

**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**

FACULTAD DE QUÍMICO-FARMACOBIOLOGÍA

**“EFECTO DEL ÓXIDO NÍTRICO EN LA RESPIRACIÓN
DE MITOCONDRIAS DE PULMÓN DE RATA”**

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE QUÍMICO-FARMACOBIOLOGO

PRESENTA:

P.Q.F.B. EMMANUEL REYES URIBE

ASESOR DE TESIS:

D.C. ALFREDO SAAVEDRA MOLINA

Morelia, Michoacán. Junio 2009

TESIS APOYADA POR LA COORDINACIÓN DE
INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA – UMSNH (2.16);
COECYT (2008)

AGRADECIMIENTOS

Le doy gracias a **Dios** por permitirme realizar este trabajo, a la **vida** porque cuanto más aprendo de ella, me doy cuenta de lo inmensa y maravillosa que es.

A mi esposa, mi mejor amiga, **Cristina Paniagua Méndez**, por su gran amor, por convertirme dichosamente en padre y tenerme toda la paciencia del mundo, además del apoyo que me brindo durante todo este tiempo, ya que siempre me ha dado fuerza e inspiración para seguir luchando.

A dos grandes personas que, gracias a ellas he llegado hasta aquí además de formarme como la persona que soy, siempre con amor, mis padres, **Rafael Reyes González y Ma. Patricia Uribe Téllez**.

A mi hermana **Ana M. Reyes Uribe** por el gran apoyo que me brindo cuando era estudiante, a mis hermanos por todo el tiempo agradable que me hicieron pasar junto a ellos.

A mi asesor y amigo, el **DC. Alfredo Saavedra Molina**, a su esposa **Mónica Clemente Guerrero** por todo su apoyo y por los consejos que me brindaron durante mi etapa estudiantil y hasta la fecha.

A mis sinodales, el **DC. Rosalio Mercado Camargo**, el **DC. Carlos Sosa Aguirre**, la **DC. Elizabeth Calderón Cortés**, por su paciencia, su apoyo y consejos durante la realización de este trabajo.

A mis amigos de la universidad, **Luis F. Rangel**, **Fernando Mejía**, **Cesar B. Ramírez**, **Mariano Méndez**, y a mis compañeros de escuela, por todos los momentos de alegría, apoyo y amistad.

A mis compañeros de laboratorio por permitirme aprender también de ellos.

A mi casa de estudios, la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo por permitirme formarme como profesionista.

ÍNDICE

Página

CONTENIDOS

INDICE DE FIGURAS-----	iv
INDICE DE TABLAS-----	v
LISTA DE ABREVIATURAS-----	vi
GLOSARIO-----	viii

Capítulo

1.0. RESUMEN-----	1
-------------------	---

ANTECEDENTES

1.1. ANATÓMICOS Y FISIOLÓGICOS-----	2
1.2. HISTÓRICOS-----	5
1.3. BIOQUÍMICOS	
1.3.1 ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LA MITOCONDRIA-----	7
1.3.2 CADENA RESPIRATORIA Y TRANSPORTE DE ELECTRONES-----	8
1.3.2.1 COMPLEJO I (NADH: ubiquinona oxidoreductasa)-----	9
1.3.2.2 COMPLEJO II (succinato: ubiquinona oxidoreductasa)-----	10
1.3.2.3 COMPLEJO III (ubiquinol: citocromo c oxidoreductasa)-----	10
1.3.2.4 COMPLEJO IV (citocromo c oxidasa)-----	11
1.3.2.5 ATP SINTASA-----	14
1.3.3 FOSFORILACIÓN OXIDATIVA-----	15

2.0	ÓXIDO NÍTRICO -----	16
	2.1 ISOFORMAS DE LA ÓXIDO NÍTRICO SINTASA -----	18
	2.2 INHIBIDORES DE LA ÓXIDO NÍTRICO SINTASA -----	25
	2.3 EFECTOS DEL ÓXIDO NÍTRICO EN LA MITOCONDRIA -----	26
3.0	HIPÓTESIS -----	29
4.0	OBJETIVOS	
	4.1 OBJETIVO GENERAL -----	30
	4.2 OBJETIVOS PARTICULARES -----	30
5.0	MATERIALES Y MÉTODOS	
	5.1 REACTIVOS-----	31
	5.2 ANIMALES -----	31
	5.3 AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE MITOCONDRIAS DE PULMÓN DE RATA -----	32
	5.4 DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA MITOCONDRIAL -----	33
	5.5 MEDICIÓN DE LA RESPIRACIÓN MITOCONDRIAL -----	34
	5.5.1 RESPIRACIÓN EN ESTADO 4 -----	35
	5.5.2 RESPIRACIÓN EN ESTADO 3 -----	35
	5.6 DETERMINACIÓN DEL ÓXIDO NÍTRICO MITOCONDRIAL-----	36
6.0	RESULTADOS	
	6.1 EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE L-ARG EN EL ESTADO DE BAJA FOSFORILACIÓN EN MITOCONDRIAS PURIFICADAS DE PULMÓN DE RATA -----	40
	6.2 EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE L-ARG EN EL ESTADO DE ALTA FOSFORILACIÓN EN MITOCONDRIAS PURIFICADAS DE PULMÓN DE RATA -----	43

	6.3 EFECTO DEL L-NAME EN LA CONCENTRACIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO EN EL ESTADO DE ALTA Y BAJA FOSFORILACIÓN EN MITOCONDRIAS PURIFICADAS DE PULMÓN DE RATA -----	46
7.0	DISCUSIÓN -----	49
8.0	CONCLUSIONES -----	53
9.0	BIBLIOGRAFÍA -----	54

INDICE DE FIGURAS

	página
FIGURA 1.- Aparato respiratorio -----	3
FIGURA 2.- Estructura y delimitaciones de la mitocondria -----	8
FIGURA 3.- Transporte de electrones -----	11
FIGURA 4.- Cadena respiratoria -----	12
FIGURA 5.- Potencial de reducción de los complejos respiratorios -----	13
FIGURA 6.- Estructura de la ATP asa -----	14
FIGURA 7.- Reacción general catalizada por la NOS -----	17
FIGURA 8.- Estructura de los diferentes dominios de las óxido nítrico sintasas -----	20
FIGURA 9.- Transporte de electrones por cofactores enzimáticos a través de los dominios reductasa y oxigenasa de la NOS -----	24
FIGURA 10.- Control respiratorio -----	38
FIGURA 11.- Porcentaje de consumo de oxígeno en el Control respiratorio -----	39
FIGURA 12.- Efecto de la concentración de L-arginina en la respiración de mitocondrias en estado de baja fosforilación -----	41
FIGURA 13.- Porcentaje de consumo de oxígeno en un estado de baja fosforilación a diferentes concentraciones de L-arginina -----	42
FIGURA 14.- Efecto de la concentración de L-arginina en la respiración de mitocondrias en estado de alta fosforilación -----	44
FIGURA 15.- Porcentaje de consumo de oxígeno en un estado de alta fosforilación a diferentes concentraciones de L-arginina -----	45
FIGURA 16.- Síntesis de óxido nítrico en estado 4 -----	47
FIGURA 17.- Síntesis de óxido nítrico en estado 3 -----	48

INDICE DE TABLAS

	página
TABLA 1.- Características de las isoformas de las óxido níttrico sintasa -----	23
TABLA 2.- Porcentajes de inhibición obtenidos con diferentes concentraciones de L-arginina en estado de baja fosforilación.-----	40
TABLA 3.- Porcentajes de inhibición obtenidos con diferentes concentraciones de L-arginina en estado de alta fosforilación.-----	43

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico
ADP: Difosfato de adenosina
Ca⁺⁺ : Ión calcio
EDTA: Ácido etilén diamino tetraacético
ERN: Especies reactivas de nitrógeno
FAD: Dinucleótido de flavín adenina
FADH₂ : Dinucleótido de flavín adenina en su forma reducida
FMN: Flavin Mononucleótido.
H⁺ : Próton
H₂O₂: Peróxido de hidrogeno
HClO₄ : Ácido perclórico
kcal : Kilocaloría
KCl: Cloruro de potasio
kDa: Kilodalton
KH₂PO₄ : Fosfato monoácido de potasio
L-NAME: Nitro-L-arginina metil ester
mg: Miligramo
MgCl₂ : Cloruro de magnesio
min: Minutos
ml: Mililitro
mM: Milimolar
mV: Milivolt
NO. : Óxido nítrico
NOS: Óxido nítrico sintasa
NOSe: Óxido nítrico sintasa endotelial.
NOSi: Óxido nítrico sintasa inducible.
NOSmt: Óxido nítrico sintasa mitocondrial
NOSn: Óxido nítrico sintasa neuronal
O₂ .-: Radical superóxido
OH: Grupo hidróxilo
ONOO⁻ : Radical peroxinitrito
pH: Potencial hidrógeno

ROS: Especies reactivas de oxígeno

rpm: Revoluciones por minuto

TES: Medio Tris HCl, EDTA, Sacarosa

THB: Tetrahidrobiopterina

TNF α : Factor de necrosis tumoral alfa

α : Alfa

β : Beta

γ : Gama

μ M: Micromolar

GLOSARIO

ATP: 5' -Trifosfato de adenosina. Nucleótido que es la molécula más importante para la captación y transferencia de energía libre celular.

La hidrólisis de cada uno de los dos enlaces de fosfato anhidro de alta energía del ATP se acompaña con una notable variación de energía libre, de -7 kcal/mol.

Citocromos: Grupo de proteínas coloreadas, que contienen grupos hemo, capaces de transferir electrones durante la respiración celular y la fotosíntesis.

Despolarización: cambio del potencial que suele existir normalmente a través de la membrana plasmática de una célula en reposo, que produce un potencial de membrana menos negativo.

Exón: Segmentos de un gen eucarionte que llega al citoplasma como parte de una molécula de RNAm, RNAr o RNAt.

Fosforilación oxidativa: fosforilación de ADP para formar ATP, debida a la transferencia de electrones al oxígeno (O_2) en bacterias y mitocondrias. El proceso implica la generación de una fuerza de motivo de protones durante el transporte de electrones y la consecuente aplicación para impulsar la síntesis de ATP.

Grupo prostético: molécula orgánica no peptídico o ion metálico, que se fija con fuerza y especificidad a una proteína y es requerida para su actividad, por ejemplo el grupo hemo en la hemoglobina.

Intrón: Parte de una transcripción primaria que se elimina por empalme durante el procesamiento de RNA y no se incluye en los RNAm, RNAr o RNAt funcionales maduros; también se denomina secuencia de intervención.

L-Arg: (L-arginina) L- aminoácido, hidrófilo o soluble en agua tienen cadenas laterales ionizadas o polares. A pH neutro presenta carga positiva. Es uno de los cuatro aminoácidos principales que contribuyen a la carga global de una proteína.

Mitocondria: Organelo de gran tamaño rodeada por dos membranas de bicapa fosfolípida, que contiene DNA y efectúa la fosforilación oxidativa, por lo que produce la mayor parte del ATP de las células eucariotas.

NADH: dinucleótido de nicotina adenina en su forma reducida. Coenzima de amplio uso que transfiere electrones a los portadores que intervienen en la fosforilación oxidativa. Su forma oxidada NAD^+ participa en las reacciones de oxidación aceptando dos electrones de una molécula donante y un H^+ de la solución.

Neumocitos: son las células principales que forman el epitelio alveolar. Hay dos tipos; los neumocitos tipo I (recubren el 95%) del epitelio alveolar, y los neumocitos tipo II (producen la sustancia tensoactiva pulmonar e intervienen en la reconstrucción del epitelio alveolar cuando las células de tipo I han sido destruidas).

Neurotransmisor: molécula señal extracelular que es liberada por la neurona presináptica en una sinapsis química y transfiere la señal a la célula postsináptica. La respuesta generada por un neurotransmisor puede ser excitatoria o inhibitoria, y es determinada por el receptor de la célula postsináptica.

Nitración: La nitración es un [proceso químico](#) general para la introducción de un [grupo nitro](#) en un [compuesto químico](#) mediante una [reacción química](#).

Óxido nítrico: es una molécula en estado gaseoso que tiene función de segundo mensajero y neurotransmisor producido a partir de la L-arginina. Se identificó originalmente como un agente de transducción de señal en la vasodilatación de las células vasculares endoteliales y del músculo liso subyacente.

Porinas: son una clase de proteínas transmembrana .Son trímeros de subunidades idénticas .En cada subunidad, 16 hebras β forman una estructura con forma de barril, con un poro en el centro.

S-nitrosilación: Proceso químico en el cual el grupo sulfhidrilo de una molécula es oxidado por una especie reactiva de nitrógeno, como el peroxinitrito.

Succinato oxidasa: Enzima que se localiza en la membrana interna mitocondrial. Oxida una molécula de succinato a fumarato en el ciclo del ácido cítrico.

Sustrato: Molécula que sufre modificaciones a través de una reacción catalizada por una enzima

Transducción de señales: Conversión de una señal de una forma física o química en otra. Proceso de secuencias iniciado por la fijación de una señal extracelular a un receptor y que culmina en una o más respuestas celulares específicas.

Vasodilatación: Es la capacidad de los vasos sanguíneos ([arterias](#) y [venas](#))de dilatarse frente a estímulos químicos.

RESUMEN

En los últimos años a la molécula de óxido nítrico se le ha atribuido su participación en muchos procesos fisiológicos, tales como la neurotransmisión, la vasodilatación, la respuesta inmune y en la **regulación de la respiración mitocondrial**. Para efectos del presente trabajo nos centraremos en el estudio del óxido nítrico producido por la enzima NOSmt en mitocondrias aisladas de pulmón de rata.

Se demostró que la adición del sustrato utilizado por la NOSmt, la L-arginina (50 μ M) en mitocondrias de pulmón de rata puede inhibir la respiración en los estados 4 (estado de baja fosforilación) y 3 (estado de alta fosforilación). Mientras que el inhibidor competitivo de la NOSmt (L-NAME 10 mM) mostró una disminución en la concentración de óxido nítrico mitocondrial en un estado de baja fosforilación. Nuestros resultados sugieren que el óxido nítrico juega un papel importante en la regulación de la respiración mitocondrial.

