauta de administración de endotoxina utilizada inducía la expresión de la iNOS (Figura R.46) y aumentaba la producción de NO (Figuras R.47 y R.48) en el tejido muscular esquelético. Sin embargo, para establecer una relación directa entre la síntesis de NO y la inhibición de la actividad respiratoria de los complejos de la cadena de transporte de electrones, sería necesario comprobar que dicho efecto desaparece con la adición de los inhibidores L-NMMA o L-NAME.

Por otro lado, la utilización de endotoxina en nuestro estudio tiene como principal objetivo inducir un aumento en la expresión de la proteína UCP3, con la finalidad de relacionar diferencias en la expresión de esta proteína con cambios en la conductancia de la membrana mitocondrial interna a los protones, de manera que se pudiese estudiar la implicación de esta proteína en la protección frente al estrés oxidativo.

La proteína UCP3 cataliza parcialmente la conductancia basal de la membrana mitocondrial interna a los protones en las mitocondrias aisladas a partir del músculo esquelético

En condiciones basales, medimos la conductancia de la membrana mitocondrial interna a los protones en las mitocondrias aisladas a partir del músculo esquelético de ratones de tipo silvestre y deficientes en la expresión de la UCP3, en ausencia y presencia de endotoxina. A pesar de los diferentes niveles de expresión de la UCP3 en dichas mitocondrias, no se detectaron diferencias en la conductancia basal de la membrana mitocondrial interna a los

protones, según se refleja en las Figuras R.16, R.19, R.21 y R.22. Sin embargo, en estudios previamente realizados por otros autores se determinó que las mitocondrias aisladas a partir del músculo esquelético de los animales KO presentaban una conductancia a los protones inferior a la detectada en los animales de tipo silvestre (Gong et al., 2000; Vidal-Puig et al., 2000), asignando a la UCP3 una clara actividad desacoplante en condiciones basales. En oposición a esta afirmación y confirmando los resultados anteriormente citados, también se ha publicado que la conductancia de la membrana mitocondrial interna a los protones en las mitocondrias aisladas a partir del músculo esquelético de los animales KO es similar a la observada en las mitocondrias de animales de tipo silvestre (Cadenas et al., 2002).

Otros trabajos han tratado de determinar el papel de la UCP3 en la conductancia basal a los protones intentando relacionar un aumento en su expresión (mediante el ayuno o la administración de endotoxina) con cambios en la conductancia a los protones. En este sentido, en ratas sometidas a un periodo de 24 h de ayuno se determinó que la expresión de la UCP3 se incrementaba 2 veces en el músculo esquelético, sin modificarse la conductancia basal a los protones (Cadenas et al., 1999). En un estudio posterior, mediante la inoculación de endotoxina a ratones, se formuló la misma conclusión (Yu et al., 2000). Sin embargo, en este trabajo se determinaron las variaciones en el nivel de expresión de la UCP3 en el músculo esquelético en relación a su ARNm (no de la proteína), dificultando la interpretación de los resultados puesto que las variaciones en la expresión del ARNm de la UCP3 pueden no corresponderse con cambios en la expresión de la proteína (Sivitz et al., 1999). Por otro lado, a pesar de usar en nuestro estudio la misma estirpe de ratones y la misma endotoxina que los usados en el trabajo de Yu y colaboradores, su protocolo de inoculación consistía en la administración de una dosis de 6 mg/kg de peso corporal y un periodo de incubación de 16 h, por lo que los niveles de expresión de la proteína UCP3 en dicho estudio no pueden ser inferidos a partir de los resultados obtenidos en nuestro trabajo.

Aunque nuestros resultados parecían corroborar que la UCP3 no está implicada en la conductancia basal, tras consultar los trabajos recientemente publicados por Parker y colaboradores (Parker et al., 2008a; Parker et al., 2008b), decidimos realizar una nueva aproximación en el análisis de los resultados mediante el cálculo de la diferencia entre el valor de la respiración medido al potencial de 145 mV de las mitocondrias WT y las mitocondrias KO (Figura R.24). Esta determinación más detallada nos permitió precisar que, en nuestras condiciones experimentales, la UCP3 cataliza el 10% de la conductancia basal a los protones en el músculo esquelético. Este resultado es similar al obtenido en los trabajos anteriormente citados (Parker et al., 2008a; Parker et al., 2008b), en los que se estimó que la UCP3 cataliza en el músculo esquelético el 17% de la conductancia basal a los protones.

La proteína UCP3 no cataliza la conductancia basal de la membrana mitocondrial interna a los protones en las mitocondrias aisladas a partir del corazón

En condiciones basales, medimos la conductancia de la membrana mitocondrial interna a los protones en las mitocondrias aisladas a partir del corazón de los ratones de tipo silvestre y deficientes en la expresión de la UCP3, en ausencia y presencia de endotoxina. En las Figuras R.25, R.27 y R.28 puede observarse que no se detectaron diferencias en la conductancia basal de la membrana mitocondrial interna a los protones a pesar de los diferentes niveles de expresión de la UCP3 en dichas mitocondrias.

Seguidamente, a partir de los resultados reflejados en la Figura R.27, se efectuaron los mismos cálculos realizados con las mitocondrias de músculo esquelético para la confección de la Figura R.24, confirmándose en las mitocondrias de corazón que la UCP3 no se encuentra implicada en la regulación de la conductancia basal de la membrana mitocondrial interna a los protones. El reducido grado de expresión de la UCP3 en este tejido, en comparación con los niveles detectados en el músculo esquelético (Figura R.8), podría explicar que en nuestras condiciones experimentales no se haya asociado a la UCP3 con un papel en la regulación de la conductancia basal a los protones de la membrana interna de las mitocondrias aisladas a partir del corazón.

En resumen, en nuestras condiciones experimentales, la UCP3 cataliza únicamente el 10% de la conductancia basal de la membrana mitocondrial interna a los protones en las mitocondrias del músculo esquelético, mientras que no cataliza la conductancia basal de la membrana mitocondrial interna a los protones en las mitocondrias de corazón. No obstante, se decidió estudiar también la implicación de esta proteína en el desacoplamiento mitocondrial en presencia del radical superóxido (músculo esquelético), y en presencia del compuesto 4-hidroxinonenal (HNE) (músculo esquelético y corazón), descritos como activadores de la conductancia a los protones mediada por la UCP3 (Echtay et al., 2002b; Echtay et al., 2003).

La proteína UCP3 no cataliza la conductancia de la membrana mitocondrial interna a los protones en presencia del radical superóxido en las mitocondrias aisladas a partir del músculo esquelético

En nuestro trabajo, la generación exógena del radical superóxido mediante la adición de xantina 50 μ M y 0,01 U de xantina-oxidasa induce un aumento en la conductancia a los protones de la membrana interna de las mitocondrias aisladas a partir del músculo esquelético (Figura R.16, C y D). El efecto activador del radical superóxido sobre la conductancia mediada por la UCP3 fue descrito previamente (Echtay et al., 2002b), basándose los autores en que dicha activación se observaba en mitocondrias aisladas a partir del músculo esquelético de los animales de tipo silvestre, era inhibida en presencia de GDP 500 μ M y no se detectaba en las

mitocondrias aisladas a partir del músculo esquelético de los animales KO. En cambio, nuestros resultados parecen indicar que el aumento en la conductancia a los protones inducido por el radical superóxido no está mediado por la UCP3, puesto que no está inhibido en presencia de GDP, a pesar de utilizar las mismas condiciones de concentración de GDP, tiempo y pH de incubación (Figura R.17).

La posibilidad de estar generando, en nuestras condiciones experimentales, una excesiva cantidad de superóxido cuyos efectos no pudieran ser inhibidos en presencia de GDP fue estudiada mediante la adición al medio de incubación de xantina 50 μM y 0,002 U de xantina-oxidasa (Figura R.16, A y B). Al disminuir la concentración de la xantina-oxidasa añadida, no observamos ningún efecto sobre la conductancia a los protones de la membrana mitocondrial interna, a diferencia de los resultados obtenidos por Krauss y colaboradores, que detectaron un incremento en la conductancia a los protones en mitocondrias aisladas a partir del riñón con la adición de xantina 50 μM y 0,0002 U de xantina-oxidasa, así como en mitocondrias aisladas a partir del bazo adicionando xantina 50 μM y 0,0001 U de xantina-oxidasa, siendo este efecto inhibido en presencia de GDP (Krauss et al., 2003).

Posteriormente determinamos que el aumento en la conductancia a los protones inducido por el radical superóxido generado a partir de xantina 50 μM y 0,01 U de xantina-oxidasa estaba mediado por el ANT, debido a que dicha activación era inhibida tras la adición de carboxiatractilósido (CAT) 2,5 μM (Figura R.18). Este resultado se opone a los datos publicados en el trabajo de Echtay y colaboradores (Echtay et al., 2002b), en el que determinaron que el CAT no ejerce ningún efecto sobre el aumento en la conductancia a los protones inducido por el superóxido. A este respecto, conviene señalar que en dicho estudio utilizaron una concentración de CAT de 1,5 μM , mientras que en nuestro trabajo utilizamos una concentración superior.

En definitiva, debido a que la adición del inhibidor específico de la UCP3, GDP, no revierte el aumento de la conductancia a los protones inducido por el superóxido, mientras que dicho efecto es inhibido en presencia del inhibidor del ANT, CAT, concluimos que la activación que induce el radical superóxido sobre la conductancia de la membrana mitocondrial interna a los protones de las mitocondrias aisladas a partir del músculo esquelético de ratón no está catalizada por la UCP3, sino que dicha activación está mediada a través del ANT.

La proteína UCP3 cataliza parcialmente la conductancia de la membrana mitocondrial interna a los protones en presencia del 4-hidroxinonenal en las mitocondrias aisladas a partir del músculo esquelético

En nuestro estudio, la adición del compuesto HNE (35 μM) induce un aumento en la conductancia de la membrana mitocondrial interna a los protones en las mitocondrias del

músculo esquelético (Figuras R.19, R.20 y R.21). Esta activación está mediada por la UCP3 debido a que al inducir un aumento en la expresión de la UCP3 mediante la administración de endotoxina, se produce un aumento en la activación ejercida por el HNE sobre la conductancia a los protones (Figura R.19) y, además, tras la adición de HNE, las mitocondrias aisladas a partir del músculo esquelético de los animales KO presentan una conductancia a los protones inferior a la detectada en las mitocondrias aisladas de animales de tipo silvestre (Figura R.21). Sin embargo, el aumento en la conductancia observado tras la adición de HNE no está catalizado únicamente por la UCP3 en las mitocondrias del músculo esquelético. Esta conclusión se alcanza a partir de dos observaciones: en las mitocondrias de tipo silvestre la adición de GDP 500 μM revierte sólo parcialmente dicha activación (Figura R.20) y, además, en las mitocondrias de tipo KO, la adición de HNE también induce cierto aumento en la conductancia a los protones, aunque menor que el detectado en las mitocondrias de tipo silvestre (Figuras R.21 y R.22). Por lo tanto, en el aumento en la conductancia a los protones inducido por el HNE no se encuentra únicamente implicada la UCP3, sino que también participa otro transportador, el ANT. Este hecho se confirma tras observar que la adición de CAT 2,5 μM inhibe el efecto activador del HNE sobre la conductancia a los protones, tanto en las mitocondrias de tipo silvestre (Figura R.20) como de tipo KO (Figura R.23).

En las mitocondrias del músculo esquelético, se ha descrito previamente la implicación de ambas proteínas (UCP3 y ANT) en el aumento en la conductancia a los protones inducido por el HNE (Echtay et al., 2003). Sin embargo, el efecto conseguido con la adición de GDP en dicho trabajo difiere del observado en nuestras condiciones experimentales. Echtay y colaboradores inhibieron completamente la activación inducida por el HNE mediante la adición de GDP mientras que, en nuestras condiciones experimentales, el GDP tan solo inhibía un 46-56% la activación inducida por el HNE, siendo necesaria la adición conjunta de CAT para conseguir una reversión total del efecto del HNE (Figura R.20).

Finalmente, cuantificamos la implicación específica de la UCP3 en el aumento de la conductancia a los protones inducido por el HNE a partir de los resultados reflejados en la Figura R.21, restando el valor de la respiración en presencia de HNE del valor de la respiración en ausencia de HNE, tanto en las mitocondrias de tipo silvestre como en las de tipo KO (Figura R.24). Dichos incrementos fueron 30 nmol O/(min·mg de proteína) en las mitocondrias de tipo silvestre y 21 nmol O/(min·mg de proteína) en las mitocondrias de tipo KO. A partir de estos dos incrementos, en presencia y en ausencia de la proteína UCP3, se determinó que la UCP3 catalizaba el 30% del aumento en la conductancia a los protones inducido por el HNE en las mitocondrias del músculo esquelético. Se pueden comparar estos resultados con los obtenidos por Echtay y colaboradores (Echtay et al., 2003) que determinaron que la UCP3 y el ANT catalizaban el aumento en la conductancia a los protones inducido por el HNE en el músculo esquelético contribuyendo ambos transportadores aproximadamente al 50% en dicho efecto. Por otro lado, también se ha descrito recientemente que la UCP3 y el ANT contribuyen al

aumento de la conductancia a los protones inducido por el HNE en este mismo tejido en un 11 y un 64%, respectivamente (Parker et al., 2008b). Las diferencias existentes entre nuestro trabajo y los anteriormente citados en relación a la cuantificación del aumento en la conductancia catalizado por la UCP3 pueden deberse a diferencias en el tiempo de incubación de las mitocondrias en presencia del sustrato succinato (Parker et al., 2008a), que se hacen aún más evidentes en presencia del HNE (Parker et al., 2008b). En nuestro estudio, el tiempo de incubación de las mitocondrias desde la adición del succinato hasta la finalización de la titulación con malonato y FCCP fue de 7 min. En el primer trabajo anteriormente citado no se hace referencia a los tiempos de incubación utilizados (Echtay et al., 2003), por lo que no podemos determinar las posibles diferencias entre nuestras condiciones experimentales y las utilizadas por dichos autores. En el segundo estudio referido (Parker et al., 2008b) se precisa que dicho tiempo de incubación fue de 5,5 min, pudiéndose atribuir a este factor las diferencias existentes en el porcentaje del aumento de la conductancia a los protones inducido por el HNE y catalizado por la UCP3.

La proteína UCP3 no cataliza la conductancia de la membrana mitocondrial interna a los protones en presencia del 4-hidroxinonanal en las mitocondrias aisladas a partir del corazón

En comparación con el músculo esquelético, el papel de la UCP3 en el corazón se ha estudiado en un menor número de trabajos e incluso, en algunos de ellos, no ha sido posible determinar la existencia de la UCP3 en este tejido (Ricquier and Bouillaud 2000; Pecqueur et al., 2001; Echtay et al., 2002b; Echtay et al., 2003).

En nuestro estudio, tras detectar mediante western blot la presencia de esta proteína en las mitocondrias aisladas a partir del corazón de los ratones de tipo silvestre (Figura R.7), se determinó que la adición del HNE inducía un aumento en la conductancia de la membrana mitocondrial interna a los protones, tanto en las mitocondrias aisladas a partir de ratones de tipo silvestre como de tipo KO, no encontrándose diferencias en el grado de activación inducido por el HNE, a pesar de las diferencias existentes en la expresión de la UCP3 (Figuras R.25, R.27 y R.28). Estos datos parecen indicar que la UCP3 no cataliza el aumento en la conductancia a los protones inducido por el HNE en las mitocondrias del corazón, estando esta hipótesis apoyada por el hecho de que la adición de GDP 500 μ M no inhibe la activación inducida por el HNE (Figura R.26). Como se ha indicado anteriormente, el diferente grado de expresión de la UCP3 en este tejido y en el músculo esquelético (siendo 6-7 veces inferior en el corazón, Figura R.8) podría ser la explicación de que se haya determinado que la UCP3 no se encuentra implicada en el aumento de la conductancia a los protones inducido por el HNE, o de que la UCP3 ejerza un efecto tan sutil que no llega a ser detectable en nuestras condiciones experimentales. En cambio, la adición de CAT 2,5 μ M (o de GDP+CAT) inhibe parcialmente la activación inducida por el HNE, determinándose que el ANT cataliza entre un 67-73% de la

activación de la conductancia de la membrana mitocondrial interna a los protones inducida por el HNE (Figuras R.26 y R.29). De los resultados anteriores se deduce que parte del efecto activador del HNE observado en las mitocondrias del corazón (27-33%) no está catalizado a través de la UCP3 ni a través del ANT, debido a que dicho efecto no revierte completamente en presencia de GDP, de CAT o de GDP+CAT, haciéndose necesaria la implicación de otras vías en la mediación de la activación inducida por el HNE.

La adición de GDP no modifica significativamente la conductancia basal de la membrana mitocondrial interna a los protones, y su efecto inhibitor sobre el aumento en la conductancia a los protones inducido por el 4-hidroxinonenal es específico de la UCP3

En nuestro estudio, la implicación de la UCP3 en la conductancia a los protones, tanto basal como inducida, se ha determinado mediante la utilización de mitocondrias aisladas a partir de animales de tipo silvestre y mutantes deficientes en la expresión de la UCP3, así como mediante la utilización del inhibidor clásicamente considerado específico de las UCPs, el GDP (Echtay et al., 2001). El efecto de la adición de GDP sobre la conductancia basal de la membrana mitocondrial interna a los protones fue estudiado en las mitocondrias del músculo esquelético (Figuras R.30 y R.31) y del corazón (Figuras R.32 y R.33). A partir de estas gráficas se determinó que la adición de GDP no modificaba significativamente la conductancia basal a los protones en nuestras condiciones experimentales, confirmando datos previamente publicados (Cadenas et al., 1999; Cadenas and Brand 2000; Echtay et al., 2002b). No obstante, aunque las diferencias observadas no eran estadísticamente significativas, sí se detectó una tendencia a la inhibición de la conductancia basal en presencia de GDP.

