



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO
Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas

Programa de Doctorado Institucional en Ciencias Biológicas
Opción Biología Experimental

**INFLUENCIA DEL CALCIO SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA ÓXIDO NÍTRICO SINTASA
MITOCONDRIAL EN CEREBRO DE RATA DURANTE EL DESARROLLO DE LA
HIPERTENSIÓN**

TESIS

Para obtener el grado de:

**DOCTORA EN CIENCIAS
EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

Presenta:

M. EN C. ELIZABETH CALDERÓN CORTÉS

Director de Tesis:

DR. ALFREDO SAAVEDRA MOLINA

**MORELIA, MICHOACÁN, MÉXICO
JULIO, 2008**

La disciplina es el mejor amigo del hombre,
porque ella te lleva a realizar los anhelos más
profundos de su corazón.

Madre Teresa De Calcuta

Cuanto más grande es el caos, más cerca
está la solución.

Proverbio Chino

El amor de madre es el combustible que
le permite a un ser humano hacer lo
imposible.

† A Nicolasa Cortés Calderón

DEDICATORIA

A **Dios** quién nunca me ha abandonado, y me ha regalado fuerza y sabiduría para llegar a esta etapa de mi vida.

A **Él**, que siempre ha estado a mi lado en los momentos más difíciles.

Con especial amor, agradecimiento y admiración a mis padres **Eleazar** y **Nicolasa** por todo su apoyo, comprensión y dedicación en cada momento de mi vida.

Gracias **Mamá** porque todo lo que soy o espero ser se lo debo tu angelical solicitud de madre.

Gracias **Papá** porque me has dejado la herencia más rica que le puede dejar un padre a un hijo, sabiduría y perseverancia para lograr mis objetivos.

A mi abuelita **Paz** porque siempre me apoyó durante mi formación académica.

A mis queridas hermanas **Marisol** y **Viridiana** que han sido un gran apoyo en los malos y mejores momentos por los que he atravesado en este camino.

A mis tíos **Anita** y **Margarito** porque han estado en las buenas y la malas siempre dándonos su incondicional apoyo.

A mi primo **Marco** porque aunque esté lejos siempre me alienta con sus buenos deseos y su gran cariño de hermano.

A **Christian** que siempre ha estado conmigo apoyándome, brindándome su cariño incondicional a lo largo de todos estos años.

Al **Dr. Saavedra** y **Mony** que con sus enseñanzas me abrieron una gran puerta al conocimiento y así lograr mis objetivos.

Al **Dr. Salvador Manzo Ávalos** por su apoyo y amistad durante mi desarrollo profesional.

AGRADECIMIENTOS

Al **Dr. Alfredo Saavedra Molina**, y a la **Q.F.B. Mónica Clemente Guerrero** por la asesoría y el apoyo brindado para la realización de este trabajo.

A los miembros de mi comité tutorial: **Dr. Rafael Villalobos Molina, Dr. Carlos Cervantes Vega, Dr. Ernesto García Pineda, Dr. Rafael Salgado Garciglia, Dr. Salvador Manzo Ávalos, Dr Istvan Boldogh y Dr. Alfredo Saavedra Molina** por su asesoría durante todo el tiempo en que se realizó este trabajo.

A mis amigos del laboratorio, **Mirella, Edgar, Salvador, Mónica, Areli, Luisa, Christian, Ruth, Eva, Viridiana, Sacnité, José Luis, Rocío**, por su amistad y ayuda en la realización del presente trabajo.

A mis amigos del instituto, **Alma, Patricia, Esther, Georgina, César, Martha**, por su amistad y apoyo, y en especial a mis amigos **Alberto, Alma y Beatriz** quienes siempre han creído en mí.

A mis amigas de la escuela de farmacología **Alma, Nadia y Oliva** con quienes pasé los mejores años de mi vida.

A **Martha, Servando, Giovanni, Jaime y Francisco** por su amistad.

A todos mis amigos de la **Unidad de Biomedicina de la FES Iztacala**, por toda su amistad y apoyo manifestado durante mi estancia en México.

A la **Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo** y en particular al **Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas** por mi formación académica.

A CONACYT por el apoyo económico recibido con la beca no. 159808.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	i
RESUMEN	ii
ABSTRACT	iii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Sistema nervioso	1
1.2. Cerebro	1
1.2.1. Metabolismo cerebral	2
1.2.2. Circulación sanguínea cerebral	3
1.3. La mitocondria	4
1.3.1. Estructura y distribución de las enzimas de la mitocondria	4
1.3.2. Cadena respiratoria	7
I. NADH-Ubiquinona oxidorreductasa	8
II. Succinato- Ubiquinona oxidorreductasa	9
III. Ubiquinol- citocromo c oxidorreductasa	10
IV. Citocromo c oxidasa	10
V. ATP sintasa	10
VI. Ubiquinona	11
VII. Citocromo c	11
1.4. Óxido nítrico	12
1.5. Óxido nítrico sintasa	12
1.5.1. Inhibidores de las óxido nítrico sintasas	14
1.5.2. Óxido nítrico mitocondrial	14
1.6. Calcio	17
1.6.1. Calcio intramitocondrial	18
1.7. Hipertensión	20
2. ANTECEDENTES	22
2.1. Calcio, óxido nítrico y función mitocondrial durante la hipertensión	22
3. HIPÓTESIS	24
4. OBJETIVOS	25

4.1. Objetivo general -----	25
4.2. Objetivos específicos -----	25
5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL -----	26
5.1. Material biológico -----	27
5.2. Aislamiento de mitocondrias de cerebro de rata -----	27
5.3. Determinación del grado de pureza mitocondrial -----	28
5.4. Determinación de calcio libre intramitocondrial -----	28
5.5. Captación de calcio -----	29
5.6. Determinación del potencial de transmembranal-----	29
5.7. Determinación del consumo de oxígeno -----	29
5.8. Determinación de la concentración de óxido nítrico -----	30
5.9. Análisis estadístico -----	31
6. RESULTADOS -----	
Changes in mitochondrial functionality and calcium uptake in hypertensive rats as a function of age	32
7. RESULTADOS ADICIONALES -----	44
7.1. Resultados no incluidos en el artículo -----	44
7.1.1. Pureza mitocondrial -----	44
7.1.2. Captación y concentración de calcio intramitocondrial -----	44
7.1.3. Determinación del potencial transmembranal -----	45
7.1.4. Determinación de la concentración de óxido nítrico -----	46
7.1.5. Determinación de la actividad de la citocromo <i>c</i> oxidasa -----	47
7.2. ACTIVIDAD DE LA CITOCROMO <i>c</i> OXIDASA EN MITOCONDRIAS DE HÍGADO Y RIÑÓN DE RATA DURANTE LA HIPERTENSIÓN -----	50
7.2.1. Introducción -----	50
7.2.2. Estrategia experimental -----	50
7.2.2.1. Aislamiento de mitocondrias de hígado y riñón de rata -----	50
7.2.3. Resultados -----	51
8. DISCUSIÓN -----	56
8.1. MODELO PROPUESTO -----	58
9. CONCLUSIONES -----	60

10. BIBLIOGRAFÍA -----	61
11. ANEXOS (publicaciones relacionadas con el trabajo de tesis) -----	69

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Anatomía del cerebro humano -----	2
Figura 2. Estructura de la mitocondria -----	6
Figura 3. Componentes de la membrana interna mitocondrial involucradas en la fosforilación oxidativa-----	8
Figura 4. Reacción de la óxido nítrico sintasa -----	13
Figura 5. Regulación del consumo de oxígeno por el NO [•] -----	16
Figura 6. Detección de la óxido nítrico sintasa mitocondrial en cerebro -----	17
Figura 7. Mecanismos del transporte de calcio a través de la mitocondria -	20
Figura 8. Grado de pureza mitocondrial -----	44
Figura 9. Actividad de la citocromo c oxidasa en mitocondrias de cerebro de ratas de 1 y 7 meses de edad en presencia de L-NMMA-----	49
Figura 10. Actividad de la citocromo c oxidasa en mitocondrias de cerebro de ratas de 1 mes de edad -----	52
Figura 11. Actividad de la citocromo c oxidasa en mitocondrias de cerebro de ratas de 7 meses de edad -----	53
Figura 12. Actividad de la citocromo c oxidasa en mitocondrias de cerebro de ratas de 1 mes de edad -----	55
Figura 13. Actividad de la citocromo c oxidasa en mitocondrias de cerebro de ratas de 7 meses de edad -----	55
Figura 14. Modelo propuesto -----	59

RESUMEN

La mitocondria contribuye directamente con la regulación de la concentración citosólica de calcio (Ca^{2+}). La concentración intramitocondrial de Ca^{2+} es regulada mediante un uniportador cuya función depende del potencial de membrana ($m\Delta\Psi$) generado en la cadena de transporte de electrones. Se han observado varias anomalías en el metabolismo de Ca^{2+} de ratas espontáneamente hipertensas (SHR). Las ratas SHR han sido usadas como un modelo de hipertensión humana. En el presente trabajo se evaluó si la funcionalidad mitocondrial se afecta durante la hipertensión, lo cual podría alterar el metabolismo de Ca^{2+} , así como la actividad de enzimas dependientes de este catión. Se utilizaron los valores de $m\Delta\Psi$ y de la actividad de la citocromo c oxidasa (complejo IV) como parámetros de la funcionalidad mitocondrial. Asimismo, se determinaron la concentración de Ca^{2+} intramitocondrial y la actividad de la óxido nítrico sintasa mitocondrial (NOSmt) dependiente de Ca^{2+} en ratas normotensas (WKY) e SHR de 1 y 7 meses de edad. La actividad basal del complejo IV fue mayor en ratas SHR de 1 mes de edad, mientras que la producción basal de L-citrulina (indicativo de la síntesis de óxido nítrico [NO^*]) fue menor en ratas SHR de 1 mes de edad. La síntesis de L-citrulina en las ratas WKY de 1 mes de edad fue dependiente de la concentración de Ca^{2+} ($p < 0.05$). No se observaron cambios significativos en la síntesis de L-citrulina en presencia de Ca^{2+} en las ratas SHR de 1 y 7 meses de edad, ni en las WKY de 7 meses de edad. La actividad basal del complejo IV en ratas SHR de 7 meses de edad fue menor en comparación a las WKY. El $m\Delta\Psi$ fue menor en las ratas SHR de 1 mes de edad comparado a las WKY, mientras que en las ratas de 7 meses de edad el $m\Delta\Psi$ disminuyó tanto en ratas SHR como en las WKY. La captación de Ca^{2+} fue menor en ratas SHR de 1 mes de edad que en ratas WKY de la misma edad. Estos datos muestran en las mitocondrias de cerebro de ratas SHR una disminución en la actividad basal del complejo IV dependiente de la edad lo cual fue paralelo a una disminución en el $m\Delta\Psi$, lo cual podría afectar la concentración y el transporte de Ca^{2+} en la mitocondria, así como la actividad de la NOSmt dependiente de Ca^{2+} . Estas alteraciones en el metabolismo energético mitocondrial podrían estar relacionadas con la disfunción mitocondrial y con una progresiva muerte neuronal reportada durante la hipertensión por otros estudios.

ABSTRACT

Mitochondria contribute directly with regulation of cytosolic calcium (Ca^{2+}) concentration. The intra-mitochondrial Ca^{2+} concentration is regulated via a Ca^{2+} uniporter whose function depends on membrane potential ($m\Delta\Psi$)-generated in the electron transport chain. Several abnormalities have been observed in the Ca^{2+} metabolism of spontaneously hypertensive rats (SHR), which are used as a model of human hypertension. In this work was evaluated whether mitochondrial functionality is affected during hypertension, which could affect Ca^{2+} metabolism, as well as the activity of the enzymes dependent on this cation. We utilized measurements of mitochondrial $m\Delta\Psi$ and cytochrome *c* oxidase activity (complex IV) as parameters of mitochondrial functionality. As well, we determined intramitochondrial Ca^{2+} levels and Ca^{2+} -dependent nitric oxide synthase (mtNOS) activity in 1 and 7-mo normotensive (WKY) and SHR rats. Basal complex IV activity was higher in 1-mo SHR, whereas the basal L-citrulline production (indicator of nitric oxide [NO^{\bullet}] synthesis) was decreased in SHR rats of 1-mo. L-citrulline synthesis in WKY of 1-mo was dependent on Ca^{2+} concentration ($p < 0.05$). There were not significant changes in L-citrulline synthesis in presence of Ca^{2+} in SHR rats of 1 and 7-mo neither WKY of 7-mo. Basal complex IV activity in SHR rats of 7-mo was lower than the activity measured in WKY animals. $m\Delta\Psi$ was lower in 1-mo SHR than 1-mo WKY rats, while in 7-mo animals, $m\Delta\Psi$ decreased both in SHR and WKY rats. Ca^{2+} uptake was lower in 1-mo SHR than 1-mo WKY rats. These data show that in brain mitochondria from SHR an age-dependent decrease on basal complex IV activity parallel to a diminished $m\Delta\Psi$, which may impair movements and levels of mitochondrial Ca^{2+} as well as Ca^{2+} -dependent NOS activity. These alterations in mitochondrial energetic metabolism could be related to mitochondrial dysfunction and progressive neuronal death reported during hypertension by other studies.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Sistema nervioso

El sistema nervioso controla y coordina las funciones de todo el cuerpo y responde a los estímulos internos y externos. Está compuesto de tres partes principalmente: la parte sensorial, el sistema nervioso central y la parte motora. El sistema nervioso central está formado por el encéfalo y la médula espinal. El cerebro constituye la parte anterior y superior del encéfalo; éste puede almacenar información, generar pensamientos y determinar las reacciones que el cuerpo experimenta como respuesta a las sensaciones. Después, se transmiten señales adecuadas a través de la parte motora del sistema nervioso para dar respuesta al estímulo captado (Guyton, 1992; West, 1993; Testut y Latarjet, 1997).

1.2. El cerebro

El cerebro es la porción principal del encéfalo de los vertebrados que ocupa la parte superior del cráneo. Una fisura profunda lo divide en dos mitades denominadas hemisferio derecho y hemisferio izquierdo, que son comunicados mediante el cuerpo calloso. Otras fisuras subdividen a cada hemisferio cerebral en cuatro lóbulos: frontal, occipital, temporal y parietal. De forma ovoide, este órgano tiene una longitud en los humanos de 17 cm, una anchura de 14 cm, 13 cm de altura y pesa aproximadamente 1.3 Kg (**Fig. 1**) (Testut y Latarjet, 1997).

El cerebro está constituido por alrededor de 10 millones de neuronas aferentes (de entrada y sensoriales), 50 mil millones de neuronas centrales y 0.5 millones de neuronas eferentes (salida o motoras), que son las vías a través de las cuales se transmite la información dentro de él, así como la maquinaria que lo hace trabajar. Hay miles de neuronas centrales por cada neurona de entrada o salida, proporcionando así abundantes circuitos, lo cual determina la función del cerebro (Villem, 1985; West, 1993; Carpenter, 1998).

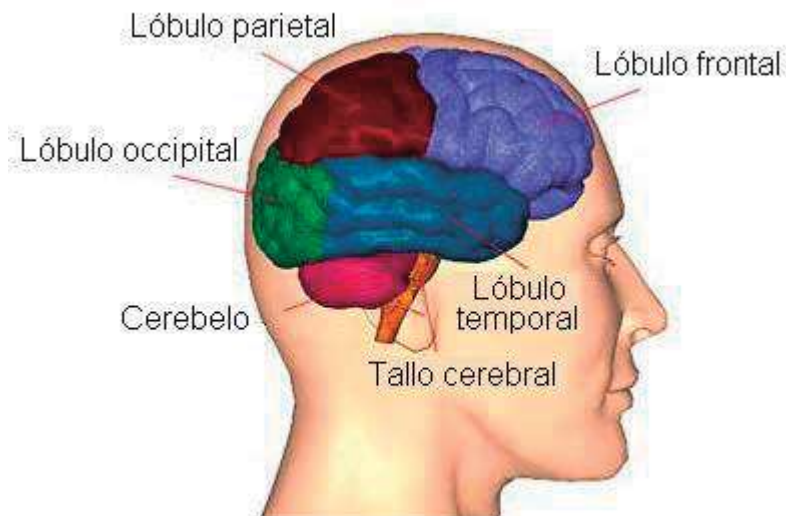


Figura 1. Anatomía del cerebro humano. Hemisferio derecho, vista lateral.
Tomada y modificada de Pashchuk (2007).

1.2.1. Metabolismo cerebral

En condiciones de reposo, el cerebro requiere alrededor del 15% del metabolismo energético total del cuerpo, aún cuando la masa del cerebro es sólo un 2% de la masa corporal total. En estas condiciones, el metabolismo del cerebro es 7 veces el metabolismo promedio del resto del cuerpo. La mayor parte del metabolismo cerebral tiene lugar en las neuronas y la otra parte en células gliales como los astrocitos. Del consumo energético del cerebro, aproximadamente el 60% se utiliza para mantener las funciones electrofisiológicas; es decir, para mantener los gradientes iónicos para la síntesis, el transporte y la recaptura de neurotransmisores. El resto de la energía consumida se emplea para las actividades propias de la homeostasis cerebral (Guyton, 1992).

En condiciones normales, el 90% de la energía necesaria para conservar los gradientes iónicos a través de las membranas celulares y transmitir los impulsos eléctricos, proviene de la glucosa, la cual entra al cerebro mediante un transportador que está en los capilares cerebrales. La glucosa es oxidada por la vía de la glucólisis y el ciclo de Krebs. Durante un ayuno prolongado, el cerebro utiliza cuerpos

cetónicos como fuente de energía. El cerebro necesita alrededor de 4×10^{21} moléculas de ATP cada minuto, por lo que este órgano es vulnerable a las interrupciones de suplemento de glucosa o de O_2 . Debido al metabolismo elevado que tienen las neuronas, se requiere mucha más energía que la necesaria para las demás células del organismo, por lo tanto, la capacidad de depósito de glucógeno en el cerebro es reducida ya que esta reserva es capaz de cubrir los requerimientos energéticos cerebrales por pocos minutos (Ganong, 1992; Guyton, 1992; Halliwell y Gutteridge, 1999).

El consumo de oxígeno por el encéfalo humano, es de 3.5 mol O_2 /100 g de tejido cerebral/min, lo cual representa aproximadamente 20% del consumo total de oxígeno bajo condiciones de reposo; para mantener este ritmo, necesita un flujo sanguíneo que en promedio es de 45-55 ml/100 g de tejido/min (Ganong, 1992). Una neurona utiliza una considerable cantidad de este oxígeno para la síntesis de ATP que es necesario para mantener el gradiente iónico (Na^+ , Ca^{2+} , K^+) (Halliwell y Gutteridge, 1999). Debido a la gran actividad neuronal, el cerebro depende del suministro constante de oxígeno por la sangre (Guyton, 1992). Las neuronas también requieren energía para la apertura de canales iónicos de las terminales nerviosas para permitir la entrada de Ca^{2+} , llevando así a la liberación de neurotransmisores por excitación en la sinapsis. Existen grupos de neuronas asociadas específicamente a uno o varios neurotransmisores, entre los cuales se incluyen: dopamina, acetilcolina, serotonina, noradrenalina, glicina y glutamato, los cuales se unen a receptores presentes en las neuronas blanco (Halliwell y Gutteridge, 1999).

1.2.2. Circulación sanguínea cerebral

En el humano, el flujo arterial hacia el encéfalo llega por cuatro arterias: dos carótidas internas y dos vertebrales. Estas últimas se unen para formar la arteria basilar y el círculo de Willis que está formado por las carótidas y la arteria basilar, es el origen de los seis grandes vasos que riegan la corteza cerebral. En el humano sólo una pequeña fracción del flujo arterial total es llevada por las arterias vertebrales (Ganong, 1992).

La circulación sanguínea normal para la totalidad del cerebro de un humano adulto es de aproximadamente 750 ml/min, lo cual corresponde al 15% del total del gasto cardíaco en reposo (Ganong, 1992; Guyton, 1992).

El flujo sanguíneo cerebral está estrechamente acoplado al metabolismo cerebral (Ganong, 1992; Guyton, 1992). Algunos factores metabólicos importantes que controlan el flujo sanguíneo cerebral son las concentraciones de CO₂, H⁺ y O₂ (Guyton, 1992).

El flujo sanguíneo cerebral está regulado entre los límites de la presión arterial de 60 y 140 mm/Hg (Ganong, 1992; Guyton, 1992). En individuos hipertensos, este margen de autorregulación se desplaza hacia presiones más elevadas, del orden de 180-200 mm/Hg, (Guyton, 1992). Esta patología ha sido reconocida como uno de los más importantes factores de riesgo de infarto cerebral (Bordet et al., 2000).

1.3. La mitocondria

Las mitocondrias son orgánulos intracelulares presentes en los organismos eucariontes. Se consideran las centrales energéticas de la célula ya que por medio de reacciones acopladas de oxidación y reducción, captan la energía contenida en las moléculas combustibles y producen otras formas de energía química (Lehninger, 1964). Estos orgánulos varían en tamaño, forma, número y localización dependiendo del tipo de célula o función del tejido. Las dimensiones de la mitocondria son de aproximadamente 0.5 µm de diámetro y 1.0 µm de longitud. La mayoría de las células de plantas y animales contienen varios cientos a miles de mitocondrias (Lehninger et al., 2000; Voet et al., 2002).

1.3.1. Estructura y distribución de las enzimas de la mitocondria

La estructura típica de la mitocondria consiste de dos membranas, una externa, que es lisa, y otra interna, que presenta numerosas invaginaciones conocidas como crestas, con lo que se forman dos compartimientos, uno externo que corresponde a un espacio limitado por las dos membranas, denominado espacio

intermembranal, y otro espacio interno, limitado solamente por la membrana interna llamado matriz mitocondrial (**Fig. 2**) (Medina, 1995).

La membrana mitocondrial externa está compuesta por alrededor del 30-40% de lípidos y del 60-70% de proteínas y ahí se encuentran las enzimas de la oxidación de los aminoácidos, de la biosíntesis de los ácidos grasos y de los fosfolípidos de membrana, entre otras (Mathews y Van Holde, 1996; Devlin, 2002). Su principal componente incluye a una proteína de 283 aminoácidos denominada canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC por las siglas en inglés de *voltage-dependent anionic channel*) o porina, cuya función es formar un canal acuoso para el movimiento de metabolitos de naturaleza aniónica (fosfato, ADP, ATP, piruvato) hacia adentro y afuera de la mitocondria. El VDAC se une de manera reversible a cinasas como la glicerol cinasa y la hexocinasa (Blachly et al., 2002; Le Mellay et al., 2002). Otro componente proteico importante de la membrana externa lo constituye la translocasa de la membrana externa (TOM por las siglas en inglés de *translocase of outer membrane*), cuya función es el reconocimiento y la translocación de proteínas importadas por la mitocondria desde el citosol (Meisinger et al., 2001).

La membrana interna está formada por aproximadamente 80% de proteínas y es rica en ácidos grasos insaturados (Devlin, 2002). Es impermeable a la mayoría de los iones y moléculas, a excepción del O₂, CO₂ y H₂O. Esto permite el establecimiento del potencial transmembranal ($\Delta\Psi$) y evita pérdidas en el mismo debidas a la tendencia termodinámica de los iones a igualar las cargas eléctricas y su concentración en ambos lados de la membrana. Esta membrana aloja a las proteínas de la cadena respiratoria y proteínas transportadoras (González-Halphen y Vázquez-Acevedo, 2002).

En la matriz mitocondrial se encuentran las enzimas solubles del metabolismo, como son las del ciclo de Krebs y la oxidación de los ácidos grasos. Además, se encuentran sustratos, iones inorgánicos y cofactores, así como el ADN, ARN

mitocondrial y ribosomas que generan varias proteínas mitocondriales (Voet et al., 2002).

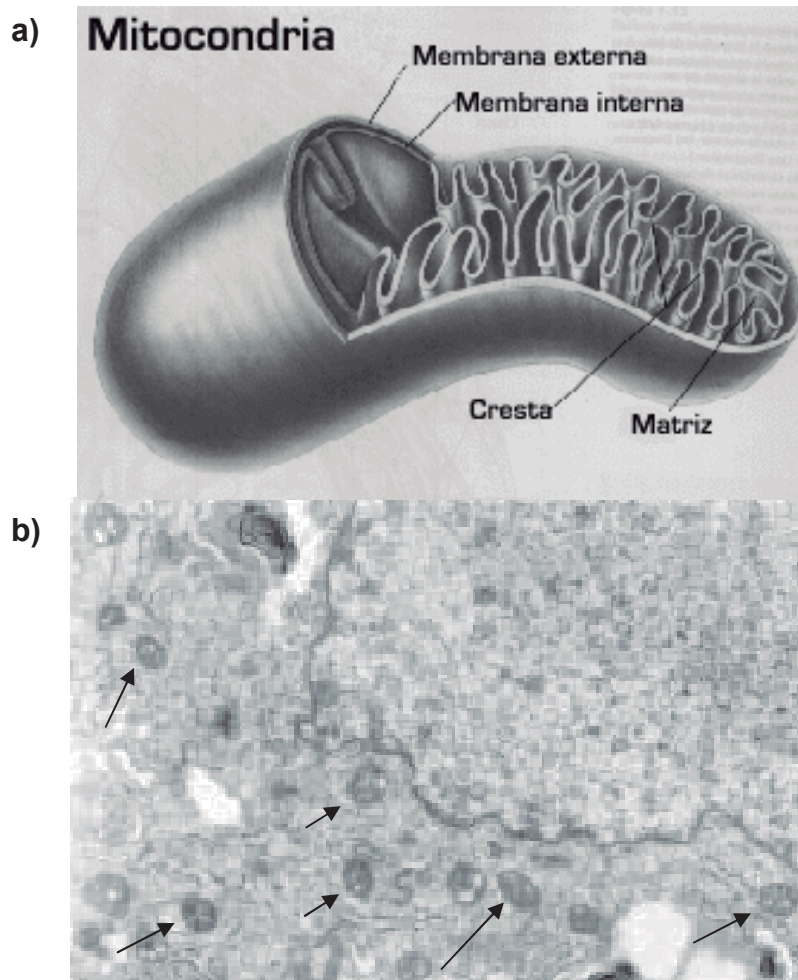


Figura 2. Estructura de la mitocondria. a) Modelo típico de la mitocondria **b)** Sección de micrografía electrónica de transmisión correspondiente a una célula mamaria diferenciada (HC11 IM), evidenciando variadas mitocondrias (flechas). 23.000 X. (Rawn, 1989; Cornejo, 2007)

1.3.2. Cadena respiratoria

La cadena respiratoria es un ensamble de más de 20 captadores de electrones capaces de experimentar cambios reversibles en su estado redox. Se encuentran principalmente asociados, ya sea de manera covalente o no covalente, a estructuras proteicas oligoméricas que forman grandes complejos enzimáticos embebidos de manera parcial en la membrana interna de la mitocondria. Tres de esos complejos (I, III y IV) funcionan como bombas redox que acoplan el transporte de electrones a la translocación vectorial de protones, a través de la membrana interna (Álvarez et al., 1994; Nicholls y Ferguson, 2002). Algunos de esos acarreadores de electrones (ubiquinona y citocromo *c*) tienen una estructura más sencilla y sirven para conectar eléctricamente a los complejos respiratorios. La estructura de la membrana interna mitocondrial permite fijar los componentes de la cadena respiratoria en un ordenamiento secuencial que facilita la transferencia de electrones entre ellos, lo que determina una alta velocidad y eficiencia del sistema (Álvarez et al., 1994). Durante las reacciones enzimáticas involucradas en la glucólisis, en la oxidación de ácidos grasos y en el ciclo de Krebs, los equivalentes reductores [nicotinamida adenindinucleótido reducido (NADH) y dinucleótido de flavina y adenina reducido (FADH₂)], generados por la oxidación de moléculas en dichas vías metabólicas, inician la fosforilación oxidativa. La cadena respiratoria transfiere los electrones del NADH o FADH₂, generados por la oxidación de nutrientes, hasta el O₂. La energía liberada por las reacciones redox que se llevan a cabo en los complejos es almacenada en forma de un gradiente electroquímico de protones que es responsable de la generación del $\Delta\Psi$, el cual es usado por la ATP sintasa para la formación de ATP a partir de ADP y Pi (**Fig. 3**) (Lehninger et al., 2000). El $\Delta\Psi$ es necesario también para el transporte iónico y de proteínas.

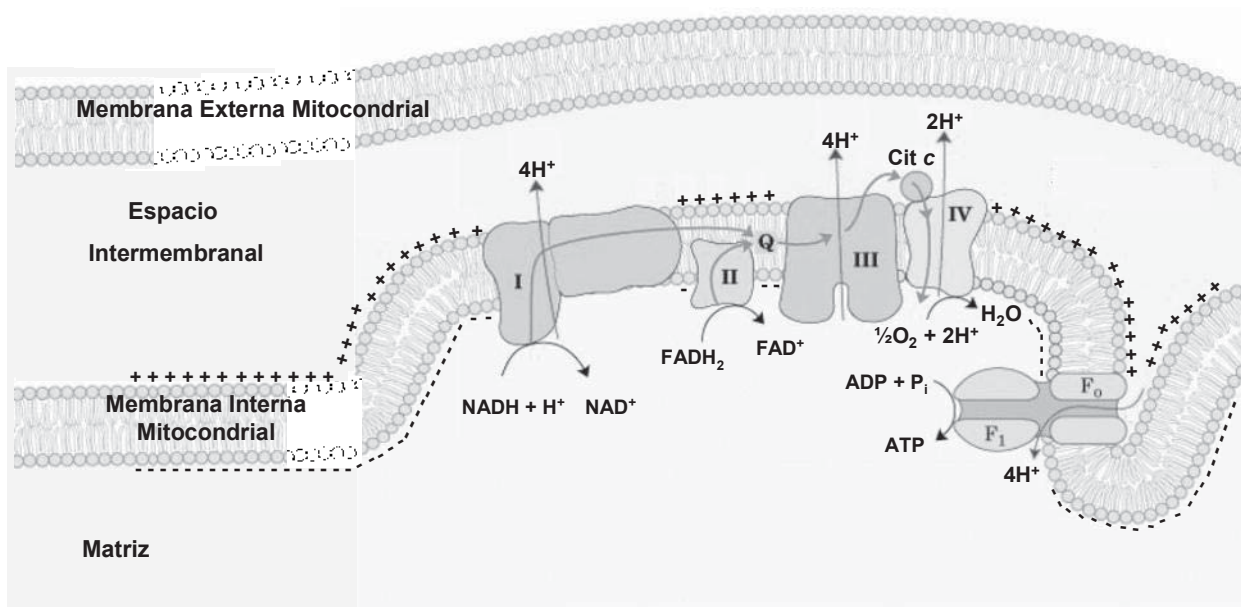


Figura 3. Componentes de la membrana interna mitocondrial involucradas en la fosforilación oxidativa. NADH-deshidrogenasa (complejo I), succinato deshidrogenasa (complejo II), ubiquinol-citocromo c oxidoreductasa (complejo III), citocromo oxidasa (complejo IV) y ATP sintasa. Tomado y modificado de Lehninger et al. (2000).

La cadena transportadora de electrones consta de los siguientes componentes:

I. NADH-Ubiquinona oxidorreductasa (complejo I). Este complejo acopla la transferencia de los electrones del NADH hacia la ubiquinona con el bombeo de cuatro protones hacia el espacio intermembranal. El complejo I consta de 46, subunidades de las cuales 39 están codificadas en el DNA nuclear y siete por el DNA mitocondrial (Antonicka et al., 2003). La estructura tridimensional a 22 Å del complejo I de mitocondrias de corazón de bovino, muestra que este complejo tiene una forma de L que consta de un dominio membranar intrínseco y otro dominio globular orientado hacia la matriz y unido a la membrana por un delgado tallo. El dominio globular contiene el sitio de unión del NADH, mientras que el dominio membranar

contiene el sitio de unión de la ubiquinona y la región del tallo constituye, en parte, la vía de transferencia de los electrones entre dichos dominios (Grigorieff, 1998).

En el dominio membranal residen de dos a tres moléculas de ubiquinona que aceptan a los electrones del NADH. El dominio globular tiene 1 molécula de mononucleótido de flavina (FMN) y se han observado hasta nueve centros hierro-azufre que participan en la transferencia de los electrones desde el NADH hacia el dominio membranal (Grigorieff, 1998).

El complejo I se inhibe con rotenona, piericidina A, amital, y otros compuestos naturales y sintéticos que tienen como característica común una estructura con una cabeza cíclica, que corresponde al anillo de la ubiquinona, y una cola hidrofóbica, que corresponde a las unidades de isopreno (Pardo et al., 2001a).

II. Succinato-Ubiquinona Oxidorreductasa (complejo II). El complejo II es una enzima que participa en la cadena respiratoria y en el ciclo de Krebs. Pertenece a una familia de enzimas de membrana que cataliza la oxidación del succinato a fumarato, acoplada a la reducción de la ubiquinona en la membrana. La reacción de oxidorreducción no está acoplada con la translocación de protones a través de la membrana. Esta enzima contiene un dominio periférico, expuesto a la matriz mitocondrial, formado por dos subunidades en donde se localiza como grupo prostético una molécula de dinucleótido de flavina y adenina (FAD) y varios centros hierro-azufre, los cuales participan en la transferencia de los electrones. En el dominio membranal se encuentran los sitios de unión para la ubiquinona, además de presentar uno o dos grupos hemo.

El malonato y el oxaloacetato son potentes inhibidores que compiten con el sustrato dicarboxílico por la unión al sitio activo de este complejo (Pardo et al., 2001b).

III. Ubiquinol-Citocromo c Oxidorreductasa (complejo III). El complejo III o complejo bc_1 , es un complejo proteico oligomérico de membrana que transfiere dos electrones desde un quinol de relativamente bajo potencial redox a un citocromo c y bombea cuatro protones al lado electropositivo de la membrana por cada par de electrones transferidos a dos moléculas de citocromo c (Trumpower, 1990). Para la función catalítica del complejo III, únicamente son necesarias tres de sus subunidades, las cuales contienen los grupos prostéticos de la enzima: el citocromo b, la proteína Fe-S de Rieske y el citocromo c_1 (Kessl et al., 2003).

IV. Citocromo c Oxidasa (complejo IV). Es el último de los complejos que participan en la cadena transportadora de electrones y cataliza la transferencia de cuatro electrones provenientes de cuatro moléculas de citocromo c reducido hacia una molécula de oxígeno, produciendo dos moléculas de agua y consumiendo cuatro protones. La energía libre disponible de esta reacción está acoplada a la translocación de cuatro protones adicionales (Michel, 1998). Este complejo está formado por 13 subunidades, en donde la unidad catalítica mínima de esta enzima está formada por las subunidades I y II, las cuales contienen los centros redox que participan en la oxidación del citocromo c y en la reducción del oxígeno. La subunidad I está formada por tres centros redox: un hemo a de bajo espín, otro hemo a de alto espín y un centro cobre Cu_B . Estos dos últimos forman el centro binuclear a_3-Cu_B . Por otro lado, la subunidad II contiene dos átomos de cobre Cu_A , unidos a través de dos residuos de cisteína, que se encarga de recibir los electrones del citocromo c desde afuera de la membrana y, a través del hemo a, son dirigidos hacia el sitio activo binuclear de unión al O_2 hemo a_3-Cu_B (Nyquist et al., 2003). Esta enzima también presenta un ión Mg^{2+} y un ión Zn^{2+} , en donde el primero participa en la estabilización del arreglo de los centros redox, mientras que la función del Zn^{2+} es estructural más que catalítica, por lo que se localiza lejos de los centros redox (Pardo et al., 2001d).

V. ATP sintasa. También conocida como F_1F_0 ATPasa, es una proteína transmembranal. Esta enzima funciona en forma reversible: puede sintetizar ATP

usando la fuerza protomotriz generada por el $\Delta\Psi$ a través de la membrana y puede hidrolizar ATP para bombear protones contra un gradiente electroquímico. La ATP sintasa está compuesta de dos unidades funcionales, la F_0 y la F_1 . La F_0 es un canal transmembranal de protones que contiene al menos ocho diferentes tipos de subunidades; la F_1 es una proteína membranal periférica compuesta por cinco subunidades (Saraste, 1999; Voet et al., 2002).

VI. Ubiquinona. La ubiquinona (2,3-dimetoxi-5-metil-6-multiprenil-1,4-benzoquinona), o coenzima Q, es un compuesto soluble en lípidos, constituido por un núcleo quinoide que sufre cambios redox y una cadena lateral hidrofóbica que consta de varias unidades isoprenoides monoinsaturadas. El ubiquinol es el producto de la reducción de dos electrones de la ubiquinona (Frei et al., 1990).

La principal función biológica de la ubiquinona es el transporte de electrones entre sistemas transmembranales, como los de la cadena transportadora de electrones, donde funciona como acarreador de electrones desde los complejos I y II hacia el complejo III. Además de esta función, la ubiquinona en su estado reducido ha sido reconocida como un potente antioxidante (Mellors y Tappel, 1966), protegiendo a los fosfolípidos, a las proteínas de membrana y al ADN mitocondrial del estrés oxidativo (Forsmark-André y Ernster, 1994).