1 ANTECEDENTES

1.1 ANTECEDENTES ANATÓMICOS Y FISIOLÓGICOS

El aparato respiratorio esta constituido por las vías respiratorias superiores e inferiores, la primera consta de las fosas nasales y la faringe, la segunda esta formada por la laringe, la tráquea, los bronquios, sus ramificaciones y los pulmones (Wasserthal, 1998).

El pulmón es un órgano par, rodeado por la pleura. Son los miembros más importantes del aparato respiratorio, tienen aspecto de cono, formados por un tejido esponjoso de color rosa grisáceo y ocupan la mayor parte del tórax (Milanés y Fernández,)

Los pulmones se componen de lóbulos; el derecho tiene tres (superior, medio e inferior) y el izquierdo tiene dos (superior e inferior). Cada lóbulo pulmonar recibe una de las ramas bronquiales que se dividen en segmentos, los que a su vez están constituidos por infinidad de lobulillos pulmonares (Milanés y Fernández)

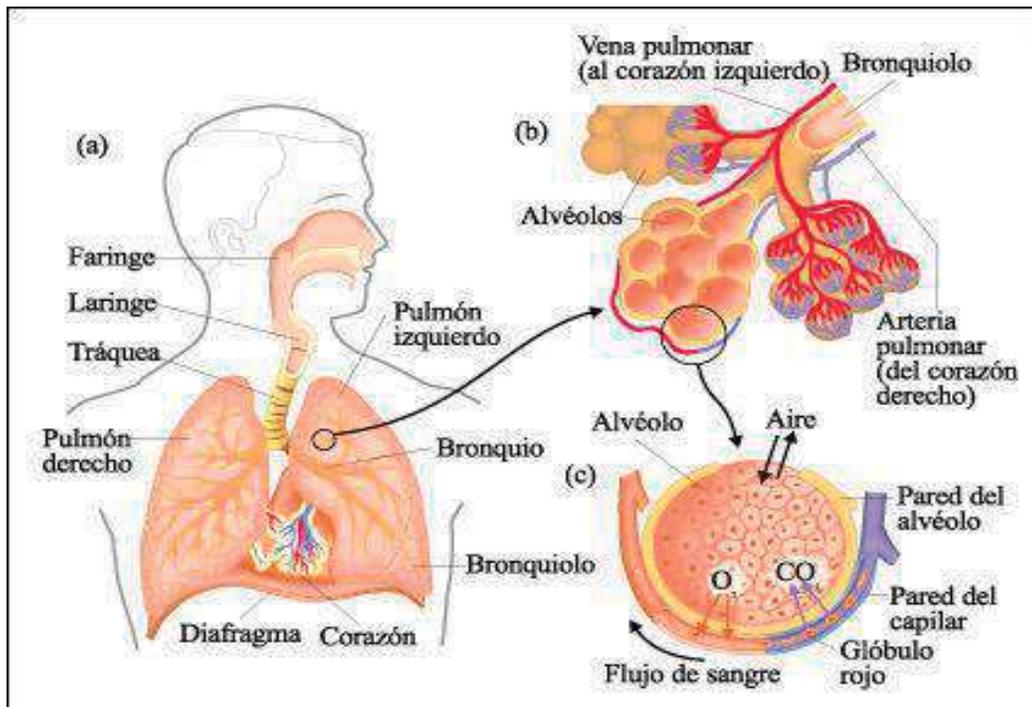


Fig. 1. Se ilustran los componentes que integran al aparato respiratorio. Se puede observar que la función de los alvéolos es la de permitir el intercambio de oxígeno y bióxido de carbono a través de la sangre (http://wwwnutrigage.blogspot.com/2008_11_01_archive.html).

Los órganos respiratorios sirven para el transporte del oxígeno a la sangre y por medio de ella a los tejidos, así como para la expulsión al aire atmosférico del bióxido de carbono (Wasserthal, 1998).

La función de los pulmones es realizar el intercambio gaseoso con la sangre, por medio de los alvéolos los cuales están en estrecho contacto con los capilares. Los alvéolos no son más que sacos de aire pequeños de 200 μm de diámetro, formando estos la unidad funcional

respiratoria, sus paredes delgadas permiten el intercambio de O_2 y CO_2 (Figura 1). Dichas paredes están compuestas por un epitelio escamoso simple formado por 2 tipos de células: Los Neumocitos tipo I o Células Alveolares escamosas, y los Neumocitos tipo II o Células Réptales ⁽¹⁶⁾.

Los Neumocitos tipo I recubren el 95% de la superficie Alveolar, poseen escaso citoplasma y este es de característica fina, lo que permite la difusión gaseosa. Los Neumocitos Tipo II recubren el 5 % de la superficie alveolar y poseen mayor cantidad de organelos. Estos pueden sufrir mitosis y regenerar los neumocitos tipo I ⁽¹⁶⁾.

Los neumocitos tipo II juegan un papel crítico en la función y mantenimiento normal de los pulmones, tal vez el papel más importante que desempeñan estas células es la síntesis de surfactante pulmonar, el cual es una mezcla de lípidos y proteínas que se encuentra en la superficie alveolar y previene su colapso al reducir la tensión superficial entre la interfase aire- líquido (Miles y col., 1996).

1.2 HISTÓRICOS

A través de los años muchos investigadores han realizado grandes aportaciones a la bioquímica, permitiendo la comprensión de muchos mecanismos celulares y moleculares. Para efectos de esta tesis nos enfocaremos a aquellos investigadores que estudiaron los orgánulos subcelulares productores de energía: las mitocondrias.

En 1934 Bensley intentó aislar mitocondrias a partir de células de hígado, mediante procedimientos de congelación y descongelación, usando la centrifugación diferencial, este fue el primer esfuerzo que se realizó para aislar mitocondrias.

En 1940 Claude incorporo un proceso mecánico suave para romper células, utilizando un homogenizador Potter Embden. Claude y sus colaboradores que aislaban gránulos de homogenizados de hígado mediante el empleo de centrifugación diferencial, observaron la apariencia, el tamaño y la sensibilidad osmótica a través de micrografías electrónicas y además encontraron que algunos orgánulos tenían actividad de citocromo oxidasa y succinato oxidasa.

En 1948 Hogeboom y Schneider y el citólogo Palade aislaron mitocondrias íntegras gracias a la inclusión de sacarosa en la soluciones.

De 1948 a 1951 Albert Lehninger localizó las enzimas del ciclo de Krebs, las enzimas de la β -oxidación, de la oxidación de los cuerpos cetónicos y de la fosforilación oxidativa en la mitocondria. Así mismo Lehninger y Col demostraron que el NADH es el verdadero sustrato de la fosforilación oxidativa.

Chance, Green, Lardy y Lehninger localizaron los tres sitios de la fosforilación oxidativa entre NADH y citocromo b el sitio I, entre citocromo b reducido y citocromo c el sitio II y entre el citocromo c y el oxígeno el sitio III.

Chance y Williams introdujeron métodos polarigráficos para la medición del consumo de oxígeno en mitocondrias.

En 1978 Peter Mitchell ganó el Premio Nobel de Química por su teoría quimiosmótica.

1.3 BIOQUÍMICOS

1.3.1. ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LA MITOCONDRIA

Las mitocondrias son orgánulos subcelulares que se encuentran en las células eucariontes. Su tamaño es en promedio de $1\mu\text{m}$ de largo y $0.5\mu\text{m}$ de diámetro. Las mitocondrias están constituidas por dos membranas, la membrana externa, la cual es bastante permeable, permite el paso de varias sustancias a través de las porinas y contiene receptores de las proteínas de importación ⁽⁹⁾. La membrana externa está en contacto con el citoplasma y constituye un saco cerrado que, a su vez, contiene la membrana interna, esta es altamente impermeable, se caracteriza por invaginaciones denominadas crestas, en donde se encuentran alojados los complejos proteicos que participan en la fosforilación oxidativa y en los procesos de transporte de electrones ^(4, 9). La matriz mitocondrial es un espacio en donde se encuentra el ADN mitocondrial y la maquinaria necesaria para la replicación, la transcripción y la síntesis de proteínas ⁽⁹⁾

Además contiene una gran cantidad de enzimas solubles, que participan en fenómenos metabólicos de gran importancia, como son el ciclo de Krebs y la oxidación de ácidos grasos ⁽⁹⁾.

Entre la membrana interna y la externa queda definido un espacio que se continúa dentro de las crestas, que se denomina espacio intermembranas o espacio intercrestal. En este espacio se mantiene un gradiente electroquímico que impulsa la síntesis de ATP (Álvarez y col., 1994).

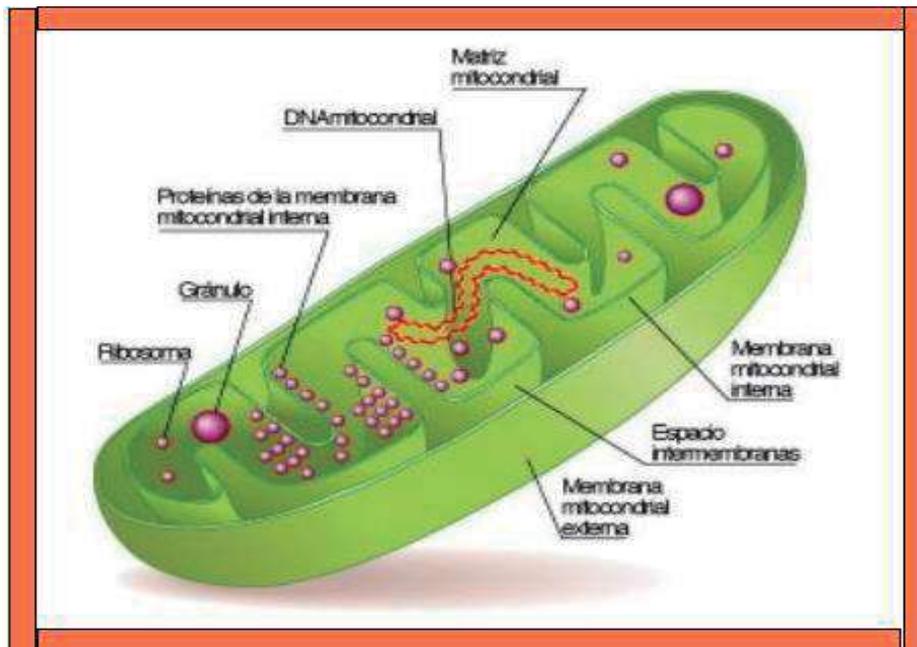


Fig.2. Se muestran las diferentes estructuras y delimitaciones que conforman a la mitocondria. (www.profesorenlinea.cl/Ciencias/Celula.htm)

1.3.2. CADENA RESPIRATORIA Y TRANSPORTE DE ELECTRONES

La cadena transportadora de electrones esta constituida por grupos prostéticos oxidorreductores: grupos hemo (a, b, c1 y c), grupos fierro- azufre (FeS), mononucleótidos de flavina (FMN), flavín adenín dinucleótidos (FAD) y átomos de cobre (CuA, CuB) los cuales siempre están asociados a estructuras proteicas, de forma covalente y no covalente ⁽⁹⁾.

La cadena respiratoria comprende cuatro complejos proteicos y una ATP sintasa. Los complejos proteicos se denominan complejo I (NADH: ubiquinona oxidorreductasa), complejo II (succinato: ubiquinona oxidorreductasa), complejo III (ubiquinol: citocromo c oxidorreductasa), complejo IV (citocromo c oxidasa); los electrones fluyen a través de la cadena de transporte de electrones desde el NADH, el succinato y el FADH₂, hasta el oxígeno, mediante una secuencia de transportadores con un menor potencial de reducción a aquellos con un potencial mayor, de tal forma que al ir incrementando dicho potencial, también aumenta la facilidad de oxidarse y perder electrones (Fig. 5), manteniendo así el flujo de electrones a través de los complejos respiratorios. La energía liberada es suficiente para impulsar el bombeo de protones a través de la membrana y mantener una fuerza protón-motriz capaz de impulsar la síntesis de ATP.

1.3.2.1. COMPLEJO I (NADH: ubiquinona oxidorreductasa)

El complejo I es una proteína relativamente grande (907 kDa). Compuesto de 41 subunidades diferentes, por tal motivo es la proteína más compleja de la cadena respiratoria ⁽⁹⁾. Este complejo cataliza la transferencia electrónica desde el NADH hasta la ubiquinona, acoplado a la translocación vectorial de protones (Fig. 3).

El complejo I contiene las coenzimas FMN, dos centros binucleares FeS, cuatro centros FeS tetranucleados y dos especies distintas de ubisemiquinonas fuertemente unidas ⁽⁹⁾. (Fig. 4)

1.3.2.2. COMPLEJO II (succinato: ubiquinona oxidorreductasa)

Este complejo tiene una participación dual: participa como una enzima del ciclo de Krebs y como complejo de la cadena respiratoria. Este complejo cataliza la oxidación de succinato a fumarato, y transfiere los electrones directamente a la ubiquinona de la cadena respiratoria. Este es el único complejo que no es una bomba de protones (Fig. 3).

Este complejo contiene un dominio hidrofílico catalítico formado por dos subunidades, que contiene una molécula FAD y tres centros FeS. También presenta un dominio membranal compuesto por dos subunidades que tienen un hemo b, el cual confiere la reactividad de la enzima con la ubiquinona ⁽⁹⁾.

(Fig. 4)

1.3.2.3. COMPLEJO III (ubiquinol: citocromo c oxidorreductasa)

También conocido como complejo bc₁, cataliza la oxidación del ubiquinol y la reducción del citocromo c soluble.

En mamíferos superiores este complejo de 240 kDa está compuesto de 11 polipéptidos diferentes. El flujo de electrones a través de este complejo también está acoplado a la translocación de protones de la matriz mitocondrial al espacio intermembranal ⁽⁹⁾. (Fig. 3)

1.3.2.4. COMPLEJO IV (citocromo c oxidasa)

Este es el componente terminal de la cadena respiratoria. Transfiere electrones desde el citocromo c reducido hasta el oxígeno y contribuye también a generar el gradiente electroquímico de protones ⁽⁹⁾ (Fig. 3).

Los centros de óxido reducción implicados en la transferencia de electrones son dos grupos prostéticos hemo tipo a, denominados a y a₃, dos centros de cobre denominados CuA y CuB (Fig. 4), así como un átomo de magnesio, un átomo de zinc y tres moléculas de fosfatidil glicerol ⁽⁹⁾.