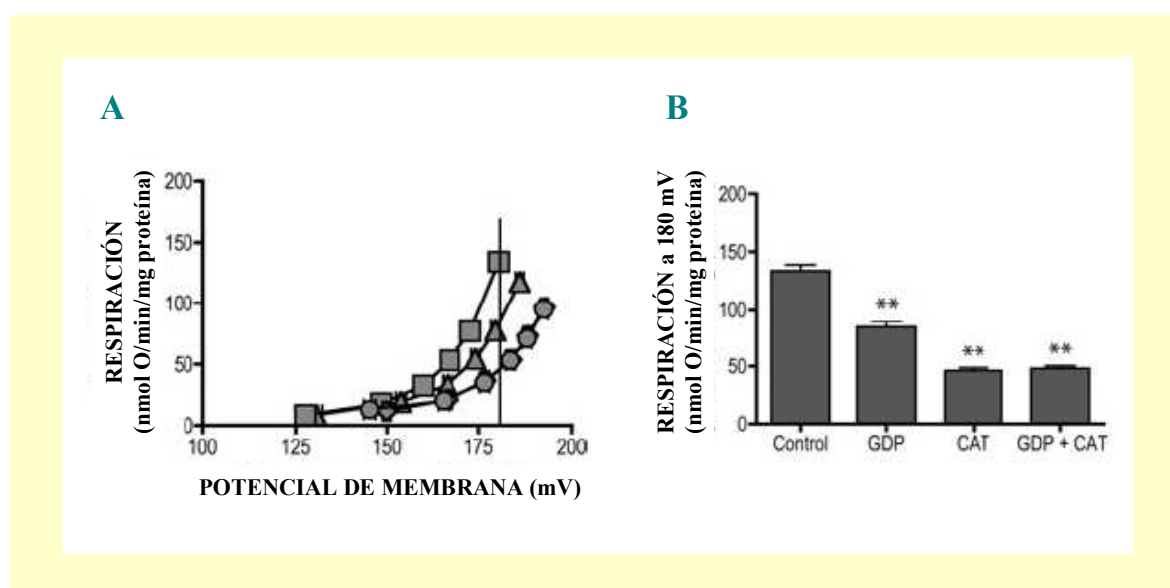


Figura D.1. Efecto del GDP y el CAT sobre la conductancia basal de la membrana mitocondrial interna a los protones en mitocondrias de músculo esquelético de rata (A). Leyenda: ■, conductancia basal; ▲, adición de GDP; ◆, adición de CAT; ●, adición de GDP y CAT. Valor medio \pm SEM de la respiración medido a un potencial de membrana de 180 mV (B). Diferencias significativas respecto al control (**, $p < 0,01$) (Parker et al., 2008a).

Este hecho concordaría con lo observado recientemente por Parker y colaboradores (Parker et al., 2008a), así como con nuestros resultados mencionados anteriormente, según los cuales la UCP3 cataliza el 10% de la conductancia basal a los protones en el músculo esquelético. En cualquier caso, las diferencias entre los resultados de nuestro trabajo y el de Parker y colaboradores puede ser debida a las diferentes condiciones de incubación utilizadas: en nuestro trabajo incubamos el GDP durante 10 min previamente a la adición del succinato y empleamos 7 min más en finalizar la titulación con malonato y FCCP, mientras que Parker y colaboradores preincubaron el GDP 3 min, añadieron el succinato y finalizaron la titulación con malonato y FCCP en 5,5 min.

Basándonos en nuestros resultados, podemos concluir que el GDP no modifica significativamente la conductancia basal a los protones, al menos en nuestras condiciones experimentales, y que el GDP inhibe específicamente el aumento en la conductancia a los protones inducido por el HNE que está catalizado a través de la UCP3. Esta afirmación está basada en el hecho de que la adición de GDP a las mitocondrias aisladas a partir del músculo esquelético de ratones de tipo silvestre inhibe parcialmente la activación inducida por el HNE (Figura R.20), mientras que al añadir GDP a las mitocondrias aisladas a partir del mismo tejido de ratones deficientes en la expresión de la UCP3, éste no ejerce ningún efecto sobre el aumento en la conductancia a los protones inducido por el HNE (Figura R.23).

A partir de los experimentos realizados en las mitocondrias de corazón no pudimos inferir ninguna conclusión en relación a la especificidad del GDP, puesto que su adición no parecía ejercer ningún efecto sobre el aumento inducido por el HNE en la conductancia a los protones de la membrana interna de las mitocondrias aisladas a partir de este tejido (Figura R.26).

Nos parece necesario destacar nuestra conclusión sobre el papel inhibitor del GDP sobre la conductancia a los protones mediada específicamente por la UCP3, debido a la reciente publicación en la que se indica que el GDP puede inhibir la conductancia a los protones actuando de forma no específica sobre las UCPs y, en concreto, inhibiendo la conductancia a los protones catalizada por el ANT (Parker et al., 2008a).

La adición de carboxiatractilósido disminuye la conductancia basal de la membrana mitocondrial interna a los protones, y su efecto inhibitor sobre el aumento en la conductancia a los protones inducido por el 4-hidroxinonenal no es específico del ANT, sino que también puede inhibir a la UCP3

El efecto de la adición de CAT sobre la conductancia basal de la membrana mitocondrial interna a los protones fue estudiado en las mitocondrias aisladas a partir del músculo esquelético (Figuras R.30 y R.31) y el corazón (Figuras R.32 y R.33). Los resultados obtenidos

indicaron que el CAT disminuye la conductancia basal de la membrana mitocondrial interna a los protones, a pesar de no acompañarse esta tendencia de significación estadística ($p > 0,05$).

En concordancia con esta afirmación, en el trabajo citado anteriormente (Parker et al., 2008a) se determinó que el CAT inhibía en parte la conductancia basal a los protones en las mitocondrias del músculo esquelético, tanto de las aisladas a partir de ratones de tipo silvestre como de las aisladas de ratones mutantes deficientes en la expresión de la UCP3, siendo este efecto inhibitorio superior al ejercido por el GDP. Esta conclusión se obtuvo preincubando el CAT durante 3 min, añadiendo seguidamente el succinato y finalizando la titulación con malonato y FCCP en 5,5 min, mientras que en nuestras condiciones experimentales se preincubó el CAT durante 6 min previamente a la adición del succinato y empleamos 7 min más en finalizar la titulación con malonato y FCCP. El diferente protocolo utilizado puede ser el responsable del diferente grado de inhibición obtenido en nuestro estudio y el realizado por Parker y colaboradores.

La implicación del ANT en la conductancia de la membrana mitocondrial interna a los protones, tanto basal como inducida, ha sido estudiada en diversos trabajos mediante la utilización de CAT, un inhibidor considerado clásicamente específico de este transportador (Echtay et al., 2003; Brand et al., 2005; Azzu et al., 2008; Parker et al., 2008a; Parker et al., 2008b). Sin embargo, la especificidad del CAT como inhibidor de la actividad del ANT ha sido recientemente refutada, indicándose que la conductancia mediada a través de la UCP3 también puede ser inhibida por el CAT (Parker et al., 2008a). Nuestros resultados apoyan esta hipótesis, puesto que la adición de CAT a las mitocondrias del músculo esquelético de los animales de tipo silvestre induce una inhibición total del aumento en la conductancia a los protones inducido por el HNE (Figura R.20) y, como se explicó anteriormente, esta conductancia está catalizada en parte por la UCP3 y en parte por el CAT.

En definitiva, nuestros resultados indican que la UCP3 regula parcialmente el aumento en la conductancia a los protones inducido por el HNE en las mitocondrias aisladas a partir del músculo esquelético; por lo tanto, se puede atribuir a esta proteína un papel protector frente al estrés oxidativo al inducir un ligero desacoplamiento mitocondrial que conduce al descenso del potencial de membrana mitocondrial y al aumento en el consumo de oxígeno, provocando ambas acciones una disminución de la producción de ROS. Sin embargo, en nuestras condiciones experimentales, dicho papel protector de la UCP3 frente al estrés oxidativo no ha sido evidenciado en las mitocondrias aisladas a partir del corazón, atribuyéndose esta diferente conclusión al reducido nivel de expresión de la UCP3 en este tejido.

2. PAPEL DE LA UCP3 EN LOS PROCESOS DE ISQUEMIA-REPERFUSIÓN EN MITOCONDRIAS AISLADAS A PARTIR DEL CORAZÓN Y EN CARDIOMIOCITOS NEONATALES DE RATA

En los procesos de isquemia-reperfusión cardiaca se produce un aumento en la producción de ROS (Zweier et al., 1987; Zweier et al., 1989; Levraut et al., 2003; Sack 2006) y, en este contexto, se ha sugerido que las UCPs podrían desempeñar un papel protector frente al daño oxidativo al mediar un ligero desacoplamiento de la fosforilación oxidativa (apartado 3.4.1 de la Introducción).

En relación con la UCP1, se ha determinado que la sobreexpresión de esta proteína en la línea celular H9C2 (mioblastos de origen cardiaco) induce un aumento de la supervivencia celular tras un proceso de hipoxia-reoxigenación, así como una disminución en la producción de ROS (Bienengraeber et al., 2003). En un estudio posterior se afirmó que esta proteína protege frente a los procesos de isquemia-reperfusión, al observar que la funcionalidad de los corazones de los ratones transgénicos que expresan elevadas cantidades de la UCP1 se recupera mejor de 40 min de isquemia seguidos de perfusión que los corazones de ratones de tipo silvestre (Hoerter et al., 2004). Por otro lado, en cardiomiocitos neonatales de rata se ha establecido que, a pesar de que la sobreexpresión de la UCP2 no confiere actividad desacoplante, esta proteína ejerce un papel protector frente al daño oxidativo al disminuir la entrada de calcio en la mitocondria y reducir la producción de ROS (Teshima et al., 2003). Una conclusión similar se obtuvo en un estudio realizado en la línea celular H9C2 en el que, mediante técnicas de ARN de interferencia, se asoció a la UCP2 y a la UCP3 con una disminución en la producción de ROS y, por tanto, con un papel protector frente a los procesos de anoxia-reoxigenación (McLeod et al., 2005).

En nuestro estudio quisimos determinar si la UCP3 tiene algún papel en la respuesta frente a un proceso de isquemia-reperfusión. Con esta finalidad se decidió aplicar un protocolo *in vitro* de anoxia-reoxigenación en mitocondrias aisladas a partir del corazón de ratones de tipo silvestre y deficientes en la expresión de la UCP3, así como en cardiomiocitos neonatales de rata, transfectados con el gen que codifica la UCP3, con el objetivo de inducir un nivel de expresión de esta proteína similar al observado en el corazón de rata adulta (Figura M.12).

La expresión de la proteína UCP3 en los cardiomiocitos neonatales de rata y en las mitocondrias aisladas a partir del corazón de ratón en presencia de succinato se asocia a una mejor recuperación de la función respiratoria tras un proceso de anoxia-reoxigenación. Sin embargo, en presencia de ADP, la expresión de la UCP3 dificulta la recuperación de la función respiratoria tras un proceso de anoxia-reoxigenación en las mitocondrias aisladas a partir del corazón de ratón

La UCP3 podría tener un papel protector frente al daño oxidativo en los procesos de isquemia-reperusión cardiaca al mediar una ligera despolarización de la membrana mitocondrial interna y, por tanto, inducir una disminución en la producción de ROS (Sack 2006). Este posible papel protector de la UCP3 se ha analizado en nuestro estudio y en otros trabajos mediante la aplicación de diversos protocolos de anoxia-reoxigenación. En nuestro estudio, tras aplicar un periodo de anoxia de 20 min, observamos que los cardiomiocitos neonatales de rata y las mitocondrias aisladas a partir del corazón de ratones que expresan la UCP3 tienden a recuperar la función respiratoria mejor que los cardiomiocitos o las mitocondrias que no expresan esta proteína (Figuras R.36, B y R.38). A pesar de no alcanzar la significación estadística, esta tendencia parece sugerir un cierto papel protector de la UCP3 frente a los procesos de anoxia-reoxigenación. Sin embargo, al adicionar ADP a las mitocondrias aisladas a partir del corazón, se observó que la ausencia de la proteína UCP3 permite una mejor recuperación de la función respiratoria tras el proceso de anoxia-reoxigenación (Figura R.36, B). Este hecho se podría explicar argumentando que las mitocondrias que no expresan la UCP3 se encuentran más acopladas, sintetizan de manera más eficiente el ATP, y el aumento en la síntesis de ATP va asociado a un mayor consumo de oxígeno, incrementándose la tasa de la respiración mitocondrial.

En la bibliografía existe cierta controversia en relación a la función de la UCP3 en los procesos de anoxia-reoxigenación cardiaca. En cuanto a los efectos de la anoxia o la hipoxia sobre los niveles de expresión del ARNm de la UCP3, por un lado se ha descrito que dichos niveles se encuentran disminuidos en el corazón de rata (Essop et al., 2004; Stavinoha et al., 2004; Zungu et al., 2007), mientras que otros trabajos establecen que dichos niveles aumentan en el corazón (McLeod et al., 2005) y en el músculo esquelético (Bo et al., 2008; Lu and Sack 2008) de este animal tras un periodo de hipoxia. En otros estudios se ha tratado de determinar el papel de la UCP3 en el precondicionamiento isquémico y la posterior respuesta frente a un proceso de anoxia-reoxigenación. En este sentido se detectó que los niveles de expresión del ARNm de la UCP3 se encuentran aumentados en el corazón precondicionado de rata, y este aumento se correlaciona con una disminución en el tamaño de los infartos (McLeod et al., 2005), lo que sugiere que la UCP3 ejerce un papel protector frente a los procesos de isquemia-reperusión. En este mismo trabajo, mediante la técnica de ARN de interferencia dirigida contra la expresión de la UCP3, se determinó que los mioblastos de la línea celular cardiaca H9c2 perdían parte de su capacidad de precondicionamiento frente a la anoxia-reoxigenación. En cambio, la tolerancia a la anoxia de dicha línea celular no disminuía a pesar de inhibirse la expresión de la UCP3.

En resumen, es preciso realizar nuevos estudios que ayuden a interpretar el papel de la UCP3 en los procesos de isquemia-reperusión, prestando especial atención a la relación existente entre la expresión de esta proteína y la producción de ROS, puesto que algunos trabajos

parecen indicar que la inhibición de la expresión de la UCP2 y la UCP3 induce un aumento en la producción de ROS en cardiomiocitos sometidos a un proceso de anoxia-reoxigenación (McLeod et al., 2005). De acuerdo con este resultado, ambas UCPs se encontrarían implicadas en la tolerancia a la isquemia y ejercerían una función protectora formando parte de los sistemas de defensa antioxidantes de la célula.

3. PRESENCIA DE LA ÓXIDO NÍTRICO SINTASA MITOCONDRIAL EN EL MÚSCULO ESQUELÉTICO DE RATONES TRAS LA ADMINISTRACIÓN DE ENDOTOXINA: PRODUCCIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO Y EFECTOS SOBRE LA RESPIRACIÓN

Como último capítulo de nuestro estudio, nos planteamos determinar la posible presencia de la óxido nítrico sintasa mitocondrial (mtNOS) en el músculo esquelético a través de la detección del óxido nítrico (NO) producido por esta enzima y de los efectos que dicho gas pudiera ejercer sobre la respiración. Ambas aproximaciones precisaron de una optimización previa de las condiciones experimentales, por lo que se realizó un estudio instrumental comparativo, en relación a las medidas de consumo de oxígeno y de producción de NO, entre un respirómetro convencional de tipo Clark y un respirómetro de alta resolución.

El flujo de oxígeno instrumental es menor en un respirómetro de alta resolución que en un respirómetro convencional

Tradicionalmente, las medidas de consumo de oxígeno se han realizado mediante técnicas polarográficas basadas en la utilización de electrodos de tipo Clark. Sin embargo, cuando se precisa realizar estas determinaciones en el rango de concentraciones fisiológicas de oxígeno o en hipoxia, surgen diversos problemas instrumentales al utilizar este tipo de electrodos (Wilson et al., 1988; Méndez 1994). El desarrollo de la respirometría de alta resolución ha permitido evitar o minimizar la difusión de oxígeno y estabilizar la señal recogida por el electrodo con un tiempo de resolución adecuado, siendo estas características necesarias para la realización de medidas de consumo de oxígeno fiables a concentraciones bajas de este gas (Gnaiger et al., 1995).

En nuestro laboratorio se determinó, a partir de las ecuaciones de la Figura R.39, la existencia de un mayor consumo de este gas por parte del electrodo de un respirómetro convencional que de un respirómetro de alta resolución a la concentración de oxígeno atmosférica (172 μM). Asimismo, la difusión de este gas desde el exterior al interior de la cámara del respirómetro es superior en el respirómetro convencional que en el de alta resolución a concentraciones bajas de oxígeno (30 μM). Por lo tanto, las medidas realizadas en el respirómetro de alta resolución

son más precisas que las realizadas en el respirómetro convencional y, además, el primero incorpora la corrección automática del flujo instrumental en todo el rango de concentraciones de oxígeno.

Seguidamente, mediante la utilización de un electrodo de NO, se compararon las medidas de NO realizadas en la cámara de un respirómetro convencional y en la de un respirómetro de alta resolución.

