



Universidad Autónoma de Madrid
Facultad de Ciencias
Departamento de Biología Molecular

Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC)

**EFFECTOS DEL ÓXIDO NÍTRICO ENDÓGENO SOBRE
LA GUANILATO CICLASA SOLUBLE, LA RESPIRACIÓN Y
LA CONDUCTANCIA DE LA MEMBRANA MITOCONDRIAL INTERNA
A LOS PROTONES EN CÉLULAS INTACTAS**

Memoria presentada por el licenciado *Félix Rodríguez Juárez* para optar al grado de
Doctor en Biología Molecular por la Universidad Autónoma de Madrid.

Directora: Dra. Susana Cadenas Álvarez

Madrid, octubre de 2009

CERTIFICADO DE LA DIRECTORA DE LA TESIS DOCTORAL

Susana Cadenas Álvarez, Doctora en Ciencias Biológicas e Investigadora del Hospital Universitario de La Princesa, certifica que la presente Tesis Doctoral ha sido realizada bajo mi dirección por el Licenciado Félix Rodríguez Juárez, en el Departamento de Cardiología Regenerativa del Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC).

Madrid, a 9 de Octubre de 2009

Dra. Susana Cadenas Álvarez

Quisiera agradecer a todas las personas que, con su trabajo o con su apoyo, han hecho posible la realización de este trabajo.

Gracias a la Dra. Susana Cadenas Álvarez por darme la oportunidad de trabajar junto a ella y enseñarme todas las cualidades que un buen investigador pueda llegar a desear. Su calidad científica ha sido un modelo para mí que perdurará más allá de nuestra relación en común.

Gracias también al Dr. Erich Gnaiger y al Dr. Andrea Belleli por su inestimable colaboración durante estos años de descubrimientos. Todas las conversaciones y el trabajo en común han sido una experiencia enriquecedora que no olvidaré.

Gracias al Dr. Jesús Mateo por todo el trabajo previo que me permitió realizar esta Tesis. Gracias por todo lo que me has enseñado y por mostrarme que la esperanza, la constancia y la profesionalidad son grandes virtudes que nunca deben faltar.

Quiero expresar un agradecimiento especial a la Dra. Magdalena Torres por aconsejarme y cederme el anticuerpo anti-VASP para mis experimentos. Gracias a ello pude finalizar el artículo a tiempo.

Y gracias a la Dra. (¡doctora!) Enara Aguirre. Gracias a ti por ser casi la mitad de mi vida durante los casi 5 años que hemos compartido, con todos los buenos y malos momentos que hemos pasado juntos y que nos han cargado de recuerdos que nunca olvidaré. Gracias a ti porque sin tu trabajo hoy esta tesis no sería una realidad.

También quiero dar las gracias a todos los miembros que alguna vez formamos el grupo de Salvador Moncada y que hemos seguido al pie del cañón. A Carlos y Marta, las primeras personas que tuvieron que soportar mi inexperiencia y a los que debo todo lo que sé sobre hacer westerns. Gracias a Patricia por hacer que trabajar en un laboratorio sea agradable y divertido (¡y por todos los papers también!). Gracias también a Juan Carlos, por todos sus consejos, aunque de F1 no sepa nada. Gracias a Fátima y Oscar, por haberme ayudado en todo lo posible y dejarme escuchar sus inquietudes.

No puedo olvidar tampoco mi estancia en el laboratorio del Dr. Daniel Sanchís en Lérida. Durante los tres meses de estancia pude aprender todo lo que sé sobre PCR, clonajes y transfecciones, por lo que una buena parte de mi formación también se la debo agradecer a él y a su equipo. Gracias a Núria y a Ji Sheng por ser tan agradables con un “extranjero”.

Gracias al resto de personas que estuvieron y están en el CNIC, desde los científicos a los administrativos y personal de mantenimiento, porque sin ellos no hubiera existido la base imprescindible desde donde empezar a construir los cimientos. Gracias a los laboratorios de Miguel Ángel, Alicia y Juan Miguel por todos los buenos momentos que hemos pasado, y por “adoptarnos” cuando nos mudamos (1ª vez). Gracias a los laboratorios de Mercedes Ricote María Monsalve y Carlos Zaragoza por “adoptarnos” cuando nos mudamos (2ª vez). Todos los miembros de estos laboratorios son extraordinarios

Muchas gracias a Jennifer y Lourdes por haber dejado a mi disposición todos sus medios para poder compaginar la Tesis con el trabajo durante este año.

A Santi, Miguel, Tania por aguantarme y no haber desaparecido en el intento. Sé que a pesar de la distancia siempre puedo contar con vosotros y eso me alegra enormemente. Gracias también a Inma por su apoyo moral y el intercambio de paranoias.

Gracias a Fernando y Ana, porque sé que habéis estado apoyándome desde el primer al último momento. Espero poder seguir compartiendo con vosotros todo lo que venga en adelante, que espero sean más cosas buenas que malas.

Gracias a Fernando y Mariemma porque sé que habéis sufrido casi tanto como yo. Gracias por todo vuestro aliento sin el cual alguna vez me podría haber caído por el precipicio. Es el momento de que aparezca por fin la mariposa.

Gracias a mis padres, Félix y Montse por educarme y enseñarme a ser como soy, por su constante apoyo, su amor y cariño y por haberme llevado hasta donde estoy ahora. Gracias a mi hermana Sara por estar siempre que la he necesitado, y ayudarme en todo lo posible.

Ana, tú eres el corazón de esta tesis. Gracias por ser mi vida, por ser mi sufrimiento, por ser mis alegrías, por ser mis frustraciones, por ser mi dolor, por ser mi felicidad, por ser mi cuerpo y mi alma, por ser mi amor, por ser tú y por ser yo. Gracias por serlo todo.

ÍNDICE

ÍNDICE	i
ABREVIATURAS	v
SUMMARY	xi
1. INTRODUCCIÓN	1
<i>1.1. Descubrimiento del óxido nítrico (NO)</i>	3
<i>1.2. Producción celular del NO: las NO sintasas</i>	4
<i>1.3. Degradación del NO</i>	7
<i>1.4. Especies reactivas del nitrógeno (RNS)</i>	7
1.4.1. NO, RNS y mitocondria	8
<i>1.5. Efectos fisiológicos del NO en las células</i>	9
1.5.1. Activación de la guanilato ciclasa soluble (sGC) por el NO	9
1.5.2. Inhibición de la citocromo <i>c</i> oxidasa (CcO) por el NO	10
1.5.3. Sensibilidad relativa de la sGC y la CcO al NO	11
1.5.3.1. Sensibilidad de la sGC al NO	12
1.5.3.2. Sensibilidad de la CcO al NO	14
<i>1.6. Modelos cinéticos de inhibición de la respiración mitocondrial por el NO</i>	15
<i>1.7. Vías de señalización mediadas por la interacción del NO con la sGC y la CcO</i>	19
1.7.1. Proteína quinasa dependiente de cGMP (PKG) y fosfoproteína estimulada por vasodilatadores (VASP)	19
1.7.2. Proteína quinasa activada por AMP (AMPK)	20
<i>1.8. Efectos del NO sobre la conductancia de la membrana mitocondrial interna a los protones</i>	21
1.8.1. Fuga de protones en la membrana mitocondrial interna	21
1.8.2. Efectos del NO sobre la fuga de protones a través de la membrana mitocondrial interna	22
2. OBJETIVOS	25
3. MATERIALES Y MÉTODOS	29
<i>3.1. Línea celular Tet-iNOS 293</i>	31
3.1.1. Descripción de las células Tet-iNOS 293	31
3.1.2. Sistema de expresión regulada de la iNOS	32
3.1.3. Cultivo de las células Tet-iNOS 293	32

3.2. Inducción de la producción endógena de NO	33
3.3. Determinación electroquímica de la producción de NO	34
3.3.1. Calibración del electrodo de NO	34
3.3.2. Medida de la producción de NO	35
3.4. Medida del consumo de oxígeno (O₂) celular	36
3.4.1. Corrección del flujo de O ₂ instrumental	36
3.4.2. Calibración del electrodo de O ₂	36
3.4.3. Medida del consumo de O ₂ en las células	38
3.5. Medida simultánea de la producción de NO y del consumo de O₂	39
3.6. Modelo cinético de inhibición de la CcO por el NO	40
3.7. Medida de la producción de cGMP	40
3.7.1. Cultivo de las células a distintas concentraciones de O ₂	40
3.7.2. Cuantificación de la producción de cGMP	40
3.8. Detección de la expresión de las proteínas iNOS, VASP y AMPK	41
3.8.1. Obtención de los extractos celulares totales	42
3.8.2. Medida de la concentración de las proteínas totales	42
3.8.3. Detección de la expresión de las proteínas iNOS, VASP y AMPK por inmunoblot (western blot)	42
3.9. Medida de la conductancia de la membrana mitocondrial interna a los protones	43
3.9.1. Medida del consumo de O ₂	43
3.9.2. Medida del potencial de membrana	44
4. RESULTADOS	47
4.1. Producción endógena de NO por las células Tet-iNOS 293	49
4.2. Sensibilidad relativa de las dos dianas principales del NO en las células: la sGC y la CcO	50
4.2.1. Sensibilidad de la sGC al NO endógeno	50
4.2.1.1. Dosis-respuesta de la producción de cGMP inducida por el NO y estudio curso-temporal de la producción de cGMP	50
4.2.1.2. Efecto de la concentración de O ₂ sobre la actividad de la sGC	55
4.2.1.3. Sensibilidad de la sGC al NO exógeno	58
4.2.2. Sensibilidad de la respiración mitocondrial al NO endógeno	60
4.2.2.1. Reversibilidad de la inhibición de la CcO por el NO	64

4.2.3. Efectos del NO en las vías de señalización celular dependientes de la PKG y de la AMPK	64
4.3. Modelo cinético de inhibición de la CcO por el NO y dinámica de producción y degradación del NO en hipoxia y durante la transición a anoxia	69
4.3.1. Respiración celular en ausencia de NO	69
4.3.2. Cinética de consumo de O ₂ en ausencia de NO en hipoxia y durante la transición a anoxia	70
4.3.3. Producción endógena de NO e inhibición de la respiración a concentraciones bajas de O ₂ (< 30 μM)	70
4.3.4. Modelo cinético de inhibición de la CcO por el NO	73
4.3.5. Producción de NO endógeno e inhibición de la respiración a concentraciones altas de O ₂ (hasta 240 μM)	78
4.3.6. Inhibición reversible de la respiración y activación del estado metabólico celular inducida por el NO	80
4.4. Efecto del NO endógeno sobre la conductancia de la membrana mitocondrial interna a los protones	82
5. DISCUSIÓN	87
5.1. Sensibilidad relativa de la sGC y la respiración mitocondrial al NO endógeno a concentraciones fisiológicas de O₂	89
5.1.1. Consecuencias de la interacción del NO con la sGC y la CcO sobre las vías de señalización celular: fosforilación de VASP y AMPK	94
5.2. Modelo cinético de inhibición de la CcO por el NO y dinámica de producción y degradación del NO en la transición a anoxia	96
5.3. Efectos del NO endógeno sobre la conductancia de la membrana mitocondrial interna a los protones	99
6. CONCLUSIONES	101
7. BIBLIOGRAFÍA	105

ABREVIATURAS

$\Delta\mu_{\text{H}}^{+}$	Gradiente electroquímico de protones
ΔpH	Gradiente de pH
$\Delta\psi_{\text{m}}$	Potencial de la membrana mitocondrial interna
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AMP	Adenosín monofosfato
AMPK	Proteína quinasa activada por AMP
AMPKK	Proteína quinasa de AMPK
APS	Persulfato amónico
ATP	Adenosín trifosfato
BAY 41-2272	5-Ciclopropil-2-[1-(2-fluorobencil)-1H-pirazolo[3,4-b]piridín-3-il]pirimidín-4-ilamina
BCA	Ácido bicincónico
BH₄	Tetrahidrobiopterina
BSA	Albúmina sérica bovina
CaM	Calmodulina
CcO	Citocromo <i>c</i> oxidasa
cGMP	GMP cíclico
cpm	Cuentas por minuto
CPTIO	2-(4-carboxifenil)-4,4,5,5,-tetrametilimidazolina-1-oxil-3-óxido
DAF-2	Diaminofluoresceína-2
DEA-NO	Dietilamina NONOato
DETA-NO	Dietilentriamina NONOato
DTT	Ditriotreitol
EC₅₀	Concentración de una molécula que activa una enzima al 50%
ECL	Quimioluminiscencia aumentada del luminol
EDRF	Factor relajante derivado del endotelio
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
eNOS	Óxido nítrico sintasa endotelial
ETC	Cadena de transporte electrónico
FAD	Flavín adenín dinucleótido
FCCP	Carbonilcianuro p-(trifluoromeoxi) fenilhidrazona
FCS	Suero fetal de ternera

FMN	Flavín mononucleótido
FRT	Sitio de recombinación por Flp
GMP	Guanosín monofosfato
HbO₂	Oxihemoglobina
HEK	Células humanas embrionarias de riñón
Hepes	Ácido N-2-hidroxiethylpiperacina-N'-2-etanosulfónico
HRP	Peroxidasa de rábano
IBMX	Isobutilmetilxantina
IC₅₀	Concentración de una molécula que inhibe una enzima al 50%
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
<i>J</i>_{O₂}	Flujo de oxígeno
<i>J</i>_{ref}	Flujo de oxígeno medido a concentraciones saturantes de O ₂
<i>K</i>_i	Constante de inhibición
<i>K</i>_m	Constante de Michaelis-Menten
L-arg	L-arginina
Mn-SOD	Superóxido dismutasa con manganeso
mtNOS	Óxido nítrico sintasa mitocondrial
NADPH	Nicotín adenín difosfato
NMDA	N-metil-D-aspartato
nNOS	Óxido nítrico sintasa neuronal
ODQ	1H-[1,2,4] oxadiazolo-[4,3a]quinoxalin-1-uno
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDE 5	Fosfodiesterasa-5
PKA	Proteína quinasa A
PKC	Proteína quinasa C
PKG	Proteína quinasa dependiente de cGMP
pmf	Fuerza protón motriz
PNPP	P-Nitrofenil fosfato
PROLI-NO	Di-sodio 1-[2-(carboxilato) pirrolidín-1-il]diazon-1-ilo-1,2-diolato
PVDF	Polivinilidenofluoruro
RNS	Especies reactivas del nitrógeno

ROS	Especies reactivas del oxígeno
SDS	Dodecil sulfato sódico
S-EITU	S-etilisotiourea
sGC	Guanilato ciclasa soluble
SNAP	S-nitroso-N-acetil-DL-penicilamina
SPER-NO	Espermina NONOato
TEMED	N,N,N,N'-tetrametilnediamina
Tet	Tetraciclina
TPB	Tetrafenil borato
TPMP⁺	Catión de trifenilmetilfosfonio
UCP	Proteína desacoplante
VASP	Fosfoproteína estimulada por vasodilatadores

SUMMARY

Most of the physiological actions of nitric oxide (NO) are mediated by the activation of soluble guanylate cyclase (sGC) and the subsequent increase in cGMP levels. NO also binds to the binuclear centre of cytochrome *c* oxidase (CcO) and inhibits mitochondrial respiration in competition with oxygen and in a reversible manner. Using HEK 293 cells that produce NO endogenously from the inducible isoform of the NO synthase (iNOS) in a controlled manner, we determined the relative sensitivity of sGC and mitochondrial respiration at physiological oxygen concentration (30 μ M). cGMP production was determined by immunoassay and mitochondrial oxygen consumption by high-resolution respirometry. Our results show that the concentration of NO that causes half-activation (EC_{50}) of sGC was approximately 2.9 nM, whereas that required to achieve half-inhibition (IC_{50}) of respiration was 141 nM. In agreement with these data, the NO-cGMP signalling transduction pathway was activated at lower NO concentrations than the AMP-activated protein kinase (AMPK) pathway. We conclude that sGC is approximately 50-fold more sensitive than cellular respiration to endogenous NO under our experimental conditions.

In the second section of this thesis, we performed a detailed study of the oxygen kinetics of cellular respiration in intact cells producing controlled amounts of NO. We determined NO and oxygen concentrations, and mitochondrial oxygen consumption by high-resolution respirometry over a range of oxygen concentrations, down to nanomolar. CcO maintained residual activity up to 2 μ M NO even at low oxygen concentrations. The concentration of NO required to inhibit CcO by 50% (IC_{50}) had an unusual parabolic dependence on oxygen concentration. A kinetic model of CcO inhibition by NO was developed that provided an excellent fit to experimentally determined respiration under hypoxia, and accurately predicted the respiratory responses under hyperoxia. The model takes into account competitive and uncompetitive inhibition by binding of NO to the reduced and oxidized forms of CcO, respectively, and suggests that dissociation of NO from reduced CcO may involve its O_2 -dependent oxidation.

In the last group of experiments, we investigated the effects of physiological NO concentrations (up to 600 nM) on mitochondrial inner membrane proton conductance at an oxygen concentration of 30 μ M. Oxygen consumption and mitochondrial inner membrane potential ($\Delta\psi_m$) were simultaneously determined by high-resolution respirometry and the lipophilic cation [3 H]TPMP $^+$, respectively, in the presence of oligomycin to inhibit ATP synthesis. Membrane potential was progressively decreased by increasing concentrations of rotenone (Complex I inhibitor), and its values were determined from the ratio [3 H]TPMP $^+$ _{matrix}/[3 H]TPMP $^+$ _{cytosol} using the Nernst equation at 37 °C. We conclude that physiological concentrations of endogenous NO inhibit mitochondrial oxygen consumption but do not increase proton conductance.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Descubrimiento del NO

El óxido nítrico (NO) es un radical libre inicialmente conocido por ser un gas tóxico contaminante de la atmósfera. El descubrimiento posterior de que esta molécula desempeñaba un papel importante en la fisiología de los seres vivos permitió dar un gran salto conceptual tanto en la ciencia como la medicina de los últimos 30 años.

En 1980, Furchgott y Zawadzki observaron que las células endoteliales eran indispensables para producir la relajación del músculo liso de arterias tratadas con acetilcolina (Furchgott y Zawadzki, 1980). También comprobaron que la vasodilatación provocada por la bradiquinina, la histamina y el ATP se debía a la liberación de una misma sustancia, que denominaron “factor relajante derivado del endotelio” (*endothelium-derived relaxing factor*, EDRF). No se pudo conocer que el EDRF era en realidad el NO hasta 7 años después (Ignarro *et al.*, 1987; Palmer *et al.*, 1987) tras sugerirse que el EDRF debía ser un nitrovasodilatador endógeno (Murad, 1986). En 1982, antes de la caracterización del EDRF, se identificó que la L-arginina era el activador endógeno de la guanilato ciclasa soluble (sGC) en células de neuroblastoma (Deguchi y Yoshioka, 1982), y posteriormente se comprobó que en el sistema nervioso central se formaba NO a partir de la L-arginina (Knowles *et al.*, 1989). En otro estudio contemporáneo se demostró que, en los ratones de tipo silvestre C3H/He que sufrían procesos infecciosos, había un aumento de los niveles de nitratos presentes en la orina. Sin embargo, en los ratones C3H/HeJ, que poseen una alteración genética que provoca la resistencia de los macrófagos a la endotoxina, no se observaba este aumento (Stuehr y Marletta, 1985). Gracias a este modelo se pudo identificar al NO como la molécula intermedia en la producción de nitratos/nitritos a partir de la L-arginina.

Todas estas observaciones llevaron a la caracterización del NO como un agente fundamental en la fisiología de los mamíferos. La importancia de estos descubrimientos fue reconocida en 1998, al otorgar el Premio Nobel de Medicina y Fisiología a R. Furchgott, L. Ignarro y F. Murad por sus contribuciones al descubrimiento y modo de acción del NO.

1.2. Producción celular del NO: las NO sintasas

El NO es producido en las células por las enzimas óxido nítrico sintasas (NOS), (Alderton *et al.*, 2001), que son activas en forma homodimérica. Cada dímero está compuesto fundamentalmente por dos dominios: el dominio N-terminal oxigenasa y el C-terminal reductasa (Figura 1.1), que se encuentran separados por un lugar de unión al Ca^{2+} /Calmodulina (CaM). El aminoácido L-arginina es el agonista natural de estas proteínas, que es oxidado en el centro activo de la enzima para dar lugar a L-citrulina y NO. Esta reacción transcurre en dos etapas, con la formación del intermediario N^{O} -hidroxi-L-arginina, siendo necesaria la presencia del NADPH (nicotinamida-adenina dinucleótido fosfato), el O_2 , y los cofactores BH_4 (tetrahidrobiopterina), FMN (flavín mononucleótido) y FAD (flavín adenín dinucleótido). El flujo de electrones a través del dominio reductasa requiere la presencia de Ca^{2+} /CaM.

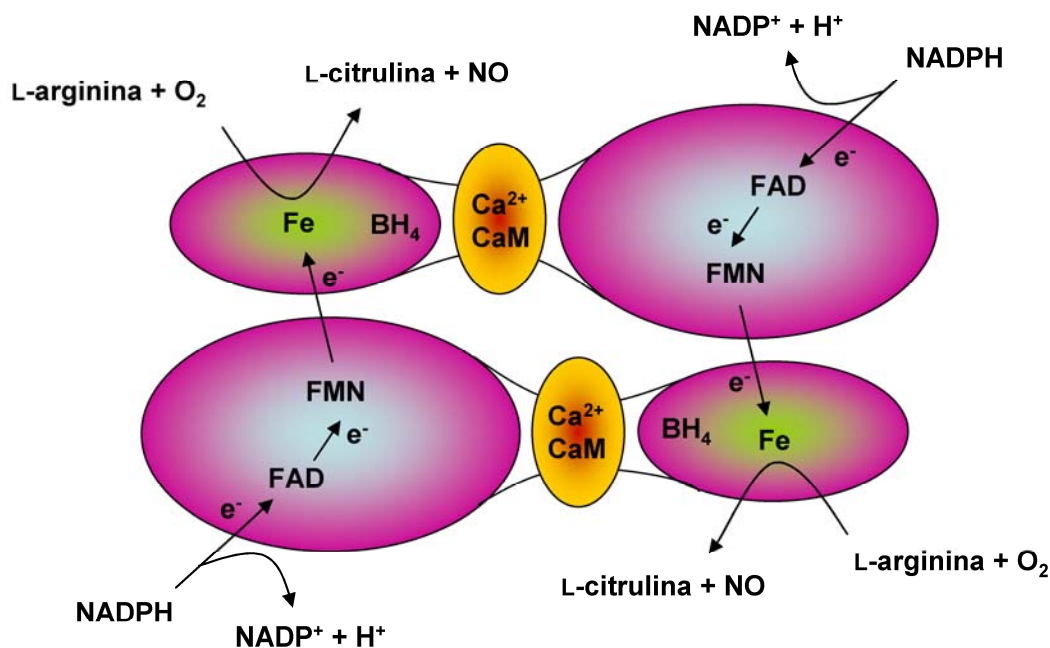


Figura 1.1. Síntesis celular de NO catalizada por las NOS y sus cofactores

Los electrones (e^-) son donados desde el NADPH al dominio reductasa de la enzima y son transportados a través de los centros redox FAD y FMN hasta el dominio oxigenasa del monómero adyacente. En este dominio se encuentra el centro activo de la enzima, en donde los e^- interactúan con el Fe del grupo hemo y con el cofactor BH_4 , catalizando la conversión de los sustratos L-arginina y O_2 a L-citrulina y NO. El transporte electrónico requiere la presencia de Ca^+ /CaM unido a cada uno de los monómeros de las NOS.

Se han identificado tres isoformas de las NOS, con una homología de entre el 51-57%, en el caso de las isoformas humanas (Figura 1.2) (Alderton *et al.*, 2001). La primera que se descubrió fue la NOS-I o nNOS (neuronal) (Bredt y Snyder, 1990): su nombre procede de su descubrimiento en el cerebelo de rata y es la isoforma predominante en el sistema nervioso. Posteriormente se caracterizó la NOS-II o iNOS (inducible) (Stuehr *et al.*, 1990; Yui *et al.*, 1991): esta isoforma está presente en un gran número de tejidos y se la denominó así por ser inducible mediante estímulos proinflamatorios. La última en ser descubierta fue la NOS-III o eNOS (endotelial) (Pollock *et al.*, 1991) caracterizada por primera vez en células endoteliales. Estas tres isoformas están codificadas por genes diferentes y tienen diferente localización, regulación, propiedades catalíticas y sensibilidad a los inhibidores.

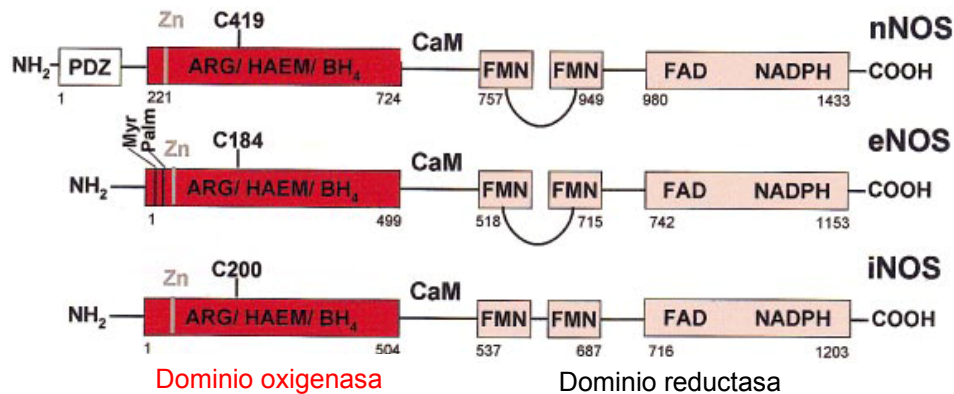


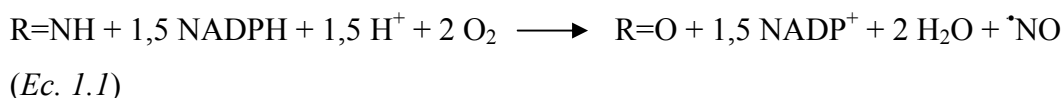
Figura 1.2. Estructura de la cadena polipeptídica de la nNOS, la eNOS y la iNOS

Se resaltan en recuadros el dominio oxigenasa, el dominio reductasa y el dominio PDZ. También se muestra la cisteína de unión del grupo hemo, el lugar de unión de la calmodulina y los sitios de miristoilación (Myr) y de palmitoilación (Palm) de la eNOS. Modificado de Alderton y col. (2004). PDZ, PSD-95 discs large/ZO-1 homology.

Estas isoformas se han clasificado por sus diferencias en el tipo de expresión (la nNOS y la eNOS son constitutivas mientras que la iNOS es inducible), y su dependencia de activación por la señalización a través de Ca^{2+} (la nNOS y la eNOS son dependientes mientras que la iNOS es independiente). Sin embargo, en la actualidad se sabe que estas características no son identificativas de cada isoforma: la expresión de las isoformas constitutivas puede ser inducida por diferentes estímulos (Forstermann *et al.*, 1998) y las tres se pueden expresar de manera constitutiva en ciertas células o tejidos. También pueden existir diferencias en la dependencia de estas isoformas por el Ca^{2+} según la especie animal (Shirato *et al.*, 1998). Además, se ha sugerido que las tres isoformas pueden encontrarse en el citoplasma o en compartimentos subcelulares (Oess

et al., 2006). Finalmente, se están descubriendo variantes de transcripción genómica (*splicing*) que pudieran dar lugar a otras isoformas, como la NOS mitocondrial (mtNOS). Aunque la naturaleza de esta isoforma aún es controvertida (Ghafourifar y Cadenas, 2005; Lacza *et al.*, 2006), su presencia podría ser clave en la regulación de la respiración mitocondrial por el NO, ya que permitiría localizar la síntesis de NO exactamente en el lugar en donde realizaría su función.

La estequiometría de la producción de NO por las NOS es:



donde R=NH es L-arginina y R=O es L-citrulina.

Las concentraciones de NO determinadas en diferentes modelos experimentales se encuentran entre 0,01-5 μM (Brown, 1995; Hall y Garthwaite, 2009). Multitud de tipos celulares expresan la iNOS y producen niveles de NO altos cuando se activan por la endotoxina o por citoquinas proinflamatorias como, por ejemplo, el interferón γ . Se ha comprobado que los astrocitos activados por endotoxina producen hasta 1 μM de NO detectado en el medio y que esta producción de NO hace que el consumo de O_2 de estas células disminuya hasta la mitad, en relación con las células no activadas (Brown *et al.*, 1995).

Aunque el NO es el producto principal de las NOS, estas enzimas pueden producir superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) (Xia, 2007). Las NOS también sintetizan el anión nitroxilo (NO^-) cuando existe una limitación del cofactor BH_4 y del sustrato L-arginina (Rusche *et al.*, 1998). El hecho de que el NO^- pueda ser producido endógenamente, unido a su gran potencial terapéutico, podría tener una gran relevancia en el tratamiento de las enfermedades cardiovasculares (Irvine *et al.*, 2008).

1.3. Degradación del NO

Para que el NO pueda ser un mensajero eficaz es necesaria la presencia de mecanismos de eliminación que regulen la concentración de NO en el organismo. Las mitocondrias aisladas son capaces de consumir NO. Inicialmente se observó que se produce un aumento en el consumo de NO al añadir un sustrato respiratorio a las mitocondrias (Poderoso *et al.*, 1996). Este consumo es revertido parcialmente al añadir la enzima superóxido dismutasa (SOD), lo que indica que el NO está reaccionando con el radical superóxido (O_2^{\bullet}) para formar peroxinitrito ($ONOO^-$). El NO es consumido en las mitocondrias en parte debido a la reacción del NO con la CcO (Borutaite y Brown, 1996; Sarti *et al.*, 2000; Torres *et al.*, 2000) y en parte debido a la reacción del NO con el O_2 en las membranas (Shiva *et al.*, 2001). El NO interacciona con la hemoglobina en los eritrocitos, dando lugar a nitrosilhemoglobina y NO_3^- (Beckman y Koppenol, 1996). También se ha observado que las células cerebelares poseen un mecanismo de eliminación de NO que permiten mantener los niveles de NO (20 nM) en valores lo suficientemente bajos para no afectar a la respiración mitocondrial. La pérdida de este mecanismo de regulación puede derivar en la toxicidad que el NO produce en las células (Griffiths y Garthwaite, 2001; Hall y Garthwaite, 2006).