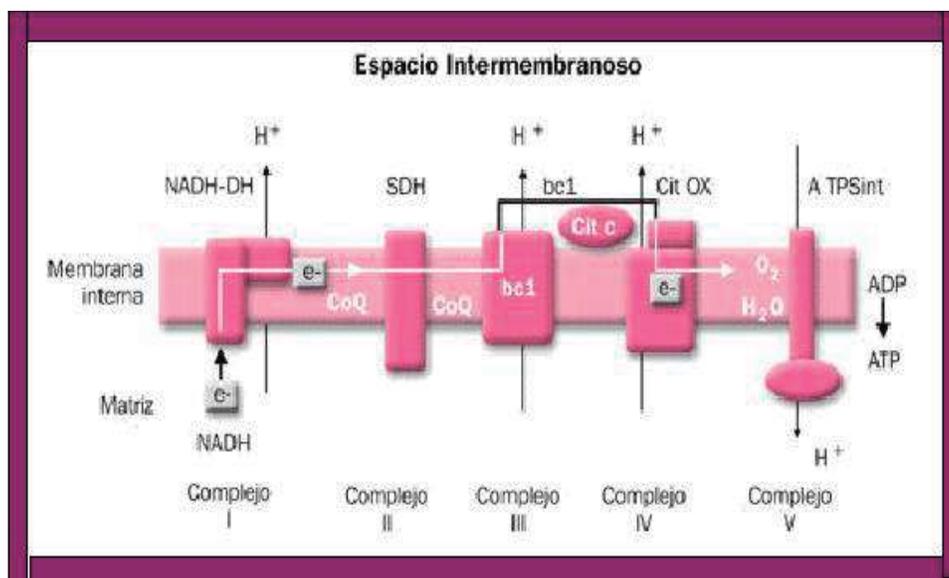


Fig. 3. Se ilustra el transporte de electrones a través de los cuatro complejos respiratorios, también se muestra el bombeo de protones para generar el gradiente electroquímico, el cual esta acoplado a la síntesis de ATP por la ATP sintasa. (Extractos de la "Second Conference of the International Coenzyme Q₁₀ Association". Frankfurt, Alemania, Diciembre 1-3, 2000)

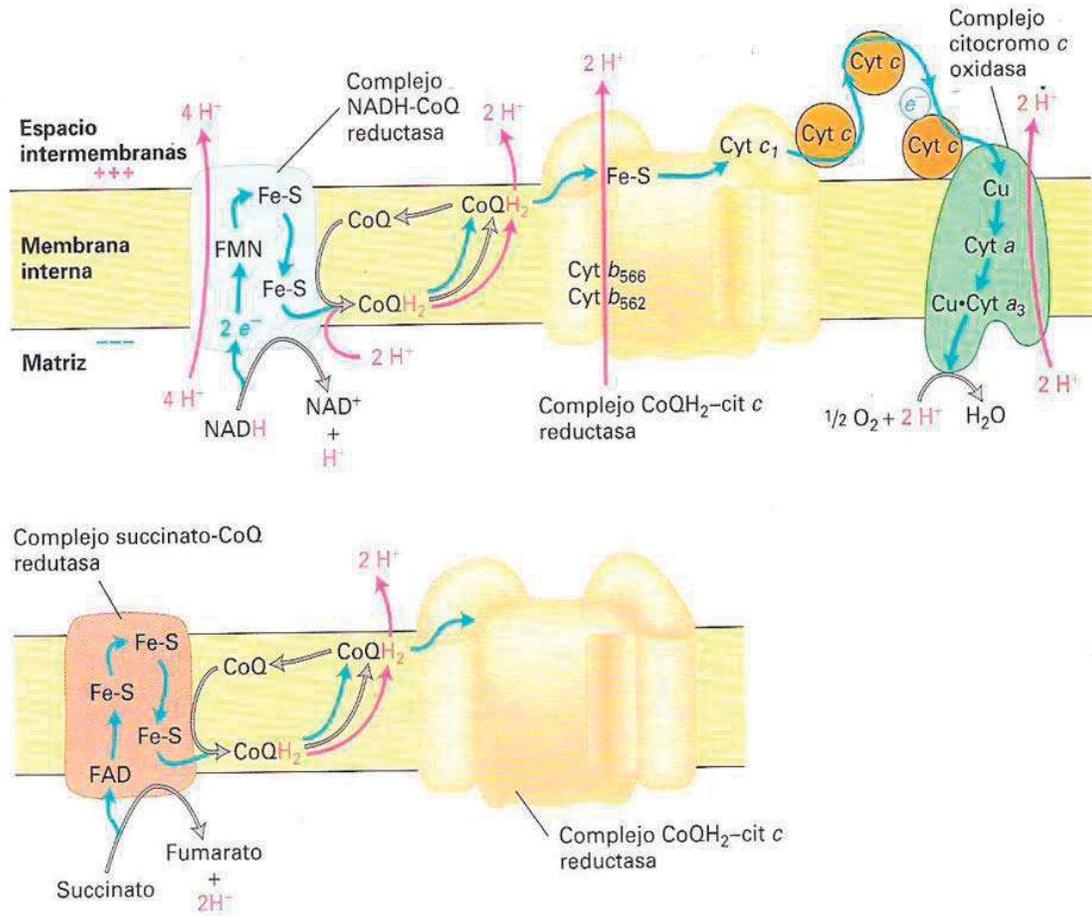


Fig. 4 . En esta imagen se muestran los centros de óxido reducción que participan en cada complejo de la cadena respiratoria durante el transporte de electrones. (Lodish y col. 2002)

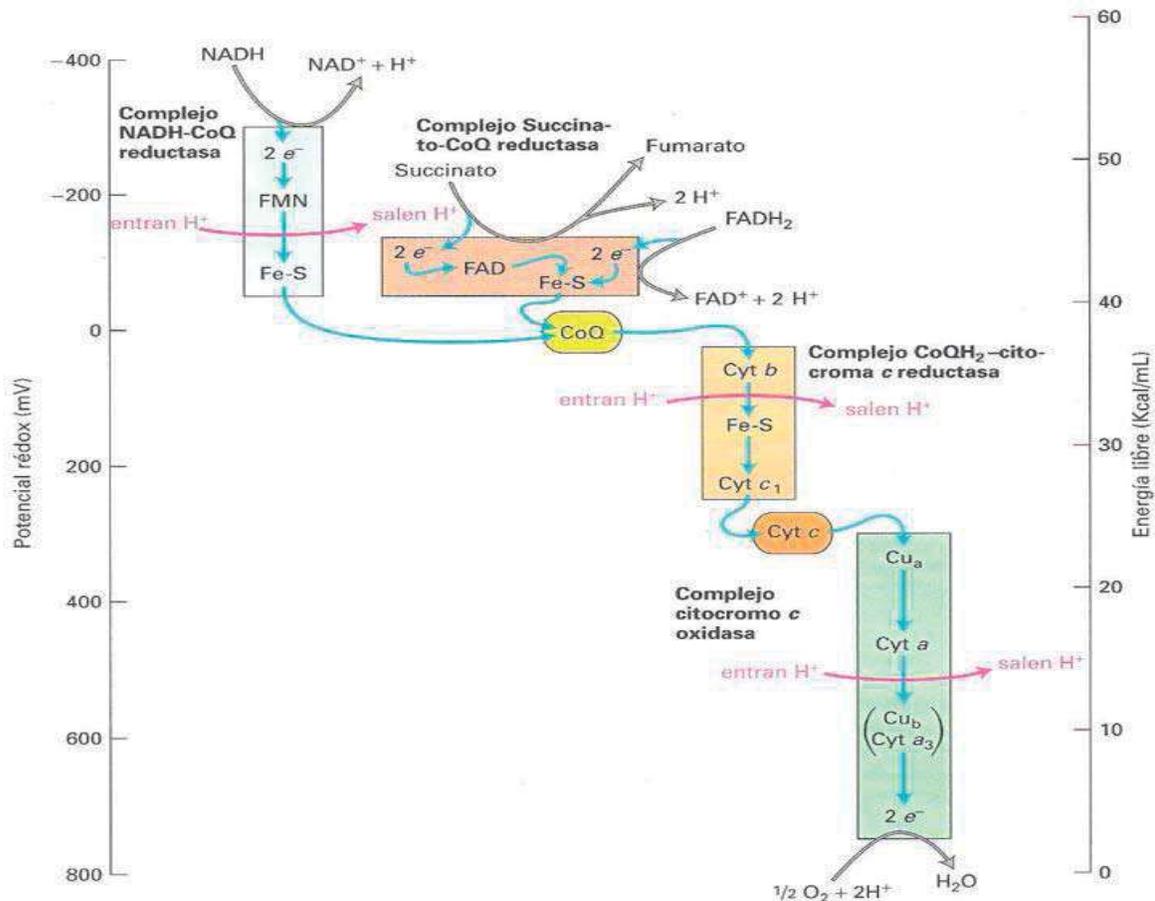


Fig. 5. Flujo gradual de los electrones a través de la cadena de transporte de electrones desde el NADH, el succinato y el FADH₂, hasta el oxígeno. Los electrones pasan en secuencia de transportadores con un menor potencial de reducción a aquellos con un potencial mayor (más positivo). La escala de energía libre muestra la correspondiente reducción de esta energía. La energía liberada es suficiente para impulsar el bombeo de protones a través de la membrana, estableciendo una fuerza protón-motriz (Lodish, y col. 2002).

1.3.2.5. ATP SINTASA

Esta enzima aprovecha el gradiente electroquímico generado por la cadena respiratoria para fosforilar el ADP y transformarlo en ATP ⁽⁹⁾. Este complejo consta de dos proteínas oligoméricas denominadas F₀ y F₁. El complejo F₀ está ubicado dentro de la membrana interna y contiene un canal transmembrana a través del cual fluyen los protones hacia F₁. Posee tres tipos de subunidades: a, b y c. El complejo F₁ está constituido por cinco polipéptidos bien definidos, con una composición $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$ (Fig. 6). Este complejo cataliza la síntesis de ATP pero también es capaz de catalizar su hidrólisis (Lodish y col., 2002).

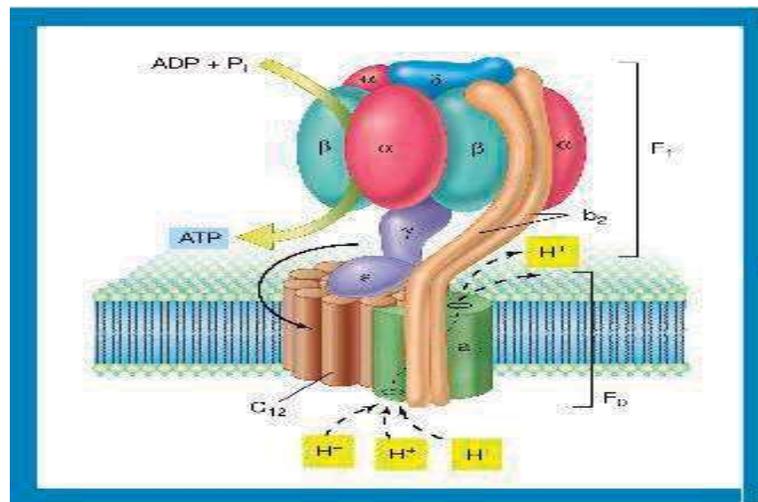


Fig. 6. Se ilustran las diferentes subunidades de proteína que conforman la ATP sintasa, así como el flujo de protones que ingresa desde la subunidad F₀, el cual coadyuva a la síntesis de ATP a partir de ADP y P_i. (www.ugr.es/%7Eeianez/Microbiologia/10energia.htm)

1.3.3 FOSFORILACIÓN OXIDATIVA

La fosforilación oxidativa es la transferencia de los equivalentes reducidos NADH, NADPH, FADH, obtenidos durante el metabolismo celular, hasta el oxígeno molecular, acoplado con la síntesis de ATP. En este proceso metabólico están implicadas las enzimas de la cadena respiratoria que catalizan varias reacciones de óxido-reducción, donde el oxígeno es el aceptor final de electrones y donde se forma finalmente agua.

La hipótesis quimio-osmótica de Peter Mitchell (1961), puede explicar la síntesis de ATP tanto en cloroplastos como en mitocondrias. La cual es un mecanismo de conservación de energía a través de las membranas biológicas, que se basa en la orientación asimétrica de los transportadores de electrones en el interior de la membrana interna de la mitocondria, lo que permite una transferencia de protones (H^+) desde la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembranal. Como la membrana interna de la mitocondria es impermeable a los protones (H^+), se establece un gradiente electroquímico de protones o fuerza protón-motriz, este gradiente es utilizado por la mitocondria para sintetizar ATP, la síntesis se lleva a cabo cuando los protones pasan a través del canal transmembrana del complejo F_0 de la ATP sintasa ⁽¹⁵⁾.

2. ÓXIDO NÍTRICO

El $\text{NO}\cdot$ es un gas incoloro, moderadamente soluble en el agua, siendo mucho más soluble en solventes apolares tal como el N-hexano, tendiendo a disolverse en las fases lipídicas de las células por ser altamente lipofílico ⁽²⁾.

El óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$) es un radical libre diatómico, de vida media corta, entre 1 y 10 segundos, y es sintetizado a partir de una reacción catalizada por la óxido nítrico sintasa (NOS), la cual cataliza la oxidación de L-arginina a citrulina y $\text{NO}\cdot$ en cantidades equimolares (Fig. 7). El óxido nítrico está implicado en muchos procesos fisiológicos, tales como la neurotransmisión, la vasodilatación, en la inhibición plaquetaria, la respuesta inmune y en la regulación de la respiración de mitocondrias ^(25, 26).

Existen diferentes isoformas de la NOS: la NOS_n, la NOS_e (denominadas óxido nítrico sintasa neuronal y endotelial, respectivamente) estas se expresan de manera constitutiva; la NOS_i (óxido nítrico sintasa inducible), la cual es sintetizada en respuesta a estímulos inmunológicos o inflamatorios; la NOS_{mt} (óxido nítrico sintasa mitocondrial), la cual se piensa que es una forma modificada postraducciona de la NOS_n (Saavedra-Molina y Cortés-Rojo, 2004).