La cuantificación de la producción de NO no se ve afectada por la utilización de la cámara de un respirómetro convencional o de alta resolución

La cuantificación de la producción de NO no se ve afectada por la realización de las medidas en la cámara del respirómetro convencional o de alta resolución (Figura R.44), puesto que los cálculos de la producción de NO se realizan a partir de la recta de calibración obtenida en las mismas condiciones experimentales que las medidas de NO. Sin embargo, se debe tener en cuenta que el valor absoluto de la intensidad de la señal (pA) recogida por el electrodo de NO se ve afectada por el estado de la cámara, abierta o cerrada (Figura R.40, A), así como por la realización de las medidas en la cámara de uno u otro respirómetro en relación con su valor máximo (Figuras R.42 y R.43, A) y a su estabilidad transcurrido un breve periodo de tiempo (5 min), especialmente cuando se intentan detectar concentraciones de NO inferiores a 1 μM (Figura R.43, B).

Los resultados del estudio instrumental comparativo entre el respirómetro convencional y el de alta resolución nos llevaron a optar por la utilización de éste último a la hora de intentar determinar el NO producido por la mtNOS y su efecto inhibitorio sobre la respiración mitocondrial. Esta decisión se tomó basándonos en que se ha descrito que la producción media del NO generado por la mtNOS es de $1,70 \pm 0,66 \text{ nmol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$ de proteína, habiéndose obtenido este valor tras calcular la media de los valores de producción de NO aportados por distintos estudios realizados con diferentes preparaciones mitocondriales y técnicas analíticas (Brookes 2004). Dado que la producción de NO que se esperaba detectar en nuestro trabajo debía estar en torno a dicha tasa, y que el grado de inhibición que ejerce el NO sobre la respiración es más potente cuanto menor es la concentración de oxígeno (Brown and Cooper 1994; Takehara et al., 1995; Koivisto et al., 1997), la utilización de un respirómetro de alta resolución nos permitía estudiar con mayor fiabilidad el efecto del NO sobre la respiración a bajas concentraciones de oxígeno (30 y 10 μM). Así, en la cámara de este respirómetro, la difusión de este gas y del NO es menor (según demuestra nuestro estudio instrumental comparativo), aporta una corrección automática del flujo de oxígeno instrumental en tiempo real y registra una señal más estable (Gnaiger et al., 1995).

La producción de NO por la mtNOS no es detectable mediante la utilización de un electrodo de NO en la cámara de un respirómetro de alta resolución

Con la finalidad de detectar el NO producido por la mtNOS, aislamos mitocondrias a partir del músculo esquelético de ratones de tipo silvestre a los que se les había inyectado solución salina estéril o endotoxina a una dosis de 12 mg/kg de peso corporal y 24 h de incubación. La administración de endotoxina se ha utilizado en diversos estudios como modelo de inducción de la mtNOS con la finalidad de detectarla y posteriormente caracterizarla funcionalmente (Callahan et al., 2001; Boveris et al., 2002; Escames et al., 2003; Alvarez and Boveris 2004; Xu et al., 2005). En nuestro trabajo, previamente comprobamos mediante western blot que dicha pauta de administración de endotoxina inducía la expresión de la iNOS en el tejido muscular esquelético (Figura R.46), y que la presencia de NO era detectable mediante microscopía confocal gracias a la fluorescencia emitida por el fluorocromo DAF-FM (Figuras R.47 y R.48).

En nuestras condiciones experimentales, las mitocondrias aisladas a partir del músculo esquelético de ratones de tipo silvestre no produjeron una concentración de NO detectable mediante la utilización de un electrodo de NO (ISO-NOP, World Precision Instruments Inc.) insertado en la cámara del respirómetro de alta resolución (Figura R.49).

El electrodo de NO ha sido aplicado previamente a la detección del NO producido por la mtNOS en otros estudios, obteniéndose similares resultados negativos en mitocondrias aisladas a partir del hígado de rata (Tay et al., 2004) y en mitocondrias aisladas a partir del cerebro de ratón (Lacza et al., 2004).

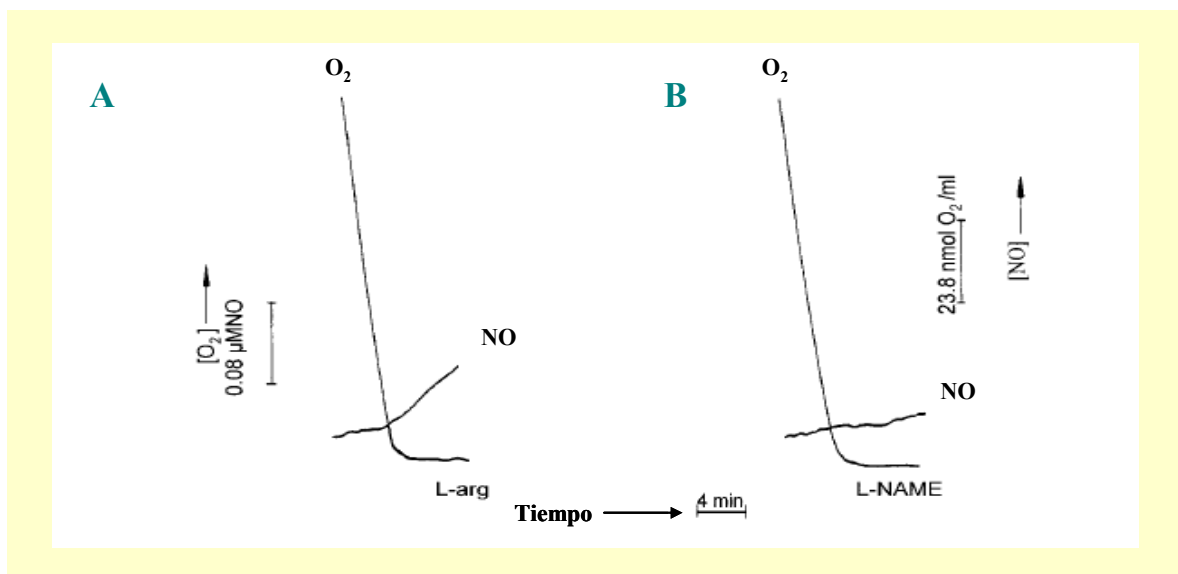


Figura D.2. Consumo de oxígeno y producción de NO de las mitocondrias aisladas a partir del hígado de rata (2 mg/ml). El consumo de oxígeno se determinó mediante la utilización de un electrodo de tipo Clark mientras que la producción de NO se determinó con un electrodo sensible a NO, en presencia del sustrato de las NOS L-arginina (L-arg) 10 mM (A) y del inhibidor de las NOS L-NAME 10 mM (B) (Schild et al., 2003).

Sin embargo, otros autores consiguieron detectar el NO producido por mitocondrias aisladas a partir del corazón (Kanai et al., 2001) y del hígado de rata (Schild et al., 2003; Castello et al., 2006) mediante la utilización de la misma técnica instrumental. En el corazón se determinó que las mitocondrias generaban una concentración de 28 ± 9 nM de NO en presencia de L-arginina y diversos cofactores, mientras que dicha producción de NO no se detectaba al añadir el inhibidor de las NOS, L-NMMA. En el hígado, la concentración de NO detectada fue inferior (12 nM/min (Castello et al., 2006) y 13 nM/min (Schild et al., 2003)) inhibiéndose su producción en presencia del inhibidor de las NOS, L-NAME. En el corazón se determinó que las mitocondrias generaban una concentración de 28 ± 9 nM de NO en presencia de L-arginina y diversos cofactores, mientras que dicha producción de NO no se detectaba al añadir el inhibidor de las NOS, L-NMMA. En el hígado, la concentración de NO detectada fue inferior: 12 nM/min (Castello et al., 2006) y 13 nM/min (Schild et al., 2003), inhibiéndose su producción en presencia del inhibidor de las NOS L-NAME.

Posteriormente determinamos que el límite de detección del electrodo de NO utilizado en nuestro estudio se encontraba alrededor de 50 nM de NO; por lo tanto, en el caso de que la producción de NO por parte de la mtNOS fuese inferior a este valor, no sería detectable. Tras no conseguir detectar directamente el NO producido por la mtNOS, intentamos determinar indirectamente la presencia de este gas mediante el estudio de la inhibición de la respiración a concentraciones bajas de oxígeno.

La inhibición de la respiración inducida por el NO producido por la mtNOS es detectable en presencia de L-arginina a 10 μ M de oxígeno en mitocondrias aisladas a partir del músculo esquelético de ratones inoculados con endotoxina

El valor de la respiración se determinó en el respirómetro de alta resolución a 30 y 10 μ M de oxígeno, en presencia y ausencia de ADP 1 mM, puesto que se ha descrito que la respiración en el Estado III presenta una mayor sensibilidad al efecto inhibitor del NO que en el Estado IV (Brookes et al., 2003). Tras añadir el sustrato de las NOS L-arginina, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas en el valor de la respiración medido a 30 μ M de oxígeno entre las mitocondrias aisladas a partir del músculo esquelético de los ratones control y de los ratones a los que se le había inoculado endotoxina (Figura R.51, A). Sin embargo, al determinar el valor de la respiración de las mitocondrias aisladas a partir de los ratones inoculados con endotoxina a la concentración de oxígeno fisiológica celular, 10 μ M (Brookes et al., 2003), detectamos que la adición de L-arginina inducía cierta inhibición de la respiración (Figura R.51, C), siendo este efecto abolido en presencia del inhibidor de las NOS, L-NMMA (Figura R.51, D). Los diferentes resultados obtenidos a 30 y 10 μ M de oxígeno se encuentran en concordancia con el diferente grado de inhibición que ejerce el NO sobre la actividad de la citocromo c oxidasa en función de la concentración de oxígeno, puesto que el NO y el oxígeno

compiten por el mismo sitio de unión en el centro reactivo de la citocromo c oxidasa (Brown and Cooper 1994; Cleeter et al., 1994; Takehara et al., 1995; Koivisto et al., 1997).

El valor de la p_{50} de la respiración aumenta al adicionar L-arginina a las mitocondrias aisladas a partir del músculo esquelético de los ratones inoculados con endotoxina

El valor de presión parcial de oxígeno a la que la respiración es la mitad de la máxima viene definido por la p_{50} , un valor inversamente proporcional a la afinidad que presenta la citocromo c oxidasa por el oxígeno. En nuestro estudio, determinamos que el valor de la p_{50} de la respiración de las mitocondrias aisladas a partir del músculo esquelético de ratones a los que se les administró endotoxina aumenta en presencia de L-arginina (de 0,4 a 0,7 μ M), y que dicho aumento desaparece en presencia de L-NMMA (Figura R.52).

En conclusión, los resultados obtenidos (Figuras R.51 y R.52) indican que el protocolo de administración de endotoxina se relaciona con la producción de NO en presencia del sustrato L-arginina, es decir, en las mitocondrias del músculo esquelético se detecta la actividad de una NOS de naturaleza inducible.

Existe cierta controversia en relación con la naturaleza de la mtNOS, describiéndose inicialmente que esta enzima presentaba cierta similitud con la eNOS (Bates et al., 1995; Kobzik et al., 1995). Posteriormente se describió que la mtNOS se encontraba relacionada en mayor medida con la nNOS (Kanai et al., 2001; Giulivi 2003). Algunos autores consideran que podría ser la propia nNOS la que, tras sufrir una modificación post-translacional, fuera incorporada en la mitocondria (Elfering et al., 2002), mientras que otros afirman que dicha enzima se expresa constitutivamente en la mitocondria, siendo codificada por el mismo gen que codifica la nNOS (Haynes et al., 2004). Por el contrario, otros trabajos han determinado la naturaleza inducible de la mtNOS basándose en la detección de esta proteína en mitocondrias de hígado (Tatoyan and Giulivi 1998; Escames et al., 2003), corazón (French et al., 2001) y pulmón (Escames et al., 2003) mediante la utilización de anticuerpos anti-iNOS por western blot. En nuestro estudio, en las mitocondrias aisladas a partir del músculo esquelético, no conseguimos detectar la mtNOS mediante western blot utilizando un anticuerpo anti-iNOS, e incluso la utilización de este anticuerpo nos sirvió como comprobación del grado de pureza de las mitocondrias aisladas al poder detectar proteína iNOS en el tejido muscular y no detectar dicha proteína en las mitocondrias (Figura R.46).

La naturaleza inducible de la mtNOS también se ha determinado en algunos trabajos al observar un aumento en su expresión o en su actividad al provocar un estado de sepsis en animales de experimentación, mediante la administración de endotoxina (Boczkowski et al., 1999; Boveris et al., 2002; Escames et al., 2003; Alvarez and Boveris 2004) o mediante el procedimiento quirúrgico de ligación y posterior punción del ciego (Xu et al., 2005; Escames et

al., 2006). Nuestros resultados corroboran la naturaleza inducible de la actividad de la mtNOS, al detectarse únicamente cierta inhibición de la respiración o un aumento en el valor de la p_{50} (ambas, medidas indirectas de la presencia de NO) en las mitocondrias aisladas a partir de ratones a los que se les había administrado endotoxina. Sin embargo, algunos autores proponen que la mtNOS presenta distinta naturaleza en función del tejido en el que se exprese (Giulivi 2003; Alvarez and Boveris 2004; Brookes 2004), siendo una isoforma más próxima a la nNOS en el cerebro, el corazón y el músculo esquelético, mientras que la naturaleza de la mtNOS en el hígado y en el pulmón tendría mayor similitud con la iNOS (Giulivi 2003). Por el contrario, otros consideran que la mtNOS presenta una naturaleza distinta a la nNOS, eNOS y iNOS, o que dichas isoformas no se encuentran en la mitocondria a concentraciones fisiológicamente relevantes (Lacza et al., 2003). Por otro lado, en un estudio realizado recientemente en mitocondrias de músculo esquelético de ratón se determinó que la mitocondria expresa dos isoformas de la mtNOS: una de manera constitutiva y la otra inducible frente a un proceso de sepsis (Escames et al., 2006). En este trabajo, la naturaleza inducible de la mtNOS se veía corroborada por el hecho de que los autores no detectaron actividad, ni basal ni inducida mediante el protocolo de sepsis, de la mtNOS en mitocondrias aisladas a partir de ratones deficientes en la expresión de la iNOS, sugiriendo que la mtNOS está codificada por el mismo gen que la iNOS.

En nuestro estudio, podemos determinar que la administración de endotoxina induce un aumento en la actividad de la mtNOS, detectándose la inhibición de la respiración a 10 μ M de oxígeno y un aumento en el valor de la p_{50} al adicionar el sustrato L-arginina, es decir, detectamos los efectos que ejerce el NO sobre la respiración. Sin embargo, no podemos aseverar con total seguridad que dicho NO sea producido por la mtNOS, al describirse en la literatura que el aislamiento de mitocondrias presenta tan sólo un 40-90% de pureza (Kanai et al., 2004) o como máximo del 96% al realizar el aislamiento utilizando gradientes de Percoll (Giulivi 1998), pudiéndose producir una contaminación con las NOS citosólicas en el proceso de aislamiento. Además, la eNOS y la nNOS poseen puntos de anclaje específicos a los lípidos de membrana (Alderton et al., 2001), mientras que la iNOS se puede adherir no específicamente a las membranas biológicas (Hiki et al., 1991), por lo que estas isoformas podrían contaminar las preparaciones de mitocondrias aisladas durante el proceso de homogeneizado tisular. Tampoco se debe olvidar que en la mitocondria se ha descrito la generación de NO de forma independiente de las NOS a partir de la conversión de nitritos en NO en condiciones reductoras, estando catalizada esta reacción por el Complejo bc_1 mitocondrial (Nohl et al., 2000).

Independientemente de la naturaleza de la mtNOS, es necesario destacar la importancia biológica que ejerce esta enzima sobre la respiración celular, siendo fundamental en numerosas condiciones fisiopatológicas en las que la respiración mitocondrial se encuentra afectada. Sin embargo, todavía existe cierto desconocimiento sobre la regulación de la

expresión de la mtNOS en los diferentes tejidos, sobre si su actividad se encuentra coordinada con la expresión de las demás NOS, así como sobre su implicación en diversos procesos fisiopatológicos (Kato and Giulivi 2006). Por lo tanto, es necesario realizar nuevos estudios dirigidos a aclarar estas incógnitas, con el apoyo de técnicas instrumentales que permitan cuantificar la producción de NO de manera fiable a pesar de ser un gas de vida media corta, alta difusión y relativamente reactivo.

CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos en el presente trabajo de tesis doctoral se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. La delección del gen que codifica la proteína UCP3 o el aumento en su expresión mediante la administración de endotoxina no modifica el control respiratorio, la capacidad máxima de la respiración mitocondrial ni los niveles de expresión del ANT en las mitocondrias aisladas a partir del músculo esquelético y del corazón de ratón.
2. La proteína UCP3 cataliza únicamente el 10% de la conductancia basal de la membrana mitocondrial interna a los protones en las mitocondrias aisladas a partir del músculo esquelético de ratón y no cataliza dicha conductancia en las mitocondrias del corazón de ratón. Además, en ambos tejidos se aprecia una tendencia del ANT a actuar como catalizador de la conductancia basal.
3. La activación que induce el radical superóxido sobre la conductancia de la membrana mitocondrial interna a los protones de las mitocondrias aisladas a partir del músculo esquelético de ratón no está catalizada por la UCP3, sino que dicha activación está mediada a través del ANT.
4. La activación de la conductancia de la membrana mitocondrial interna a los protones inducida por el 4-hidroxinonenal, está catalizada parcialmente por la proteína UCP3 (30%) y por el ANT en las mitocondrias aisladas a partir del músculo esquelético de ratón. Sin embargo, la proteína UCP3 no cataliza de manera significativa el aumento en la conductancia de la membrana mitocondrial interna a los protones inducido por el 4-hidroxinonenal en las mitocondrias aisladas a partir del corazón de ratón, sino que dicho aumento está catalizado parcialmente por el ANT y por otras vías distintas a este transportador y a la UCP3.
5. El GDP ejerce un efecto inhibitor sobre el aumento en la conductancia a los protones inducido por el 4-hidroxinonenal específicamente mediado a través de la UCP3, mientras que el carboxiatractilósido no inhibe específicamente al ANT, desempeñando también cierto papel inhibitor sobre el aumento en la conductancia a los protones inducido por el 4-hidroxinonenal a través de la UCP3.