1.4. Especies reactivas del nitrógeno (RNS)

El NO es una molécula relativamente inerte que puede unirse con gran afinidad al hierro en estado ferroso (Fe^{2+}), tanto en forma libre, como el presente en los centros de hierro-azufre (Fe-S) o en los grupos hemo de proteínas como la sGC, la hemoglobina, la catalasa y la citocromo *c* oxidasa (CcO) (Brown, 2001). Además, el NO puede dar lugar a una serie de moléculas con mayor reactividad, denominadas genéricamente como especies reactivas del nitrógeno (*reactive nitrogen species*, RNS). Cuando el NO está presente a concentraciones altas, reacciona rápidamente con el O_2 , produciendo dióxido de nitrógeno (NO_2). El NO_2 puede interaccionar con una gran variedad de proteínas, añadiendo un catión nitrilo (NO_2^+) a uno de sus aminoácidos (nitración). El NO_2 también puede reaccionar con otra molécula de NO para formar trióxido de dinitrógeno (N_2O_3). El N_2O_3 puede reaccionar con tioles y aminas, añadiéndoles un catión nitroxilo (NO^+) a su estructura (nitrosilación). Este grupo NO^+ se puede transferir entre diferentes S-nitrosotioles (RNSO) en un proceso conocido como transnitrosilación (Martinez-Ruiz y Lamas, 2009). De este modo se podría regular la funcionalidad de las enzimas

susceptibles a través de su nitrosilación de manera reversible, como es el caso de la NADH deshidrogenasa.

Aproximadamente el 1% del O₂ consumido por la cadena de transporte electrónico (ETC) no llega a ser reducido a H₂O por la CcO, sino que se convierte en O₂^{•-} (Cadenas *et al.*, 1977). A pesar de que existen en las células diversos mecanismos de defensa frente a este radical, como la superóxido dismutasa (SOD), con constantes de velocidad de reacción altas (Zou y Skeel, 2003), que permiten la eliminación de grandes cantidades de O₂^{•-}, la constante de velocidad de reacción no enzimática entre el NO y el O₂^{•-} es aproximadamente cuatro veces mayor que la de estas enzimas, dando lugar a la formación de grandes cantidades de ONOO⁻ en la mitocondria.

1.4.1. NO, RNS y mitocondria

El NO y las RNS tienen un papel fundamental en la fisiopatología de la mitocondria. El NO puede inhibir la respiración mitocondrial a través de la inhibición de la CcO. Esta inhibición es rápida y reversible, y es detectable a concentraciones bajas de NO (nM) (detallada en el apartado 1.5.2 de la Introducción). También existe una inhibición irreversible de la ETC que se produce cuando las concentraciones de NO son mayores (μM) y durante exposiciones prolongadas al NO (Sarti *et al.*, 2000). Este tipo de inhibición es debido posiblemente a la formación de RNS a partir del NO, que pueden inhibir a la ETC en el Complejo I y III (Pearce *et al.*, 2005) y el Complejo IV (CcO) (Parihar *et al.*, 2008) de la ETC. Las RNS también pueden inhibir a la ATP sintasa (Radi *et al.*, 1994), la aconitasa (Castro *et al.*, 1998), la Mn-SOD (Seo *et al.*, 1995) y la creatín-quinasa (Konorev *et al.*, 1998). Adicionalmente, pueden causar daño en el ADN mitocondrial (Cover *et al.*, 2005), inducir la peroxidación lipídica (Gadelha *et al.*, 1997) y aumentar la conductancia de la membrana mitocondrial interna a los protones (Brookes *et al.*, 1998).

Además, el NO es un agente relacionado con la biogénesis mitocondrial. El NO provoca un aumento de las proteínas mitocondriales y del ADN mitocondrial en adipocitos del tejido adiposo marrón, células HeLa, células 3T3-L1 y células U937 en cultivo (Nisoli *et al.*, 2003). Este efecto del NO es dependiente del cGMP y está mediado por la inducción de PGC-1α (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 alpha*)

1.5. Efectos fisiológicos del NO en las células

1.5.1. Activación de la sGC por el NO

La guanilato ciclasa soluble (sGC) se encuentra en el citoplasma de la mayoría de los tipos celulares y su activación da lugar a múltiples e importantes efectos fisiológicos, revisado en (Lucas *et al.*, 2000):

- La relajación del músculo liso (Ignarro *et al.*, 1987)
- La inhibición de la agregación plaquetaria (Radomski *et al.*, 1987)
- La neurotransmisión (Garthwaite *et al.*, 1988)
- La activación de canales iónicos dependientes de nucleótidos cíclicos (Fesenko *et al.*, 1985)

La sGC es un heterodímero constituido por una subunidad α y una subunidad β , ambas necesarias para la actividad catalítica de la enzima. Contiene un grupo hemo ligado a la subunidad β , donde el NO interacciona provocando un cambio conformacional en la sGC, que pasa a ser catalíticamente activa y, de este modo, desencadena la producción de cGMP a partir de GTP (Poulos, 2006). El monóxido de carbono (CO) puede unirse al grupo hemo de esta enzima, aunque la capacidad de activarla es de 2 a 4 veces menor que la del NO, y las concentraciones de CO necesarias para activarla son mucho mayores (μM) que las de NO (nM) (Brune y Ullrich, 1987). Otros compuestos capaces de unirse a la sGC, bien de manera dependiente o independiente del grupo hemo, pueden activar o inhibir a la enzima. El inhibidor ODQ (1H-[1,2,4] oxadiazolo-[4,3a]quinoxalin-1-uno) actúa sobre el grupo hemo, oxidando el Fe^{2+} a Fe^{3+} e impidiendo la activación por el NO (Garthwaite *et al.*, 1995). La inhibición de la sGC por el ODQ es competitiva con el NO (Schrammel *et al.*, 1996). También se ha estudiado al ATP como posible inhibidor de la sGC (Suzuki *et al.*, 2001; Ruiz-Stewart *et al.*, 2004). El activador BAY 41-2272 es capaz de activar a la sGC de manera independiente del NO y dependiente del grupo hemo (Stasch y Hobbs, 2009). El sitio de interacción del BAY 41-2272 se encuentra en las Cys²³⁸ y Cys²⁴³ de la subunidad α de la sGC (Stasch *et al.*, 2001). Otro activador de la sGC ampliamente utilizado menos potente que el BAY 41-2272, independiente del NO y dependiente del grupo hemo, es el YC-1 (Ko *et al.*, 1994).

Inicialmente se pensaba que la activación de la sGC por el NO seguía un mecanismo simple de activación-desactivación, en el cual se produce un cambio conformacional en la estructura de la proteína tras la unión del NO al grupo hemo (Stone *et al.*, 1995; Zhao *et al.*, 1999). En la actualidad se han propuesto la existencia de dos tipos de activación de la sGC: una activación basal prolongada y una activación total transitoria. Para que se puedan producir estos dos tipos de activación se requiere que el NO pueda unirse al grupo hemo de la sGC y, además, exista otro lugar de unión para el NO diferente del grupo hemo (Russwurm y Koesling, 2004; Cary *et al.*, 2005).

Adicionalmente se pueden producir modificaciones post-traduccionales en la sGC, como la S-nitrosilación (Sayed *et al.*, 2008; Mayer *et al.*, 2009) o la fosforilación por la proteína quinasa dependiente de cGMP (PKG) (Zhou *et al.*, 2008) que provocarían una disminución en la sensibilidad de la sGC por el NO (desensibilización).

1.5.2. Inhibición de la CcO por el NO

El NO ejerce un efecto inhibitor sobre el aceptor final de electrones de la ETC mitocondrial, la CcO, de manera reversible y competitiva con el O₂ (Brown y Cooper, 1994; Cleeter *et al.*, 1994). Esta inhibición ocurre a concentraciones de NO en el rango nM, por lo que se ha sugerido que el NO endógeno actúa como un regulador fisiológico de la respiración mitocondrial. El hecho de que el NO pueda interactuar con proteínas que habitualmente utilizan O₂ abre la posibilidad de que el NO sea un modulador de los procesos celulares sensibles al O₂ (Moncada y Erusalimsky, 2002; Shiva *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2005).

El centro activo de la CcO está compuesto por un grupo hemo a_3 y un átomo de cobre Cu_B. El O₂ puede unirse al centro activo solamente cuando ambos están reducidos (hemo a_3^{2+} y Cu_B⁺). Sin embargo, el NO puede unirse tanto al grupo hemo a_3 reducido como al átomo Cu_B oxidado (Mason *et al.*, 2006). Así, el NO inhibe a la CcO mediante dos mecanismos diferentes, en los que el NO se une a diferentes átomos del centro activo de la CcO. Ambas formas de inhibición son rápidas y reversibles. La primera forma de inhibición es competitiva con el O₂ y puede ser revertida tras la aplicación de luz, mientras que la segunda no (Borutaite *et al.*, 2000; Sarti *et al.*, 2000). Ambos tipos de inhibición pueden ocurrir de manera simultánea, al menos *in vitro*, pero el primero sería el predominante cuando la CcO estuviera reducida y la concentración de O₂ fuera

baja, mientras que el segundo ocurriría en las condiciones opuestas (Mason *et al.*, 2006). La inhibición de la respiración mitocondrial por el NO está relacionada con un amplio espectro de procesos fisiológicos, revisados en (Erusalimsky y Moncada, 2007):

- La regulación de la afinidad de la CcO por el O₂ (Brown, 1995)
- El control de la generación de superóxido y peróxido de hidrógeno en la mitocondria (Poderoso *et al.*, 1996)
- La activación del factor inducible por hipoxia (HIF) (Hagen *et al.*, 2003)
- La activación de la proteína quinasa activada por AMP (AMPK) (Almeida *et al.*, 2004)
- La regulación de la distribución de O₂ en los tejidos (Thomas *et al.*, 2001)
- La modulación de la señalización mediada por calcio en el cerebro (Xu *et al.*, 2004)

Además de estos procesos, también se han descrito situaciones patológicas en las que la inhibición de la CcO por el NO estaría implicada, como el shock séptico y la neurodegeneración (Brealey *et al.*, 2002; Moncada y Bolanos, 2006). Una inhibición prolongada de la CcO podría tener repercusiones patológicas al limitar la producción de ATP, o al aumentar la producción de las especies reactivas del O₂ (*reactive oxygen species*, ROS), que están involucradas en patologías tales como la aterosclerosis, el infarto de miocardio y la miocarditis, entre otras (Elahi y Matata, 2006; Landmesser *et al.*, 2006). Se ha descrito que las concentraciones altas de NO causan una disminución irreversible de la afinidad de la CcO por el O₂ (Cooper *et al.*, 2003).

1.5.3. Sensibilidad relativa de la sGC y la CcO al NO

Existen numerosos estudios en los que se ha determinado la sensibilidad de la sGC y la CcO al NO. Estos estudios presentan una gran heterogeneidad en cuanto a las concentraciones de O₂ a las que se han realizado las medidas, el origen de la muestra en que se han realizado las determinaciones y las fuentes de NO utilizadas. Además, tan sólo se ha realizado un estudio (Griffiths y Garthwaite, 2001) en el que se ha determinado conjuntamente en el mismo modelo la sensibilidad de ambas enzimas.

1.5.3.1. Sensibilidad de la sGC al NO

En los estudios realizados sobre la sensibilidad de la sGC al NO, los valores de EC_{50} (concentración de NO que activa a la enzima al 50%) determinados han sido muy variables. Así, se han hallado valores de EC_{50} superiores a 500 nM (Russwurm *et al.*, 1998) e inferiores a 1,5 nM (Gibb *et al.*, 2003; Wykes y Garthwaite, 2004; Roy *et al.*, 2008). Inicialmente se utilizó la enzima purificada, en condiciones alejadas de un entorno fisiológico. De este modo, Stone y Marletta (1996) realizaron sus determinaciones a una temperatura de 10 °C, lo que puede explicar el valor alto de EC_{50} obtenido (250 nM). De hecho, los mismos autores habían observado en experimentos anteriores realizados a 37 °C con la enzima purificada una producción de cGMP mayor a la obtenida cuando realizaron los experimentos a 10 °C (Stone y Marletta, 1995). En otro trabajo, utilizando una enzima recombinante y purificada se obtuvieron a 37 °C unos valores de EC_{50} muy altos en comparación con el resto de trabajos (< 500 nM) (Russwurm *et al.*, 1998). En el estudio realizado por Bellamy y col. (2000) se determinaron unos valores de EC_{50} (20 nM) sensiblemente inferiores a los obtenidos hasta entonces, en suspensiones celulares de cerebelo de rata. Utilizando el mismo modelo pero una fuente de NO diferente ($K_2Ru(NO)Cl_5$), Bellamy y Garthwaite (2001) determinaron unos valores de EC_{50} de entre 20-45 μ M.

Más recientemente se han determinado, en general, valores de EC_{50} inferiores (1 nM-3,9 nM NO) (Tabla 1.1). En algunos estudios anteriores se asumía que las concentraciones del donador de NO se correspondían a las concentraciones de NO liberadas. La utilización de electrodos de NO permite determinar la concentración real de NO que es liberada al medio. En un estudio se utilizó una suspensión celular a partir de cerebelo de rata en agitación constante a 37 °C (Griffiths y Garthwaite, 2001) y se generó el NO a partir de DETA-NO. La suspensión contenía eritrocitos procedentes de la preparación de la muestra, que consumen el NO en el medio. En este estudio obtuvieron un valor de EC_{50} de 2 nM (Gibb *et al.*, 2003). La utilización de eritrocitos como sumidero de NO presenta algunos inconvenientes, como la posibilidad de rotura de los eritrocitos, con la consecuente liberación de hemoglobina y de otras moléculas que pueden interferir en los resultados. Dadas estas limitaciones, estos autores realizaron un nuevo trabajo utilizando como donador de NO el SPER-NO y un sumidero químico de NO (2-(4-carboxifenil)-4,4,5,5,-tetrametilimidazolina-1-oxil-3-óxido, CPTIO), de

manera que se obtuvieran concentraciones de NO constantes y prolongadas (Griffiths *et al.*, 2003). El valor de EC₅₀ obtenido fue similar (1,7 nM).

Los valores de EC₅₀ determinados en todos estos estudios están recogidos en la Tabla 1.1.

Referencia	sGC		
	EC ₅₀ (nM NO)	Origen	Fuente de NO
Stone y Marletta (1996)	250	Enzima purificada de pulmón de vaca	Gas NO 99%
Russwurm <i>et al.</i> (1998)	690, α 1 β 1 510, α 2 β 1	Enzima recombinante purificada	DEA-NO
Bellamy <i>et al.</i> (2000)	20	Extractos de cerebelo de rata	DEA-NO
Bellamy y Garthwaite (2001)	20 – 45	Extractos de cerebelo de rata	K ₂ Ru(NO)Cl ₅
Griffiths y Garthwaite (2001)	2	Extractos de cerebelo de rata	DETA-NO
Bellamy <i>et al.</i> (2002)	3,9	Enzima purificada (Alexis)	DETA-NO
Griffiths <i>et al.</i> (2003)	1,7	Enzima purificada de pulmón de vaca	SPER-NO
Gibb <i>et al.</i> (2003)	1,2; α 1 β 1 2,2; α 2 β 1	Enzima recombinante expresada en células COS-7	DETA-NO
Wykes y Garthwaite (2004)	1	Extractos de cerebelo de rata y plaquetas	SPER-NO
Roy <i>et al.</i> (2008)	1,03; GTP 1 mM 1,62; GTP 100 μ M	Enzima purificada de pulmón de vaca	SPER-NO
Halvey <i>et al.</i> (2009)	10 – 20	Plaquetas de rata	SPER-NO

Tabla 1.1. Sensibilidad de la sGC por el NO

La tabla recoge los valores de EC₅₀ de la sGC por el NO publicados. También se muestra el modelo utilizado para realizar la medida y la fuente de NO utilizada.

1.5.3.2. Sensibilidad de la CcO al NO

El NO inhibe a la CcO compitiendo con el O₂ por el centro activo de la enzima, por lo que diferentes concentraciones de O₂ dan lugar a diferentes valores de IC₅₀ (concentración de NO que inhibe a la enzima al 50%). Por tanto, para poder comparar los valores de IC₅₀ obtenidos, es importante conocer la concentración de O₂ a la que se llevaron a cabo los experimentos.

Existe una gran heterogeneidad en los valores de IC₅₀ obtenidos en los diferentes estudios (11-1170 nM), en parte debido a que las concentraciones de O₂ utilizadas en el momento de realizar las medidas (20-180 μM) también difieren de unos trabajos a otros. Brown y Cooper (1994) fueron los pioneros en determinar el valor de IC₅₀ de la CcO para el NO: para ello utilizaron agua destilada saturada con NO y realizaron las medidas en sinaptosomas de cerebelo de rata a 25 °C con un electrodo de NO y un electrodo de O₂ de tipo Clark, obteniendo unos valores de IC₅₀ de 270 y 60 nM a unas concentraciones de O₂ de 145 y 30 μM, respectivamente. Borutaite y Brown (1996) realizaron las medidas en mitocondrias de corazón de rata aisladas a 37° C, obteniendo unos valores de IC₅₀ de 570 y 180 nM a unas concentraciones de O₂ de 147 y 58 μM, respectivamente. Koivisto y col. (1997) determinaron por primera vez la dependencia del valor de IC₅₀ en función de la concentración de O₂ utilizando mitocondrias aisladas de tejido adiposo marrón y una fuente externa de NO. Esta dependencia no era lineal. Posteriormente, Mason y col. (2006) obtuvieron unos valores de IC₅₀ de 84 nM cuando el valor de recambio electrónico (*turnover*) de la CcO era alto, y de 1170 nM cuando éste era bajo, ambos a una concentración de O₂ de 150 μM (Mason *et al.*, 2006). También determinaron que la dependencia del valor de IC₅₀ en función de la concentración de O₂ seguía una relación no lineal. En otros trabajos se han utilizado células intactas en lugar de mitocondrias aisladas o enzimas purificadas, obteniendo unos valores de IC₅₀ de 120 nM a una concentración de O₂ de ~120 μM (Griffiths y Garthwaite, 2001) y una IC₅₀ de 120 nM a una concentración de O₂ de ~25 μM (Bellamy *et al.*, 2002).

Los valores de IC₅₀ determinados en todos estos estudios están recogidos en la Tabla 1.2.

Referencia	CcO			
	IC ₅₀ (nM NO)	[O ₂] (μM)	Origen	Fuente de NO
Brown y Cooper (1994)	270 60	~145 ~30	Sinaptosomas de cerebro de rata	H ₂ O saturada con NO
Torres <i>et al.</i> (1995)	650	50	Enzima purificada de corazón de vaca	H ₂ O saturada con NO
Borutaite y Brown (1996)	570 180	~147 ~58	Mitocondrias aisladas de corazón de rata	H ₂ O saturada con NO
Lizasoain <i>et al.</i> (1996)	600	50	Mitocondrias aisladas de cerebro de rata	SIN-1 + SOD
Koivisto <i>et al.</i> (1997)	11 41 69 148 364	32 49 72 119 180	Mitocondrias aisladas de tejido adiposo marrón de rata	H ₂ O saturada con NO
Griffiths y Garthwaite (2001)	120	~120	Extractos de cerebelo de rata	PROLI-NO
Bellamy <i>et al.</i> (2002)	120	~25	Extractos de cerebelo de rata	DETA-NO
Brookes <i>et al.</i> (2003)	140	~5	Mitocondria aislada de hígado de rata	H ₂ O saturada con NO
Mason <i>et al.</i> (2006)	84; <i>Low Turnover</i> 1170; <i>High Turnover</i>	150	Enzima purificada de corazón de vaca	PROLI-NO

Tabla 1.2. Sensibilidad de la CcO por el NO

La tabla recoge los valores de IC₅₀ de la CcO por el NO publicados. También se muestra el modelo utilizado para realizar la medida, la fuente de NO utilizada y la concentración de O₂ a la que se llevaron a cabo las determinaciones.

1.6. Modelos cinéticos de inhibición de la respiración mitocondrial por el NO

Se han propuesto diferentes modelos cinéticos de inhibición de la respiración mitocondrial por el NO. La mayoría de estos modelos han sido desarrollados a partir de datos obtenidos *in vitro*, con la CcO purificada y utilizando donadores de NO exógenos. Antunes y col. (2004) desarrollaron un modelo basado en la suposición de que el centro activo de la CcO sólo presentaba un lugar de unión en el grupo hemo *a*₃ para el NO y el O₂, por lo que el mecanismo de inhibición sería puramente competitivo. Este modelo predice que el NO sería un inhibidor de la CcO poco eficiente cuando la tasa de consumo de O₂ fuera baja (valor de *turnover* o recambio electrónico bajo) (Figura 1.3).

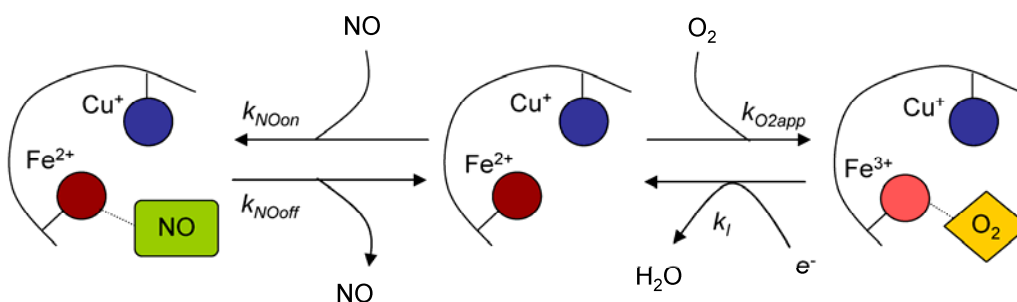


Figura 1.3. Modelo de inhibición competitiva pura de la CcO por el NO

En la figura se representa el centro activo de la CcO que contiene el átomo de hierro del grupo hemo a_3 y el átomo de cobre Cu_B . El NO inhibe de manera competitiva la unión del O_2 al Fe^{3+} para reducirse a H_2O . k_{NOon} , k_{NOoff} , k_{O_2app} y k_i representan las constantes de velocidad de cada una de las reacciones. Figura adaptada de (Antunes *et al.*, 2004).

Posteriormente se propuso un modelo que consideraba que la inhibición de la CcO por el NO se pudiera producir a través de la unión del NO al centro catalítico en dos sitios diferentes: el grupo hemo a_3 , al igual que en el modelo anterior, y el átomo de cobre Cu_B , al que podría unirse el NO con menor afinidad que al grupo hemo y de manera no competitiva con el O_2 (Mason *et al.*, 2006) (Figura 1.4 A). En este modelo, la inhibición de la CcO por el NO depende directamente del valor de recambio electrónico (*turnover*) de la enzima. Cuando estos valores son altos, la CcO se encuentra reducida, lo que permite la competencia del O_2 y el NO en su unión al centro activo de la CcO. Cuando los valores de *turnover* son bajos, el grupo hemo a_3 de la CcO se encuentra oxidado, por lo que se favorece la unión del NO al Cu_B de manera no competitiva con el O_2 . En la Figura 1.5 se pueden observar el ajuste de ambos modelos a los datos obtenidos por Mason y col. (2006). El modelo de inhibición competitiva pura se ajusta bien cuando el valor de *turnover* es alto, lo que se corresponde con la CcO totalmente reducida. Sin embargo, con valores de *turnover* menores, cuando la CcO no está totalmente reducida, este modelo no puede describir los datos experimentales (Figura 1.5 A). El modelo de Mason y col (2006) incorpora la posibilidad de que el NO inhiba a la CcO a través de su unión al átomo Cu_B de forma no competitiva. De este modo se pueden explicar de manera convincente los resultados experimentales en todo el rango de concentraciones de O_2 y valores de recambio electrónico (Figura 1.5 B). Este modelo también predice que el NO podría ser un inhibidor más eficiente de lo que propondría el modelo de inhibición competitiva pura, cuando la tasa de consumo de O_2 es baja.

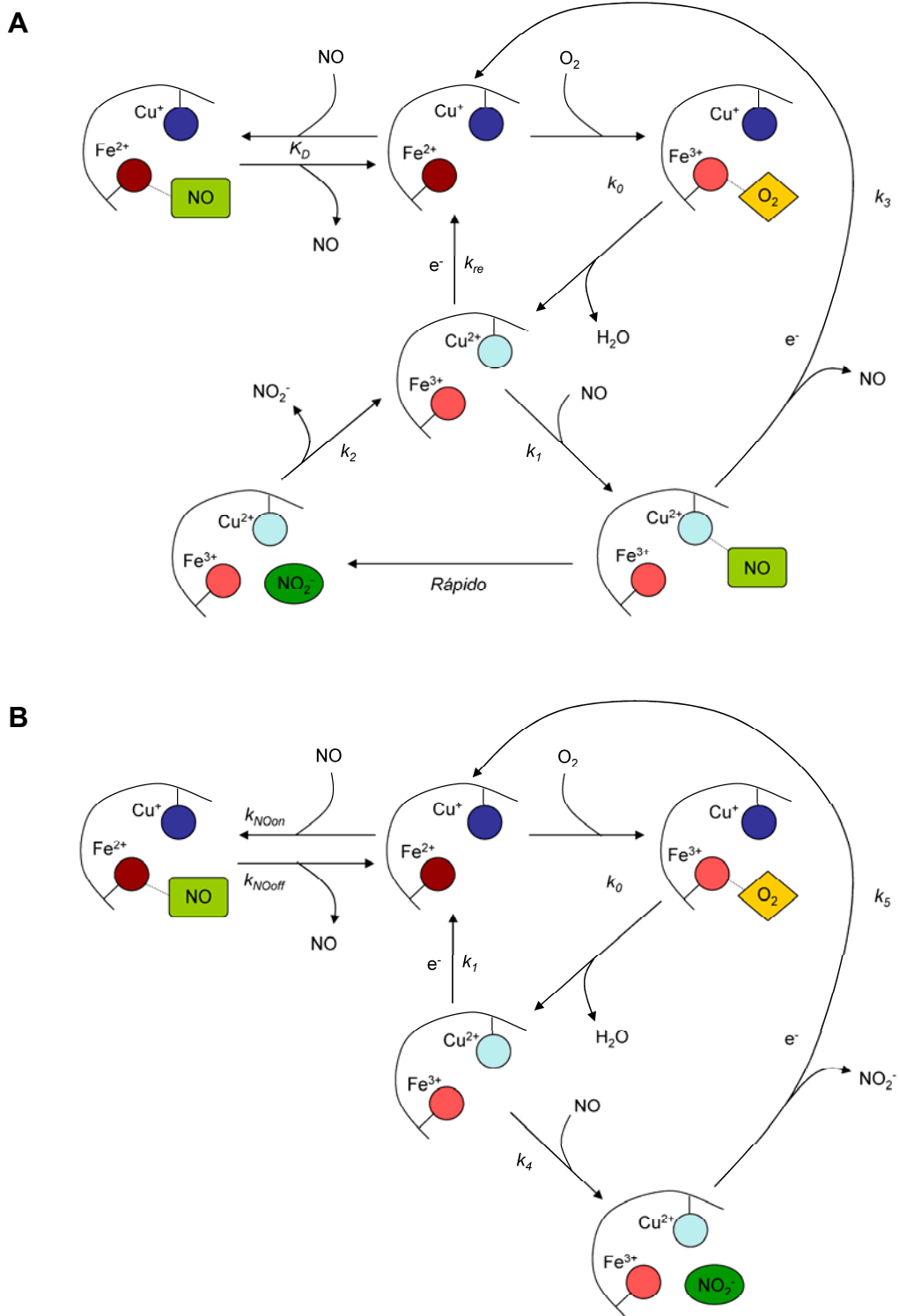


Figura 1.4. Modelo de inhibición competitiva y no competitiva de la CcO por el NO

(A) Modelo simplificado del presentado por Mason y col. (2006). En este modelo cinético existe un componente de inhibición competitiva pura, cuando el centro activo se encuentra totalmente reducido, y un componente de inhibición no competitiva cuando el NO se une al átomo de cobre oxidado. (B) Modelo simplificado del presentado por Antunes y col. (2007), similar al anterior pero en el que no se contempla la reversibilidad de la unión del NO al átomo de cobre oxidado. K_D representa el valor de la K_m para el NO de la CcO reducida; k_{NOon} , k_{NOoff} , k_r , k_e , k_0 , k_1 , k_2 , k_3 , k_4 y k_5 representan las constantes de velocidad de cada una de las reacciones. Figuras adaptadas de (Cooper *et al.*, 2008).