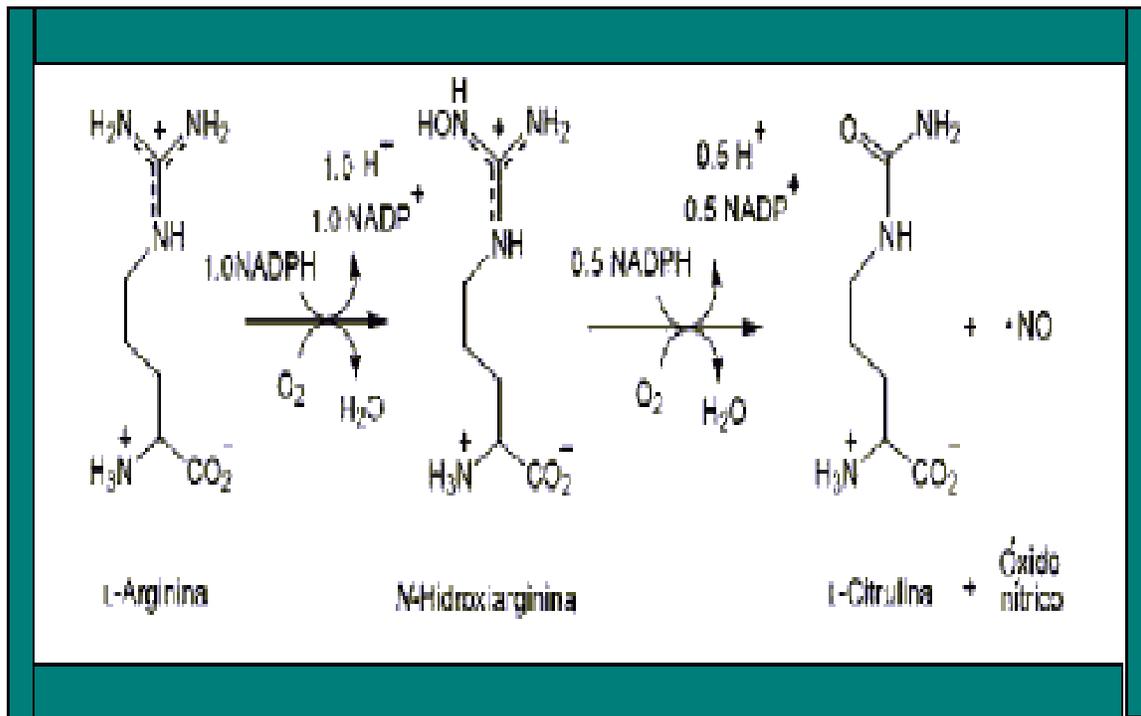


Fig. 7. Reacción general catalizada por la NOS. La NOS cataliza la oxidación del grupo guanidino de la L-arginina produciendo un intermediario de N-hidroxi-L-arginina, dando como productos L-citrulina y óxido nítrico (Saavedra-Molina y Cortés-Rojó, 2004).

En la síntesis de $\text{NO}\cdot$ por la acción de la NOS en células de mamíferos intervienen 5 electrones del nitrógeno guanidino de la L-arginina, 1.5 moles de NADPH y 2 de oxígeno molecular por cada mol de $\text{NO}\cdot$ formado. La reacción requiere además THB, FAD, FMN, iones Ca^{2+} , calmodulina y grupos hemo como cofactores (Fig. 9). La reacción consiste en dos actos separados de monooxigenación, consistiendo el primer acto en la incorporación de un átomo de oxígeno al substrato, a la vez que otro átomo se reduce hasta agua, obteniéndose la N-

hidroxi-L-arginina como producto intermedio. El segundo acto cuenta con que un electrón de la NADPH, otro de la N-hidroxi-L-arginina y el oxígeno molecular-hierro atacan al carbono guanidino de la N-hidroxi-L-arginina, facilitando la incorporación de O_2 y la escisión de enlace C-N, liberando un átomo de nitrógeno y dando lugar a L-citrulina. Además, en esta segunda reacción un átomo de O_2 se reduce hasta agua y otro se une al nitrógeno para formar el $NO\cdot$. Esta producción de $NO\cdot$ puede ser atenuada por diferentes inhibidores de la NOS derivados de la L-arginina ⁽²⁾.

2.1 ISOFORMAS DE LA NOS

La NOS_n, es una proteína homodimérica de 1434 aminoácidos, con un peso molecular de 161 KDa por monómero. El gen que la codifica se localiza en el cromosoma 12 en la región 12q24.2 en el humano y es uno de los más complejos que se conoce. La secuencia codificante está repartida en 29 exones, 28 intrones y el gen puede ser transcrito a partir de cinco promotores alternativos, confiriéndole la posibilidad de ser activado ante diversos estímulos (Alderton y Cooper, 2001).

La NOS_n también se ha localizado en fibras nerviosas de las capas adventicias y externas de los vasos largos, donde es almacenada junto con el neuropéptido vasoactivo intestinal.

También se han encontrado cantidades variables de la NOSn en el músculo esquelético y en los neutrófilos (Carreras y Riobo, 1994)

La NOSe es una proteína que contiene 1203 aminoácidos, con un peso molecular de 133 KDa, comparte el 52% de la secuencia de aminoácidos con la NOSn. El gen que la codifica se encuentra en el cromosoma 7 en la región 7q35-q36 en el humano, el mismo gen que codifica a la citocromo P450 reductasa. La secuencia codificante contiene 26 exones y 25 intrones.

La NOSe se localiza en el endotelio y en las células epiteliales; se piensa que la localización de la NOSe en la membrana plasmática podría tener alguna función en la transducción de señales.

La actividad de la NOSe es totalmente dependiente de la concentración de calcio dentro de un rango entre 100 – 500 nM, y parece ser mediada por calmodulina a semejanza que la NOSn ^(3, 7).

La NOSi es un polipéptido que contiene 1153 aminoácidos, con un peso molecular de 131 KDa, el cual es activo en su forma dimérica. El gen de la NOSi humana se localiza en la región 17q11.2-q12 del cromosoma 17 y consiste de 26 exones, 25 intrones y una región promotora que contiene secuencias de unión de receptores del factor nuclear kappa B (NF-kB), interleucina 6, elemento de respuesta al hierro (IRE), lipopolisacáridos, interferon gamma, TNF alfa. Estos activadores pueden actuar sinérgicamente y producir niveles de NO-citotóxicos en macrófagos. ^(3, 7)

En la figura 8 se observa la estructura de los dominios de las óxido nítrico sintasas, sus cofactores, y la región de la cadena polipeptídica en que se encuentran sus componentes estructurales.

ESTRUCTURA DE LOS DIFERENTES DOMINIOS DE LAS NOSs

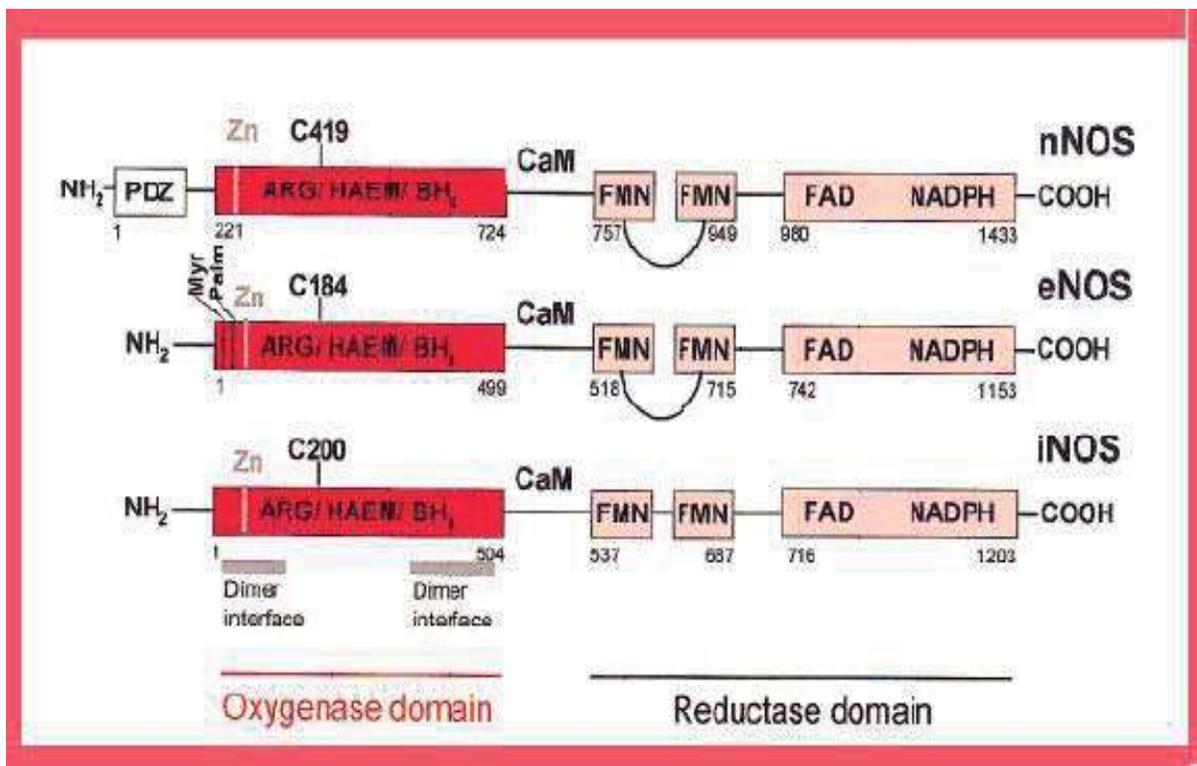


Fig. 8. Los dominios oxigenasa, reductasa y PDZ (proteína postsináptica), son ilustrados por recuadros, el número de aminoácido correspondiente al inicio de cada dominio se muestra. Un residuo de cisteína liga el grupo hemo y el sitio de unión de la calmodulina es indicado para cada isoforma, así como también se muestran los sitios de miristilación y palmitoilación y la localización del zinc ligado a cisteína (Alderton y Cooper, 2001).

Las tres isoformas de la NOS contienen un dominio carboxi-terminal homólogo al citocromo P450, con una flavina como grupo prostético, y un dominio amino terminal con un grupo heme como grupo prostético. Estos dominios terminales están conectados por un tercer dominio, que es afín a calmodulina. La unión de la calmodulina a la NOS parece ser el "interruptor molecular" que permite el flujo de electrones desde el dominio reductasa hacia el grupo heme, permitiendo la transformación del O_2 y L-arginina en $NO\cdot$ y L-citrulina (Kelly y col., 1996). Las isoformas constitutivas NOS_n y en la NOS_e se encuentran inactivas hasta que aumenta el calcio intracelular. Por ejemplo, en las células endoteliales, la acetilcolina, la bradiquinina, el ADP o el estrés de roce son capaces de iniciar la señal que incrementa el calcio celular, el cual regula la unión de calmodulina a su dominio, iniciando la síntesis de NO . Cuando la calmodulina se une a la enzima, los electrones donados por el NADPH fluyen desde el dominio reductasa hacia el dominio oxigenasa y son aceptados por el citocromo C y otros aceptores de electrones (figura 4). En contraste, en la isoforma inducible (NOS_i , o independiente de calcio), la calmodulina permanece fuertemente unida, aún a bajas concentraciones de calcio, actuando esencialmente como una subunidad más (Kelly y col., 1996). En este caso, los electrones donados por el NADPH son transportados por el FAD y por FMN hacia el grupo heme. En estas condiciones, la NOS_i cataliza la producción de una mezcla de aniones superóxido (O_2^-) y de $NO\cdot$ en altas cantidades, produciendo peroxinitritos ($ONOO^-$), con capacidad para producir citotoxicidad. En ausencia de THB, la NOS genera H_2O_2 , O_2^- y $NO\cdot$ (Ferrer y col., 1998; Moncada y col., 1997). Se ha demostrado que la NOS de macrófagos es inducible. Los macrófagos no estimulados no tienen la enzima, pero la activación de la célula se acompaña de la aparición irreversible de la enzima NOS_i . Es decir, la producción de la NOS_i es regulada transcripcionalmente (presencia o ausencia); mientras que

la forma NOSe (presente, en endotelio vascular) es regulada en relación con su actividad (siempre está presente, pero puede estar mas o menos activa).

La enzima constitutiva endotelial (NOSe) tiene un sitio de miristilación, capaz de unirse a un ácido graso. Esto le permite asociarse a la membrana lipídica de las células, a diferencia de las otras isoformas, que no tienen este brazo lipídico, y en consecuencia, son hidrosolubles y se encuentran libres en el citoplasma. Se cree que la asociación de la NOSe a la membrana facilita que el NO formado esté más cercano al exterior celular y en consecuencia difunda más rápidamente hacia la sangre y hacia el músculo liso adyacente (Gosgnach y col., 1999).

En los últimos años se ha demostrado la existencia de un cuarto tipo de NOS, la **NOSmt** localizada en la membrana interna de las mitocondrias, en proximidad con los complejos de la cadena respiratoria, sugiriendo que esta isoforma es estructuralmente similar a las otras isoformas de la NOS. ⁽⁷⁾

En la siguiente tabla se engloban los parámetros estructurales, la localización celular y la función fisiológica de las isoformas de las Oxido Nítrico Sintetas.

PARÁMETROS ENZIMÁTICOS Y ESTRUCTURALES	HOMODÍMEROS ACTIVOS			
	NOSn (I) neuronal	NOSe (III) endotelial	NOSi (II) inducible	NOSmt mitocondrial
Masa molecular	160 kDa	135 kDa	125-130 kDa	127 kDa
Inducibilidad	Constitutiva	Constitutiva	Inducible	Constitutiva
Unión de Calmodulina (CaM)	$\sim 30 \times 10^{-9}$ M	$\sim 30 \times 10^{-9}$ M	$\gg 30 \times 10^{-9}$ M	$\sim 30 \times 10^{-9}$ M
Cofactores	FMN, FAD, BH ₄ , HEMO, Zn	FMN, FAD, BH ₄ , HEMO, Zn	FMN, FAD, BH ₄ , HEMO, Zn	FMN, FAD, BH ₄ , HEMO, Zn
Sustratos	NADPH, L-arg, O ₂	NADPH, L-arg, O ₂	NADPH, L-arg, O ₂	NADPH, L-arg, O ₂
Variantes proteicas	Isoformas $\alpha, \beta, \gamma, \mu$	-----	-----	-----
Localización celular	Citosol	Membrana plasmática	Citosol	Membrana interna mitocondrial
Modificación post-traducciona	Presenta sitios de fosforilación	Presenta sitios de palmitoilación, fosforilación y miristoilación	Presenta sitios de fosforilación	Presenta sitios de fosforilación y miristoilación
Función fisiológica	Neurotransmisión	Vasodilatador	Citotoxicidad	Regulador de la citocromo oxidasa
Papel en la enfermedad	Distrofia muscular ataque, daño de isquemia-reperusión	Disfunción endotelial hipertensión	Choque tóxico inflamación	Apoptosis

Tomada y modificada de Elfering (81).