6. La expresión de la proteína UCP3 en los cardiomiocitos neonatales de rata y en las mitocondrias aisladas a partir del corazón de ratón en presencia de succinato se asocia a una mejor recuperación de la función respiratoria tras un proceso de anoxia-reoxigenación. Sin embargo, en presencia de ADP, la expresión de la UCP3 dificulta la recuperación de la función respiratoria tras un proceso de anoxia-reoxigenación en las mitocondrias aisladas a partir del corazón de ratón.

7. La cuantificación de la producción de NO no se ve afectada por la utilización de un respirómetro convencional o de alta resolución, siempre que se realice la calibración del electrodo de NO en las mismas condiciones experimentales que las medidas de NO. No obstante, la señal recogida por el electrodo de NO es más intensa y más estable a lo largo del tiempo en el respirómetro de alta resolución. Además, la medida del consumo de oxígeno se realiza con mayor precisión en un respirómetro de alta resolución que en un respirómetro convencional, debido a que el flujo de oxígeno instrumental es menor en el primero de ellos.

8. En las mitocondrias aisladas a partir del músculo esquelético de ratones inoculados con endotoxina se detecta una inhibición de la respiración en presencia del sustrato de las NOS, L-arginina, al realizar dichas medidas a la concentración de oxígeno de 10 μM , así como un aumento del valor de la p_{50} . Estos efectos son debidos a la presencia de NO, puesto que desaparecen en presencia del inhibidor de las NOS, L-NMMA.

BIBLIOGRAFÍA

- ALDERTON, W. K., COOPER, C. E., and KNOWLES, R. G. (2001). Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J*, 357(Pt 3), 593-615.
- ALEXSON, S. E., and NEDERGAARD, J. (1988). A novel type of short- and medium-chain acyl-CoA hydrolases in brown adipose tissue mitochondria. *J Biol Chem*, 263(27), 13564-13571.
- ALVAREZ, S., and BOVERIS, A. (2004). Mitochondrial nitric oxide metabolism in rat muscle during endotoxemia. *Free Radic Biol Med*, 37(9), 1472-1478.
- ALVAREZ, S., and EVELSON, P. A. (2007). Nitric oxide and oxygen metabolism in inflammatory conditions: sepsis and exposition to polluted ambients. *Front Biosci*, 12, 964-974.
- ALVES-GUERRA, M. C., ROUSSET, S., PECQUEUR, C., MALLAT, Z., BLANC, J., TEDGUI, A., BOUILLAUD, F., CASSARD-DOULCIER, A. M., RICQUIER, D., and MIROUX, B. (2003). Bone marrow transplantation reveals the in vivo expression of the mitochondrial uncoupling protein 2 in immune and nonimmune cells during inflammation. *J Biol Chem*, 278(43), 42307-42312.
- ARNER, E. S., and HOLMGREN, A. (2000). Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Eur J Biochem*, 267(20), 6102-6109.
- ARSENIJEVIC, D., ONUMA, H., PECQUEUR, C., RAIMBAULT, S., MANNING, B. S., MIROUX, B., COUPLAN, E., ALVES-GUERRA, M. C., GOUBERN, M., SURWIT, R., BOUILLAUD, F., RICHARD, D., COLLINS, S., and RICQUIER, D. (2000). Disruption of the uncoupling protein-2 gene in mice reveals a role in immunity and reactive oxygen species production. *Nat Genet*, 26(4), 435-439.
- ASHCROFT, F. M., and GRIBBLE, F. M. (1999). ATP-sensitive K⁺ channels and insulin secretion: their role in health and disease. *Diabetologia*, 42(8), 903-919.
- AZZU, V., PARKER, N., and BRAND, M. D. (2008). High membrane potential promotes alkenal-induced mitochondrial uncoupling and influences adenine nucleotide translocase conformation. *Biochem J*, 413(2), 323-332.
- BAO, S., KENNEDY, A., WOJCIECHOWSKI, B., WALLACE, P., GANAWAY, E., and GARVEY, W. T. (1998). Expression of mRNAs encoding uncoupling proteins in human skeletal muscle: effects of obesity and diabetes. *Diabetes*, 47(12), 1935-1940.
- BARBERA, M. J., SCHLUTER, A., PEDRAZA, N., IGLESIAS, R., VILLARROYA, F., and GIRALT, M. (2001). Peroxisome proliferator-activated receptor alpha activates transcription of the brown fat uncoupling protein-1 gene. A link between regulation of the thermogenic and lipid oxidation pathways in the brown fat cell. *J Biol Chem*, 276(2), 1486-1493.
- BATES, T. E., LOESCH, A., BURNSTOCK, G., and CLARK, J. B. (1995). Immunocytochemical evidence for a mitochondrially located nitric oxide synthase in brain and liver. *Biochem Biophys Res Commun*, 213(3), 896-900.
- BECKMAN, J. S., and KOPPENOL, W. H. (1996). Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol*, 271(5 Pt 1), C1424-1437.
- BEZAIRE, V., SEIFERT, E. L., and HARPER, M. E. (2007). Uncoupling protein-3: clues in an ongoing mitochondrial mystery. *Faseb J*, 21(2), 312-324.
- BEZAIRE, V., SPRIET, L. L., CAMPBELL, S., SABET, N., GERRITS, M., BONEN, A., and HARPER, M. E. (2005). Constitutive UCP3 overexpression at physiological levels increases mouse skeletal muscle capacity for fatty acid transport and oxidation. *Faseb J*, 19(8), 977-979.

- BIENENGRAEBER, M., OZCAN, C., and TERZIC, A. (2003). Stable transfection of UCP1 confers resistance to hypoxia/reoxygenation in a heart-derived cell line. *J Mol Cell Cardiol*, 35(7), 861-865.
- BINDOKAS, V. P., KUZNETSOV, A., SREENAN, S., POLONSKY, K. S., ROE, M. W., and PHILIPSON, L. H. (2003). Visualizing superoxide production in normal and diabetic rat islets of Langerhans. *J Biol Chem*, 278(11), 9796-9801.
- BO, H., WANG, Y. H., LI, H. Y., ZHAO, J., ZHANG, H. Y., and TONG, C. Q. (2008). Endurance training attenuates the bioenergetics alterations of rat skeletal muscle mitochondria submitted to acute hypoxia: Role of ROS and UCP3. *Sheng Li Xue Bao*, 60(6), 767-776.
- BOCZKOWSKI, J., LISDERO, C. L., LANONE, S., SAMB, A., CARRERAS, M. C., BOVERIS, A., AUBIER, M., and PODEROSO, J. J. (1999). Endogenous peroxynitrite mediates mitochondrial dysfunction in rat diaphragm during endotoxemia. *Faseb J*, 13(12), 1637-1646.
- BOEKSTEGERS, P., WEIDENHOFER, S., PILZ, G., and WERDAN, K. (1991). Peripheral oxygen availability within skeletal muscle in sepsis and septic shock: comparison to limited infection and cardiogenic shock. *Infection*, 19(5), 317-323.
- BOSCA, L., and HORTELANO, S. (1999). Mechanisms of nitric oxide-dependent apoptosis: involvement of mitochondrial mediators. *Cell Signal*, 11(4), 239-244.
- BOSCA, L., ZEINI, M., TRAVES, P. G., and HORTELANO, S. (2005). Nitric oxide and cell viability in inflammatory cells: a role for NO in macrophage function and fate. *Toxicology*, 208(2), 249-258.
- BOSS, O., SAMEC, S., KUHNE, F., BIJLENGA, P., ASSIMACOPOULOS-JEANNET, F., SEYDOUX, J., GIACOBINO, J. P., and MUZZIN, P. (1998). Uncoupling protein-3 expression in rodent skeletal muscle is modulated by food intake but not by changes in environmental temperature. *J Biol Chem*, 273(1), 5-8.
- BOSS, O., SAMEC, S., PAOLONI-GIACOBINO, A., ROSSIER, C., DULLOO, A., SEYDOUX, J., MUZZIN, P., and GIACOBINO, J. P. (1997). Uncoupling protein-3: a new member of the mitochondrial carrier family with tissue-specific expression. *FEBS Lett*, 408(1), 39-42.
- BOVERIS, A., ALVAREZ, S., and NAVARRO, A. (2002). The role of mitochondrial nitric oxide synthase in inflammation and septic shock. *Free Radic Biol Med*, 33(9), 1186-1193.
- BOVERIS, A., COSTA, L. E., PODEROSO, J. J., CARRERAS, M. C., and CADENAS, E. (2000). Regulation of mitochondrial respiration by oxygen and nitric oxide. *Ann N Y Acad Sci*, 899, 121-135.
- BOVERIS, A., D'AMICO, G., LORES-ARNAIZ, S., and COSTA, L. E. (2003a). Enalapril increases mitochondrial nitric oxide synthase activity in heart and liver. *Antioxid Redox Signal*, 5(6), 691-697.
- BOVERIS, A., VALDEZ, L. B., ALVAREZ, S., ZAORBONYJ, T., BOVERIS, A. D., and NAVARRO, A. (2003b). Kidney mitochondrial nitric oxide synthase. *Antioxid Redox Signal*, 5(3), 265-271.
- BRAND, M. D. (1990). The proton leak across the mitochondrial inner membrane. *Biochim Biophys Acta*, 1018(2-3), 128-133.

- BRAND, M. D., BRINDLE, K. M., BUCKINGHAM, J. A., HARPER, J. A., ROLFE, D. F., and STUART, J. A. (1999). The significance and mechanism of mitochondrial proton conductance. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 23 Suppl 6, S4-11.
- BRAND, M. D., COUTURE, P., ELSE, P. L., WITHERS, K. W., and HULBERT, A. J. (1991). Evolution of energy metabolism. Proton permeability of the inner membrane of liver mitochondria is greater in a mammal than in a reptile. *Biochem J*, 275 (Pt 1), 81-86.
- BRAND, M. D., COUTURE, P., and HULBERT, A. J. (1994a). Liposomes from mammalian liver mitochondria are more polyunsaturated and leakier to protons than those from reptiles. *Comp Biochem Physiol Biochem Mol Biol*, 108(2), 181-188.
- BRAND, M. D., CHIEN, L. F., AINSCOW, E. K., ROLFE, D. F., and PORTER, R. K. (1994b). The causes and functions of mitochondrial proton leak. *Biochim Biophys Acta*, 1187(2), 132-139.
- BRAND, M. D., and ESTEVES, T. C. (2005). Physiological functions of the mitochondrial uncoupling proteins UCP2 and UCP3. *Cell Metab*, 2(2), 85-93.
- BRAND, M. D., PAKAY, J. L., OCLOO, A., KOKOSZKA, J., WALLACE, D. C., BROOKES, P. S., and CORNWALL, E. J. (2005). The basal proton conductance of mitochondria depends on adenine nucleotide translocase content. *Biochem J*, 392(Pt 2), 353-362.
- BRAND, M. D., PAMPLONA, R., PORTERO-OTIN, M., REQUENA, J. R., ROEBUCK, S. J., BUCKINGHAM, J. A., CLAPHAM, J. C., and CADENAS, S. (2002). Oxidative damage and phospholipid fatty acyl composition in skeletal muscle mitochondria from mice underexpressing or overexpressing uncoupling protein 3. *Biochem J*, 368(Pt 2), 597-603.
- BRAND, M. D., STEVERDING, D., KADENBACH, B., STEVENSON, P. M., and HAFNER, R. P. (1992). The mechanism of the increase in mitochondrial proton permeability induced by thyroid hormones. *Eur J Biochem*, 206(3), 775-781.
- BRAND, M. D. I., EDS.), . (1995). Measurement of mitochondrial protonmotive force. In: *Bioenergetics - a Practical Approach* G. C. a. C. Brown, C. E, ed., IRL Press, Oxford, 39-62
- BREALEY, D., KARYAMPUDI, S., JACQUES, T. S., NOVELLI, M., STIDWILL, R., TAYLOR, V., SMOLENSKI, R. T., and SINGER, M. (2004). Mitochondrial dysfunction in a long-term rodent model of sepsis and organ failure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 286(3), R491-497.
- BREDT, D. S., HWANG, P. M., GLATT, C. E., LOWENSTEIN, C., REED, R. R., and SNYDER, S. H. (1991). Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature*, 351(6329), 714-718.
- BREDT, D. S., and SNYDER, S. H. (1990). Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87(2), 682-685.
- BROOKES, P. S. (2004). Mitochondrial nitric oxide synthase. *Mitochondrion*, 3(4), 187-204.
- BROOKES, P. S., BUCKINGHAM, J. A., TENREIRO, A. M., HULBERT, A. J., and BRAND, M. D. (1998). The proton permeability of the inner membrane of liver mitochondria from ectothermic and endothermic vertebrates and from obese rats: correlations with standard metabolic rate and phospholipid fatty acid composition. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 119(2), 325-334.

- BROOKES, P. S., HULBERT, A. J., and BRAND, M. D. (1997a). The proton permeability of liposomes made from mitochondrial inner membrane phospholipids: no effect of fatty acid composition. *Biochim Biophys Acta*, 1330(2), 157-164.
- BROOKES, P. S., KRAUS, D. W., SHIVA, S., DOELLER, J. E., BARONE, M. C., PATEL, R. P., LANCASTER, J. R., JR., and DARLEY-USMAR, V. (2003). Control of mitochondrial respiration by NO^{*}, effects of low oxygen and respiratory state. *J Biol Chem*, 278(34), 31603-31609.
- BROOKES, P. S., ROLFE, D. F., and BRAND, M. D. (1997b). The proton permeability of liposomes made from mitochondrial inner membrane phospholipids: comparison with isolated mitochondria. *J Membr Biol*, 155(2), 167-174.
- BROWN, G. C. (1995). Nitric oxide regulates mitochondrial respiration and cell functions by inhibiting cytochrome oxidase. *FEBS Lett*, 369(2-3), 136-139.
- BROWN, G. C. (2001). Regulation of mitochondrial respiration by nitric oxide inhibition of cytochrome c oxidase. *Biochim Biophys Acta*, 1504(1), 46-57.
- BROWN, G. C., and COOPER, C. E. (1994). Nanomolar concentrations of nitric oxide reversibly inhibit synaptosomal respiration by competing with oxygen at cytochrome oxidase. *FEBS Lett*, 356(2-3), 295-298.
- BRUN, S., CARMONA, M. C., MAMPEL, T., VINAS, O., GIRALT, M., IGLESIAS, R., and VILLARROYA, F. (1999). Activators of peroxisome proliferator-activated receptor- α induce the expression of the uncoupling protein-3 gene in skeletal muscle: a potential mechanism for the lipid intake-dependent activation of uncoupling protein-3 gene expression at birth. *Diabetes*, 48(6), 1217-1222.
- BUSQUETS, S., ALMENDRO, V., BARREIRO, E., FIGUERAS, M., ARGILES, J. M., and LOPEZ-SORIANO, F. J. (2005). Activation of UCPs gene expression in skeletal muscle can be independent on both circulating fatty acids and food intake. Involvement of ROS in a model of mouse cancer cachexia. *FEBS Lett*, 579(3), 717-722.
- BUSQUETS, S., GARCIA-MARTINEZ, C., OLIVAN, M., BARREIRO, E., LOPEZ-SORIANO, F. J., and ARGILES, J. M. (2006). Overexpression of UCP3 in both murine and human myotubes is linked with the activation of proteolytic systems: a role in muscle wasting? *Biochim Biophys Acta*, 1760(2), 253-258.
- BUSQUETS, S., SANCHIS, D., ALVAREZ, B., RICQUIER, D., LOPEZ-SORIANO, F. J., and ARGILES, J. M. (1998). In the rat, tumor necrosis factor alpha administration results in an increase in both UCP2 and UCP3 mRNAs in skeletal muscle: a possible mechanism for cytokine-induced thermogenesis? *FEBS Lett*, 440(3), 348-350.
- BUSTAMANTE, J., BERSIER, G., ROMERO, M., BADIN, R. A., and BOVERIS, A. (2000). Nitric oxide production and mitochondrial dysfunction during rat thymocyte apoptosis. *Arch Biochem Biophys*, 376(2), 239-247.
- CADENAS, S., and BRAND, M. D. (2000). Effects of magnesium and nucleotides on the proton conductance of rat skeletal-muscle mitochondria. *Biochem J*, 348 Pt 1, 209-213.
- CADENAS, S., BUCKINGHAM, J. A., SAMEC, S., SEYDOUX, J., DIN, N., DULLOO, A. G., and BRAND, M. D. (1999). UCP2 and UCP3 rise in starved rat skeletal muscle but mitochondrial proton conductance is unchanged. *FEBS Lett*, 462(3), 257-260.
- CADENAS, S., ECHTAY, K. S., HARPER, J. A., JEKABSONS, M. B., BUCKINGHAM, J. A., GRAU, E., ABUIN, A., CHAPMAN, H., CLAPHAM, J. C., and BRAND, M. D. (2002). The basal proton