VII. Citocromo c. El citocromo c es una pequeña proteína globular hidrofílica con un peso molecular de 13000 Da. Contiene un grupo hemo planar localizado en la mitad de la proteína, rodeado por residuos hidrófobos y unido de manera covalente por dos residuos conservados de cisteína. El Fe^{3+} en el anillo de porfirina está coordinado al nitrógeno de una histidina y a un átomo de azufre de una metionina, previniendo de este modo la interacción del hemo con el oxígeno (Guérin, 1989).

La función de esta proteína es mediar el transporte de electrones entre el complejo III y el complejo IV, sufriendo cambios redox en un electrón durante el proceso. El citocromo c es aparentemente capaz de moverse a lo largo de la

membrana para hacer colisiones efectivas entre estos dos complejos, gracias a que se une débilmente a la cara externa de la membrana interna mitocondrial por fuerzas electrostáticas (Beattie, 2002). Otra función importante que tiene el citocromo c es su participación en el proceso de apoptosis, debido a que esta proteína puede abandonar el espacio intermembranal e interactuar con componentes citosólicos como el factor activador de la proteasa apoptótica (Apaf-1) para inducir la activación de la caspasa-9 y con ello la cascada de las caspasas; de esta manera se estimula la cascada de degradación apoptótica (Petit, 2001; Cascales, 2003).

1.4. Óxido nítrico

El óxido nítrico (NO[•]) es un radical libre, de vida media corta, generado por varios tejidos biológicos (López-Figueroa et al., 2000; Orsi et al., 2000). Debido a su bajo peso molecular (30 Da), a su naturaleza hidrofóbica y a su baja reactividad, el NO[•] difunde aproximadamente 140 μm de distancia a través de las membranas y células, así como de las paredes celulares de bacterias y hongos, en donde desempeña diversas funciones fisiológicas, como la neurotransmisión, la respuesta inmune y la regulación de la cadena de transporte de electrones de la mitocondria, además de funcionar como molécula antiinflamatoria, antitrombótica y antiproliferativa. La formación de NO[•] en las células del endotelio vascular regula el tono vascular, que es esencial para la regulación del flujo y la presión sanguínea (Michel et al., 1993; Alp et al., 2004).

1.5. Óxido nítrico sintasa

El NO[•] es sintetizado por una familia de enzimas denominadas óxido nítrico sintasas (NOS). Estas enzimas requieren de oxígeno molecular y NADPH para catalizar la oxidación del nitrógeno guanidino de la L-arginina para producir NO[•] y L-citrulina (Marletta, 1993; Li et al., 2006). La formación del NO[•] procede en dos pasos y consiste en la oxidación de 5 electrones de la L-arginina, dos electrones son provistos por el NADPH para producir N^ω-hidroxi-L-arginina, seguida de una oxidación de tres electrones del nitrógeno hidroxilado para formar NO[•] y citrulina en forma equimolar (**Fig. 4**) (Marletta, 1993; Li et al., 2006).

En los mamíferos, existen tres isoformas de la NOS, codificadas por distintos genes, con diferente regulación, propiedades catalíticas y sensibilidad a inhibidores. Dos de estas isoformas se expresan de manera constitutiva, las cuales son denominadas óxido nítrico sintasa neuronal (NOSn) y óxido nítrico sintasa endotelial (NOSe) (también denominadas, NOS I y III, respectivamente). Una tercera isoforma es la óxido nítrico sintasa inducible (NOSi) (denominada también NOS II) la cual es sintetizada en respuesta a estímulos inmunológicos o inflamatorios. La expresión de la NOSi puede ayudar a modular la respuesta inmune; sin embargo, su expresión también está implicada en numerosas enfermedades inflamatorias (Alderton et al., 2001; Chen et al., 2002).

Todas las isoformas utilizan tetrahydrobiopterina (BH₄), FAD, FMN y nicotinamida adenindinucleótido fosfato reducido (NADPH) como cofactores y en el caso de la NOSn y NOSe requieren de Ca²⁺/calmodulina (CaM) para su máxima actividad, siendo menos sensible a este complejo la NOSi (Brookes, 2004).

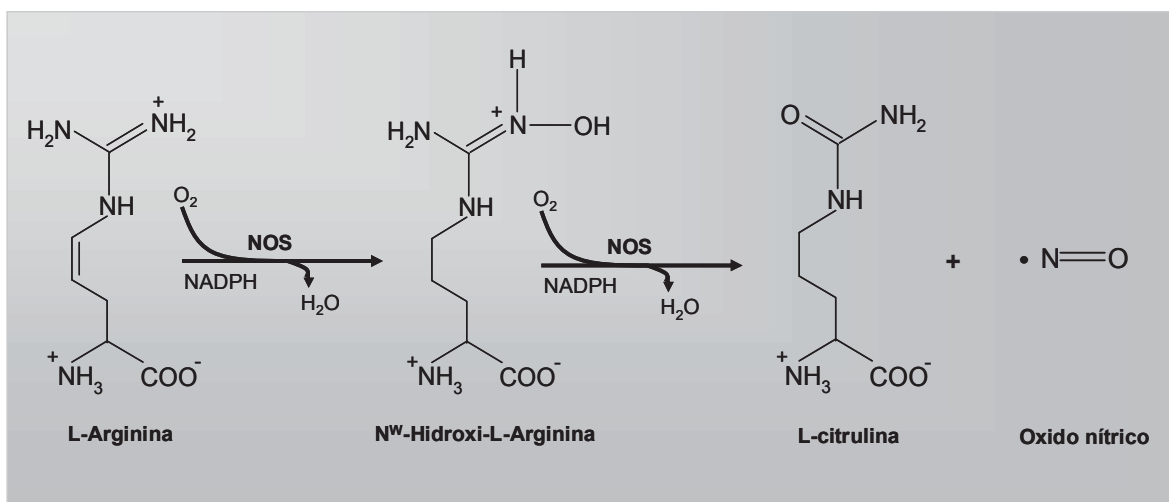


Figura 4. Reacción de la óxido nítrico sintasa. La óxido nítrico sintasa (NOS) cataliza la oxidación de cinco electrones del nitrógeno guanidino de la L-arginina para generar óxido nítrico y L-citrulina, con la formación del intermediario N^ω-Hidroxi-L-arginina. Tomada y modificada de Titheradge (1998).

La NOS es activa como un homodímero; cada subunidad presenta un dominio reductasa y un dominio oxigenasa. El dominio oxigenasa N-terminal contiene los

sitios de unión para el hemo y la BH₄ que unen y oxidan a la L-arginina. En el dominio reductasa se encuentran los sitios de unión para el FAD y el FMN, los cuales catalizan la transferencia de electrones del NADPH al hemo. La presencia de CaM aumenta la velocidad de transferencia de los electrones, desde el NADPH en el dominio reductasa hasta el centro hemo en el dominio oxigenasa (Gorren et al., 2002; Wei et al., 2002).

1.5.1. Inhibidores de las óxido nítrico sintasas

Existen varios inhibidores de la NOS, tales como el N^ω-monometil-L-arginina (L-NMMA), el N^ω-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), el N5-1-iminoetil-L-ornitina (L-NIO), entre otros, que actúan como inhibidores competitivos ya que contienen un grupo guanidino en su estructura, con el cual se pueden unir de manera no-covalente al sitio de unión de la L-arginina (Griffith y Stuehr, 1995; Babu et al., 1999). Los inhibidores no competitivos se unen a un grupo funcional de la enzima, situado fuera del centro activo, que es esencial para mantener la conformación tridimensional catalíticamente activa de la enzima, de modo que sus efectos no se anulan al aumentar la concentración del sustrato. Un ejemplo de este tipo de inhibición es el dado por el 7-Nitroindazol, el cual se une al grupo hemo de la NOS (Wolf et al., 1994).

1.5.2. Óxido nítrico mitocondrial

El NO[•] se ha convertido en un importante tema de estudio debido a la variedad de funciones biológicas que se le han encontrado en el humano. Una serie de estudios acerca de los posibles blancos del NO[•] dentro de la célula llevaron al descubrimiento de que la mitocondria es uno de los mas importantes blancos para el NO[•] debido su alta reactividad con los grupos hemo y sulfhidriilo contenidos en cantidades importantes en las proteínas de la cadena de transporte de electrones (p. ej.: los complejos III y IV). Además, el NO[•] reacciona con el O₂^{•-}, el cual se genera principalmente en la mitocondria, para formar la especie oxidante peroxinitrito, la cual puede ser altamente dañina para la célula (Ghafourifar y Saavedra Molina, 2006).

Lo anterior dio lugar a intensas investigaciones acerca del papel funcional del NO[•] en la mitocondria, encontrándose que el NO[•] regulaba el consumo de oxígeno mitocondrial en las células de diferentes órganos de rata (Ghafourifar y Saavedra Molina, 2006). Este hallazgo sugirió la existencia de una NOS mitocondrial, por lo que se realizaron diferentes estudios para determinar la presencia de esta enzima en la mitocondria.

Los primeros estudios en relación a la existencia de esta enzima fueron realizados por Bates y col. (1996), quienes demostraron, mediante técnicas de inmunocitoquímica y de microscopía electrónica, la presencia de la isoforma endotelial de la NOS localizada en la membrana mitocondrial interna en mitocondrias de hígado y cerebro de rata. Por otro lado, otro grupo de investigación demostró en mitocondrias de hígado de rata la presencia de una nueva isoforma de la NOS asociada a la membrana interna la cual fue designada como óxido nítrico sintasa mitocondrial (NOSmt), (Tatoyan y Giulivi, 1997; Ghafourifar y Richter, 1997) y a la que se le encontró un efecto inhibitorio sobre la respiración mitocondrial y el potencial de membrana (Ghafourifar y Richter, 1997, (Brown, 2001)). A este respecto, Giulivi (1998) determinó que el efecto inhibitorio que ejerce el NO[•] sobre la respiración mitocondrial y la síntesis de ATP, se lleva a cabo a nivel del complejo IV, debido a que la actividad de este complejo se inhibe en presencia de L-arginina, sustrato de la NOS; dicha inhibición fue eliminada con la adición de un inhibidor de la NOS, el L-NMMA, lo cual indicaba una interacción del NO[•] con el complejo IV, la cual se lleva cabo de manera reversible mediante la competencia con el O₂ por el sitio binuclear Cu_B/citocromo a₃ del complejo IV (**Fig. 5**) (Antunes et al., 2007).

Respecto al origen de la NOSmt, Kanai y col. (2001), trabajando con ratones knockout en las diferentes isoformas de la NOS, encontraron una posible relación entre la NOSmt y la NOSn, ya que la producción de NO[•] estimulada con Ca²⁺ no se observó en las mitocondrias provenientes de ratones knockout en la NOSn. De igual forma, Elfering y col. (2002) utilizando diversos métodos [espectrometría de masas, análisis por MALDI-TOF, determinación de peso molecular, determinación del punto

isoeléctrico (pI) y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)], determinaron que en mitocondrias de hígado de rata la NOSmt tenía similitud con la NOSn y que esta enzima sufría dos modificaciones postraduccionales: una acilación con ácido mirístico y una fosforilación en el carbonilo terminal, lo que permite a la NOSmt anclarse a la membrana interna mitocondrial (**Fig.6**).

Por otra parte, la determinación de la características cinéticas de la NOSmt mostraron que esta enzima al igual que las otras isoformas, requiere de los cofactores BH_4 , FAD, FMN, NADPH y Ca^{2+} para su máxima actividad, siendo el Ca^{2+} uno de los cofactores más importantes para su actividad (Riobó et al., 2002).

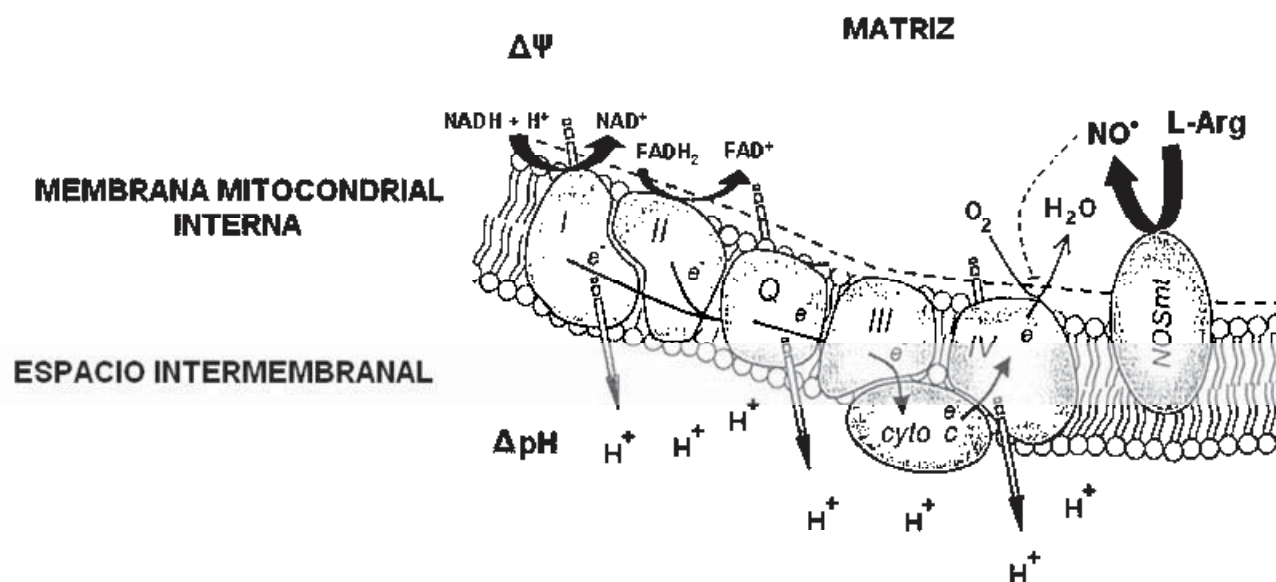


Figura 5. Regulación del consumo de oxígeno por el NO[•]. El NO[•] sintetizado por la óxido nítrico sintasa mitocondrial (NOSmt) inhibe el complejo IV de la cadena respiratoria, regulando así el consumo de oxígeno, el ΔΨ, el ΔpH y la síntesis de ATP. Tomada y modificada de Ghafourifar (2002).

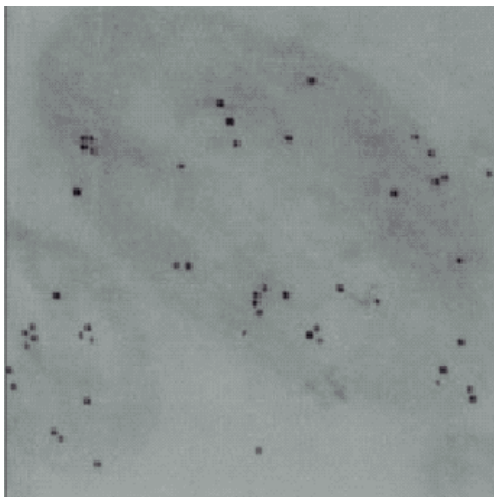


Figura 6. Detección de la óxido nítrico sintasa mitocondrial (NOSmt) en cerebro. La detección específica de la NOSmt fue realizada mediante microscopía inmunoelectrónica. La utilización de anticuerpos anti-NOSn reveló la presencia de una NOS ubicada en la membrana interna mitocondrial. Tomada y modificada de Riobó et al. (2002).

1.6. Calcio

El calcio (Ca^{2+}) es un catión divalente muy importante para los seres vivos. La mayor parte del Ca^{2+} está inmovilizado en los huesos y dientes como hidroxapatita $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$. Una cantidad relativamente pequeña se encuentra en los fluidos intracelulares y extracelulares (Denton y McCormack, 1990).

La concentración de Ca^{2+} libre en el citosol, $[\text{Ca}^{2+}]_c$, es controlada por la captación y liberación de este catión a través de tres compartimientos: la membrana plasmática, la membrana mitocondrial interna y el retículo endoplásmico. Cada membrana posee varios canales, uniportadores, antiportadores y ATPasas, los cuales regulan y modulan la concentración intracelular de Ca^{2+} (Nicholls, 1986; Saris y Carafoli, 2005).

El calcio extracelular total se encuentra en concentraciones de 4 a 5 mM, pero la mayor parte está unido a proteínas o ácidos orgánicos, quedando libre en una concentración de entre 1.5 a 2.0 mM. El calcio citosólico total se encuentra entre 1 y

2 mM, mientras que el calcio citosólico libre alcanza una concentración de entre 0.1 y 1 μM , mientras que el calcio libre intramitocondrial se encuentra entre 0.05 y 0.3 μM (Lehninger, 2002).

En muchas de las células que responden a señales extracelulares, el Ca^{2+} desempeña un papel de segundo mensajero al estimular respuestas intracelulares; es decir, activando las células para llevar a cabo sus funciones; tales como, la transmisión de estímulos nerviosos, la contracción muscular, el movimiento celular, la producción y liberación de hormonas, la respuesta a agentes extraños, la producción de jugo pancreático y gástrico, y como activador de enzimas (McCormack y Denton, 1993; Brini, 2003; Bianchi, 2004).

El estímulo, ya sea neuronal, hormonal o de otro tipo, causa un aumento en la concentración de Ca^{2+} citosólico, por lo que la concentración de este catión necesita regresar a su estado basal a través de canales específicos presentes en la célula (Lehninger, 2002).

1.6.1. Calcio intramitocondrial

La mitocondria posee un sistema específico para la regulación de la concentración del Ca^{2+} citosólico, formado por un uniportador por el cual el Ca^{2+} entra a la mitocondria y funciona aprovechando la energía generada durante la fosforilación oxidativa en la membrana interna mitocondrial. La salida del Ca^{2+} es controlada por un antiportador $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^{+}$ presente en mitocondrias de corazón, cerebro y músculo esquelético, y por el antiportador $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ presente en hígado, riñón, músculo liso y pulmón (**Fig. 7**) (Bringold et al., 2000; Nicholls, 2004).

La función principal de este sistema de transporte es transmitir, hacia la mitocondria, cambios en las concentraciones de Ca^{2+} citosólico, lo cual estimula procesos que requieren energía en el citosol hacia la matriz mitocondrial donde el Ca^{2+} estimula varios pasos claves en la producción de energía (McCormack y Delton, 1993). El principal mecanismo es la entrada de Ca^{2+} a la mitocondria vía el

uniportador seguida por la activación de tres deshidrogenasas en la matriz mitocondrial: la piruvato deshidrogenasa, la isocitrato deshidrogenasa y la α -cetoglutarato deshidrogenasa (Gunter et al., 2004; Satrústegui et al., 2007). De igual manera, la NOSmt puede ser activada por este catión y así el NO^\bullet sintetizado por esta enzima puede regular el transporte de electrones (Dedkova et al., 2004; Ghafourifar y Cadenas, 2005).

El uniportador de Ca^{2+} puede ser inhibido fisiológicamente por Mg^{2+} y artificialmente por rojo de rutenio. Por otra parte, es activado por poliaminas como la espermina. El antiportador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ es inhibido por Mg^{2+} , Ca^{2+} , tetrafenil fosfonio, trifluoroperazina, diltiazem, verapamil, clonazepam y amilorida, mientras que el antiportador $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ es inhibido por tetrafenil fosfonio y cianuro (McCormack y Delton, 1993; Gunter et al., 2004).

El Ca^{2+} es un efector positivo de la función mitocondrial, por lo que una desregulación en la homeostasis de Ca^{2+} mitocondrial y citosólico puede tener implicaciones graves en la función celular, por ejemplo, a nivel de la síntesis de ATP y así jugar un papel importante en varias patologías (Brookes et al., 2004).

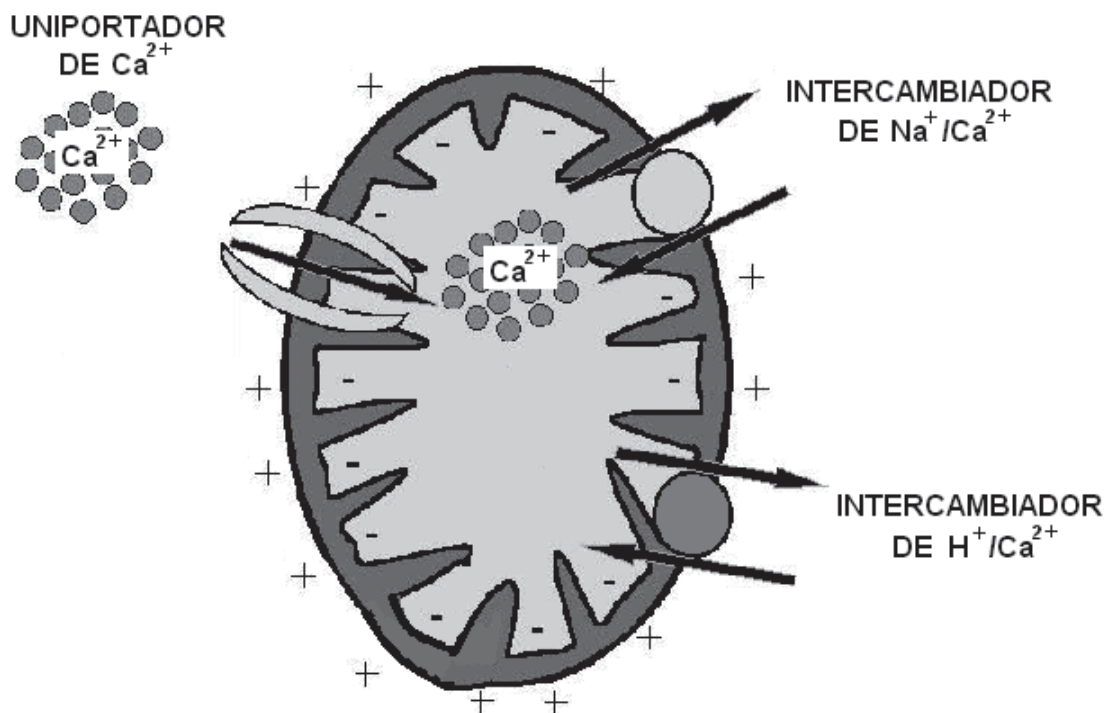


Figura 7. Mecanismos del transporte de calcio a través de la mitocondria. La entrada de calcio (Ca^{2+}) está dada por un uniprotector., mientras que la salida de Ca^{2+} está dada por el antiportador (intercambiador) H^+/Ca^{2+} y Na^+/Ca^{2+} dependiendo del tejido del cual provienen las mitocondrias. Tomada y modificada de Campanella et al (2004).

1.7. Hipertensión

La presión arterial se define como la fuerza ejercida por la sangre contra cualquier área de la pared arterial. La presión arterial es controlada por el gasto cardiaco y la resistencia periférica; sin embargo, ninguno de ellos la controla de manera absoluta porque a su vez éstos dependen de otros factores fisiológicos que influyen en la presión arterial (Ganong, 1993; West, 1993; Secretaría de Salud, 2001), siendo el endotelio vascular el principal regulador del tono vascular a través de la liberación de sustancias vasoactivas que controlan la relajación y la contracción del músculo liso vascular (Taddei et al., 1998; Pereira, 2000).

Los trastornos en la regulación del tono vascular conducen a la disfunción endotelial debido al estrés causado por el flujo sanguíneo que se asocia con

enfermedades cardiovasculares como la aterosclerosis, la hipertensión, la insuficiencia cardíaca y la diabetes mellitus, entre otras (Dohi et al., 1996; Halliwell y Gutteridge, 1999; Pereira, 2000).

En la hipertensión, la presión diastólica se encuentra por arriba de 90 mm/Hg, mientras que la presión sistólica es mayor de 140 mm/Hg (Guyton, 1991; West, 1993). En el 90% de los casos no se conocen las causas de la presión arterial alta (hipertensión primaria), aunque en una pequeña proporción pueden identificarse formas secundarias de hipertensión causadas por una serie de enfermedades como tumores suprarrenales, enfermedad renal u otras causas específicas (Ganong, 1993; West, 1993).

La prevalencia de la hipertensión aumenta con la edad, aparece desde la juventud hasta llegar a afectar a más de la mitad de la población después de los 55 años de edad. Esta situación es reflejo de la acción de los factores de carácter ambiental, que actúan de manera sinérgica a lo largo de la vida.

La hipertensión es uno de los problemas de salud con mayor impacto económico y social en el mundo, debido a la relación que existe entre este padecimiento y las muertes por complicaciones vasculares en órganos blanco (corazón, cerebro, riñón y vasos sanguíneos), ya que esta patología incrementa el trabajo a que es sometido el corazón, aumenta el riesgo de accidente vascular cerebral, ataque cardíaco y enfermedad renal, entre otras (Secretaría de Salud, 2001).

La patogénesis de la hipertensión puede involucrar varios factores, como la predisposición genética y la exposición a toxinas. Un mecanismo que contribuye a la hipertensión es el aumento en la generación de $O_2^{\bullet-}$ en la pared de los vasos (Halliwell y Gutteridge, 1999; Touyz, 2004), lo que puede ser reflejo de un desbalance en la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y defensas antioxidantes (estrés oxidativo), así como a la disminución en la biodisponibilidad de

moléculas vasodilatadores, como es el caso del NO^{*}, llevando así al daño vascular. El estrés oxidativo puede promover lipoperoxidación, daño al DNA y modificación de proteínas, lo cual a su vez puede causar daño celular y tisular (Vaziri et al., 2000, Touyz, 2004).

La hipertensión es un factor de riesgo para enfermedades cerebro-vasculares, debido a que daña particularmente a un órgano vulnerable o propenso al daño oxidativo como el cerebro. Aunque todos los órganos pueden sufrir daño oxidativo, el cerebro es el órgano más susceptible a éste daño por varias razones: la relativa deficiencia de defensas antioxidantes en comparación con otros órganos, la alta velocidad de consumo de O₂ en este órgano, el elevado contenido de ácidos grasos altamente poliinsaturados que contienen los lípidos de membrana neuronal (lo cual los hace particularmente susceptible a la peroxidación), el intenso movimiento de Ca²⁺ a través de las membranas neuronales, la presencia de aminoácidos excitotóxicos y algunos neurotransmisores que son moléculas autooxidables y pueden generar O₂^{*} (Ohtsuki et al., 1995; Halliwell y Gutteridge, 1999).

2. ANTECEDENTES

2.1 Calcio, óxido nítrico y función mitocondrial durante la hipertensión

Una cantidad creciente de evidencias experimentales indican que la sobreproducción de especies reactivas del oxígeno (ERO) juega un papel importante en el desarrollo de la hipertensión (Ohtsuki et al., 1995; Taddei et al., 1998; Halliwell y Gutteridge, 1999; Lopez-Campistrous et al., 2008), dando lugar a daño importante en órganos como el corazón, el riñón y el cerebro, siendo este último órgano un punto crítico en el control de la presión arterial. La disfunción mitocondrial ha sido fuertemente asociada con el desarrollo de la hipertensión como fuente principal de producción de ERO en la cadena de transporte de electrones. Por ejemplo, experimentos recientes revelaron un defecto en el ensamble de los complejos I, III, IV y V de mitocondrias de tallo cerebral (el cual constituye la región principal donde se regula la presión sanguínea sistémica y cardiovascular) de ratas hipertensas. Lo

anterior se relacionó con disfunción en la actividad del complejo I, lo cual a su vez provocó un aumento en la producción de ERO y una disminución en la síntesis de ATP (Lopez-Campistrous et al., 2008). Asimismo, se ha encontrado que la producción de ERO en la cadena respiratoria de mitocondrias de cerebro durante la hipertensión puede dañar progresivamente el metabolismo energético resultando en una muerte celular progresiva (Ohtsuki et al., 1995).

Las alteraciones en el metabolismo energético mitocondrial durante la hipertensión puede como consecuencia, afectar la entrada de Ca^{2+} hacia la matriz mitocondrial debido a que el transporte de este catión es dependiente del $\Delta\Psi$. Experimentos realizados en ratas espontáneamente hipertensas (SHR) han mostrado varias anomalías en el metabolismo de Ca^{2+} , como disminución en los niveles de Ca^{2+} en el suero, hipercalciuria, alteraciones en el transporte de Ca^{2+} intestinal, incrementos en la concentración de Ca^{2+} citosólico en plaquetas y linfocitos tanto de humanos como de ratas hipertensas (Arab et al., 1990). También una disminución en la concentración de Ca^{2+} en corazón y riñón de ratas SHR (Aguilera-Aguirre et al., 2002). Estas alteraciones en la concentración de Ca^{2+} pueden afectar las actividades de diversas enzimas que dependen del Ca^{2+} para su actividad, como es el caso de la NOSmt. La actividad de esta enzima se encuentra disminuida en mitocondrias de ratas SHR de diversos órganos (Aguilera-Aguirre et al., 2002; Calderón-Cortés et al., 2006). Por lo tanto, la disfunción mitocondrial reportada en cerebro de ratas hipertensas podría ser responsable por la alteración en el transporte mitocondrial de Ca^{2+} y por ende, afectar la producción de NO^{\bullet} por la NOSmt, afectando de este modo la modulación del metabolismo energético por ese radical.

Para comprobar el postulado anterior, en el presente estudio se decidió evaluar el efecto del Ca^{2+} intramitocondrial sobre la actividad de la NOSmt, así como la función mitocondrial en ratas hipertensas.

3. HIPÓTESIS

En cerebro, la hipertensión está asociada a una disminución en la concentración de calcio intramitocondrial y la producción de óxido nítrico dependiente de calcio debido a la disfunción mitocondrial.

4. OBJETIVOS

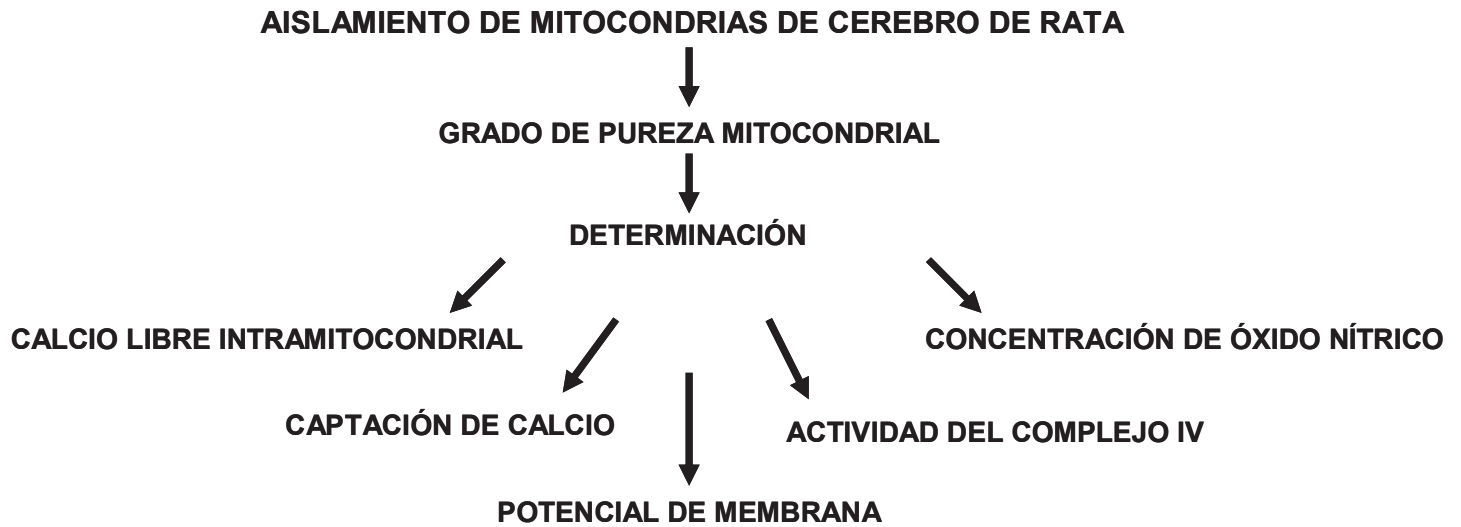
4.1. Objetivo general

Demostrar que durante la hipertensión se afecta la actividad de la óxido nítrico sintasa mitocondrial de cerebro por una disminución en la concentración de calcio debido a la disfunción mitocondrial.

4.2. Objetivos específicos

1. Conocer si la concentración de calcio intramitocondrial en cerebro de rata se afecta durante la hipertensión.
2. Establecer si el transporte de calcio se encuentra alterado en cerebro de ratas durante la hipertensión.
3. Conocer si el calcio altera el potencial de membrana en mitocondrias de cerebro de ratas durante la hipertensión.
4. Establecer si el calcio afecta la respiración mitocondrial en cerebro de ratas durante la hipertensión.
5. Conocer la influencia del calcio sobre la síntesis de óxido nítrico en mitocondrias de cerebro de ratas durante la hipertensión.

5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



5.1. Material biológico

Se emplearon ratas macho hipertensas (SHR) y normotensas Wistar-Kyoto (WKY) de 1 y 7 meses de edad, obtenidas de la Unidad de Biomedicina de la Facultad de Estudios Superiores, Campus Iztacala de la Universidad Nacional Autónoma de México, México. Fueron mantenidas bajo condiciones de bioterio con agua y alimentación *ad libitum* en el Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas de la Universidad Michoacana. Se utilizó la norma reglamentaria para el uso de animales expedida por la Secretaría de Agricultura en el párrafo de la Regulación Federal para el Uso y Cuidado de Animales (NOM-062-ZOO-1999). Esta investigación fue aprobada, además, por el Comité Institucional para el Uso de Animales de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Los registros de la presión arterial de los fueron determinados mediante pletismografía mediante un anillo metálico, que se colocó en la cola de las ratas, el cual contenía un transductor de presión conectada a un polígrafo para registrar gráficamente la presión arterial. En cada caso, se realizaron tres mediciones de presión y se promediaron.

5.2. Aislamiento de mitocondrias de cerebro de rata

Las mitocondrias de cerebro de rata fueron aisladas por centrifugación diferencial y purificadas mediante un gradiente de Percoll (Thakar y Hassan, 1988; Sims, 1990). Las ratas se sacrificaron por decapitación, se extrajo el cerebro descartando el cerebelo y el bulbo raquídeo; se colocó en un medio que contenía manitol 210 mM, sacarosa 70 mM, ácido etilén glicol-bis(beta-aminoetil éter N, N, N', N'-tetraacético) 1 mM (EGTA), albúmina sérica bovina 0.5% y ácido 3-[N-morfolino]propano sulfónico 10 mM (MOPS) (pH 7.4 y 4°C). El rompimiento de las células se llevó a cabo mediante la trituración y homogenización del cerebro en un vaso de Potter con un vástago de teflón. El homogenizado se centrifugó a 400 x g (centrífuga Beckman J2-MC) durante 10 min a 4°C. El sobrenadante se centrifugó a 9000 x g por 10 min. Se desechó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en Percoll al 15% y colocado sobre un gradiente discontinuo de Percoll (23% y 40%). Este gradiente fue centrifugado a 30,700 x g por 15 min y se extrajo la fracción 3

correspondiente a las mitocondrias, la cual fue centrifugada a 16,700 x *g* durante 10 min, seguida por una centrifugación de 6,900 x *g* por 10 min. Finalmente, la concentración de proteína se determinó por el método de Lowry (Lowry et al., 1951).

5.3. Determinación del grado de pureza mitocondrial

Para determinar que las mitocondrias estuvieran libres de proteínas contaminantes citosólicas, se determinó por inmunodetección la presencia de proteínas mitocondriales y citosólicas. La proteína mitocondrial se separó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida bajo condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE al 10%) de acuerdo al protocolo de Laemmli et al. (1970). Posteriormente las proteínas fueron transferidas a membranas de fluoruro de polivinildieno (PVDF) de acuerdo al protocolo descrito por Towbin et al. (1979). Las membranas con las proteínas transferidas se lavaron con TBS-T (Tris-HCl 10 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 0.05%, pH 7.6) y posteriormente, para bloquear los sitios de unión inespecíficos se incubaron con TBS-T-leche 5% por 1 h en agitación constante. Después de lavar con TBS-T, las membranas se incubaron en presencia del anticuerpo monoclonal específico para citocromo c (7H8) (1:2000) (Santa Cruz) y calreticulina (1:2000) (Santa Cruz) en TBS-T-leche por 1 h con agitación constante. Las membranas se lavaron 3 veces con TBS-T para remover el anticuerpo unido inespecíficamente y después se incubaron por 1 h con el anticuerpo secundario IgG acoplado a peroxidasa (1:4000) en TBS-T-leche. La interacción antígeno-anticuerpo se determinó mediante quimioluminiscencia.