TABLA 1. Características de las isoformas de las Óxido Nítrico Sintetas. (Saavedra-Molina y Cortés-Rojo, 2004)

TRANSPORTE DE ELECTRONES POR COFACTORES ENZIMÁTICOS A TRAVÉS DE LOS DOMINIOS REDUCTASA Y OXIGENASA DE LA NOS

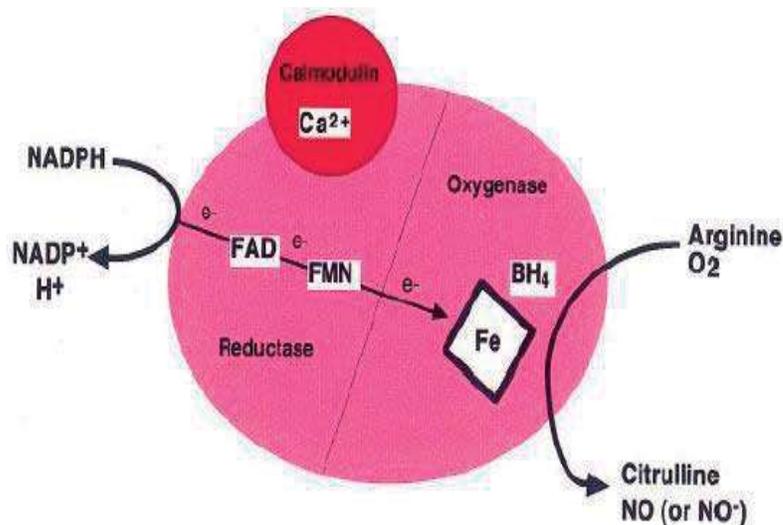


Fig. 9. Los electrones son donados por el NADPH hacia el dominio reductasa de la NOS. Los transportadores FAD Y FMN dirigen los electrones hacia el dominio oxigenasa, en donde interactúan con el hierro del grupo heme y con la BH₄ en el sitio de catálisis de la reacción del oxígeno con L-arginina, generando citrulina y NO como productos. El flujo de electrones a través del dominio reductasa requiere de la presencia de un puente calcio-calmodulina (Alderton y Cooper, 2001).

2.2 INHIBIDORES DE LA NOS

Como inhibidores de la actividad de la NOS, hemos de señalar a dos compuestos, la N-monometil-L-arginina (L-NMMA) y la N-N-dimetil-L-arginina asimétrica (L-ADMA). Otros inhibidores como la N-nitro-L-arginina (L-NNA), su ester la N-nitro-L-arginina metil ester (L-NAME) y la N-iminoetil-L-ornitina (L-NIO) pueden inhibir a las isoformas constitutivas de la NOS, mientras que la N-amino-L-arginina y la aminoguanidina inhiben la NOSi de una manera selectiva ⁽²⁾

Todos estos compuestos suelen inhibir la actividad de las enzimas NOS de manera competitiva y la exposición de estas enzimas al inhibidor L-NMMA durante un tiempo prolongado provoca una desactivación irreversible de la enzima por alquilación ⁽²⁾

2.3 EFECTOS DEL ÓXIDO NÍTRICO EN LA MITOCONDRIA

Se ha visto que el $\text{NO}\cdot$ puede inhibir las funciones mitocondriales de muchas células, la forma en que este radical actúa, es debido a que las proteínas que componen la cadena respiratoria de las mitocondrias contienen grupos prostéticos como el grupo hemo (a,b,c₁ y c), centros fierro-azufre y átomos de cobre (Cu_A y Cu_B) por tal motivo, el óxido nítrico formado por la NOSmt puede reaccionar con estos grupos prostéticos y alterar su actividad ^(14,25).

El NO desenergiza a la mitocondria, dando como resultado un desequilibrio en la homeostasis del calcio citosólico (Takeharal y col., 1996).

El calcio es una de las principales señales intracelulares. Modula varios procesos biológicos esenciales, tales como la proliferación, la diferenciación, el metabolismo, la excitosis y la contracción muscular. El calcio participa tanto en señales de vida como de muerte, de tal manera que un desequilibrio en su homeostasis podría promover la apoptosis celular (Martínez y col., 2002).

El blanco más sensible para el $\text{NO}\cdot$ en la cadena respiratoria es la citocromo c oxidasa (COX o complejo IV), donde se ha visto que el $\text{NO}\cdot$ compite con el O_2 con su sitio de unión ^(25,26).

El $\text{NO}\cdot$ puede reaccionar con los grupos sulfhidrilo de los residuos de cisteína mediante S-nitrosilación y también con los grupos OH de residuos de tirosina mediante nitración. Estos eventos sugieren que el óxido nítrico puede actuar a nivel mitocondrial mediante la formación de especies reactivas de nitrógeno.

Debido a que el óxido nítrico posee un electrón desapareado, es capaz de reaccionar con el oxígeno molecular (O_2) y el superóxido ($\text{O}_2\cdot^-$). De hecho, estas reacciones parecen estar

implicadas en la química de su citotoxicidad. La reacción del $\text{NO}\cdot$ con O_2 resulta en la generación de oxidantes reactivos tales como el dióxido de nitrógeno (NO_2) y el trióxido de dinitrógeno (N_2O_3). Se ha propuesto que el dióxido de dinitrógeno inicia la lipoperoxidación y causa la ruptura de las cadenas de ADN (Gordsdorf y Appel, 1990).

Las especies nitrosantes como el N_2O_3 , pueden reaccionar con tioles o aminas, lo que altera proteínas, formando nitrosaminas carcinogénicas, o desaminar nitrosativamente las bases del ADN. ^(8, 14)

Asimismo la reacción del $\text{NO}\cdot$ con el $\text{O}_2^{\cdot-}$ produce el radical peroxinitrito ($\text{ONOO}\cdot$), el cual es un potente oxidante al que se le atribuye el daño al complejo I debido a la nitración de la tirosina que conforma a este complejo y a la s-nitrosilación de sus grupos tiol. ⁽²⁴⁾ Por otra parte, existen reportes de que una concentración de $\text{NO}\cdot$ de $0.1 \mu\text{M}$ inhibe la citocromo c oxidasa de una manera reversible, pero a una concentración mayor de $1 \mu\text{M}$ se mantiene una inhibición persistente de este complejo respiratorio⁽²⁸⁾; de manera que al incrementarse la concentración de $\text{NO}\cdot$, como se había mencionado anteriormente, este reacciona con el $\text{O}_2^{\cdot-}$ y forma peroxinitrito; este producto inhibe de manera irreversible al complejo IV por la nitración a los residuos de cisteína que conforman a este complejo, de tal forma que los efectos que el óxido nítrico y las ERN (especies reactivas de nitrógeno) producen sobre estos complejos respiratorios limitan la respiración celular ^(9,25,28).

El $\text{NO}\cdot$ regula la respiración en mitocondrias aisladas de varios tejidos; por ejemplo en mitocondrias de hígado de rata se ha observado que el $\text{NO}\cdot$ inhibe la respiración de una forma más marcada cuando las concentraciones de oxígeno son bajas que cuando las concentraciones son altas ^(5,26).

Existen datos de que el complejo II de la cadena respiratoria y también la ATP sintasa, conocida también como complejo V pueden ser dañados por el peroxinitrito, además también

algunas enzimas son dañadas, por ejemplo, la aconitasa, creatina cinasa, superóxido dismutasa, por otra parte, produce daño a la membrana mitocondrial, despolarización de la misma, promueve la formación del poro de transición de permeabilidad en la membrana interna mitocondrial, la salida de calcio y del citocromo C, por último, muerte celular programada.⁽⁶⁾

Mientras algunos estudios demuestran que el NO \cdot promueve la apoptosis, hay estudios que demuestran que inhibe este acontecimiento celular, por ejemplo, en células alveolares tipo II se ha demostrado que el NO \cdot producido por los macrófagos alveolares protege a estas células de la apoptosis inducida por estrechamiento, sin embargo, todavía falta mucho que investigar acerca de si el NO \cdot también posee la capacidad de regular la apoptosis en estas células.⁽¹¹⁾

Como ya se había mencionado anteriormente, el NO \cdot puede causar daño al ADN y favorecer mutaciones en el mismo al S-nitrosilar las cisteínas de las enzimas reparadoras del ADN, por ejemplo se ha visto que en el carcinoma de pulmón existe una estrecha relación entre las ERN y las mutaciones del gen P53 (Díaz, 2004).

En conclusión, si bien el NO \cdot puede regular la respiración, y así proteger a la célula del daño por hipoxia; también puede promover apoptosis celular, o bien, ser el punto de origen de muchos procesos patológicos, por ejemplo, el cáncer.

3. HIPÓTESIS

La adición de L-arginina afecta el consumo de oxígeno en los estados de alta y baja fosforilación (estado 3 y 4 respiratorios) en mitocondrias purificadas de pulmón de rata, al sintetizarse óxido nítrico mitocondrial e incrementarse su concentración basal.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la L-arginina sobre la producción de óxido nítrico, en los estados de alta y baja fosforilación (estado 3 y estado 4) en mitocondrias purificadas de pulmón de rata.

4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Aislar y purificar mitocondrias funcionales de pulmón de rata.
2. Evaluar el efecto de la L-arginina a diferentes concentraciones sobre la producción de óxido nítrico en mitocondrias de pulmón de rata en los estados 4 y 3 respiratorios.
3. Determinar la concentración de óxido nítrico producido en mitocondrias de pulmón de rata en los estados 4 y 3 respiratorios, cuando se someten a diferentes concentraciones de L-arginina.
4. Evaluar el efecto del inhibidor L-NAME sobre la producción de óxido nítrico mitocondrial en los estados 4 y 3 respiratorios en mitocondrias de pulmón de rata, cuando se agregan diferentes concentraciones de L-arginina.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 REACTIVOS

Se utilizaron en todos los experimentos reactivos de pureza de tipo grado reactivo.

5.2 ANIMALES

Se utilizaron ratas macho Wistar normotensas con alimentación *ad libitum* y ciclos de luz-oscuridad de 12 hrs del bioterio en el Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas de la UMSNH. Las ratas utilizadas tenían 4 meses y 400 g de peso.

5.3 AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE MITOCONDRIAS DE PULMÓN DE RATA

Se sacrifica la rata por decapitación y se extraen los pulmones, colocándolos en un medio (TES) que contenía 10mM de Tris HCl, 1mM de EDTA (ácido etilén diamino tetraacético) y 250mM de sacarosa, ajustado a un PH de 7.4. Los pulmones se cortaron en pedazos pequeños y se lavaron tres veces con TES para eliminar el exceso de sangre en el tejido. Después el tejido fragmentado se homogenizo en un homogenizador Embden Potter a 1000 – 1500 rpm.

El homogenado se filtro con una gasa para eliminar los restos de tejido más grandes. Las mitocondrias se obtuvieron mediante centrifugación diferencial. La primera centrifugación se realizo a 2770 rpm durante 10 min desechando el precipitado, la segunda a 9000 rpm durante 20 min desechando el sobrenadante, el pellet mitocondrial obtenido se resuspendió en 1 ml de Percoll al 15 % (diluido con medio TES) y se paso por un gradiente de Percoll (23%, 40%) centrifugando a 19900 rpm durante 10 min. Se extrajo la banda mitocondrial, la cual se situaba entre la concentración de Percoll al 23% y la de 40%.

A la suspensión mitocondrial se le realizaron dos lavados con medio TES para eliminar el Percoll, en el primero se centrifugo a 14000 rpm durante 10 min desechando el sobrenadante, se adiciono más medio TES y se centrifugo por segunda vez a 9000 rpm durante 10 min, el sobrenadante se desecho y el pellet mitocondrial se resuspendió en 200 µl de medio TES.

5.4 DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA MITOCONDRIAL

A la suspensión mitocondrial obtenida se le determinó la concentración de proteína mediante el método de Biuret.

Una vez conocida la concentración de proteína, se calculó el volumen necesario para obtener una concentración de 0.1 mg / ml, concentración utilizada durante todos los experimentos realizados.

5.5 MEDICIÓN DE LA RESPIRACIÓN MITOCONDRIAL

La respiración mitocondrial se midió con un electrodo de oxígeno tipo Clark conectado a un voltímetro y a una PC.

El medio buffer utilizado para medir la respiración contenía 75 mM de MOPS (ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico, 15 mM de KCl, 5 mM de KH_2PO_4 , 3 mM de MgCl_2 , 220 mM de manitol y ajustado a un pH de 7.4.

A la dilución mitocondrial se le adicionó los sustratos: succinato 10 mM, rotenona $2\mu\text{M}$ para evaluar el estado 4 respiratorio, y ADP $300\mu\text{M}$ para evaluar el estado 3 respiratorio.

5.5.1 RESPIRACIÓN EN ESTADO 4

La respiración en este estado se realizó añadiendo a la cámara del oxímetro, una concentración mitocondrial de 0.1 mg, succinato 10 mM, rotenona 2 μ M, y medio buffer para obtener un volumen final de 2 ml. Antes de medir el consumo de oxígeno, las mitocondrias y los sustratos se incubaron 5 min, después se midió y cuantifico el consumo de oxígeno.

5.5.2 RESPIRACIÓN EN ESTADO 3

La respiración en este estado se realizó añadiendo a la cámara del oxímetro, una concentración mitocondrial de 0.1 mg, succinato 10mM, rotenona 2 μ M, ADP 300 μ M y medio buffer para obtener un volumen final de 2 ml. Antes de medir el consumo de oxígeno, las mitocondrias y los sustratos se incubaron 5 min, después se agregó ADP 300 μ M y se cuantifico el consumo de O₂.