- conductance of skeletal muscle mitochondria from transgenic mice overexpressing or lacking uncoupling protein-3. *J Biol Chem*, 277(4), 2773-2778.
- CALLAHAN, L. A., STOFAN, D. A., SZWEDA, L. I., NETHERY, D. E., and SUPINSKI, G. S. (2001). Free radicals alter maximal diaphragmatic mitochondrial oxygen consumption in endotoxin-induced sepsis. *Free Radic Biol Med*, 30(1), 129-138.
- CANNON, B., and NEDERGAARD, J. (1985). The biochemistry of an inefficient tissue: brown adipose tissue. *Essays Biochem*, 20, 110-164.
- CANNON, B., and NEDERGAARD, J. (2004). Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev*, 84(1), 277-359.
- CANNON, B., SHABALINA, I. G., KRAMAROVA, T. V., PETROVIC, N., and NEDERGAARD, J. (2006). Uncoupling proteins: a role in protection against reactive oxygen species--or not? *Biochim Biophys Acta*, 1757(5-6), 449-458.
- CARMONA, M. C., HONDARES, E., RODRIGUEZ DE LA CONCEPCION, M. L., RODRIGUEZ-SUREDA, V., PEINADO-ONSURBE, J., POLI, V., IGLESIAS, R., VILLARROYA, F., and GIRALT, M. (2005). Defective thermoregulation, impaired lipid metabolism, but preserved adrenergic induction of gene expression in brown fat of mice lacking C/EBPbeta. *Biochem J*, 389(Pt 1), 47-56.
- CASTELLO, P. R., DAVID, P. S., MCCLURE, T., CROOK, Z., and POYTON, R. O. (2006). Mitochondrial cytochrome oxidase produces nitric oxide under hypoxic conditions: implications for oxygen sensing and hypoxic signaling in eukaryotes. *Cell Metab*, 3(4), 277-287.
- CLAPHAM, J. C., ARCH, J. R., CHAPMAN, H., HAYNES, A., LISTER, C., MOORE, G. B., PIERCY, V., CARTER, S. A., LEHNER, I., SMITH, S. A., BEELEY, L. J., GODDEN, R. J., HERRITY, N., SKEHEL, M., CHANGANI, K. K., HOCKINGS, P. D., REID, D. G., SQUIRES, S. M., HATCHER, J., TRAIL, B., LATCHAM, J., RASTAN, S., HARPER, A. J., CADENAS, S., BUCKINGHAM, J. A., BRAND, M. D., and ABUIN, A. (2000). Mice overexpressing human uncoupling protein-3 in skeletal muscle are hyperphagic and lean. *Nature*, 406(6794), 415-418.
- CLEETER, M. W., COOPER, J. M., DARLEY-USMAR, V. M., MONCADA, S., and SCHAPIRA, A. H. (1994). Reversible inhibition of cytochrome c oxidase, the terminal enzyme of the mitochondrial respiratory chain, by nitric oxide. Implications for neurodegenerative diseases. *FEBS Lett*, 345(1), 50-54.
- CORTEZ-PINTO, H., YANG, S. Q., LIN, H. Z., COSTA, S., HWANG, C. S., LANE, M. D., BAGBY, G., and DIEHL, A. M. (1998). Bacterial lipopolysaccharide induces uncoupling protein-2 expression in hepatocytes by a tumor necrosis factor-alpha-dependent mechanism. *Biochem Biophys Res Commun*, 251(1), 313-319.
- COSTFORD, S. R., CHAUDHRY, S. N., SALKHORDEH, M., and HARPER, M. E. (2006). Effects of the presence, absence, and overexpression of uncoupling protein-3 on adiposity and fuel metabolism in congenic mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 290(6), E1304-1312.
- COULIBALY, I., GAHR, S. A., PALTU, Y., YAO, J., and REXROAD, C. E., 3RD. (2006). Genomic structure and expression of uncoupling protein 2 genes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *BMC Genomics*, 7, 203.
- COUPLAN, E., DEL MAR GONZALEZ-BARROSO, M., ALVES-GUERRA, M. C., RICQUIER, D., GOUBERN, M., and BOUILLAUD, F. (2002). No evidence for a basal, retinoic, or superoxide-induced uncoupling activity of the uncoupling protein 2 present in spleen or lung mitochondria. *J Biol Chem*, 277(29), 26268-26275.

- CSORDAS, A., PANKOTAI, E., SNIPES, J. A., CSELENYAK, A., SARSZEGI, Z., CZIRAKI, A., GASZNER, B., PAPP, L., BENKO, R., KISS, L., KOVACS, E., KOLLAI, M., SZABO, C., BUSIJA, D. W., and LACZA, Z. (2007). Human heart mitochondria do not produce physiologically relevant quantities of nitric oxide. *Life Sci*, 80(7), 633-637.
- CHAN, C. B., DE LEO, D., JOSEPH, J. W., MCQUAID, T. S., HA, X. F., XU, F., TSUSHIMA, R. G., PENNEFATHER, P. S., SALAPATEK, A. M., and WHEELER, M. B. (2001). Increased uncoupling protein-2 levels in beta-cells are associated with impaired glucose-stimulated insulin secretion: mechanism of action. *Diabetes*, 50(6), 1302-1310.
- CHAN, C. B., MACDONALD, P. E., SALEH, M. C., JOHNS, D. C., MARBAN, E., and WHEELER, M. B. (1999). Overexpression of uncoupling protein 2 inhibits glucose-stimulated insulin secretion from rat islets. *Diabetes*, 48(7), 1482-1486.
- CHEN, Z., GORDON, J. R., ZHANG, X., and XIANG, J. (2002). Analysis of the gene expression profiles of immature versus mature bone marrow-derived dendritic cells using DNA arrays. *Biochem Biophys Res Commun*, 290(1), 66-72.
- CHENG, L., DING, G., QIN, Q., HUANG, Y., LEWIS, W., HE, N., EVANS, R. M., SCHNEIDER, M. D., BRAKO, F. A., XIAO, Y., CHEN, Y. E., and YANG, Q. (2004). Cardiomyocyte-restricted peroxisome proliferator-activated receptor-delta deletion perturbs myocardial fatty acid oxidation and leads to cardiomyopathy. *Nat Med*, 10(11), 1245-1250.
- CHEVILLOTTE, E., RIEUSSET, J., ROQUES, M., DESAGE, M., and VIDAL, H. (2001). The regulation of uncoupling protein-2 gene expression by omega-6 polyunsaturated fatty acids in human skeletal muscle cells involves multiple pathways, including the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor beta. *J Biol Chem*, 276(14), 10853-10860.
- CHOMCZYNSKI, P., and SACCHI, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 162(1), 156-159.
- DEGASPERI, G. R., VELHO, J. A., ZECCHIN, K. G., SOUZA, C. T., VELLOSO, L. A., BORECKY, J., CASTILHO, R. F., and VERCESI, A. E. (2006). Role of mitochondria in the immune response to cancer: a central role for Ca²⁺. *J Bioenerg Biomembr*, 38(1), 1-10.
- DEJEAN, L., CAMARA, Y., SIBILLE, B., SOLANES, G., and VILLARROYA, F. (2004). Uncoupling protein-3 sensitizes cells to mitochondrial-dependent stimulus of apoptosis. *J Cell Physiol*, 201(2), 294-304.
- DENNINGER, J. W., and MARLETTA, M. A. (1999). Guanylate cyclase and the .NO/cGMP signaling pathway. *Biochim Biophys Acta*, 1411(2-3), 334-350.
- DINARELLO, C. A. (1996). Cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock. *Curr Top Microbiol Immunol*, 216, 133-165.
- DUVAL, C., CAMARA, Y., HONDARES, E., SIBILLE, B., and VILLARROYA, F. (2007). Overexpression of mitochondrial uncoupling protein-3 does not decrease production of the reactive oxygen species, elevated by palmitate in skeletal muscle cells. *FEBS Lett*, 581(5), 955-961.
- ECHTAY, K. S. (2007). Mitochondrial uncoupling proteins--what is their physiological role? *Free Radic Biol Med*, 43(10), 1351-1371.
- ECHTAY, K. S., and BRAND, M. D. (2007). 4-hydroxy-2-nonenal and uncoupling proteins: an approach for regulation of mitochondrial ROS production. *Redox Rep*, 12(1), 26-29.

- ECHTAY, K. S., ESTEVES, T. C., PAKAY, J. L., JEKABSONS, M. B., LAMBERT, A. J., PORTERO-OTIN, M., PAMPLONA, R., VIDAL-PUIG, A. J., WANG, S., ROEBUCK, S. J., and BRAND, M. D. (2003). A signalling role for 4-hydroxy-2-nonenal in regulation of mitochondrial uncoupling. *Embo J*, 22(16), 4103-4110.
- ECHTAY, K. S., MURPHY, M. P., SMITH, R. A., TALBOT, D. A., and BRAND, M. D. (2002a). Superoxide activates mitochondrial uncoupling protein 2 from the matrix side. Studies using targeted antioxidants. *J Biol Chem*, 277(49), 47129-47135.
- ECHTAY, K. S., ROUSSEL, D., ST-PIERRE, J., JEKABSONS, M. B., CADENAS, S., STUART, J. A., HARPER, J. A., ROEBUCK, S. J., MORRISON, A., PICKERING, S., CLAPHAM, J. C., and BRAND, M. D. (2002b). Superoxide activates mitochondrial uncoupling proteins. *Nature*, 415(6867), 96-99.
- ECHTAY, K. S., WINKLER, E., FRISCHMUTH, K., and KLINGENBERG, M. (2001). Uncoupling proteins 2 and 3 are highly active H(+) transporters and highly nucleotide sensitive when activated by coenzyme Q (ubiquinone). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(4), 1416-1421.
- ELFERING, S. L., SARKELA, T. M., and GIULIVI, C. (2002). Biochemistry of mitochondrial nitric oxide synthase. *J Biol Chem*, 277(41), 38079-38086.
- ESCAMES, G., LEON, J., MACIAS, M., KHALDY, H., and ACUNA-CASTROVIEJO, D. (2003). Melatonin counteracts lipopolysaccharide-induced expression and activity of mitochondrial nitric oxide synthase in rats. *Faseb J*, 17(8), 932-934.
- ESCAMES, G., LOPEZ, L. C., TAPIAS, V., UTRILLA, P., REITER, R. J., HITOS, A. B., LEON, J., RODRIGUEZ, M. I., and ACUNA-CASTROVIEJO, D. (2006). Melatonin counteracts inducible mitochondrial nitric oxide synthase-dependent mitochondrial dysfunction in skeletal muscle of septic mice. *J Pineal Res*, 40(1), 71-78.
- ESSOP, M. F., RAZEGHI, P., MCLEOD, C., YOUNG, M. E., TAEGTMEYER, H., and SACK, M. N. (2004). Hypoxia-induced decrease of UCP3 gene expression in rat heart parallels metabolic gene switching but fails to affect mitochondrial respiratory coupling. *Biochem Biophys Res Commun*, 314(2), 561-564.
- ESTERBAUER, H., SCHAUR, R. J., and ZOLLNER, H. (1991). Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med*, 11(1), 81-128.
- ESTEVES, T. C., and BRAND, M. D. (2005). The reactions catalysed by the mitochondrial uncoupling proteins UCP2 and UCP3. *Biochim Biophys Acta*, 1709(1), 35-44.
- FAGGIONI, R., SHIGENAGA, J., MOSER, A., FEINGOLD, K. R., and GRUNFELD, C. (1998). Induction of UCP2 gene expression by LPS: a potential mechanism for increased thermogenesis during infection. *Biochem Biophys Res Commun*, 244(1), 75-78.
- FINCK, B. N., BERNAL-MIZRACHI, C., HAN, D. H., COLEMAN, T., SAMBANDAM, N., LARIVIERE, L. L., HOLLOSZY, J. O., SEMENKOVICH, C. F., and KELLY, D. P. (2005). A potential link between muscle peroxisome proliferator-activated receptor-alpha signaling and obesity-related diabetes. *Cell Metab*, 1(2), 133-144.
- FLEURY, C., NEVEROVA, M., COLLINS, S., RAIMBAULT, S., CHAMPIGNY, O., LEVI-MEYRUEIS, C., BOUILLAUD, F., SELDIN, M. F., SURWIT, R. S., RICQUIER, D., and WARDEN, C. H. (1997). Uncoupling protein-2: a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia. *Nat Genet*, 15(3), 269-272.

- FONTAINE, E. M., MOUSSA, M., DEVIN, A., GARCIA, J., GHISOLFI, J., RIGOULET, M., and LEVERVE, X. M. (1996). Effect of polyunsaturated fatty acids deficiency on oxidative phosphorylation in rat liver mitochondria. *Biochim Biophys Acta*, 1276(3), 181-187.
- FRENCH, S., GIULIVI, C., and BALABAN, R. S. (2001). Nitric oxide synthase in porcine heart mitochondria: evidence for low physiological activity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 280(6), H2863-2867.
- GARLID, K. D., BEAVIS, A. D., and RATKJE, S. K. (1989). On the nature of ion leaks in energy-transducing membranes. *Biochim Biophys Acta*, 976(2-3), 109-120.
- GARLID, K. D., JABUREK, M., and JEZEK, P. (1998). The mechanism of proton transport mediated by mitochondrial uncoupling proteins. *FEBS Lett*, 438(1-2), 10-14.
- GARLID, K. D., JABUREK, M., JEZEK, P., and VARECHA, M. (2000). How do uncoupling proteins uncouple? *Biochim Biophys Acta*, 1459(2-3), 383-389.
- GARLID, K. D., OROSZ, D. E., MODRIANSKY, M., VASSANELLI, S., and JEZEK, P. (1996). On the mechanism of fatty acid-induced proton transport by mitochondrial uncoupling protein. *J Biol Chem*, 271(5), 2615-2620.
- GEWALTIG, M. T., and KOJDA, G. (2002). Vasoprotection by nitric oxide: mechanisms and therapeutic potential. *Cardiovasc Res*, 55(2), 250-260.
- GHAFOURIFAR, P., and RICHTER, C. (1997). Nitric oxide synthase activity in mitochondria. *FEBS Lett*, 418(3), 291-296.
- GIORDANO, F. J. (2005). Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure. *J Clin Invest*, 115(3), 500-508.
- GIULIVI, C. (1998). Functional implications of nitric oxide produced by mitochondria in mitochondrial metabolism. *Biochem J*, 332 (Pt 3), 673-679.
- GIULIVI, C. (2003). Characterization and function of mitochondrial nitric-oxide synthase. *Free Radic Biol Med*, 34(4), 397-408.
- GIULIVI, C., PODEROSO, J. J., and BOVERIS, A. (1998). Production of nitric oxide by mitochondria. *J Biol Chem*, 273(18), 11038-11043.
- GNAIGER, E., STEINLECHNER-MARAN, R., MENDEZ, G., EBERL, T., and MARGREITER, R. (1995). Control of mitochondrial and cellular respiration by oxygen. *J Bioenerg Biomembr*, 27(6), 583-596.
- GONG, D. W., HE, Y., KARAS, M., and REITMAN, M. (1997). Uncoupling protein-3 is a mediator of thermogenesis regulated by thyroid hormone, beta3-adrenergic agonists, and leptin. *J Biol Chem*, 272(39), 24129-24132.
- GONG, D. W., MONEMDJOU, S., GAVRILOVA, O., LEON, L. R., MARCUS-SAMUELS, B., CHOU, C. J., EVERETT, C., KOZAK, L. P., LI, C., DENG, C., HARPER, M. E., and REITMAN, M. L. (2000). Lack of obesity and normal response to fasting and thyroid hormone in mice lacking uncoupling protein-3. *J Biol Chem*, 275(21), 16251-16257.
- GONZALEZ-BARROSO, M. M., FLEURY, C., BOUILLAUD, F., NICHOLLS, D. G., and RIAL, E. (1998). The uncoupling protein UCP1 does not increase the proton conductance of the inner mitochondrial membrane by functioning as a fatty acid anion transporter. *J Biol Chem*, 273(25), 15528-15532.