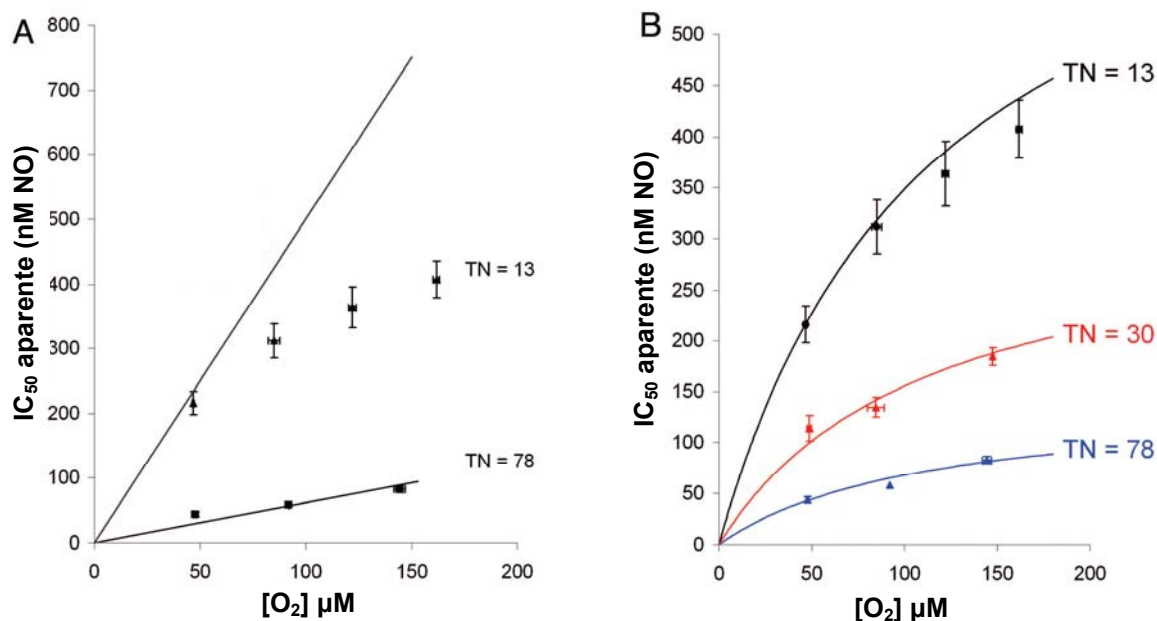


Figura 1.5. Valor de IC_{50} aparente en función de la concentración de O_2 con diferentes valores de *turnover*. Los datos experimentales (puntos) se ajustaron según Antunes y col. (2004) (A) o Mason y col. (2006) (B). Figura adaptada de (Mason *et al.*, 2006). TN, turnover ($e \cdot s^{-1} \cdot aa_3^{-1}$).

Recientemente, Antunes y col. (2007) desarrollaron un modelo de inhibición competitiva y no competitiva (Figura 1.4 B), que podía describir con mayor precisión sus datos experimentales. En este modelo la CcO puede interactuar con el NO cuando ha aceptado los electrones desde el citocromo *c*, pero aún no han sido transferidos desde el grupo hemo *a* hasta el centro activo de la CcO. Se ha sugerido que la presencia de una pequeña cantidad de CcO oxidada unida al NO, que tiene un impacto mínimo en la inhibición de la respiración, podría tener un papel de señalización o detoxificación, mediante la conversión de NO a NO_2^- , al reducir la concentración de NO disponible para inhibir la respiración mitocondrial o disminuir la formación de $O_2^{\cdot -}$ y $ONOO^-$ (Palacios-Callender *et al.*, 2004).

1.7. Vías de señalización mediadas por la interacción del NO con la sGC y la CcO

1.7.1. Proteína quinasa dependiente de cGMP (PKG) y fosfoproteína estimulada por vasodilatadores (VASP)

Una de las principales dianas del segundo mensajero cGMP es la proteína quinasa dependiente de cGMP (PKG), una serina/treonina proteína quinasa. Existen dos genes que codifican las isoformas de PKG, PKGI α , PKGI β y PKGII (Orstavik *et al.*, 1997; Witczak *et al.*, 1998). PKGI α se expresa en el cerebelo, el ganglio espinal y el pulmón, mientras que PKGI β se expresa fundamentalmente en el músculo liso, las plaquetas, el hipocampo y el bulbo olfatorio. PKGII se localiza en la membrana plasmática de las células de la mucosa intestinal, el riñón y los condrocitos.

La proteína PKG es esencial para el funcionamiento correcto de la musculatura lisa en el organismo. Es la responsable de su relajación mediante la fosforilación de diversas proteínas, como el receptor del inositol 1,4,5-trifosfato dependiente de PKG (IRAG) (Schlossmann *et al.*, 2000), la fosforilación del canal de potasio activado por Ca²⁺ (BK_{Ca}) (Sausbier *et al.*, 2000) y la fosforilación de la miosina fosfatasa (Wooldridge *et al.*, 2004), entre otras. PKG también inhibe la agregación plaquetaria, posiblemente disminuyendo la concentración intracelular de Ca²⁺ por la fosforilación de IRAG (Schlossmann *et al.*, 2000). También puede fosforilar al receptor α del tromboxano (TP α) provocando su desensibilización (Reid y Kinsella, 2003). Además, PKG fosforila a la proteína VASP, que es fundamental para impedir la adhesión de las plaquetas a la pared vascular mediante la regulación de la organización de los microfilamentos (Massberg *et al.*, 2004). Las funciones fisiológicas de las PKG están representadas en la Figura 1.6.

La proteína VASP tiene 3 sitios de fosforilación diferentes en humanos, la Ser¹⁵⁷, la Ser²³⁹ y la Thr²⁷⁸. Estos sitios pueden ser fosforilados por la PKG y por la proteína quinasa A (PKA), aunque se requieren concentraciones de cGMP mucho mayores para activar a la PKA que a la PKG (Butt *et al.*, 1992). De hecho, se han realizado estudios en músculo liso y plaquetas (Pfeifer *et al.*, 1998; Massberg *et al.*, 1999), células endoteliales (Draijer *et al.*, 1995) y linfocitos T (Fischer *et al.*, 2001) que sugieren que

la proteína PKA no está relacionada con la señalización mediada por cGMP en condiciones fisiológicas, aunque podría tener un papel relevante en situaciones patológicas, como los procesos inflamatorios o el shock séptico. El estudio de la fosforilación de VASP como indicador de la activación de la sGC se ha llevado a cabo en gran cantidad de tipos celulares, incluyendo células endoteliales (Mollnau *et al.*, 2003), fibroblastos (Smolenski *et al.*, 2000), células glomerulosas adrenales (Gambaryan *et al.*, 2003) y células mesangiales (Burkhardt *et al.*, 2000). También se ha relacionado directamente la producción de NO con la activación de la sGC y la fosforilación de VASP en cardiomiocitos neonatales (Wollert *et al.*, 2002), células HEK-293 (Andre *et al.*, 2005), plaquetas (Massberg *et al.*, 2004), linfocitos T (Fischer *et al.*, 2001) y células granulares del cerebelo (Jurado *et al.*, 2004; Jurado *et al.*, 2006).

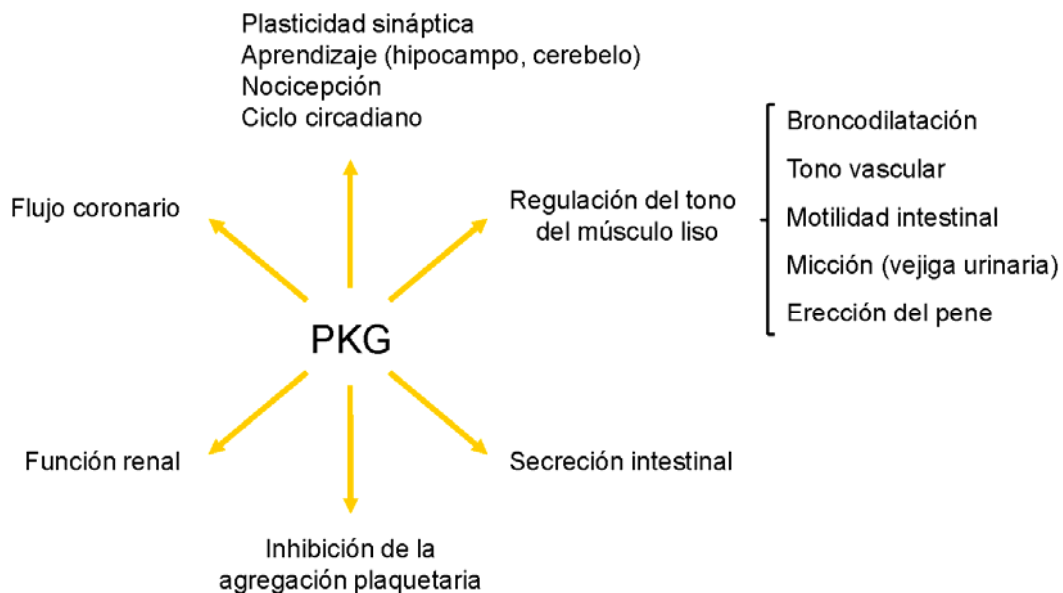


Figura 1.6. Funciones fisiológicas de la PKG en el organismo

La PKG ejerce efectos pleiotrópicos en diferentes órganos, lo que resalta la importancia fisiológica de la señalización por la PKG. Adaptado de (Schlossmann y Hofmann, 2005).

1.7.2. Proteína quinasa activada por AMP (AMPK)

La proteína quinasa activada por AMP (AMPK) tiene un papel fundamental en la regulación de la homeostasis energética celular (Figura 1.7). La activación de la AMPK da lugar a un cambio metabólico en las células, inhibiendo aquellas rutas que consumen ATP, como la lipogénesis o la gluconeogénesis, y favoreciendo aquellas que lo producen, como la oxidación de los ácidos grasos y la glucosa. La AMPK es capaz de detectar fluctuaciones en la relación AMP/ATP. El aumento de esta relación se produce

en respuesta al estrés celular, como el shock térmico, la hipoxia y la isquemia (Kemp *et al.*, 2003). Para que se produzca la activación de la AMPK, es necesario que sea fosforilada en la Thr¹⁷² de su subunidad α por las proteínas AMPK quinasas (AMPKK) (Hawley *et al.*, 1996; Hue y Rider, 2007) entre las que se encuentra el supresor tumoral LKB1 (Hardie, 2004).

Se ha observado que el NO puede desencadenar la activación de la AMPK a través de la inhibición de la CcO, un fenómeno observado en astrocitos y fundamental para la activación de la glucólisis (Almeida *et al.*, 2004). Además, la proteína quinasa C (PKC) es capaz de activar a la AMPK en un proceso mediado por el ONOO⁻ en el endotelio (Xie *et al.*, 2006; Choi *et al.*, 2008).

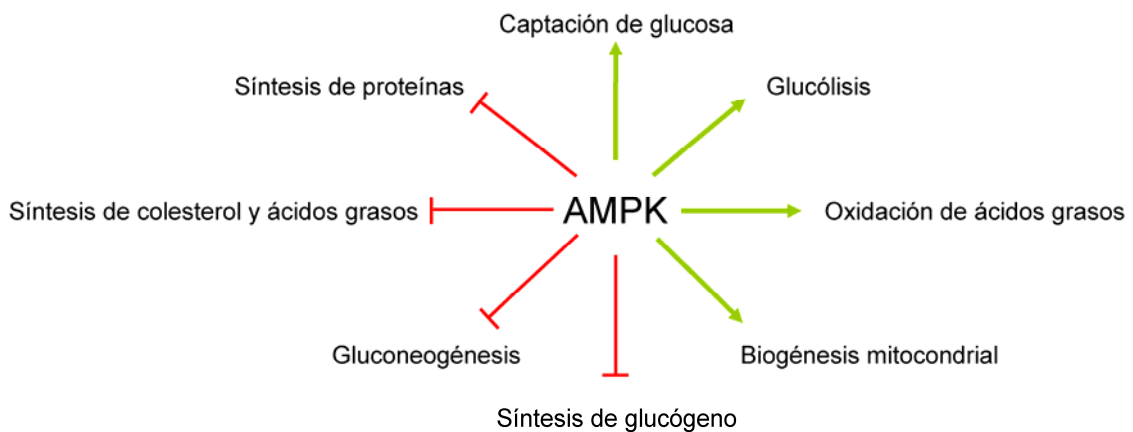


Figura 1.7. Procesos del metabolismo energético regulados por la AMPK

Las flechas verdes indican activación, mientras que las barras rojas indican inhibición. Figura adaptada de (Hardie *et al.*, 2006).

1.8. Efectos del NO sobre la conductancia de la membrana mitocondrial interna a los protones.

1.8.1. Fuga de protones en la membrana mitocondrial interna

En las células, la síntesis de ATP se produce de forma mayoritaria a través de la ATP sintasa, situada en la membrana mitocondrial interna. La síntesis de ATP es posible gracias a la existencia de un gradiente de protones (H⁺) generado por la NADH deshidrogenasa (Complejo I), el complejo citocromo *bc₁* (Complejo III) y la citocromo

c oxidasa (Complejo IV), que forman parte de la ETC. Este gradiente electroquímico de protones ($\Delta\mu_{\text{H}^+}$) se puede expresar en $\text{KJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, y representa una medida del grado en el que el gradiente de protones es desplazado del equilibrio. El $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ tiene dos componentes: la diferencia en la concentración de protones a ambos lados de la membrana (ΔpH) y la diferencia en el potencial eléctrico entre las dos fases acuosas separadas por la membrana, denominado potencial de membrana ($\Delta\psi_{\text{m}}$). En términos bioenergéticos, este gradiente de protones se convierte en potencial eléctrico, y se denomina fuerza protón motriz (pmf).

Sin embargo, no todo el gradiente generado por la ETC se utiliza para obtener energía en forma de ATP. Las membranas lipídicas, donde se encuentran los complejos de la ETC, son permeables a los protones y el coeficiente de permeabilidad es de unos 7 órdenes de magnitud mayor respecto a la permeabilidad de las membranas hacia otros iones pequeños (Paula *et al.*, 1996). Además, existen diversos transportadores en la membrana interna mitocondrial que permiten el paso de los protones sin generar ATP, como las proteínas desacoplantes (*uncoupling proteins*, UCPs) (Stuart *et al.*, 2001). Esta difusión de los protones por cauces distintos a la ATP sintasa se conoce como fuga de protones (*proton leak*), y constituye un ciclo fútil de protones, ya que la energía contenida en el gradiente no se utiliza para obtener ATP, sino que se disipa en forma de calor. La respiración mitocondrial en ausencia de la síntesis de ATP es consecuencia de esta fuga de protones, por lo que es posible estudiar la cinética de la conductancia de la membrana interna a los protones midiendo de forma simultánea el potencial de membrana ($\Delta\psi_{\text{m}}$) y la tasa de respiración mitocondrial en presencia de un inhibidor de la síntesis de ATP como la oligomicina (Brand 2005).

1.8.2. Efectos del NO sobre la fuga de protones a través de la membrana mitocondrial interna

En la actualidad no se conoce si el NO afecta a la conductancia de la membrana mitocondrial interna a los protones, pero sí se ha realizado un trabajo en el que se observa que el ONOO^- , producto de la reacción del NO con el O_2^- , es capaz de alterar las propiedades de la membrana mitocondrial interna mediante la peroxidación de los ácidos grasos presentes en los fosfolípidos (Brookes *et al.*, 1998). Este fenómeno se determinó mediante adiciones secuenciales de ONOO^- a mitocondrias aisladas de

cerebro de rata, observándose que, tras cada adición, el valor de $\Delta\psi_m$ disminuía, mientras que la respiración aumentaba en la primera adición de ONOO^- , pero en sucesivas adiciones disminuía (Figura 1.8). El ONOO^- posee la capacidad de provocar la peroxidación lipídica de las membranas, liposomas y lipoproteínas mediante la eliminación de un átomo de hidrógeno de los ácidos grasos poli-insaturados. Los productos resultantes incluyen radicales lipídicos y aldehídos, entre otros (Denicola y Radi, 2005). Estos productos reaccionan a su vez con otros ácidos grasos, generando radicales adicionales que propagan la degeneración de las membranas (Hogg y Kalyanaraman, 1999), causando un aumento de la permeabilidad de las membranas y cambios en su fluidez, lo que tiene importantes consecuencias biológicas (Richter, 1987).

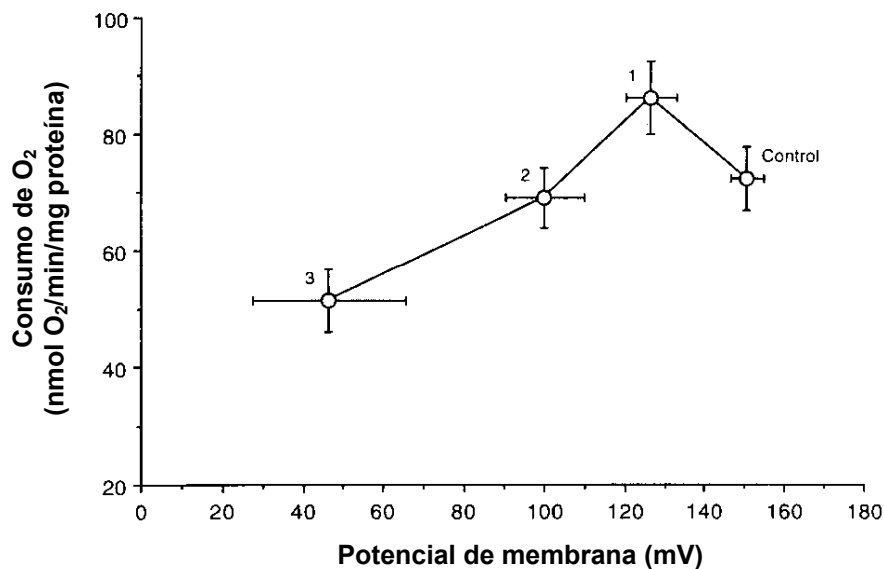


Figura 1.8. Efecto de la adición secuencial de ONOO^- sobre la fuga de protones en mitocondrias de cerebro de rata

Las mitocondrias fueron incubadas en presencia de succinato, rotenona, TPMP⁺, nigericina y oligomicina. Los números (1-3) representan adiciones secuenciales de ONOO^- (400 μM). Figura adaptada de (Brookes *et al.*, 1998).

2. OBJETIVOS

Los objetivos planteados en esta tesis doctoral fueron los siguientes:

1. Determinar la sensibilidad relativa de la guanilato ciclasa soluble (sGC) y la respiración mitocondrial al NO producido endógenamente, a concentraciones fisiológicas de O₂ (30 μM).
2. Determinar la sensibilidad al NO endógeno de las vías de señalización celular mediadas por la proteína quinasa dependiente de cGMP (PKG) y la proteína quinasa activada por AMP (AMPK).
3. Desarrollar un modelo cinético que describa la inhibición del consumo de O₂ por el NO endógeno en células intactas a concentraciones bajas de O₂ (< 30 μM) y durante la transición a anoxia.
4. Evaluar el efecto limitante del O₂ en la producción de NO por la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS).
5. Estudiar los efectos del NO endógeno sobre la cinética de la conductancia de la membrana mitocondrial interna a los protones, a concentraciones fisiológicas de O₂ (30 μM).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Línea celular Tet-iNOS 293

3.1.1. Descripción de las células Tet-iNOS 293

Para realizar los experimentos de esta tesis doctoral se emplearon células Tet-iNOS 293 (Mateo *et al.*, 2003), basadas en la línea celular Flp-InTM T-RExTM-293 (Invitrogen). Se trata de células HEK 293 (*Human Embryonic Kidney*) que contienen integrados en su genoma de manera estable los plásmidos pcDNA6/TR y pFRT/Lac-Zeo. El plásmido pcDNA6/TR contiene el gen de regulación de la tetraciclina (TetR) y el gen de resistencia a la blasticidina S. El gen TetR permite la expresión del represor de la tetraciclina (TetR) de manera constitutiva. El plásmido pFRT/Lac-Zeo contiene un sitio único de recombinación denominado FRT (*Flp Recombination Target*). Para poder expresar de forma regulada la iNOS en las células Flp-InTM T-RExTM-293 se utilizó el plásmido pcDNA5/FRT/TO (Invitrogen) (Figura 3.1). En este plásmido se clonó el cDNA correspondiente a la región codificante de la iNOS (3465 pares de bases) de condrocitos humanos (*GenBank X73029*) obtenido por PCR. El vector que contenía el inserto se denominó pcDNA5/FRT/TO-iNOS. Las células Flp-InTM T-RExTM-293 se cotransfectaron con el plásmido generado anteriormente (pcDNA5/FRT/TO-iNOS) y el plásmido pOG44 (Invitrogen) (Figura 3.1).

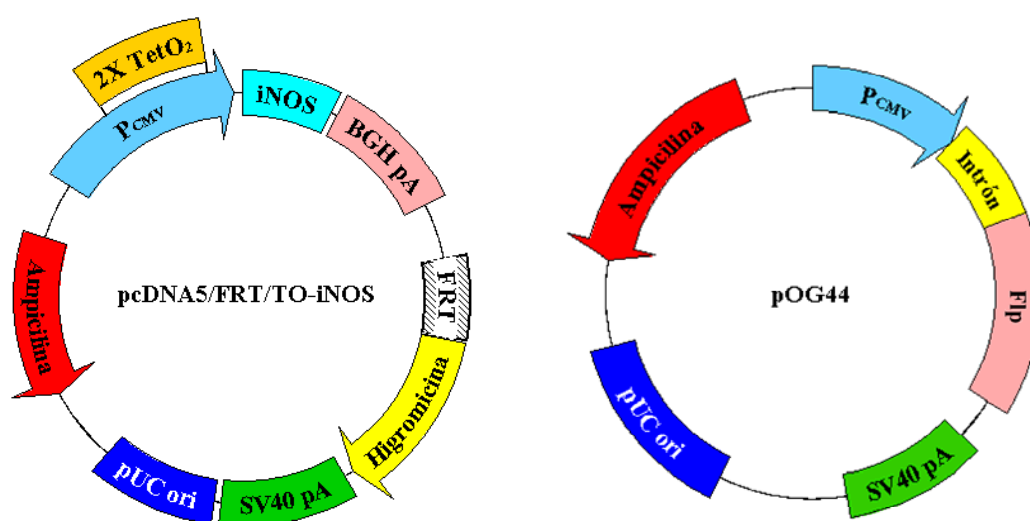


Figura 3.1. Plásmidos cotransfectados en las células Tet-iNOS 293

El plásmido pcDNA5/FRT/TO-iNOS contiene el gen de la iNOS y los genes de resistencia a ampicilina e higromicina. B. El plásmido pOG44 contiene el gen de la recombinasa Flp y el gen de resistencia a ampicilina.

El plásmido pOG44 expresa la recombinasa Flp y cataliza la inserción del gen de la iNOS en el genoma de las células, mediante recombinación específica en el sitio FRT previamente integrado. Las células Flp-InTM T-REXTM-293-iNOS se seleccionaron mediante resistencia a higromicina B y blasticidina S. Esta línea celular se denominó Tet-iNOS 293.

3.1.2. Sistema de expresión regulada de la iNOS

El sistema de regulación de la expresión de la iNOS en función de la concentración de tetraciclina en las células Tet-iNOS 293 se basa en el sistema Tet-ON (Figura 3.2). En este sistema se expresa de forma constitutiva un represor transcripcional (TetR) que reconoce la secuencia denominada TetO₂, de modo que la expresión del gen de la iNOS está reprimida. La administración de tetraciclina hace que ésta interaccione con el represor, de manera que se produce un cambio conformacional en el mismo que provoca su liberación de las secuencias TetO₂. Al perder la represión, el gen de la iNOS puede ser transcrito. En función de la concentración de tetraciclina utilizada, se obtienen diferentes grados de expresión de la proteína (Resultados-Figura 4.1).

3.1.3. Cultivo de las células Tet-iNOS 293

Las células Tet-iNOS 293 se cultivaron en medio de cultivo DMEM (*Dulbecco Modified Eagle's Medium*) (Sigma-Aldrich) que contiene glucosa (4,5 g/l), suplementado con piruvato sódico 1 mM (Sigma-Aldrich), FCS al 10% (v/v) (Sigma-Aldrich), higromicina B (200 µg/ml) (InvivoGen) y blasticidina S (15 µg/ml) (InvivoGen) a 37 °C en atmósfera humidificada y con 5% de CO₂.

Para realizar las medidas de acumulación de cGMP, las células se cultivaron en placas de 6 pocillos de 35 mm de diámetro (Becton Dickinson). En cada pocillo se sembraron 1×10^6 células. Por otra parte, para realizar las medidas de consumo de O₂ en el respirómetro de alta resolución (Oxygraph-2k, Oroboros Instruments) se utilizaron botellas confluentes de 75-150 cm² (Becton Dickinson).

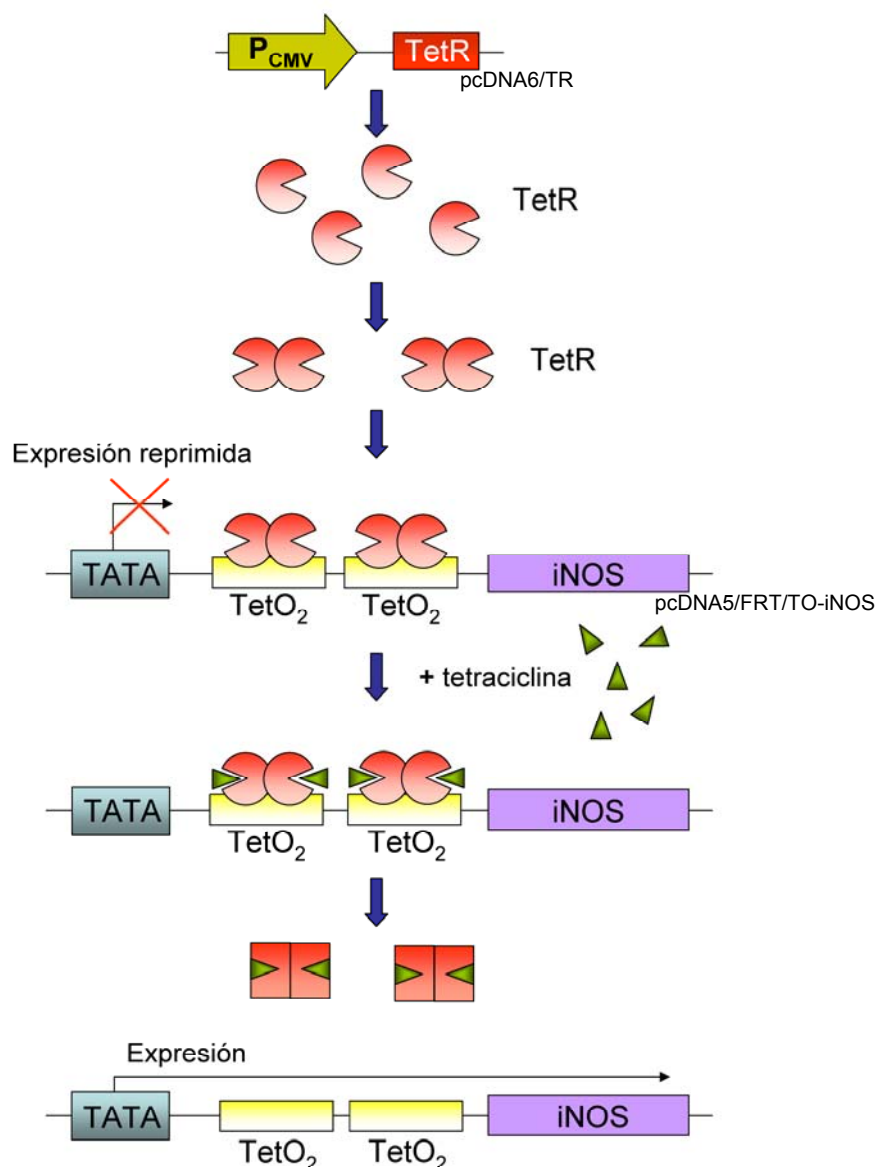


Figura 3.2. Sistema Tet-ON de inducción de la expresión de la iNOS por tetraciclina

La expresión del gen de la iNOS está reprimida en ausencia de tetraciclina mediante el represor TetR. La adición de tetraciclina (triángulos verdes) hace que se produzca un cambio conformacional en el represor, impidiendo su unión al ADN y permitiendo la expresión del gen de la iNOS.

3.2. Inducción de la producción endógena de NO

Para inducir la producción endógena de NO, las células se incubaron durante 14-16 h en medio de crecimiento completo al que se añadieron distintas concentraciones de tetraciclina (2-1000 ng/ml) (Calbiochem; EMD Chemicals), en presencia del inhibidor específico de la iNOS, S-etilisotiurea (S-EITU), a una concentración de 0,5 mM (Sigma-Aldrich). Este periodo de incubación con tetraciclina y S-EITU permite la

síntesis de la enzima iNOS sin que exista producción de NO. Transcurrido el periodo de incubación, se retiró el medio con tetraciclina y S-EITU, y las células se incubaron durante 1 h en medio de cultivo DMEM sin L-arginina (Gibco Invitrogen) con 5% (v/v) de suero fetal bovino dializado sin L-arginina (Gibco Invitrogen), con el objetivo de eliminar el inhibidor y la tetraciclina, sin permitir todavía la síntesis de NO. Tras esta hora de lavado, las células se incubaron con el tampón de ensayo HBSS (*Hank's Balanced Salt Solution*) (Gibco Invitrogen) suplementado con Hapes (ácido N-2-hidroxiethylpiperacina-N'-2-etanosulfónico) 25 mM (Gibco Invitrogen) a diferentes tiempos y concentraciones de O₂. La adición del sustrato de la iNOS, L-arginina (1 mM) (Sigma-Aldrich) marcó el tiempo cero (t=0) de producción de NO.