5.4. Determinación de calcio libre intramitocondrial

La concentración de Ca^{2+} libre mitocondrial se determinó en un espectrofluorómetro RF 5000U de Shimadzu usando, como sonda fluorescente Fluo-3/AM a una longitud de onda de 506 nm de excitación y 526 nm de emisión. Las mitocondrias (0.125 mg/ml) fueron energizadas con succinato 10 mM e incubadas en un buffer que contenía manitol 210 mM, sacarosa 70 mM, albúmina sérica bovina 0.5 %, MOPS 10 mM (pH 7.4) y 0.003% de ácido plúronico a 25 °C y agitación constante durante 20 min. Posteriormente, se eliminó el exceso de la sonda

fluorescente mediante 2 lavados en un medio de aislamiento sin EGTA durante 2 min en una microcentrífuga. Se utilizó EGTA/Tris 600 μ M, desoxicolato de sodio al 0.05% (p/v) y la adición de Ca^{2+} (5 mM) para calibrar la señal fluorescente (Saavedra-Molina et al., 1990). Las concentraciones de Ca^{2+} libre externo adicionadas se calcularon mediante el programa de computadora WinMax 2.0 (Patton, 1999).

5.5. Captación de calcio mitocondrial

La captación de Ca^{2+} se determinó en un espectrofotómetro de doble haz Aminco DW-2000 uv/vis a 675-685 nm, ajustado en modo dual, usando como indicador el Arsenazo III. Las mitocondrias de cerebro fueron incubadas en un buffer que contenía manitol 210 mM, sacarosa 70 mM, albúmina 0.5 %, KH_2PO_4 5 mM, MgCl_2 1 mM, MOPS 10 mM (pH 7.4) y energizadas con succinato 10 mM. La captación de Ca^{2+} fue detectada después de diversas adiciones de 80 nmoles de Ca^{2+} . Una vez que el Ca^{2+} fue captado completamente, se adicionó EGTA 0.5 mM (Bringold et al., 2000; Ghafourifar et al., 2002).

5.6. Determinación del potencial transmembranal

El $\Delta\Psi$ se determinó mediante espectrofotometría, empleando el indicador safranina, utilizando un espectrofotómetro Aminco DW-2000 uv/vis. Se incubaron las mitocondrias en el buffer. Se registró el incremento de la absorbencia en modo dual a 511-533 nm y se observó la completa energización de las mitocondrias después de la adición de succinato 10 mM. Se realizaron varias adiciones de 80 nmoles de Ca^{2+} . Al final de cada trazo de $\Delta\Psi$ el desacoplante carbonil cianuro m-clorofenilhidrazona (CCCP) 1 μ M fue adicionado para colapsar el $\Delta\Psi$ (Rottenberg y Marbach, 1989; Bringold et al., 2000).

5.7. Determinación del consumo de oxígeno

Para estudiar la regulación del consumo de oxígeno mitocondrial a través de la inhibición competitiva de la citocromo c oxidasa (complejo IV) por la actividad de la NOSmt, se evaluó la actividad de este complejo midiendo el consumo de oxígeno con un electrodo de oxígeno de tipo Clark. Las mitocondrias (0.3 mg/ml), fueron

incubadas en una cámara de 2 ml sellada a 30°C bajo condiciones de agitación constante, en un buffer de fosfatos saturado con aire (KH₂PO₄ 50 mM, pH 7.6) en presencia rotenona 2 µM (inhibidor del complejo I), antimicina-A 2 µg/ml (inhibidor del sitio quinol reductasa del complejo III), estigmatelina 1 µg/ml (inhibidor del sitio quinol oxidasa del complejo III) y N,N,N,N-tetrametil-*p*-fenilenediamina (TMPD) 50 µM (acarreador redox). La reacción se inició mediante la adición de ascorbato de sodio 5 mM (pH 7.4). La inhibición endógena del complejo IV por la activación de la NOSmt se determinó con la adición de diferentes concentraciones de Ca²⁺ (Dedkova et al., 2004; Ghafourifar, 2002). Como control positivo de la inhibición del complejo IV, se adicionaron diferentes concentraciones de cianuro de potasio (KCN) y el donador de NO, el S-nitroso-N-acetilpenicilamina (SNAP) (Sigel y Carafoli, 1979; Madapallimattam et al., 2002; Cortés-Rojo et al., 2007).

5.8. Determinación de la concentración de óxido nítrico

La síntesis de NO[•] se determinó mediante la cuantificación de L-citrulina, producto secundario de la reacción catalizada por la NOSmt, en presencia de diferentes concentraciones de Ca²⁺ para estimular la síntesis del NO[•]. La citrulina se determinó mediante el método descrito por Knipp y Vasak (2000). Las mitocondrias fueron incubadas en un medio que contenía manitol 190 mM, MOPS 10 mM, KH₂PO₄ 5 mM, KCl 15 mM, MgCl₂ 3 mM, EGTA 1 mM, a pH de 7.4. Se adicionó succinato 10 mM y rotenona 2 µM. Las mitocondrias se incubaron por 1 h a 30°C y 30 rpm, con la adición de diferentes concentraciones de Ca²⁺. Después de este periodo, la reacción se detuvo con la adición de ácido perclórico al 4%. Posteriormente, se centrifugó a 6,900 x *g* por 10 min. Se tomaron 300 µl del sobrenadante y se le adicionaron 3 ml del reactivo cromogénico compuesto de: solución férrica-ácida (H₃PO₄ 3 M de, H₂SO₄ 6 M, NH₄Fe(SO₄)₂ 2 mM y solución DAMO la cual contenía DAMO (2,3-butanodiona monoxima) 80 mM y tiosemicarbazida 2 mM. Se mezcló vigorosamente y se calentó en baño María por 10 min a 95°C. Se dejó enfriar y se determinó la absorbencia a 530 nm en un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 10. Se corrió un blanco y una curva estándar de citrulina.

5.9. Análisis estadístico

Las diferencias estadísticas de los datos fueron determinadas con la prueba *t* de Student con el programa de computadora Sigma Plot Versión 9.0 (SPSS Inc) y se consideró una significancia estadística con una $p < 0.01$ y $p < 0.05$.

6. RESULTADOS

Esta sección corresponde al artículo publicado con los datos experimentales generados durante la realización de la presente tesis doctoral, el cual fue aceptado para su publicación en la revista internacional, Mitochondrion 2008. 8(3): 262-272.



Available online at www.sciencedirect.com



Mitochondrion 8 (2008) 262–272



www.elsevier.com/locate/mito

Changes in mitochondrial functionality and calcium uptake in hypertensive rats as a function of age

E. Calderón-Cortés^a, C. Cortés-Rojo^a, M. Clemente-Guerrero^a, S. Manzo-Ávalos^a,
R. Villalobos-Molina^b, I. Boldogh^c, A. Saavedra-Molina^{a,*}

^a Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Edificio B-3, C.U., Morelia, Mich. 58030, México

^b Unidad de Biomedicina, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM, Tlalnepanipa, México

^c Department of Microbiology and Immunology, University of Texas Medical Branch at Galveston, Galveston, TX, USA

Received 24 November 2007; received in revised form 13 March 2008; accepted 28 April 2008

Available online 4 May 2008

Abstract

We studied whether mitochondrial functions and Ca^{2+} metabolism were altered in Wistar Kyoto normotensive (WKY) and spontaneous hypertensive rats (SHR). Ca^{2+} uptake was decreased in SHR compared to WKY rats. Accumulation of Ca^{2+} was more efficient in WKY than in SHR rats. $m\Delta\psi$ was lower in SHR compared to WKY rats. Basal complex IV activity was higher in SHR than WKY rats, whereas basal L-citrulline production, an indicator of nitric oxide synthesis, was decreased in SHR and dependent on Ca^{2+} concentration ($p < 0.05$). Impact of Ca^{2+} was counteracted by EGTA. These data show an age-dependent decreased mitochondrial functions in brain mitochondria during hypertension.

© 2008 Elsevier B.V. and Mitochondria Research Society. All rights reserved.

Keywords: Brain mitochondria; Calcium uptake; Nitric oxide; Cytochrome c oxidase; Hypertension; Aging

1. Introduction

Intracellular free calcium ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), plays an important role in cellular signaling. Accordingly, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ is a second-messenger, implicated in the action of growth factors, hormones via transmitting signals to various kinases and enzymes (McCormack and Denton, 1993; Brini, 2003). Regulation of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ concentration is controlled by the uptake and release via Ca^{2+} channels of plasma membrane, endoplasmic reticulum, and inner mitochondrial membrane (Nicholls, 1986). Intramitochondrial Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_m$) concentrations are maintained by active transport. It has been shown that rat liver and heart mitochondria contain 1–2 nmol Ca^{2+} per milligram of mitochondrial protein (cited in Ghafourifar and Saavedra-Molina, 2006). Mitochondria contain tightly regulated transport systems

to maintain mitochondrial Ca^{2+} levels. The Ca^{2+} uptake takes place via an electrophoretic uniporter that is driven by the transmembrane potential (Nicholls, 2004, 2005). Mitochondrial release of Ca^{2+} ions is achieved by reversal of the influx carrier, and by a Na^+ dependent ($\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$) or independent ($\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$) exchanger. The $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$ pathway predominates in mitochondria of heart, brain, skeletal muscle, adrenal cortex, brown fat, and most tumor tissues. The $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ system is important in liver, kidney, lung, and smooth muscle mitochondria (McCormack and Denton, 1993; Richter, 1997; Bringold et al., 2000).

The hypertension is an established risk factor for cerebrovascular disease. A mechanism contributing to maintain high blood pressure during acute hypertension is the increased generation of superoxide ($\text{O}_2^{\cdot-}$) in the vessel wall, which leads to vascular injury (Houngaku et al., 1992; Ohtsuki et al., 1995; Halliwell and Gutteridge, 1999). The chronic hypertension selectively causes cell damage and injury in hypertensive-vulnerable organs like brain. Brain and nervous tissue are particularly prone to oxidative

* Corresponding author. Tel.: +52 443 326 5790x117; fax: +52 443 326 5788.

E-mail address: saavedra@zeus.umich.mx (A. Saavedra-Molina).

damage for several reasons: the high Ca^{2+} traffic across neuronal membranes, the presence of excitotoxic amino acids; some neurotransmitters are autoxidizable molecules and could generate $\text{O}_2^{\cdot-}$, the neuronal membrane lipids contains a high content of polyunsaturated fatty-acids, which are targets of oxygen-derived free radicals, the brain is relatively deficient in antioxidants defenses and the high rate of O_2 consumption in the tissue (Ohtsuki et al., 1995; Halliwell and Gutteridge, 1999). Brain mitochondria consume about 90% of the oxygen used by cells, and the mitochondrial respiratory chain generates high concentrations of reactive oxygen species (ROS) that attack cellular macromolecules, oxidize membranous phospholipids, proteins and DNA (Ohtsuki et al., 1995).

Spontaneously hypertensive rats (SHR) exhibit several abnormalities regarding Ca^{2+} metabolism. These abnormalities include decrease in Ca^{2+} level in the serum, hypercalciuria, and alteration in intestinal Ca^{2+} transport. An increment in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ had been reported in platelets and lymphocytes from hypertensive humans and in SHR (Arab et al., 1990). In mitochondria the basal matrix Ca^{2+} concentration is significantly lower in heart and kidney tissues from SHR compared to normotensive control animals (Aguilera-Aguirre et al., 2002). Over production of ROS in respiratory chain of brain mitochondria during hypertension can impair progressively mitochondrial energy metabolism and may be implicated in the vulnerability of SHR to cerebral ischemia, resulting in a progressive neuronal cell death (Ohtsuki et al., 1995).

Mitochondrial enzymes, such as pyruvate dehydrogenase, NAD(P)^+ -dependent isocitrate dehydrogenase, 2-oxoglutarate dehydrogenase, and mitochondrial nitric oxide synthase (mtNOS) can be activated by increase in Ca^{2+} level (Hansford and Zorov, 1998; Ghafourifar and Cadenas, 2005). mtNOS catalyzes the oxidation of L-arginine to nitric oxide (NO^{\cdot}) and citrulline. NO^{\cdot} is a free radical that binds to cytochrome *c* oxidase (complex IV) of the mitochondrial electron transport chain to inhibit respiration by competitive action with oxygen in complex IV, and therefore regulates the membrane potential ($\Delta\Psi$) and ATP synthesis (Giulivi et al., 1998; Ghafourifar and Richter, 1999; Aguilera-Aguirre et al., 2002; Calderón-Cortés et al., 2006). mtNOS and the enzymes mentioned above regulate ATP synthesis to support cellular energetic requirements (Bringold et al., 2000; Traaseth et al., 2004).

The goal of this study was to address the hypothesis that during hypertension, $[\text{Ca}^{2+}]_m$ and Ca^{2+} -regulated NOS activity are altered in brain mitochondria by the impairment on $\Delta\Psi$ establishment, due to decreased mitochondrial electron transport chain at the level of complex IV.

In this study we utilized healthy young, pre-hypertensive (1-month) and adult (7-months) rats with established hypertension (middle age, spontaneously hypertensive: SHR). In control experiments, the normotensive Wistar Kyoto (WKY) rats were used (1- and 7-months-old). We studied whether Ca^{2+} -driven NO^{\cdot} -mediated inhibition of complex IV activity could alter calcium transport-energy

dependent mitochondrial function in brain of rats, which may be related to augmentation of blood pressure.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

EGTA, KH_2PO_4 , MgCl_2 , mannitol, sucrose, bovine serum albumin (fatty acid free), MOPS, sodium deoxycholate, percoll, calcium chloride, KH_2PO_4 , succinic acid, arsenazo III, safranine, rotenone, antimycin-A, ascorbic acid, ruthenium red (RR), *N,N,N,N*-tetramethyl-*p*-phenylenediamine (TMPD), carbonylcyanide-*m*-chlorophenylhydrazone (CCCP), and potassium cyanide (KCN) were purchased from Sigma Chemical Co. Stigmatellin was obtained from Fluka Biochemika. 4-(6-Acetoxy-methoxy-2,7-dichloro-3-oxo-9-xanthenyl)-4'-methyl-2,2'-(ethylene dioxy)dianiline-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid tetrakis (acetoxymethyl) ester (Fluo-3/AM), *S*-nitroso-*N*-acetylpenicillamine (SNAP), and pluronic acid were purchased from Molecular Probes.

2.2. Animals

Normotensive genetic control (WKY) and SHR rats of 1- and 7-months of age were fed *ad libitum* and kept under controlled conditions of light:darkness in our animal facilities. All animal procedures were conducted in accordance with our Federal Regulations for the Use and Care of Animals (NOM-062-ZOO-1999, Ministry of Agriculture, Mexico), and were approved by the Institutional Committee of the Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, on the use of animals. Systolic blood pressure was determined by plethysmography.

2.3. Isolation of rat brain mitochondria

Brain mitochondria were isolated by differential centrifugation in a Percoll gradient as described (Thakar and Hassan, 1988; Sims, 1990). Briefly, rats were decapitated and the brain was extracted and placed in a cold medium that contained 210 mM mannitol, 70 mM sucrose, 1 mM EGTA, 0.5% bovine serum albumin, 10 mM MOPS (pH 7.4). The brain was homogenized manually in a glass homogenizer and centrifuged at 400g; the supernatant was centrifuged at 9000g. Centrifugations were carried out for 10 min at 4 °C. The pellet was suspended in 15% Percoll and placed in a discontinuous Percoll gradient (23 and 40%). The gradient was centrifuged at 30,700g, 15 min. at 4 °C, and mitochondria were isolated, diluted 1:4, centrifuged and washed at 16,700g in the isolation medium to which 0.5% bovine serum albumin had been added, followed by centrifugation at 6900g for 10 min. Mitochondrial protein concentration was measured by the Lowry technique (Lowry et al., 1951). The purity of mitochondrial preparations was assessed by Western blotting. The endoplasmic reticulum marker calreticulin was

present in crude tissue preparations but was decreased to insignificant amounts in purified mitochondria. In contrast, the mitochondrial marker cytochrome *c* oxidase was highly enriched in mitochondrial preparations.

2.4. Measurement of free intramitochondrial calcium

Brain mitochondria (0.125 mg/ml) were incubated in a medium (210 mM mannitol, 70 mM sucrose, 0.5% bovine serum albumin, 10 mM MOPS) with 10 μ M Fluo-3/AM and 0.003% pluronic acid in presence of 10 mM succinate as substrate, and 2 μ M rotenone (complex I inhibitor) for 20 min at 25 °C with shaking at 80 rpm. Mitochondria were then centrifuged and washed twice in an Eppendorf microfuge for 2 min and re-suspended in the medium. Fluorescence of mitochondrial suspensions were measured in a Shimadzu RF5000U spectrofluorometer; excitation wavelength was 506 nm (slit 10 nm) and emission wavelength 526 nm (slit 10 nm). Intramitochondrial free Ca^{2+} ions were determined by measuring the fluorescence minimum by addition of EGTA/deoxycholate, DOC (0.6 mM/0.05%) and the fluorescence maximum by subsequent addition of 5 mM Ca^{2+} . The computer program Winmax (Patton, 1999) was used to determine the concentrations of extramitochondrial free Ca^{2+} that were added. Quantification of mitochondrial matrix Ca^{2+} was determined as described (Saavedra-Molina et al., 1990) and the relative percentage of Ca^{2+} concentration was calculated with respect to Ca^{2+} basal concentration.

2.5. Uptake and release of mitochondrial calcium

Ca^{2+} movements across the inner mitochondrial membrane were followed with an Aminco DW-2a UV/VIS spectrophotometer at 675–685 nm with Arsenazo III as indicator (Bringold et al., 2000; Ghafourifar, 2002). Purified brain mitochondria (0.3 mg of mitochondrial protein/ml) was suspended in an incubation medium (210 mM mannitol, 70 mM sucrose, 0.5% bovine serum albumin, 10 mM MOPS (pH 7.4), 5 mM KH_2PO_4 , 1 mM MgCl_2) and energized with 10 mM succinate in presence of 2 μ M rotenone. Ca^{2+} uptake was initiated by repeated additions of 80 nmol Ca^{2+} and once net uptake was completed, 0.5 mM EGTA was added to sequester Ca^{2+} (Ghafourifar, 2002).

2.6. Determination of mitochondrial transmembrane potential

The mitochondrial $\Delta\Psi$ was measured using safranin in an Aminco DW-2a UV/VIS spec at 533–511 nm. Brain mitochondria (0.3 mg/ml) suspensions were incubated in a medium containing 210 mM mannitol, 70 mM sucrose, 0.5% bovine serum albumin, 10 mM MOPS, 5 mM KH_2PO_4 , 1 mM MgCl_2 , and 2 μ M rotenone as complex I inhibitor. Ten micromolar safranin was added to mitochondria. Mitochondria suspension was energized by addition of 10 mM succinate. Mitochondrial $\Delta\Psi$ was assessed by deter-

mining changes in safranin absorbance in presence of respiratory substrate. Energized mitochondria suspension was exposed to increasing concentrations of Ca^{2+} (160, 480, and 640 nmol Ca^{2+}) to determine changes in $\Delta\Psi$ due to Ca^{2+} uptake. 0.5 mM EGTA was added to sequester Ca^{2+} . The uncoupler CCCP (1 μ M) was added to collapse $\Delta\Psi$ (Rottenberg and Marbach, 1989; Bringold et al., 2000).

2.7. Measurement of oxygen consumption

Ca^{2+} -dependent mitochondrial nitric oxide synthase (mtNOS) regulates mitochondrial oxygen consumption through competitive inhibition of complex IV. Oxygen consumption was determined polarographically with a Clark-type electrode placed in a 2 ml chamber at 30 °C under continuous stirring, in an air-saturated phosphate buffer (50 mM KH_2PO_4). Complex IV activity was measured by oxygen consumption in the presence or absence of inhibitors of complex I and III. Brain mitochondria (0.3 mg/ml) were incubated in a phosphate buffer (50 mM KH_2PO_4). Complex I was inhibited with 2 μ M rotenone. Complex III was inhibited by 2 μ g/ml antimycin-A and 1 μ g/ml stigmatellin. TMPD is an ascorbate-reducible redox carrier that transfers electrons directly to cytochrome *c*. Addition of TMPD (50 μ M) and ascorbate (5 mM) to the antimycin A-stigmatellin inhibited mitochondria allows the measurement of oxygen consumption through complex IV. Endogenous inhibition of complex IV by mtNOS was accomplished when increasing concentrations of Ca^{2+} were added (stimulated NO^{\cdot} synthesis) (Dedkova et al., 2004; Ghafourifar, 2002). KCN and SNAP was used to inhibit complex IV (Sigel and Carafoli, 1979; Madapallimattam et al., 2002; Cortés-Rojo et al., 2007).

2.8. Measurement of L-citrulline synthesis

Nitric oxide synthase catalyzes the oxidation of L-arginine to L-citrulline and NO^{\cdot} . Therefore, the production of L-citrulline is used as an indirect determination of NO^{\cdot} . L-Citrulline production was determined as described by Knipp and Vasak (2000), in a medium containing 190 mM mannitol, 5 mM KH_2PO_4 , 15 mM KCl, 3 mM MgCl_2 , 10 mM MOPS (pH 7.4), plus 10 mM succinate, and 2 μ M rotenone. Brain mitochondria were incubated 1 h at 30 °C, in a shaking bath (30 rpm), in the presence of different concentrations of Ca^{2+} (80, 160, 240, 320, 400, and 480 nmol). Basal values of L-citrulline were obtained without exogenous addition of Ca^{2+} and samples were incubated during the same time. L-Citrulline was quantified in a Perkin-Elmer Lambda 10 spectrophotometer at 530 nm using a calibration curve.

2.9. Statistical analysis

Statistical differences of the data were determined with the Student's *t*-test and considered statistically significant at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Intramitochondrial calcium

Isolated mitochondria have the capacity to accumulate and retain calcium (Chalmers and Nicholls, 2003). Here, we studied calcium transport and accumulation in freshly isolated brain mitochondria of SHR animals before the onset of hypertension (healthy 1-month) and when hypertension is established (7-months), which had a blood pressure of 125 ± 3 mmHg and 203 ± 14 mmHg, respectively. Age-matched WKY rats were used as normotensive control. Fig. 1 shows $[Ca^{2+}]_m$ levels in WKY and SHR of different ages. Level of $[Ca^{2+}]_m$ in 1-month SHR was lower than in healthy rats, though the results are statistically nonsignificant at all (0.2, 0.6, 1.0, 2.0 μ M) Ca^{2+} concentrations (Fig. 1a). Non-significant differences were observed between SHR and WKY rats at age 7-months (Fig. 1b). Addition of RR, an inhibitor of the calcium uniporter (Bringold et al., 2000) caused a reduction in $[Ca^{2+}]_m$ (Fig. 1a and b).

These findings were corroborated by qualitative measurements of Ca^{2+} uptake and release using Arsenazo III as an indicator. Fig. 2 shows Ca^{2+} uptake plots of WKY and SHR brain mitochondria for 1-month old rats. The trace of Ca^{2+} uptake was started when mitochondria were incubated with Arsenazo III and line base in the trace was observed, which represent Arsenazo III-mitochondria absorbance. Succinate was added to energize mitochondria and allow Ca^{2+} uptake (McCormack and Denton, 1993). In both WKY and SHR mitochondria, Ca^{2+} uptake was instantaneous during first three additions. However, Ca^{2+} uptake was more efficient in WKY mitochondria (zoom, Fig. 2), which is evident when a drop on absorbance is observed after seven times addition of 80 nmol Ca^{2+} until a saturating intramitochondrial Ca^{2+} concentration was reached. By other hand, hypertensive rats showed a relative resistance to Ca^{2+} uptake, which is observed as an absence of significant changes in absorbance after six-times addition of 80 nmol Ca^{2+} (zoom, Fig. 2). Fig. 3 shows plots for mitochondrial Ca^{2+} uptake of WKY and SHR 7-months rats. As well as in 1-month rats, repetitive additions of 80 nmol of Ca^{2+} (three and five additions for WKY and SHR, respectively) were rapidly taken in both groups, which is evident as an absence of changes in absorbance during these additions. WKY 7-months rat mitochondria showed a better efficiency in Ca^{2+} uptake than age-matched SHR mitochondria. However, in comparison to 1-month WKY rat mitochondria, both 7-months WKY and SHR mitochondria showed a lower efficiency in Ca^{2+} uptake, which is observed as a lower drop in absorbance after repetitive addition of 80 nmol Ca^{2+} during 6–8 times in both cases (see zoom, Fig. 3).

3.2. Mitochondrial membrane potential in SHR rats

Mitochondrial Ca^{2+} uptake is an energy dependent process driven by the electrical potential produced by the mito-

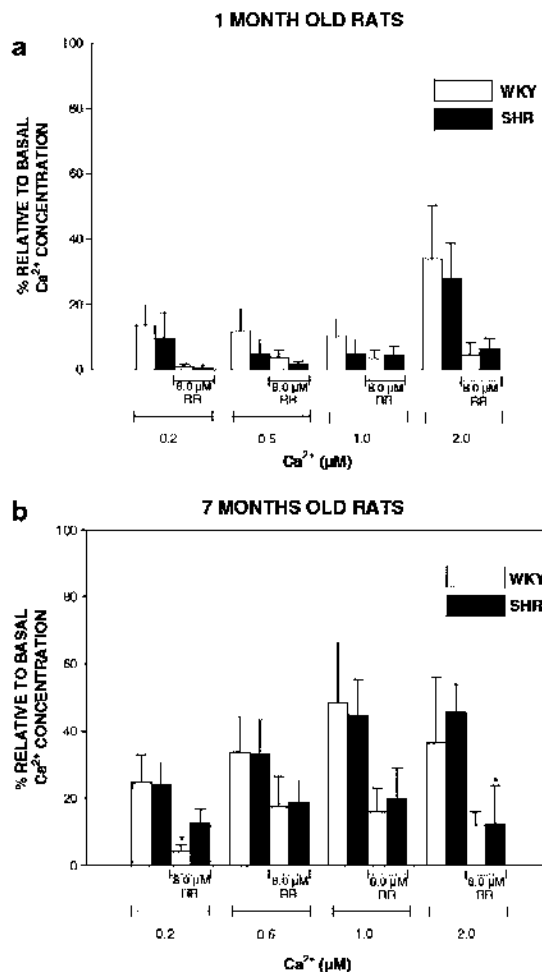


Fig. 1. Measurement of free intramitochondrial Ca^{2+} . Free mitochondrial Ca^{2+} concentration was followed spectrofluorometrically with Fluo-3/AM as indicator. (a and b) One- and 7-months old rats, respectively. Eight micromolar Ruthenium red (RR) was added to mitochondria. Several different concentrations of free Ca^{2+} were added (calculated with Winmax computer program) to mitochondria (0.125 mg/ml). Minimal and maximal fluorescence was determined by the addition of 0.6 mM EGTA/0.05% DOC and 5 mM Ca^{2+} , respectively. Wistar Kyoto normotensive genetic control (WKY) and spontaneously hypertensive (SHR) rats were compared. Each point represents the mean \pm SEM of 3–5 separate experiments. * $p < 0.05$ vs. respective control values.

chondrial respiratory chain (Nicholls, 2004, 2005). In this study, we investigated the $m\Delta\psi$ of brain mitochondria during the development of hypertension using the cationic dye safranin. Mitochondria were incubated in a medium with safranin and rotenone to inhibit the complex I. The addition of succinate to energize mitochondria increased $m\Delta\psi$. Fig. 4 shows two representative traces of $m\Delta\psi$ in 1-month WKY and SHR rats. These results show a significant difference in $m\Delta\psi$ between 1-month SHR and WKY rats, where

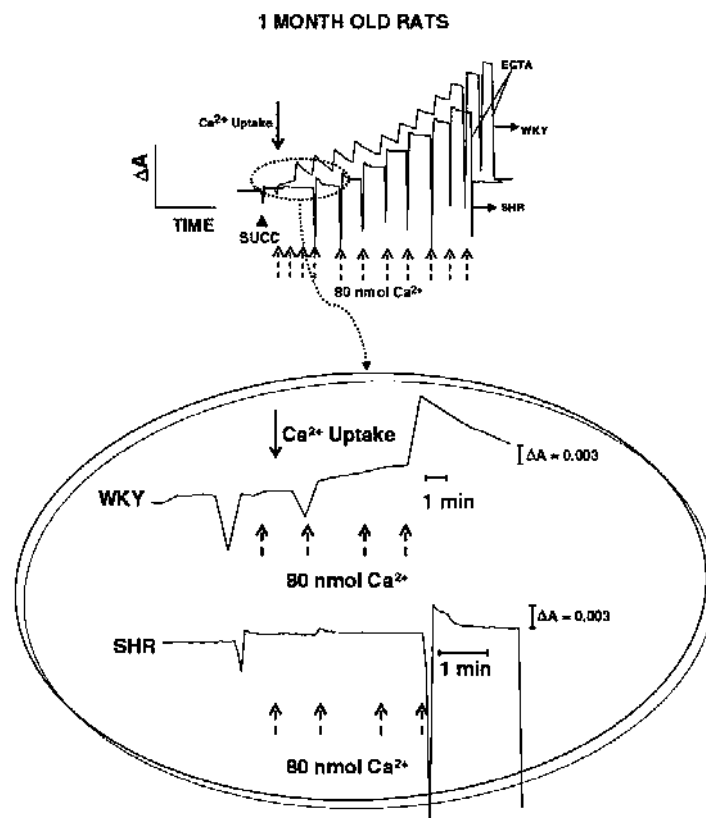


Fig. 2. Uptake and release of mitochondrial Ca^{2+} . Ca^{2+} movement across the inner mitochondrial membrane was followed spectrophotometrically with Arsenazo III as indicator. One-month old normotensive genetic control (WKY) and spontaneously hypertensive (SHR) rats were compared. Mitochondria (0.3 mg/ml) were energized with 10 mM succinate (\blacktriangle succ) in the presence of rotenone (not shown). Thereafter, 80 nmol of Ca^{2+} was added for several times which is indicated with arrows. Once net uptake was completed, 0.5 mM EGTA was added to sequester Ca^{2+} . The graph inside the circle shows a zoom corresponding to a more detailed view of the first portion of the plots. Five separate experiments were carried out in duplicates. A representative trace is shown.

1-month SHR rats present a lower $m\Delta\Psi$ of approximately one half of $m\Delta\Psi$ generated in WKY mitochondria (Fig. 4b). These data also show the abolition of $m\Delta\Psi$ when 160 nmol of Ca^{2+} was added to mitochondria, being the drop in $m\Delta\Psi$ fast in WKY and gradual in SHR mitochondria.

In 1-month WKY rats and SHRs $m\Delta\Psi$ was recovered by the addition of EGTA. Mitochondrial function was tested through addition of CCCP, which rapidly abolished $m\Delta\Psi$ in both cases. To determine the effect of established hypertension, $m\Delta\Psi$ was measured in 7-months of WKY and SHR rats. After succinate addition, $m\Delta\Psi$ was established in a fast way in WKY mitochondria and gradually in SHR rats (Fig. 5a and b). Results showed no difference between SHR and WKY rats. On the other hand, to depolarize WKY and SHR mitochondria, additions of 640 and 480 nmol Ca^{2+} were needed, respectively. $m\Delta\Psi$ was recovered in a faster way in SHR mitochondria than in WKY mitochondria after addition of EGTA. $m\Delta\Psi$ dissipation

achieved with CCCP was faster in WKY mitochondria than in SHR mitochondria.

Taken together these results showed that the Ca^{2+} concentration required to inhibit the transmembrane potential was greater as age increased (Figs. 4b and 5b). There were no differences in $m\Delta\Psi$ between age groups in SHR; however, $m\Delta\Psi$ in 7-month-old WKY was lower than in the 1-month-old WKY rats (Figs. 4a and 5a).

3.3. Mitochondrial activity of cytochrome c oxidase and nitric oxide synthase

mtNOS is activated at increased mitochondrial Ca^{2+} uptake/levels (Dedkova et al., 2004; Kanai et al., 2004). Therefore, we evaluated whether increased Ca^{2+} uptake in mitochondria of SHR and WKY rats affected Ca^{2+} -dependent mtNOS activity and NO-sensitive complex IV activity. Fig. 6 shows the results of L-citrulline production and complex IV activity of WKY and SHR for 1- and 7-

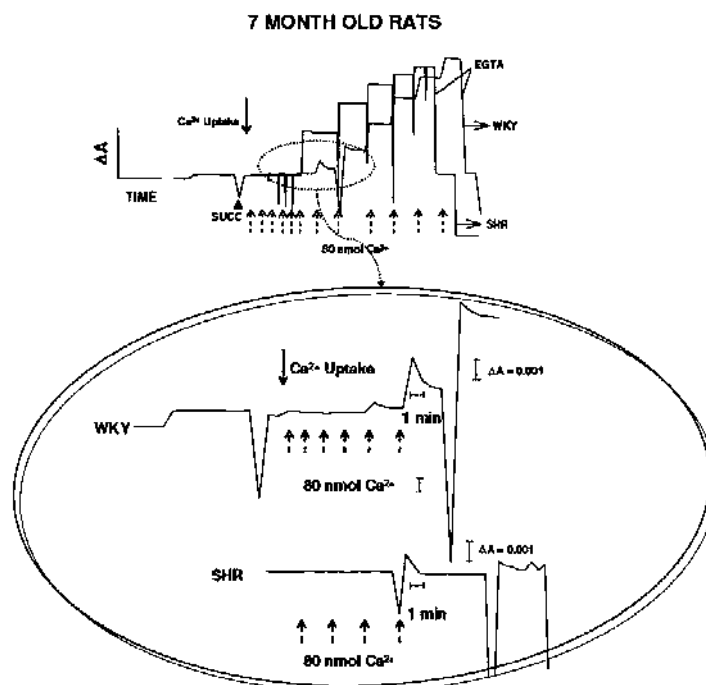


Fig. 3. Uptake and release of mitochondrial Ca^{2+} . Ca^{2+} movement across the inner mitochondrial membrane was followed spectrophotometrically with Arsenazo III as indicator. Seven-months old normotensive genetic control (WKY) and spontaneously hypertensive (SHR) rats were compared. Mitochondria (0.3 mg/ml) were energized with 10 mM succinate (\blacktriangle succ) in the presence of rotenone (not shown). Thereafter, 80 nmol of Ca^{2+} was added for several times which is indicated with arrows. Once net uptake was completed, 0.5 mM EGTA was added to sequester Ca^{2+} . The graph inside the circle shows a zoom corresponding to a more detailed view of the first portion of the plots. Five separate experiments were carried out in duplicates. A representative trace is shown.

months old rats. One month WKY and SHR basal value of L-citrulline were 0.87 ± 0.01 and 0.73 ± 0.03 nmol/min/mg prot, respectively (Fig. 6a). While in 7-months rats the basal value found for L-citrulline were 1.03 ± 0.08 (WKY) and 1.29 ± 0.15 nmol/min/mg prot (SHR). Addition of Ca^{2+} evoked significant ($p < 0.05$) NO^- production (L-citrulline) in 1-month WKY rats, whereas SHR of the same age did not show changes of L-citrulline synthesis with different addition of Ca^{2+} (Fig. 6a). In contrast, 7-months WKY and SHR showed non-significant increments in L-citrulline levels with different concentration of Ca^{2+} (Fig. 6b). However, basal value of L-citrulline in 7-months SHR was higher than 1-month SHR ($p < 0.05$) (Fig. 6a and b). On the other hand, the basal values of complex IV activity in 1-month rats were 351.7 ± 16.6 natO/min/mg prot for WKY and 609.2 ± 52.4 natO/min/mg prot for SHR (Fig. 6c). Seven-months WKY and SHR rats showed a basal activity of complex IV of 228.3 ± 22.9 (WKY) and 140.0 ± 16.0 natO/min/mg (SHR) (Fig. 6d). Consecutive additions of Ca^{2+} provoked a progressive inhibition of complex IV activity in WKY rats of 1-month and full inhibition was observed at 480 nmol Ca^{2+} ($p < 0.05$), whereas 1-month SHR exhibited a poor response of complex IV activity to consecutive additions of Ca^{2+} and full inhibition

of the activity was not observed even at 480 nmol Ca^{2+} (Fig. 6c). Seven-months SHR complex IV activity was fully inhibited with 480 nmol of Ca^{2+} , whereas 7-months WKY are insensitive to any concentration of Ca^{2+} (Fig. 6d). These results suggest that Ca^{2+} concentration needed to stimulate production of mitochondrial NO^- and subsequent inhibition of complex IV by this species is different in healthy and hypertensive animals. To verify that complex IV inhibition was due to increased mitochondrial NO^- production in response to mitochondrial Ca^{2+} uptake, synthesis of NO was tested in the presence of 100 μM L-NMMA, a competitive inhibitor of mtNOS (Ghafourifar, 2002). We found that L-NMMA augmented complex IV activity in mitochondria of 7-months WKY and 7-months SHR (data not shown); indicating that inhibition of oxygen consumption was indeed due to mtNOS activation in response to Ca^{2+} uptake. In the case of the young SHR and WKY rats, oxygen consumption was not affected by L-NMMA. These results showed both different basal activity and susceptibility to inhibition of complex IV activity between strains and age. Therefore it was investigated if differences in complex IV activity could be associated to differential sensitivity of this complex to NO^- during hypertension. Oxygen consumption was measured in the presence of different concen-

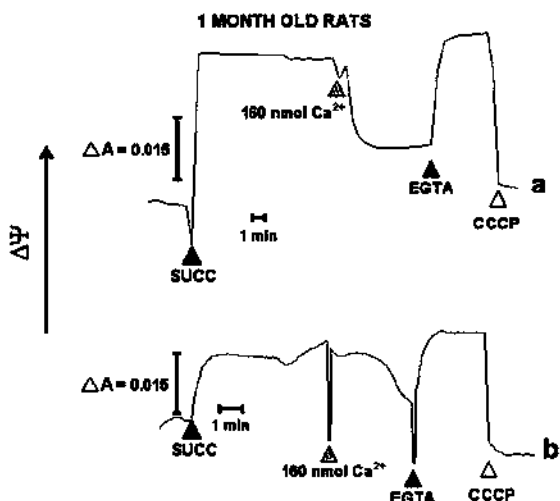


Fig. 4. Mitochondrial membrane potential ($m\Delta\Psi$) measurements. $m\Delta\Psi$ was followed spectrophotometrically with the indicator safranin. Mitochondria (0.3 mg/ml) were de-energized with rotenone (not shown) and subsequently energized with 10 mM succinate (\blacktriangle succ). After addition of 160 nmoles Ca^{2+} to 1-month old (a) WKY and (b) SHR rats and establishing a stable $m\Delta\Psi$, 0.5 mM EGTA (\blacktriangle) and CCCP (\triangle) (carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone) were added to the mitochondria with collapsed $m\Delta\Psi$. Five separate experiments were carried out in duplicates. A representative trace is shown.