5.6 DETERMINACIÓN DEL ÓXIDO NÍTRICO MITOCONDRIAL

El óxido nítrico se determinó mediante la técnica de Griess, se utilizó el medio TES como buffer.

Para evaluar el efecto del óxido nítrico en los estados respiratorios ya descritos, se agregó L-arginina (L-arg), el sustrato de la óxido nítrico sintasa (NOS) a las concentraciones de 50 μ M, 100 μ M, y 200 μ M, incubando las mitocondrias y los sustratos durante 20 min, pasado este tiempo la reacción enzimática se detuvo agregando 40 μ l de ácido perclórico al 20 %, la muestra se centrifugó a 5000 rpm durante 5 min, la muestra se decantó y luego se agregó el reactivo de Griess, incubando la muestra durante 25 min protegiéndola de la luz, después a la muestra se le midió la absorbancia a 546 nm en un espectrofotómetro UV/VIS de marca Lambda 18 de doble haz.

Para evaluar la eficacia del inhibidor L-NAME sobre la NOSmt en mitocondrias de pulmón de rata, se procede a realizar el procedimiento descrito en el apartado 5.5.1 para el estado 4 y el 5.5.2 para el estado 3, una vez agregados todos los sustratos, se procede a agregar una concentración de 10 mM de L- Name junto con las diferentes concentraciones de L-arginina (50 μ M, 100 μ M, y 200 μ M) y se deja incubar por 20 min antes de medir y cuantificar el consumo de oxígeno. Después la reacción se detiene con HClO₄ al 20% y se prosigue como en el apartado 5.6.

Se cuantifico el óxido nítrico y el consumo de oxígeno en cada estado respiratorio como se señalo en el apartado 5.5.1 y 5.5.2, utilizando las diferentes concentraciones de L-arginina respectivamente y de inhibidor L-NAME.

6 RESULTADOS

En el control respiratorio, se observó un mayor consumo de oxígeno en el estado de alta fosforilación (estado 3), mientras que el estado de baja fosforilación (estado 4) se mostró un menor consumo de oxígeno. Los datos sugieren que las mitocondrias obtenidas en el aislamiento se encontraban funcionales, es decir, no presentaban un deterioro considerable en cuanto a su integridad estructural, como para descartar los datos obtenidos.

CONTROL RESPIRATORIO

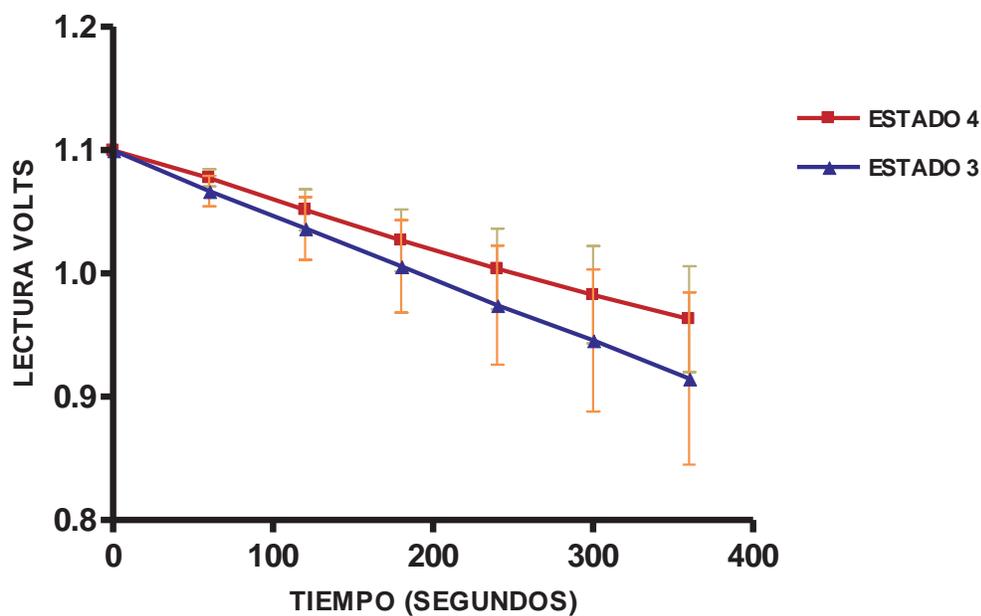


Fig. 10. En esta gráfica se muestra la disminución de la concentración de oxígeno de un control donde solo se tenían mitocondrias purificadas de pulmón de rata, se indujeron los estados respiratorios correspondientes y se observó el consumo de oxígeno, como una disminución del voltaje. El estado de alta fosforilación (estado 3) disminuye más rápido el voltaje, mientras que el estado de baja fosforilación (estado 4) lo hace más lento. Los datos representan la media de tres experimentos realizados \pm su error estándar.

CONTROL RESPIRATORIO

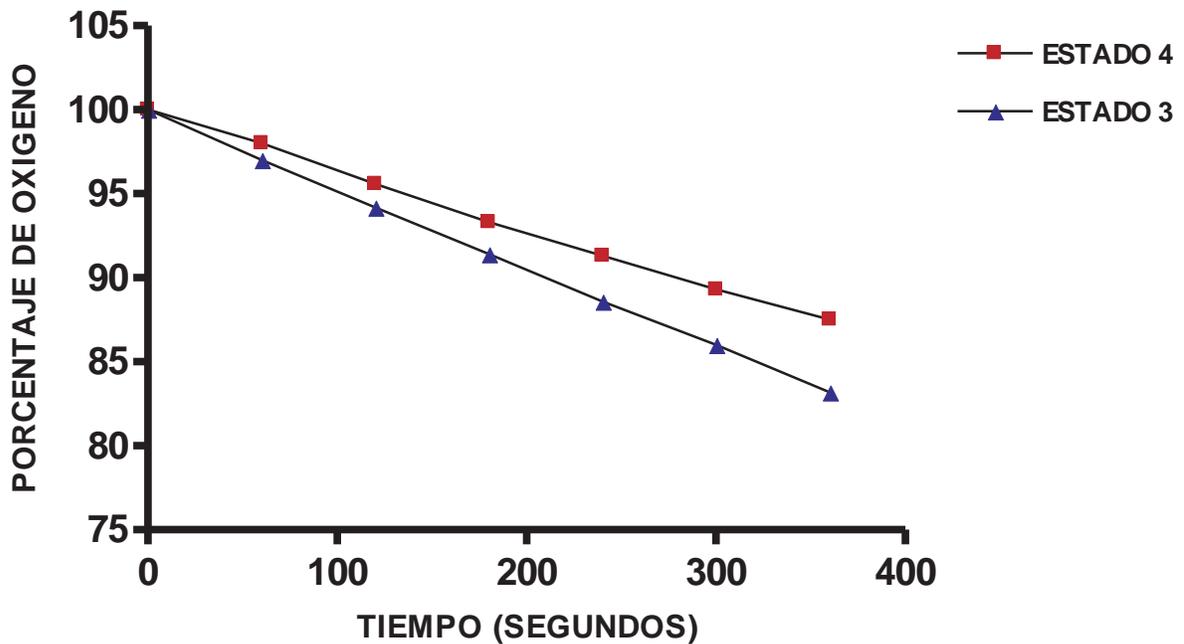


Fig. 11. Se observa el porcentaje de consumo de oxígeno de un control donde solo se tenían mitocondrias purificadas de pulmón de rata, el estado de alta fosforilación (estado 3) disminuyó su concentración de oxígeno un 17%, mientras que el estado de baja fosforilación (estado 4) mostró un decremento en un 12.5%, la duración del trazo fue de seis minutos. Los datos representan la media de tres experimentos realizados.

6.1 EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE L-ARGININA EN EL ESTADO DE BAJA FOSFORILACIÓN (ESTADO 4) EN MITOCONDRIAS PURIFICADAS DE PULMÓN DE RATA

La adición de L-arginina, el sustrato de la NOSmt, a las concentraciones de 50 μ M, 100 μ M y 200 μ M respectivamente, a la suspensión de mitocondrias de pulmón de rata, mostró una inhibición en el consumo de oxígeno en la respiración en el estado de baja fosforilación (estado 4); la inhibición fue mayor cuando se adicionó una concentración de 50 μ M de L-arginina.

En la siguiente tabla se muestra el tratamiento que se llevo a cabo, con su respectiva inhibición.

TRATAMIENTO	PORCENTAJE DE INHIBICION
Control (estado 4)	0%
Adición de L-arginina 50 μ M	34.45%
Adición de L-arginina 100 μ M	33.34%
Adición de L-arginina 200 μ M	22.23%

TABLA 2. Porcentajes de inhibición obtenidos con diferentes concentraciones de L-arginina en estado de baja fosforilación.

EFEECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE L-ARGININA EN LA RESPIRACIÓN DE MITOCONDRIAS EN ESTADO DE BAJA FOSFORILACIÓN

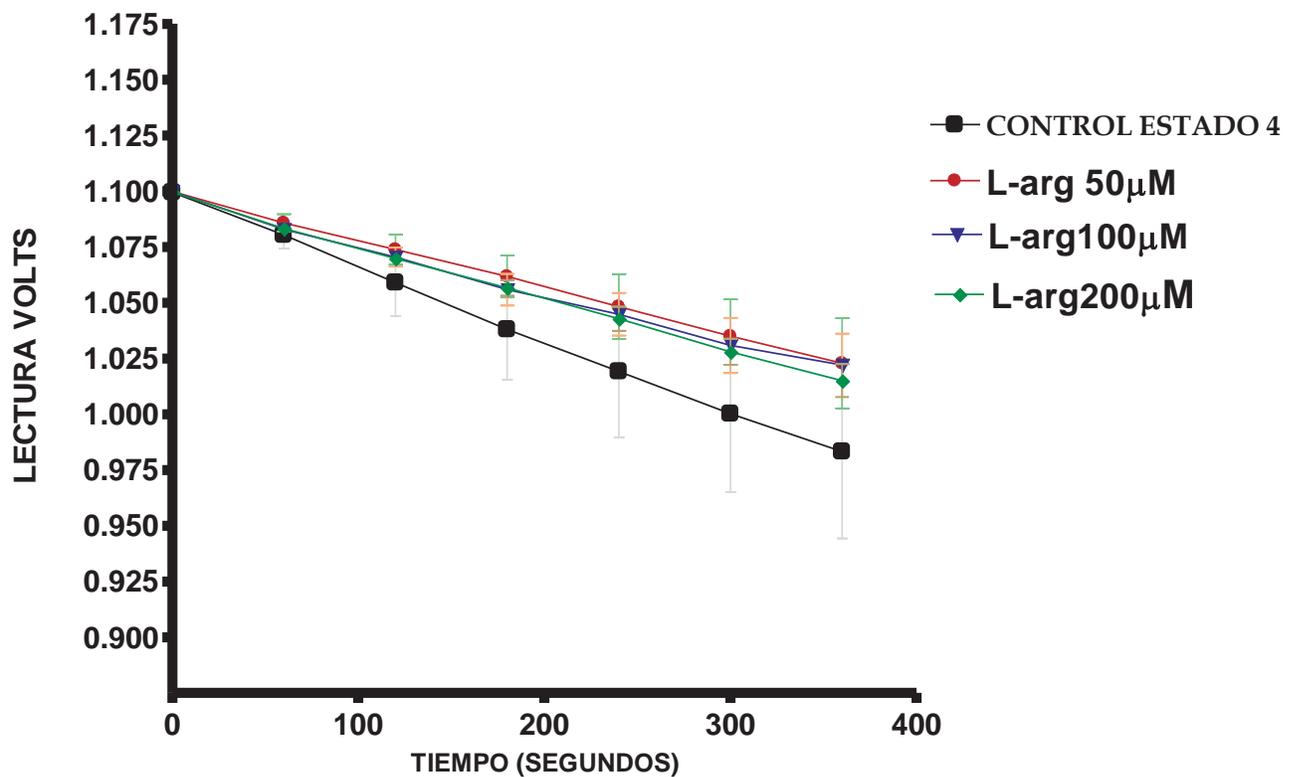


Fig 12. Se muestra el consumo de oxígeno como una disminución del voltaje, obsérvese que la concentración de L-arginina 50µM y 100µM, muestran una mayor inhibición en el consumo de oxígeno. Los datos representan la media de tres experimentos realizados + / - su error estándar.

PORCENTAJE DE CONSUMO DE OXIGENO EN UN ESTADO DE BAJA FOSFORILACIÓN CON EL TRATAMIENTO DE L-ARGININA

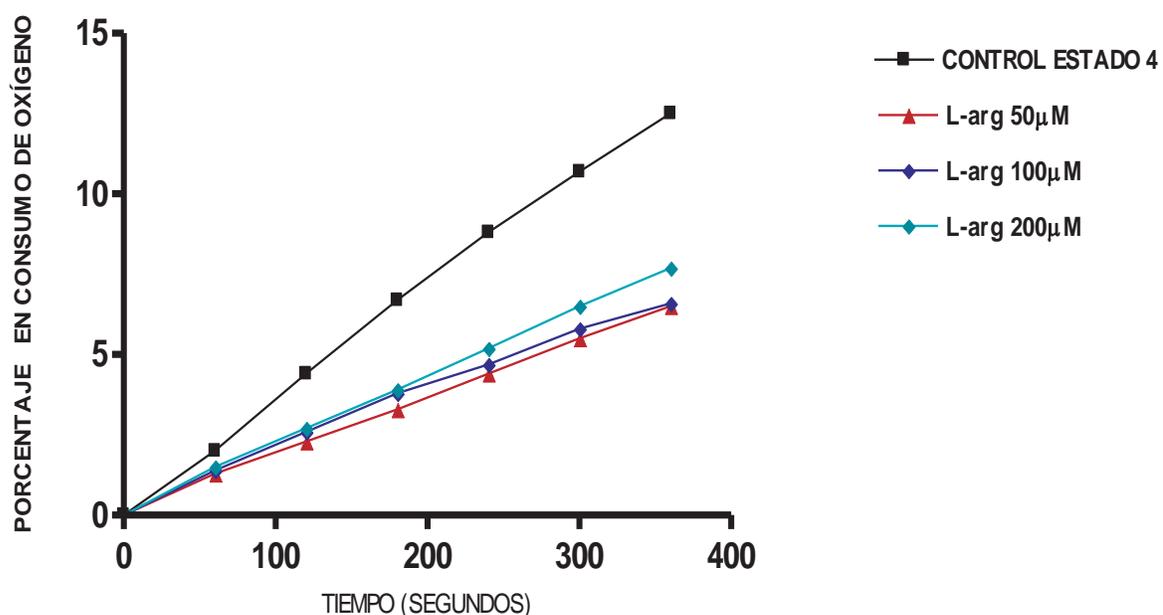


Fig. 13. Se presenta el porcentaje de oxígeno consumido, el tratamiento con 50 μM de L-arginina presentó un consumo de oxígeno en un 6.5%, con una concentración de 100 μM de L-arginina en un 6.6% y con el tratamiento de 200 μM de L-arginina un 7.7%, mientras que el control consumió el 12.5% de oxígeno, nótese que el oxígeno consumido con el tratamiento de 50 y 100 μM de L-arginina es aproximadamente un 50% con respecto al control. Los datos representan la media de tres experimentos realizados

6.2 EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE L-ARGININA EN EL ESTADO DE ALTA FOSFORILACIÓN (ESTADO 3) EN MITOCONDRIAS PURIFICADAS DE PULMÓN DE RATA

La adición de L-arginina a la suspensión de mitocondrias purificadas de pulmón de rata en un estado de alta fosforilación (estado 3) tuvo un efecto inhibitorio en el consumo de oxígeno; la adición de 50 μM de L-arginina presentó un menor consumo de oxígeno y una inhibición del 38.56%.