- GOTH, L., RASS, P., and PAY, A. (2004). Catalase enzyme mutations and their association with diseases. *Mol Diagn*, 8(3), 141-149.
- GRAIER, W. F., TRENKER, M., and MALLI, R. (2008). Mitochondrial Ca²⁺, the secret behind the function of uncoupling proteins 2 and 3? *Cell Calcium*, 44(1), 36-50.
- GREMLICH, S., NOLAN, C., RODUIT, R., BURCELIN, R., PEYOT, M. L., DELGHINGARO-AUGUSTO, V., DESVERGNE, B., MICHALIK, L., PRENTKI, M., and WAHLI, W. (2005). Pancreatic islet adaptation to fasting is dependent on peroxisome proliferator-activated receptor alpha transcriptional up-regulation of fatty acid oxidation. *Endocrinology*, 146(1), 375-382.
- GROSS, S. S., STUEHR, D. J., AISAKA, K., JAFFE, E. A., LEVI, R., and GRIFFITH, O. W. (1990). Macrophage and endothelial cell nitric oxide synthesis: cell-type selective inhibition by NG-aminoarginine, NG-nitroarginine and NG-methylarginine. *Biochem Biophys Res Commun*, 170(1), 96-103.
- GUNTER, T. E., BUNTINAS, L., SPARAGNA, G., ELISEEV, R., and GUNTER, K. (2000). Mitochondrial calcium transport: mechanisms and functions. *Cell Calcium*, 28(5-6), 285-296.
- GUNTER, T. E., and PFEIFFER, D. R. (1990). Mechanisms by which mitochondria transport calcium. *Am J Physiol*, 258(5 Pt 1), C755-786.
- HALESTRAP, A. P. (2004). Mitochondrial permeability: dual role for the ADP/ATP translocator? *Nature*, 430(7003), 1 p following 983.
- HAN, D., ANTUNES, F., CANALI, R., RETTORI, D., and CADENAS, E. (2003). Voltage-dependent anion channels control the release of the superoxide anion from mitochondria to cytosol. *J Biol Chem*, 278(8), 5557-5563.
- HARMAN, D. (1968). Free radical theory of aging: effect of free radical reaction inhibitors on the mortality rate of male LAF mice. *J Gerontol*, 23(4), 476-482.
- HARPER, J. A., STUART, J. A., JEKABSONS, M. B., ROUSSEL, D., BRINDLE, K. M., DICKINSON, K., JONES, R. B., and BRAND, M. D. (2002). Artifacts of uncoupling protein 3 in yeast mitochondria at the concentrations found in mouse and rat skeletal-muscle mitochondria. *Biochem J*, 361(Pt 1), 49-56.
- HAYNES, V., ELFERING, S., TRAAETH, N., and GIULIVI, C. (2004). Mitochondrial nitric-oxide synthase: enzyme expression, characterization, and regulation. *J Bioenerg Biomembr*, 36(4), 341-346.
- HEIDKAEMPER, D., WINKLER, E., MULLER, V., FRISCHMUTH, K., LIU, Q., CASKEY, T., and KLINGENBERG, M. (2000). The bulk of UCP3 expressed in yeast cells is incompetent for a nucleotide regulated H⁺ transport. *FEBS Lett*, 480(2-3), 265-270.
- HERLEIN, J. A., FINK, B. D., O'MALLEY, Y., and SIVITZ, W. I. (2008). Superoxide and Respiratory Coupling in Mitochondria of Insulin Deficient Diabetic Rats. *Endocrinology*.
- HEVENER, A. L., HE, W., BARAK, Y., LE, J., BANDYOPADHYAY, G., OLSON, P., WILKES, J., EVANS, R. M., and OLEFSKY, J. (2003). Muscle-specific Pparg deletion causes insulin resistance. *Nat Med*, 9(12), 1491-1497.
- HIKI, K., YUI, Y., HATTORI, R., EIZAWA, H., KOSUGA, K., and KAWAI, C. (1991). Cytosolic and membrane-bound nitric oxide synthase. *Jpn J Pharmacol*, 56(2), 217-220.

- HIMMS-HAGEN, J., and HARPER, M. E. (2001). Physiological role of UCP3 may be export of fatty acids from mitochondria when fatty acid oxidation predominates: an hypothesis. *Exp Biol Med (Maywood)*, 226(2), 78-84.
- HOEKS, J., HESSELINK, M. K., SLUITER, W., SCHAART, G., WILLEMS, J., MORRISON, A., CLAPHAM, J. C., SARIS, W. H., and SCHRAUWEN, P. (2006). The effect of high-fat feeding on intramuscular lipid and lipid peroxidation levels in UCP3-ablated mice. *FEBS Lett*, 580(5), 1371-1375.
- HOEKS, J., HESSELINK, M. K., VAN BILSEN, M., SCHAART, G., VAN DER VUSSE, G. J., SARIS, W. H., and SCHRAUWEN, P. (2003). Differential response of UCP3 to medium versus long chain triacylglycerols; manifestation of a functional adaptation. *FEBS Lett*, 555(3), 631-637.
- HOENICKA, M., and SCHMID, C. (2008). Cardiovascular effects of modulators of soluble guanylyl cyclase activity. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem*, 6(4), 287-301.
- HOERTER, J., GONZALEZ-BARROSO, M. D., COUPLAN, E., MATEO, P., GELLY, C., CASSARD-DOULCIER, A. M., DIOLEZ, P., and BOULLAUD, F. (2004). Mitochondrial uncoupling protein 1 expressed in the heart of transgenic mice protects against ischemic-reperfusion damage. *Circulation*, 110(5), 528-533.
- HOTH, M., BUTTON, D. C., and LEWIS, R. S. (2000). Mitochondrial control of calcium-channel gating: a mechanism for sustained signaling and transcriptional activation in T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(19), 10607-10612.
- HUPPERTZ, C., FISCHER, B. M., KIM, Y. B., KOTANI, K., VIDAL-PUIG, A., SLIEKER, L. J., SLOOP, K. W., LOWELL, B. B., and KAHN, B. B. (2001). Uncoupling protein 3 (UCP3) stimulates glucose uptake in muscle cells through a phosphoinositide 3-kinase-dependent mechanism. *J Biol Chem*, 276(16), 12520-12529.
- IGNARRO, L. J. (1999). Nitric oxide: a unique endogenous signaling molecule in vascular biology. *Biosci Rep*, 19(2), 51-71.
- IMAI, H., and NAKAGAWA, Y. (2003). Biological significance of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells. *Free Radic Biol Med*, 34(2), 145-169.
- JABUREK, M., and GARLID, K. D. (2003). Reconstitution of recombinant uncoupling proteins: UCP1, -2, and -3 have similar affinities for ATP and are unaffected by coenzyme Q10. *J Biol Chem*, 278(28), 25825-25831.
- JABUREK, M., VARECHA, M., GIMENO, R. E., DEMBSKI, M., JEZEK, P., ZHANG, M., BURN, P., TARTAGLIA, L. A., and GARLID, K. D. (1999). Transport function and regulation of mitochondrial uncoupling proteins 2 and 3. *J Biol Chem*, 274(37), 26003-26007.
- JACOB, R. A., PIANALTO, F. S., HENNING, S. M., ZHANG, J. Z., and SWENDSEID, M. E. (1995). In vivo methylation capacity is not impaired in healthy men during short-term dietary folate and methyl group restriction. *J Nutr*, 125(6), 1495-1502.
- JARMUSZKIEWICZ, W., SLUSE-GOFFART, C. M., HRYNIEWIECKA, L., and SLUSE, F. E. (1999). Identification and characterization of a protozoan uncoupling protein in *Acanthamoeba castellanii*. *J Biol Chem*, 274(33), 23198-23202.
- JASTROCH, M., WUERTZ, S., KLOAS, W., and KLINGENSPOR, M. (2005). Uncoupling protein 1 in fish uncovers an ancient evolutionary history of mammalian nonshivering thermogenesis. *Physiol Genomics*, 22(2), 150-156.

- JEKABSONS, M. B., ECHTAY, K. S., and BRAND, M. D. (2002). Nucleotide binding to human uncoupling protein-2 refolded from bacterial inclusion bodies. *Biochem J*, 366(Pt 2), 565-571.
- JEKABSONS, M. B., GREGOIRE, F. M., SCHONFELD-WARDEN, N. A., WARDEN, C. H., and HORWITZ, B. A. (1999). T(3) stimulates resting metabolism and UCP-2 and UCP-3 mRNA but not nonphosphorylating mitochondrial respiration in mice. *Am J Physiol*, 277(2 Pt 1), E380-389.
- JENKINS, D. P., BAXTER, G. F., and YELLON, D. M. (1995). The pathophysiology of ischaemic preconditioning. *Pharmacol Res*, 31(3-4), 219-224.
- JEZEK, P. (1999). Fatty acid interaction with mitochondrial uncoupling proteins. *J Bioenerg Biomembr*, 31(5), 457-466.
- JEZEK, P. (2002). Possible physiological roles of mitochondrial uncoupling proteins--UCPn. *Int J Biochem Cell Biol*, 34(10), 1190-1206.
- JEZEK, P., OROSZ, D. E., MODRIANSKY, M., and GARLID, K. D. (1994). Transport of anions and protons by the mitochondrial uncoupling protein and its regulation by nucleotides and fatty acids. A new look at old hypotheses. *J Biol Chem*, 269(42), 26184-26190.
- JIMENEZ-JIMENEZ, J., LEDESMA, A., ZARAGOZA, P., GONZALEZ-BARROSO, M. M., and RIAL, E. (2006). Fatty acid activation of the uncoupling proteins requires the presence of the central matrix loop from UCP1. *Biochim Biophys Acta*, 1757(9-10), 1292-1296.
- JOSEPH, J. W., KOSHKIN, V., ZHANG, C. Y., WANG, J., LOWELL, B. B., CHAN, C. B., and WHEELER, M. B. (2002). Uncoupling protein 2 knockout mice have enhanced insulin secretory capacity after a high-fat diet. *Diabetes*, 51(11), 3211-3219.
- JOUAVILLE, L. S., PINTON, P., BASTIANUTTO, C., RUTTER, G. A., and RIZZUTO, R. (1999). Regulation of mitochondrial ATP synthesis by calcium: evidence for a long-term metabolic priming. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(24), 13807-13812.
- KANAI, A., EPPERLY, M., PEARCE, L., BIRDER, L., ZEIDEL, M., MEYERS, S., GREENBERGER, J., DE GROAT, W., APODACA, G., and PETERSON, J. (2004). Differing roles of mitochondrial nitric oxide synthase in cardiomyocytes and urothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 286(1), H13-21.
- KANAI, A. J., PEARCE, L. L., CLEMENS, P. R., BIRDER, L. A., VANBIBBER, M. M., CHOI, S. Y., DE GROAT, W. C., and PETERSON, J. (2001). Identification of a neuronal nitric oxide synthase in isolated cardiac mitochondria using electrochemical detection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(24), 14126-14131.
- KANTROW, S. P., TAYLOR, D. E., CARRAWAY, M. S., and PIANTADOSI, C. A. (1997). Oxidative metabolism in rat hepatocytes and mitochondria during sepsis. *Arch Biochem Biophys*, 345(2), 278-288.
- KASSIS, N., BERNARD, C., PUSTERLA, A., CASTEILLA, L., PENICAUD, L., RICHARD, D., RICQUIER, D., and KTORZA, A. (2000). Correlation between pancreatic islet uncoupling protein-2 (UCP2) mRNA concentration and insulin status in rats. *Int J Exp Diabetes Res*, 1(3), 185-193.
- KATO, K., and GIULIVI, C. (2006). Critical overview of mitochondrial nitric-oxide synthase. *Front Biosci*, 11, 2725-2738.

- KINNULA, V. L., and CRAPO, J. D. (2004). Superoxide dismutases in malignant cells and human tumors. *Free Radic Biol Med*, 36(6), 718-744.
- KIZAKI, T., SUZUKI, K., HITOMI, Y., TANIGUCHI, N., SAITOH, D., WATANABE, K., ONOE, K., DAY, N. K., GOOD, R. A., and OHNO, H. (2002). Uncoupling protein 2 plays an important role in nitric oxide production of lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(14), 9392-9397.
- KLINGENBERG, M. (1993). Dialectics in carrier research: the ADP/ATP carrier and the uncoupling protein. *J Bioenerg Biomembr*, 25(5), 447-457.
- KLINGENBERG, M., and ECHTAY, K. S. (2001). Uncoupling proteins: the issues from a biochemist point of view. *Biochim Biophys Acta*, 1504(1), 128-143.
- KLINGENBERG, M., and HUANG, S. G. (1999). Structure and function of the uncoupling protein from brown adipose tissue. *Biochim Biophys Acta*, 1415(2), 271-296.
- KLINGENBERG, M., WINKLER, E., and ECHTAY, K. (2001). Uncoupling protein, H⁺ transport and regulation. *Biochem Soc Trans*, 29(Pt 6), 806-811.
- KOBZIK, L., STRINGER, B., BALLIGAND, J. L., REID, M. B., and STAMLER, J. S. (1995). Endothelial type nitric oxide synthase in skeletal muscle fibers: mitochondrial relationships. *Biochem Biophys Res Commun*, 211(2), 375-381.
- KOESLING, D., RUSSWURM, M., MERGIA, E., MULLERSHAUSEN, F., and FRIEBE, A. (2004). Nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase: structure and regulation. *Neurochem Int*, 45(6), 813-819.
- KOIVISTO, A., MATTHIAS, A., BRONNIKOV, G., and NEDERGAARD, J. (1997). Kinetics of the inhibition of mitochondrial respiration by NO. *FEBS Lett*, 417(1), 75-80.
- KOZLOV, A. V., STANIEK, K., and NOHL, H. (1999). Nitrite reductase activity is a novel function of mammalian mitochondria. *FEBS Lett*, 454(1-2), 127-130.
- KRAUSS, S., ZHANG, C. Y., and LOWELL, B. B. (2002). A significant portion of mitochondrial proton leak in intact thymocytes depends on expression of UCP2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(1), 118-122.
- KRAUSS, S., ZHANG, C. Y., and LOWELL, B. B. (2005). The mitochondrial uncoupling-protein homologues. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6(3), 248-261.
- KRAUSS, S., ZHANG, C. Y., SCORRANO, L., DALGAARD, L. T., ST-PIERRE, J., GREY, S. T., and LOWELL, B. B. (2003). Superoxide-mediated activation of uncoupling protein 2 causes pancreatic beta cell dysfunction. *J Clin Invest*, 112(12), 1831-1842.
- KREYMANN, G., GROSSER, S., BUGGISCH, P., GOTTSCHALL, C., MATTHAEI, S., and GRETEN, H. (1993). Oxygen consumption and resting metabolic rate in sepsis, sepsis syndrome, and septic shock. *Crit Care Med*, 21(7), 1012-1019.
- KROOK, A., DIGBY, J., O'RAHILLY, S., ZIERATH, J. R., and WALLBERG-HENRIKSSON, H. (1998). Uncoupling protein 3 is reduced in skeletal muscle of NIDDM patients. *Diabetes*, 47(9), 1528-1531.
- LACZA, Z., HORN, T. F., SNIPES, J. A., ZHANG, J., ROYCHOWDHURY, S., HORVATH, E. M., FIGUEROA, J. P., KOLLAI, M., SZABO, C., and BUSIJA, D. W. (2004). Lack of mitochondrial nitric oxide production in the mouse brain. *J Neurochem*, 90(4), 942-951.

- LACZA, Z., KOZLOV, A. V., PANKOTAI, E., CSORDAS, A., WOLF, G., REDL, H., KOLLAI, M., SZABO, C., BUSIJA, D. W., and HORN, T. F. (2006a). Mitochondria produce reactive nitrogen species via an arginine-independent pathway. *Free Radic Res*, 40(4), 369-378.
- LACZA, Z., PANKOTAI, E., CSORDAS, A., GERO, D., KISS, L., HORVATH, E. M., KOLLAI, M., BUSIJA, D. W., and SZABO, C. (2006b). Mitochondrial NO and reactive nitrogen species production: does mtNOS exist? *Nitric Oxide*, 14(2), 162-168.
- LACZA, Z., SNIPES, J. A., ZHANG, J., HORVATH, E. M., FIGUEROA, J. P., SZABO, C., and BUSIJA, D. W. (2003). Mitochondrial nitric oxide synthase is not eNOS, nNOS or iNOS. *Free Radic Biol Med*, 35(10), 1217-1228.
- LALOI, M., KLEIN, M., RIESMEIER, J. W., MULLER-ROBER, B., FLEURY, C., BOUILLAUD, F., and RICQUIER, D. (1997). A plant cold-induced uncoupling protein. *Nature*, 389(6647), 135-136.
- LAYBUTT, D. R., SHARMA, A., SGROI, D. C., GAUDET, J., BONNER-WEIR, S., and WEIR, G. C. (2002). Genetic regulation of metabolic pathways in beta-cells disrupted by hyperglycemia. *J Biol Chem*, 277(13), 10912-10921.
- LEVRAUT, J., IWASE, H., SHAO, Z. H., VANDEN HOEK, T. L., and SCHUMACKER, P. T. (2003). Cell death during ischemia: relationship to mitochondrial depolarization and ROS generation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 284(2), H549-558.
- LIBERMAN, E. A., TOPALY, V. P., TSOFINA, L. M., JASAITIS, A. A., and SKULACHEV, V. P. (1969). Mechanism of coupling of oxidative phosphorylation and the membrane potential of mitochondria. *Nature*, 222(5198), 1076-1078.
- LIEBIG, M., VON PRAUN, C., HELDMAIER, G., and KLINGENSPOR, M. (2004). Absence of UCP3 in brown adipose tissue does not impair nonshivering thermogenesis. *Physiol Biochem Zool*, 77(1), 116-126.
- LIN, B., COUGHLIN, S., and PILCH, P. F. (1998). Bidirectional regulation of uncoupling protein-3 and GLUT-4 mRNA in skeletal muscle by cold. *Am J Physiol*, 275(3 Pt 1), E386-391.
- LITSKY, M. L., and PFEIFFER, D. R. (1997). Regulation of the mitochondrial Ca²⁺ uniporter by external adenine nucleotides: the uniporter behaves like a gated channel which is regulated by nucleotides and divalent cations. *Biochemistry*, 36(23), 7071-7080.
- LOCKE, R. M., and NICHOLLS, D. G. (1981). A re-evaluation of the role of fatty acids in the physiological regulation of the proton conductance of brown adipose tissue mitochondria. *FEBS Lett*, 135(2), 249-252.
- LOCKE, R. M., RIAL, E., SCOTT, I. D., and NICHOLLS, D. G. (1982). Fatty acids as acute regulators of the proton conductance of hamster brown-fat mitochondria. *Eur J Biochem*, 129(2), 373-380.
- LOMBARDI, A., GRASSO, P., MORENO, M., DE LANGE, P., SILVESTRI, E., LANNI, A., and GOGLIA, F. (2008). Interrelated influence of superoxides and free fatty acids over mitochondrial uncoupling in skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta*, 1777(7-8), 826-833.
- LOPEZ-FIGUEROA, M. O., CAAMANO, C., MORANO, M. I., RONN, L. C., AKIL, H., and WATSON, S. J. (2000). Direct evidence of nitric oxide presence within mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun*, 272(1), 129-133.