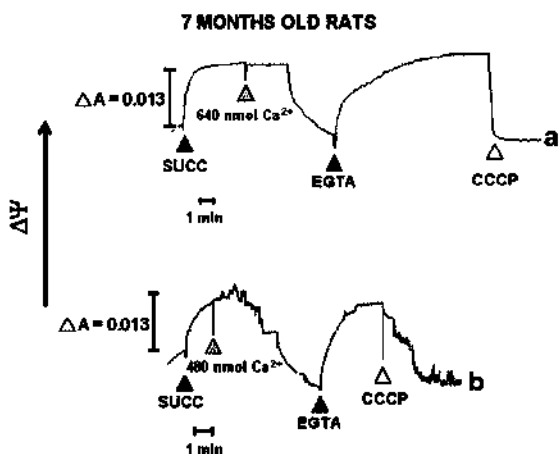


Fig. 5. Mitochondrial membrane potential ($m\Delta\Psi$) measurements. $m\Delta\Psi$ was followed spectrophotometrically with the indicator safranin. Mitochondria (0.3 mg/ml) were de-energized with rotenone (not shown) and subsequently energized with 10 mM succinate (\blacktriangle succ). After addition of 640 and 490, 160 nmoles Ca^{2+} to 7-months old WKY and SHR rats, respectively, and establishing a stable $m\Delta\Psi$, 0.5 mM EGTA (\blacktriangle) and CCCP (\triangle) (carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazones) were added to the mitochondria with collapsed $m\Delta\Psi$. (a) WKY and (b) SHR rats were compared. Five separate experiments were carried out in duplicates. A representative trace is shown.

irations of the NO^{\cdot} donor SNAP, and CN^{-} , which are inhibitors of binuclear Cu_B haem aa_3 center in complex

IV (Fig. 7). The results of complex IV activity in 1-month WKY and 1-month SHR showed to be more susceptible to inhibition for different concentrations of NO^{\cdot} and CN^{-} , and presented differential susceptibility to both inhibitors (Fig. 7a and c) ($p < 0.05$), whereas 7-months rats showed an no susceptible inhibition for both NO^{\cdot} and CN^{-} (Fig. 7b and d), which means that 1-month rats WKY and SHR requires lower concentrations of NO^{\cdot} and CN^{-} to inhibit complex IV, whereas both WKY and SHR rats of 7-month-old required higher concentrations of these inhibitors. These data suggest an alteration in the Cu_B haem aa_3 center in complex IV in 7-month-old WKY and SHR rats.

4. Discussion

The respiratory chain of mammalian mitochondria consists of a series of electron carriers, most of which are integral membrane proteins, capable of accept and donate electrons (Nicholls and Ferguson, 2002). Cytochrome *c* oxidase (complex IV) is the terminal electron acceptor in mitochondria respiratory chain. During catalysis of this complex, cytochrome *c* is oxidized, oxygen is reduced to water and redox energy is converted to a proton motive force, which drives ATP synthesis (Cooper, 2002). NO^{\cdot} is a reversible inhibitor of complex IV, competing with oxygen for binding at the binuclear Cu_B /cytochrome aa_3 site (Nicholls and Ferguson, 2002). Therefore, NO^{\cdot} is an active modulator of mitochondrial respiration and ATP synthesis. Key hallmarks of mitochondrial dysfunction are decreased expression of mitochondrial components and defects in the assembly of respiratory complex. The mitochondrial dysfunction has been increasingly associated with the development of hypertension (Lopez-Campistrous et al., 2008). This pathological process induces abnormalities in Ca^{2+} metabolism (Arab et al., 1990), including $[\text{Ca}^{2+}]_m$ levels, which may affect activity of intramitochondrial enzymes like mtNOS and thus the energy production by the mitochondria. On the other hand, brain is highly susceptible to oxidative damage because its lower antioxidant capacity and higher oxygen uptake when compared with other organs (Halliwell and Gutteridge, 1999), which could contribute to mitochondrial injury and neuronal degeneration (Ohtsuki et al., 1995). These facts lead us to search if mitochondrial dysfunction is in part caused by functional defects in complex IV activity during hypertension, which could altered $m\Delta\Psi$ and, as a consequence, Ca^{2+} mitochondrial uptake and activity of mtNOS. We found that basal activity of complex IV was higher in 1-month SHR than 1-month WKY rats (Fig. 6a); this result correlate with the lower production of NO^{\cdot} in the same group of rats (Fig. 6a) and corroborate previous results from our laboratory (Calderón-Cortés et al., 2006), which indicate that in brain mitochondria from hypertensive rats the activity of mtNOS was lower in 1-month SHR than in healthy rats of the same age. Thus, if mitochondrial NO^{\cdot} concentration in SHR mitochondria was lower due to decreased activity of mtNOS, regulation of complex IV

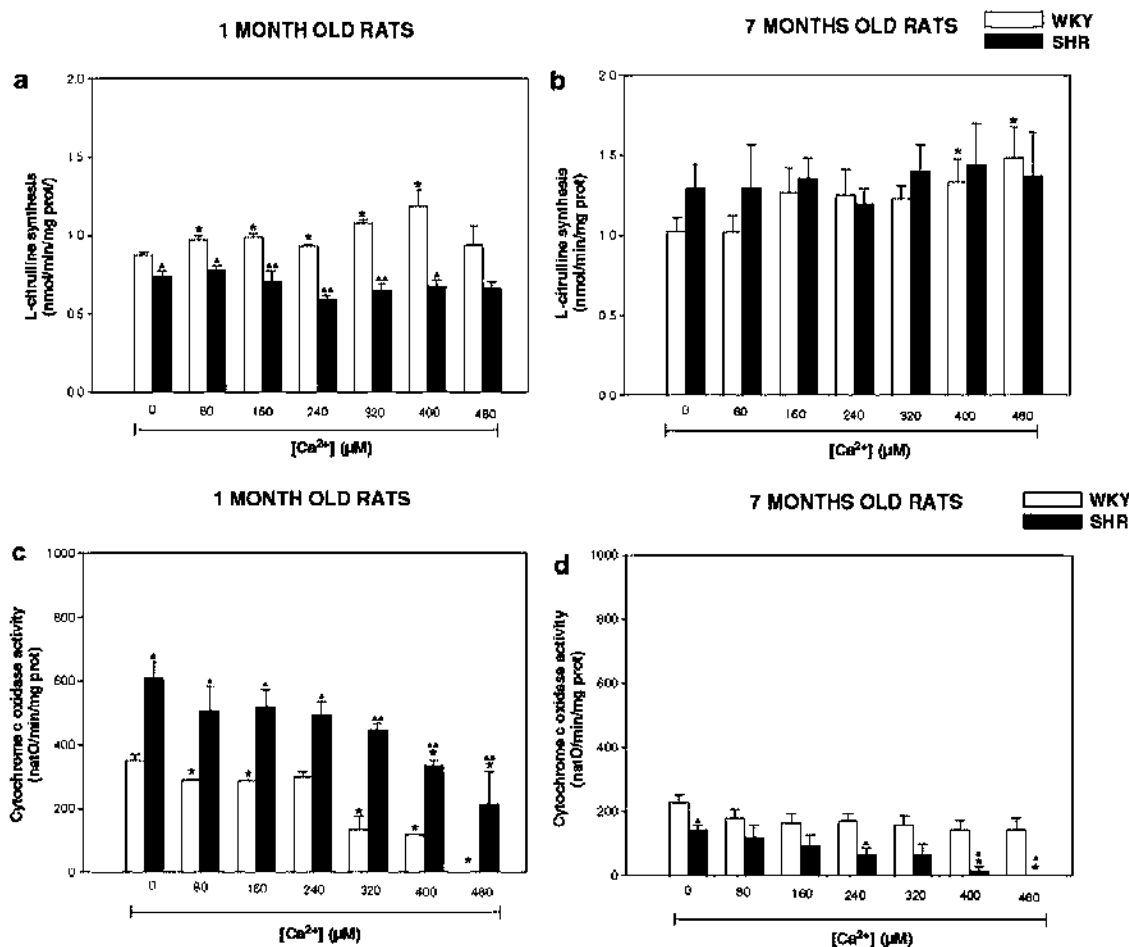


Fig. 6. Mitochondrial activity of nitric oxide synthase (mtNOS) and cytochrome c oxidase (complex IV). Mitochondrial protein (0.3 mg/ml) were incubated in presence of different concentrations of Ca²⁺ 80, 160, 240, 320, 400, and 480 nmol in the medium as described in Section 2. mtNOS was evaluated measured the production of L-citrulline in (a) 1-month old and (b) 7-months old rats. Complex IV was evaluated measuring oxygen consumption of purified mitochondria isolated from rat brain of (c) 1-month old and (d) 7-months old WKY and SHR. WKY, Wistar Kyoto; SHR, Spontaneously hypertensive rats. Results are the means \pm SEM of 3-6 separate experiments in duplicates. **p* < 0.05, ***p* < 0.01 vs. control values and ****p* < 0.01 vs. strains of same age.

by this radical could not be possible. Contrary to these results, the SHR rats of 7-months old showed an increased activity of mtNOS (Fig. 6b) in comparison with its normotensive control (7-months WKY), which contributed a decrease on oxygen consumption (Fig. 6d). The results in 7-months old rats suggest that complex IV activity could decrease as age and hypertension occur. The activity of mtNOS in 1-month WKY rats exhibited a significant (*p* < 0.05) concentration-dependent response to Ca²⁺ (Fig. 6a); however, 1-month SHR and 7-months WKY and SHR rats did not show changes in mtNOS activity in response to exogenous addition of Ca²⁺ (Fig. 6a and b), which may explain the insensitivity of the NO⁻-mediated complex IV inhibition by Ca²⁺ in these groups of rats (Fig. 6c and d). These results lead us to thought that Ca²⁺

uptake is diminished before and after hypertension is established in SHR, which was corroborated when lower Ca²⁺ uptake and [Ca²⁺]_m level were observed in brain SHR mitochondria of 1 and 7-months when compared with WKY rats (Figs. 1a and 2). These results are in agreement with previous reports (Arab et al., 1990), in which *V*_{max} of Ca²⁺ uptake in jejunal mitochondria was found decreased in SHR during suckling and weaning periods, before the development of hypertension and in hypertensive adult SHR.

Ca²⁺ uptake in brain mitochondria of 7-months SHR and WKY rats was found decreased compared to 1-month WKY rats (Figs. 2 and 3), suggesting that calcium handling is disrupted by both hypertension and age, which would contribute to progressive cell damage because mitochon-

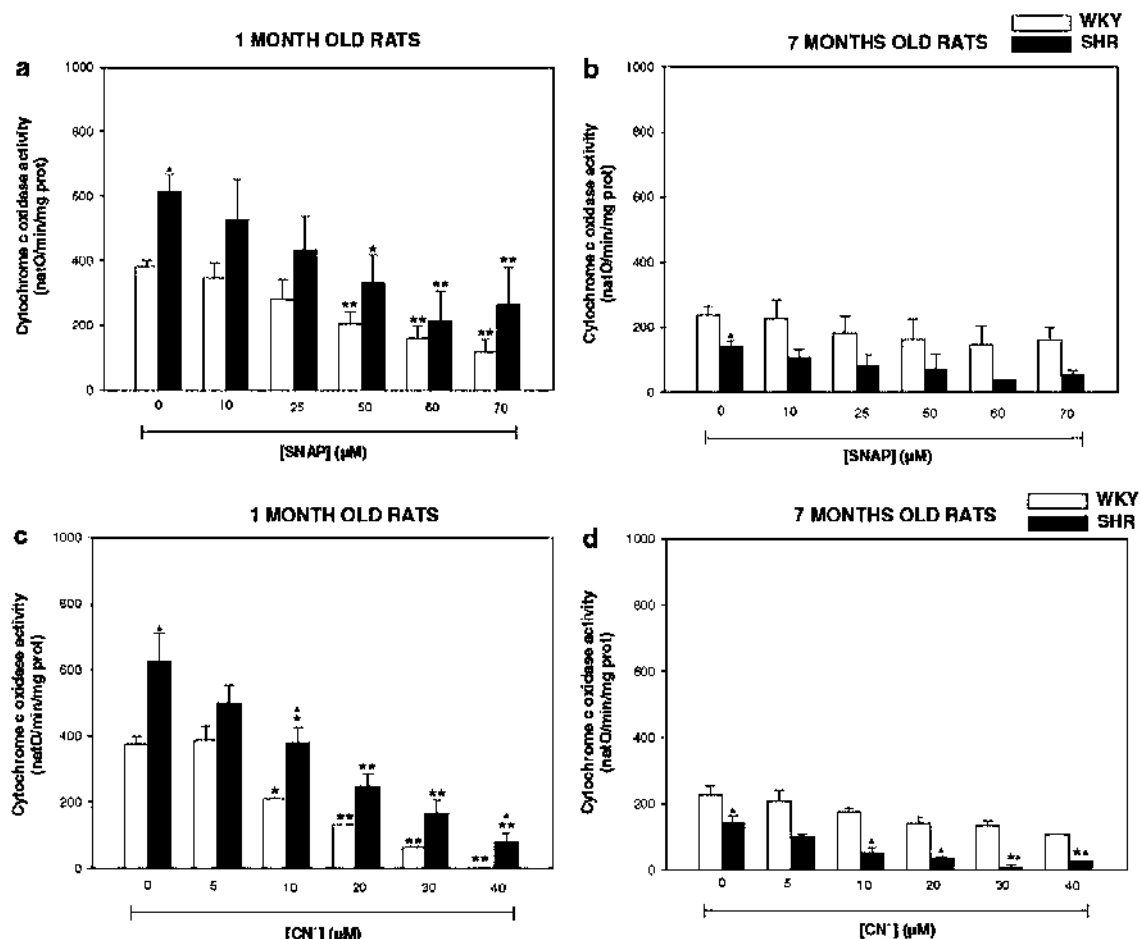


Fig. 7. Mitochondrial activity of cytochrome c oxidase (complex IV). Complex IV was evaluated measuring oxygen consumption of purified mitochondria isolated from rat brain. Mitochondrial (0.3 mg/ml) were incubated in phosphate buffer, pH 7.4, at room temperature. Complex I was inhibited with rotenone. Complex III was inhibited with antimycin A, and stigmatellin. Subsequently, TMPD was added and the reaction was started by the addition of reduced ascorbate. Concentrations of 10, 25, 50, 60, and 70 μM of NO^{\bullet} donor (SNAP) were used in (a) 1-month old and (b) 7-months old rats, and concentrations of 5, 10, 20, 30, and 40 μM cyanide (CN^{-}) were used in (c) 1-month old and (d) 7-months old rats. Results are the mean \pm SEM of 3-6 separate experiments in duplicates. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. control values and # $p < 0.01$ vs. strains of same age.

dria play an important role buffering cytosolic calcium concentration.

In addition, we found a differential activity of complex IV between WKY and SHR rats in presence or absence of Ca^{2+} . Consequently, it was important to know if this activity change was due to differences in the sensitivity of complex IV to substrate binding at the binuclear Cu_B haem a_3 center, which is the site of binding for inhibitors like NO^{\bullet} and CN^{-} . The results of complex IV activity in the presence of different concentrations of NO^{\bullet} and CN^{-} show that 1-month-WKY and 1-month-SHR rats are more susceptible to inhibition than 7-months SHR and WKY rats (Fig. 7). These results suggest that the activity of complex IV is affected in its haem a_3/Cu_B binuclear center when hypertension is established, which could be possibly related

with assembly defects of this complex during hypertension and contributing to mitochondrial dysfunction in brain mitochondria (Lopez-Campistrous et al., 2008). In the case of 1-month rats we found a similar NO^{\bullet} and CN^{-} sensitivity between both rat strains (Fig. 7a and c). However, 1-month SHR rats showed an increased activity of complex IV due to a lower Ca^{2+} -dependent production of NO^{\bullet} (Fig. 6a and c). The decreasing of Ca^{2+} uptake in this case could be attributed to defects of assembly in the other respiratory complexes (I and III) as reported for Lopez-Campistrous et al. (2008), which could affected $\text{m}\Delta\psi$ and then levels of Ca^{2+} (Figs. 1a and 2).

Mitochondria are the center of bioenergetics interactions that control several functions in cells. Three fundamental functions, ATP generation, Ca^{2+} uptake and the

generation and detoxification of ROS, are driven by the mitochondrial $m\Delta\Psi$ (Nicholls, 2004). The $m\Delta\Psi$ is driving force for the uptake of Ca^{2+} , therefore, we investigated the relationship between $m\Delta\Psi$ and $[Ca^{2+}]_m$. Our results show a difference in mitochondrial functionality in pre-hypertensive rats, as evidenced by a lower $m\Delta\Psi$ in SHR 1-month rats when compared to normotensive rats. As well, a gradual drop in $m\Delta\Psi$ due to uptake of 160 nmol of Ca^{2+} was observed in SHR mitochondria, which was in contrast with the rapid $m\Delta\Psi$ collapse presented at the same Ca^{2+} concentration in WKY 1-month rat. Therefore, these data suggest a disturbance in Ca^{2+} uptake of 1-month SHR rats, which may be explained by lower $m\Delta\Psi$ found in these rats and support the results where the Ca^{2+} levels and its uptake were lower in 1-month SHR rats (Figs. 1 and 2). There were no differences in $m\Delta\Psi$ between 1 and 7-months SHR; however, Ca^{2+} concentration necessary for $m\Delta\Psi$ collapse was higher in 7-months rats than in 1-month rats (Figs. 4b and 5b). In 7-months normotensive rats the $m\Delta\Psi$ was similar to that found in SHR (Fig. 5a and b), suggesting that age could lead to progressive mitochondrial damage that could be related with mitochondrial dysfunction reported for mice with accelerated senescence (Nakahara et al., 1998). It is well known that overproduction of ROS in respiratory chain of brain mitochondria during hypertension impairs mitochondrial energy metabolism (Ohtsuki et al., 1995). Increased ROS generation corroborates our results because impaired mitochondrial function may lead to mitochondrial energy insufficiency resulting in neuronal cell death. $m\Delta\Psi$ in young and hypertensive rats as well as in 7-months WKY rats were lower than WKY rats of 1-month. The relative diminution of $m\Delta\Psi$ would be sufficient to keep the energetic mitochondrial requirement, but this possibility should be explored. Decreased $m\Delta\Psi$ could be attributed to mtNOS activation. However, our results of Ca^{2+} uptake showed that influx of this cation to mitochondria was affected in 1- and 7-months SHR rats and 7-months WKY rats (Figs. 1-3), which could explain the higher concentrations needed to drop $m\Delta\Psi$ and the differential responses to Ca^{2+} addition with respect to the rate of $m\Delta\Psi$ collapse (Figs. 4 and 5). The drop $m\Delta\Psi$ in brain mitochondria of WKY and SHR rats due to the addition of Ca^{2+} excess (160, 480, and 640 nmol Ca^{2+}) was restored by the addition of Ca^{2+} chelating agents, this suggest that Ca^{2+} excess did not cause mitochondrial damage, which would be attributed to the relative resistance of brain mitochondria to Ca^{2+} overload. Accordingly, other studies found that depending on the brain region, mitochondria are differentially sensitive to Ca^{2+} overload (LaFrance et al., 2005; Brown et al., 2006), without undergoing mitochondrial permeability transition (Berman et al., 2000).

Abnormal mitochondrial calcium uptake and release during hypertension may contribute to mitochondrial injury in the brain and lead to neuron degeneration in SHR. On the other hand, the increased superoxide anion generation in brain mitochondria of SHR combined with deficit in superoxide dismutase activity cause oxidative

stress conditions (Ohtsuki et al., 1995), which may damage expression of mitochondrial components and lead to defective assembly of respiratory complexes (Lopez-Campistrous et al., 2008). Hence, these findings may be the underlying cause behind decreased $m\Delta\Psi$ and complex IV activity reported here (Figs. 4-7). Our results demonstrate an association between $[Ca^{2+}]_m$ metabolism and $m\Delta\Psi$ that may indicate the importance of this organelle in blood pressure elevation and a crucial role in aging associated hypertension. Alteration of mitochondrial energetics might play a role in vascular aging and aging processes.

Our results suggest that during age-associated hypertension, decreased complex IV activity caused consequent diminishing in mitochondrial inner-membrane potential and changes in $\Delta\Psi$ -dependent Ca^{2+} movements, which leads to impairment in the activity of Ca^{2+} -dependent enzymes like mtNOS. The scheme pictured here may be related to progression of mitochondrial energetics metabolism dysfunction and progressive neuronal cell death during hypertension.

In conclusion, our results suggest that pathological and physiological process as age-associated hypertension lead to changes in Ca^{2+} metabolism injury of respiratory chain enzymes as cytochrome *c* oxidase activity, which may lead to decrease in mitochondrial inner-membrane potential and consequently changes in Ca^{2+} metabolism that could be related to progression of mitochondrial dysfunction and neuronal cell death in brain during hypertension.

Acknowledgments

The authors appreciate the partial financial support of CONACYT (43705, ASM and 47481, RVM), Fondos Mixtos CONACYT-Gobierno Estado Michoacán (64277, ASM; 64308, SMA), COEYCT (CB0702182_2, ASM) and CIC-UMSNH (2.16, ASM) grants. This work was also supported by P01 AG 021830 (1B) from the U.S NIA. ECC and CCR are CONACYT fellows.

References

- Aguilera-Aguirre, L., González-Hernández, J.C., Pérez-Vázquez, V., Ramírez, J., Clemente-Guerrero, M., Villalobos-Molina, R., Saavedra-Molina, A., 2002. Role of intramitochondrial nitric oxide in rat heart and kidney during hypertension. *Mitochondrion* 1, 413-423.
- Arab, N., Shibata, S.H., Ghishan, F.K., 1990. Ontogeny of mitochondrial calcium transport in spontaneously hypertensive (SHR) and WKY rats. *J. Dev. Physiol.* 14, 59-67.
- Berman, S.B., Watkins, S.C., Hastings, T.G., 2000. Quantitative biochemical and ultrastructural comparison of mitochondrial permeability transition in isolated brain and liver mitochondria: evidence for reduced sensitivity of brain mitochondria. *Exp. Neurol.* 164, 415-425.
- Bringold, U., Ghafourifar, P., Richter, C., 2000. Peroxynitrite formed by mitochondrial NO synthase promotes mitochondrial Ca^{2+} release. *Free Radic. Biol. Med.* 29, 343-348.
- Briai, M., 2003. Ca^{2+} signaling in mitochondria: mechanism and role in physiology and pathology. *Cell Calcium* 34, 399-405.
- Brown, M.R., Sullivan, P.G., Geddes, J.W., 2006. Synaptic mitochondrial are more susceptible to Ca^{2+} overload than nonsynaptic mitochondria. *J. Biol. Chem.* 281, 11658-11668.

- Calderón-Cortés, E., Clemente-Guerrero, M., Sierra-Campos, E., Cortés-Rojo, C., Gaona-Zamudio, F.J., Villalobos-Molina, R., Saavedra-Molina, A., 2006. Functional characterization of brain mitochondrial nitric oxide synthase during hypertension and aging. *Amino Acids* 30, 73-80.
- Chalmers, S., Nicholls, D.G., 2003. The relationship between free and total calcium concentrations in the matrix of liver and brain mitochondria. *J. Biol. Chem.* 278, 19062-19070.
- Cooper, C.E., 2002. Nitric oxide and cytochrome oxidase: substrate, inhibitor or effector? *Trends Biochem. Sci.* 27, 33-39.
- Cortés-Rojo, C., Calderón-Cortés, E., Clemente-Guerrero, M., Mauzo-Avalos, S., Uribe, S., Boldogh, I., Saavedra-Molina, A., 2007. Electron transport chain of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria is inhibited by H₂O₂ at succinate-cytochrome *c* oxidoreductase level without lipid peroxidation involvement. *Free Radic. Res.* 41, 1212-1223.
- Dodkova, E.N., Ji, X., Lipsius, S.L., Blatter, L.A., 2004. Mitochondrial calcium uptake stimulates nitric oxide production in mitochondria of bovine vascular endothelial cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 286, 406-415.
- Ghafoufifar, P., 2002. Characterization of mitochondrial nitric oxide. In: *Methods Enzymol.* 359. Elsevier Science, vol. 31, pp. 339-350.
- Ghafoufifar, P., Cadenas, E., 2005. Mitochondrial nitric oxide synthase. *Trends Pharmacol. Sci.* 26, 190-195.
- Ghafoufifar, P., Richter, C., 1999. Mitochondrial nitric oxide synthase regulates mitochondrial matrix pH. *Biol. Chem.* 380, 1025-1028.
- Ghafoufifar, P., Saavedra-Molina, A., 2006. Functions of mitochondrial nitric oxide synthase. In: *Lamas, S., Cadenas, E. (Eds.), Nitric Oxide, Cell Signaling, and Gene Expression.* CRC, Taylor & Francis, Boca Raton, USA, pp. 77-98.
- Giulivi, C., Poderoso, J.J., Boveris, A., 1998. Production of nitric oxide by mitochondria. *J. Biol. Chem.* 273, 11038-11043.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 1999. Oxidative stress and disorders of the nervous system: general principles and ageing, nutrition, disease and therapy: a role for antioxidants? In: *Free Radicals in Biology and Medicine*, third ed. Oxford University Press, England, vol. 9, pp. 721-731.
- Hausford, R.G., Zorov, D., 1998. Role of mitochondrial calcium transport in the control of substrate oxidation. *Mol. Cell Biochem.* 181, 359-369.
- Houga, H., Matsumoto, M., Kitagawa, K., Harada, K., Oku, N., Itoh, T., Maeda, H., Ikada, N., Kamada, T., 1992. Silent cerebral infarction as a form of hypertensive target organ damage in the brain. *Hypertension* 20, 816-820.
- Kanai, A., Epperly, M., Pearce, L., Birder, L., Zeidel, M., Meyers, S., Greenberger, J., de Groat, W., Apodaca, G., Peterson, J., 2004. Diverging roles of mitochondrial nitric oxide synthase in cardiomyocytes and urothelial cells. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 286, 13-21.
- Kuipp, M., Vasak, M., 2000. A colorimetric 96-well microtiter plate assay for the determination of enzymatically formed citrulline. *Aust. Biochem.* 286, 257-264.
- LaFrance, R., Brustovetsky, N., Sherburne, C., DeLong, D., Dubinsky, J.M., 2005. Aged-related changes in regional brain mitochondrial from Fischer 344 rats. *Aging Cell* 4, 139-145.
- Lopez-Campistrous, A., Hao, L., Xiang, W., Ton, D., Semchuk, K., Sander, J., Ellison, M.J., Fernandez-Patron, C., 2008. Mitochondrial dysfunction in the hypertension rat brain. Respiratory complexes exhibit assembly defects in hypertension. *Hypertension* 51, 412-419.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- Madapallimattam, A.G., Law, L., Jesjeebhoy, K.N., 2002. Effect of hypoenergetic feeding on muscle oxidative phosphorylation and mitochondrial complex I-IV activities in rats. *Am. J. Clin. Nutr.* 76, 1031-1039.
- McComack, J.G., Denton, R.M., 1993. Mitochondrial Ca²⁺ transport and the role of intramitochondrial Ca²⁺ in the regulation of energy metabolism. *Dev. Neurosci.* 15, 165-173.
- Nakahara, H., Kanno, T., Inai, Y., Utsumi, K., Hiramatsu, M., Mori, A., Packer, L., 1998. Mitochondrial dysfunction in the senescence accelerated mouse (SAM). *Free Radic. Biol. Med.* 24, 85-92.
- Nicholls, D.G., 1986. Intracellular calcium homeostasis. *Brit. Med. Bull.* 42, 353-358.
- Nicholls, D.G., 2004. Mitochondrial membrane potential and aging. *Aging Cell* 3, 35-40.
- Nicholls, D.G., 2005. Mitochondrial and cell signalling. *Cell Calcium* 38, 311-317.
- Nicholls, D.G., Ferguson, S.J., 2002. *Bioenergetics* 35. Academic Press, London, UK, 89-154.
- Ohtsuki, T., Matsumoto, M., Suzuki, K., Taniguchi, N., Kamada, T., 1995. Mitochondrial lipid peroxidation and superoxide dismutase in rat hypertensive target organs. *Heart Circ. Physiol.* 37, H1418-H1421.
- Pattou, C., 1999. WinMAXC, Version 2.0. Stanford University Hopkins-Marine Station, Pacific Grove, CA, USA.
- Richter, C., 1997. Reactive oxygen and nitrogen species regulate mitochondrial Ca²⁺ homeostasis and respiration. *Biosci. Rep.* 17, 53-66.
- Rottenberg, H., Marbach, M., 1989. Adenine nucleotides regulate Ca²⁺ transport in brain mitochondria. *FEBS Lett.* 247, 483-486.
- Saavedra-Molina, A., Uribe, S., Devlin, T.M., 1990. Control of mitochondrial matrix calcium: studies using Fluo-3 as a fluorescent calcium indicator. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 167, 148-153.
- Sigel, E., Carafoli, E., 1979. The charge stoichiometry of cytochrome *c* oxidase in the reconstituted system. *J. Biol. Chem.* 254, 10572-10574.
- Sims, N.R., 1990. Rapid isolation of metabolically active mitochondria from rat brain and subregions using Percoll density gradient centrifugation. *J. Neurochem.* 55, 698-707.
- Thakar, J.H., Hassan, M.N., 1988. Effects of 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine (MPTP), cyperquat (MPP-) and paraquat on isolated mitochondria from rat striatum cortex and liver. *Life Sci.* 43, 143-149.
- Traaseth, N., Elfering, S., Solien, J., Haynes, V., Giulivi, C., 2004. Role of calcium signaling in the activation of mitochondrial nitric oxide synthase and citric acid cycle. *Biochim. Biophys. Acta* 1658, 64-71.

7. RESULTADOS ADICIONALES

7.1. Resultados no incluidos en el artículo

En este apartado se describe brevemente los resultados publicados en el artículo anterior. Los resultados que no se encuentran incluidos en este artículo y que son parte de este tema de estudio, se incluyeron en este apartado.

7.1.1. Pureza mitocondrial

Para determinar el grado de pureza de las muestras mitocondriales, se determinó mediante inmunodetección la presencia de proteínas citosólicas y mitocondriales. En la figura 8 se observan las bandas correspondientes a los marcadores citosólicos y mitocondriales. El marcador de retículo endoplásmico, la calreticulina, se observó en las preparaciones de tejido total y se encontró en cantidades insignificantes en las mitocondrias purificadas. En contraste, el marcador mitocondrial citocromo c se encontró altamente enriquecido en las preparaciones mitocondriales (**Fig. 8**), lo cual comprueba el alto grado (95%) de pureza mitocondrial obtenido.



Figura 8. Grado de pureza mitocondrial. Inmunodetección de citocromo c (**A**) y calreticulina (**B**) en homogenado total (1) y fracción mitocondrial (2) de cerebro de rata.

7.1.2. Captación y concentración de calcio intramitocondrial

Los resultados de la concentración de Ca^{2+} libre intramitocondrial mostraron una disminución en la concentración de Ca^{2+} libre en las ratas SHR de 1 mes de edad, mientras que en las 7 meses de edad la concentración de Ca^{2+} fue igual tanto en las ratas SHR como WKY (**artículo: figura 1a y b**). Estos datos sugieren que el transporte de Ca^{2+} se afectó en ratas SHR de 1 y 7 meses de edad y en las WKY de

7 meses de edad, ya que no se observó ninguna respuesta al adicionar diferentes concentraciones de Ca^{2+} en las mitocondrias de cerebro de rata a esa edad, lo cual se corroboró con la medición de la captación de calcio, en donde se encontró una captación menor en las ratas SHR de un mes de edad en comparación a las WKY a la misma edad (**artículo: figura 2**), asimismo, la captación de Ca^{2+} en las ratas WKY de 7 meses de edad es menor en comparación a las ratas WKY de 1 mes de edad (**artículo: figura 3**). Estos últimos resultados son similares a los datos obtenidos por Arab y col. (1990), quienes encontraron que la captación de Ca^{2+} en mitocondrias de yeyuno de ratas SHR prehipertensas e hipertensas, era menor que su control WKY. Estos resultados sugieren que procesos como la hipertensión pueden afectar la captación de Ca^{2+} en mitocondrias de cerebro e intestino de SHR, lo cual podría afectar la actividad de la NOSmt (Calderón-Cortés et al., 2006).

7.1.3. Determinación del potencial transmembranal

Debido a que la captación de Ca^{2+} depende del $\Delta\Psi$ generado en la cadena respiratoria, fue importante evaluar este parámetro de funcionalidad mitocondrial. Los resultados de $\Delta\Psi$ en presencia de Ca^{2+} se presentan en las **figuras 4 y 5** del artículo. El $\Delta\Psi$ en las ratas de SHR de 1 mes de edad fue menor que en las ratas WKY de la misma edad (**artículo: figuras 4a y 4b**) y este potencial se abatió en presencia de 160 nmoles de Ca^{2+} , el cual se recuperó en presencia del quelante de Ca^{2+} EGTA en ambos casos, lo que sugiere que esta concentración de calcio no daña la integridad mitocondrial.

No se presentaron diferencias en el $\Delta\Psi$ de las ratas SHR y WKY de 7 meses; sin embargo, el requerimiento de Ca^{2+} (640 y 480 nmoles, respectivamente) para abatir el potencial de membrana fue mayor que en las ratas de 1 mes de edad y este potencial se recuperó nuevamente al adicionar EGTA a las mitocondrias (**artículo: figuras 5a y 5b**).

La comparación del $\Delta\Psi$ de las ratas SHR de 1 y 7 meses de edad (**artículo: figuras 4a y 5a**) muestran cómo el requerimiento de Ca^{2+} para inhibir el potencial es mayor conforme aumenta la edad, sin haber diferencias en el potencial de las ratas SHR de ambas edades. No hubo diferencias en el $\Delta\Psi$ en las ratas SHR de 1 y 7

meses de edad, contrario a lo ocurrido en las ratas WKY de 1 y 7 meses de edad, en donde se observó un $\Delta\Psi$ menor en las ratas de 7 meses de edad (**artículo: figuras 4b y 5b**). Las comparaciones entre WKY y SHR a una misma edad muestran un $\Delta\Psi$ menor en las SHR, lo cual sugiere que tanto la edad como algún proceso patológico (hipertensión), afectan la funcionalidad mitocondrial, así expresada como $\Delta\Psi$ (**artículo: figuras 4a y 4b**). La presencia de grandes cantidades del anión superóxido generadas en la cadena respiratoria de mitocondrias de cerebro de ratas SHR y la deficiencia de enzimas antioxidantes convierte a estas mitocondrias en un blanco del estrés oxidativo (Ohtsuki et al., 1995), lo cual a su vez se puede ver reflejado en una disminución en el potencial de membrana (**artículo: figuras 4 y 5**) y por lo tanto, disminuir la captación de Ca^{2+} en estas ratas (**artículo: figuras 1, 2 y 3**).