El protocolo utilizado para la inducción de la producción de NO se muestra esquematizado en la siguiente figura:

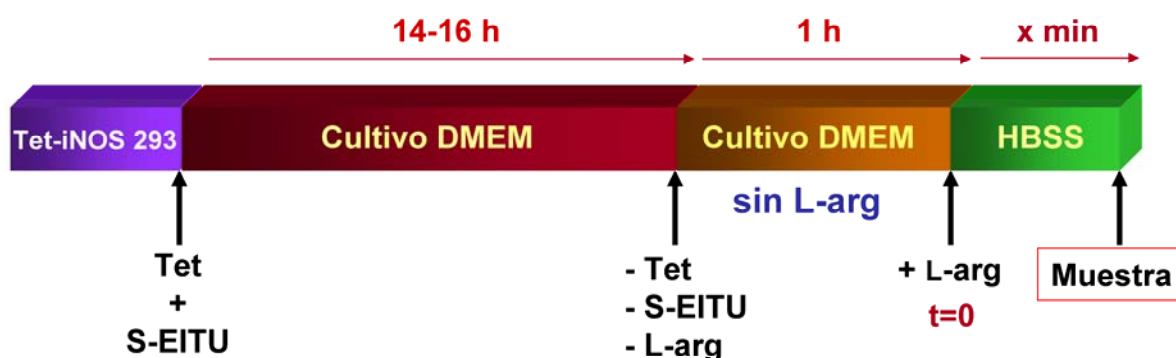


Figura 3.3. Protocolo de inducción de la producción endógena de NO en las células Tet-iNOS 293
Cada uno de los pasos de la inducción se muestran representados por orden cronológico, de izquierda a derecha. Tet, tetraciclina; L-arg, L-arginina.

3.3. Determinación electroquímica de la producción de NO

3.3.1. Calibración del electrodo de NO

El electrodo de NO (*ISO-NO MarkII, World Precision Instruments*) fue calibrado mediante la adición de concentraciones conocidas de NaNO₂ (Sigma-Aldrich) en condiciones reductoras (KI/H₂SO₄) a 37 °C. Las calibraciones se realizaron a una concentración de O₂ de 30 μM (Figura 3.4).

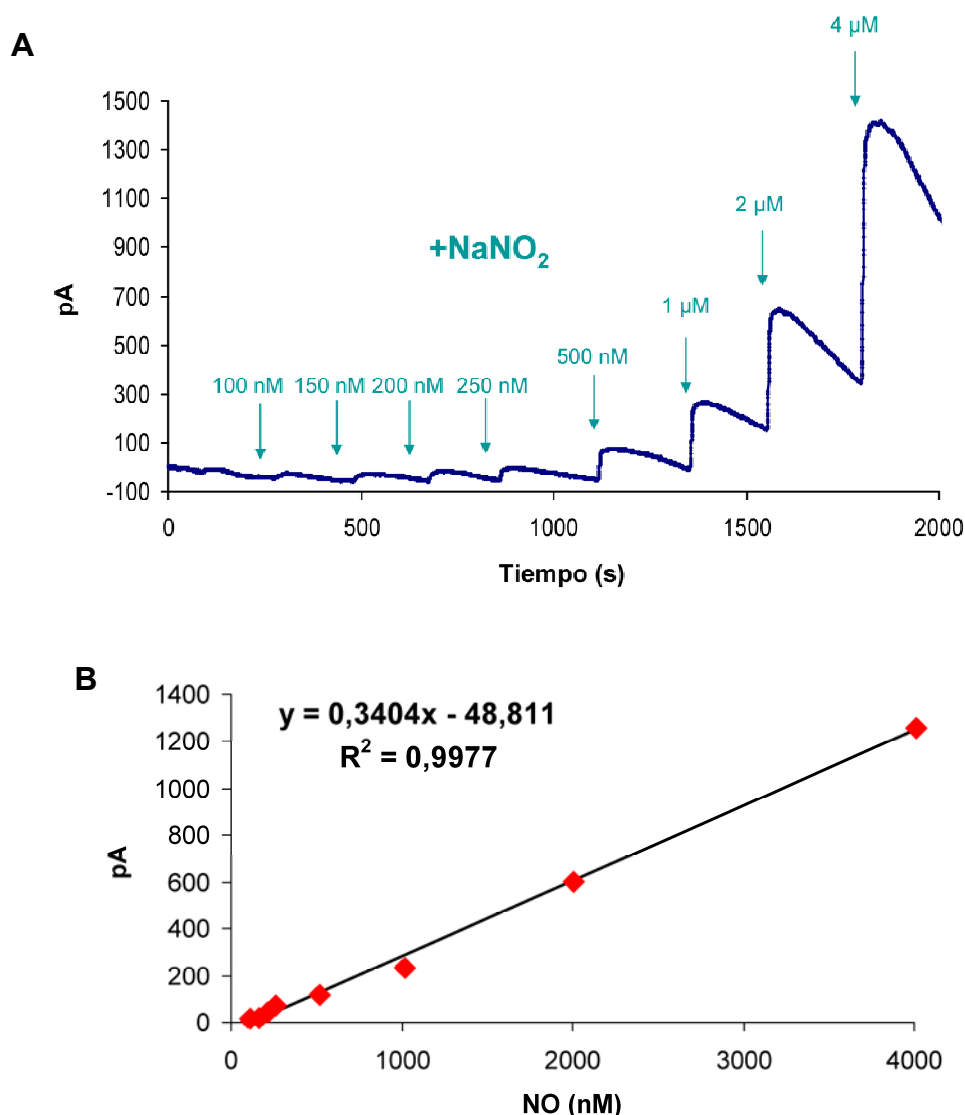


Figura 3.4. Calibración del electrodo de NO

(A) Registro de la producción de NO. Tras la adición de concentraciones conocidas de NaNO₂ se genera una concentración de NO proporcional al incremento de la señal eléctrica (pA) recogida por el electrodo de NO. La relación estequiométrica entre el NaNO₂ añadido y el NO producido es 1. (B) Recta de regresión calculada a partir de las concentraciones de NO y los valores de pA obtenidos en (A).

3.3.2. Medida de la producción de NO

La producción de NO fue determinada en células resuspendidas en medio HBSS suplementado con Hepes 25 mM, a una densidad de 1×10^7 células/ml. Las medidas se realizaron utilizando un electrodo de NO (ISO-NOP, *World Precision Instruments*) en 1 ml de esta suspensión celular con agitación suave y a 37 °C. La producción de NO se inició con la adición de L-arginina 1 mM a una concentración de O₂ de 60 μM, y fue monitorizada durante al menos 15 min tras la adición de L-arginina. Los datos se recogieron y se analizaron con el software DUO18.

En los experimentos realizados con NO exógeno, se utilizó el donador de NO DEA-NO ([Sigma-Aldrich](#)) a las concentraciones y los tiempos indicados en el apartado 4.2.1.3 de los Resultados. El tiempo 0 se corresponde con el momento de la adición del donador a las placas de cultivo.

3.4. Medida del consumo de O₂ celular

El consumo de oxígeno se determinó mediante respirometría de alta resolución ([Oxygraph-2k](#), [Oroboros Instruments](#)) (Gnaiger, 2001). El software utilizado para la adquisición y análisis de los datos fue [Datlab](#) ([Oroboros Instruments](#)).

3.4.1. Corrección del flujo de O₂ instrumental

El flujo de O₂ instrumental fue determinado en 2 ml de medio HBSS, como una función lineal de la concentración de O₂. Para ello, se seleccionaron 4 valores de concentración de O₂ representativos de todo el rango de concentraciones presentes en los experimentos y se determinó el flujo de O₂ en 4 intervalos (J1-J4) correspondientes a las concentraciones de O₂ seleccionadas (Figura 3.5 A). Para alcanzar las concentraciones de O₂ seleccionadas en el medio HBSS, se utilizó gas N₂ ([Air Liquide](#)) insuflado en el medio aéreo del interior de la cámara del respirómetro. Representando el flujo de O₂ en función de las concentraciones de O₂ (Figura 3.5 B) se obtuvo una recta de regresión del tipo $y = bx - a$, donde b representa la pendiente de la recta y a el punto de corte con el eje de ordenadas, respectivamente. Estos valores fueron introducidos posteriormente en el programa [Datlab](#) para realizar la corrección del flujo de O₂ instrumental en todo el rango de concentraciones de O₂ en las medidas experimentales.

3.4.2. Calibración del electrodo de O₂

Para calibrar el electrodo de O₂ se tomaron los valores del 100% y el 0% de O₂. La concentración de O₂ en el medio HBSS saturado de aire, a una presión barométrica de 92,6 kPa y a 37 °C, fue 175,7 μM (el factor de solubilidad del O₂ en el medio es de 0,92). Este valor se tomó como el 100% (R1; Figura 3.6). Una vez que las células consumieron todo el O₂, se tomó el valor del 0% de O₂ (R0; Figura 3.6).

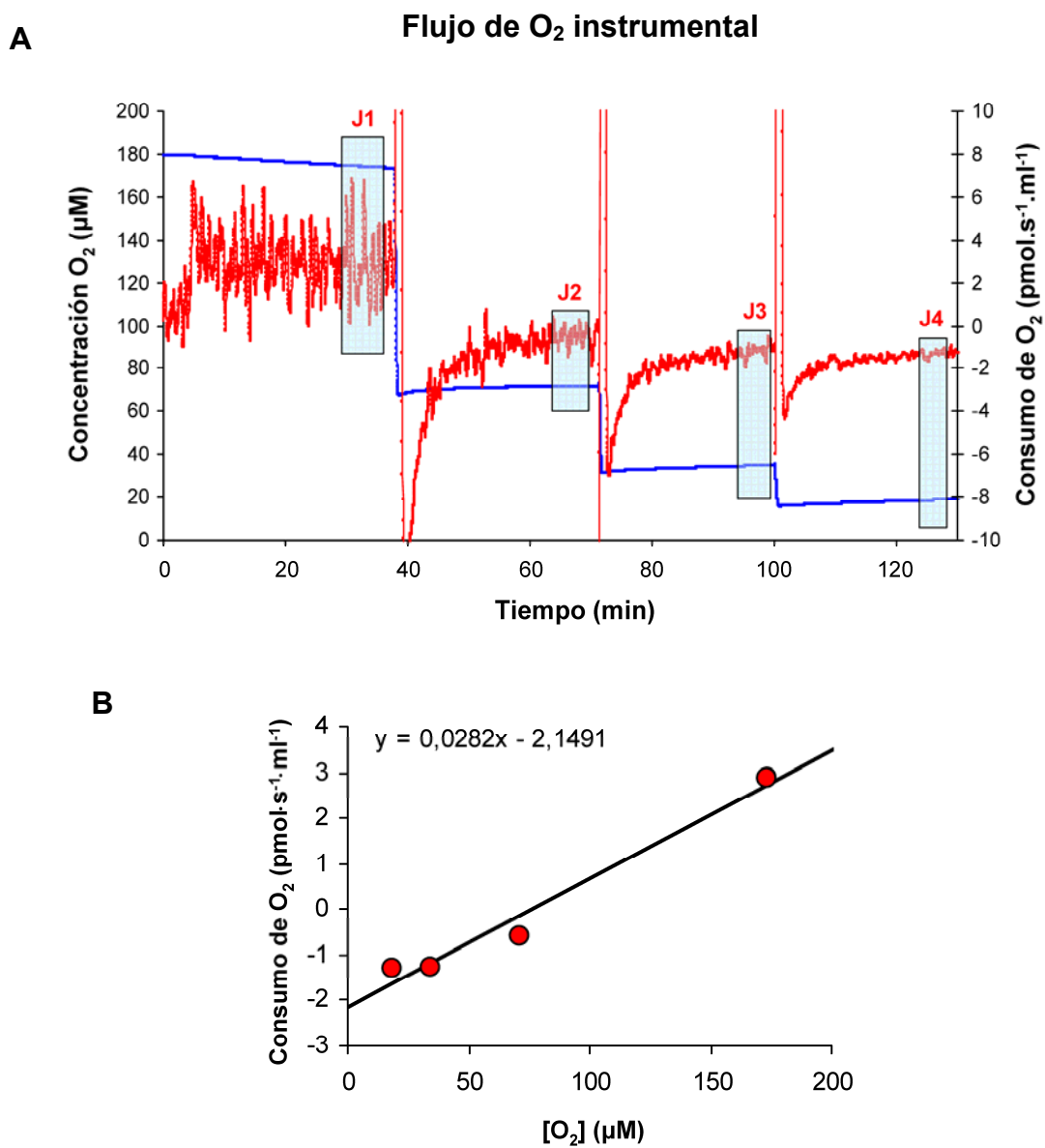


Figura 3.5. Corrección del flujo de O₂ instrumental del electrodo de alta resolución

(A) Registro representativo de la determinación del flujo de O₂ instrumental. Se determinó el flujo (línea roja) en 4 intervalos (J1-J4) correspondientes a 4 concentraciones diferentes de O₂ (170, 80, 40 y 20 µM; línea azul). (B) Recta de regresión que relaciona el flujo de O₂ instrumental con la concentración de O₂.

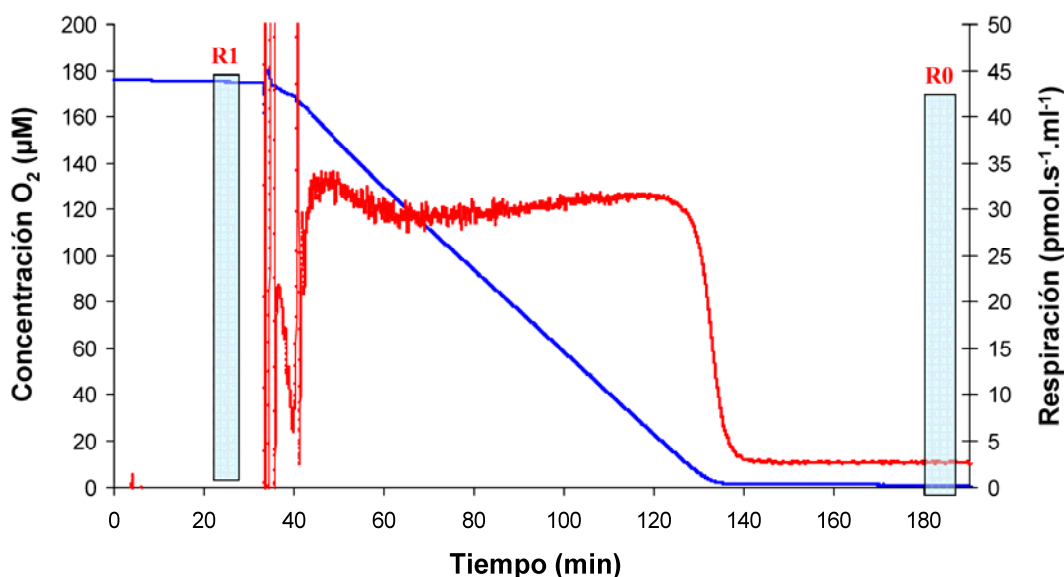


Figura 3.6. Calibración del electrodo de O₂

Se seleccionaron 2 intervalos de concentración de O₂ (R1 y R0; línea azul) correspondientes a los valores de concentración de O₂ en saturación (100%) y en anoxia (0%).

3.4.3. Medida del consumo de O₂ en las células

Tras la incubación con tetraciclina durante la noche (14-16 h) y posterior lavado, las células se trataron con tripsina y se resuspendieron en HBSS suplementado con HEPES 25 mM a una densidad de 1×10^7 células/ml. Las medidas fueron realizadas en paralelo en las dos cámaras del respirómetro Oxygraph-2k a 37 °C, en células tratadas con la misma cantidad de tetraciclina; la adición de L-arginina 1 mM a una de las cámaras inició la producción de NO. Debido a que la luz puede revertir la inhibición de la respiración por el NO (Boelens *et al.*, 1983; Borutaite *et al.*, 2000; Sarti *et al.*, 2000), todos los experimentos fueron realizados en ausencia de luz directa, excepto aquellos diseñados para estudiar la reversibilidad de la inhibición, en los que las células se iluminaron con una fuente de luz fría (Intralux 5000-1, Volpi).

La respiración mitocondrial se determinó en condiciones basales y en presencia de FCCP 350 nM (Sigma-Aldrich), un compuesto desacoplante de la fosforilación oxidativa que permite determinar la velocidad máxima de la respiración. Para medir la respiración mitocondrial no ligada a la síntesis de ATP se utilizó oligomicina 80 ng/ml (Sigma-Aldrich), un inhibidor del complejo ATP sintasa. Para determinar el consumo de O₂ residual no relacionado con la respiración mitocondrial se utilizó un inhibidor de la citocromo *c* oxidasa (CcO), cianuro 1 mM (Sigma-Aldrich).

3.5. Medida simultánea de la producción de NO y del consumo de O₂

Con el fin de realizar un estudio detallado de la producción endógena de NO y de la inhibición de la respiración celular en el rango fisiológico de concentraciones de O₂, incluyendo la transición a anoxia, determinamos simultáneamente la concentración de NO, la concentración de O₂ y la respiración. Para ello, se insertó un electrodo de NO (ISO-NOP, WPI) en el interior de una de las cámaras del respirómetro de alta resolución (Oxygraph-2k, Oroboros Instruments), gracias a la utilización de un tapón especial de PVDF diseñado específicamente para permitir el paso del sensor de NO a través de un capilar de 2 mm de diámetro (Figura 3.7). La presencia de este segundo capilar no aumentó la difusión de O₂ hacia el interior de la cámara a concentraciones bajas de O₂.

Los electrodos de NO y O₂ fueron calibrados en la misma cámara del electrodo de alta resolución a 37 °C, como se ha descrito anteriormente. Las medidas llevadas a cabo en las suspensiones celulares se realizaron con las cámaras cerradas y, tras la adición de L-arginina (1 mM), se registraron las concentraciones de O₂ y NO hasta que el O₂ se agotó. Puesto que la actividad de la iNOS es dependiente de O₂, la falta de O₂ impide la producción endógena de NO, por lo que al agotarse el O₂ la señal de NO volvió a su valor inicial. El valor de concentración de NO anterior a la adición de L-arginina se utilizó para calibrar el valor basal de concentración de NO de cada registro.

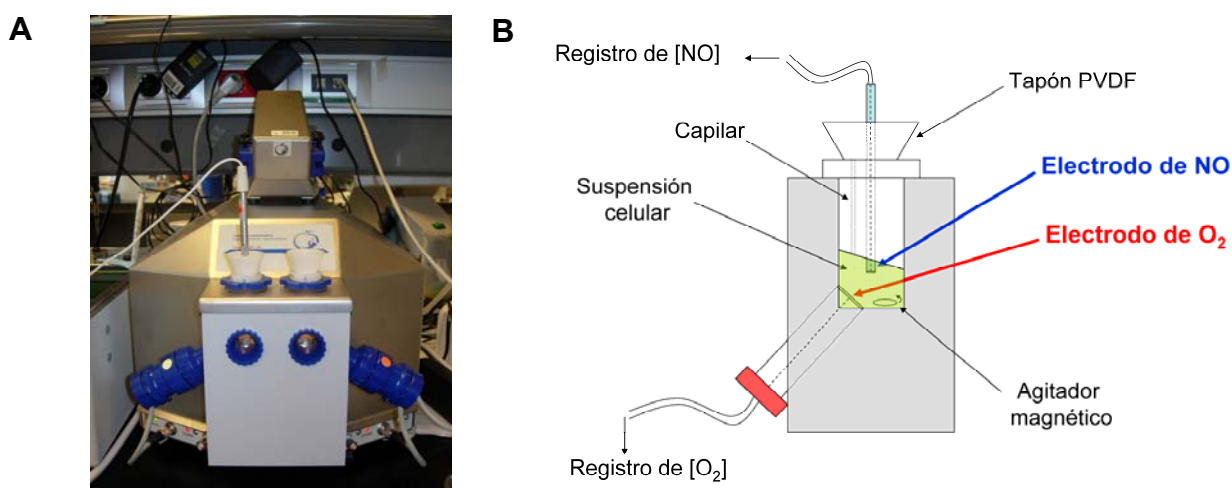


Figura 3.7. Medida simultánea de la producción de NO, la concentración de O₂ y la respiración

(A) Imagen del respirómetro de alta resolución con el electrodo de NO insertado en la cámara izquierda. (B) Esquema que representa la disposición de los dos electrodos (O₂ y NO) en el interior de la cámara del respirómetro.

3.6. Modelo cinético de inhibición de la CcO por el NO

A partir de los datos obtenidos de concentración de NO, concentración de O₂ y respiración desarrollamos un modelo cinético de inhibición de la CcO por el NO. La interdependencia de las concentraciones de NO y de O₂ no permite utilizar un ajuste cinético en el que se pueda variar la concentración del sustrato (O₂) a una concentración constante de inhibidor (NO). Por este motivo, realizamos una aproximación en la que los parámetros cinéticos fueron ajustados simultáneamente a todos los datos experimentales.

Los datos se analizaron mediante la utilización del programa informático [Matlab \(MathWorks, Natick, MA\)](#) aplicando el análisis numérico de los mínimos cuadrados no-lineal. Este análisis se realizó en colaboración del Dr. Andrea Bellelli, de la Universidad de Roma 'Sapienza'. A partir de este análisis se elaboró un modelo de inhibición de la respiración celular por el NO que tiene en cuenta los tipos de inhibición competitiva y no competitiva. La posibilidad de que existan ambos tipos de inhibición ha sido propuesta recientemente (Mason *et al.*, 2006; Antunes *et al.*, 2007). El modelo desarrollado en esta tesis se ajusta a los datos experimentales y permite predecir el valor de la respiración a una determinada concentración de O₂ y NO.

3.7. Medida de la producción de cGMP

3.7.1. Cultivo de las células a distintas concentraciones de O₂

Para los estudios de estimulación de la sGC por el NO, la incubación de las células a diferentes concentraciones de O₂ (200, 30 y 15 μ M) se llevó a cabo en incubadores de CO₂ ([Nuaire](#)) o en cámaras de hipoxia ([COY Laboratory Products](#)). En este último caso, la mezcla de gases utilizada (95% N₂ y 5% CO₂) fue de [Air Liquide](#).

3.7.2. Cuantificación de la producción de cGMP

Para cuantificar la producción de cGMP, las células fueron cultivadas en placas de 6 pocillos ([Becton Dickinson](#)), sembrándose 1×10^6 células en cada pocillo. Tras alcanzar el 80-90% de confluencia, las células fueron incubadas con tetraciclina (2-1000

ng/ml) durante 14-16 h para inducir la expresión de la iNOS, como se ha descrito anteriormente (apartado 3.2). La adición de HBSS suplementado con L-arginina 1 mM marcó el tiempo 0 de producción de NO. La acumulación de cGMP fue determinada durante diferentes periodos de tiempo hasta 5 min. Después de la incubación con L-arginina se añadieron 500 μ l de HCl 0,1 M (Carlo Erba Reagents) durante 35 min para detener la actividad de las fosfodiesterasas e inducir la lisis celular. Seguidamente, las células fueron desprendidas de los pocillos con un raspador (Corning Incorporated) y centrifugadas a $1200 \times g$ durante 5 min a temperatura ambiente. El sobrenadante fue utilizado directamente en el ensayo. La concentración de cGMP fue determinada mediante inmunoensayo utilizando el kit comercial *cGMP EIA Kit for Cell and Tissue Lysates* (Biomol International), siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración de proteínas se determinó en los mismos sobrenadantes utilizados para la cuantificación del cGMP, utilizando el kit BCA (Pierce Chemicals, Thermo Scientific) (apartado 3.8.2).

Para comprobar que los efectos observados eran específicos de la activación de la sGC, utilizamos un inhibidor específico de la sGC, el ODQ (1H-[1,2,4] oxadiazolo-[4,3a]quinoxalin-1-uno) 50 μ M. Asimismo, utilizamos el compuesto BAY 41-2272 10 μ M, un activador de la sGC independiente de NO, proporcionado por el Dr. Salvador Moncada (Wolfson Institute for Biomedical Research, Londres, Reino Unido). Para evitar que la acumulación de cGMP estuviera siendo modificada por las fosfodiesterasas, enzimas que degradan el cGMP, utilizamos el IBMX (isobutilmetilxantina) 0,5 mM, un inhibidor de estas enzimas. El ODQ y el IBMX fueron de Sigma-Aldrich.

3.8. Detección de la expresión de las proteínas iNOS, VASP y AMPK

3.8.1. Obtención de los extractos celulares totales

La preparación de los extractos se realizó según el siguiente protocolo: las células, cultivadas en placas de 10 cm (Becton Dickinson), fueron incubadas con tripsina (Gibco Invitrogen) y centrifugadas a $300 \times g$ durante 5 min a 4 °C. Los precipitados se lisaron utilizando 60 μ l de tampón de lisis (Hepes 20 mM pH 7,5, NaCl 400 mM, glicerol 20%, EDTA 0,1 mM, NaF 10 mM, Na₂MoO₄ 10 μ M, NaVO₃ 1 mM, PNPP 10 mM y β -

glicerofosfato 10 mM) por cada muestra; todos estos compuestos se obtuvieron de [Sigma](#), excepto el EDTA, que se adquirió en [Calbiochem](#). El tampón de lisis fue suplementado con DTT 1 mM ([B.D.H.](#)), Pefablock 1 mM pH 7,4 ([Roche Diagnostics](#)) y un cóctel de inhibidores de proteasas ([Roche](#)). El lisado de las células se realizó en hielo durante 15 min y el extracto celular completo se obtuvo al recoger el sobrenadante tras centrifugar las muestras a $16000 \times g$ durante 15 min a 4 °C.

3.8.2. Medida de la concentración de las proteínas totales

La concentración de proteínas totales en los extractos se determinó utilizando el kit comercial *Pierce BCA protein assay* ([Pierce Chemicals](#)) según las instrucciones del fabricante y utilizando albúmina bovina (BSA) para realizar la curva patrón. Para estas determinaciones se utilizaron placas de 96 pocillos ([Sarstedt](#)) y un lector de placas ([iEMS reader MF, Thermo Labsystems](#)) a una longitud de onda de 570 nm, mediante el software [Ascent \(Thermo Labsystems\)](#).

3.8.3. Detección de la expresión de las proteínas iNOS, VASP y AMPK por inmunoblot (western blot)

Para determinar los niveles de inducción de la proteína iNOS por la tetraciclina, así como el efecto del NO sobre el estado de fosforilación de la fosfoproteína estimulada por vasodilatadores (VASP) y la proteína quinasa activada por AMP (AMPK), se procedió a la detección de las mismas mediante western blot. Se realizó una electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS/PAGE), con un porcentaje de acrilamida/bisacrilamida del 7,5%, los que se cargó la misma cantidad de proteína para cada muestra (200 µg para la iNOS y 120 µg para VASP y AMPK). Los geles de acrilamida se prepararon a partir de acrilamida/bis-acrilamida 30% comercial ([BioRad](#)), persulfato de amonio (APS), dodecil sulfato sódico (SDS) (todos ellos obtenidos de [Sigma-Aldrich](#)) y N,N,N,N'-tetrametilnediamina (TEMED) obtenido de [B.D.H.](#) El material utilizado para realizar la electroforesis y la transferencia de las proteínas a las membranas fue de [BioRad \(Mini protean 3, Mini transblot Cell y fuente de alimentación Powerpac 300\)](#), así como los marcadores de peso molecular ([Precision Plus Protein Dual Color](#)).

Las proteínas fueron transferidas desde el gel a membranas de nitrocelulosa (GE Healthcare) utilizando una corriente eléctrica con una intensidad de 250 mA durante 1 h. Las membranas fueron bloqueadas durante 1 h a temperatura ambiente con leche desnatada al 5% (p/v) en TBS-T (Tris-HCl 20 mM pH 7,2 , NaCl 150 mM, Tween-20 0,1%), y fueron incubadas durante 14-16 h a 4 °C con anticuerpos policlonales de conejo anti-iNOS (1:2000) (Becton Dickinson), anti-VASP (1:1000) (Calbiochem) o anti-AMPK (1:1000) (Cell Signaling Technology). Como control de carga se detectó la actina de cada muestra con un anticuerpo monoclonal de ratón (1:10000) (Sigma-Aldrich).

Las bandas de proteínas fueron detectadas mediante incubación durante 1 h a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario de cabra anti-IgG de conejo y conjugado a una peroxidasa de rábano (HRP) (1:5000) (Vector Laboratorios). Para la detección de la banda correspondiente al anticuerpo anti-actina se utilizó un anticuerpo secundario de cabra anti-IgG de ratón (1:2500) (Santa Cruz Biotechnology). Para visualizar las bandas se utilizó el método quimioluminiscente (ECL) (GE Healthcare), que se basa en la oxidación del luminol por la HRP. Las películas utilizadas para el revelado fueron de AGFA.

3.9. Medida de la conductancia de la membrana mitocondrial interna a los protones

Para determinar el efecto del NO endógeno sobre la cinética de la conductancia de la membrana mitocondrial interna a los protones, realizamos medidas en paralelo del potencial de la membrana mitocondrial interna ($\Delta\psi_m$) y la respiración. El $\Delta\psi_m$ se inhibió progresivamente mediante la adición de concentraciones crecientes de rotenona, un inhibidor del Complejo I. Las medidas se realizaron en presencia de oligomicina 80 ng/ml, con el fin de inhibir la síntesis de ATP y poder así medir la respiración correspondiente a la fuga de protones a través de la membrana mitocondrial interna. Para la determinación del $\Delta\psi_m$ se utilizó el catión lipofílico [^3H]TPMP⁺, marcado radiactivamente con tritio (Brand 1995). Los protocolos utilizados se describen a continuación y están esquematizados en la Figura 3.8.

3.9.1. Medida del consumo de O₂

Para determinar la respiración celular se utilizaron 2,5 ml de suspensión celular a una densidad de 1×10^7 células/ml en HBSS suplementado con Hepes 25 mM, a los que se añadió oligomicina 80 ng/ml y TPMP⁺ 0,5 μM. En función del tratamiento, también se añadieron FCCP 1 μM, L-arginina 1 mM y concentraciones crecientes de rotenona (4, 8, 16, 32, 64 nM) (Sigma-Aldrich). A continuación, se incubaron en un baño de H₂O a 37 °C durante 2 min. Después, las células fueron incubadas durante 1 h a 37 °C, tras lo que fueron introducidas en la cámara del respirómetro de alta resolución donde se realizaron las medidas de consumo de O₂ como se explicó previamente (apartado 3.4).