- LOWENSTEIN, C. J. (2007). Nitric oxide regulation of protein trafficking in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res*, 75(2), 240-246.
- LU, Z., and SACK, M. N. (2008). ATF-1 is a hypoxia-responsive transcriptional activator of skeletal muscle mitochondrial-uncoupling protein 3. *J Biol Chem*, 283(34), 23410-23418.
- LUQUET, S., LOPEZ-SORIANO, J., HOLST, D., FREDENRICH, A., MELKI, J., RASSOULZADEGAN, M., and GRIMALDI, P. A. (2003). Peroxisome proliferator-activated receptor delta controls muscle development and oxidative capability. *Faseb J*, 17(15), 2299-2301.
- LLESUY, S., EVELSON, P., GONZALEZ-FLECHA, B., PERALTA, J., CARRERAS, M. C., PODEROSO, J. J., and BOVERIS, A. (1994). Oxidative stress in muscle and liver of rats with septic syndrome. *Free Radic Biol Med*, 16(4), 445-451.
- MACLELLAN, J. D., GERRITS, M. F., GOWING, A., SMITH, P. J., WHEELER, M. B., and HARPER, M. E. (2005). Physiological increases in uncoupling protein 3 augment fatty acid oxidation and decrease reactive oxygen species production without uncoupling respiration in muscle cells. *Diabetes*, 54(8), 2343-2350.
- MACMILLAN-CROW, L. A., and CRUTHIRDS, D. L. (2001). Invited review: manganese superoxide dismutase in disease. *Free Radic Res*, 34(4), 325-336.
- MADAMANCHI, N. R., HAKIM, Z. S., and RUNGE, M. S. (2005). Oxidative stress in atherogenesis and arterial thrombosis: the disconnect between cellular studies and clinical outcomes. *J Thromb Haemost*, 3(2), 254-267.
- MAIA, I. G., BENEDETTI, C. E., LEITE, A., TURCINELLI, S. R., VERCESI, A. E., and ARRUDA, P. (1998). AtPUMP: an Arabidopsis gene encoding a plant uncoupling mitochondrial protein. *FEBS Lett*, 429(3), 403-406.
- MAO, W., YU, X. X., ZHONG, A., LI, W., BRUSH, J., SHERWOOD, S. W., ADAMS, S. H., and PAN, G. (1999). UCP4, a novel brain-specific mitochondrial protein that reduces membrane potential in mammalian cells. *FEBS Lett*, 443(3), 326-330.
- MARETTE, A., and BUKOWIECKI, L. J. (1989). Stimulation of glucose transport by insulin and norepinephrine in isolated rat brown adipocytes. *Am J Physiol*, 257(4 Pt 1), C714-721.
- MASAKI, T., YOSHIMATSU, H., CHIBA, S., HIDAKA, S., TAJIMA, D., KAKUMA, T., KUROKAWA, M., and SAKATA, T. (1999). Tumor necrosis factor-alpha regulates in vivo expression of the rat UCP family differentially. *Biochim Biophys Acta*, 1436(3), 585-592.
- MATEO, J., GARCIA-LECEA, M., CADENAS, S., HERNANDEZ, C., and MONCADA, S. (2003). Regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha by nitric oxide through mitochondria-dependent and -independent pathways. *Biochem J*, 376(Pt 2), 537-544.
- MATSUDA, J., HOSODA, K., ITOH, H., SON, C., DOI, K., TANAKA, T., FUKUNAGA, Y., INOUE, G., NISHIMURA, H., YOSHIMASA, Y., YAMORI, Y., and NAKAO, K. (1997). Cloning of rat uncoupling protein-3 and uncoupling protein-2 cDNAs: their gene expression in rats fed high-fat diet. *FEBS Lett*, 418(1-2), 200-204.
- MCLEOD, C. J., AZIZ, A., HOYT, R. F., JR., MCCOY, J. P., JR., and SACK, M. N. (2005). Uncoupling proteins 2 and 3 function in concert to augment tolerance to cardiac ischemia. *J Biol Chem*, 280(39), 33470-33476.

- MCLEOD, C. J., JEYABALAN, A. P., MINNERS, J. O., CLEVINGER, R., HOYT, R. F., JR., and SACK, M. N. (2004). Delayed ischemic preconditioning activates nuclear-encoded electron-transfer-chain gene expression in parallel with enhanced postanoxic mitochondrial respiratory recovery. *Circulation*, 110(5), 534-539.
- MEDVEDEV, A. V., SNEDDEN, S. K., RAIMBAULT, S., RICQUIER, D., and COLLINS, S. (2001). Transcriptional regulation of the mouse uncoupling protein-2 gene. Double E-box motif is required for peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-dependent activation. *J Biol Chem*, 276(14), 10817-10823.
- MEMON, R. A., HOTAMISLIGIL, G. S., WIESBROCK, S. M., UYSAL, K. T., FAGGIONI, R., MOSER, A. H., FEINGOLD, K. R., and GRUNFELD, C. (2000). Upregulation of uncoupling protein 2 mRNA in genetic obesity: lack of an essential role for leptin, hyperphagia, increased tissue lipid content, and TNF-alpha. *Biochim Biophys Acta*, 1484(1), 41-50.
- MÉNDEZ, G., AND GNAIGER, E. (1994). Modern Trends in BioThermoKinetics. In: *What is Controlling Life?*, and E. G. Gnaiger, F. N., and Wyss, M., eds., Innsbruck University Press, Innsbruck, 191-194.
- MICHEL, T., and FERON, O. (1997). Nitric oxide synthases: which, where, how, and why? *J Clin Invest*, 100(9), 2146-2152.
- MILLET, L., VIDAL, H., ANDREELLI, F., LARROUY, D., RIOU, J. P., RICQUIER, D., LAVILLE, M., and LANGIN, D. (1997). Increased uncoupling protein-2 and -3 mRNA expression during fasting in obese and lean humans. *J Clin Invest*, 100(11), 2665-2670.
- MINNERS, J., LACERDA, L., MCCARTHY, J., MEIRING, J. J., YELLON, D. M., and SACK, M. N. (2001). Ischemic and pharmacological preconditioning in Girardi cells and C2C12 myotubes induce mitochondrial uncoupling. *Circ Res*, 89(9), 787-792.
- MITCHELL, P. (1961). Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature*, 191, 144-148.
- MONCADA, S., and ERUSALIMSKY, J. D. (2002). Does nitric oxide modulate mitochondrial energy generation and apoptosis? *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3(3), 214-220.
- MONCADA, S., and HIGGS, E. A. (2006). The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. *Br J Pharmacol*, 147 Suppl 1, S193-201.
- MOREIRA, P. I., NUNOMURA, A., NAKAMURA, M., TAKEDA, A., SHENK, J. C., ALIEV, G., SMITH, M. A., and PERRY, G. (2008). Nucleic acid oxidation in Alzheimer disease. *Free Radic Biol Med*, 44(8), 1493-1505.
- MOZO, J., FERRY, G., STUDENY, A., PECQUEUR, C., RODRIGUEZ, M., BOUTIN, J. A., and BOUILLAUD, F. (2006). Expression of UCP3 in CHO cells does not cause uncoupling, but controls mitochondrial activity in the presence of glucose. *Biochem J*, 393(Pt 1), 431-439.
- MURPHY, M. P., ECHTAY, K. S., BLAIKIE, F. H., ASIN-CAYUELA, J., COCHEME, H. M., GREEN, K., BUCKINGHAM, J. A., TAYLOR, E. R., HURRELL, F., HUGHES, G., MIWA, S., COOPER, C. E., SVISTUNENKO, D. A., SMITH, R. A., and BRAND, M. D. (2003). Superoxide activates uncoupling proteins by generating carbon-centered radicals and initiating lipid peroxidation: studies using a mitochondria-targeted spin trap derived from alpha-phenyl-N-tert-butyl-nitron. *J Biol Chem*, 278(49), 48534-48545.
- MURRY, C. E., JENNINGS, R. B., and REIMER, K. A. (1986). Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*, 74(5), 1124-1136.

- NADTOCHIY, S. M., TOMPKINS, A. J., and BROOKES, P. S. (2006). Different mechanisms of mitochondrial proton leak in ischaemia/reperfusion injury and preconditioning: implications for pathology and cardioprotection. *Biochem J*, 395(3), 611-618.
- NAGANO, T., and YOSHIMURA, T. (2002). Bioimaging of nitric oxide. *Chem Rev*, 102(4), 1235-1270.
- NEGRE-SALVAYRE, A., HIRTZ, C., CARRERA, G., CAZENAVE, R., TROLY, M., SALVAYRE, R., PENICAUD, L., and CASTEILLA, L. (1997). A role for uncoupling protein-2 as a regulator of mitochondrial hydrogen peroxide generation. *Faseb J*, 11(10), 809-815.
- NICHOLLS, D. G. (1974). The influence of respiration and ATP hydrolysis on the proton-electrochemical gradient across the inner membrane of rat-liver mitochondria as determined by ion distribution. *Eur J Biochem*, 50(1), 305-315.
- NICHOLLS, D. G. (1976). Hamster brown-adipose-tissue mitochondria. Purine nucleotide control of the ion conductance of the inner membrane, the nature of the nucleotide binding site. *Eur J Biochem*, 62(2), 223-228.
- NICHOLLS, D. G., BERNSON, V. S., and HEATON, G. M. (1978). The identification of the component in the inner membrane of brown adipose tissue mitochondria responsible for regulating energy dissipation. *Experientia Suppl*, 32, 89-93.
- NICHOLLS, D. G., and LOCKE, R. M. (1984). Thermogenic mechanisms in brown fat. *Physiol Rev*, 64(1), 1-64.
- NICHOLLS, D. G., and RIAL, E. (1999). A history of the first uncoupling protein, UCP1. *J Bioenerg Biomembr*, 31(5), 399-406.
- NOHL, H., STANIEK, K., SOBHIAN, B., BAHRAMI, S., REDL, H., and KOZLOV, A. V. (2000). Mitochondria recycle nitrite back to the bioregulator nitric monoxide. *Acta Biochim Pol*, 47(4), 913-921.
- OMATSU-KANBE, M., and KITASATO, H. (1992). Insulin and noradrenaline independently stimulate the translocation of glucose transporters from intracellular stores to the plasma membrane in mouse brown adipocytes. *FEBS Lett*, 314(3), 246-250.
- PALMER, R. M., ASHTON, D. S., and MONCADA, S. (1988). Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature*, 333(6174), 664-666.
- PALMIERI, F. (2004). The mitochondrial transporter family (SLC25): physiological and pathological implications. *Pflugers Arch*, 447(5), 689-709.
- PAPA, S., and SKULACHEV, V. P. (1997). Reactive oxygen species, mitochondria, apoptosis and aging. *Mol Cell Biochem*, 174(1-2), 305-319.
- PAREKH, A. B. (1998). Slow feedback inhibition of calcium release-activated calcium current by calcium entry. *J Biol Chem*, 273(24), 14925-14932.
- PARKER, N., AFFOURTIT, C., VIDAL-PUIG, A., and BRAND, M. D. (2008a). Energization-dependent endogenous activation of proton conductance in skeletal muscle mitochondria. *Biochem J*, 412(1), 131-139.
- PARKER, N., VIDAL-PUIG, A., and BRAND, M. D. (2008b). Stimulation of mitochondrial proton conductance by hydroxynonenal requires a high membrane potential. *Biosci Rep*, 28(2), 83-88.

- PECQUEUR, C., ALVES-GUERRA, M. C., GELLY, C., LEVI-MEYRUEIS, C., COUPLAN, E., COLLINS, S., RICQUIER, D., BOUILLAUD, F., and MIROUX, B. (2001). Uncoupling protein 2, in vivo distribution, induction upon oxidative stress, and evidence for translational regulation. *J Biol Chem*, 276(12), 8705-8712.
- PEDRAZA, N., ROSELL, M., VILLARROYA, J., IGLESIAS, R., GONZALEZ, F. J., SOLANES, G., and VILLARROYA, F. (2006). Developmental and tissue-specific involvement of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha in the control of mouse uncoupling protein-3 gene expression. *Endocrinology*, 147(10), 4695-4704.
- PEDRAZA, N., SOLANES, G., CARMONA, M. C., IGLESIAS, R., VINAS, O., MAMPEL, T., VAZQUEZ, M., GIRALT, M., and VILLARROYA, F. (2000). Impaired expression of the uncoupling protein-3 gene in skeletal muscle during lactation: fibrates and troglitazone reverse lactation-induced downregulation of the uncoupling protein-3 gene. *Diabetes*, 49(7), 1224-1230.
- PERALTA, C., BULBENA, O., XAUS, C., PRATS, N., CUTRIN, J. C., POLI, G., GELPI, E., and ROSELLO-CATAFAU, J. (2002). Ischemic preconditioning: a defense mechanism against the reactive oxygen species generated after hepatic ischemia reperfusion. *Transplantation*, 73(8), 1203-1211.
- PERALTA, C., HOTTER, G., CLOSA, D., GELPI, E., BULBENA, O., and ROSELLO-CATAFAU, J. (1997). Protective effect of preconditioning on the injury associated to hepatic ischemia-reperfusion in the rat: role of nitric oxide and adenosine. *Hepatology*, 25(4), 934-937.
- PERALTA, C., HOTTER, G., CLOSA, D., PRATS, N., XAUS, C., GELPI, E., and ROSELLO-CATAFAU, J. (1999). The protective role of adenosine in inducing nitric oxide synthesis in rat liver ischemia preconditioning is mediated by activation of adenosine A2 receptors. *Hepatology*, 29(1), 126-132.
- PORTER, R. K., HULBERT, A. J., and BRAND, M. D. (1996). Allometry of mitochondrial proton leak: influence of membrane surface area and fatty acid composition. *Am J Physiol*, 271(6 Pt 2), R1550-1560.
- PUIGSERVER, P., WU, Z., PARK, C. W., GRAVES, R., WRIGHT, M., and SPIEGELMAN, B. M. (1998). A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell*, 92(6), 829-839.
- RAIMBAULT, S., DRIDI, S., DENJEAN, F., LACHUER, J., COUPLAN, E., BOUILLAUD, F., BORDAS, A., DUCHAMP, C., TAOUIS, M., and RICQUIER, D. (2001). An uncoupling protein homologue putatively involved in facultative muscle thermogenesis in birds. *Biochem J*, 353(Pt 3), 441-444.
- REY, B., SIBILLE, B., ROMESTAING, C., BELOUZE, M., LETEXIER, D., SERVAIS, S., BARRE, H., DUCHAMP, C., and VOITURON, Y. (2008). Reptilian uncoupling protein: functionality and expression in sub-zero temperatures. *J Exp Biol*, 211(Pt 9), 1456-1462.
- REYNAFARJE, B., COSTA, L. E., and LEHNINGER, A. L. (1985). O₂ solubility in aqueous media determined by a kinetic method. *Anal Biochem*, 145(2), 406-418.
- RIAL, E., AGUIRREGOITIA, E., JIMENEZ-JIMENEZ, J., and LEDESMA, A. (2004). Alkylsulfonates activate the uncoupling protein UCP1: implications for the transport mechanism. *Biochim Biophys Acta*, 1608(2-3), 122-130.
- RICQUIER, D., and BOUILLAUD, F. (2000). The uncoupling protein homologues: UCP1, UCP2, UCP3, StUCP and AtUCP. *Biochem J*, 345 Pt 2, 161-179.

- RIOBO, N. A., CLEMENTI, E., MELANI, M., BOVERIS, A., CADENAS, E., MONCADA, S., and PODEROSO, J. J. (2001). Nitric oxide inhibits mitochondrial NADH:ubiquinone reductase activity through peroxynitrite formation. *Biochem J*, 359(Pt 1), 139-145.
- RIOBO, N. A., MELANI, M., SANJUAN, N., FISZMAN, M. L., GRAVIELLE, M. C., CARRERAS, M. C., CADENAS, E., and PODEROSO, J. J. (2002). The modulation of mitochondrial nitric-oxide synthase activity in rat brain development. *J Biol Chem*, 277(45), 42447-42455.
- ROLFE, D. F., and BRAND, M. D. (1996). Contribution of mitochondrial proton leak to skeletal muscle respiration and to standard metabolic rate. *Am J Physiol*, 271(4 Pt 1), C1380-1389.
- ROLFE, D. F., and BRAND, M. D. (1997). The physiological significance of mitochondrial proton leak in animal cells and tissues. *Biosci Rep*, 17(1), 9-16.
- ROLFE, D. F., HULBERT, A. J., and BRAND, M. D. (1994). Characteristics of mitochondrial proton leak and control of oxidative phosphorylation in the major oxygen-consuming tissues of the rat. *Biochim Biophys Acta*, 1188(3), 405-416.
- ROLFE, D. F., NEWMAN, J. M., BUCKINGHAM, J. A., CLARK, M. G., and BRAND, M. D. (1999). Contribution of mitochondrial proton leak to respiration rate in working skeletal muscle and liver and to SMR. *Am J Physiol*, 276(3 Pt 1), C692-699.
- ROSEN, E. D., WALKEY, C. J., PUIGSERVER, P., and SPIEGELMAN, B. M. (2000). Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes Dev*, 14(11), 1293-1307.
- ROSHON, M. J., KLINE, J. A., THORNTON, L. R., and WATTS, J. A. (2003). Cardiac UCP2 expression and myocardial oxidative metabolism during acute septic shock in the rat. *Shock*, 19(6), 570-576.
- ROSS, M. F., KELSO, G. F., BLAIKIE, F. H., JAMES, A. M., COCHEME, H. M., FILIPOVSKA, A., DA ROS, T., HURD, T. R., SMITH, R. A., and MURPHY, M. P. (2005). Lipophilic triphenylphosphonium cations as tools in mitochondrial bioenergetics and free radical biology. *Biochemistry (Mosc)*, 70(2), 222-230.
- ROSSER, D. M., STIDWILL, R. P., JACOBSON, D., and SINGER, M. (1995). Oxygen tension in the bladder epithelium rises in both high and low cardiac output endotoxemic sepsis. *J Appl Physiol*, 79(6), 1878-1882.
- ROZEN, S., and SKALETSKY, H. J. (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers.) In: *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*, M. S. Krawetz S, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 365-386.
- SACK, M. N. (2006). Mitochondrial depolarization and the role of uncoupling proteins in ischemia tolerance. *Cardiovasc Res*, 72(2), 210-219.
- SANCHIS, D., FLEURY, C., CHOMIKI, N., GOUBERN, M., HUANG, Q., NEVEROVA, M., GREGOIRE, F., EASLICK, J., RAIMBAULT, S., LEVI-MEYRUEIS, C., MIROUX, B., COLLINS, S., SELDIN, M., RICHARD, D., WARDEN, C., BOUILLAUD, F., and RICQUIER, D. (1998). BMCP1, a novel mitochondrial carrier with high expression in the central nervous system of humans and rodents, and respiration uncoupling activity in recombinant yeast. *J Biol Chem*, 273(51), 34611-34615.
- SASTRE, J., PALLARDO, F. V., and VINA, J. (2000). Mitochondrial oxidative stress plays a key role in aging and apoptosis. *IUBMB Life*, 49(5), 427-435.