7.1.4. Determinación de la concentración de óxido nítrico

La NOS cataliza la oxidación de la L-arginina (L-arg) a L-citrulina y NO^\bullet en forma equimolar, por lo tanto, la determinación de L-citrulina puede ser utilizada para la determinación indirecta de los niveles de NO^\bullet (Knipp, 2000); es por ello que se determinó la síntesis de L-citrulina mediante la adición de diferentes concentraciones de Ca^{2+} , catión que estimula la actividad de la NOSmt. En la **figura 6** del artículo se muestran los resultados de la síntesis de L-citrulina obtenidos en las mitocondrias de cerebro de ratas hipertensas y normotensas de 1 y 7 meses de edad, incubadas por 1 h en presencia de 80, 160, 240, 320, 400 y 480 nmoles de Ca^{2+} . La determinación de la concentración basal de NO^\bullet se realizó sin la adición de Ca^{2+} . La actividad basal de la NOSmt fue mayor en las ratas WKY de 1 mes de edad comparada con las SHR de la misma edad (**artículo: figura 6a**). En mitocondrias de las ratas SHR de 7 meses se observó una mayor actividad basal en la NOSmt en comparación a las WKY de 7 meses de edad (**artículo: figura 6b**). En las ratas WKY de 1 mes de edad se observó que la síntesis de NO^\bullet (L-citrulina) es estimulada de manera dependiente a la concentración de Ca^{2+} ($p < 0.05$) (**artículo: figura 6a**). En contraste, en las mitocondrias de ratas SHR de la misma edad no se observó estimulación en la síntesis de NO^\bullet en presencia del Ca^{2+} , lo cual sugiere que puede existir una deficiencia en la disponibilidad de este catión dentro de la mitocondria como se vio

anteriormente (**artículo: figuras 1a y 2**). Esto puede contribuir en una disminución en la actividad de la NOSmt en ratas SHR de 1 mes de edad, como se observó en la **figura 6a** del artículo, así como en un trabajo anterior (Calderón-Cortés et al., 2006). En el caso de las mitocondrias de ratas WKY de 7 meses de edad, se observó que la actividad de la NOSmt fue estimulada en presencia de altas concentraciones de Ca^{2+} (400 y 480 nmoles) ($p < 0.05$) (**artículo: figura 6b**), mientras que en las ratas SHR de 7 meses de edad se encontró que a pesar de que esta actividad fue mayor en comparación a las ratas de 1 mes de edad, dicha actividad no fue estimulada por las diferentes concentraciones de Ca^{2+} (**artículo: figura 6b**). Estos resultados sugieren que la actividad de la NOSmt, tanto en ratas hipertensas como en ratas normotensas de 7 meses de edad, podría afectarse debido a la disminución en la concentración y en el transporte de Ca^{2+} mitocondrial (**artículo: figuras 1b y 3**), lo cual se ve reflejado en la actividad no significativa de la NOSmt en presencia de Ca^{2+} .

7.1.5. Determinación de la actividad de la citocromo c oxidasa

Otra forma de evaluar tanto la actividad de la NOSmt como la funcionalidad mitocondrial fue determinando la actividad del complejo IV sensible a NO^{\bullet} . Debido a que la actividad de la NOSmt es estimulada por un aumento en la captación de Ca^{2+} mitocondrial (Dedkova et al., 2004, Kanai et al., 2004). También se evaluó si un aumento en la captación de Ca^{2+} en mitocondrias de ratas SHR y WKY afecta la actividad del complejo IV mediante la determinación del consumo de oxígeno. Los resultados presentados en la **figura 6c** del artículo muestran que la actividad basal del complejo IV fue menor en las ratas WKY de 1 meses de edad en comparación a las ratas SHR de la misma edad; mientras que las ratas WKY adultas presentaron mayor actividad basal del complejo IV en comparación a las SHR de la misma edad (**artículo: figura 6d**). Los datos en las ratas de 1 mes de edad corroboraron los resultados de Calderón-Cortés et al. (2006), en donde se observó que la actividad de la NOSmt en ratas SHR jóvenes fue disminuida en comparación a su control WKY, lo cual se podría verse reflejado en un aumento en la actividad del complejo IV (**artículo: figura 6c**) debido a la disminución en la síntesis de NO^{\bullet} (Calderón-Cortés et al., 2006). El aumento en la concentración de $[\text{Ca}^{2+}]_m$ provocó una disminución en

la actividad del complejo IV en las ratas WKY y SHR de 1 y 7 meses de edad. En las ratas WKY de 1 mes se presentó una inhibición total en el consumo de oxígeno en presencia de 480 nmoles de Ca^{2+} , mientras que en las ratas SHR de 1 mes esta disminución fue del 35% a la misma concentración de Ca^{2+} . La actividad del complejo IV en las ratas de 7 meses disminuyó en un 76% en las ratas WKY, mientras que las ratas SHR mostraron una inhibición completa cuando se adicionaron 480 nmoles de Ca^{2+} (**artículo: figura 6d**). Estos resultados sugieren que la concentración Ca^{2+} necesaria para inducir la producción de NO^{\bullet} mitocondrial es diferente en las ratas normotensas e hipertensas, lo que podría ser atribuido a la diferencia observada en la captación de Ca^{2+} en este grupo de ratas (**artículo: figuras 1, 2 y 3**). Para verificar que la inhibición de la actividad del complejo IV fue debida a un aumento en la producción del NO^{\bullet} mitocondrial en respuesta a la captación Ca^{2+} mitocondrial, la síntesis de NO^{\bullet} se inhibió con la adición de un inhibidor competitivo de la NOSmt, el L-monometil-L-arginina (L-NMMA) 100 μM (Ghafourifar, 2002). La adición de L-NMMA ocasionó un aumento en el consumo de oxígeno en mitocondrias de ratas WKY y SHR de 7 meses (**Fig. 9**), sugiriendo que la inhibición del consumo de oxígeno fue debida a la activación de la NOSmt en respuesta a la captación de Ca^{2+} . En el caso de las ratas SHR y WKY de 1 mes de edad, el consumo de oxígeno no fue afectado por el L-NMMA (**Fig. 9**). Estos resultados mostraron que existe una diferencia tanto en la actividad basal del complejo IV como en la susceptibilidad a la inhibición de este complejo en las ratas SHR, lo cual sugiere que la hipertensión podría afectar algún sitio importante para la actividad de este complejo. Por lo tanto, fue importante investigar si las diferencias que existen en la actividad del complejo IV son debidas a un cambio en el centro binuclear $\text{Cu}_B/\text{hemo aa}_3$ que es el sitio de reducción del O_2 . Por consiguiente, se determinó la actividad de este complejo en presencia de diferentes concentraciones de un donador de NO^{\bullet} (SNAP) y de cianuro (CN^-), dos inhibidores del centro binuclear $\text{Cu}_B/\text{hemo aa}_3$ del complejo IV. La **figura 7** del artículo muestra los resultados de la actividad del complejo IV en presencia de SNAP y CN^- en las ratas WKY y SHR de 1 y 7 meses de edad. Los resultados mostraron que la actividad del complejo IV en las ratas WKY y SHR de 1 mes de edad es más susceptible a la inhibición por NO^{\bullet} y CN^- , y la inhibición fue diferencial

con ambos inhibidores (**artículo: figura 7a y 7c**) ($p < 0.05$), mientras que en mitocondrias de ratas de 7 meses de edad no se observaron diferencias significativas en presencia de los dos inhibidores (**artículo: figura 7b y 7d**). Esto indica que mientras las ratas WKY y SHR jóvenes requieren concentraciones bajas tanto de NO^{\bullet} como de CN^- para inhibir el complejo IV, las mitocondrias de ratas WKY y SHR adultas requieren de concentraciones altas de estos inhibidores. Estos resultados sugieren que existe una alteración en el centro binuclear $\text{Cu}_B/\text{hemo aa}_3$ del complejo IV en las ratas WKY y SHR de 7 meses de edad. De igual manera, estos últimos resultados demuestran que la actividad medida anteriormente fue debida al complejo IV, la cual es sensible a cianuro (Nicholls y Ferguson, 2002).

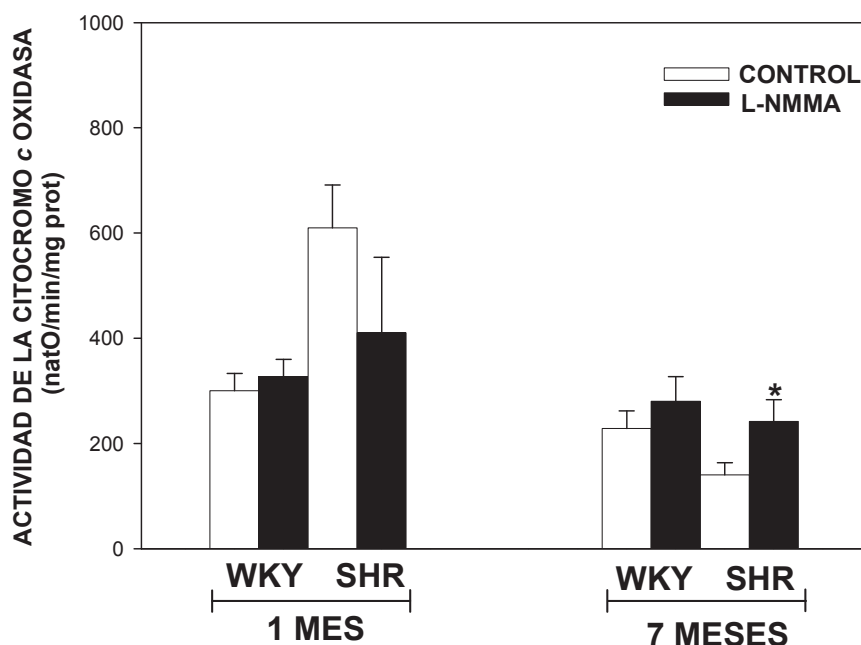


Figura 9. Actividad de la citocromo c oxidasa en mitocondrias de cerebro de ratas de 1 mes y 7 meses de edad en presencia de L-NMMA. Esta actividad fue evaluada midiendo el consumo de oxígeno en presencia de un inhibidor de la NOS (L-NMMA). La mitocondrias (0.3 mg/ml) fueron incubadas en un medio de fosfatos, pH 7.4 a temperatura ambiente en presencia de L-NMMA 100 μM . WKY = Ratas Wistar-Kyoto; SHR = Ratas espontáneamente hipertensas. Los resultados representan el promedio de $n = 3 \pm$ el error estándar. * $p < 0.05$, con respecto al control.

7.2. ACTIVIDAD DE LA CITOCROMO c OXIDASA EN MITOCONDRIAS DE HÍGADO Y RIÑÓN DE RATA DURANTE LA HIPERTENSIÓN

7.2.1. Introducción

El NO[•] sintetizado por la NOS_{mt} contribuye en la regulación de la fosforilación oxidativa al inhibir la síntesis de ATP mediante su unión al complejo IV de la cadena respiratoria en el sitio de unión al oxígeno, el centro binuclear Cu_B/citocromo a_3 (Calderón-Cortés et al., 2006; Ghafourifar y Saavedra-Molina, 2006). De este modo, el NO[•] puede regular el gasto de ADP/O llevado a cabo durante la fosforilación oxidativa y aumentar su disponibilidad para otras vías metabólicas (Antunes et al., 2007). De igual forma, la interacción del NO[•] con el complejo IV puede aumentar la disponibilidad de O₂ a otros tejidos previniendo de este modo la hipoxia (Brookes et al., 2003).

Por otra parte, la disfunción mitocondrial ha sido fuertemente asociada a patologías como la hipertensión (Lopez-Campistrous et al., 2008), lo cual podría afectar la regulación que ejerce el NO[•] sobre la respiración mitocondrial. (Brookes et al., 2003). De aquí, la importancia de determinar si la actividad de la complejo IV como blanco del NO[•] se ve afectada en mitocondrias de diferentes órganos durante la hipertensión, debido a que en esta patología se ha determinado que la actividad de este complejo es la más afectada (Lopez-Campistrous et al., 2008).

7.2.2. Estrategia experimental

7.2.2.1. Aislamiento de mitocondrias de hígado y riñón de rata

El aislamiento de mitocondrias se realizó de acuerdo al método modificado por Saavedra-Molina y Devlin (1997). Todo el procedimiento se realizó en un medio de aislamiento con manitol 220 mM, sacarosa 70 mM, MOPS 2 mM y EGTA 1 mM (pH 7.4 y 4°C). Se utilizaron ratas WKY y SHR de 1 y 7 meses de edad. Se sacrificó la rata por decapitación, se extrajo el hígado y el riñón. Se fragmentaron ambos órganos por separado y se homogenizaron en un tubo de homogenización a 176 x g

con un vástago de teflón. El homogenizado se centrifugó a 490 x *g* por 10 min. en un rotor JA-20 de una centrifuga Beckman J2-MC. Se desechó el precipitado y el sobrenadante se centrifugó a 4400 x *g* durante 10 min. Posteriormente, se resuspendió cuidadosamente el precipitado en Percoll al 15% y se colocó sobre un gradiente discontinuo de Percoll (23% y 40%). Este gradiente fue centrifugado a 30,700 x *g* por 15 min y se extrajo la fracción 3 correspondiente a las mitocondrias, la cual fue centrifugada a 16,700 x *g* durante 10 min. Se resuspendió cuidadosamente el precipitado en el mismo medio de aislamiento y se adicionó 80 µl de albúmina sérica bovina al 0.2% por ml de suspensión mitocondrial. Finalmente, se centrifugó a 6,900 x *g* por 10 min con el mismo medio pero sin EGTA. La concentración de proteína se determinó por el método de Lowry (Lowry et al., 1951).

7.2.3. Resultados

La **figura 10** muestra los resultados de la actividad del complejo IV en mitocondrias de hígado y riñón de ratas jóvenes. Se puede apreciar una diferencia en la actividad basal del complejo IV en los diferentes órganos, tanto en las ratas SHR como en la WKY. La actividad basal del complejo IV fue mayor en las mitocondrias de riñón (408.8 ± 4.4 natO/min/mg prot) en ratas WKY y SHR (512.2 ± 121.7 natO/min/mg prot), mientras que las mitocondrias de hígado presentaron una menor actividad en dicho complejo en comparación al riñón en ambos grupos de ratas (261.3 ± 5.3 natO/min/mg prot en WKY y 311.8 ± 110.7 natO/min/mg prot en SHR). Por otra parte, se estudió la inhibición del complejo IV mediante la adición del donador de NO[•], el S-nitroso-N-acetilpenicilamina (SNAP). Se observó una diferente susceptibilidad a 70 µM de SNAP en los dos órganos, presentándose una inhibición del 60% y 48%, en mitocondrias de hígado y riñón de ratas WKY de 1 mes de edad (**Figs. 10a y 10b**). En ratas SHR se observó que las mitocondrias de riñón fueron las más susceptibles al SNAP, observándose una inhibición del 90%, mientras que en hígado se presentó una inhibición del 45%. Estos resultados sugieren una regulación diferencial de la cadena respiratoria a nivel del complejo IV en mitocondrias de ratas normotensas y prehipertensas de diferentes órganos (**Figs. 10a y 10b**).

Los resultados de la actividad del complejo IV en ratas WKY y SHR adultas mostraron una mayor actividad basal en mitocondrias de riñón (377.8 ± 91.8 [WKY] y 296.0 ± 58.3 [SHR] natO/min/mg prot) (**Fig. 11b**), en comparación a las mitocondrias de hígado, donde la actividad fue menor tanto en ratas WKY como en SHR (146.6 ± 46.8 y 160.0 ± 19.8 natO/min/mg prot, respectivamente) (**Fig. 11a**). La actividad basal del complejo IV en las ratas normotensas e hipertensas de 7 meses de edad disminuye en comparación con la actividad de las ratas de 1 mes de edad, lo cual sugiere que la hipertensión asociada con la edad afecta la actividad del complejo IV en mitocondrias de hígado y riñón, lo que a su vez, podría comprometer la función mitocondrial de estos órganos.

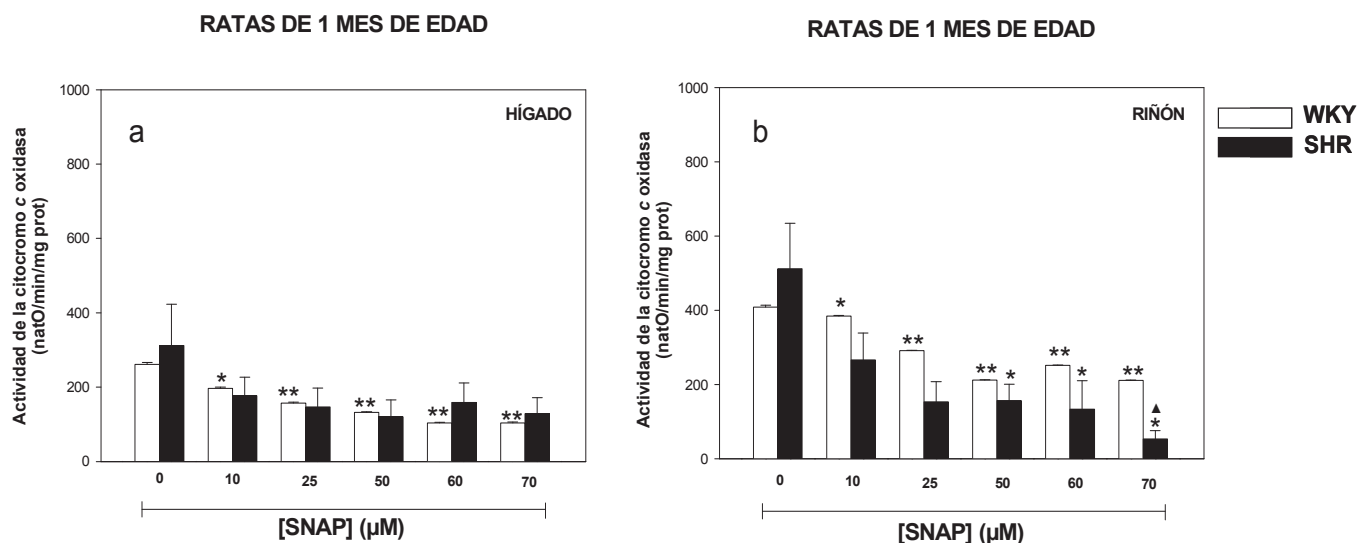


Figura 10. Actividad de la citocromo c oxidasa en mitocondrias de cerebro de ratas de 1 mes de edad. La actividad del complejo IV fue evaluada midiendo el consumo de oxígeno de mitocondrias de **a)** Hígado y **b)** Riñón de ratas de 1 mes de edad. El complejo I fue inhibido con rotenona, mientras que el complejo III se inhibió con antimicina A y estigmatelina. La reacción fue iniciada con la adición de ascorbato. Diferentes concentraciones de S-nitroso-N-acetilpenicilamina (SNAP) se adicionaron. Los resultados representan el promedio de $n = 4-6 \pm$ el error estándar. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, con respecto al control. ▲ $p < 0.05$ con respecto a las cepas.

Asimismo, en la **figura 11a y 11b** se puede observar una susceptibilidad diferente al SNAP en mitocondrias de los dos órganos. En presencia de $70 \mu\text{M}$ de SNAP, la actividad del complejo IV se inhibió un 54 y 45% en las mitocondrias de

ratas WKY de hígado y riñón, respectivamente, mientras que en las mitocondrias de ratas SHR, la inhibición fue de 52% en mitocondrias de hígado y de 61% en mitocondrias de riñón. Comparando los porcentajes de inhibición entre las mitocondrias de hígado y riñón de ratas de 1 y 7 meses de edad, se observa que no existen diferencias con respecto a la edad. Sin embargo, en la **figura 11a y 11b** se observa que en mitocondrias de ratas de 7 meses de edad de ambos órganos se requieren altas concentraciones de SNAP para inhibir la actividad del complejo IV, mientras que a bajas concentraciones del donador el complejo IV no se inhibe en forma significativa, lo cual no sucede con las mitocondrias de ratas de 1 mes de edad. Por lo tanto, estos datos sugieren que durante la hipertensión, la susceptibilidad del complejo IV al SNAP podría cambiar debido a una alteración en el sitio de unión del NO^{*} y el O₂ al complejo IV (centro binuclear Cu_B/citocromo a₃).

Para comprobar lo anterior se determinó la actividad del complejo IV en presencia de cianuro (CN⁻), el cual es un inhibidor del complejo IV que se une al citocromo a₃ inhibiendo el consumo de oxígeno de una forma similar al NO^{*} (Nicholls y Ferguson, 2002).

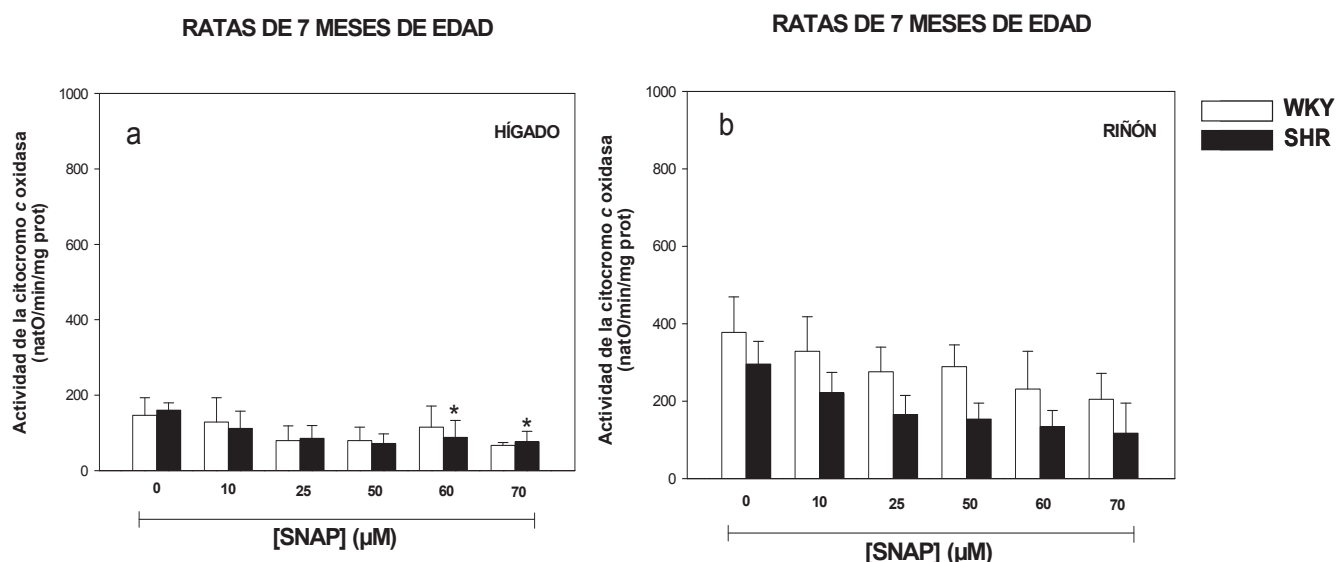


Figura 11. Actividad de la citocromo c oxidasa en mitocondrias de cerebro de ratas de 7 meses de edad. La actividad del complejo IV fue evaluada midiendo el consumo de oxígeno de mitocondrias de **a)** Hígado y **b)** Riñón de ratas de 7 meses de edad. El complejo I fue inhibido con rotenona, mientras que el complejo III se inhibió con antimicina A y estigmatelina. La reacción fue iniciada con la adición de ascorbato. Diferentes concentraciones de S-nitroso-N-acetilpenicilamina (SNAP) se adicionaron. Los resultados representan el promedio de n = 4-6 ± el error estándar. *p<0.05, **p<0.01, con respecto al control.

En la **figura 12** se observan los resultados de la actividad del complejo IV en presencia de diferentes concentraciones de CN^- en mitocondrias de hígado, riñón de ratas SHR y WKY de 1 mes de edad. En ratas WKY, la actividad disminuyó un 95 y 92% en mitocondrias de hígado y riñón, respectivamente, en presencia de 40 μM de CN^- , mientras que en mitocondrias de ratas SHR, la inhibición fue de 84 y 90% en mitocondrias de hígado y riñón, respectivamente (**Figs. 12a y 12b**). Lo anterior sugiere que en ratas jóvenes, independientemente de la cepa, la sensibilidad del complejo IV al CN^- no se altera; por lo tanto, el centro binuclear Cu_B /citocromo a_3 no se afecta en las mitocondrias de ratas WKY ni SHR de 1 mes de edad. En mitocondrias de ratas de 7 meses, se observó una inhibición de 52 y 73% en mitocondrias de hígado y riñón, respectivamente, de ratas WKY, mientras que en ratas SHR esta inhibición fue de 21% y 63% (**Figs. 13a y 13b**) para mitocondrias de hígado y riñón, respectivamente. Estos últimos resultados sugieren que la susceptibilidad del complejo IV a la inhibición por CN^- se afecta con la hipertensión y la edad, lo cual corrobora los resultados de la susceptibilidad del complejo IV por SNAP (**Figs. 11a y 11b**). Estos últimos resultados sugieren la existencia de un defecto en el centro binuclear Cu_B /citocromo a_3 del complejo IV en las ratas WKY y SHR de 7 meses de edad.

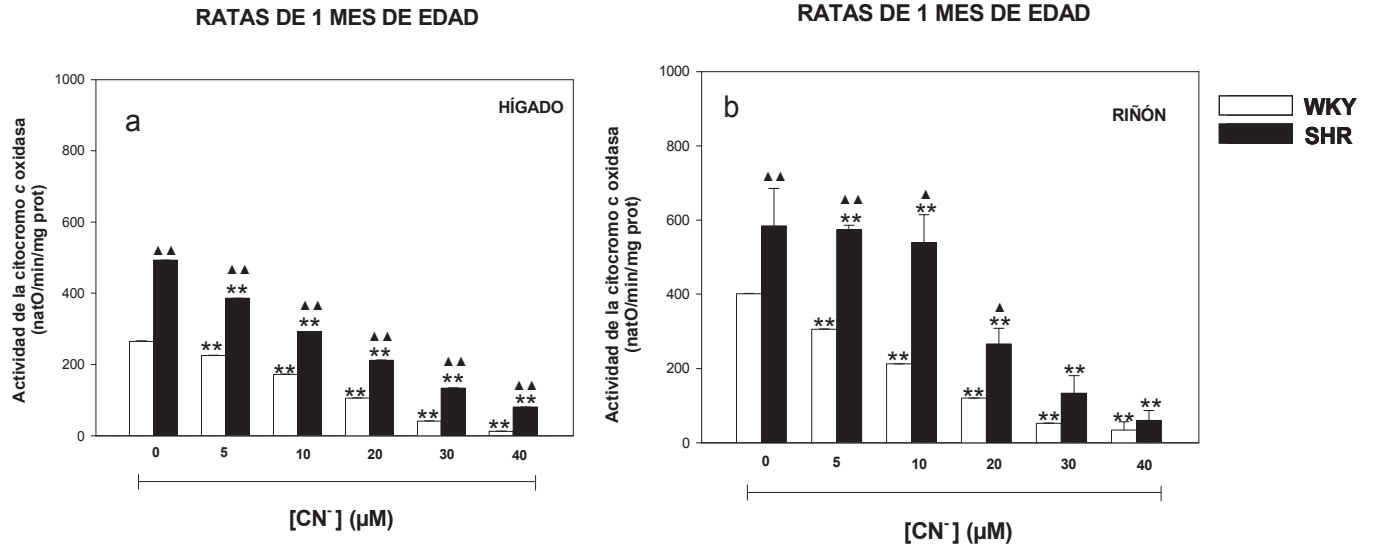


Figura 12. Actividad de la citocromo c oxidasa en mitocondrias de cerebro de ratas de 1 mes de edad. La actividad del complejo IV fue evaluada midiendo el consumo de oxígeno de mitocondrias de a) Hígado y b) Riñón de ratas de 1 mes de edad. El complejo I fue inhibido con rotenona, mientras que el complejo III se inhibió con antimicina A y estigmatelina. La reacción fue iniciada con la adición de ascorbato. Diferentes concentraciones de KCN (CN⁻) se adicionaron. Los resultados representan el promedio de n = 4-6 ± el error estándar. *p<0.05, **p<0.01, con respecto al control. ▲p<0.05, ▲▲p<0.01 con respecto a las cepas.

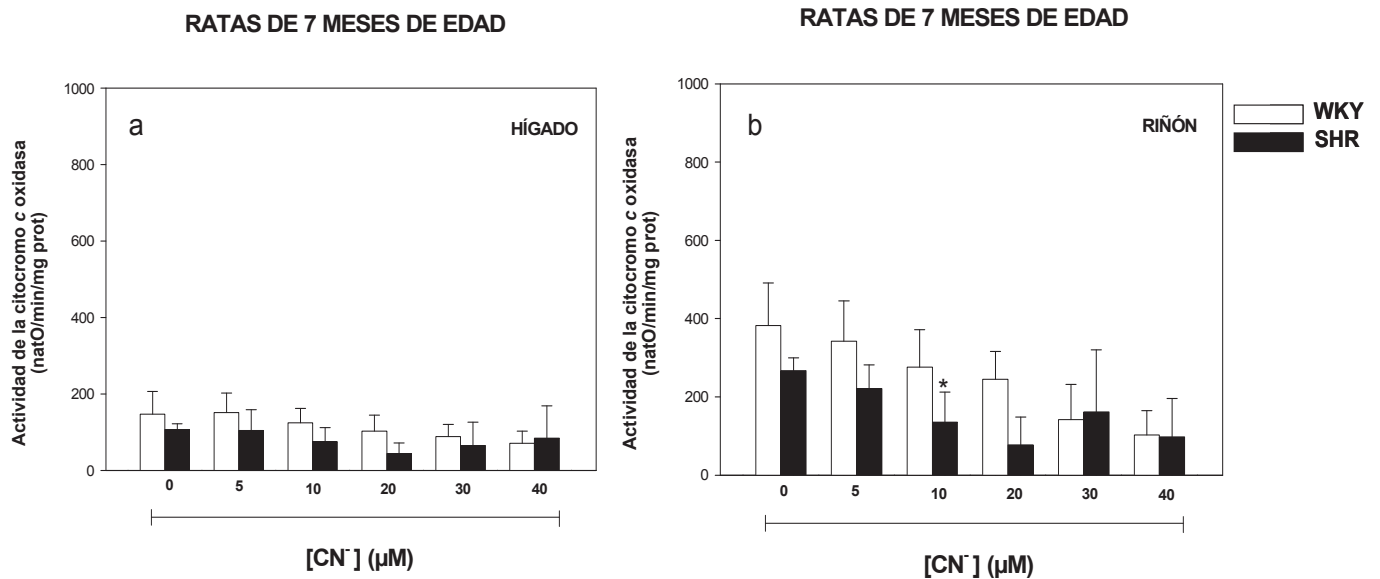


Figura 13. Actividad de la citocromo c oxidasa en mitocondrias de cerebro de ratas de 7 meses de edad. La actividad del complejo IV fue evaluada midiendo el consumo de oxígeno de mitocondrias de a) Hígado y b) Riñón de ratas de 7 meses de edad. El complejo I fue inhibido con rotenona, mientras que el complejo III se inhibió con antimicina A y estigmatelina. La reacción fue iniciada con la adición de ascorbato. Diferentes concentraciones de KCN (CN⁻) se adicionaron. Los resultados representan el promedio de n = 4-6 ± el error estándar. *p<0.05, **p<0.01, con respecto al control.

8. DISCUSIÓN

En los últimos años la hipertensión se ha convertido en un importante tema de estudio debido a su alta prevalencia y a las complicaciones que esta patología genera. Es así como el NO[•] se ha convertido en un blanco de estudio, debido a la importancia que tiene tanto en la regulación del tono vascular como en la regulación del metabolismo mitocondrial (principal fuente de energía de las células aerobias) (Marletta, 1993, López-Figueroa et al., 2000).

Por otra parte, estudios recientes han sugerido una disminución en la actividad de NOSmt durante la hipertensión, lo cual podría afectar el efecto regulador que tiene el NO[•] sobre la síntesis de ATP (Aguilera-Aguirre et al., 2002; Calderón-Cortés et al., 2006).

Debido a que el Ca²⁺ es uno de los cofactores más importantes para la actividad de la NOSmt fue importante estudiar el transporte mitocondrial y la concentración de este catión durante la hipertensión, con el objetivo de determinar si una deficiencia en su concentración pudiera explicar la disminución en la actividad de la NOSmt en mitocondrias de cerebro de ratas, siendo el cerebro uno de los principales órganos blanco de la hipertensión.

Los resultados del presente trabajo mostraron una disminución en la captación y en los niveles de Ca²⁺ en mitocondrias de cerebro de ratas SHR de 1 y 7 meses de edad, así como en ratas WKY de 7 meses de edad. Debido a que la captación de Ca²⁺ es dependiente del $\Delta\Psi$ generado en la cadena respiratoria, fue importante determinar si la funcionalidad mitocondrial se encuentra afectada en mitocondrias de ratas hipertensas, lo cual podría explicar la disminución en la concentración de Ca²⁺ mitocondrial.

La disminución en la actividad del complejo IV y en el $\Delta\Psi$ observada en ratas SHR de 1 y 7 meses, así como en las ratas WKY de 7 meses de edad, indican una funcionalidad mitocondrial alterada en cerebro, lo cual podría afectar la concentración de Ca²⁺ y la actividad de la NOSmt dependiente de Ca²⁺.

En adición, se consideró importante investigar si la disfunción mitocondrial en hipertensión descrita en mitocondrias de cerebro podría estar asociada a una sensibilidad disminuida del complejo IV al NO[•], lo cual podría reflejar una alteración en el sitio catalítico de esta enzima. Para corroborar esta hipótesis, se midió la sensibilidad del complejo IV de mitocondrias de hígado y de riñón a la inhibición por KCN (CN⁻) y NO[•].

Con respecto a la susceptibilidad del complejo IV al NO[•] y al CN⁻ en los diferentes órganos se observó que las mitocondrias de cerebro de ratas normotensas de 1 y 7 meses de edad fueron las más susceptibles a la inhibición por ambos inhibidores, sin embargo esta susceptibilidad se afectó en ratas hipertensas ya que las mitocondrias de riñón fueron las más susceptibles a la inhibición tanto por NO[•] como por CN⁻. Estos resultados nos sugieren una regulación diferencial de la cadena respiratoria a nivel del complejo IV, en mitocondrias de ratas normotensas que puede cambiar con la hipertensión. Lo anterior podría estar relacionado con un ensamble defectuoso de este complejo reportado recientemente en mitocondrias de cerebro de ratas hipertensas (Lopez-Campistrous et al., 2008), lo cual podría a su vez afectar la conformación del centro binuclear Cu_B/citocromo a₃, y contribuir con la susceptibilidad disminuida al NO[•] y al CN⁻. Esto último podría afectar el efecto regulador del NO[•] sobre la cadena respiratoria, debido a que se requieren concentraciones altas de NO[•] para inhibir el complejo IV; sin embargo debido a que las concentraciones de Ca²⁺ intramitocondrial se ven afectadas por una disfunción mitocondrial durante hipertensión, la actividad de la NOSmt podría verse comprometida y por lo tanto disminuir la síntesis de NO[•] y afectar así la regulación de la cadena respiratoria.

Por último, los resultados de la actividad del complejo IV en mitocondrias de hígado y riñón de ratas mostraron una diferencia entre los dos órganos en cuanto a la actividad basal del complejo IV durante la hipertensión. La actividad de este complejo en las mitocondrias de hígado y riñón también se afecta durante la hipertensión y con la edad (Figs. 1 y 2).

8.1. MODELO PROPUESTO

El presente modelo propone una explicación de cómo la concentración de Ca^{2+} puede disminuir en mitocondrias de cerebro de ratas hipertensas, y por lo tanto, disminuir la actividad de la NOSmt como se reportó con anterioridad (Calderón-Cortés et al., 2006). El NADH y FADH_2 son oxidados en los complejos I y II de la cadena transportadora de electrones (CTE). Las reacciones redox que ocurren durante el transporte de electrones están acopladas al bombeo vectorial de protones hacia el espacio intermembranal, generando el potencial de membrana ($\Delta\Psi$) que es utilizado, tanto para la síntesis de ATP como para la entrada de ciertos cationes como el Ca^{2+} . El aumento en la concentración intramitocondrial de Ca^{2+} activa la actividad de la NOSmt [1]. El NO^\bullet producido por la NOSmt es un inhibidor competitivo del complejo IV de la CTE [2]. Por lo tanto, la inhibición del flujo de electrones a través de la cadena por el NO^\bullet disminuye el $\Delta\Psi$ y, como consecuencia, la síntesis de ATP. En la hipertensión, el metabolismo mitocondrial en cerebro podría estar alterado debido a una disminución en la actividad de las enzimas de la CTE, en específico, de la citocromo c oxidasa, cuya actividad resultó disminuida en ratas SHR de 7 meses [3] (artículo: figuras 6d y 7), disminuyendo al mismo tiempo el potencial de $\Delta\Psi$ [4] (artículo: figuras 5) y por lo tanto, la entrada de Ca^{2+} a la mitocondria [5] (artículo: figuras 1b y 3). En el caso de las mitocondrias de ratas SHR jóvenes, donde no se observó una disminución en la actividad del complejo IV, otro de los complejos de la cadena respiratoria puede verse afectado (Lopez-Campistrous et al., 2008) y así contribuir a la disminución en el $\Delta\Psi$ que fue encontrado en mitocondrias de ratas SHR de 1 mes. Una disminución en la concentración de Ca^{2+} intramitocondrial durante este proceso patológico podría afectar la actividad de NOSmt [6] y disminuir la concentración de NO^\bullet , lo cual podría a su vez afectar la regulación de la CTE y la fosforilación oxidativa. Por lo tanto, la hipertensión podría dañar progresivamente el metabolismo energético mitocondrial del cerebro, llevando a una disfunción mitocondrial progresiva, lo cual culminaría con muerte celular neuronal.