En la siguiente tabla se muestra el tipo de tratamiento con su respectiva inhibición.

TRATAMIENTO	PORCENTAJE DE INHIBICIÓN
Control (estado 3)	0%
Adición de L-arginina 50 μM	38.56%
Adición de L-arginina 100 μM	33.46%
Adición de L-arginina 200 μM	13.72%

TABLA 3. Porcentajes de inhibición obtenidos con diferentes concentraciones de L-arginina, en un estado de alta fosforilación.

EFFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE L-ARGININA EN LA RESPIRACIÓN DE MITOCONDRIAS EN ESTADO DE ALTA FOSFORILACIÓN

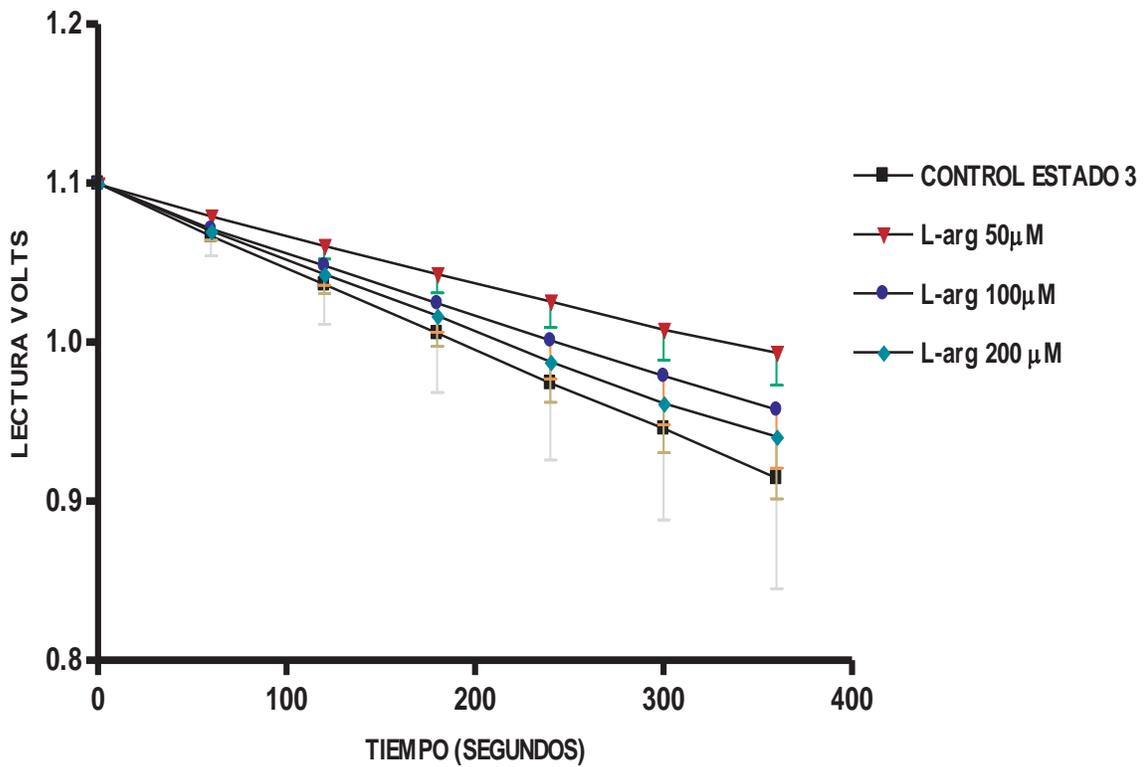


Fig. 14. Esta gráfica ilustra que la adición de L-arginina a la suspensión mitocondrial, en un estado de alta fosforilación (estado 3), el cual se indujo agregando una concentración de 300 µM de ADP, tuvo un efecto inhibitorio máximo cuando la concentración del L-aminoácido fue de 50 µM; el efecto inhibitorio se observa como una disminución en el consumo de oxígeno, que se interpreta como una disminución del voltaje, la cual es menor con respecto al control. Estos datos muestran el promedio de tres experimentos + / - su error estándar

PORCENTAJE DE CONSUMO DE OXÍGENO EN UN ESTADO DE ALTA FOSFORILACIÓN CON EL TRATAMIENTO DE L-ARGININA

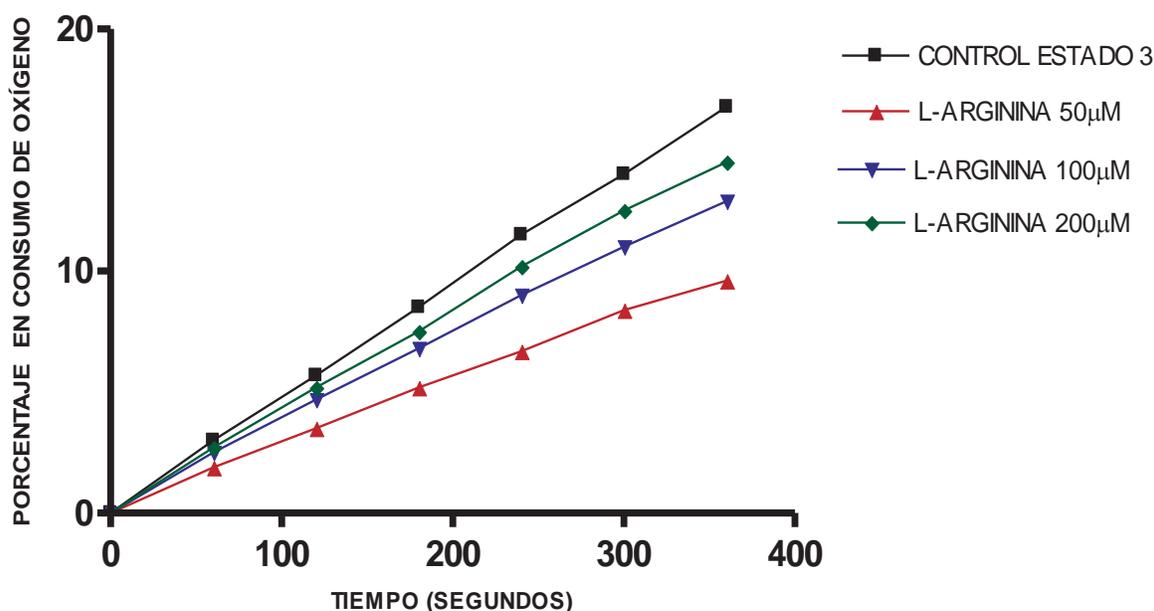


Fig. 15. En la siguiente gráfica se muestra el porcentaje en consumo de oxígeno en mitocondrias en un estado de alta fosforilación (estado 3). Cuando se adicionó una concentración de 50µM de L-arginina, el consumo de oxígeno fue de un 9.6%, con una concentración de 100µM de L-arginina, el consumo de oxígeno fue del 12.9%, mientras que una concentración de 200 µM de L-arginina, se produjo un consumo del 14.5 %; el control consumió el 16.8% de oxígeno. Los datos fueron graficados con el promedio de 3 experimentos realizados.

6.3 EFECTO DEL L-NAME EN LA CONCENTRACIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO EN EL ESTADO DE BAJA FOSFORILACIÓN (ESTADO 4) EN MITOCONDRIAS PURIFICADAS PULMÓN DE RATA

Los resultados mostraron que las mitocondrias tratadas con el inhibidor L-NAME tuvieron una concentración más baja de óxido nítrico; las mitocondrias que no contenían el inhibidor pero que se les había adicionado L-arginina a diferentes concentraciones, manifestaron una concentración de óxido nítrico mayor, inclusive que el control. En la figura 16 se observa que la concentración de 50 μM de L-arginina produjo el mayor incremento de óxido nítrico en mitocondrias purificadas de pulmón rata, en un estado de baja fosforilación (estado 4 respiratorio).

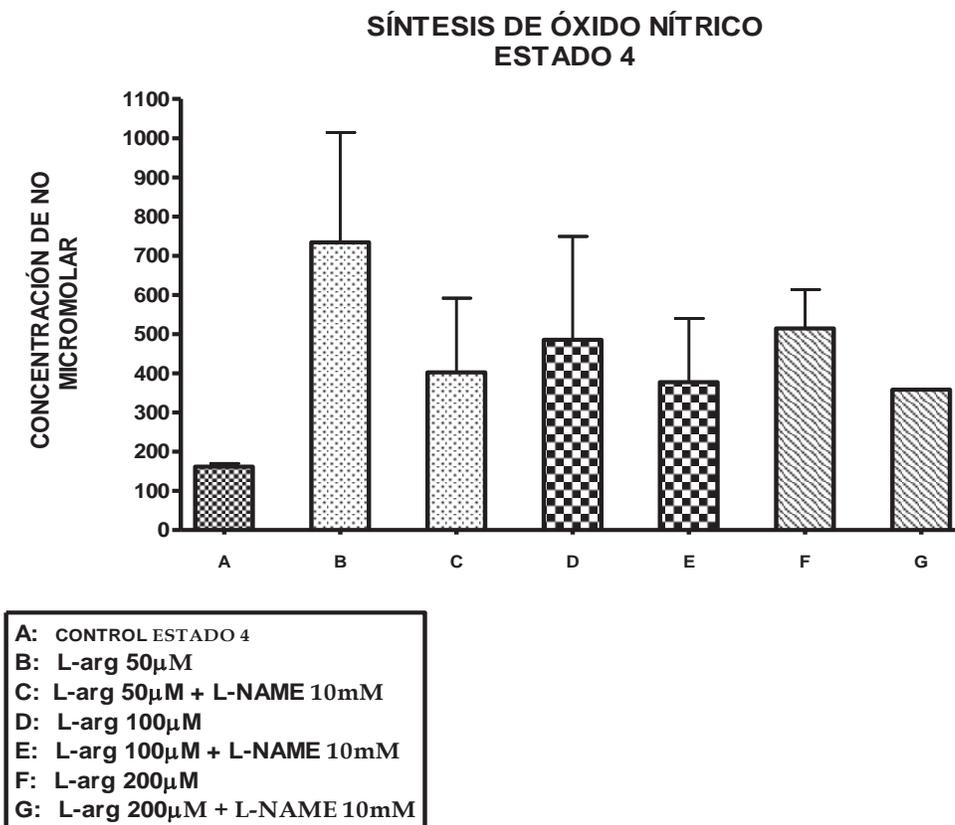


Fig. 16. Obsérvese que la mayor concentración de óxido nítrico se presentó cuando las mitocondrias se trataron con una concentración de 50µM de L-arginina obteniendo una concentración de óxido nítrico de 734.22 µM, al tratar estas mitocondrias con 10mM del inhibidor L-NAME se redujo la concentración a 402.22 µM, para el tratamiento con 100µM de L-arginina sin el inhibidor L-NAME, la concentración de óxido nítrico fue de 485.33µM, cuando se trataron con el inhibidor se redujo la concentración a 377.5µM, nótese que la concentración de óxido nítrico para el tratamiento con 200µM de L-arginina con y sin el inhibidor no difieren mucho en comparación con los resultados obtenidos con una concentración de 100µM de L-arginina con y sin el inhibidor.