3.9.2. Medida del potencial de membrana

El [³H]TPMP⁺ es un catión lipofílico que se distribuye a ambos lados de la membrana mitocondrial interna en función del potencial de membrana (Ross *et al.*, 2005). También utilizamos el anión lipofílico tetrafenil borato (TPB) para facilitar el movimiento del [³H]TPMP⁺ a través de la membrana mitocondrial interna (Ross *et al.*, 2006). Antes de realizar las medidas de potencial de membrana en presencia de NO, realizamos un experimento de curso-temporal (Resultados-Figura 4.19) para determinar el periodo óptimo de incubación con [³H]TPMP⁺, es decir, el tiempo que tarda en estabilizarse la distribución del [³H]TPMP⁺ entre la matriz mitocondrial y el citoplasma. El periodo óptimo determinado fue de 1 h.

Para la medida del potencial de membrana se utilizaron 1,7 ml de suspensión celular a una densidad de 1×10^7 células/ml en HBSS suplementado con Hepes 25 mM, a los que se añadió oligomicina 80 ng/ml, TPMP⁺ 0,5 μM, TPB 1,5 μM y [³H]TPMP⁺ (American Radiolabeled Chemicals) a una concentración final de 0,2 μCi/ml. En función del tratamiento también se añadieron FCCP 1 μM, L-arginina 1 mM y concentraciones crecientes de rotenona (4, 8, 16, 32, 64 nM) (Sigma-Aldrich). Los viales fueron procesados mediante el siguiente protocolo: para cada tratamiento se utilizaron 500 μl de suspensión celular por triplicado. Esta suspensión se centrifugó a $300 \times g$ durante 2 min a 25 °C. Seguidamente, se colocaron 400 μl del sobrenadante en viales de centelleo. Después de retirar el resto del sobrenadante, los precipitados fueron resuspendidos en 40 μl de tritón X-100 (Sigma-Aldrich) al 20% e introducidos en viales de centelleo a los que se añadieron 250 μl de H₂O. A cada vial de centelleo, tanto a los

que contenían los precipitados como a los que contenían los sobrenadantes, se les añadió 5 ml de líquido de centelleo (Beckman Coulter). Finalmente, se determinaron las cuentas por minuto (cpm) totales, en un contador de centelleo (Beckman Coulter LS6500). Se utilizó un vial con 6 ml de líquido de centelleo como blanco. Se calculó la razón entre la concentración de $[^3\text{H}]\text{TPMP}^+$ en la matriz y en el citosol.

A partir de esta razón se obtuvo el valor de $\Delta\psi_m$ mediante la aplicación de la ecuación de Nernst:

$$\Delta\psi_m = \frac{2,303RT}{F} \log \left(\frac{[[^3\text{H}]\text{TPMP}]_{matriz}}{[[^3\text{H}]\text{TPMP}]_{citosol}} \right) \quad \text{Ec. (3.1)}$$

donde R es la constante universal de los gases ($8,314472 \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$), T es la temperatura en grados Kelvin, y F es la constante de Faraday ($9,6485309 \times 10^4 \text{ C}\cdot\text{mol}^{-1}$). En nuestras condiciones experimentales, el valor $2,303RT/F$ es constante y se corresponde a 61,5. Sustituyendo este valor en la ecuación 3.1 obtenemos:

$$\Delta\psi_m = 61,5 \times \log \left(\frac{[[^3\text{H}]\text{TPMP}]_{matriz}}{[[^3\text{H}]\text{TPMP}]_{citosol}} \right) \quad \text{Ec. (3.2)}$$

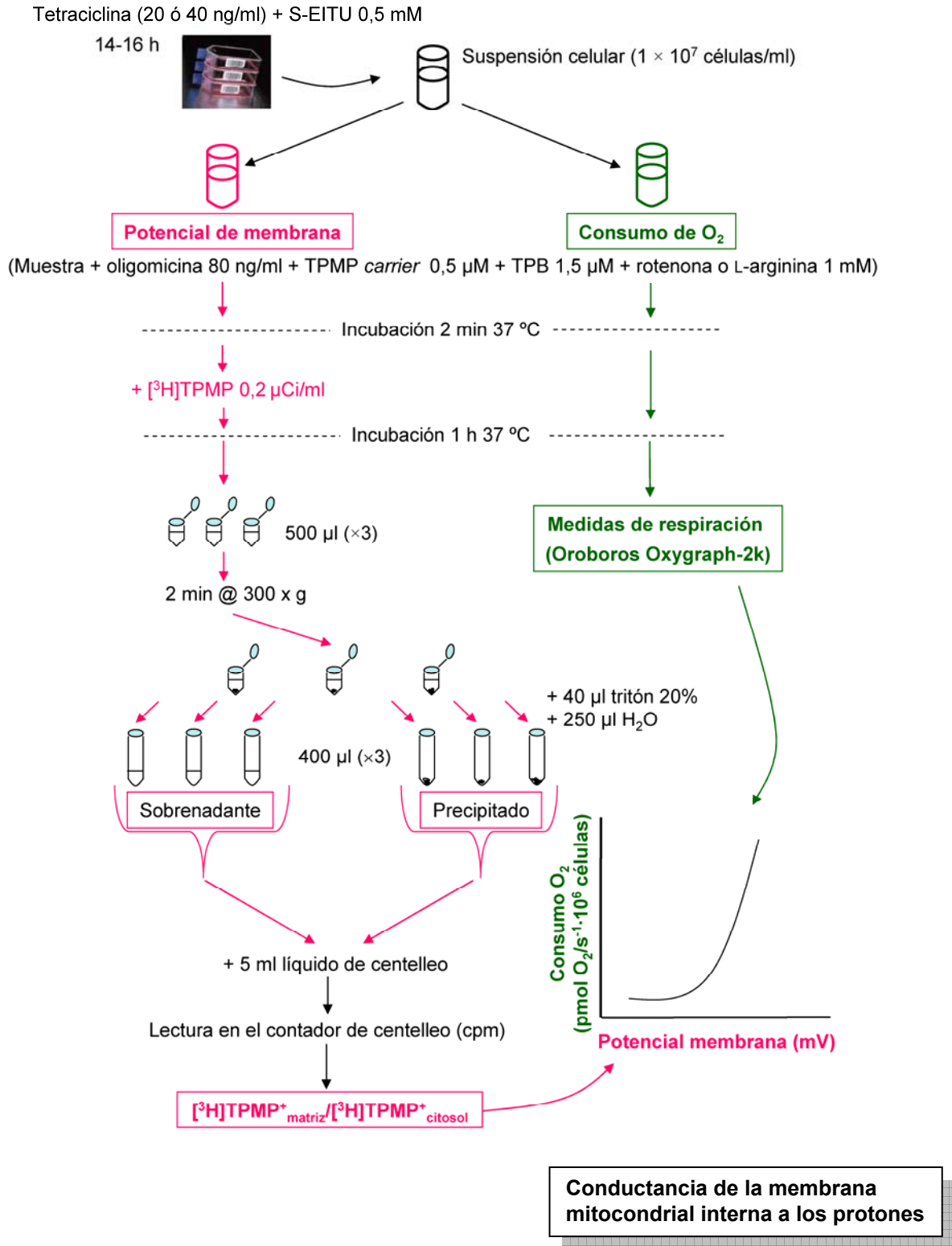


Figura 3.8. Esquema del protocolo utilizado para la medida de la conductancia de la membrana mitocondrial interna a los protones

Se realizaron medidas simultáneas del potencial de membrana (rojo) y del consumo de O₂ (verde) en presencia de oligomicina, partiendo de la misma suspensión celular. La representación de estos dos parámetros nos permite conocer la curva que describe la cinética de la conductancia de la membrana mitocondrial interna a los protones.

4. RESULTADOS

4.1. Producción endógena de NO por las células Tet-iNOS 293

Para realizar los experimentos presentados en esta tesis doctoral utilizamos la línea celular Tet-iNOS 293 (Métodos 3.1.1), que expresa la enzima iNOS de manera regulada por un sistema inducible por tetraciclina (Tet-ON). La incubación de las células con una serie de concentraciones de tetraciclina (2-1000 ng/ml) dio lugar a la expresión de la iNOS de manera dependiente de la concentración de tetraciclina, según se muestra en el western blot de la Figura 4.1.

Para iniciar la producción de NO utilizamos el sustrato de la iNOS, la L-arginina 1 mM, que fue añadida a una concentración de O_2 de 30 μ M. La adición de L-arginina (1 mM) dio lugar a la producción inmediata de NO, como se muestra en la Figura 4.2 A. El NO producido fue dependiente de la cantidad de iNOS expresada en las células. Las medidas se tomaron durante al menos 10 min, durante los cuales la concentración de NO detectada se mantuvo constante. La concentración de NO más alta se obtuvo cuando la expresión de la iNOS era máxima, con un valor de $1,2 \pm 0,1 \mu$ M. La relación entre la concentración de tetraciclina y el valor máximo de NO obtenido a cada concentración de tetraciclina se muestra en la Figura 4.2 B.

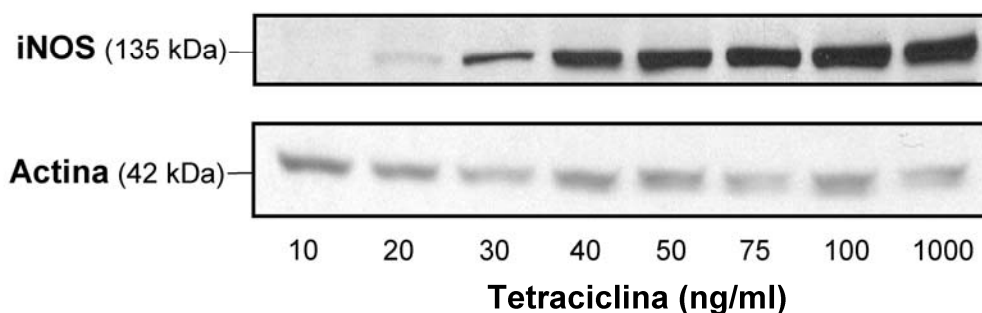


Figura 4.1. Expresión de la iNOS de manera dependiente de la concentración de tetraciclina

Análisis de la expresión de la iNOS mediante western blot tras la incubación de las células con dosis crecientes de tetraciclina (10-1000 ng/ml). El análisis de actina se utilizó como control de carga. El resultado presentado es representativo de 3 experimentos independientes.

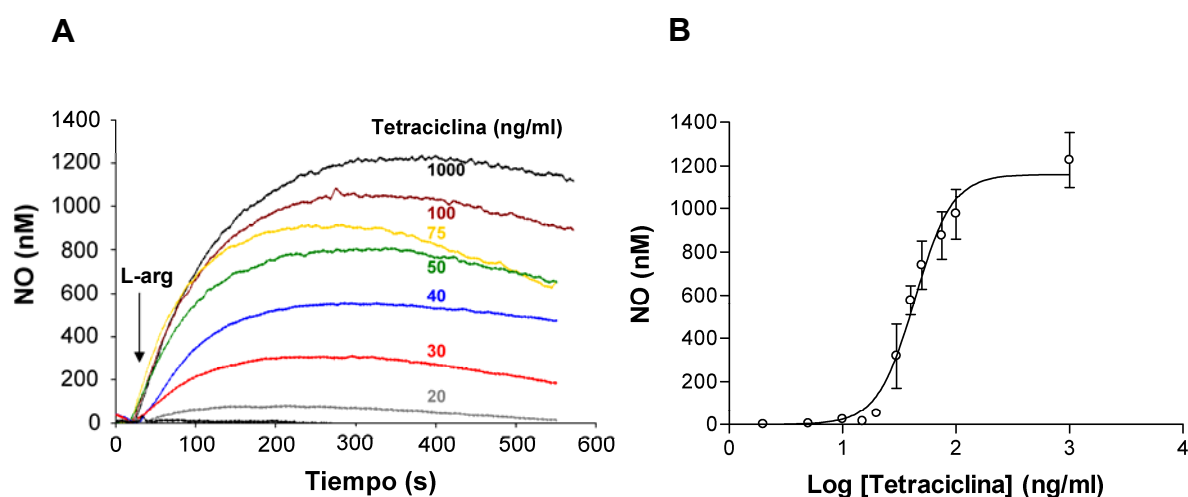


Figura 4.2. Producción endógena de NO de manera dependiente de la concentración de tetraciclina

(A) Detección electroquímica de NO gas en células tratadas con dosis crecientes de tetraciclina (10-1000 ng/ml). (B) Relación entre la concentración de tetraciclina utilizada para inducir la expresión de la iNOS y la producción máxima de NO obtenida con cada concentración de tetraciclina. El resultado presentado en (A) es representativo de 3 experimentos independientes. El resultado en (B) son los valores medios \pm S.D. de 3 experimentos independientes. L-arg: L-arginina (1 mM).

4.2. Sensibilidad relativa de las dos dianas principales del NO en las células: la guanilato ciclasa soluble (sGC) y la citocromo *c* oxidasa (CcO)

Como se expuso en la Introducción, existen dos dianas principales del NO en las células: la guanilato ciclasa soluble (sGC) y la citocromo *c* oxidasa (CcO). La sensibilidad relativa de ambas en presencia de concentraciones fisiológicas de O₂ es un tema controvertido, por lo que decidimos estudiarlo en el sistema celular Tet-iNOS 293.

4.2.1. Sensibilidad de la sGC al NO endógeno

4.2.1.1. Dosis-respuesta de la producción de cGMP inducida por el NO y estudio de curso-temporal de la producción de cGMP

Para examinar el efecto de la incubación con diferentes concentraciones de tetraciclina (2-100 ng/ml) sobre la cinética de la activación de la sGC, las células se incubaron con tetraciclina durante 14-16 h a 37 °C. A continuación se incubaron con medio sin L-arginina durante 1 h y a concentración atmosférica de O₂ (21% O₂). Seguidamente, se les añadió L-arginina (1 mM) para inducir la producción de NO durante intervalos de tiempo crecientes (10 s-5 min) (Figura 4.3).

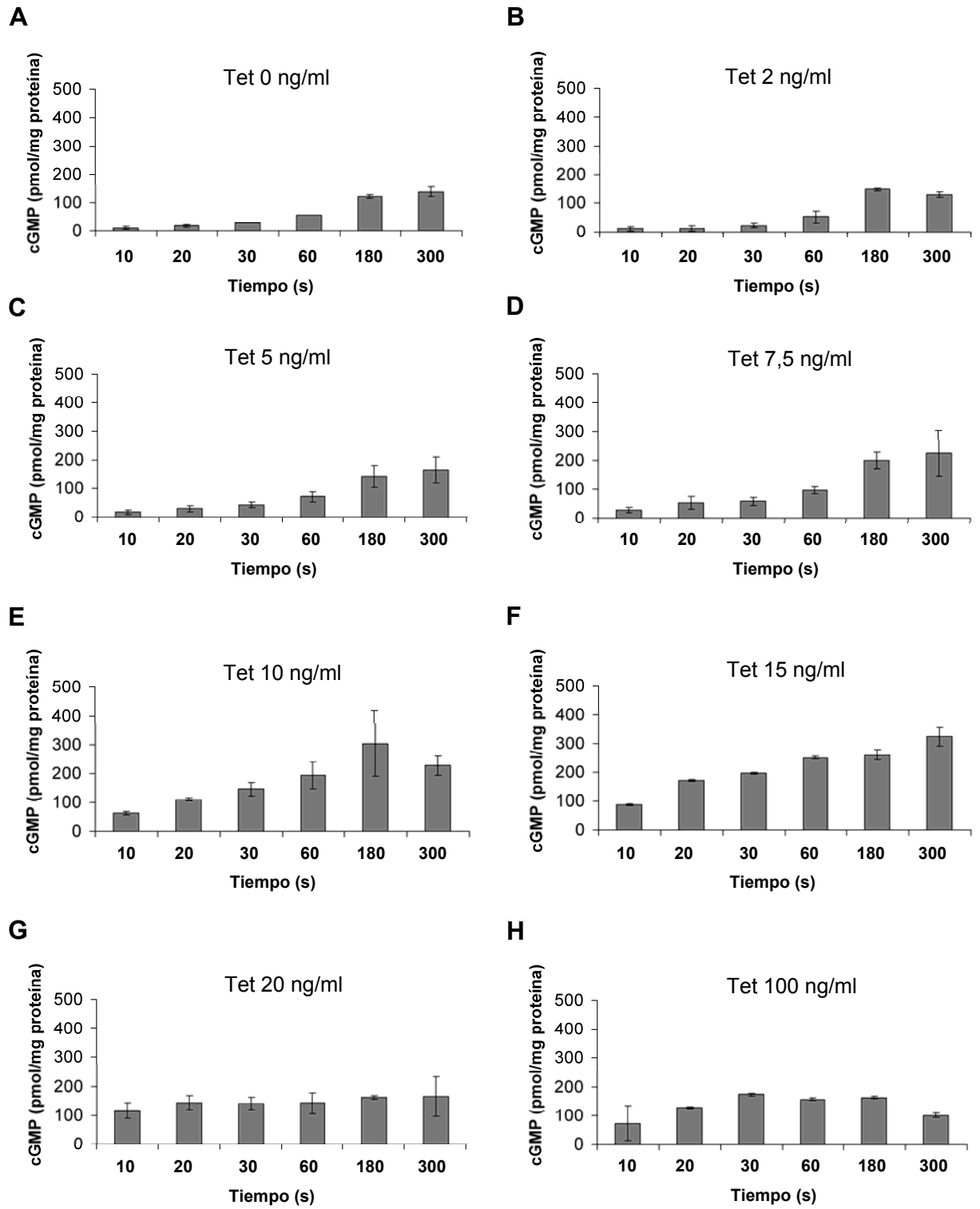


Figura 4.3. Producción de cGMP inducida por el NO endógeno al 21% de O₂

Experimento de curso-temporal de producción de cGMP inducido por el tratamiento durante 14-16 h con concentraciones crecientes de tetraciclina (0, 2, 5, 7,5, 10, 15, 20 y 100 ng/ml) (A-H) y la adición del sustrato de la iNOS, la L-arginina (1 mM). Se estudiaron los tiempos desde 10 s hasta 5 min tras la adición de L-arginina. Los resultados mostrados representan los valores medios \pm S.D. de al menos 3 experimentos independientes. Tet, tetraciclina.

La acumulación de cGMP se determinó mediante inmunoensayo. Se observó un aumento en la acumulación de cGMP en función del tiempo (a intervalos cortos), obteniéndose los niveles máximos con concentraciones de tetraciclina de 10 y 15 ng/ml, a los tiempos de incubación de 3 y 5 min, respectivamente (Figura 4.3 E y F). Las concentraciones de tetraciclina mayores de 15 ng/ml no provocaron una acumulación mayor de cGMP en las células.

Para comprobar si tiempos de incubación mayores a 5 min podían dar lugar a concentraciones más altas de cGMP, se realizó un experimento en el que se incubaron las células con L-arginina (1 mM) durante 10 min, y con la misma serie de concentraciones de tetraciclina que en el experimento anterior. En la Figura 4.4 se observa cómo el valor máximo de acumulación de cGMP se obtiene a los 3 min de incubación con L-arginina y con una dosis de tetraciclina de 10 ng/ml, de acuerdo con los resultados anteriores. En todos los casos, existía una disminución en la concentración de cGMP al incubar las células con L-arginina durante 10 min. Estos resultados indican que los tiempos de incubación mayores a 5 min no producen acumulaciones mayores de cGMP, y que el tiempo de incubación en el que la acumulación de cGMP es máxima, cuando la concentración de tetraciclina es de 10 ng/ml, es de 3 min.

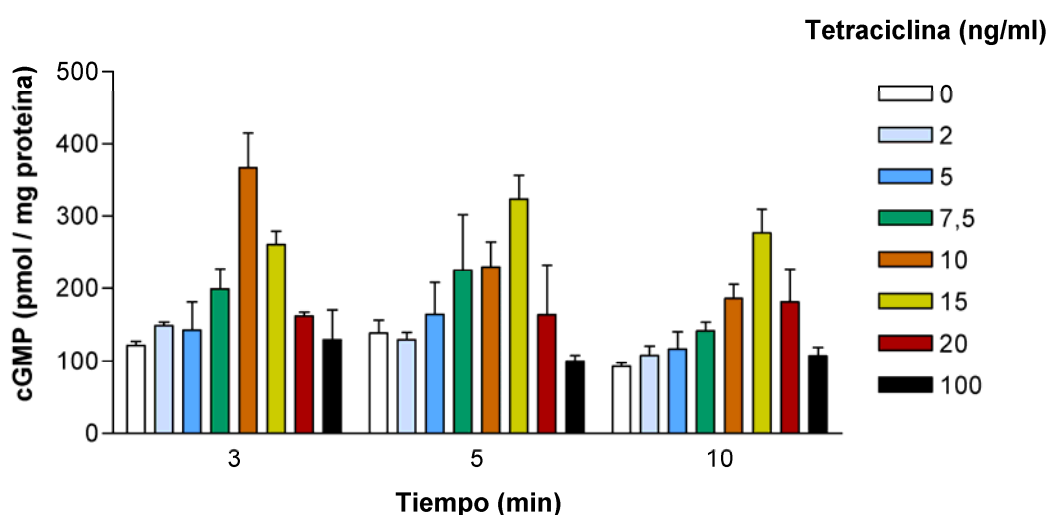


Figura 4.4. Producción de cGMP inducida por el NO endógeno al 21% de O₂ , durante intervalos de tiempo prolongados

Experimento de curso-temporal de producción de cGMP inducido por el tratamiento durante 14-16 h con tetraciclina (2-100 ng/ml) y la adición de L-arginina (1 mM). Se estudiaron los tiempos de 3, 5 y 10 min. Se observó la acumulación máxima de cGMP a los 3 min y 10 ng/ml de tetraciclina. Los resultados representan los valores medios \pm S.D. de al menos 3 experimentos independientes.

A continuación se estudió el efecto de la concentración de O_2 en la producción de cGMP inducida por el NO. Para ello, las células se incubaron con concentraciones crecientes de tetraciclina (2-50 ng/ml) en una cámara de hipoxia a una concentración de O_2 de $30 \mu\text{M}$ (Figura 4.5 A), que es, aproximadamente, la concentración de O_2 presente en los tejidos (Brown y Cooper, 1994).

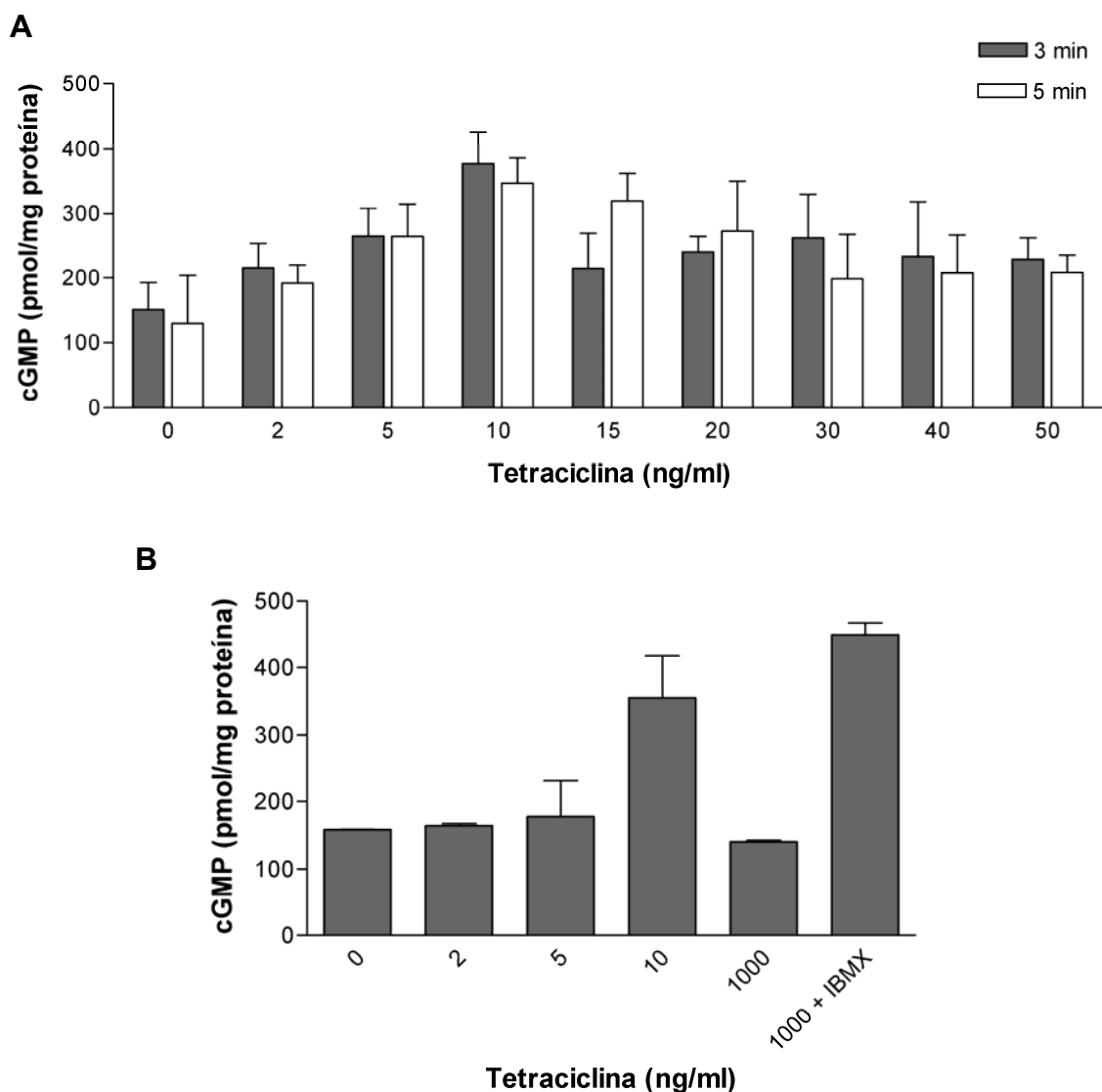


Figura 4.5. Producción de cGMP inducida por el NO endógeno a una concentración de O_2 de $30 \mu\text{M}$

(A) Las células se trataron durante 14-16 h con concentraciones crecientes de tetraciclina (2-50 ng/ml) y se determinó la producción de cGMP a 3 o 5 min tras la adición de L-arginina (1 mM). (B) Producción de cGMP en células tratadas con tetraciclina (2-1000 ng/ml) durante 14-16 h y suplementadas con L-arginina (1 mM) durante 3 min en presencia de IBMX (0,5 mM), un inhibidor de las PDEs endógenas. La adición de IBMX provoca un aumento en la acumulación de cGMP en comparación con el valor obtenido en las mismas condiciones sin IBMX. Los resultados representan los valores medios \pm S.D. de al menos 3 experimentos independientes.

El tiempo de tratamiento con el sustrato L-arginina (1 mM) fue el que se determinó anteriormente como aquel en el que se alcanza la mayor acumulación de cGMP, es decir, 3 min, incluyéndose también un punto a 5 min (Figura 4.5 A). En estas condiciones, la producción de cGMP aumentó de manera dosis-dependiente, hasta un valor máximo de 380 pmoles/mg de proteína a la dosis de tetraciclina de 10 ng/ml y, a continuación, disminuyó hasta un valor aproximado de 230 pmoles/mg de proteína, independientemente de la concentración de tetraciclina utilizada. Para comprobar si esta caída en la acumulación de cGMP se debía a la acción de las fosfodiesterasas (PDEs) presentes en la célula, realizamos el mismo experimento añadiendo un inhibidor de estas enzimas, el IBMX (isobutimetilxantina), a una concentración de 0,5 mM. Este inhibidor provocó un aumento drástico en el cGMP detectado, en comparación con el mismo tratamiento sin la adición de IBMX (Figura 4.5 B). A las dosis más altas de tetraciclina utilizadas (> 50 ng/ml) el NO fue capaz de activar a la sGC incluso sin la adición exógena del sustrato L-arginina (resultado no mostrado).

Para comprobar que la acumulación de cGMP se debía específicamente a la activación de la sGC por el NO, utilizamos un inhibidor de la sGC, el ODQ (1H-[1,2,4]oxadiazolo-[4,3a]quinoxalin-1-uno), a concentraciones 10 μ M y 50 μ M (Figura 4.6 A). La acumulación de cGMP observada tras la incubación de las células durante 14-16 h con tetraciclina (2-50 ng/ml) y la adición de L-arginina (1 mM) fue prevenida parcialmente tras la adición al medio de incubación durante 3 min de ODQ (10 μ M). Al aumentar la concentración de ODQ a 50 μ M, se alcanza una inhibición total de la sGC, incluso a las concentraciones de tetraciclina más altas. Estos resultados son compatibles con la naturaleza competitiva de la inhibición de la sGC por el ODQ (Zhao *et al.*, 2000). La acumulación de cGMP también fue prevenida totalmente tras la adición del inhibidor de la iNOS, S-EITU (S-etilisotiourea) a una concentración de 500 μ M (Figura 4.6 B). Estos experimentos anteriores demuestran que el aumento de cGMP observado puede atribuirse a la activación específica de la sGC por el NO. El NO producido tras la adición de L-arginina activa a la sGC, la cual genera cGMP a partir de GTP.

El activador de la sGC, BAY 41-2272, que es dependiente del grupo hemo de la enzima, pero independiente del NO (Stasch *et al.*, 2001), estimuló la producción de cGMP a concentraciones del mismo que saturaron el ensayo (> 500 pmoles/mg

proteína; Figura 4.6 B). En esta figura también se muestra que la activación de la sGC por el BAY 41-2272 se impide parcialmente por el ODQ (50 μ M).