- SCARPA, A., and AZZONE, G. F. (1970). The mechanism of ion translocation in mitochondria. 4. Coupling of K⁺ efflux with Ca²⁺ uptake. *Eur J Biochem*, 12(2), 328-335.
- SCHILD, L., REINHECKEL, T., REISER, M., HORN, T. F., WOLF, G., and AUGUSTIN, W. (2003). Nitric oxide produced in rat liver mitochondria causes oxidative stress and impairment of respiration after transient hypoxia. *Faseb J*, 17(15), 2194-2201.
- SCHRAUWEN, P., and HESSELINK, M. (2002). UCP2 and UCP3 in muscle controlling body metabolism. *J Exp Biol*, 205(Pt 15), 2275-2285.
- SCHRAUWEN, P., and HESSELINK, M. K. (2004). The role of uncoupling protein 3 in fatty acid metabolism: protection against lipotoxicity? *Proc Nutr Soc*, 63(2), 287-292.
- SCHRAUWEN, P., HESSELINK, M. K., BLAAK, E. E., BORGHOUTS, L. B., SCHAART, G., SARIS, W. H., and KEIZER, H. A. (2001a). Uncoupling protein 3 content is decreased in skeletal muscle of patients with type 2 diabetes. *Diabetes*, 50(12), 2870-2873.
- SCHRAUWEN, P., HESSELINK, M. K., VAARTJES, I., KORNIPS, E., SARIS, W. H., GIACOBINO, J. P., and RUSSELL, A. (2002). Effect of acute exercise on uncoupling protein 3 is a fat metabolism-mediated effect. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 282(1), E11-17.
- SCHRAUWEN, P., HOPPELER, H., BILLETER, R., BAKKER, A. H., and PENDERGAST, D. R. (2001b). Fiber type dependent upregulation of human skeletal muscle UCP2 and UCP3 mRNA expression by high-fat diet. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 25(4), 449-456.
- SEARS, I. B., MACGINNITIE, M. A., KOVACS, L. G., and GRAVES, R. A. (1996). Differentiation-dependent expression of the brown adipocyte uncoupling protein gene: regulation by peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Mol Cell Biol*, 16(7), 3410-3419.
- SEIDEL, B., STANARIUS, A., and WOLF, G. (1997). Differential expression of neuronal and endothelial nitric oxide synthase in blood vessels of the rat brain. *Neurosci Lett*, 239(2-3), 109-112.
- SEIFERT, E. L., BEZAIRE, V., ESTEY, C., and HARPER, M. E. (2008). Essential role for uncoupling protein-3 in mitochondrial adaptation to fasting but not in fatty acid oxidation or fatty acid anion export. *J Biol Chem*, 283(37), 25124-25131.
- SINGER, M., and BREALEY, D. (1999). Mitochondrial dysfunction in sepsis. *Biochem Soc Symp*, 66, 149-166.
- SIVITZ, W. I., FINK, B. D., and DONOHUE, P. A. (1999). Fasting and leptin modulate adipose and muscle uncoupling protein: divergent effects between messenger ribonucleic acid and protein expression. *Endocrinology*, 140(4), 1511-1519.
- SOLANES, G., PEDRAZA, N., IGLESIAS, R., GIRALT, M., and VILLARROYA, F. (2003). Functional relationship between MyoD and peroxisome proliferator-activated receptor-dependent regulatory pathways in the control of the human uncoupling protein-3 gene transcription. *Mol Endocrinol*, 17(10), 1944-1958.
- STAVINOHA, M. A., RAYSPELLICY, J. W., ESSOP, M. F., GRAVELEAU, C., ABEL, E. D., HART-SAILORS, M. L., MERSMANN, H. J., BRAY, M. S., and YOUNG, M. E. (2004). Evidence for mitochondrial thioesterase 1 as a peroxisome proliferator-activated receptor-alpha-regulated gene in cardiac and skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 287(5), E888-895.

- STUART, J. A., HARPER, J. A., BRINDLE, K. M., and BRAND, M. D. (1999). Uncoupling protein 2 from carp and zebrafish, ectothermic vertebrates. *Biochim Biophys Acta*, 1413(1), 50-54.
- STUEHR, D. J., CHO, H. J., KWON, N. S., WEISE, M. F., and NATHAN, C. F. (1991). Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD- and FMN-containing flavoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88(17), 7773-7777.
- SUN, X., WRAY, C., TIAN, X., HASSELGREN, P. O., and LU, J. (2003). Expression of uncoupling protein 3 is upregulated in skeletal muscle during sepsis. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 285(3), E512-520.
- TAKEHARA, Y., KANNO, T., YOSHIOKA, T., INOUE, M., and UTSUMI, K. (1995). Oxygen-dependent regulation of mitochondrial energy metabolism by nitric oxide. *Arch Biochem Biophys*, 323(1), 27-32.
- TALBOT, D. A., LAMBERT, A. J., and BRAND, M. D. (2004). Production of endogenous matrix superoxide from mitochondrial complex I leads to activation of uncoupling protein 3. *FEBS Lett*, 556(1-3), 111-115.
- TATOYAN, A., and GIULIVI, C. (1998). Purification and characterization of a nitric-oxide synthase from rat liver mitochondria. *J Biol Chem*, 273(18), 11044-11048.
- TAY, Y. M., LIM, K. S., SHEU, F. S., JENNER, A., WHITEMAN, M., WONG, K. P., and HALLIWELL, B. (2004). Do mitochondria make nitric oxide? no? *Free Radic Res*, 38(6), 591-599.
- TESHIMA, Y., AKAO, M., JONES, S. P., and MARBAN, E. (2003). Uncoupling protein-2 overexpression inhibits mitochondrial death pathway in cardiomyocytes. *Circ Res*, 93(3), 192-200.
- TORDJMAN, K., STANDLEY, K. N., BERNAL-MIZRACHI, C., LEONE, T. C., COLEMAN, T., KELLY, D. P., and SEMENKOVICH, C. F. (2002). PPARalpha suppresses insulin secretion and induces UCP2 in insulinoma cells. *J Lipid Res*, 43(6), 936-943.
- TRENKER, M., MALLI, R., FERTSCHAI, I., LEVAK-FRANK, S., and GRAIER, W. F. (2007). Uncoupling proteins 2 and 3 are fundamental for mitochondrial Ca²⁺ uniport. *Nat Cell Biol*, 9(4), 445-452.
- TSUBOYAMA-KASAOKA, N., TSUNODA, N., MARUYAMA, K., TAKAHASHI, M., KIM, H., IKEMOTO, S., and EZAKI, O. (1998). Up-regulation of uncoupling protein 3 (UCP3) mRNA by exercise training and down-regulation of UCP3 by denervation in skeletal muscles. *Biochem Biophys Res Commun*, 247(2), 498-503.
- URSO, M. L., and CLARKSON, P. M. (2003). Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicology*, 189(1-2), 41-54.
- VALMASEDA, A., CARMONA, M. C., BARBERA, M. J., VINAS, O., MAMPEL, T., IGLESIAS, R., VILLARROYA, F., and GIRALT, M. (1999). Opposite regulation of PPAR-alpha and -gamma gene expression by both their ligands and retinoic acid in brown adipocytes. *Mol Cell Endocrinol*, 154(1-2), 101-109.
- VIANNA, C. R., HAGEN, T., ZHANG, C. Y., BACHMAN, E., BOSS, O., GEREKEN, B., MORISCOT, A. S., LOWELL, B. B., BICUDO, J. E., and BIANCO, A. C. (2001). Cloning and functional characterization of an uncoupling protein homolog in hummingbirds. *Physiol Genomics*, 5(3), 137-145.

- VIDAL-PUIG, A. J., GRUJIC, D., ZHANG, C. Y., HAGEN, T., BOSS, O., IDO, Y., SZCZEPANIK, A., WADE, J., MOOHA, V., CORTRIGHT, R., MUOIO, D. M., and LOWELL, B. B. (2000). Energy metabolism in uncoupling protein 3 gene knockout mice. *J Biol Chem*, 275(21), 16258-16266.
- VIDAL, H., LANGIN, D., ANDREELLI, F., MILLET, L., LARROUY, D., and LAVILLE, M. (1999). Lack of skeletal muscle uncoupling protein 2 and 3 mRNA induction during fasting in type-2 diabetic subjects. *Am J Physiol*, 277(5 Pt 1), E830-837.
- VILLARROYA, F., IGLESIAS, R., and GIRALT, M. (2007). PPARs in the Control of Uncoupling Proteins Gene Expression. *PPAR Res*, 2007, 74364.
- VINCENT, A. M., OLZMANN, J. A., BROWNLEE, M., SIVITZ, W. I., and RUSSELL, J. W. (2004). Uncoupling proteins prevent glucose-induced neuronal oxidative stress and programmed cell death. *Diabetes*, 53(3), 726-734.
- VOEHRINGER, D. W., HIRSCHBERG, D. L., XIAO, J., LU, Q., ROEDERER, M., LOCK, C. B., HERZENBERG, L. A., STEINMAN, L., and HERZENBERG, L. A. (2000). Gene microarray identification of redox and mitochondrial elements that control resistance or sensitivity to apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(6), 2680-2685.
- WANG, S., SUBRAMANIAM, A., CAWTHORNE, M. A., and CLAPHAM, J. C. (2003). Increased fatty acid oxidation in transgenic mice overexpressing UCP3 in skeletal muscle. *Diabetes Obes Metab*, 5(5), 295-301.
- WANG, Y. X., ZHANG, C. L., YU, R. T., CHO, H. K., NELSON, M. C., BAYUGA-OCAMPO, C. R., HAM, J., KANG, H., and EVANS, R. M. (2004). Regulation of muscle fiber type and running endurance by PPARdelta. *PLoS Biol*, 2(10), e294.
- WILSON, D. F., RUMSEY, W. L., GREEN, T. J., and VANDERKOOI, J. M. (1988). The oxygen dependence of mitochondrial oxidative phosphorylation measured by a new optical method for measuring oxygen concentration. *J Biol Chem*, 263(6), 2712-2718.
- WINGROVE, D. E., AMATRUDA, J. M., and GUNTER, T. E. (1984). Glucagon effects on the membrane potential and calcium uptake rate of rat liver mitochondria. *J Biol Chem*, 259(15), 9390-9394.
- WINKLER, E., and KLINGENBERG, M. (1994). Effect of fatty acids on H⁺ transport activity of the reconstituted uncoupling protein. *J Biol Chem*, 269(4), 2508-2515.
- WINZELL, M. S., SVENSSON, H., ENERBACK, S., RAVNSKJAER, K., MANDRUP, S., ESSER, V., ARNER, P., ALVES-GUERRA, M. C., MIROUX, B., SUNDLER, F., AHREN, B., and HOLM, C. (2003). Pancreatic beta-cell lipotoxicity induced by overexpression of hormone-sensitive lipase. *Diabetes*, 52(8), 2057-2065.
- WOOD, Z. A., SCHRODER, E., ROBIN HARRIS, J., and POOLE, L. B. (2003). Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem Sci*, 28(1), 32-40.
- XU, C., YE, Z., GAO, Q., SHAN, Q., XIA, Q., and BOURREAU, J. P. (2005). The relationship of ventricular dynamics and mitochondrial nitric oxide synthase activity in septic shock models. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*, 3, 2280-2282.
- YAMASHITA, N., NISHIDA, M., HOSHIDA, S., KUZUYA, T., HORI, M., TANIGUCHI, N., KAMADA, T., and TADA, M. (1994). Induction of manganese superoxide dismutase in rat cardiac myocytes increases tolerance to hypoxia 24 hours after preconditioning. *J Clin Invest*, 94(6), 2193-2199.

- YU, X. X., BARGER, J. L., BOYER, B. B., BRAND, M. D., PAN, G., and ADAMS, S. H. (2000). Impact of endotoxin on UCP homolog mRNA abundance, thermoregulation, and mitochondrial proton leak kinetics. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 279(2), E433-446.
- YUBERO, P., MANCHADO, C., CASSARD-DOULCIER, A. M., MAMPEL, T., VINAS, O., IGLESIAS, R., GIRALT, M., and VILLARROYA, F. (1994). CCAAT/enhancer binding proteins alpha and beta are transcriptional activators of the brown fat uncoupling protein gene promoter. *Biochem Biophys Res Commun*, 198(2), 653-659.
- YUI, Y., HATTORI, R., KOSUGA, K., EIZAWA, H., HIKI, K., and KAWAI, C. (1991). Purification of nitric oxide synthase from rat macrophages. *J Biol Chem*, 266(19), 12544-12547.
- ZACKOVA, M., SKOBISOVA, E., URBANKOVA, E., and JEZEK, P. (2003). Activating omega-6 polyunsaturated fatty acids and inhibitory purine nucleotides are high affinity ligands for novel mitochondrial uncoupling proteins UCP2 and UCP3. *J Biol Chem*, 278(23), 20761-20769.
- ZANELLA, B., GIORDANO, E., MUSCARI, C., ZINI, M., and GUARNIERI, C. (2004). Nitric oxide synthase activity in rat cardiac mitochondria. *Basic Res Cardiol*, 99(3), 159-164.
- ZHANG, B. X., MA, X., ZHANG, W., YEH, C. K., LIN, A., LUO, J., SPRAGUE, E. A., SWERDLOW, R. H., and KATZ, M. S. (2006a). Polyunsaturated fatty acids mobilize intracellular Ca²⁺ in NT2 human teratocarcinoma cells by causing release of Ca²⁺ from mitochondria. *Am J Physiol Cell Physiol*, 290(5), C1321-1333.
- ZHANG, C. Y., BAFFY, G., PERRET, P., KRAUSS, S., PERONI, O., GRUJIC, D., HAGEN, T., VIDAL-PUIG, A. J., BOSS, O., KIM, Y. B., ZHENG, X. X., WHEELER, M. B., SHULMAN, G. I., CHAN, C. B., and LOWELL, B. B. (2001). Uncoupling protein-2 negatively regulates insulin secretion and is a major link between obesity, beta cell dysfunction, and type 2 diabetes. *Cell*, 105(6), 745-755.
- ZHANG, C. Y., PARTON, L. E., YE, C. P., KRAUSS, S., SHEN, R., LIN, C. T., PORCO, J. A., JR., and LOWELL, B. B. (2006b). Genipin inhibits UCP2-mediated proton leak and acutely reverses obesity- and high glucose-induced beta cell dysfunction in isolated pancreatic islets. *Cell Metab*, 3(6), 417-427.
- ZHOU, C., HUANG, Y., and PRZEDBORSKI, S. (2008). Oxidative stress in Parkinson's disease: a mechanism of pathogenic and therapeutic significance. *Ann N Y Acad Sci*, 1147, 93-104.
- ZHOU, Y. T., SHIMABUKURO, M., WANG, M. Y., LEE, Y., HIGA, M., MILBURN, J. L., NEWGARD, C. B., and UNGER, R. H. (1998). Role of peroxisome proliferator-activated receptor alpha in disease of pancreatic beta cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(15), 8898-8903.
- ZUNGU, M., ALCOLEA, M. P., GARCIA-PALMER, F. J., YOUNG, M. E., and ESSOP, M. F. (2007). Genomic modulation of mitochondrial respiratory genes in the hypertrophied heart reflects adaptive changes in mitochondrial and contractile function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 293(5), H2819-2825.
- ZWEIER, J. L., FLAHERTY, J. T., and WEISFELDT, M. L. (1987). Direct measurement of free radical generation following reperfusion of ischemic myocardium. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84(5), 1404-1407.
- ZWEIER, J. L., KUPPUSAMY, P., WILLIAMS, R., RAYBURN, B. K., SMITH, D., WEISFELDT, M. L., and FLAHERTY, J. T. (1989). Measurement and characterization of postischemic free radical generation in the isolated perfused heart. *J Biol Chem*, 264(32), 18890-18895.