Los datos representan la media de 3 experimentos realizados +/- su error estándar

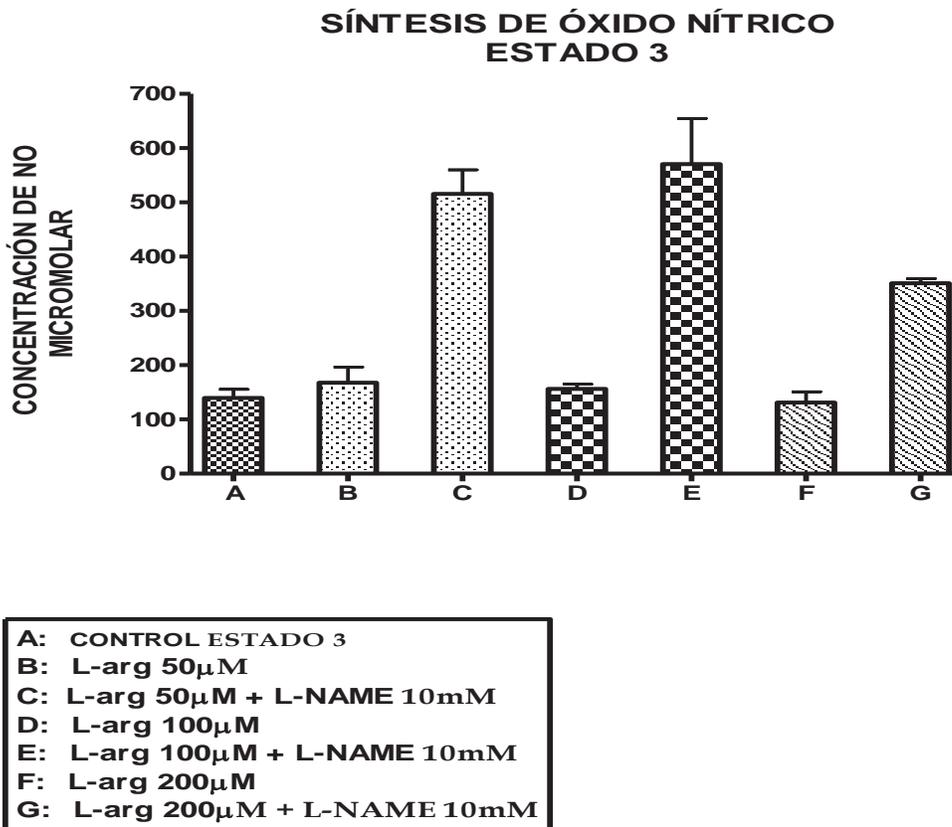


Fig. 17. La adición de L-arginina a las concentraciones de 50 μM , 100 μM , y 200 μM respectivamente, en un estado de alta fosforilación (estado 3), no muestran incremento significativo en la concentración de óxido nítrico con respecto al control (139.7 μM), sin embargo, al agregar una concentración de 10mM de L-NAME, se observó un aumento en la concentración de óxido nítrico, las lecturas fueron para la concentración de L-arg 50 μM + L-NAME de 500.74 μM , para la de L-arg 100 μM + L-NAME de 570.37 μM y para la de L-arg 200 μM + L-NAME de 351 μM , la mayor concentración de óxido nítrico se observó en la concentración de L-arg 100 μM .

7 DISCUSIÓN

La participación del $\text{NO}\cdot$ es muy importante en varias funciones fisiológicas: desde regular el metabolismo energético, inhibiendo la actividad respiratoria en la mitocondria ^(5, 6, 23), o bien modificando estructuralmente proteínas que participan en diversos procesos biológicos, así como el ADN debido a la acción de sus especies reactivas de nitrógeno ^(9, 14, 24,28), hasta ser determinante en la apoptosis ⁽¹⁾, al estimular la salida del citocromo c ⁽¹³⁾.

La NOSmt es de forma constitutiva, es decir, esta enzima necesita cierta concentración de iones calcio para activarse y producir óxido nítrico, se ha observado que la presencia de L-arg incrementa los niveles de calcio libre ⁽¹⁾, este incremento promovería la activación de esta enzima y por lo tanto el aumento en la síntesis de $\text{NO}\cdot$.

El $\text{NO}\cdot$ puede generar especies reactivas de nitrógeno, estas son moléculas radicales libres muy reactivas, pueden producirse de diversas formas, por ejemplo, al reaccionar el $\text{NO}\cdot$ con el radical superóxido producido durante la respiración mitocondrial se genera el radical peroxinitrito, esta molécula tiene implicaciones importantes en el metabolismo, al inhibir de manera irreversible a varias enzimas como la ATPasa y la citocromo c oxidasa ^(1, 4, 8, 9, 28). El peroxinitrito es más reactivo que el $\text{NO}\cdot$ y produce lipoperoxidación al interactuar con los fosfolípidos de la membrana mitocondrial. La lipoperoxidación y la inhibición de la citocromo c oxidasa facilitan la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial y así la salida del citocromo c promoviendo la activación de las caspasas y finalmente apoptosis.⁽¹⁾

En este trabajo se observó que las mitocondrias tratadas con una concentración de $50\mu\text{M}$ de L-arg mostraron un aumento en la concentración de óxido nítrico basal en un estado de baja fosforilación, la activación de la NOSmt se tuvo que dar al incrementar la concentración

de iones calcio libres debido a la adición de su sustrato (L-arg), favoreciéndose un incremento de $\text{NO}\cdot$ basal. Este incremento teóricamente pudo reducir el consumo de oxígeno en las mitocondrias de pulmón, debido a la inhibición de la citocromo c oxidasa.

El $\text{NO}\cdot$ puede inhibir de manera reversible o irreversible a la NOSmt; la forma irreversible se logra al tener altas concentraciones de óxido nítrico, de tal forma que en este trabajo experimental, las concentraciones de 100 μM y 200 μM de L-arg respectivamente, muestran una menor pero muy similar concentración de $\text{NO}\cdot$ entre sí, con respecto al tratamiento con una concentración de 50 μM de L-arg, esto es posiblemente, a la inhibición de la NOSmt por el propio $\text{NO}\cdot$, así como también al daño extensivo que sufre la mitocondria debido a la presencia de radicales libres que se producen durante la respiración mitocondrial y que de cierta manera reaccionan con el $\text{NO}\cdot$ que se forma.

En cuanto a la actividad respiratoria observada en un estado de baja fosforilación obtenida en este trabajo, todos los tratamientos con L-arg con diferentes concentraciones de este L-aminoácido, mostraron una inhibición en el consumo de oxígeno muy parecida. La adición del inhibidor L-NAME (10 mM) a las mitocondrias con una concentración de 50 μM de L-arg, en un estado de baja fosforilación manifestó una disminución en la concentración de NO comparada con su control, mientras que a las concentraciones de 100 μM y 200 μM de L-arg tratadas con el inhibidor, no se observó una disminución muy marcada de $\text{NO}\cdot$ comparados también con su respectivo control, esto pudo deberse a que a estas concentraciones de L-arg, la enzima NOSmt se inhibe más rápidamente, tal vez por el aumento de iones calcio libres generados por este sustrato (L-arg), y a la producción de cantidades de $\text{NO}\cdot$, $\text{ER}\cdot$ y $\text{E}\cdot$ generadas durante el transcurso del experimento, suficientes como para obtenerse resultados experimentales de esta naturaleza. La acción de estas especies reactivas, disminuyen la funcionalidad e integridad de las mitocondrias.

En los tratamientos con las diferentes concentraciones de L-arg en un estado de alta fosforilación, no se observó un incremento en la concentración de óxido nítrico basal, mientras que en la actividad respiratoria pudo observarse que la concentración de 50 μM de L-arg en este estado respiratorio, se veía afectada con una inhibición en el consumo de oxígeno con respecto a su control; las concentraciones de 100 μM y 200 μM del L-aminoácido mostraron una menor inhibición en el consumo de oxígeno, es decir, se observó una actividad respiratoria mayor, comparados con el control. Tal vez estos resultados pudieran mostrar una inhibición de la NOSmt por el propio $\text{NO}\cdot$ generado por la enzima a estas concentraciones de sustrato.

Un dato muy importante muestra, que al utilizar L-NAME (10mM) en este estado respiratorio las lecturas de óxido nítrico se elevan considerablemente, lo que supone que el inhibidor al contener un grupo nitro, este altera los resultados en las muestras tratadas, por lo tanto, se sugiere que se utilice un inhibidor que no pueda alterar los resultados en las lecturas de óxido nítrico, como por ejemplo el N-monometil-L-arginina (L-NMMA) o la N-iminoetil-L-ornitina (L-NIO).

Las perspectivas de este trabajo pueden ser muy variables, por ejemplo; podríamos investigar el papel que juega el óxido nítrico en los procesos patológicos de los pulmones u otros órganos, así como su importancia en la célula, ya que en los últimos años se ha creído la posibilidad de que durante los periodos de hipoxia, el óxido nítrico regula el consumo de oxígeno, protegiendo de esta manera a la célula, aunque cabe mencionar que esta protección es limitada, debido a las ERN y a las ERO que se generan en este tipo de estrés y más aún durante la reperfusión.

Por otra parte los efectos que tiene el óxido nítrico, las ERN y las ERO sobre las células pueden ser un punto clave para en determinado momento inducir apoptosis en células cancerosas, claro esto conllevaría a más años de experimentación y entendimiento del comportamiento del óxido nítrico en los diferentes procesos biológicos que llevan a cabo las células.

El óxido nítrico tiene un gran camino por recorrer, pues todavía faltan muchas cosas por conocer de esta molécula, aunque en la actualidad ya se conocen datos muy importantes sobre sus mecanismos de acción y participación en algunas enfermedades degenerativas, en la neurotransmisión, la vasodilatación e hipertensión, en la inflamación y en el sistema inmunitario, entre otras, por mencionar algunas.

8 CONCLUSIONES

- Una concentración de 50 μ M de L-arg, inhibe la actividad respiratoria en mitocondrias de pulmón de rata, en un estado de baja fosforilación.
- La concentración de óxido nítrico basal se incrementa de forma significativa cuando las mitocondrias se incuban con 50 μ M de L-arg, en un estado de baja fosforilación.
- La adición de L-arg no muestra efectos inhibitorios importantes en la actividad respiratoria en mitocondrias de pulmón de rata, en un estado de alta fosforilación.
- La adición de L-NAME (10mM) redujo la concentración de óxido nítrico basal en mitocondrias de pulmón de rata, en un estado de baja fosforilación.
- La adición de L-NAME (10 mM) incremento la concentración de óxido nítrico en mitocondrias de pulmón de rata, en un estado de alta fosforilación.

9 BIBLIOGRAFÍA

1. Aguilera, A.L. 2000. Papel del óxido nítrico en mitocondrias de corazón y de riñón de rata durante la hipertensión. Tesis de Maestría en Ciencias en Biología Experimental, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Mich., México 58-69 p.
2. Alonso, J.R., Alonso, Fernández, A.P., 1998. Nitric oxide: synthesis, neuroprotection and neurotoxicity. CSIC.
3. Alderton, K.W., Cooper, E.C. 2001. Nitric Oxide Synthases: Structure, Function and Inhibition. *J. Biol. Chem.* 357: 593-615
4. Alvarez, S., Bermudez N. M.J., Boveris, A. 1994. La Mitocondria: Estructura, Función y Especies Reactivas de Oxígeno. 1:26
5. Borutaite, V., Brown, C. G., 1996. Rapid Reduction of Nitric Oxide by Mitochondria, and Reversible Inhibition of Mitochondrial respiration by Nitric Oxide. *Biochem. J.* vol. 315. 295:299
6. Brown, C.G. 2000. Nitric Oxide as a Competitive Inhibitor of Oxygen Consumption in the Mitochondrial Respiratory Chain. *Physiol. Scand.* Vol. 168. 667:674
7. Carreras, M.C., Riobo, N. El óxido nítrico y las óxido nítrico sintasas.
8. Carrizo, H. P., Dubin, M. 1998. Fisiopatología del Óxido Nítrico y su Relación con el Estrés Oxidativo. 58: 367-373
9. Clementi, E., Brown, C.G., Moncada, S.1998. Persistent inhibition of cell respiration by nitric oxide: crucial role of s-nitrosylation of mitochondrial complex I and protective action of glutathione. 95, 7631-7636 p.

10. Diaz, A. D., 2004. Óxido Nítrico, Mutagénesis y Cáncer. Rev. Cubana Invest. Biomed. 23. 184 -189 p.
11. Edwards, S. Y., Sutherland, M. L., Murray, W. A. 2000. Nitric Oxide Protects Alveolar Type II Cells From Stretch-Induced Apoptosis. A Novel Role For Macrophages In The Lung. Am. J. Physiol. Lung Cell. Vol. 279. 236:242
12. Extractos de la "Second Conference of the Internacional Coenzyme Q₁₀ Association". 2000. La Coenzima Q₁₀, Su Función en la Cadena de Transporte de Electrones y su Implicancia en las Enfermedades Neurodegenerativas. ". Frankfurt, Alemania, Diciembre 1-3, 2000
13. Ghafourifar, P., Schenk,U. 1999 Mitochondrial nitric – oxide synthase stimulation causes cytochrome c release from isolated mitochondria. The journal of biological chemistry. 274 (44): 31185 – 31188 p.
14. Gordsdorf, S., Appel, K.E. 1990. Nitrogen Dioxide Induces DNA-Single-Strand Breaks in Cultured Chinese Hamster Cells.
15. <http://www.forest.ula.ve/~rubenhg/respiración/>.
16. <http://www.pucmmsti.edu.do/cienciasfisiologicas/surfactante1.pdf>
17. http://wwwnutrigage.blogspot.com/2008_11_01_archive.html
18. www.profesorenlinea.cl/Ciencias/Celula.htm (imagen)
19. www.ugr.es/%7Eeianez/Microbiologia/10energia.htm
20. Lodish, H., Berk, A., Baltimore, D. 2002. Biología Celular y Molecular. 4ª. Edición. Madrid, España,: Medica panamericana. ed. 633-636 -645 p.

21. Martínez, G.A., Dent, M. 2002. La Controversia de la Muerte Celular Mediada por calcio. UAEM. Vol.9: 1
22. Milanés S, H., Fernández I, A. J. Anatomía, Fisiología y Patología Respiratoria. ISSN: 67,1885 -7124 p.
23. Miles, R. P., Bowman, L., Huffman, L. 1996. Nitric Oxide Alters Metabolism in Isolated Alveolar Type II Cells. *Am. J. Physiol.* 271. 23-29 p.
24. Riobo, A. N., Clementi, E., Melani, M., Boveriso, A., Moncada, S. 2001. Nitric oxide inhibits mitochondrial NADH: ubiquinone reductase activity through peroxynitrite formation. *Biochem. J.* 359, 139-145 p.
25. Saavedra-Molina, A., Calderón-Cortés E., 2004. Papel Patofisiológico del Óxido Nítrico Mitocondrial. *UMSNH.* 28: 27-36 p.
26. Takeharal, Y., Nakaharal,H., Inail, Y., 1996. Oxygen- Dependent Reversible Inhibition of Mitochondrial Respiration by Nitric Oxide. *Japan Society for Cell Biology.* 251-258 p.
27. Wasserthal L, T. 1998. The Open Hemolymph System of Holometabola and Its Relation to the Tracheal Space. In "Microscopic Anatomy of Invertebrates.
28. Zhang, J., Jin, B., Block, R. E. 2004. Nitric Oxide-Induced Persistent Inhibition and Nitrosylation of Active Site Cysteine Residues of Mitochondrial Cytochrome- C Oxidase in Lung Endothelial Cells. *Am. J. Physiol.* Vol. 288. 840-849 p.