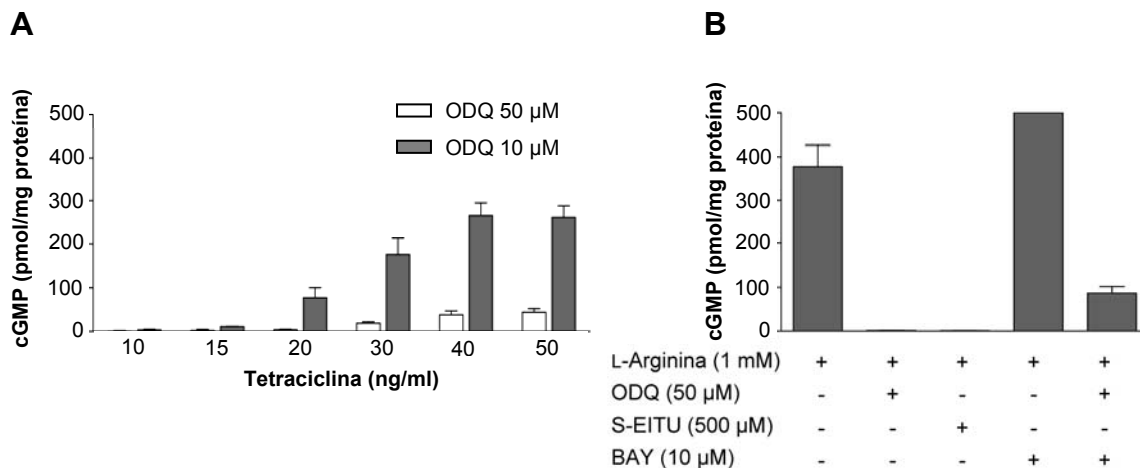


Figura 4.6. Producción de cGMP inducida por el NO endógeno a una concentración de O₂ de 30 μ M

(A) Producción de cGMP en células tratadas con tetraciclina (2-50 ng/ml) y en presencia del inhibidor de la sGC, ODQ (10 μ M o 50 μ M). La producción de cGMP se determinó a 3 min tras la adición de L-arginina (1 mM). (B) Producción de cGMP en células tratadas con tetraciclina (10 ng/ml). La adición de ODQ (50 μ M) o de S-EITU (500 μ M) durante el periodo de tratamiento de 3 min con L-arginina (1 mM) impidió la producción de cGMP. La adición del activador de la sGC BAY 41-2272 (10 μ M) dio lugar a la saturación del ensayo, si bien esta activación revierte en presencia de ODQ (50 μ M). Los datos representan las medias \pm S.D. de al menos 3 experimentos independientes.

También se realizaron estos experimentos en células HEK 293 transfectadas con el vector pcDNA5/FRT/TO, sin el gen de la iNOS, como control negativo de producción de NO. En estas células el tratamiento con tetraciclina durante 14-16 h y la adición de L-arginina (1 mM) no dio lugar a la acumulación de cGMP (resultado no mostrado).

La Figura 4.7 muestra la relación entre la concentración de NO producido endógenamente y la concentración de cGMP generado por la sGC, a los 3 min tras la adición de L-arginina, a 37 $^{\circ}$ C y a una concentración de O₂ de 30 μ M. A partir de esta gráfica, se puede calcular el valor de concentración de NO que induce el 50% de activación de la sGC (EC₅₀), que fue de 2,9 nM.

4.2.1.2. Efecto de la concentración de O₂ sobre la actividad de la sGC

Para examinar el efecto de la concentración de O₂ en la activación de la sGC inducida por el NO, las células se incubaron en cámaras de hipoxia a tres

concentraciones de O_2 diferentes (21, 3 y 1,5%). Se eligieron estas concentraciones porque son, aproximadamente, la concentración de O_2 presente en la atmósfera y a la que se han realizado la mayoría de los estudios previos (21%), y las concentraciones de O_2 presentes en los tejidos (3%) y en el interior de las células (1,5%). Las células se incubaron con tetraciclina (5 ng/ml) durante 14-16 h y, a continuación, se les añadió el sustrato L-arginina (1 mM) para estimular la producción de NO durante periodos de tiempo de hasta 5 min. En las Figuras 4.3 y 4.4 se puede apreciar que la producción de cGMP máxima se obtuvo cuando las células se trataron con una concentración de tetraciclina de 10 ng/ml. Sin embargo, en estos experimentos se utilizó la concentración de tetraciclina de 5 ng/ml porque permitía observar de una manera más clara el aumento de la producción de cGMP en función del tiempo (Figura 4.8).

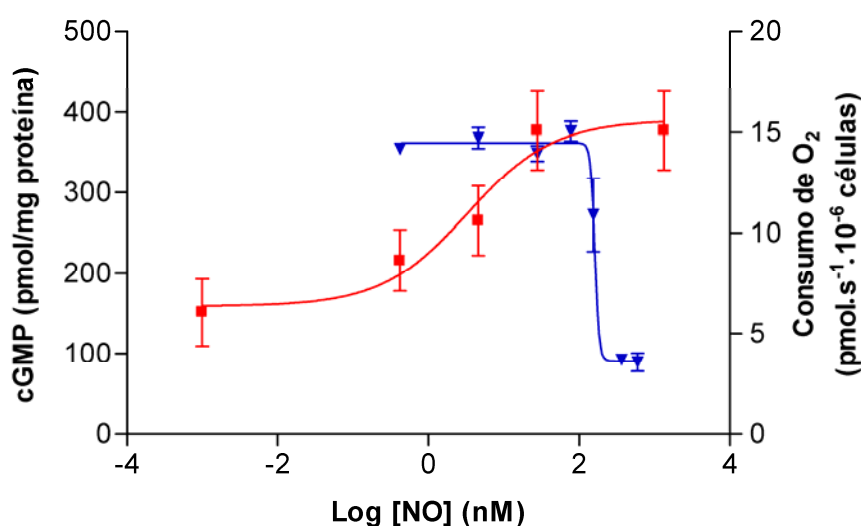


Figura 4.7. Curvas de dosis-respuesta al NO de la producción de cGMP y la inhibición de la respiración a una concentración de O_2 de $30 \mu M$

Producción de cGMP (línea roja) y consumo de O_2 (línea azul) en función de la concentración de NO. El valor de EC_{50} para la activación de la sGC por el NO es de 2,9 nM. El valor de IC_{50} para la inhibición de la respiración celular por el NO es de 141 nM (apartado 4.2.2). Los valores mostrados representan la media \pm S.D. de al menos 3 experimentos independientes.

Como se observa en la Figura 4.8 A, el cGMP comenzó a acumularse inmediatamente tras la adición de L-arginina, alcanzando el valor máximo a los 3 min y disminuyendo ligeramente a los 5 min. La cantidad de cGMP observada se corresponde con el equilibrio entre su producción y degradación. La adición de IBMX (0,5 mM), aumentó los niveles máximos de acumulación de cGMP en los extractos celulares,

llegando a saturar el ensayo desde los 3 min en adelante, y previno la disminución de cGMP en las incubaciones a tiempos más largos (Figura 4.8 B).

Los resultados indican que la producción de cGMP por la sGC es independiente de la concentración de O₂, aunque a la menor concentración de O₂ utilizada (15 μM) se observó una ligera disminución en la producción de cGMP (Figura 4.8 A). Este hecho podría explicarse debido a la dependencia de la iNOS por el O₂. A medida que la concentración de O₂ disminuye, la actividad de la iNOS desciende y, por consiguiente, también lo hace el grado de activación de la sGC por el NO.

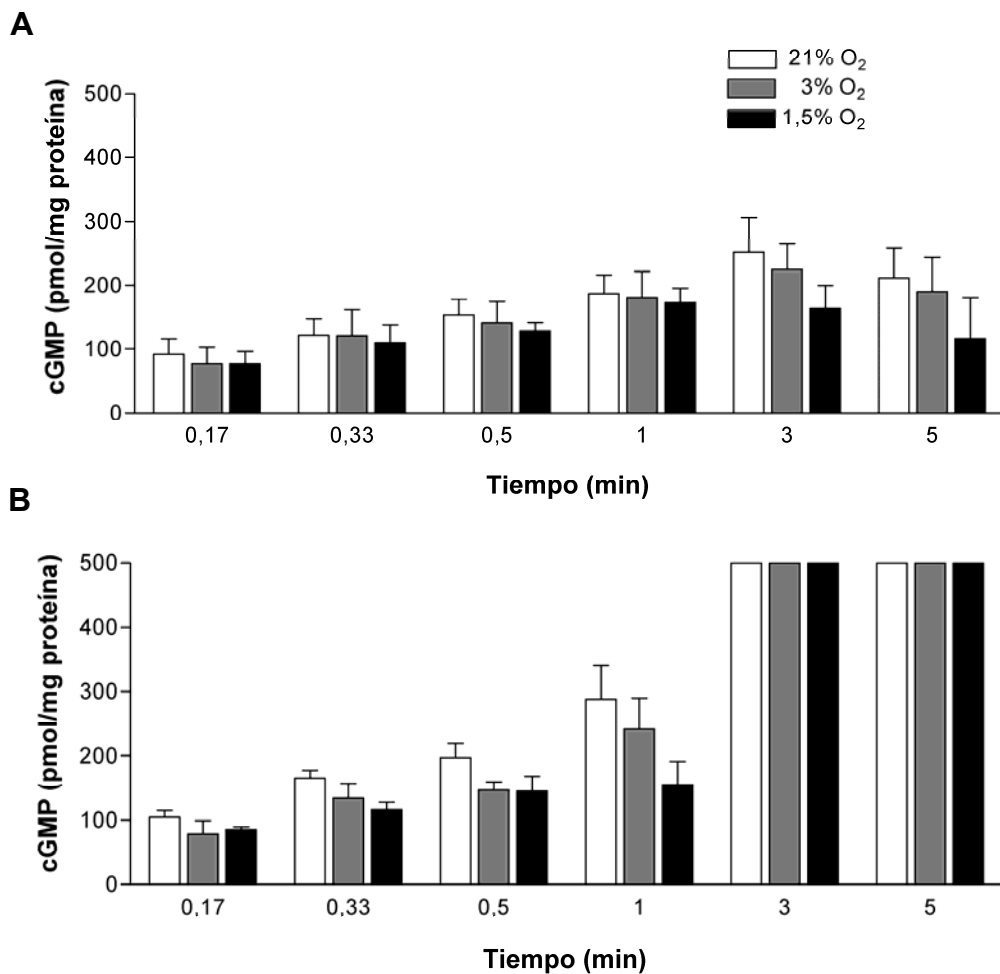


Figura 4.8. Efecto del tiempo y la concentración de O₂ sobre la producción de cGMP inducida por el NO endógeno

Las células se trataron con tetraciclina (5 ng/ml) durante 14-16 h y con L-arginina (1 mM) en ausencia (A) y en presencia (B) de IBMX (0,5 mM). Las medidas se realizaron en cámaras de hipoxia a tres concentraciones de O₂ diferentes (21, 3 y 1,5%). En ausencia de IBMX, la acumulación de cGMP máxima se detectó 3 min después de la adición de L-arginina. La producción de cGMP por la sGC es independiente de la concentración de O₂. Los datos representan la media ± S.D. de al menos 3 experimentos independientes.

4.2.1.3. Sensibilidad de la sGC al NO exógeno

Con el fin de comprobar si los resultados obtenidos con el NO endógeno podían reproducirse con NO exógeno, las células se trataron con DEA-NO (1 μ M), un donador rápido de NO cuya vida media es de 2,5 min a pH neutro y a 37 °C (Figura 4.9 A). La concentración de NO generada por el donador se estudió con un electrodo de NO (ISO-NO MarkII, WPI) insertado en la cámara de un electrodo de O₂ (Hansatech) mantenida a una temperatura constante de 37 °C. La concentración de NO liberada por el DEA-NO (1 μ M) en medio HBSS conteniendo 1×10^7 células/ml, fue de 268 ± 56 nM.

El patrón de producción de cGMP tras la adición de DEA-NO (1 μ M) (Figura 4.9 A) era similar al encontrado cuando utilizamos el NO endógeno producido por las células (Figura 4.8 A), es decir, un aumento en la concentración de cGMP dependiente del tiempo, que alcanza el valor máximo a los 3 min y disminuye ligeramente a los 5 min. Al añadir IBMX (0,5 mM), la concentración de cGMP aumentó de manera significativa, saturando el ensayo (> 500 pmoles/mg proteína) tanto a 3 min como a 5 min.

A continuación, estudiamos el patrón de acumulación de cGMP en células tratadas con diferentes concentraciones de DEA-NO, estableciendo el tiempo de incubación como el que propició una mayor acumulación de cGMP en el experimento de curso-temporal, 3 min (Figura 4.9 A). Así, las células fueron incubadas durante 3 min con DEA-NO (0,02-200 μ M) en presencia o ausencia del inhibidor IBMX (Figura 4.9 B). Concentraciones de DEA-NO muy diferentes (2, 20 y 200 μ M) dan lugar a concentraciones de NO muy distintas en el medio HBSS con 1×10^7 células/ml a 37 °C (918 ± 79 nM, 9217 ± 928 nM y > 9 μ M, respectivamente). Estas concentraciones de NO generadas por el DEA-NO no dieron lugar a valores de acumulación de cGMP diferentes. La adición de IBMX (0,5 mM) aumentó la acumulación de cGMP hasta casi saturar el ensayo cuando las concentraciones de DEA-NO eran superiores a 2 μ M.

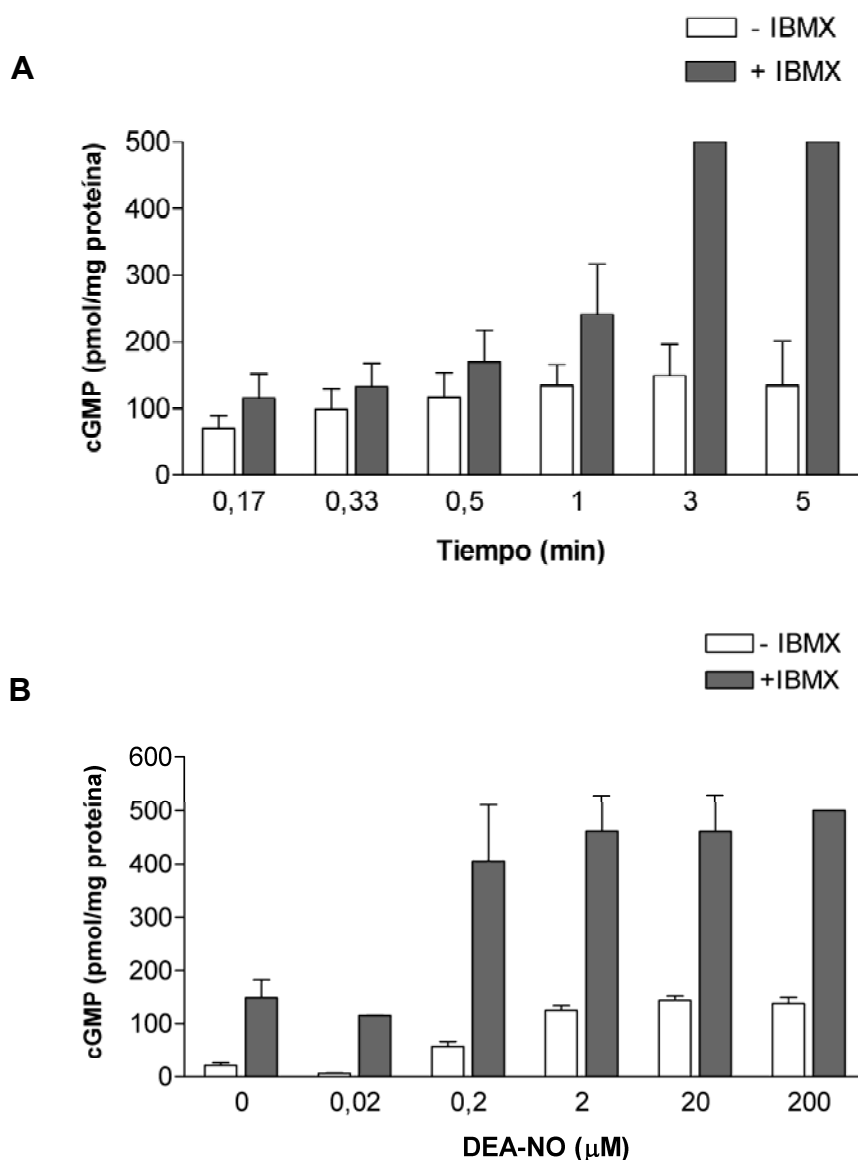


Figura 4.9. Producción de cGMP inducida por DEA-NO

(A) Estudio de curso-temporal de la producción de cGMP en células tratadas con DEA-NO ($1 \mu\text{M}$) en presencia o ausencia de IBMX ($0,5 \text{ mM}$) y a una concentración de O_2 de $30 \mu\text{M}$. La acumulación de cGMP máxima se detectó a los 3 min. El IBMX aumentó significativamente la acumulación de cGMP, saturando el sistema de detección a los 3 y 5 min. (B) Ensayo de dosis-respuesta de la producción de cGMP inducida por el tratamiento de las células con DEA-NO ($0,02$ - $200 \mu\text{M}$) durante 3 min, en presencia o ausencia de IBMX y a una concentración de O_2 de $30 \mu\text{M}$. Los datos representan las medias \pm S.D. de 3 experimentos independientes.

La acumulación de cGMP en células tratadas con dos concentraciones de DEA-NO ($1 \mu\text{M}$ y $40 \mu\text{M}$) fue similar tanto si las células se incubaban a una concentración de O_2 de $30 \mu\text{M}$ como de $15 \mu\text{M}$, lo que indica que la activación de la sGC por el NO generado por el DEA-NO es independiente de la concentración de O_2 (Figura 4.10).

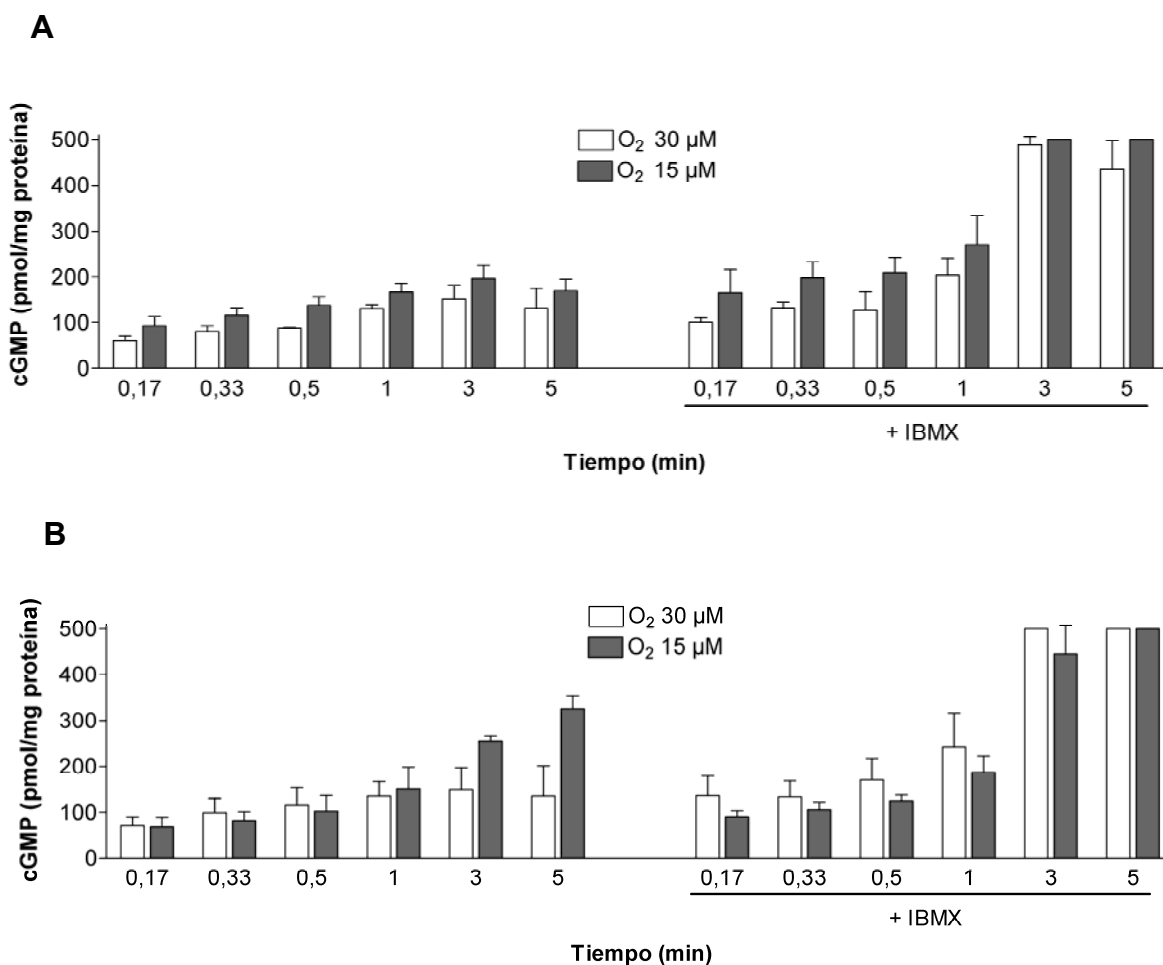


Figura 4.10. Producción de cGMP inducida por DEA-NO a diferentes concentraciones de O₂

Experimento de curso-temporal de la producción de cGMP en células tratadas con DEA-NO 1 μM (A) o 40 μM (B) en presencia o ausencia de IBMX (0,5 mM) y realizado a dos concentraciones de O₂ diferentes (30 μM y 15 μM). Los datos representan las medias ± S.D. de 3 experimentos independientes.

4.2.2. Sensibilidad de la respiración mitocondrial al NO endógeno

Para estudiar la sensibilidad de la respiración mitocondrial al NO endógeno, se determinaron paralelamente la producción de NO y la tasa de respiración mediante la utilización de un respirómetro de alta resolución, que permite medir con gran precisión la respiración a tensiones de O₂ bajas (Gnaiger, 2001) (Tabla 4.1).

Tetraciclina (ng/ml)	[NO] (nM)	Respiración a 30 μM O_2 (pmol $\text{O}_2/\text{s}\cdot 10^6$ células)
2	n.d.	14,2 \pm 0,17
5	n.d.	14,7 \pm 0,53
10	n.d.	13,9 \pm 0,38
15	14,5 \pm 9,08	15,1 \pm 0,50
20	52,4 \pm 9,34	10,9 \pm 1,80
30	318 \pm 128	3,69 \pm 0,05
40	576 \pm 59,8	3,58 \pm 0,45
50	739 \pm 96,9	4,62 \pm 0,16

Tabla 4.1. Tasa de respiración a concentraciones de NO crecientes y a 30 μM O_2

Las medidas de la concentración de NO y la respiración en células control y células que producen NO (1×10^7 células/ml) se realizaron con un electrodo de NO (ISO-NOP, WPI) situado en la cámara de un electrodo tipo Clark (Hansatech) y en un respirómetro de alta resolución (Oroboros Oxygraph-2k), en paralelo y a 37 °C, como se explica en la sección de Métodos (apartados 3.3 y 3.4). La producción de NO se inició tras la adición de L-arginina (1 mM) a 60 μM O_2 . Los datos son las medias \pm S.D. de 3 experimentos independientes. n.d., No determinado.

En estos experimentos se añadió el sustrato de la iNOS, la L-arginina (1 mM), cuando la concentración de O_2 era 60 μM . Como se muestra en la Figura 4.11 D, en las células tratadas durante 14-16 h con una concentración alta de tetraciclina (50 ng/ml), el consumo de O_2 se inhibió significativamente inmediatamente tras la adición de L-arginina, en comparación con las células no tratadas con tetraciclina (Figura 4.11 A). El valor control de la respiración (células no tratadas con tetraciclina) fue $14 \pm 0,8$ pmoles de $\text{O}_2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot 10^{-6}$ células. Debido a que la inhibición de la CcO por el NO es competitiva con el O_2 , el grado de inhibición de la respiración es dependiente de la concentración de O_2 y, por ello, el NO es más efectivo como inhibidor cuando las concentraciones de O_2 son menores. Así, en las células tratadas con la concentración de tetraciclina más alta utilizada en estos experimentos (50 ng/ml), la inhibición de la respiración respecto al valor control fue del 49% a una concentración de O_2 de 50 μM , y del 67% a una concentración de O_2 de 30 μM . La concentración de tetraciclina más baja que tuvo un efecto sobre la respiración a concentraciones bajas de O_2 (< 30 μM) fue 20 ng/ml (Figura 4.11 C), mientras que las concentraciones de tetraciclina inferiores (2 ng/ml) no tuvieron un efecto apreciable (Figura 4.11 B). A concentraciones fisiológicas de O_2 (30 μM), la concentración de NO que inhibió la respiración al 50% (IC_{50}) fue 141 nM (Figura 4.7).

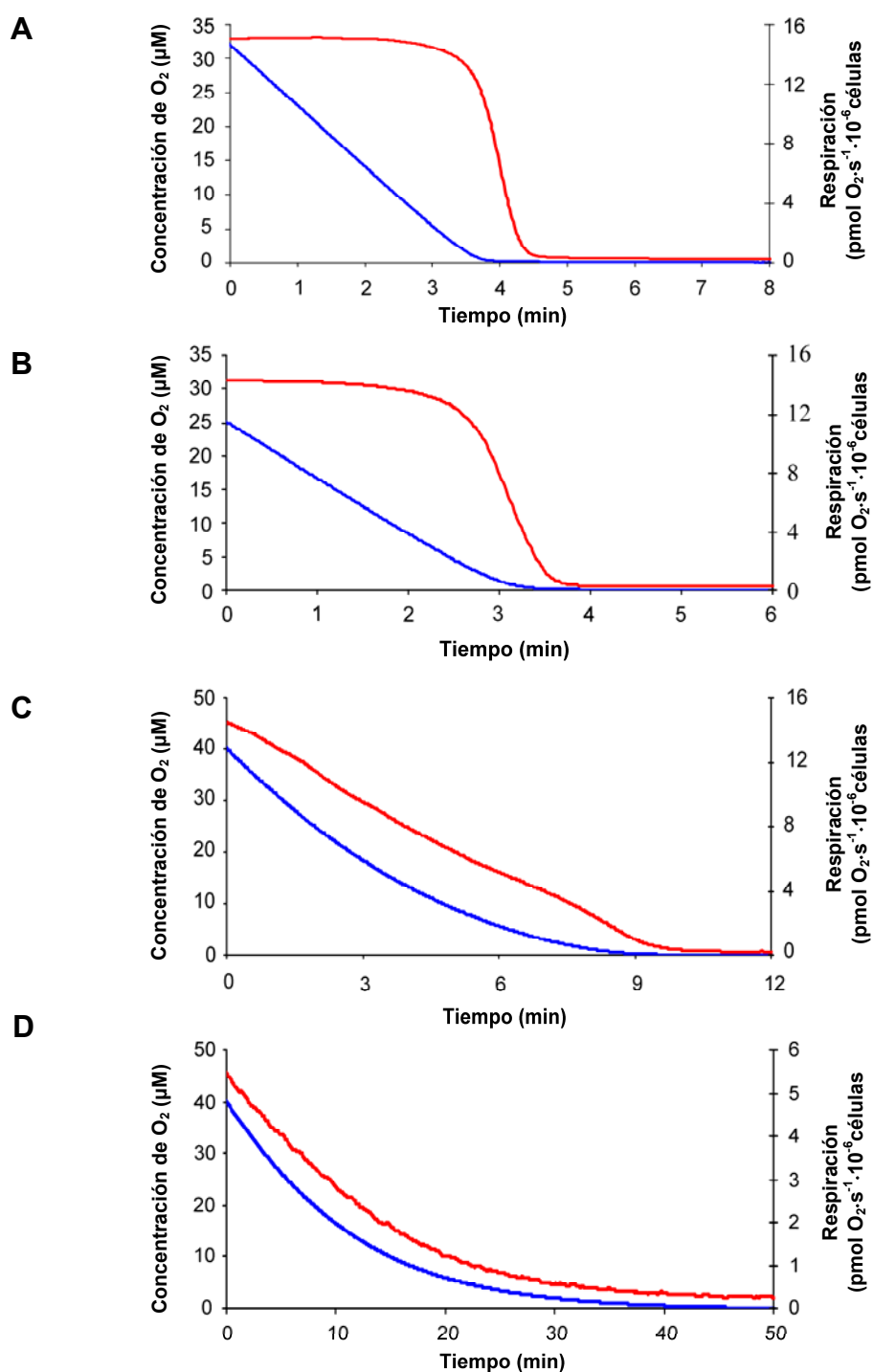


Figura 4.11. Inhibición de la respiración por el NO endógeno

Registro de la concentración de O_2 (línea azul) y la respiración (línea roja) determinadas mediante respirometría de alta resolución en células tratadas durante 14-16 h con 0 (A), 2 (B), 20 (C) o 50 (D) ng/ml de tetraciclina. La producción de NO se inició mediante la adición de L-arginina (1 mM) a una concentración de O_2 de $60 \mu M$. Las concentraciones bajas de O_2 [$\leq 40 \mu M$ (C, D) y $\leq 25 \mu M$ (A, B)] y la respiración correspondiente se representan en función del tiempo. Los registros son representativos de al menos 3 experimentos independientes.