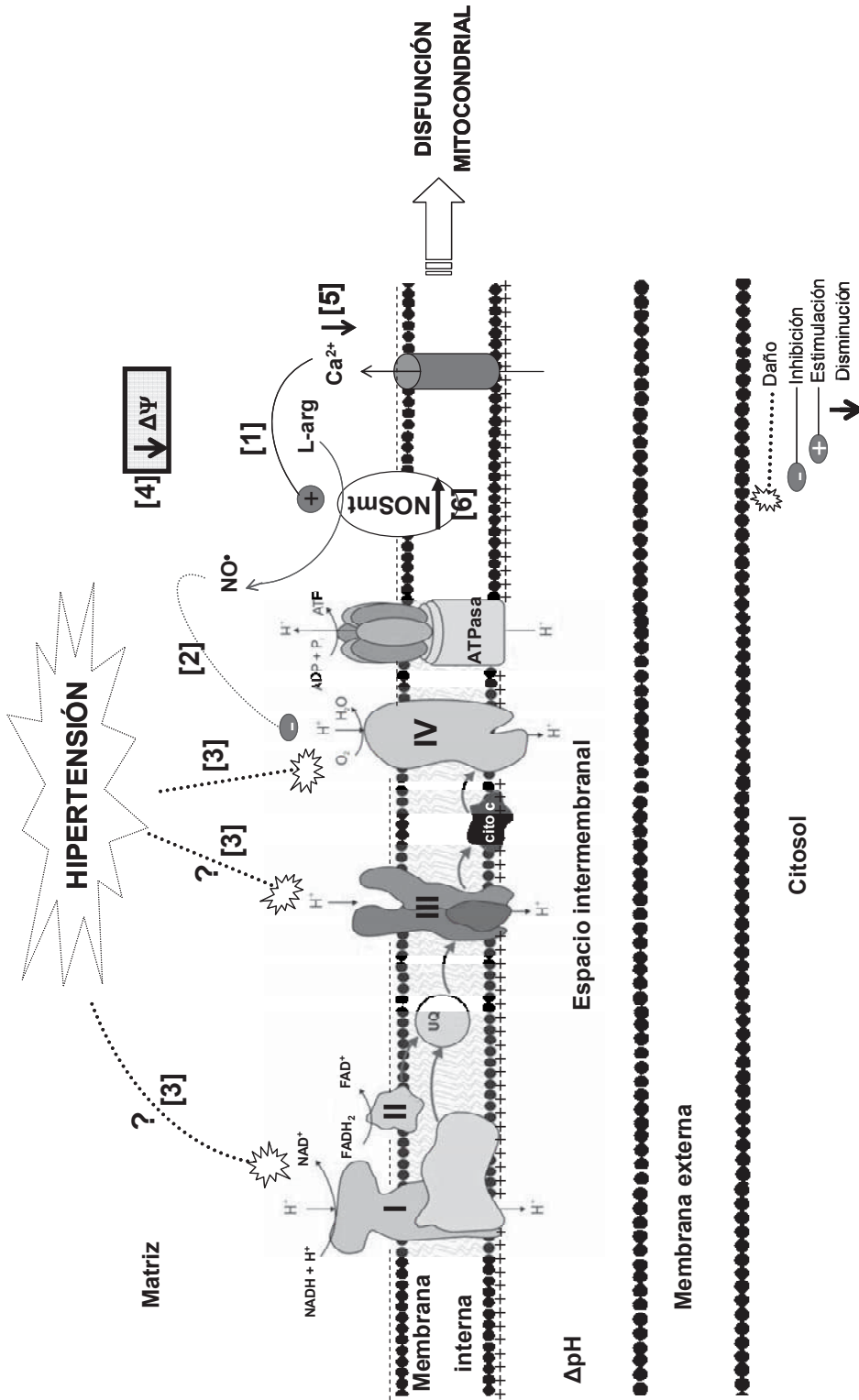


Figura 14. Modelo propuesto del metabolismo mitocondrial en cerebro de rata durante la hipertensión. La hipertensión puede ser causa de disfunción mitocondrial debido a la disminución en la actividad de uno de los complejos de la cadena respiratoria, lo cual puede llevar a la disminución en la captación de Ca²⁺, afectado así la actividad de la NOSmt.

9. CONCLUSIONES

- La hipertensión asociada con la edad, afectó la función mitocondrial en cerebro, causando una alteración en el metabolismo de Ca^{2+} y afectando la actividad de la NOSmt.
- La hipertensión, afectó la susceptibilidad del complejo IV a la inhibición por NO^{\bullet} en mitocondrias de cerebro de rata.
- La hipertensión, afectó la actividad del complejo IV en mitocondrias de hígado y riñón de rata, lo que contribuyó a que se presente una susceptibilidad diferencial a la inhibición del NO^{\bullet} .

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Alderton, W.K., Cooper, C.E. y Knowles, R.G. 2001. **Nitric oxide synthase: structure, function and inhibition.** *Biochem. J.* 357: 593-615.
2. Alp, N.J. y Channon, K.M. 2004. **Regulation of endothelial nitric oxide synthase by tetrahydrobiopterin in vascular disease.** *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24: 413-420.
3. Alvarez, S., Novoa, B.M.J. y Boveris, A. 1994. **La mitocondria: estructura, función y especies reactivas del oxígeno.** *Antioxidantes y Calidad de vida.* 1: 26-38.
4. Antonicka, H., Ogilvie, I., Taivassalo, T., Anitori, R.P., Haller, R.G. Vissing, J., Kennaway, N.G. y Shoubridge, E.A. 2003. **Identification and characterization of a common set of complex I intermediates in mitochondria from patients with complex I deficiency.** *J. Biol. Chem.* 278: 43081-43088.
5. Antunes, F., Boveris, A. y Cadenas, E. 2007. **On the biologic role of the reaction of NO with oxidized cytochrome c oxidase.** *Antioxid. Redox. Signal.* 9: 1-11.
6. Babu, B.R., Frey, C. y Griffith, O.W. 1999. **L-arginine binding to nitric-oxide synthase.** *J. Biol. Chem.* 274: 25218-25226.
7. Bates, T.E., Loesch, A., Burnstock, G. y Clark, J.B. 1995. **Immunocytochemical evidence for a mitochondrially located nitric oxide synthase in brain and liver.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 213: 896-900.
8. Beattie, D.S. **Bioenergetics and oxidative metabolism.** 2002. En: *Textbook of Biochemistry with clinical correlations.* 5^a Edition. (Devlin, T.M. Ed). USA. Wiley-Liss. 13: 537- 596.
9. Bianchi, K., Rimessi, A., Prandini, A., Szabadkai, G. y Rizzuto, R. 2004. **Calcium and mitochondria: mechanisms and functions of a troubled relationship.** *Biochim Biophys Acta.* 1742: 119-131.
10. Blachly-Dyson, E., Song, J., Wolfgang, W.J. Colombini, M. y Forte, M. 1997. **Multicopy suppressors of phenotypes resulting from the absence of yeast VDAC encode a VDAC-like protein.** *Mol. Cell. Biol.* 17: 5727-5738.

11. Bordet, R., Pu, Q., Puisieux, F., Deplanque, D., Jaboureck, O., Leys, D., Vallet, B. y Dupuis, B. 2000. **Susceptibility to provoked cerebral infarction is not increased in a rat model of pharmacologically-induced hypertension despite endothelial dysfunction.** *Fundam. Clin. Pharmacol.* 14: 177-186.
12. Brookes, P.S., Kraus, D.W., Shiva, S., Doeller, J.E. Barone, M.C., Patel, R. P., Lancaster, J.R. Darley-Usmar, V. 2003. **Control of mitochondrial respiration by NO[•]; effects of low oxygen and respiratory state.** *J. Biol. Chem.* 278: 31603-31609.
13. Brookes, P.S., Yoon, Y., Robotham, J. L. Anders, M.W. Sheu y S.S. 2004. **Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle.** *Am J Physiol.* 287: C817-C833.
14. Brookes, P.S. 2004. **Mitochondrial nitric oxide synthase.** *Mitochondrion.* 3: 187-204.
15. Brown, G.C. 2001. **Regulation of mitochondrial respiration by nitric oxide inhibition of cytochrome c oxidase.** *Biochim. Biophys. Acta.* 1504, 46-57.
16. Campanella, M., Pinton, P. y Rizzuto, R. 2004. **Mitochondrial Ca²⁺ homeostasis in health and disease.** *Biol. Res.* 37(4):653-660.
17. Carpenter, R.H.S. 1998. **El cerebro.** En: *Neurofisiología.* 2a ed. Edit. Manual Moderno. México. 1: 6-35.
18. Cascales, A.M. 2003. **Bases moleculares de la apoptosis.** *Anal. Real Acad. Nal. Farm.* 69: 36-64.
19. Chen, Y., Panda, K. y Stuehr, D. 2002. **Control of nitric oxide synthase dimer assembly by a heme-NO-dependent mechanism.** *Biochemistry.* 41: 4618-4625.
20. Chou, T.C., Yen, M.H., Li, C.Y., Ding, Y.A. 1998. **Alterations of nitric oxide synthase expression with aging and hypertension in rats.** *Hypertension.* 31:643-648.
21. Cornejo U.R. 2007. **Variaciones mitocondriales en el transcurso de la diferenciación celular del epitelio mamario.** *Rev. Chil. Obstet. Ginecol.* 72(3): 182-185.

22. Devlin, T.M. 2002. **Oxidative metabolism**. 5a ed. *Biochemistry*. Edit. Wiley-Liss. U.S.A. Capítulo 13.
23. Denton, R. M y McCormack, J. G. 1990. Ca^{2+} as a second messenger within mitochondria of the heart and other tissues. *Annu. Rev. Physiol.* 52: 451-466.
24. Dohi, Y., Kojima, M. y Sato, K. 1996. **Endothelial modulation of contractile responses in arteries from hypertensive rats**. *Hypertension.* 28: 732-737.
25. Elfering, S.L., Sarkela, T.M. y Giulivi, C. 2002. **Biochemistry of mitochondrial nitric oxide synthase**. *J. Biol. Chem.* 277: 38079-38086.
26. Forsmark-Andréé, P. y Ernster, L. 1994. **Evidence for a protective effect of endogenous ubiquinol against oxidative damage to mitochondrial protein and DNA during lipid peroxidation**. *Mol. Aspects Med.* 15: 73-81.
27. Frej, B., Kim, M.C. y Ames, B.M. 1990. **Ubiquinol-10 is an effective lipid-soluble antioxidant at physiological concentrations**. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87: 4879-4883.
28. Ganong, W.F. 1992. **Encéfalo**. En: *Fisiología Médica*. 13a ed. Edit. Manual Moderno. México. Capítulos 32-33.
29. Giulivi, C., Kato, K. y Cooper, E. C. 2006. **Nitric oxide regulation of mitochondrial oxygen consumption I: cellular physiology**. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 291: C-1225-C1231.
30. González-Halphen, D. y Vázquez-Acevedo, M. 2002. **La cadena respiratoria mitocondrial: un enfoque estructural**. En: *mitocondria, una mirada a la evolución de los conceptos básicos y modernos*. (Vázquez Memije, M.E. y Tuena de Gómez-Pouyou, M. Eds). México, Editorial Prado. 8: 65-88.
31. Gorren, A.C.F., Schmidt, K. y Mayer, B. 2002. **Binding of L-arginine and imidazole suggests heterogeneity of rat brain neuronal nitric oxide synthase**. *Biochemistry.* 41: 7819-7829.
32. Griffith, O.W. y Stuehr, D.J. 1995. **Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism**. *Annu. Rev. Physiol.* 57: 707-736.
33. Grigorieff, N. 1998. **Three-dimensional structure of bovine NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) at 22 Å in ice**. *J. Mol. Biol.* 277: 10033-1046.

34. Guérin, B. 1989. **Mitochondria**. En: *The yeasts*. 2ª Edición. (Rose, A.H., Harrison, J.S. Eds.). USA. Academic Press. 11: 541-600.
35. Gunter, T.E., Yule, D.I. Gunter, K.K., Eliseev, R.A. y Jason, Salter, D. 2004. **Minireview. Calcium and mitochondria**. *FEBS. Lett.* 567: 96-102.
36. Guyton A.C. 1992. **Cerebro**. En: *Tratado de fisiología médica*. 8a ed. Edit. Interamericana McGraw-Hill. España. Capítulos 19 y 61.
37. Kanai, A., Epperly, M., Pearce, L., Birder, L., Zeidel, M., Meyers, S., Greenberger, J., de Groat, W., Apodaca, G. y Peterson, J. 2004. **Differing roles of mitochondrial nitric oxide synthase in cardiomyocytes and urothelial cells**. *J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 286: 13-21.
38. Kanai, A.J., Pearce, L.L., Clemens, P.R., Birder, L.A., VanBibber, M.M., Choi, S.Y., Groat, W.C. y Peterson, J. 2001. **Identification of a neuronal nitric oxide synthase in isolated cardiac mitochondria using electrochemical detection**. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98: 14126-14131.
39. Kessler, J.J., Lange, B.R., Merbitz-Zahradnik, T., Zwicker, K., Hill, P., Meunier, B., Pálsdóttir, H., Hunte, C. Meshnick, S y Trumppower, B.L. 2003. **Molecular basis for atovaquone binding to the cytochrome bc₁ complex**. *J. Biol. Chem.* 278: 31312-31318.
40. Laemli, U.K. 1970. **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4**. *Nature.* 227: 680-685.
41. Le Mellay, V., Troppmair, J., Benz R. y Rapp, U.L. 2002. **Negative regulation of mitochondrial VDAC channels by C-Raf kinase**. *BMC Cell Biol.* 3: 14-25.
42. Lehninger, A.L., Nelson, D.L. y Cox, M.M. 2000. **Biosignaling and oxidative phosphorylation and photophosphorylation**. En: *Principles of biochemistry*. 3a Edición. Worth Publishers. New York. 12: 421-479, 19: 690-750.
43. Li, D., Hayden, E. Y., Panda, K., Stuehr, D.J., Deng, H., Rousseau, D.L. y Yeh, S. 2006. **Regulation of the monomer-dimer equilibrium in inducible nitric-oxide synthase by nitric oxide**. *J. Biol. Chem.* 281: 8197-8204.
44. López-Figueroa, M.O., Caamaño, C., Morano, M.I., Ronn, L.C., Akil, H. y Watson, S.J. 2000. **Direct evidence of nitric oxide presence within mitochondria**. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 272: 129-133.

45. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J. 1951. **Protein measurement with the folin phenol reagent.** *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
46. Marletta, M.A. 1993. **Nitric oxide synthase structure and mechanism.** *J. Biol. Chem.* 268: 12231-12234.
47. Mathews, C.K. y Van Holde, K.E. 1996. *Biochemistry*. 2a ed. The Benjamin Cummings Publishing Company, Inc. New York. Capítulo 15.
48. Medina, J.M. 1995. **Oxidación biológica y cadena respiratoria.** En: *Elementos de bioquímica.* (herrera, H. Ed.) México. Interamericana McGraw-Hill. 10: 253-284.
49. Meisinger, C., Ryan, M.T., Hill, K., Model, K., Lim, J.H., Sickmann, A., Muller, H., Meyer, H.E., Wagner, R., y Pfanner, N. 2001. **Protein import channel of the outer mitochondrial membrane: a highly stable Tom40-Tom22 core structure differentially interacts with preproteins, small Tom proteins, and import receptors.** *Mol. Cell. Biol.* 21: 2337-2348.
50. Mellors, A. y Tappel, A.L. 1996. **The inhibition of mitochondrial peroxidation by ubiquinone and ubiquinol.** *J. Biol. Chem.* 241: 4353-4356.
51. Michel, H. 1998. **The mechanism of proton pumping by cytochrome c oxidase.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 12819-12824.
52. Michel, T., Li, G.K. y Busconi, L. 1993. **Phosphorylation and subcellular translocation of endothelial nitric oxide synthase.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 6252-6256.
53. Moncada, S., Higgs, A. y Furchgott, R. 1997. **XIV. International union of pharmacology nomenclature in nitric oxide research.** *Pharmacol. Rev.* 49: 137-142.
54. Nicholls, D.G. 1986. **Intracellular calcium homeostasis.** *Brit. Med. Bull.* 42: 353-358.
55. Nyquist, R.M., Heitbrink, D., Bolwien, C., Gennis, R.B. y Heberle, J. 2003. **Direct observation of protonation reactions during the catalytic cycle of cytochrome c oxidase.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100: 8715-8720.
56. Orsi, A., Beltrán, B., Clementi, E., Hallén, K., Feelisch, M. y Moncada, S. 2000. **Continuous exposure to high concentrations of nitric oxide leads to**

- persistent inhibition of oxygen consumption by J774 cells as well as extraction of oxygen by the extracellular medium.** *Biochem. J.* 346: 407-412.
57. Pardo, J.P., Martínez, F., Guerra, G. y Velázquez, I. 2001b. **El complejo II: la succinato deshidrogenasa de la cadena respiratoria.** *BEB.* 20(2): 103-1113.
58. Pardo, J.P., Martínez, F., Mendoza, G. y Velázquez, I. 2001d. **El complejo IV o citocromo c oxidasa de la cadena respiratoria.** *BEB.* 20(3): 144-151.
59. Pardo, J.P., Martínez, F., Velázquez, I. y Flores-Herrera, O. 2001a. **El complejo I de la cadena respiratoria y los factores que determinan la velocidad de la transferencia de los electrones.** *BEB.* 20(2): 93-102.
60. Pashchuk, I. 2007. Alabama Department of Rehabilitation Services <http://www.rehab.state.al.us/Home/default.aspx?url=/Home/Services/VRS/TBI/General+Information/Brain+Anatomy#top> (Accesada en febrero de 2008).
61. Patton, C. 1999. **WinMAXC.** Version 2.0. Stanford University Hopkins-Marine Station. Pacific Grove, CA. U.S.A.
62. Pereida, R.N. 2000. **El endotelio vascular y la disfunción endotelial.** *BEB.* 20: 79-84.
63. Petit, P.X. 2001. **Mitochondrial implication in cell death.** En: *Mitochondrial in pathogenesis.* (Lemasters, J.J. y Nieminen, A.L. Eds.). New York. Kluwer Academic, Plenum Publishers. 11: 215-246.
64. Rawn, J.D. (1989). **Introducción, célula y núcleo.** *Bioquímica.* Buenos Aires: Interamericana Mc-Graw Hill. Cap. 1. <http://www.forest.ula.ve/~rubenhg/celula/imagenes.html> (Accesada en febrero de 2008)
65. Riobó, N.A., Melani, M., Sanjuán, N., Fiszman, M.L., Gravielle, M.C., Carreras, M.C., Cadenas, E. y Poderoso, J.J. 2002. **The modulation of mitochondrial nitric oxide synthase activity in rat brain development.** *J. Biol. Chem.* 277: 42447-42455.
66. Saavedra-Molina, A. y Devlin, T.M. 1997. **Effect of extra- and intramitochondrial calcium on citrulline síntesis.** *Amino Acids.* 12: 293-298.

67. Saraste, M. 1999. **Oxidative phosphorylation at the fin de siècle.** *Science*. 283: 1488-1493.
68. Saris, N.E.L. y Carafoli, E. 2005. **Review. A historical review of cellular calcium handling, with emphasis on mitochondria.** *Biochemistry*. (Moscow). 70: 231-239.
69. Satrústegui, J., Pardo, B. y Del Arco, A. 2007. **Mitochondrial transporters as novel targets for intracellular calcium signalling.** *Physiol. Rev.* 1: 29-67.
70. Secretaría de Salud. 2001. **Programa de Acción: Enfermedades Cardiovasculares e Hipertensión Arterial.** 1a ed. S.S. México.
71. Sigel, E. y Carafoli, E. 1979. **The charge stoichiometry of cytochrome c oxidase in the reconstituted system.** *J. Biol. Chem.* 254: 10572-10574.
72. Taddei, S., Viridis, A., Ghiadoni, L. y Salvetti, A. 1998. **Endothelial dysfunction in hypertension: fact or fancy?** *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 32: 41-47.
73. Tatoyan, A. y Giulivi, C. 1998. **Purification and characterization of a nitric oxide synthase from rat liver mitochondria.** *J. Biol. Chem.* 273: 11044-11048.
74. Testut, L. y Latarjet, A. 1997. **Cerebro.** Compendio de anatomía descriptiva. JGH editores. México. Capítulo 7
75. Titheradge, M.A. 1998. **Nitric oxide protocols.** *Human Press Totowa.* New Jersey. Capítulo 1.
76. Touyz, R.M. 2004. **Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension.** *Hypertension.* 44: 248-252.
77. Towbin, H., Staehelin, T., y Gordon, J. 1979. **Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets.** *Proc Natl Acad Sci. USA.* 76: 4350-4354.
78. Trumpower, B.L. 1990. **Cytochrome *bc*₁ complexes of microorganisms.** *Microbiol. Rev.* 54: 101-129.
79. Vaziri, N.D., Wang, X.Q., Oveisi, F. y Rad, B. 2000. **Induction of oxidative stress by glutathione depletion cause severe hypertension in normal rats.** *Hypertension.* 36: 142-146.

80. Vilee, C.A. 1985. **Sistemas reguladores: integración nerviosa**. En: *Biología*. 7ª Edición. Nueva Editorial Interamericana. Capítulo 23: 418-448.
81. Voet, D., Voet, J.G. y Pratt, C.W. 2002. **Electron transport and oxidative phosphorylation**. *Fundamentals of biochemistry*. 2ª Edición. (Upgrade edition). Edit. John Wiley and Sons, Inc. U.S.A. Capítulo 17: 563-598.
82. Wei, C.C., Wang, Z.Q., Meade, A.L., McDonald, J.F. y Stuehr, D.J. 2002. **Why do nitric oxide synthase use tetrahydrobiopterin?** *J. Inorg. Biochem.* 91: 618-624.
83. West, J.B. 1993. **Encéfalo**. *Bases fisiológicas de la práctica médica*. 12a ed. Edit. Médica Panamericana. Buenos Aires. Capítulos 18 y 62.
84. Wolf, D.J., Lubeskie, A. y Umansky, S. 1994. **The inhibition of the constitutive bovine endothelial oxide synthase by imidazole and indazole agents**. *Arch. Biochem. Biophys.* 314: 360-366.

11. ANEXOS

Publicaciones relacionadas con el trabajo de tesis

Functional characterization of brain mitochondrial nitric oxide synthase during hypertension and aging

E. Calderón-Cortés¹, M. Clemente-Guerrero¹, E. Sierra-Campos¹, C. Cortés-Rojo¹,
F. J. Gaona-Zamudio¹, R. Villalobos-Molina², and A. Saavedra-Molina¹

¹ Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Mich. México

² Unidad de Biomedicina, Facultad de Estudios Superiores-Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, and Departamento de Farmacobiología, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados, Sede Sur, México D.F., México

Received November 22, 2004

Accepted April 20, 2005

Published online July 5, 2005; © Springer-Verlag 2005

Summary. Nitric oxide (NO^{*}) plays an important role in various physiological processes. The aim of the present study was to investigate if brain mitochondrial nitric oxide synthase (mtNOS) is active and functional during hypertension. L-citrulline production, an indicator of nitric oxide synthesis, was concentration-dependent on L-arginine in all strains and all ages tested, and was inhibited by 7-Nitroindazole (7-NI). Brain mitochondria of 1 month-old (prehypertensive) spontaneously hypertensive rats (SHR) exhibited a significantly ($p < 0.05$) low basal L-citrulline content as compared to age-matched Wistar (W) and Wistar-Kyoto (WKY) rats. L-citrulline synthesis in SHR rats showed a significant ($p < 0.01$) low response to L-arginine in 3 and 7 months-old rats. Respiratory rates in states 3 and 4 increased with low L-arginine concentration in all strains and all ages. The results suggest that in rat brain mitochondria, L-citrulline synthesis is constant once age-related hypertension is installed and NO^{*} does not regulate oxidative phosphorylation.

Keywords: Mitochondrial L-citrulline – Rat brain – Spontaneously hypertensive rats – Aging – L-Arginine – Nitric oxide synthase

Introduction

In the last few years a number of reports appeared showing that a putatively new isoform of nitric oxide synthase (NOS) occurs inside rat liver mitochondria (mtNOS) (Ghafourifar and Richter, 1997; Giulivi et al., 1998; Tatoyan and Giulivi, 1998). Its activity has been also detected in mitochondria from brain, heart and kidney (Tatoyan and Giulivi, 1998; French et al., 2001; Kanai et al., 2001; Lacza et al., 2001; Manzo-Ávalos et al., 2002; Aguilera-Aguirre et al., 2002). However, in very recent reports mtNOS has been identified as brain NOS α suggesting the existence of a new pathway (Kanai et al., 2001; Blfering et al., 2002). Mitochondrial nitric oxide

(NO^{*}) production has been involved in modulation of several organelle functions, such as transmembrane potential and matrix pH, inhibition of respiration by competitive inhibition with oxygen in cytochrome c oxidase, inhibition of ATP synthesis, permeability transition pore (PTP) opening, apoptosis and cell death (Giulivi et al., 1998; Ghafourifar and Richter, 1999; Ghafourifar et al., 1999; Shiva et al., 2001; Aguilera-Aguirre et al., 2002; Saavedra-Molina et al., 2003). During aging and hypertension, activation of endothelial cells produce and release contractile factors that affect the relaxing physiological action of NO^{*} (Nakahara et al., 1998; Taddei et al., 1998), and affect NOS expression (Chou et al., 1998). Since the enzyme has been localized in the inner mitochondrial membrane (Elfering et al., 2002), it has become important to search for its role in different physiological and pathological conditions. In this regard, previous data have shown that basal mtNOS activity has no physiological relevance in porcine heart (French et al., 2001), but it regulates several mitochondrial functions in the rat (Ghafourifar and Richter, 1997; Giulivi et al., 1998; Tatoyan and Giulivi, 1998; Ghafourifar and Richter, 1999; Ghafourifar et al., 1999; Aguilera-Aguirre et al., 2002). These mtNOS-modulating events have been implicated in disease states such as hypertension (Aguilera-Aguirre et al., 2002), hypoxia (Shiva et al., 2001) and a natural process: development (Riobó et al., 2002). The aim of the present report was to characterize NO^{*} production, as L-citrulline formation, and to determine its influence in the

respiratory rate in rat brain mitochondria, both in the normal state and during hypertension. In addition, the influence aging has in this condition was explored.

Materials and methods

Chemicals

All reagents and substances were from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

Biological materials

Male Wistar (W), normotensive genetic control Wistar-Kyoto (WKY) and spontaneously hypertensive rats (SHR) of 1, 3 and 7 months of age were fed *ad libitum* and kept under controlled conditions of light:darkness in our animal facilities. All animal procedures were conducted in accordance with our Federal Regulations for the Use and Care of Animals (NOM-062-ZOO-1999, Ministry of Agriculture, México), and were approved by the Institutional Committee of the Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, for the use of animals. Systolic blood pressure was determined by plethysmography, yielding values of 134 ± 3 and 122 ± 3 mmHg

(WKY) and 183 ± 5 and 203 ± 14 mmHg (SHR), for 3 and 7 month-old rats, respectively. At 1 month of age rats from all strains were normotensive. In experiments with young rats, the brains from 4 animals were pooled.

Brain mitochondria were isolated by differential centrifugation in a Percoll gradient as described (Thakar and Hassan, 1988; Sims, 1990). Briefly, rats were decapitated and the brain was extracted and placed in a cold medium that contained 210 mM mannitol, 70 mM sucrose, 1 mM EGTA, 0.5% bovine serum albumin, 10 mM MOPS (pH 7.4). Brain was homogenized manually in a glass homogenizer and centrifuged at $400 \times g$; the supernatant was centrifuged at $9000 \times g$. Centrifugations were carried out for 10 min at 4°C. The pellet was resuspended in 15% Percoll and placed in a discontinuous gradient of Percoll (23% and 40%). The gradient was centrifuged at $30,700 \times g$, during 6 min, band 3 was extracted, diluted 1:4, centrifuged and washed at $16,700 \times g$ in the isolation medium added with 0.5% bovine serum albumin, following centrifugation at $6,900 \times g$ for 10 min. Mitochondrial protein concentration was measured by a slight modification of the biuret reaction (Gornall et al., 1949).

L-Citrulline synthesis

L-Citrulline production was determined as described (Knipp and Vasak, 2000) in a medium that contained 190 mM mannitol, 5 mM KH_2PO_4 , 15 mM KCl, 3 mM MgCl_2 , 1 mM EGTA, 10 mM MOPS (pH 7.4), plus

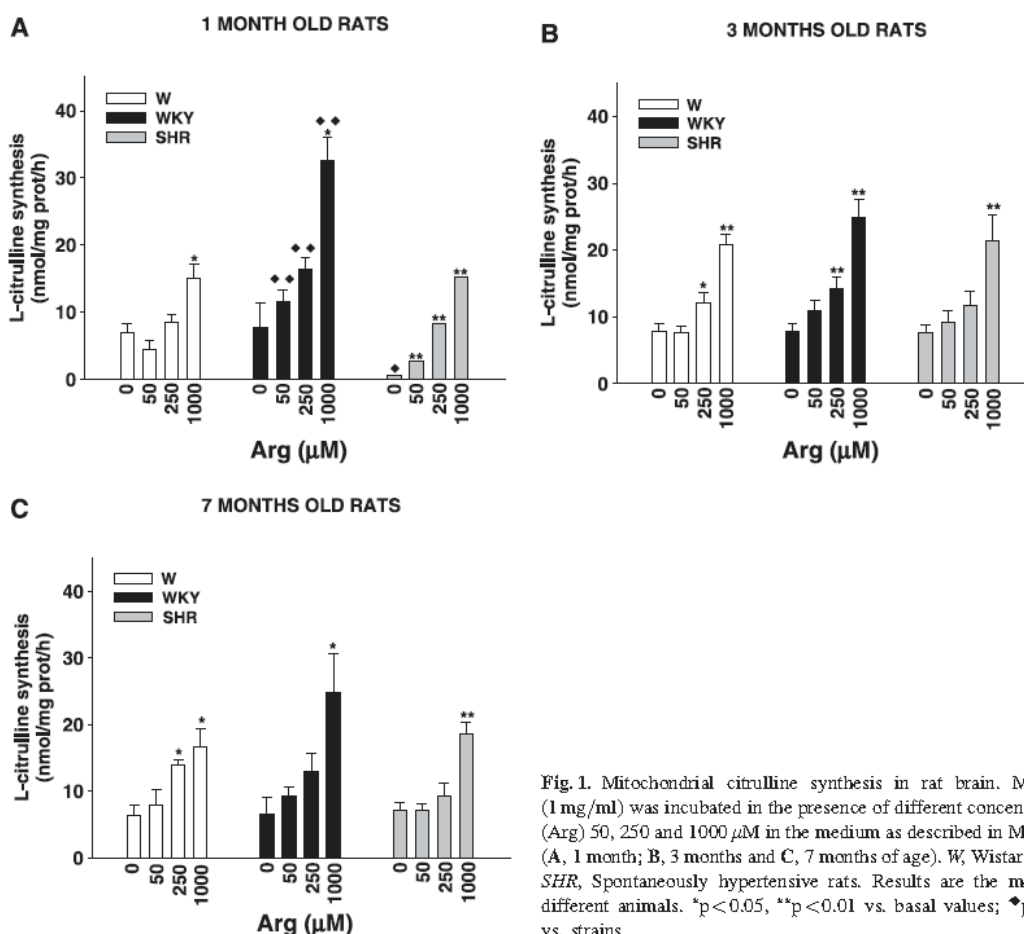


Fig. 1. Mitochondrial citrulline synthesis in rat brain. Mitochondrial protein (1 mg/ml) was incubated in the presence of different concentrations of L-arginine (Arg) 50, 250 and 1000 μM in the medium as described in Materials and methods. (A, 1 month; B, 3 months and C, 7 months of age). W, Wistar; WKY, Wistar-Kyoto; SHR, Spontaneously hypertensive rats. Results are the mean \pm SEM of 4–10 different animals. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. basal values; ♦ $p < 0.05$, ♦♦ $p < 0.01$ vs. strains

10 mM succinate and 2 μ M rotenone. Brain mitochondria were incubated 1 h at 30°C, in a shaking bath (30 rpm), in the presence of the nitric oxide synthase cofactors 0.1 mM NADPH, 10 μ M tetrahydrobiopterin, 5 μ M FAD⁺ and 40 μ M CaCl₂ and 50, 250 or 1000 μ M of the substrate L-arginine, with or without 100 μ M 7-Nitroindazole (7-NI). Basal values of L-citrulline were obtained with endogenous L-arginine. L-Citrulline was quantified in a Perkin-Elmer Lambda 10 spectrophotometer at 530 nm using a calibration curve.

Mitochondrial respiration

Oxygen consumption was measured in a chamber fitted with a Clark-type oxygen electrode. The incubation buffer contained 210 mM mannitol, 70 mM sucrose, 0.5 mM EGTA, 10 mM K₂HPO₄ and 10 mM MOPS (pH 7.4), plus respiration substrate (10 mM succinate and 2 μ M rotenone). State 3 was obtained by adding 300 μ M ADP. Different concentrations of L-arginine were used to determine the effect of NO^{*} in mitochondrial respiration with or without 7-NI.

Data analysis

Values represent the mean \pm SEM from 3–17 animals. Data were subjected to Student's *t* test to determine the statistical significance ($p < 0.05$).

Results

L-Citrulline determination

Nitric oxide synthase catalyze the oxidation of L-arginine to L-citrulline and NO^{*}. Therefore, the production of L-citrulline is used as an indirect determination of NO^{*}. In this work, we studied the effect of the stimulation and inhibition of the synthesis of L-citrulline by the addition of the substrate L-arginine, and the NOS noncompetitive inhibitor 7-NI, respectively. Figure 1 shows the results of L-citrulline production in the three rat strains of different ages. Wistar, WKY and SHR rat brain mitochondria from 1 month-old rats exhibited L-arginine concentration-dependent L-citrulline synthesis (Fig. 1A). Wistar basal value was 7 \pm 1 nmol L-citrulline/mg prot/h, which increased to 16 \pm 2 nmol L-citrulline/mg prot/h ($p < 0.05$), at 1 mM L-arginine. However, in WKY brain mitochondria the basal value of L-citrulline was 8 \pm 4 nmol/mg prot/h., which increased \approx 4 times (33 \pm 3 nmol/mg prot/h, $p < 0.05$), in the presence of 1 mM of L-arginine. In contrast, a very low basal value of L-citrulline (0.53 nmol/mg prot/h), which was significantly different ($p < 0.05$) to the other strains, was obtained in SHR brain mitochondria (Fig. 1A). However, these mitochondria also exhibited a significant ($p < 0.01$) concentration-dependent response to L-arginine (up to 15 nmol/mg prot/h at 1 mM substrate).

In Fig. 1B and C L-citrulline values for 3 and 7 month-old rats are shown. These results also showed an L-arginine concentration-dependent increase in L-citrulline for-

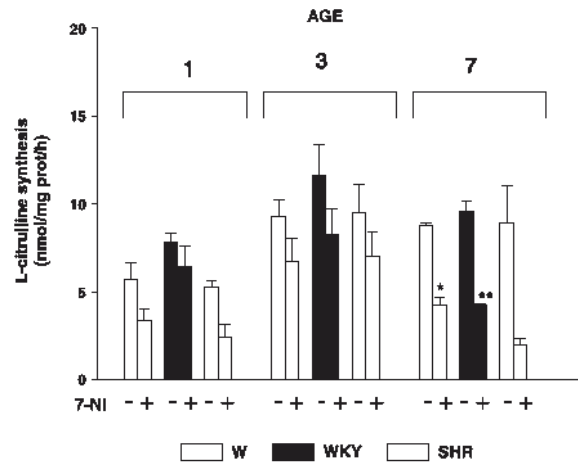


Fig. 2. Mitochondrial citrulline synthesis in rat brain at different ages in the presence of 7-Nitroindazole. Mitochondrial protein (1 mg/ml) was incubated (7-NI) 100 μ M in the medium as described in Materials and methods. W, Wistar; WKY, Wistar-Kyoto; SHR, Spontaneously hypertensive rats. Results are the means \pm SEM of 4–10 different animals. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. basal values

mation. Basal L-citrulline values were 7 and 8 nmol/mg prot/h in 3 and 7 months old rats, respectively (Fig. 1B and C). L-Citrulline synthesis increased to 20 \pm 2 (W), 26 \pm 2 (WKY) and 22 \pm 4 nmol/mg prot/h (SHR) in rats of 3 months of age, in the presence of 1 mM L-arginine (Fig. 1B). While in older rats the values found were 17 \pm 3 (W), 25 \pm 5 (WKY) and 19 \pm 2 nmol L-citrulline/mg prot/h (SHR) with 1 mM of L-arginine (Fig. 1C). These results show that there are not differences between rat strains at these ages (Fig. 1B and C). SHR of 3 and 7 months of age increased basal L-citrulline values with respect to 1 month old (Fig. 1A–C).