Debido a que la inhibición de la CcO por el NO es competitiva con el O₂, podría ocurrir que, a concentraciones bajas de NO, al disminuir la concentración de O₂, la inhibición fuese mayor y encontrásemos diferencias entre las células no tratadas y las tratadas con L-arginina. Para determinar si la inhibición de la respiración inducida con concentraciones bajas de NO (< 14 nM) era detectable a concentraciones menores de O₂, se realizaron experimentos en células tratadas con concentraciones de tetraciclina bajas (2, 5 y 10 ng/ml) a las que se añadió L-arginina (1 mM) a una concentración de O₂ de 30 μM en lugar de 60 μM, y se determinaron los valores de respiración a una concentración de O₂ de 15 μM. La cantidad de NO producida en estas condiciones no pudo ser detectada en ningún caso, puesto que se encontraba por debajo del límite de detección del electrodo de NO. No se observó un efecto del NO sobre la respiración a ninguna de las 3 concentraciones. La ausencia de efecto del NO sobre la respiración se muestra en la Tabla 4.2, en la que se reflejan los valores de respiración a una concentración de O₂ de 15 μM como el porcentaje del valor de respiración determinado a una concentración de O₂ de 40 μM (antes de la adición de L-arginina). Estos resultados indican que no hay diferencias en la tasa de respiración en ningún caso.

Tetraciclina (ng/ml)	L-arginina (1 mM)	Respiración a 15 μM O₂ (% de la respiración a 40 μM O ₂)
2	+	98,4 ± 1,7
	-	99,8 ± 1,2
5	+	96,6 ± 3,0
	-	99,7 ± 0,5
10	+	97,1 ± 0,8
	-	98,2 ± 1,4

Tabla 4.2. Tasa de respiración a concentraciones bajas de NO y a una concentración de O₂ de 15 μM

La tasa de respiración a una concentración de O₂ de 15 μM se expresa como el porcentaje respecto a la respiración a una concentración de O₂ de 40 μM (antes de la adición de L-arginina) en células tratadas con dosis de tetraciclina bajas. Las medidas de concentración de O₂ y de respiración en células control (sin L-arginina) y en células que producen NO (L-arginina 1 mM) se realizaron en las cámaras de un respirómetro de alta resolución (Oroboros Oxygraph-2k) a 37 °C, como se explica en la sección de Métodos (apartado 3.4). La producción de NO se inició tras la adición de L-arginina a una concentración de O₂ de 30 μM. Los datos corresponden al valor medio ± S.D. de 3 experimentos independientes.

4.2.2.1. Reversibilidad de la inhibición de la CcO por el NO

Para comprobar si la inhibición de la CcO por el NO era reversible, se realizó un ensayo en el que las células se trataron durante 14-16 h con una concentración alta de tetraciclina (1000 ng/ml) y se realizaron medidas de respiración en el respirómetro de alta resolución. Se añadió el sustrato de la iNOS, la L-arginina (1 mM), cuando el valor de la concentración de O₂ era de 60 μM. Una vez que la producción de NO se estabilizó en torno a un valor de 1,5 μM, se añadió oxihemoglobina (HbO₂), un agente quelante de NO. La adición de HbO₂ reactivó completamente la respiración celular (Figura 4.12), lo que demuestra que el efecto de inhibición del NO es totalmente reversible.

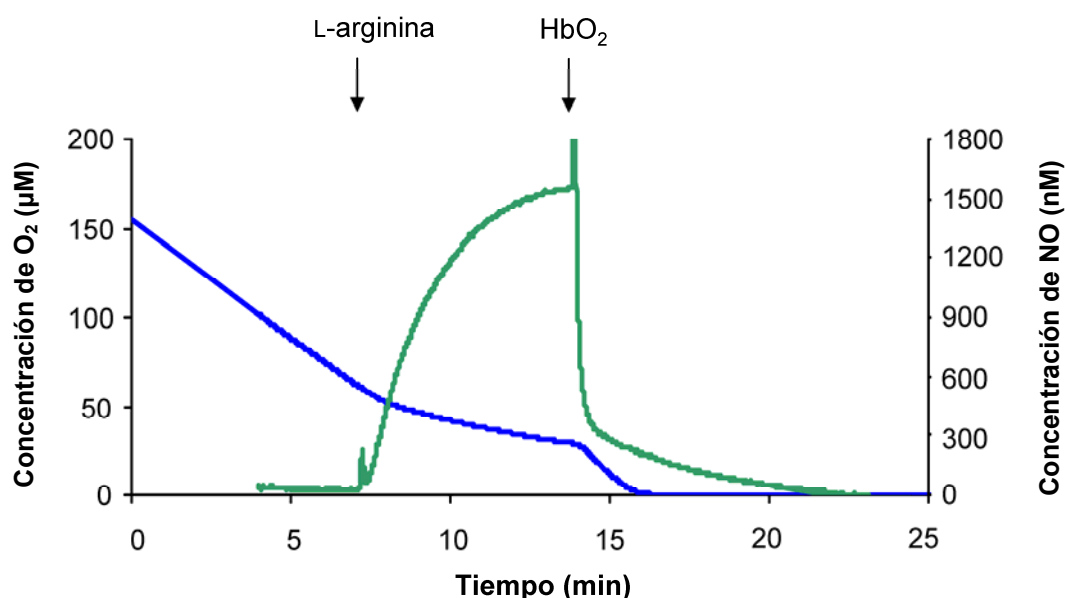


Figura 4.12. Reversibilidad de la inhibición de la respiración inducida por el NO endógeno

Registro simultáneo de la concentración de O₂ (línea azul) y de la producción del NO (línea roja) en células tratadas con 1000 ng/ml de tetraciclina. La producción de NO comenzó tras la adición de L-arginina (1 mM), lo que provocó la inhibición inmediata de la respiración. La adición de HbO₂ secuestró al NO y se recuperaron los valores basales de respiración. El resultado es representativo de 3 experimentos independientes.

4.2.3. Efectos del NO sobre las vías de señalización celular dependientes de la proteína quinasa dependiente de cGMP (PKG) y de la proteína quinasa activada por AMP (AMPK)

Para estudiar las consecuencias de los efectos mediados por el NO en las células sobre la señalización celular, teniendo en cuenta el hecho de que la actividad de la CcO puede ser inhibida parcialmente sin un efecto en la respiración, se examinaron los

efectos mediados por el NO en la señalización celular a través de la proteína PKG y la proteína quinasa activada por AMP (AMPK).

Para examinar los efectos del NO mediados por la PKG, se analizó el patrón de fosforilación de la fosfoproteína estimulada por vasodilatadores (VASP). Esta proteína, expresada en la mayoría de los tejidos de los mamíferos, es fosforilada directamente por la PKG en su Ser¹⁵⁷, dando lugar a un cambio en su movilidad electroforética. De este modo, la proteína VASP se puede considerar como un buen biomarcador de la actividad de la PKG (Andre *et al.*, 2005). Por otra parte, la proteína AMPK es fundamental en la regulación de la homeostasis energética de la célula (Introducción, apartado 1.7.2) y su fosforilación está relacionada con cambios en la relación AMP/ATP celular (McGee y Hargreaves, 2008). Así, la AMPK es un buen marcador de la señalización mediada por la inhibición de la CcO por el NO, puesto que esta inhibición provocaría una disminución en la producción de ATP y un aumento en la relación AMP/ATP, lo que activaría a la AMPK por fosforilación. El estudio de su patrón de fosforilación, mediante western blot, nos permite conocer cómo afecta el grado de inhibición de la CcO por el NO en la regulación de las rutas de señalización en las que interviene la AMPK.

Los experimentos de curso-temporal en células tratadas con tetraciclina (5 ng/ml) indicaron que la fosforilación de VASP mediada por el NO era máxima a 1 min, mientras que la fosforilación de AMPK era máxima tras 15 min de incubación con L-arginina (Figuras 4.13 y 4.14). El aumento de la fosforilación de VASP fue transitorio, disminuyendo tras 1 min, mientras que la fosforilación de AMPK se mantuvo durante al menos 1 h.

El experimento de dosis-respuesta para la fosforilación de VASP mediada por el NO indicó que el NO produjo un valor máximo en la tasa *VASP fosforilado/VASP* cuando las células fueron tratadas con 2 ng/ml de tetraciclina. Concentraciones superiores de tetraciclina dieron lugar a valores de la tasa inferiores (Figura 4.15).

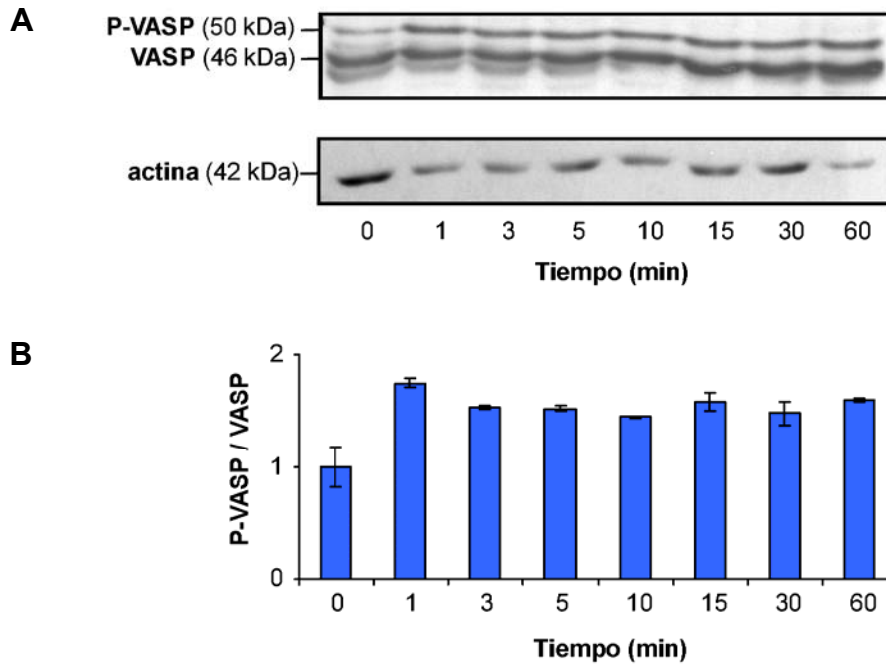


Figura 4.13. Estudio de curso-temporal de la fosforilación de VASP inducida por el NO endógeno

(A) Western blot de las formas fosforilada (P-VASP) y no fosforilada de VASP en su Ser¹⁵⁷ tras el tratamiento con tetraciclina 5 ng/ml. La producción de NO se indujo tras la adición de L-arginina (1 mM) durante el tiempo indicado en la gráfica antes de la lisis celular. (B) La densitometría representa la relación P-VASP/VASP. El resultado es representativo de 2 experimentos independientes. Los valores indican un rápido aumento en P-VASP, que se mantiene constante durante al menos 60 min.

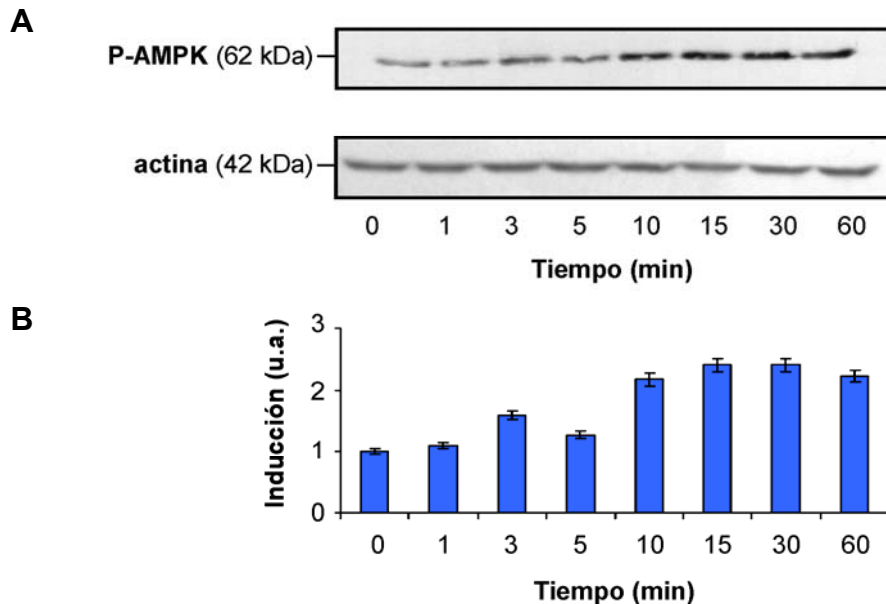


Figura 4.14. Estudio de curso-temporal de la fosforilación de AMPK inducida por el NO endógeno

(A) Western blot de la proteína AMPK fosforilada (P-AMPK) realizado en células tratadas con tetraciclina 50 ng/ml. El tiempo indica los minutos desde la adición de la L-arginina (1 mM) hasta la lisis celular. El resultado es representativo de 2 experimentos independientes. (B) La densitometría representa el grado de inducción de AMPK. Los valores indican un aumento gradual en la fosforilación de AMPK, que alcanza su valor máximo a los 30 min.

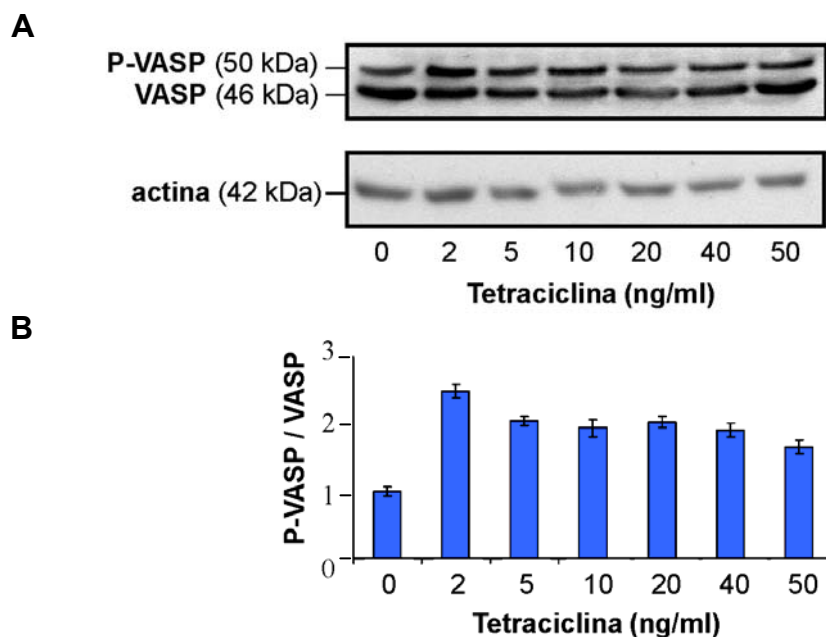


Figura 4.15. Estudio de dosis-respuesta de la fosforilación de VASP inducida por el NO endógeno

(A) Western blot de las formas fosforilada (P-VASP) y no fosforilada de VASP en su Ser¹⁵⁷ tras el tratamiento con una serie de concentraciones de tetraciclina (2-50 ng/ml). La producción de NO se indujo tras la adición de L-arginina (1 mM) 1 min antes de la lisis celular. (B) La densitometría representa la relación P-VASP/VASP. El resultado es representativo de 2 experimentos independientes. Los valores indican un rápido aumento de P-VASP, alcanzando el valor máximo cuando las células fueron tratadas con 2 ng/ml de tetraciclina.

Para comprobar que la fosforilación de VASP observada dependía de la activación de la sGC, se utilizó el 8-Br-cGMP, un análogo del cGMP capaz de atravesar la membrana plasmática. El 8-Br-cGMP (100 μ M) indujo la fosforilación de VASP en ausencia de NO (Figura 4.16). Por otra parte, la utilización del inhibidor específico de la sGC, ODQ (50 μ M), confirmó que la fosforilación de VASP dependía de la activación de la sGC (Figura 4.16).

En el caso de la fosforilación de AMPK mediada por el NO, se observó que el NO produjo una inducción de la fosforilación de AMPK dependiente de la concentración de tetraciclina, alcanzando el valor máximo cuando las células se trataron con tetraciclina 50 ng/ml (Figura 4.17).

Estos experimentos de análisis de la fosforilación de VASP y AMPK inducida por el NO concuerdan con los resultados presentados anteriormente, indicando que la señalización mediada por la ruta NO-PKG se activa a concentraciones de NO menores que la señalización mediada por la ruta NO-AMPK.

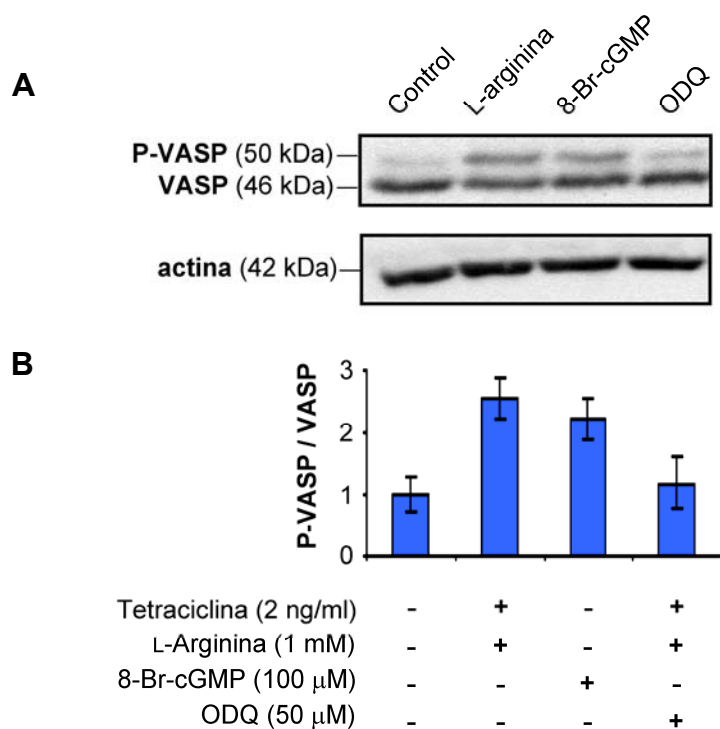


Figura 4.16. Especificidad de la fosforilación de VASP inducida por el NO endógeno a través de la ruta de señalización sGC-PKG

(A) Western blot de las formas fosforilada (P-VASP) y no fosforilada de VASP en su Ser¹⁵⁷. La exposición durante 1 min al 8-Br-cGMP (100 μ M) indujo la fosforilación de VASP en las células no tratadas con tetraciclina, mientras que la adición de ODQ (50 μ M) a las células tratadas con tetraciclina (2 ng/ml) y con L-arginina (1 mM), previno la fosforilación de VASP. (B) La densitometría representa la relación P-VASP/VASP.

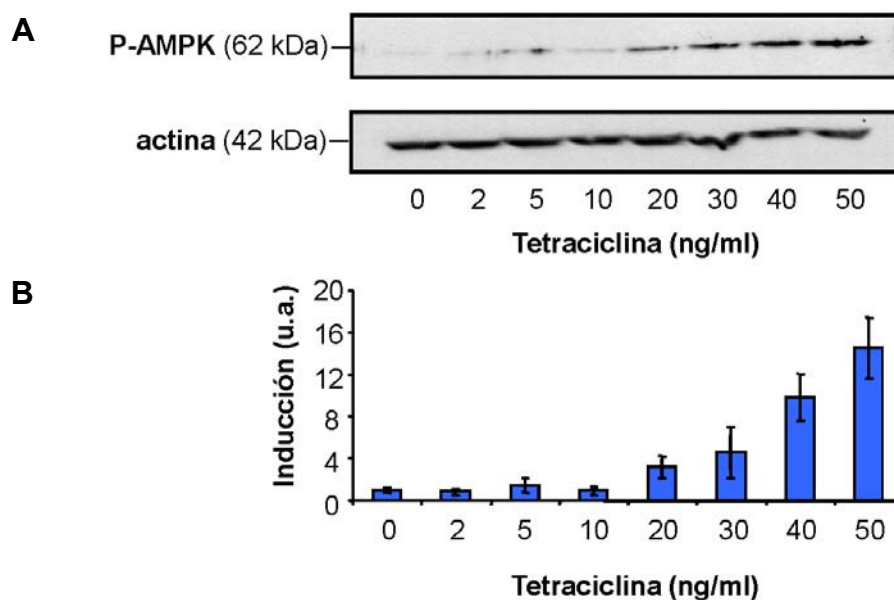


Figura 4.17. Estudio de dosis-respuesta de la fosforilación de AMPK inducida por el NO endógeno

(A) Western blot de la proteína AMPK fosforilada (P-AMPK) realizado en células tratadas con una serie de concentraciones de tetraciclina (2-50 ng/ml). La producción de NO se indujo mediante la adición de L-arginina (1 mM), 15 min antes de la lisis celular. (B) La densitometría representa el grado de inducción de AMPK. El resultado es representativo de 2 experimentos independientes. Los valores indican un aumento gradual en la fosforilación de AMPK en función de la concentración de tetraciclina, alcanzando su máxima acumulación cuando las células se trataron con 50 ng/ml.

4.3. Modelo cinético de inhibición de la CcO por el NO y dinámica de producción y degradación del NO en hipoxia y durante la transición a anoxia

4.3.1. Respiración celular en ausencia de NO

La respiración celular con sustratos endógenos se determinó en células que no expresaban la iNOS, resuspendidas en medio HBSS suplementado con Hepes 25 mM. El consumo de O₂ basal fue $14,5 \pm 1,9$ pmoles O₂·s⁻¹·10⁻⁶ células (Tabla 4.3). La respiración en presencia del agente desacoplante FCCP [carbonilcianuro *p*-(trifluorometoxi) fenilhidrazona] 350 nM fue 3 veces superior a la respiración basal, indicando que la respiración endógena tiene un amplio margen de activación y no está limitada por la concentración de sustrato. Tras la adición de oligomicina 80 ng/ml para inhibir la síntesis de ATP, la respiración disminuyó hasta aproximadamente el 10% de la respiración en presencia de FCCP, o el 30% de la respiración basal. Esto muestra que una gran parte de la respiración basal está acoplada a la síntesis de ATP. El consumo de O₂ residual, medido tras la adición de KCN 1 mM para inhibir a la CcO, fue de tan sólo el 3% de la respiración basal. Todas las medidas de respiración posteriores se corrigieron para eliminar el consumo de O₂ residual.

Condición	Respiración (pmol O ₂ ·s ⁻¹ ·10 ⁻⁶ células)	Respiración (respecto a FCCP)
Basal	14,5 ± 1,90	0,310 ± 0,030
Oligomicina (80 ng/ml)	4,20 ± 0,40	0,089 ± 0,004
FCCP (350 nM)	47,4 ± 7,10	
KCN (1 mM)	0,51 ± 0,08	0,011 ± 0,003

Tabla 4.3. Respiración basal, respiración en presencia de oligomicina, capacidad máxima de transporte electrónico y respiración residual en presencia de cianuro en las células Tet-iNOS 293

La tabla muestra la respiración en células control en ausencia de NO. La respiración basal se determinó utilizando los sustratos endógenos. La respiración en presencia de oligomicina (80 ng/ml) es la respiración celular en ausencia de síntesis de ATP. La respiración en presencia del agente desacoplante FCCP (350 nM) indica la capacidad máxima de la ETC. La respiración residual se determinó tras la adición de KCN (1 mM).

4.3.2. Cinética de consumo de O_2 en ausencia de NO en hipoxia y durante la transición a anoxia

En ausencia de NO, la respiración a concentraciones bajas de O_2 ($< 11 \mu M$) se ajustó perfectamente a una función hiperbólica (Figuras 4.18 A, B). La concentración de O_2 a la que el valor de la respiración es la mitad del valor basal, c_{50} (Gnaiger *et al.*, 2000) fue $0,65 \pm 0,04 \mu M$ en las células control (que no expresaban la iNOS) y no cambió tras la adición de L-arginina (1 mM) (Figura 4.18 B).

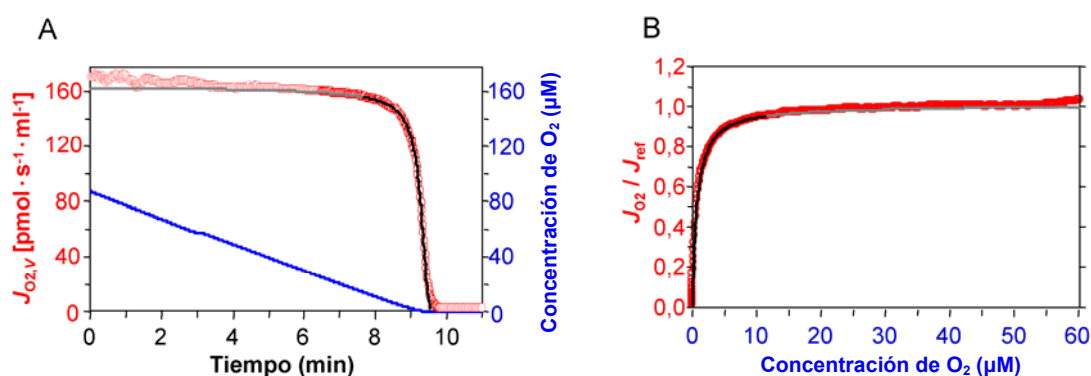


Figura 4.18. Efecto limitante de la concentración de O_2 en la respiración celular

Se realizaron medidas simultáneas de concentración de O_2 y consumo de O_2 en células que no se trataron con tetraciclina. El consumo de O_2 ($J_{O_2,v}$, línea roja) y la concentración de O_2 (línea azul) están representados en función del tiempo (A). El consumo de O_2 relativo al consumo de O_2 medido a concentraciones saturantes de O_2 (J_{ref} , línea roja) están representados en función de la concentración de O_2 (B). El consumo de O_2 está simulado con un ajuste hiperbólico (línea negra).

4.3.3. Producción endógena de NO e inhibición de la respiración a concentraciones bajas de O_2 ($< 30 \mu M$)

Las células se incubaron durante 14-16 h con una serie de concentraciones crecientes de tetraciclina (10-50 ng/ml) para inducir la expresión de la iNOS. La adición de L-arginina (1 mM) cuando la concentración de O_2 era $60 \mu M$ desencadenó la producción inmediata de NO. La concentración de NO aumentó de manera constante, alcanzando un valor máximo y disminuyendo a continuación (Figuras 4.19 A-F; línea verde).

La cantidad de NO producido por las células tras la adición de L-arginina era proporcional al nivel de expresión de la iNOS. Cuando la concentración de O₂ disminuyó hasta ~15 μM la degradación y la producción de NO alcanzaron un equilibrio. Cuando la concentración de O₂ fue menor a 15 μM, la concentración de NO disminuyó progresivamente hasta su desaparición. Esto es debido a que la actividad de la iNOS depende de la concentración de O₂ (la iNOS tiene un valor relativamente alto de K_m para el O₂, alrededor de 25 μM (Rengasamy y Johns, 1996; Santolini *et al.*, 2001). Al añadir L-arginina en ausencia de O₂ no se observó la producción de NO (resultado no mostrado).

A concentraciones bajas de O₂ (< 30 μM), la presencia de niveles bajos de NO (30 nM) dio lugar a una disminución de la cinética de la respiración celular, en comparación con la observada en las células en ausencia de NO, puesto que el valor de K_m de la CcO por el O₂ aumenta en presencia de NO (comparar las Figuras 4.18 B y 4.19 B).

Para cada uno de los experimentos se determinó el valor de referencia de la respiración (J_{ref}), que se corresponde con el valor de la respiración a concentraciones de O₂ no limitantes, medido previamente a la adición de L-arginina. Tras la adición de L-arginina se produjo un aumento rápido en la concentración de NO (Figura 4.19 A-F; línea verde), lo que provocó la disminución en la tasa de consumo de O₂ (Figura 4.19 A-F; línea roja). La concentración de NO se estabiliza al alcanzar el equilibrio entre la producción y la degradación de NO, y comienza a disminuir cuando las concentraciones de O₂ son limitantes para la síntesis de NO por la iNOS (< 20 μM).

En estos experimentos se observaron dos efectos llamativos. Primero, la CcO mantuvo una actividad residual, incluso en presencia de concentraciones altas de NO y concentraciones bajas de O₂ (Figura 4.19 F), a pesar de que la inhibición de la CcO ya era detectable a concentraciones bajas de NO (< 100 nM). Este efecto no se puede explicar por el consumo de O₂ por otros sistemas enzimáticos, puesto que el consumo de O₂ no mitocondrial fue previamente corregido, y sugiere que al menos una forma de la CcO unida al NO es activa y puede reducir al O₂. Segundo, que la concentración de NO necesaria para inhibir a la CcO al 50% (IC₅₀) en función de la concentración de O₂ se ajusta a una función hiperbólica (Figura 4.20).