The activity of mtNOS was assayed in the presence of 7-Nitroindazole, which is a noncompetitive inhibitor of NOS with high selectivity for the brain nNOS enzyme (Wolff et al., 1994). The results showed an inhibition of basal values of L-citrulline in the three ages and the three rat strains of 20–50% ($p < 0.05$) (Fig. 2).

Mitochondrial respiration

Nitric oxide can regulate oxygen consumption (Ghafourifar and Richter, 1997). Therefore, it was important to know its effect on this mitochondrial function in rat brain. Oxygen consumption was determined in the presence of different concentrations of L-arginine and 7-NI. In Fig. 3A–C, oxygen consumption values in states 3 and 4 in W, WKY and SHR rats of 1 month of age, are shown. Oxygen consumption in Wistar rats increased in

10

E. Calderón-Cortés et al.

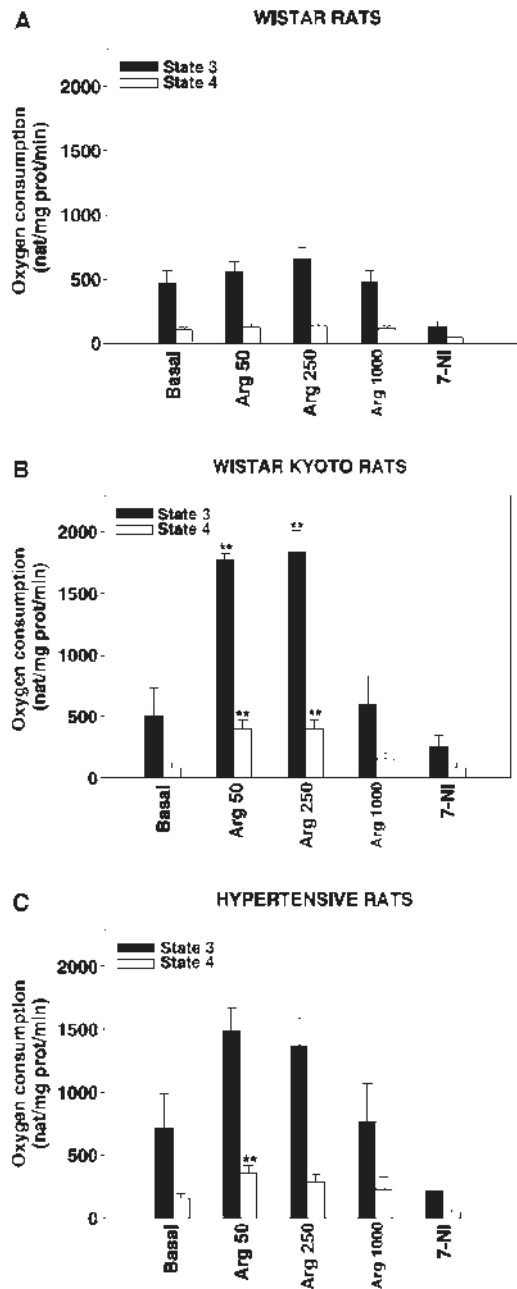


Fig. 3. Effect of L-Arginine and 7-NI on mitochondrial respiration in 1 month-old rats. Oxygen uptake of purified mitochondrial in rat brain of different strains. Mitochondrial protein (0.5 mg/ml) was incubated in the presence of different concentrations of L-arginine (Arg), 50, 250 and 1000 μ M, and 100 μ M 7-NI in the medium as described in Materials and methods. A, Wistar; B, WKY; C, SHR rats. Results are the means \pm SEM of 4-10 different animals. [†]p < 0.01 vs. basal.

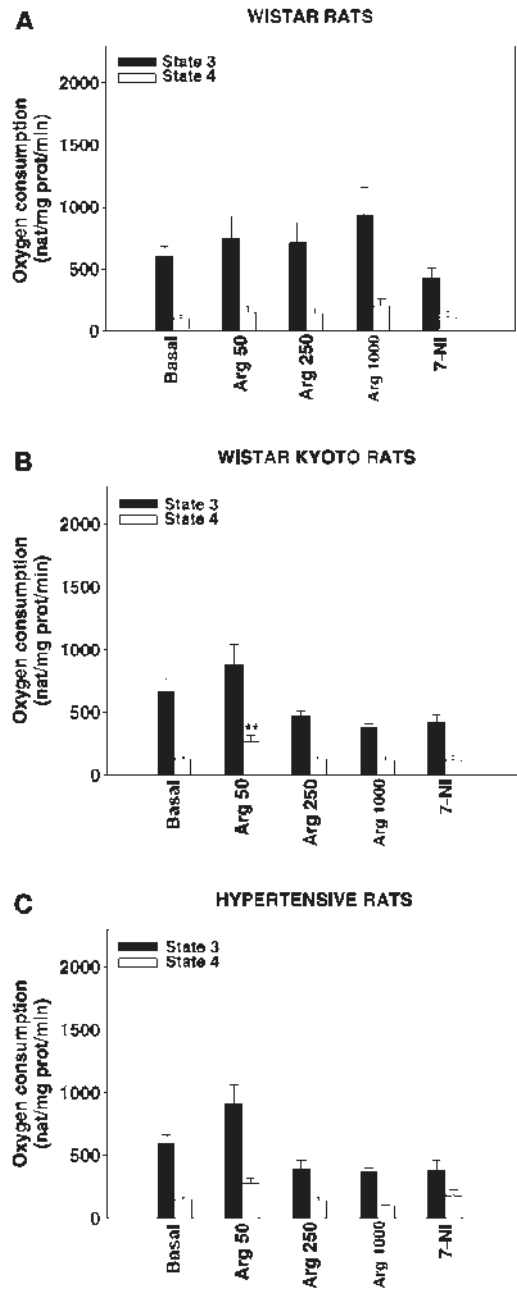


Fig. 4. Effect of L-Arginine and 7-NI on mitochondrial respiration in 3 month-old rats. Oxygen uptake of purified mitochondrial in rat brain of different strains. Mitochondrial protein (0.5 mg/ml) was incubated in the presence of different concentrations of L-arginine (Arg), 50, 250 and 1000 μ M, and 100 μ M 7-NI in the medium as described in Materials and methods. A, Wistar; B, WKY; C, SHR rats. Results are the means \pm SEM of 4-10 different animals. [†]p < 0.01 vs. basal.

the presence of 50 and 250 μM of L-arginine (Fig. 3A). Similar results were observed in WKY rats, where oxygen consumption basal value was 504 ± 200 nat/mg prot/min and increased to 1773 ± 58 and 1834 ± 179 nat/mg prot/min in the presence of 50 and 250 μM of L-arginine, respectively, in state 3 (Fig. 3B). Basal oxygen consumption was 86 ± 39 nat/mg prot/min, while 50 and 250 μM L-arginine increased to 401 ± 72 nat/mg prot/min, in state 4 (Fig. 3B). The increase in oxygen consumption also was observed in states 3 and 4 for SHR rats (Fig. 3C).

On the other hand, 7-NI inhibited oxygen consumption in states 3 and 4 in the three rat strains at 1 month of age. This inhibition was 60–70% in state 3 and 58–72% in state 4 (Fig. 3A–C).

Similar results were observed in 3 month-old Wistar rats, with an increase in oxygen consumption in both, states 3 and 4 and also the respiratory rate was inhibited by 7-NI (Fig. 4A).

Results obtained in 3 month-old WKY and SHR rats showed an increase in the respiratory rate in the presence of 50 μM L-arginine (Fig. 4B and C). Basal values were 663 ± 104 and 124 ± 25 nat/mg prot/min in states 3 and 4, respectively, for WKY rats while they increased to 883 ± 159 and 262 ± 51 nat/mg prot/min in state 3 and 4 with 50 μM L-arginine. In SHR rats an increase in oxygen consumption was observed in states 3 and 4, with that L-arginine concentration however, there was a decrease with higher substrate concentrations (Fig. 4C).

Under basal conditions, 7-NI inhibited oxygen consumption in states 3 and 4 in all rat strains of 3 months of age. This inhibition was smaller in 1 month old rats (Fig. 4A–C).

In 7 months old rats an increase in state 3 was observed only at 1 mM L-arginine, with no changes at lower concentrations of the substrate. In these rats 7-NI increased oxygen consumption in all strains (Fig. 5A–C).

Table 1 shows the respiratory control ratio (RCR), where basal values of RCR were 4–8, which corroborate the integrity and functionality of rat brain mitochondria. These results show a decrease of RCR in the presence of L-arginine and 7-NI. This effect was more pronounced in 7 month-old rats of all strains. In Wistar rats RCR diminished to 68, 55 and 46% with 50, 250 and 1000 μM L-arginine, respectively. When 7-NI was used the RCR value was diminished to 23%, with respect to control.

WKY rats (7 month-old) decreased their RCR with L-arginine (85, 71 and 86% with 50, 250 and 1000 μM , respectively) and 29% in the presence of 7-NI. In SHR of

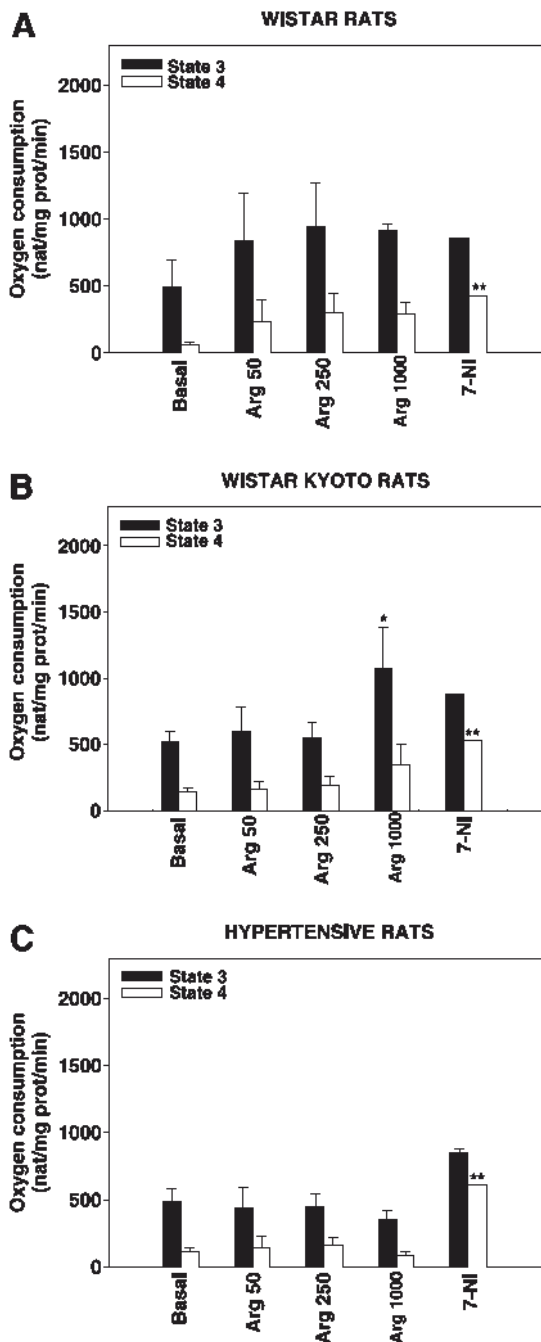


Fig. 5. Effect of L-Arginine and 7-NI on mitochondrial respiration in 7 month-old rats. Oxygen uptake of purified mitochondrial in rat brain of different strains. Mitochondrial protein (0.5 mg/ml) was incubated in the presence of different concentrations of L-arginine (Arg), 50, 250 and 1000 μM , and 100 μM 7-NI in the medium as described in Materials and methods. A, Wistar; B, WKY; C, SHR rats. Results are the means \pm SEM of 4–10 different animals. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. basal

Table 1. Effect of L-Arginine and 7-NI on the respiratory control ratio^{1,2,3,4}

Concentration (μM)	Respiratory control ratio (RCR)											
	Wistar rats (months)				Wistar-Kyoto rats (months)				Hypertensive rats (months)			
	1	3	7	1	3	7	1	3	7	1	3	7
Control	4.7 ± 0.5	6.8 ± 0.6	8.5 ± 0.4	6.1 ± 0.5	6.4 ± 0.6	5.2 ± 0.7	4.5 ± 1.3	5.0 ± 0.5	4.9 ± 0.4	4.5 ± 1.3	5.0 ± 0.5	4.9 ± 0.4
L-arg 50	5.0 ± 0.5	6.9 ± 1.3	5.8 ± 1.5	4.8 ± 0.7	3.6 ± 0.3**	4.4 ± 0.9	4.1 ± 0.1	3.2 ± 0.5	5.8 ± 1.7	4.1 ± 0.1	3.2 ± 0.5	5.8 ± 1.7
L-arg 250	5.5 ± 0.9	5.7 ± 0.6	4.7 ± 1.1	4.7 ± 0.3	4.7 ± 1.4	3.7 ± 0.6	5.1 ± 0.6	3.0 ± 0.4*	3.8 ± 0.4	5.1 ± 0.6	3.0 ± 0.4*	3.8 ± 0.4
L-arg 1000	3.7 ± 0.4	6.3 ± 1.5	3.9 ± 1.4	4.2 ± 0.5*	3.3 ± 0.4*	4.5 ± 1.4	3.8 ± 0.8	4.4 ± 0.8	4.8 ± 0.8	3.8 ± 0.8	4.4 ± 0.8	4.8 ± 0.8
7NI 100	3.0 ± 1.0	5.2 ± 1.2	2.0 ± 0.05**	3.3 ± 0.6*	4.2 ± 0.5	1.5 ± 0.08	4.1 ± 0.8	3.5 ± 0.6	1.4 ± 0.03**	4.1 ± 0.8	3.5 ± 0.6	1.4 ± 0.03**

¹ The RCR was measured in purified mitochondrial in rat brain of different strains and ages

² Mitochondrial protein (0.5 mg/ml) was incubated in the presence of different concentrations of L-arginine (Arg), 50, 250 and 1000 μM, and 7-NI 100 μM in the medium as described in Materials and methods

³ Respiration was stimulated with 300 μM ADP

⁴ Results are the mean ± SEM of 4–10 different animals. * p < 0.05, ** p < 0.01 vs. control

same age, the diminution in RCR were 78, 98 and 29% with 250 and 1000 μM L-arginine and 7-NI, respectively.

Discussion

Nitric oxide is an important molecule generated in many organisms. Because of its effects on neurotransmission, vasodilatation, immune responses, modulation of respiration and mitochondrial pH, among others (Giulivi et al., 1998; Tatoyan and Giulivi, 1998; López-Figueroa et al., 2000; Orsi et al., 2000; Ghafourifar et al., 2001; Saavedra-Molina et al., 2003), NO^{*} has become a target for research. NO^{*} production and function is altered in pathological conditions, such as diabetes and hypertension. Hypertension is recognized as an important risk factor for cerebral stroke (Bordet et al., 2000; Marín et al., 2000), which is a key reason for intense research, part of which is focused in this work. Our results show that the production of intramitochondrial NO^{*} could be affected in hypertension and could influence mitochondrial metabolism.

Riobó et al. (2002) found that basal production of L-citrulline in 1 month old Wistar rats was ≈ 1.25 nmol/mg prot/h, while we found 7–8 nmol/mg prot/h in W and WKY, and 0.53 nmol/mg prot/h in SHR. These results suggest that mtNOS activity is diminished in the first stages of hypertension progression, but once hypertension is established (3 and 7 month-old) mtNOS activity is recovered, and NO^{*} synthesis increased perhaps to offset the damage produced by the pathology.

In intact rat brain mitochondria L-citrulline synthesis was minor than other reports, despite age and strain. In those studies basal mtNOS activity values were 31.2, 61.2, and 62.4 nmol/mg prot/h for rat liver, kidney and heart mitochondria, respectively (Ghafourifar and Richter, 1997; Aguilera-Aguirre et al., 2002). Our results are comparable with those obtained in 3 month-old mice brain and pig heart at the same age (2.0 y 13.6 nmol citrulline/mg prot/h, respectively).

7-Nitroindazole (7-NI) a nNOS specific noncompetitive inhibitor (Wolff et al., 1994), decreased L-citrulline synthesis in brain mitochondria of all rat strains at all ages tested. Results demonstrated that L-citrulline synthesis was mtNOS catalyzed; furthermore, it corroborates that mtNOS is a nNOS (Kanai et al., 2001; Elfering et al., 2002).

NO^{*} is considered to have a regulator effect on respiration, by inhibiting oxygen consumption, both in liver and kidney (Brown and Borutaité, 2002; Ghafourifar and Richter, 1997; Giulivi et al., 1998), but not in porcine heart mitochondria where it has no effect on respiration (French et al., 2001). However, in brain mitochondria we

found a four-fold increase in oxygen consumption in both respiratory states, in all conditions tested. This effect was more evident in young WKY and SHR with 50 and 250 μ M L-arginine; while other authors found a NO^{*} inhibitory action at 1 mM L-arginine in intact liver rat mitochondria (Ghafourifar and Richter, 1997). Our data reveal that oxygen uptake was not inhibited by NO^{*} in rat brain mitochondria, but rather it increased, suggesting an uncoupling of mitochondrial respiration. In this regard, some authors reported that peroxynitrite (ONOO⁻), an oxidant agent of the reaction of NO^{*} and superoxide anion (O₂⁻), forms rapidly and can stimulate proton leak through the mitochondrial inner membrane, which could be responsible for this effect (Ghafourifar et al., 2001; Brown and Borutaite, 2002; Radi et al., 2002).

Since nNOS is a multifunctional enzyme that catalyzes O₂⁻ synthesis in significant amounts, under BH₄ and L-arginine non-saturating conditions (Mayer and Hemmens, 1997) and mtNOS is a post-translational modification of nNOS (Kanai et al., 2001; Elfering et al., 2002; Giulivi, 2003), then mtNOS could produce O₂⁻ with low L-arginine concentrations (50 and 250 μ M). Our results agree with the contention that peroxynitrite could uncouple mitochondrial respiration, and increase oxygen uptake.

On the other hand, because 7-NI inhibited the oxygen uptake in states 3 and 4 in all conditions tested, we suggest that 7-NI acts as an inhibitor of the respiratory chain, probably by binding to hemo group of complex III or IV of the respiratory chain, since 7-NI is a noncompetitive inhibitor at the hemo group of NOS (Wolff et al., 1994).

Other important indicator of mitochondrial function is RCR, where typical values in rat liver coupled mitochondria are 3–15 (Sims, 1990; Giulivi et al., 1998; Thakar and Hassan, 1988). Our RCR values were in that range (4–8), indicating an adequate mitochondrial function; however, others have reported that NO^{*} inhibits respiration and consequently RCR in rat liver mitochondria (Giulivi et al., 1998; Saavedra-Molina et al., 2003). Even though we observed an inhibition in RCR with L-arginine, it is not attributed to NO^{*}, since it decreased the oxygen consumption rate; rather, inhibition in RCR could be due to uncoupling of the respiratory chain, because RCR decreased and oxygen consumption increased. A higher effect was observed as the animal ages (7 month-old). Aging is a process that embrace physiological changes occurring during life-time, resulting in a diminished functional capacity of the organism that can be produced by different environmental factors, where free radicals are the most important. Oxidative damage in mitochondria plays an important role in aging, because the organelle

is a source of reactive oxygen species, and an increased production favours aging. O₂⁻ itself or in combinations with other free radicals can cause oxidative stress to mitochondria (Nakahara et al., 1998; Sarkela et al., 2001).

Conclusions

Our results suggest that basal production of NO^{*} in rat brain mitochondria is not sufficient for regulate oxidative phosphorylation, and show the importance NO^{*} has in different conditions, like hypertension and aging, having specific tissue effects.

Acknowledgements

This work was supported in part by grants from CONACYT (43705), and Coordinación de la Investigación Científica, UMSNH (2.16.2004). E.C.-C. is a graduate fellow from Conacyt. R.V.-M. received a fellowship from Conacyt.

References

- Aguilera-Aguirre L, González-Hernández JC, Pérez-Vázquez V, Ramírez J, Clemente-Guerrero M, Villalobos-Molina R, Saavedra-Molina A (2002) Role of intramitochondrial nitric oxide in rat heart and kidney during hypertension. *Mitochondrion* 1: 413–423
- Bordet R, Pu Q, Puisieux F, Deplanque D, Jaboureck O, Leys D, Vallet B, Dupuis B (2000) Susceptibility to provoked cerebral infarction is not increased in a rat model of pharmacologically-induced hypertension despite endothelial dysfunction. *Fundam Clin Pharmacol* 14: 177–186
- Brown GC, Borutaite V (2002) Nitric oxide inhibition of mitochondrial respiration and its role in cell death. *Free Radic Biol Med* 33: 1440–1450
- Chou TC, Yen MH, Li CY, Ding YA (1998) Alterations of nitric oxide synthase expression with aging and hypertension in rats. *Hypertension* 31: 643–648
- Elfering SL, Sarkela TM, Giulivi C (2002) Biochemistry of mitochondrial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem* 277: 38079–38086
- French S, Giulivi C, Balaban RS (2001) Nitric oxide synthase in porcine heart mitochondria: evidence for low physiological activity. *Am J Physiol* 280: H2863–H2867
- Ghafourifar P, Richter C (1997) Nitric oxide synthase activity in mitochondria. *FEBS Lett* 418: 291–296
- Ghafourifar P, Richter C (1999) Mitochondrial nitric oxide synthase regulates mitochondrial matrix pH. *Biol Chem* 380: 1025–1028
- Ghafourifar P, Schenk U, Klein SD, Richter C (1999) Mitochondrial nitric oxide synthase stimulation causes cytochrome c release from isolated mitochondria. Evidence for intramitochondrial peroxynitrite formation. *J Biol Chem* 274: 31185–31188
- Ghafourifar P, Bringold U, Klein SD, Richter C (2001) Mitochondrial nitric oxide synthase, oxidative stress and apoptosis. *Biol Signals Recept* 10: 57–65
- Giulivi C (2003) Characterization and function of mitochondrial nitric oxide synthase. *Free Radic Biol Med* 34: 397–408
- Giulivi C, Poderoso JJ, Boveris A (1998) Production of nitric oxide by mitochondria. *J Biol Chem* 273: 11038–11043
- Gomall AG, Bardawill CJ, David MM (1949) Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J Biol Chem* 177: 751–766
- Kanai AJ, Pearce LL, Clemens PR, Birdler LA, VanBibber MM, Choi SY, de Groat WC, Peterson J (2001) Identification of a neuronal nitric oxide

- synthase in isolated cardiac mitochondria using electrochemical detection. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 14126–14131
- Knipp M, Vasak M (2000) A colorimetric 96-well microtiter plate assay for the determination of enzymatically formed citrulline. *Anal Biochem* 286: 257–264
- Lacza Z, Puskar M, Figueroa JB, Zhang J, Rajapakse N, Busija DW (2001) Mitochondrial nitric oxide synthase is constitutively active and is functionally upregulated in hypoxia. *Free Radic Biol Med* 31: 1609–1615
- López-Figueroa MO, Caamaño C, Morano MI, Romo LC, Akil H, Watson SJ (2000) Direct evidence of nitric oxide presence within mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun* 272: 129–133
- Manzo-Ávalos S, Pérez-Vázquez V, Ramírez J, Aguilera-Aguirre L, González-Hernández JC, Clemente-Guerrero M, Villalobos-Molina R, Saavedra-Molina A (2002) Regulation of the rate of synthesis of nitric oxide by Mg^{2+} and hypoxia. *Studies in rat heart mitochondria*. *Amino Acids* 22: 381–389
- Marín J, Ferrer M, Balfagón G (2000) Role of protein kinase C in electrical-stimulation-induced neuronal nitric oxide release in mesenteric arteries from hypertensive rats. *Clin Sci* 99: 277–283
- Mayer B, Hemmens B (1997) Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells. *Trends Biochem Sci* 22: 477–481
- Nakahara H, Kanno T, Inai Y, Utsumi K, Hiramatsu M, Mori A, Packer L (1998) Mitochondrial dysfunction in the senescence accelerated mouse (SAM). *Free Radic Biol Med* 24: 85–92
- Orsi A, Beltrán B, Clementi E, Hallén K, Feelisch M, Moncada S (2000) Continuous exposure to high concentrations of nitric oxide leads to persistent inhibition of oxygen consumption by J774 cells as well as extraction of oxygen by the extracellular medium. *Biochem J* 346: 407–412
- Radi R, Cassina A, Hodara R, Quijano C, Castro L (2002) Peroxynitrite reactions and formation in mitochondria. *Free Radic Biol Med* 33: 1451–1464
- Riobó NA, Melani M, Sanjuán N, Fiszman ML, Gravielle MC, Carreras MC, Cadenas E, Poderoso JJ (2002) The modulation of mitochondrial nitric oxide synthase activity in rat brain development. *J Biol Chem* 277: 42447–42455
- Saavedra-Molina A, Ramírez-Emiliano J, Clemente-Guerrero M, Pérez-Vázquez V, Aguilera-Aguirre L, González-Hernández JC (2003) Mitochondrial nitric oxide inhibits ATP synthesis. Effect of free calcium in rat heart. *Amino Acids* 24: 95–102
- Sarkela TM, Berthiaume J, Elfering S, Gybina AA, Giulivi C (2001) The modulation of oxygen radical production by nitric oxide in mitochondria. *J Biol Chem* 276: 6945–6949
- Shiva S, Brookes PS, Patel RP, Anderson PG, Darley-Usmar VM (2001) Nitric oxide partitioning into mitochondrial membranes and the control of respiration at cytochrome c oxidase. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 7212–7217
- Sims NR (1990) Rapid isolation of metabolically active mitochondria from rat brain and subregions using Percoll density gradient centrifugation. *J Neurochem* 55: 698–707
- Taddei S, Virdis A, Ghiadoni L, Salvetti A (1998) Endothelial dysfunction in hypertension: fact or fancy? *J Cardiovasc Pharmacol* 32: S41–S47
- Tatoyan A, Giulivi C (1998) Purification and characterization of a nitric-oxide synthase from rat liver mitochondria. *J Biol Chem* 273: 11044–11048
- Thakar JH, Hassan MN (1988) Effects of 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine (MPTP), cyperquat (MPP+) and paraquat on isolated mitochondria from rat striatum cortex and liver. *Life Sci* 43: 143–149
- Wolff DJ, Lubeskie A, Umansky S (1994) The inhibition of the constitutive bovine endothelial nitric oxide synthase by imidazole and indazole agents. *Arch Biochem Biophys* 314: 360–366

Authors' address: Alfredo Saavedra-Molina, Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Edificio B-3, C.U. Morelia, Mich. 58030, México, Fax: 52-443-326-5788, E-mail: saavedra@zeus.umich.mx

Caracterización funcional de la óxido nítrico sintasa en mitocondrias de cerebro durante la hipertensión y el envejecimiento

Elizabeth Calderón-Cortés¹, Mónica Clemente-Guerrero¹, Christian Cortés-Rojo¹, Erick Sierra-Campos², Francisco J. Gaona-Zamudio¹, Rafael Villalobos-Molina² y Alfredo Saavedra-Molina²

¹Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo,
²Unidad de Biomédicina, Facultad de Estudios Superiores-Itacala, UNAM y Departamento de Farmacobiología,
CINVESTAV Sur, México.

Resumen

El óxido nítrico es una molécula biológicamente activa que desempeña un importante papel en diversos procesos fisiológicos como son la neurotransmisión, la respuesta inmune y la vasodilatación. El propósito de este trabajo fue investigar si la óxido nítrico sintasa mitocondrial (NOSmt) de cerebro de rata es activa y funcional durante la hipertensión. La síntesis de citrulina, así como la velocidad de consumo de oxígeno fueron estudiados en ratas espontáneamente hipertensas (SHR). Las ratas Wistar (W), Wistar-Kyoto (WKY) control genético normotenso y las SHR fueron usadas para determinar la formación de citrulina relacionada con la edad como un indicativo de la síntesis de óxido nítrico. La producción de óxido nítrico fue dependiente de la concentración de L-arginina en todas las cepas y edades utilizadas; así mismo, fue inhibida por el 7-Nitroindazol (7-NI). Las mitocondrias de cerebro de ratas SHR de 1 mes de edad (prehipertensas) presentaron una producción basal de citrulina significa-

Caracterización funcional de la óxido nítrico sintasa ...

tivamente menor ($p < 0.05$) comparada con las ratas W y WKY de la misma edad. La síntesis de citrulina en las ratas SHR de 3 y 7 meses de edad presentan una baja respuesta a L-arginina ($p < 0.01$). La velocidad respiratoria en estado 3 y estado 4 aumentó en presencia de bajas concentraciones de L-arginina en todas las cepas y todas las edades. El 7-NI inhibió la síntesis de citrulina en todas las cepas. Los resultados sugieren que en mitocondrias de cerebro de rata, la síntesis de citrulina es constante una vez que la hipertensión se presenta con relación a la edad. El óxido nítrico no regula la fosforilación oxidativa.

Palabras clave: Síntesis de L-citrulina mitocondrial, cerebro de rata, L-arginina, ratas espontáneamente hipertensas, óxido nítrico sintasa mitocondrial.

Abstract

Nitric oxide (NO*) is a biologically active molecule that plays an important role in various physiological processes such as neurotransmission, immune responses and vasodilatation. The aim of the present study was to investigate whether brain mitochondrial nitric oxide synthase (mtNOS) is active and functional during hypertension. Intramitochondrial citrulline synthesis as well as the rates of oxygen consumption was studied in spontaneously hypertensive rats (SHR). Wistar (W), normotensive genetic control Wistar-Kyoto (WKY) and SHR rats were used to determine age-related citrulline formation, an indicator of nitric oxide synthesis.

L-citrulline production was concentration-dependent on L-arginine in all strains and all ages tested, and was inhibited by 7-Nitroindazole (7-NI). Brain mitochondria of 1 month-old (prehypertensive) SHR rats exhibited a significantly ($p < 0.05$) low basal L-citrulline content as compared to age-matched W and WKY. L-citrulline synthesis in SHR rats showed a significantly ($p < 0.01$) low response to L-arginine in 3 and 7 months-old rats. Respiratory rates in states 3 and 4 increased with low L-arginine concentration in all strains and all ages. 7-NI inhibited L-citrulline synthesis in all strains. The results suggest that in rat brain mitochondria, L-citrulline synthesis is constant once age-related hypertension is installed and NO* does not regulate the oxidative phosphorylation.

Key words: Mitochondrial L-citrulline, rat brain, spontaneously hypertensive rats, aging, L-arginine, nitric oxide synthase.

Introducción

Recientemente, se demostró en mitocondrias de hígado de rata la presencia de una nueva isoforma de la óxido nítrico sintasa (NOS) (Giulivi et al., 1998; Tatoyan y Giulivi, 1998); sin embargo, su actividad también ha sido detectada en mitocondrias de cerebro, corazón y

Caracterización funcional de la óxido nítrico sintasa ...

rión (Tatoyany Giulivi, 1998; French et al., 2001; Kanai et al., 2001; Lacza et al., 2001; Manzo-Ávalos et al., 2002; Aguilera-Aguirre et al., 2002). El óxido nítrico (NO*) funciona como un neurotransmisor y neuromodulador en el sistema nervioso central y periférico (Gammie et al., 2000). Los efectos de NO* en el tono vascular sanguíneo y en la función neuronal son la base para la regulación de importantes funciones neuroendocrinas y de comportamiento (Gammie et al., 2000). Reportes recientes han identificado a la óxido nítrico sintasa mitocondrial (NOSmt) como una isoforma de la NOS neuronal (NOS α), lo cual ha sugerido la existencia de una nueva vía (Kanai et al., 2001; Elfering et al., 2002). La producción de óxido nítrico en mitocondrias ha sido involucrada en la regulación de diversas funciones metabólicas en la mitocondria; tales como, potencial de membrana, pH mitocondrial, regulación de la respiración por inhibición competitiva con el oxígeno en la citocromo c oxidasa, inhibición de la síntesis de ATP, apertura del poro de transición de permeabilidad, apoptosis y muerte celular (Giulivi et al., 1998; Ghafourifar y Richter, 1999; Ghafourifar et al., 1999; Shiva et al., 2001; Aguilera-Aguirre et al., 2002; Saavedra-Molina et al., 2003). Durante la hipertensión y el envejecimiento, la activación de células endoteliales produce y libera factores contráctiles que afectan la acción fisiológica relajante del NO* (Nakahara et al., 1998; Taddei et al., 1998), y afecta la expresión de la NOS (Chou et al., 1998). A partir de que se localizó la NOSmt en la membrana mitocondrial interna (Elfering et al., 2002), este hallazgo se convirtió en un blanco para la investigación en relación a su papel diferencial en condiciones fisiológicas y patofisiológicas. Al respecto, datos previos han mostrado que la actividad basal de la NOSmt no tiene relevancia fisiológica en corazón de cerdo (French et al., 2001); sin embargo, esta enzima regula diversas funciones mitocondriales en rata (Ghafourifar y Richter et al., 1997; Giulivi et al., 1998; Tatoyany Giulivi, 1998; Ghafourifar y Richter, 1999; Ghafourifar et al., 1999; Aguilera-Aguirre et al., 2002). Diversos eventos patológicos han sido implicados en la regulación de la NOSmt tales como la hipertensión (Aguilera-Aguirre et al., 2002) y la hipoxia (Shiva et al., 2001) y en procesos naturales como el desarrollo (Riobó et al., 2002). El propósito del presente trabajo fue caracterizar la producción de NO* como formación de citrulina, y determinar su influencia en la velocidad respiratoria en mitocondrias de cerebro de rata en estado normal y durante la hipertensión, así como la influencia que tiene la edad en esta condición.

Materiales y Métodos

Substancias químicas

Todos los reactivos y sustancias utilizadas fueron adquiridas de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO., EE.UU.).

Materiales biológicos

Se utilizaron ratas macho Wistar (W), ratas normotensas genéticamente Wistar-Kyoto (WKY) y ratas espontáneamente hipertensas (SHR) de 1, 3 y 7 meses de edad, ali-

Caracterización funcional de la óxido nítrico sintasa ...

mentadas *ad libitum*, que se mantuvieron en condiciones controladas de luz:oscuridad en el bioterio del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas. Se utilizó la norma reglamentaria para el uso de animales expedida por la Secretaría de Agricultura, en el párrafo de la Regulación Federal para el Uso y Cuidado de Animales (NOM-062-ZOO-1999). Esta investigación fue aprobada además, por el Comité Institucional Para el Uso de Animales de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. La presión arterial se midió con un pletismógrafo, obteniéndose valores de 134 ± 3 y 122 ± 3 mmHg (WKY) y 183 ± 5 y 203 ± 14 mmHg (SHR), para las ratas de 3 y 7 meses de edad, respectivamente. Las ratas de 1 mes de edad de todas las cepas fueron normotensas. En los experimentos con ratas jóvenes, se utilizaron en forma conjunta los cerebros de cuatro ratas.

Las mitocondrias de cerebro se aislaron de la parte antero superior del encéfalo por centrifugación diferencial en un gradiente de Percoll, como se describió (Thakary y Hassan, 1988; Sims, 1990). De manera breve, las ratas se decapitaron, se extrajo el cerebro, el cual se puso en medio de aislamiento frío que contenía 210 mM de manitol, 70 mM de sacarosa, 1 mM de EGTA (Etilen glicol-bis(β -aminoetil eter)N,N,N',N'tetraacetato), 0.5% de albúmina de suero bovino, 10 mM de MOPS (4-Morfolino-propanosulfonato) (pH 7.4). El cerebro se homogenizó manualmente en un homogenizador de vidrio, se centrifugó a $400 \times g$ y el sobrenadante se centrifugó a $9,000 \times g$. Las centrifugaciones se realizaron por 10 min a 4°C . El sedimento se resuspendió en Percoll al 15% y se aplicó en un gradiente discontinuo de Percoll (23% y 40%). El gradiente se centrifugó a $30,700 \times g$ durante 6 min; la tercera banda del tubo de gradiente se extrajo, se diluyó 1:4 con medio de aislamiento y se centrifugó a $16,700 \times g$ en el medio de aislamiento, añadido con 0.5% de albúmina de suero bovino, seguido de una centrifugación a $6,900 \times g$ por 10 min. La concentración de proteína mitocondrial se determinó mediante la reacción de biuret, con ligeras modificaciones (Gornall et al., 1949).

Síntesis de L-citrulina

La producción de L-citrulina se determinó como se describe en Knipp y Vasak (2000) en un medio que contenía 190 mM de manitol, 5 mM de KH_2PO_4 , 15 mM de KCl, 3 mM de MgCl_2 , 1 mM de EGTA, 10 mM de MOPS (pH 7.4), más 10 mM de succinato y $2 \mu\text{M}$ de rotenona. Las mitocondrias de cerebro se incubaron 1 hora a 30°C en un baño con agitación (30 rpm), en presencia de los cofactores de la enzima óxido nítrico sintasa: 0.1 mM NADPH, $10 \mu\text{M}$ tetrahidrobiopterina, $5 \mu\text{M}$ FAD+ y $40 \mu\text{M}$ CaCl_2 y 50, 250 o $1000 \mu\text{M}$ del sustrato L-arginina, con o sin $100 \mu\text{M}$ 7-Nitroindazol (7-NI). Los valores basales de L-citrulina se obtuvieron con L-arginina endógena. La L-citrulina se cuantificó en un espectrofotómetro Perkin-Elmer Lambda 10 a 530 nm, usando una curva de calibración.

Respiración mitocondrial

El consumo de oxígeno se midió en una cámara con un electrodo para oxígeno tipo Clark. El medio de incubación contenía 210 mM de manitol, 70 mM de sacarosa, 0.5 mM de EGTA, 10 mM de KH_2PO_4 y 10 mM MOPS (pH 7.4), más el sustrato de la respiración (10 mM

Caracterización funcional de la óxido nítrico sintasa ...

de succinato y 2 μM de rotenona). El estado 3 de la respiración mitocondrial se obtuvo añadiendo 300 μM de ADP. Se utilizaron diferentes concentraciones de L-arginina para determinar el efecto del NO^* sobre la respiración mitocondrial con y sin el inhibidor 7-NI.

Análisis de datos

Los valores mostrados representan la media \pm e.e. de 3-17 animales. Los datos se analizaron con la prueba t de Student para determinar la significancia estadística ($p < 0.05$).

Resultados

Medición de L-citrulina

La óxido nítrico sintasa cataliza la pentaoxidación de L-arginina a L-citrulina y NO^* . De este modo, la producción de L-citrulina puede ser utilizada como una medición indirecta del NO^* . En el presente trabajo, se estudió el efecto de la estimulación e inhibición de la síntesis de L-citrulina por la adición del sustrato L-arginina y el inhibidor competitivo de la NOS, el 7-NI, respectivamente. La figura 1 muestra los resultados de producción de L-citrulina en las tres cepas de ratas de diferentes edades. Las mitocondrias de cerebro de ratas Wistar, WKY y SHR de un mes de edad exhibieron una síntesis de L-citrulina dependiente de la concentración de L-arginina (Fig. 1a). El valor basal en la cepa Wistar fue de 7 ± 1 nmol de L-citrulina/mg prot/h, el cual incrementó a 16 ± 2 nmol de L-citrulina/mg prot/h ($p < 0.05$) en presencia de 1 mM de L-arginina. Sin embargo, en mitocondrias de cerebro de ratas WKY el valor basal de L-citrulina fue de 8 ± 4 nmol/mg prot/h, el cual incrementó en aproximadamente cuatro veces (33 ± 3 nmol/mg prot/h, $p < 0.05$) en presencia de 1 mM de L-arginina. En contraste, se obtuvo un valor muy bajo de L-citrulina en mitocondrias de ratas SHR, el cual fue significativamente diferente ($p < 0.05$) a las otras cepas (Fig. 1a). Dichas mitocondrias presentaron también una respuesta a L-arginina dependiente de la concentración de sustrato (arriba de 15 nmol/mg prot/h a 1 mM de sustrato) la cual fue estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

En las figuras 1b y 1c se muestran los valores de L-citrulina en ratas de 3 y 7 meses de edad. Estos resultados muestran también un incremento en la síntesis de L-citrulina dependiente de la concentración de L-arginina. Los valores basales de L-citrulina fueron de 7 y 8 nmol/mg prot/h en ratas de 3 y 7 meses de edad, respectivamente (Figs. 1b y 1c). La síntesis de L-citrulina incrementó a 20 ± 2 (Wistar), 26 ± 2 (WKY) y 22 ± 4 nmol/mg prot/h (SHR) en ratas de 3 meses de edad en presencia de 1 mM de L-arginina (Fig. 1b), mientras que en ratas de 7 meses de edad los valores de L-citrulina fueron de 17 ± 3 (Wistar), 25 ± 5 (WKY) y 19 ± 2 (SHR) nmol/mg prot/h con 1 mM de L-arginina (Fig. 1c). Estos resultados muestran que no hubo diferencias entre las diferentes cepas de ratas a esas edades (Figs. 1b y 1c). Los valores basales de L-citrulina en mitocondrias de la cepa SHR a 3 y 7 meses de edad incrementaron respecto al valor observado a 1 mes de edad (Figs 1a-c).

Caracterización funcional de la óxido nítrico sintasa ...

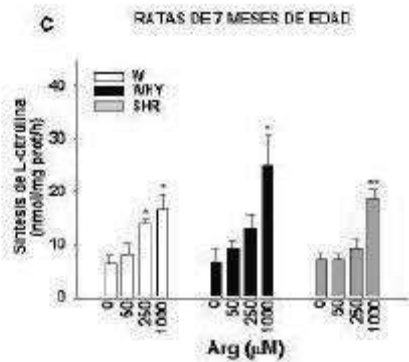
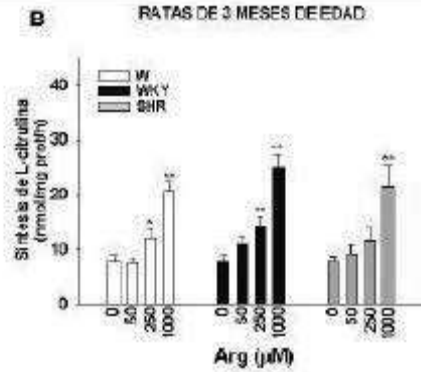
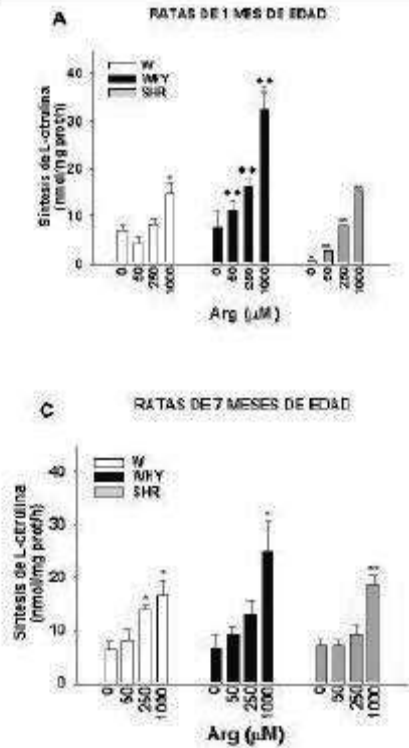


Figura 1. Síntesis de citrulina en mitocondrias de cerebro de rata. Las mitocondrias (1 mg/ml) fueron incubadas en presencia de diferentes concentraciones de L-arginina (Arg) 50, 250 y 1000 μM en el medio así descrito en materiales y métodos. (A, 1 mes; B, 3 meses y C, 7 meses de edad). W=Wistar; WKY=Wistar-Kyoto; SHR=Ratas espontáneamente hipertensas. Los resultados representan el promedio ± el error estándar de n = 4-10 diferentes animales. *p<0.05, **p<0.01 con respecto al valor basal; ♣p<0.05, ♠p<0.01 con respecto a las cepas.

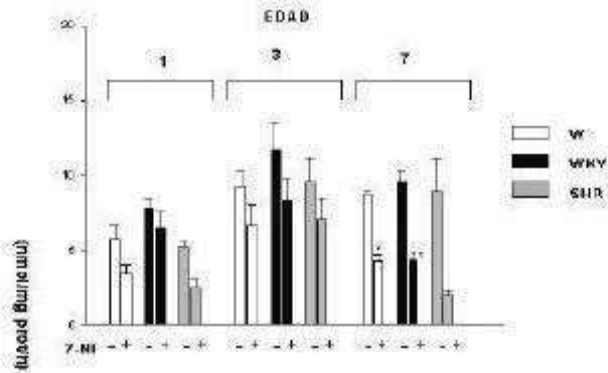


Figura 2. Síntesis de citrulina en mitocondrias de cerebro de rata en diferentes edades en presencia de 7-Nitroindazol (7-NI). Las mitocondrias (1 mg/ml) fueron incubadas con 100 μM de 7-NI en un medio descrito en materiales y métodos. W=Wistar; WKY=Wistar-Kyoto; SHR=Ratas espontáneamente hipertensas. Los resultados representan el promedio ± el error estándar de n = 4-10 diferentes animales. *p<0.05, **p<0.01 con respecto al valor basal.

La actividad de la NOSmt fue ensayada en presencia del 7-NI, el cual es un inhibidor no competitivo de la NOS con una alta selectividad para la isoforma NOS neuronal (Wolff et al., 1994). Los resultados mostraron una inhibición de entre 20 y 50% ($p < 0.05$) en los valores basales de L-citrulina a todas las edades en las tres cepas utilizadas (Fig. 2).

Respiración mitocondrial

El óxido nítrico puede regular el consumo de oxígeno mitocondrial (Ghafourifar y Richter, 1997). Por esta razón, fue importante conocer su efecto sobre esta función en las mitocondrias de cerebro de rata. El consumo de oxígeno fue medido en presencia de diferentes concentraciones de L-arginina y 7-NI. En las figuras 3a-c, se muestran los valores de consumo de oxígeno en los estados 3 y 4 de la respiración en mitocondrias de ratas Wistar, WKY y SHR de 1 mes de edad. El consumo de oxígeno en ratas Wistar incrementó en la presencia de 50 y 250 μM de L-arginina (Fig. 3a). Se observaron resultados similares en las ra-

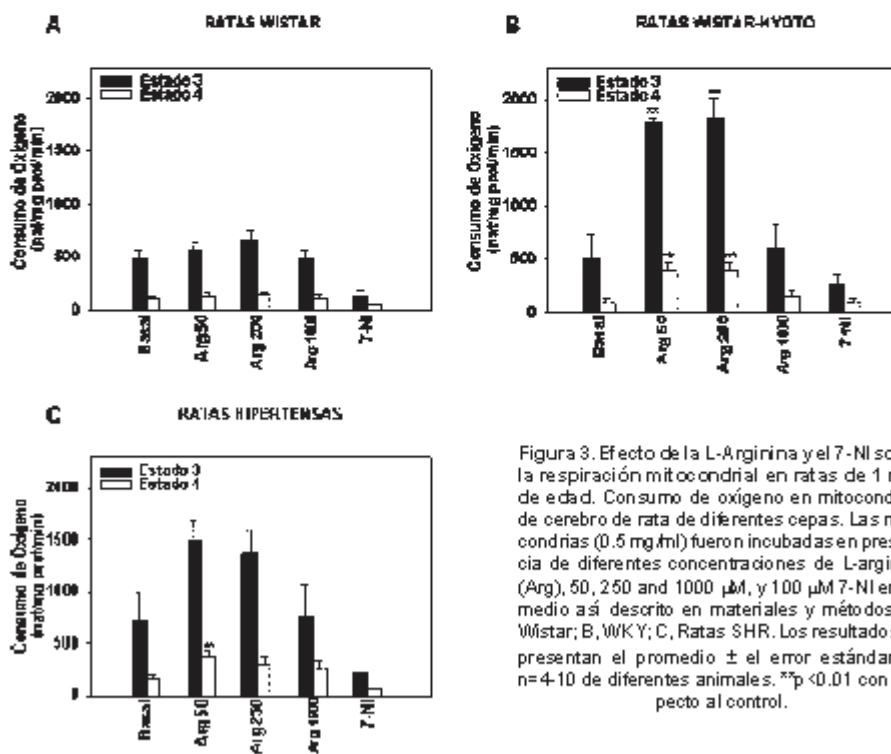


Figura 3. Efecto de la L-Arginina y el 7-NI sobre la respiración mitocondrial en ratas de 1 mes de edad. Consumo de oxígeno en mitocondrias de cerebro de rata de diferentes cepas. Las mitocondrias (0.5 mg/ml) fueron incubadas en presencia de diferentes concentraciones de L-arginina (Arg), 50, 250 and 1000 μM , y 100 μM 7-NI en un medio así descrito en materiales y métodos. A, Wistar; B, WKY; C, Ratas SHR. Los resultados representan el promedio \pm el error estándar de $n=4-10$ de diferentes animales. $**p < 0.01$ con respecto al control.

Caracterización funcional de la óxido nítrico sintasa ...

tas WKY, donde el valor basal de consumo de oxígeno en estado 3 fue de 504 ± 200 $\mu\text{mol/mg prot/min}$ e incrementó a 1773 ± 58 y 1834 ± 179 $\mu\text{mol/mg prot/min}$ en la presencia de 50 y 250 μM de L-arginina, respectivamente (Fig. 3b). El consumo basal de oxígeno en estado 4 fue de 86 ± 39 $\mu\text{mol/mg prot/min}$, mientras que la adición de 50 y 250 μM de L-arginina incrementó este valor a 401 ± 72 $\mu\text{mol/mg prot/min}$ (Fig. 3b). El consumo de oxígeno también incrementó en los estados 3 y 4 de mitocondrias de la cepa SHR (Fig. 3c).

Por otro lado, el 7-NI inhibió el consumo de oxígeno en los estados 3 y 4 en las tres cepas de ratas a 1 mes de edad. Esta inhibición fue de alrededor del 60 al 70% en estado 3 y 58 al 72% en estado 4 (Figs. 3a-c).

Se observaron resultados similares en ratas Wistar de 3 meses de edad, con un incremento en el consumo de oxígeno en ambos estados, mientras que el 7-NI inhibió también la velocidad de respiración (Fig. 4a).

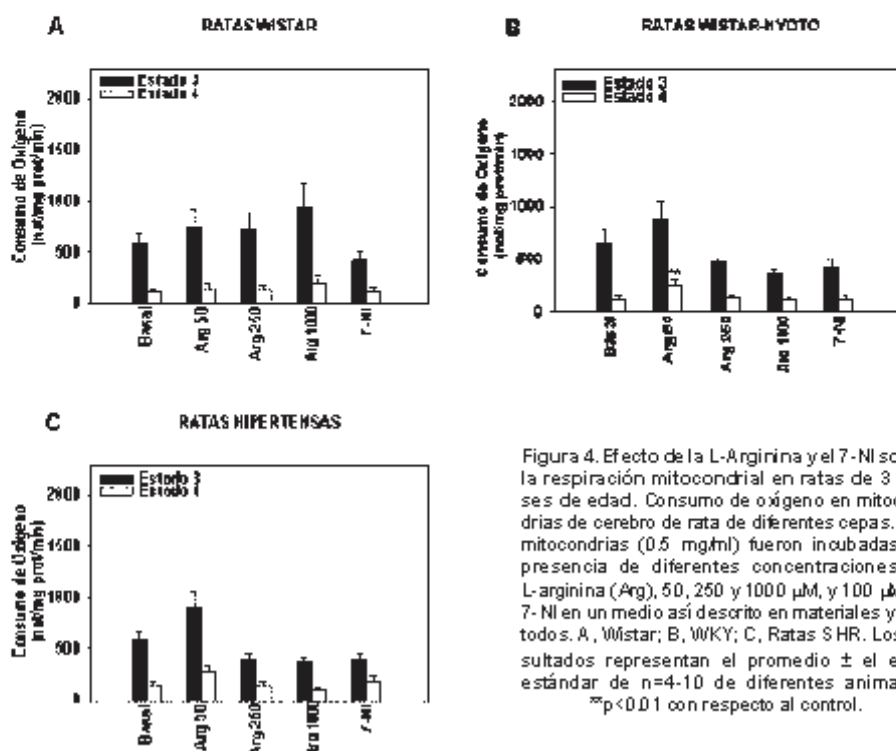


Figura 4. Efecto de la L-Arginina y el 7-NI sobre la respiración mitocondrial en ratas de 3 meses de edad. Consumo de oxígeno en mitocondrias de cerebro de rata de diferentes cepas. Las mitocondrias (0.5 mg/ml) fueron incubadas en presencia de diferentes concentraciones de L-arginina (Arg), 50, 250 y 1000 μM , y 100 μM de 7-NI en un medio así descrito en materiales y métodos. A, Wistar; B, WKY; C, Ratas SHR. Los resultados representan el promedio \pm el error estándar de $n=4-10$ de diferentes animales. $^{**}p < 0.01$ con respecto al control.

Caracterización funcional de la óxido nítrico sintasa ...

Los resultados obtenidos en mitocondrias de ratas WKY y SHR de tres meses de edad mostraron un incremento en la velocidad de respiración en presencia de 50 μM de L-arginina (Figs. 4b y c). Los valores basales en ratas WKY fueron de 663 ± 104 y 124 ± 25 nat/mg prot/min en los estados 3 y 4, respectivamente, en tanto que la adición de 50 μM de L-arginina incrementó estos valores a 883 ± 159 y 262 ± 51 nat/mg prot/min en los estados 3 y 4, respectivamente. En ratas SHR se observó un aumento en el consumo de oxígeno en ambos estados con 50 μM de L-arginina. Sin embargo, hubo una disminución con concentraciones de sustrato más altas (Fig. 4c).

En condiciones basales, el 7-NI inhibió el consumo de oxígeno en los estados 3 y 4 en todas las cepas de ratas de 3 meses de edad. Esta inhibición fue menor en ratas de 1 mes de edad (Fig. 4a-c).

En ratas de 7 meses de edad se observó un incremento en el estado 3 únicamente a una concentración 1 mM de L-arginina, sin cambios a menores concentraciones de sustrato. En esas ratas, el 7-NI incrementó el consumo de oxígeno en todas las cepas (Figs. 5a-c).

La tabla 1 muestra el cociente respiratorio (CR) obtenido, donde los valores basales del CR fueron de 4 a 8, lo cual corrobora la integridad y funcionalidad de esas mitocondrias. Estos resultados mostraron una disminución del valor del CR en la presencia de L-arginina y de 7-NI. Este efecto fue más pronunciado en mitocondrias de ratas de 7 meses de edad de todas las cepas. En las ratas Wistar, el CR disminuyó en 68, 55 y 46% con 50, 250 y 1000 μM de L-arginina, respectivamente. Cuando se utilizó el 7-NI, el valor del CR disminuyó a 23% con respecto al control.

Concentración (μM)	COCIENTE RESPIRATORIO (CR)								
	Ratas Wistar (meses)			Ratas Wistar-Kyoto (meses)			Ratas Hipertensas (meses)		
	1	3	7	1	3	7	1	3	7
Control	47 \pm 05	68 \pm 06	65 \pm 04	61 \pm 05	64 \pm 06	52 \pm 07	45 \pm 13	50 \pm 05	49 \pm 04
L-arg 50	50 \pm 05	69 \pm 13	58 \pm 15	48 \pm 07	36 \pm 03 ^{**}	44 \pm 09	41 \pm 01	32 \pm 05	58 \pm 17
L-arg 250	55 \pm 09	57 \pm 06	47 \pm 11	47 \pm 03	47 \pm 14	37 \pm 06	51 \pm 05	30 \pm 04 [*]	38 \pm 04
L-arg 1000	37 \pm 04	63 \pm 15	39 \pm 14	42 \pm 05 [*]	33 \pm 04 [*]	45 \pm 14	38 \pm 08	44 \pm 08	48 \pm 08
7-NI 100	30 \pm 10	52 \pm 12	20 \pm 05 ^{**}	33 \pm 05 [*]	42 \pm 05	15 \pm 008	41 \pm 08	35 \pm 06	14 \pm 003 ^{**}

Tabla 1. Efecto de la L-Arginina y el 7-NI sobre el cociente respiratorio (CR). El CR fue determinado en mitocondrias de cerebro de rata de diferentes cepas y edades. Las mitocondrias (0.5 mg/ml) fueron incubadas en presencia de diferentes concentraciones de L-arginina (Arg), 50, 250 y 1000 μM , y 7-NI de 100 μM en un medio así descrito en materiales y métodos. La respiración fue estimulada con 300 μM de ADP. Los resultados representan el promedio \pm el error estándar de n=4-10 de diferentes animales. *p < 0.05, **p < 0.01 con respecto al control.

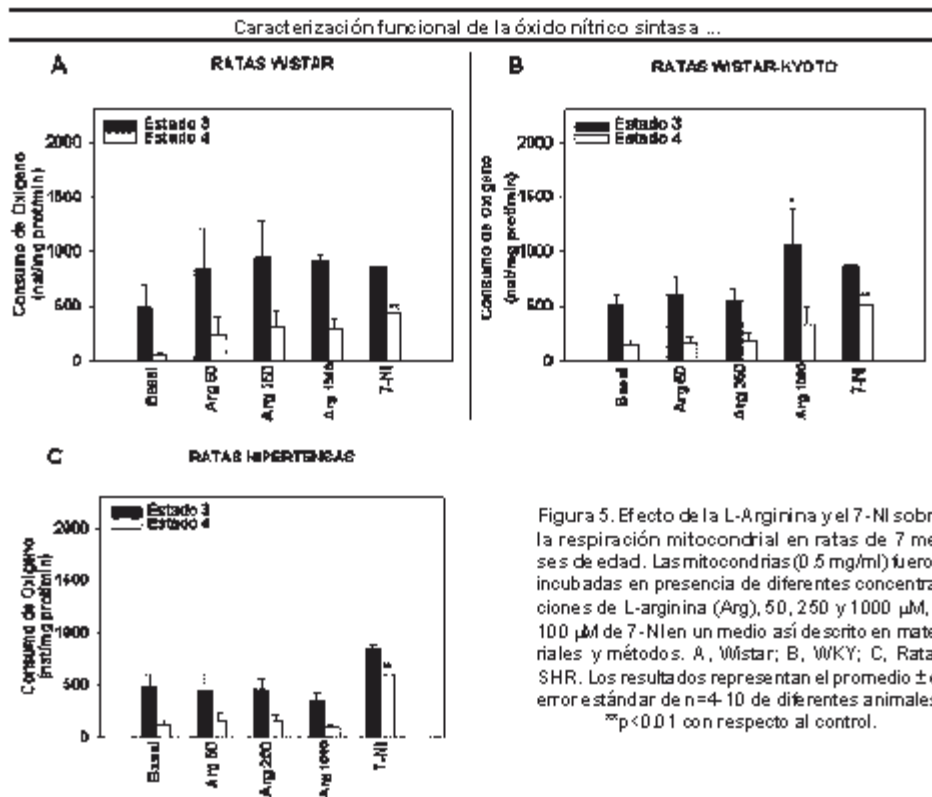


Figura 5. Efecto de la L-Arginina y el 7-NI sobre la respiración mitocondrial en ratas de 7 meses de edad. Las mitocondrias (0.5 mg/ml) fueron incubadas en presencia de diferentes concentraciones de L-arginina (Arg), 50, 250 y 1000 μ M, y 100 μ M de 7-NI en un medio así descrito en materiales y métodos. A, Wistar; B, WKY; C, Ratas SHR. Los resultados representan el promedio \pm el error estándar de n=4-10 de diferentes animales. ^{**}p<0.01 con respecto al control.

En mitocondrias de ratas WKY de 7 meses de edad el CR disminuyó con L-arginina (85, 71 y 86% con 250, 500 y 1000 μ M, respectivamente) y 29% en la presencia de 7-NI. En mitocondrias de ratas SHR de la misma edad, la disminución en el CR fue de 78, 98 y 29% con 250 y 1000 μ M de L-arginina y 7-NI, respectivamente.

Discusión

El óxido nítrico es una importante molécula generada en diversos organismos. Debido a su efecto en la neurotransmisión, vasodilatación, respuesta inmune, modulador de la respiración y pH mitocondrial, entre otros (Giulivi et al., 1998; Tatoyan y Giulivi, 1998; López-Figueroa et al., 2000; Orsi et al., 2000; Ghafourifar et al., 2001; Saavedra-Molina et al., 2003), el NO* se ha convertido en blanco para la investigación. La producción y funciones del NO* son alteradas en condiciones patológicas, tales como la diabetes y la hipertensión. La hipertensión es reconocida como un importante factor de riesgo para el desarrollo de infarto

Caracterización funcional de la óxido nítrico sintasa ...

cerebral (Bordet, et al., 2000, Marin et al., 2000), lo cual es una razón clave para la investigación, parte de la cual es enfocada en este trabajo. Nuestros resultados muestran que la producción de NO^{*} intramitocondrial puede ser afectada en hipertensión y puede influir en el metabolismo mitocondrial.

Riobó et al. (2002) encontró que la producción basal de L-citrulina en las ratas Wistar de 1 mes de edad fue de aproximadamente 1.25 nmol/mg prot/h, mientras que nosotros encontramos de 7-8 nmol/mg prot/h en ratas W y WKY y 0.53 nmol/mg prot/h en el caso de las ratas SHR (Fig. 1a).

Nuestros resultados sugieren que la actividad de la NOS_{mt} está disminuida en las primeras etapas del desarrollo de la hipertensión, pero una vez establecida la hipertensión (3 y 7 meses de edad) la actividad de la NOS_{mt} es recuperada (Fig. 1b-c). Esta afirmación indica que la síntesis de NO^{*} aumenta aparentemente con el propósito de mediar el daño producido por el proceso patológico.

La síntesis de L-citrulina en mitocondrias de cerebro de ratas fue menor a lo reportado por otros autores, a pesar de la cepa y la edad. Los valores basales encontrados en esos estudios fueron de 31.2, 61.2, y 62.4 nmol/mg prot/h para mitocondrias de hígado, riñón y corazón, respectivamente (Ghafourifar y Richter, 1997; Aguilera-Aguirre et al., 2002). Nuestros resultados son comparables con aquellos obtenidos en mitocondrias de cerebro de ratones de 3 meses de edad y en corazón de cerdo (2.0 y 13.6 nmol citrulina/mg prot/h, respectivamente).

El 7-Nitroindazol (7-NI), un inhibidor no competitivo específico para la NOS_n (Wolf et al., 1994), disminuye la síntesis de L-citrulina en mitocondrias de cerebro de rata en todas las cepas y en todas las edades estudiadas (Fig. 2). Los resultados demuestran que la síntesis de L-citrulina fue catalizada por la NOS_{mt}; además, esto corrobora que la NOS_{mt} es una variante de la NOS_n (Kanai et al., 2001; Elfering et al., 2002).

Se ha considerado que el NO^{*} tiene efecto sobre la respiración, mediante la inhibición del consumo de oxígeno tanto en hígado como en riñón (Ghafourifar y Richter, 1997; Giulivi et al., 1998), pero no así en mitocondrias de corazón de cerdo, en donde no es afectada la respiración (French et al., 2001). Sin embargo, en mitocondrias de cerebro de rata encontramos un aumento de cuatro veces en el consumo de oxígeno en ambos estados de todas las condiciones probadas (Fig. 3). Este efecto fue más evidente en ratas jóvenes de WKY y SHR con 50 y 250 μM de L-arginina (Fig. 3b-c); mientras que otros autores encontraron una acción inhibitoria del NO^{*} con 1 mM de L-arginina en mitocondrias intactas de hígado de rata (Ghafourifar y Richter, 1997). Nuestros datos revelan que el consumo de oxígeno no se inhibió por el NO^{*} en mitocondrias de cerebro de rata, pero sí aumentó, lo cual sugiere un desacoplamiento de la respiración mitocondrial (Figs. 3-5). Al respecto, algunos autores han reportado que el peroxinitrito (ONOO⁻), un agente oxidante de la reacción entre el NO^{*} y el anión superóxido (O₂⁻), puede estimular la fuga de protones a través de la membrana mitocondrial interna, la cual puede ser responsable de este efecto (Ghafourifar et al., 2001; Brown y Borutaite, 2002; Radi et al., 2002).

Caracterización funcional de la óxido nítrico sintasa ...

La NOSn es una enzima multifuncional que cataliza la síntesis de O_2^- en cantidades significativas, bajo condiciones no saturantes de L-arginina y BH_4 (Mayer y Hemmens, 1997) y debido a que la NOSmt es una modificación post-traducciona l de la NOSn (Kanai et al., 2001; Efering et al., 2002; Giulivi, 2003), la NOSmt podría producir O_2^- con bajas concentraciones de L-arginina (50 y 250 μM). Nuestros resultados sugieren que el NO^* en conjunto con el O_2^- forma $ONOO^-$, el cual puede desacoplar la respiración mitocondrial y aumentar el consumo de oxígeno.

Por otra parte, debido a que el 7-NI inhibió el consumo de oxígeno en el estado 3 y el estado 4 en todas las condiciones probadas, sugerimos que el 7-NI actúa como un inhibidor de la cadena respiratoria, probablemente por unión al grupo hemo del complejo III y IV de la cadena respiratoria, ya que el 7-NI es un inhibidor no competitivo en el grupo hemo de la NOS (Wolf et al., 1994).

Otro importante indicativo de la función mitocondrial es el cociente respiratorio, en donde los valores típicos en mitocondrias acopladas de hígado de rata son entre 3-15 (Sims, 1990; Giulivi et al., 1998; Thakar y Asan, 1988). Los valores obtenidos del CR fueron del rango de 4-8, lo que indicó una adecuada función mitocondrial (Tabla 1). Otros autores han reportado que el NO^* inhibe la respiración y por lo tanto el CR en mitocondrias de hígado de rata (Giulivi, 1998; Saavedra-Molina et al., 2003). Aunque observamos una inhibición del CR con L-arginina, este hecho no es atribuido al NO^* , puesto que se ha reportado que el NO^* disminuye el consumo de oxígeno (Ghafourifar y Richter, 1997). La inhibición en el CR puede ser debido a un desacoplamiento de la cadena respiratoria, debido a que el consumo de oxígeno aumentó (Figs. 3-5). Otra diferencia encontrada fue con respecto a la edad (7 meses de edad) (Fig. 5). El envejecimiento es un proceso que involucra cambios fisiológicos, disminuye la capacidad funcional del organismo maduro. Los radicales libres contribuyen de manera significativa en este proceso. El estrés oxidativo en mitocondrias juega un importante papel en el envejecimiento, debido a que este orgánulo es una fuente de especies reactivas de oxígeno (ERO) y un aumento en su producción lo promueve. El O_2^- por sí mismo o en combinación con otros radicales libres puede causar estrés oxidativo a la mitocondria (Nakahara et al., 1998; Sarkela et al., 2001).

Conclusiones

Los resultados de este trabajo sugieren que la producción basal de NO^* en mitocondrias de cerebro de rata no es suficiente para regular la fosforilación oxidativa y muestran la importancia que tiene el NO^* en condiciones como la hipertensión y el envejecimiento, donde se tienen efectos tejido-específicos.

Agradecimientos

Los autores agradecen el apoyo económico parcial de los donativos de la CIC-UMSNH (2005) y de CONACYT (43705).

Referencias

- Aguilera-Aguirre L, González-Hernández JC, Pérez-Vázquez V, Ramírez J, Clemente-Guerrero M, Villalobos-Molina R, Saavedra-Molina A (2002) Role of intramitochondrial nitric oxide in rat heart and kidney during hypertension. *Mitochondrion* **1**:413-423.
- Bordet R, Pu Q, Puisieux F, Deplanque D, Jaboureck O, Leys D, Vallet B, Dupuis B (2000) Susceptibility to provoked cerebral infarction is not increased in a rat model of pharmacologically-induced hypertension despite endothelial dysfunction. *Fundam Clin Pharmacol* **14**:177-186.
- Brown GC, Borutaite V (2002) Nitric oxide inhibition of mitochondrial respiration and its role in cell death. *Free Radic Biol Med* **33**:1440-1450.
- Chou TC, Yen MH, Li CY, Ding YA (1998) Alterations of nitric oxide synthase expression with aging and hypertension in rats. *Hypertension* **31**:643-648.
- Elfering SL, Sarkela TM, Giulivi C. (2002) Biochemistry of mitochondrial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem* **277**:38079-38086.
- French S, Giulivi C, Balaban RS (2001) Nitric oxide synthase in porcine heart mitochondria: evidence for low physiological activity. *Am J Physiol* **280**:H2863-H2867.
- Gammie SC, Dawson VL, Nelson RJ (2000) Influence of nitric oxide on neuroendocrine function and behaviour. Cap. 27. Nitric oxide. *Biology and Pathobiology*. (Ignarro LJ. Editor). Academic Press. Pag. 429-438.
- Ghafourifar P, Richter C (1997) Nitric oxide synthase activity in mitochondria. *FEBS Lett* **418**:291-296.
- Ghafourifar P, Richter C (1999) Mitochondrial nitric oxide synthase regulates mitochondrial matrix pH. *Biol Chem* **380**:1025-1028.
- Ghafourifar P, Schenk U, Klein SD, Richter C (1999) Mitochondrial nitric oxide synthase stimulation causes cytochrome c release from isolated mitochondria. Evidence for intramitochondrial peroxynitrite formation. *J Biol Chem* **274**:31185-31188.
- Ghafourifar P, Bringold U, Klein SD, Richter C (2001) Mitochondrial nitric oxide synthase, oxidative stress and apoptosis. *Biol Signals Recept* **10**:57-65.
- Giulivi C, Poderoso JJ, Boveris A (1998) Production of nitric oxide by mitochondria. *J Biol Chem* **273**:11038-11043.
- Giulivi C (2003) Characterization and function of mitochondrial nitric oxide synthase. *Free Radic Biol Med* **34**:397-408.
- Gornall AG, Bardawill CJ, David MM (1949) Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J Biol Chem* **177**:751-766.
- Kanai AJ, Pearce LL, Clemens PR, Birder LA, VanBibber MM, Choi SY, de Groat WC, Peterson J (2001) Identification of a neuronal nitric oxide synthase in isolated cardiac mitochondria using electrochemical detection. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**:14126-14131.

Caracterización funcional de la óxido nítrico sintasa ...

- Knipp M, Vasak M (2000) A colorimetric 96-well microtiter plate assay for the determination of enzymatically formed citrulline. *Anal Biochem* **286**:257-64.
- Lacza Z, Puskar M, Figueroa JP, Zhang J, Rajapakse N, Busija DW (2001) Mitochondrial nitric oxide synthase is constitutively active and is functionally upregulated in hypoxia. *Free Radic Biol Med* **31**:1609-1615.
- López-Figueroa MO, Caamaño C, Morano MI, Ronn LC, Akil H, Watson SJ (2000) Direct evidence of nitric oxide presence within mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun* **272**:129-133.
- Manzo-Ávalos S, Pérez-Vázquez V, Ramírez J, Aguilera-Aguirre L, González-Hernández JC, Clemente-Guerrero M, Villalobos-Molina R, Saavedra-Molina A (2002) Regulation of the rate of synthesis of nitric oxide by Mg^{2+} and hypoxia. Studies in rat heart mitochondria. *Amino Acids* **22**:381-389.
- Marín J, Ferrer M, Balfagón G (2000) Role of protein kinase C in electrical-stimulation-induced neuronal nitric oxide release in mesenteric arteries from hypertensive rats. *Clin Sci* **99**:277-283.
- Mayer B, Hemmens B (1997) Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells. *Trends Biochem Sci* **22**:477-481.
- Nakahara H, Kanno T, Inai Y, Utsumi K, Hiramatsu M, Mori A, Packer L (1998) Mitochondrial dysfunction in the senescence accelerated mouse (SAM). *Free Radic Biol Med* **24**:85-92.
- Orsi A, Beltrán B, Clementi E, Hallén K, Feelisch M, Moncada S (2000) Continuous exposure to high concentrations of nitric oxide leads to persistent inhibition of oxygen consumption by J774 cells as well as extraction of oxygen by the extracellular medium. *Biochem J* **346**:407-412.
- Radi R, Cassina A, Hodara R, Quijano C, Castro L (2002) Peroxynitrite reactions and formation in mitochondria. *Free Radic Biol Med* **33**:1451-1464.
- Riobó NA, Melani M, Sanjuán N, Fizman ML, Gravielle MC, Carreras MC, Cadenas E, Poderoso JJ (2002) The modulation of mitochondrial nitric oxide synthase activity in rat brain development. *J Biol Chem* **277**:42447-42455.
- Saavedra-Molina A, Ramírez-Emiliano J, Clemente-Guerrero M, Pérez-Vázquez V, Aguilera-Aguirre L, González-Hernández JC (2003) Mitochondrial nitric oxide inhibits ATP synthesis. Effect of free calcium in rat heart. *Amino Acids* **24**:95-102.
- Sarkela TM, Berthiaume J, Elfering S, Gybina AA, Giulivi C (2001) The modulation of oxygen radical production by nitric oxide in mitochondria. *J Biol Chem* **276**:6945-6949.
- Shiva S, Brookes PS, Patel RP, Anderson PG, Darley-Usmar VM (2001) Nitric oxide partitioning into mitochondrial membranes and the control of respiration at cytochrome c oxidase. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**:7212-7217.
- Sims NR (1990) Rapid isolation of metabolically active mitochondria from rat brain and subregions using Percoll density gradient centrifugation. *J Neurochem* **55**:698-707.

Caracterización funcional de la óxido nítrico sintasa ...

- Taddei S, Viridis A, Ghiadoni L, Salvetti A (1998) Endothelial dysfunction in hypertension: fact or fancy?. *J Cardiovasc Pharmacol* **32**:S41-S47.
- Tatoyan A, Giulivi C (1998) Purification and characterization of a nitric-oxide synthase from rat liver mitochondria. *J Biol Chem* **273**:11044-11048.
- Thakar JH, Hassan MN (1988) Effects of 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine (MPTP), cyperquat (MPP+) and paraquat on isolated mitochondria from rat striatum cortex and liver. *Life Sci* **43**:143-149.
- Wolff DJ, Lubeskie A, Umansky S (1994) The inhibition of the constitutive bovine endothelial nitric oxide synthase by imidazole and indazole agents. *Arch Biochem Biophys* **314**:360-366.