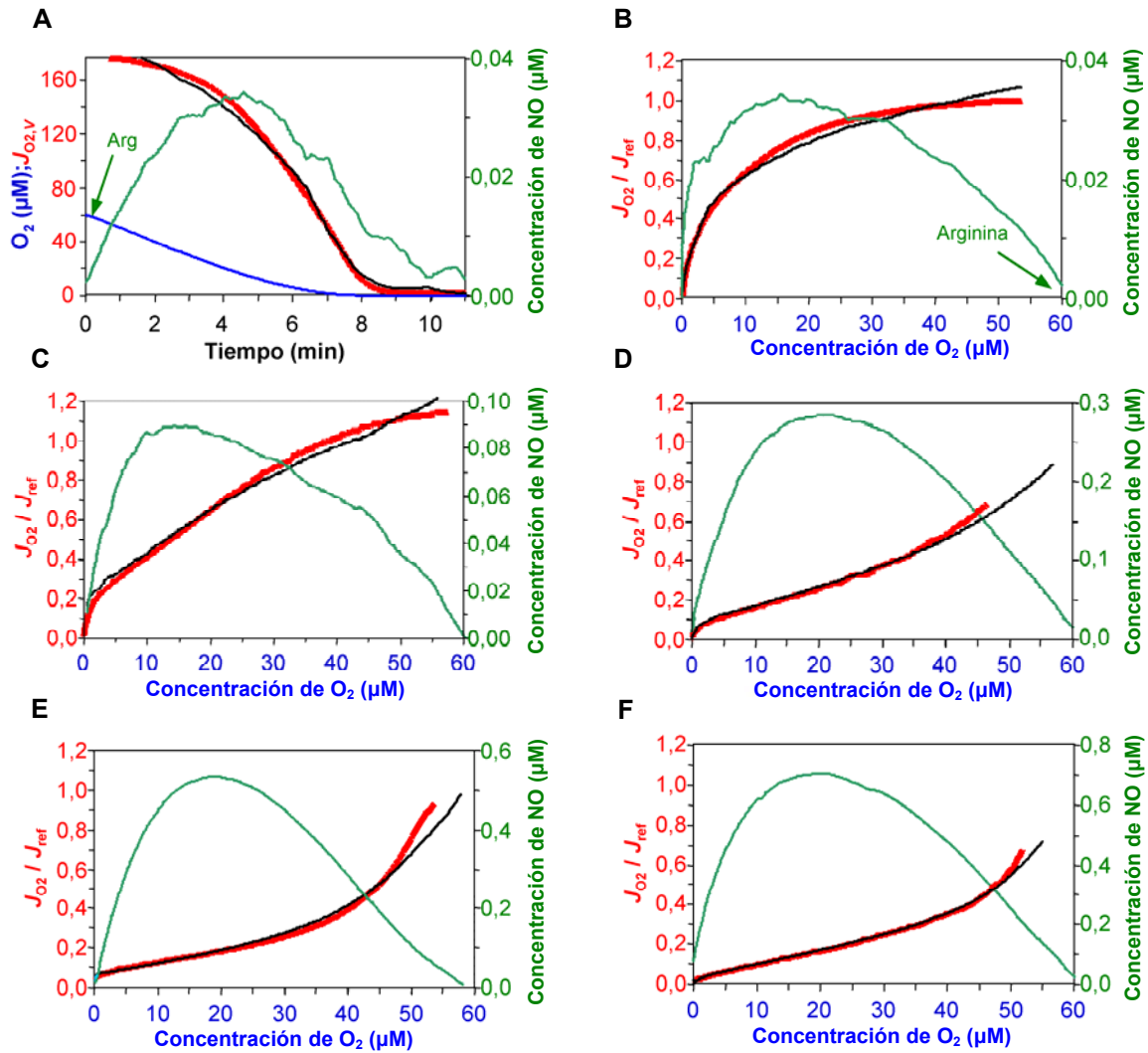


Figura 4.19. Producción endógena de NO e inhibición de la respiración celular

Se realizaron medidas simultáneas de consumo de O_2 y producción de NO en células tratadas con tetraciclina. Los gráficos muestran el consumo de O_2 relativo al consumo de O_2 medido a concentraciones saturantes de O_2 (J_{ref}) (línea roja); el consumo de O_2 determinado con el modelo cinético (línea negra) (ver apartado 4.3.4); la concentración de NO (línea verde). El consumo de O_2 y la concentración de NO están representados en función del tiempo (A) o en función de la concentración de O_2 (B-F). Los experimentos se realizaron en células que tienen niveles de producción de NO diferentes: (A-C) producción baja (20 ng/ml), (D, E) producción media (25 ng/ml) y (F) producción alta (30 ng/ml). Resultados representativos de 5 experimentos independientes.

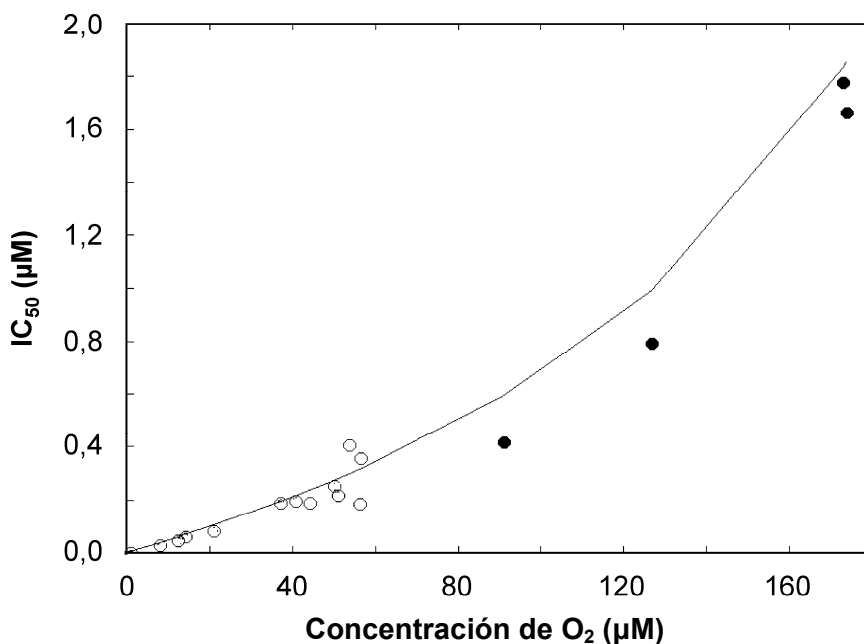


Figura 4.20. Relación entre el valor de IC₅₀ de la CcO para el NO y la concentración de O₂

Las medidas se realizaron a una serie de concentraciones bajas de O₂ (< 80 μM; círculos blancos) y altas (> 80 μM; círculos negros). La línea se trazó de acuerdo a la ecuación 4.4. (página 76).

4.3.4. Modelo cinético de inhibición de la CcO por el NO

A partir de los datos obtenidos nos planteamos desarrollar un modelo cinético de inhibición de la CcO por el NO. La interdependencia de las concentraciones de NO y de O₂ hace imposible poder aplicar un ajuste cinético que dependa de la variación de la concentración de sustrato (O₂) a una concentración constante de inhibidor (NO). Por lo tanto, se utilizó una aproximación en la cual los parámetros cinéticos se ajustaron a todos los datos de todos los experimentos de manera simultánea.

Los datos obtenidos en los experimentos no pueden explicarse adecuadamente mediante un modelo de inhibición competitiva pura, en el cual el NO se une al grupo hemo a₃ de la CcO en competición con el O₂ (Antunes *et al.*, 2004), por el hecho de que existe actividad respiratoria a concentraciones altas de NO (Figura 4.19 F), y también por la relación hiperbólica del valor de IC₅₀ de la inhibición de la CcO por el NO en función de la concentración de O₂ (Figura 4.20). Estas características podrían explicarse si la CcO catalizase la oxidación del NO, al menos bajo ciertas condiciones experimentales.

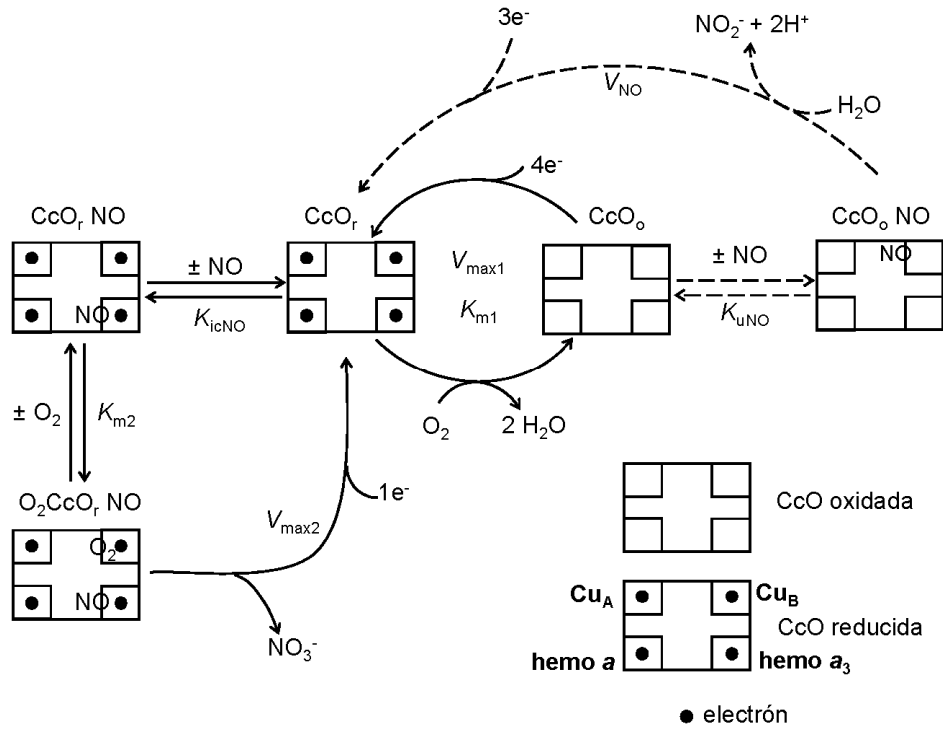


Figura 4.21. Esquema que representa el modelo propuesto de inhibición de la CcO por el NO

En el esquema se reflejan tanto la inhibición competitiva como la no competitiva, además del ciclo de disociación del NO del grupo hemo a_3 que consume O_2 con baja eficiencia a concentraciones altas de NO. CcO_o : CcO oxidada; CcO_oNO : CcO oxidada con NO unido al Cu_B ; CcO_r : CcO reducida; CcO_rNO : CcO reducida con NO unido al hemo a_3 ; O_2Cco_rNO : CcO reducida con NO unido al hemo a_3 y O_2 unido al Cu_B .

El modelo se desarrolló para ajustar los datos observados considerando lo que en la actualidad se conoce sobre la interacción entre la CcO y el NO. Es un modelo simplificado que tiene en cuenta la oxidación del NO por el O_2 (Figura 4.21). El modelo considera tanto la inhibición competitiva como la no competitiva de la CcO por el NO, así como la oxidación del NO cuando está unido al grupo hemo a_3 de la CcO. Así, cuando el NO se une al grupo hemo a_3 de la CcO, compitiendo con el O_2 , se abre una ruta catalítica alternativa, en la que el O_2 interacciona de manera transitoria con el átomo de cobre Cu_B reducido, siendo activado a superóxido, y reaccionando con el NO para producir peroxinitrito, que se convierte espontáneamente en NO_3^- . En el modelo, las dos formas reducidas de la CcO, denominadas CcO_rNO y CcO_r , son catalíticamente activas.

La suma de todos los intermediarios enzimáticos que el modelo predice a cualquier concentración de O_2 y de NO , de la cual puede derivarse la ecuación de la velocidad de reacción, es la siguiente:

$$[CcO_{tot}] = [CcO_r] (1 + [O_2]/K_{m1} + [NO]/K_{icNO} + [O_2][NO]/K_{m2}K_{icNO} + [O_2][NO]/K_{uNO}K_{m1})$$

Ec. (4.1)

donde CcO_{tot} es la suma de todas las especies de CcO ; CcO_r es la CcO reducida; K_{m1} es el valor de la K_m de la CcO por el O_2 en ausencia de NO ; K_{m2} es el valor de la K_m de la CcO por el O_2 cuando el NO se une al hemo a_3 ; K_{icNO} es la constante de inhibición competitiva del NO por la CcO y K_{uNO} es la constante de inhibición no competitiva del NO por la CcO .

La velocidad de la reacción queda descrita en la siguiente ecuación:

$$V = \frac{[CcO_{tot}]V_{max1}([O_2]K_{uNO}K_{m2}K_{icNO} + r[O_2][NO]K_{m1}K_{uNO})}{K_{m1}K_{m2}K_{icNO}K_{uNO} + [O_2]K_{m2}K_{icNO}K_{uNO} + [O_2][NO]K_{m2}K_{icNO} + [NO]K_{m1}K_{m2}K_{uNO} + [O_2][NO]K_{m1}K_{uNO}}$$

Ec. (4.2)

Los datos experimentales se analizaron mediante regresión no lineal por el método de los mínimos cuadrados y se obtuvieron los valores de los parámetros mostrados en la Tabla 4.4.

Para ajustar de la mejor manera el modelo cinético a los datos experimentales se requiere que la afinidad de la CcO por el O_2 sea modulada por el NO unido a la enzima, de tal modo que el valor de la K_m para el O_2 de la forma enzimática CcO_rNO (con el NO unido al grupo hemo a_3) (K_{m2}) sea más alto que el valor de la K_m para el O_2 de la forma enzimática CcO_r (K_{m1}). Esto concuerda con el efecto inhibitor del NO y la menor afinidad del O_2 por el átomo de cobre.

Este modelo se aplicó a todos los resultados experimentales obtenidos a concentraciones bajas de O_2 (Figura 4.19; línea negra). El modelo se ajusta con exactitud a los datos experimentales.

Parámetro	Valor
K_{m1}	0,81 μM
$V_{\max1}$	16,5 pmoles $\text{O}_2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot 10^{-6}$ células
K_{icNO}	3,63 nM
K_{m2}	520 μM
$V_{\max2}$	22 pmoles $\text{O}_2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot 10^{-6}$ células
K_{uNO}	n.d.

Tabla 4.4. Parámetros determinados mediante el análisis de los datos experimentales en función del modelo de inhibición de la CcO por el NO descrito

K_{m1} : valor de la K_m de la CcO por el O_2 en ausencia de NO; $V_{\max1}$: velocidad máxima de la reacción $\text{CcO}_r + \text{O}_2 \rightarrow \text{CcO}_o + 2\text{H}_2\text{O}$; K_{icNO} : constante de inhibición competitiva del NO por la CcO; K_{m2} : valor de la K_m de la CcO por el O_2 cuando el NO se une al hemo β_3 ; $V_{\max2}$: velocidad máxima de la reacción $\text{CcO}_r\text{NO} + \text{O}_2 \rightarrow \text{CcO}_r + \text{NO}_3^-$; K_{uNO} : constante de inhibición no competitiva del NO por la CcO. n.d., No determinado

Utilizando los valores de los parámetros obtenidos gracias a este modelo (Tabla 4.4), se realizó una representación de la relación entre la concentración de NO y el grado de inhibición de la respiración a distintas concentraciones de O_2 (Figura 4.22). En la figura se observa cómo se reproduce el patrón de inhibición observado en los experimentos. A medida que disminuye la concentración de O_2 y aumenta el valor de la concentración de NO, el valor de respiración disminuye. Sin embargo, incluso a las concentraciones menores de O_2 y las concentraciones mayores de NO, no se produce una inhibición total de la respiración, tal y como se observó en los experimentos realizados con las células.

Según el modelo cinético de inhibición competitiva pura (Antunes *et al.*, 2004), el valor de la c_{50} (la concentración de O_2 necesaria para alcanzar la mitad de la V_{\max} a cada concentración de NO) aumenta proporcionalmente a la concentración de NO de manera lineal. Este modelo falla al tratar de explicar la dependencia no lineal del valor de c_{50} en relación a la concentración de NO que se obtuvo en los experimentos realizados con las células (resultado no mostrado).

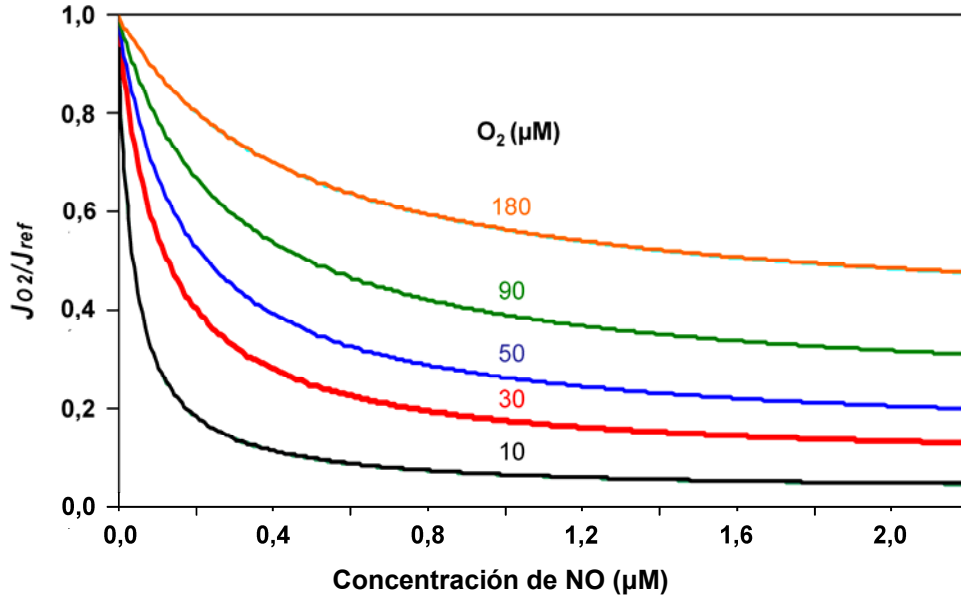


Figura 4.22. Relación entre la concentración de NO y el grado de inhibición de la respiración, en función de la concentración de O₂, obtenidos a partir del modelo cinético

Efecto de la concentración de NO en la respiración, calculado a partir de los parámetros cinéticos presentados en la Tabla 4.4, a diferentes concentraciones de O₂ (10 µM, negro; 30 µM, rojo; 50 µM, azul; 90 µM, verde; 180 µM, naranja).

A partir de las siguientes ecuaciones, obtenidas aplicando nuestro modelo, se consigue una predicción más precisa de esta dependencia no lineal:

$$c_{50} = \frac{K_{uNO}K_{m1}K_{m2}(K_{icNO} + [NO])}{K_{icNO}K_{uNO}K_{m2} + [NO]K_{uNO}K_{m1} + [NO]K_{icNO}K_{m2}} \quad Ec. (4.3)$$

En el modelo de inhibición competitiva, la dependencia del valor IC₅₀ por la concentración de O₂ sigue una relación lineal (Antunes *et al.*, 2004). Nuestros resultados en células intactas muestran una dependencia no lineal (Figura 4.20), según la ecuación:

$$IC_{50} = \frac{K_{uNO}K_{icNO}K_{m2}(K_{m1} + [O_2])}{K_{m1}K_{uNO}K_{m2} + [O_2]K_{m2}K_{icNO} - 2rK_{m1}^2K_{uNO} - (2r-1)[O_2]K_{uNO}K_{m1}} \quad Ec. (4.4)$$

donde r representa el valor V_{max2}/V_{max1} , que se ha estimado como $\sim 1,35$.

4.3.5. Producción de NO endógeno e inhibición de la respiración a concentraciones altas de O₂ (hasta 240 μM)

Se diseñaron una serie de experimentos a concentraciones de O₂ superiores a las concentraciones fisiológicas de O₂ (Figuras 4.23 y 4.24) para comprobar si el modelo cinético también era válido más allá del intervalo de concentraciones de O₂ en el que se calcularon los parámetros correspondientes al modelo (Tabla 4.4). Las células se trataron con una concentración de tetraciclina de 20 ng/ml (Figura 4.23) o 50 ng/ml (Figura 4.24) y se les añadió L-arginina (1 mM) para desencadenar la producción de NO. Se observó que el modelo cinético se ajusta a los datos experimentales en todo el rango de concentraciones de O₂ estudiado (0-240 μM).

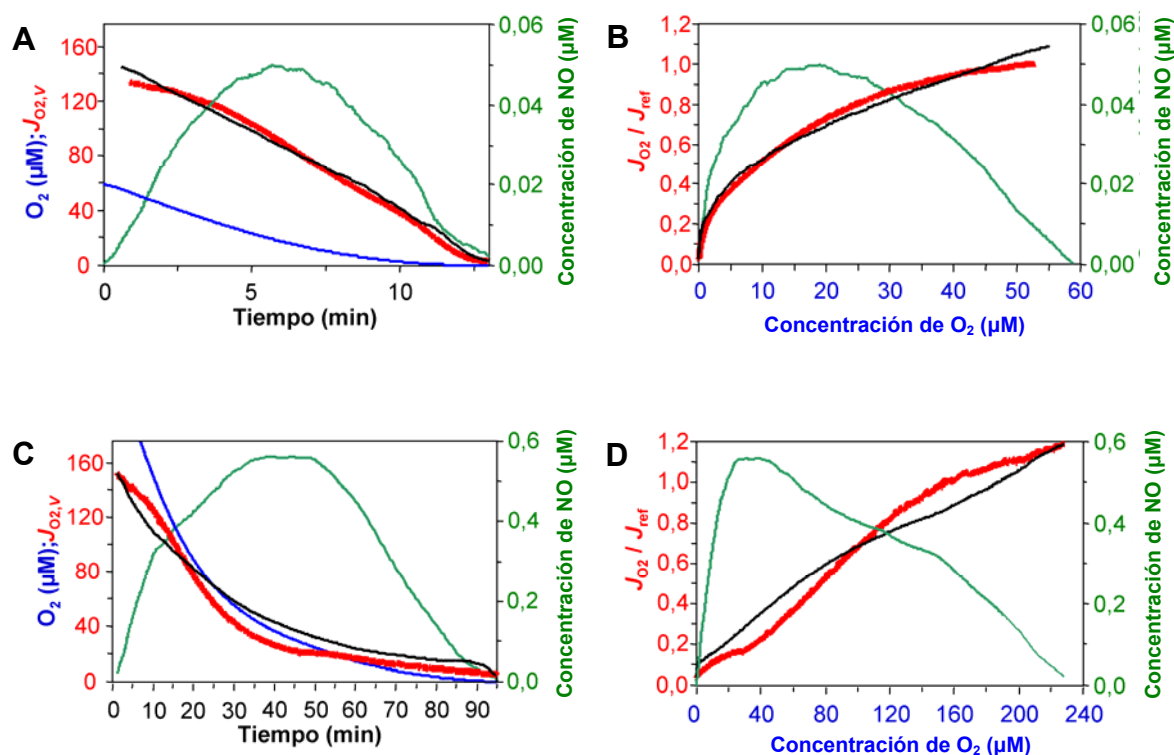


Figura 4.23. Producción endógena de NO e inhibición de la respiración en el rango de concentraciones de O₂ 0-240 μM (concentraciones bajas de NO)

Se realizaron medidas de consumo de O₂ y producción de NO en células sometidas a un rango de concentraciones estándar de O₂ (< 60 μM) (A, B) o en un intervalo más amplio (< 240 μM) (C, D). Las medidas se realizaron con actividad de la iNOS baja (tetraciclina 20 ng/ml). Los gráficos representan 3 experimentos similares. Consumo de O₂ (línea roja) (A,C) y consumo de O₂ relativo al consumo de O₂ medido a concentraciones saturantes de O₂ (línea roja) (J_{O_2}/J_{ref}) (B,D); concentración de O₂ (μM) (línea azul); valores de consumo de O₂ determinados con el modelo cinético (línea negra); concentración de NO (μM) (línea verde).

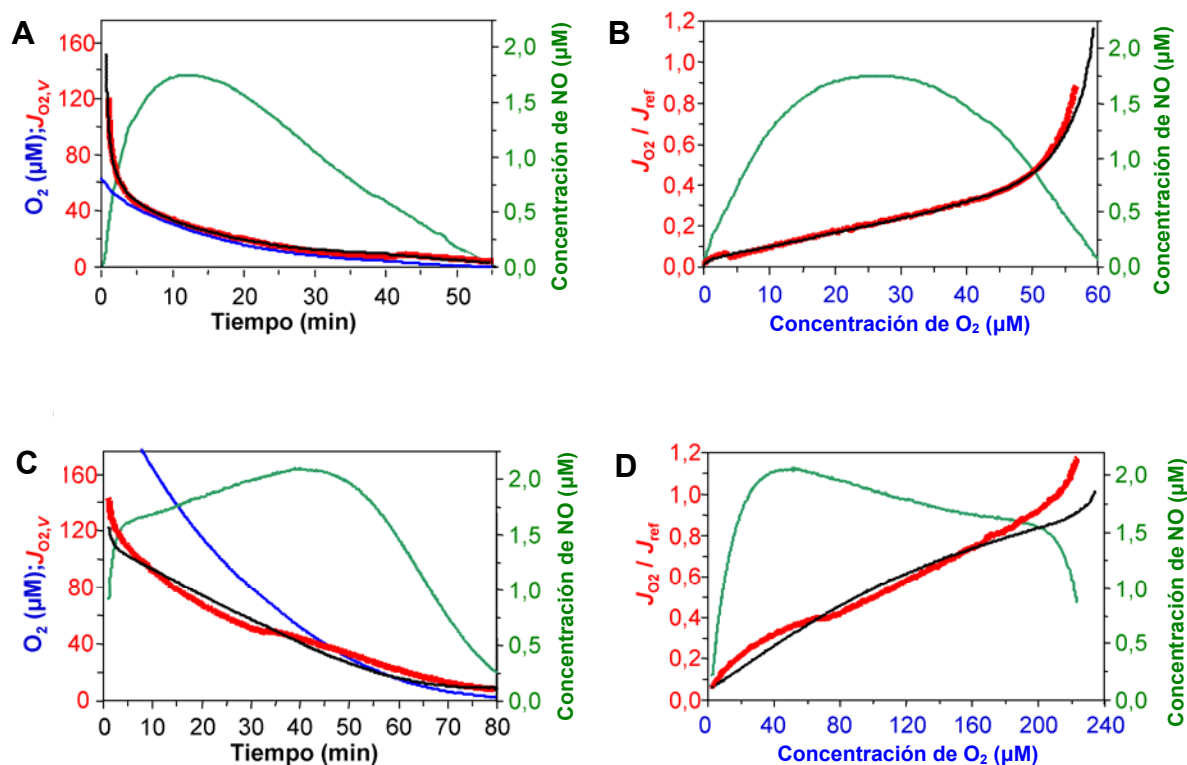


Figura 4.24. Producción endógena de NO e inhibición de la respiración en el rango de concentraciones de O₂ 0-240 μM (concentraciones altas de NO)

Se realizaron medidas de consumo de O₂ y producción de NO en células sometidas a un rango de concentraciones estándar de O₂ (< 60 μM) (A, B) o en un intervalo más amplio (< 240 μM) (C, D). Las medidas se realizaron con actividad de la iNOS alta (tetraciclina 50 ng/ml). Los gráficos representan 3 experimentos similares. Consumo de O₂ (línea roja) (A, C) y consumo de O₂ relativo al consumo de O₂ medido a concentraciones saturantes de O₂ (J_{O_2}/J_{ref}) (línea roja) (B, D); concentración de O₂ (μM) (línea azul); valores de consumo de O₂ determinados con el modelo cinético (línea negra); concentración de NO (μM) (línea verde).

En hiperoxia, las células que tienen un grado de expresión de la iNOS alto (50 ng/ml tetraciclina) llegaron a producir hasta 2 μM de NO (Figura 4.24 C y D), un valor similar al producido por las células no sometidas a hiperoxia (1,5 μM) (Figura 4.24 A y B). En ambos casos, la concentración de NO disminuyó en el momento en que la concentración de O₂ se convirtió en un factor limitante para la producción de NO por la iNOS (< 30 μM). Este resultado muestra que existe un equilibrio similar entre la producción y la utilización de NO en ambos rangos de concentración de O₂. Por el contrario, en células que tienen una expresión menor de iNOS (20 ng/ml tetraciclina) y no son sometidas a hiperoxia (Figura 4.23 A y B), el grado de inhibición de la respiración es menor, alcanzando concentraciones de O₂ limitantes (< 30 μM) en menos de 5 min. En este periodo de tiempo, en las células sometidas a hiperoxia (Figura 4.23 C y D) la producción de NO aumenta de manera constante, alcanzando el valor máximo tras 50 min, momento en el que de nuevo la concentración de O₂ vuelve a ser limitante

(< 30 μM). En la Figura 4.25 se representa el valor de O_2 crítico para la producción de NO en cada una de las condiciones. Se observa que, aunque la producción de NO depende del grado de expresión de iNOS y de la concentración de O_2 , el valor de la concentración de O_2 crítico para la producción de NO se encuentra comprendido en un estrecho margen en todas las condiciones experimentales.

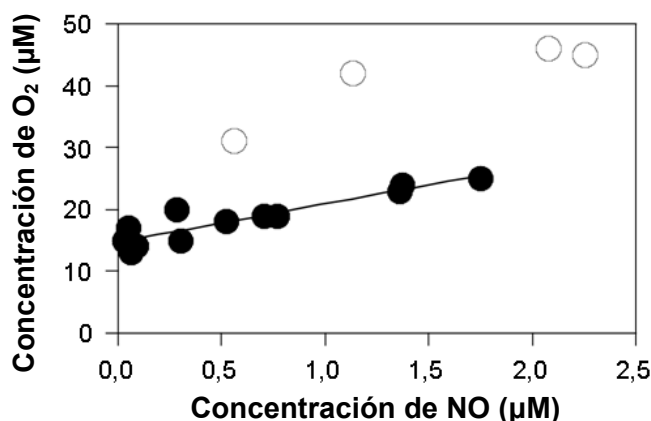


Figura 4.25. Concentración de O_2 limitante para la producción de NO

Se representa la concentración de O_2 limitante para la producción de NO, a partir de la cual la concentración de NO decae, en función de la concentración máxima de NO producida, tanto en células inducidas a producir NO tras la adición de L-arginina a concentraciones bajas de O_2 (60 μM ; círculos negros) y en hiperoxia (240 μM ; círculos blancos).

4.3.6. Inhibición reversible de la respiración y activación del estado metabólico celular inducida por el NO

Para comprobar la reversibilidad de la inhibición de la CcO por el NO se utilizaron dos métodos alternativos: el primero fue la adición de un agente quelante del NO, la oxihemoglobina (HbO_2) (Kim-Shapiro *et al.*, 2006); el segundo fue la aplicación de una fuente de luz fría sobre la muestra, ya que está descrito que el enlace entre el grupo hemo a_3 reducido y el NO es de naturaleza fotolábil (Boelens *et al.*, 1983; Borutaite *et al.*, 2000; Sarti *et al.*, 2000).

En las células inducidas para producir concentraciones altas de NO (tetraciclina 50 ng/ml y L-arginina 1 mM), la adición de HbO_2 provocó el restablecimiento total de los valores de respiración previos a la adición de L-arginina. Además, se observó un aumento en la tasa de respiración, en comparación con los valores de referencia en

ausencia de L-arginina (Figura 4.26 A). La respiración también se recuperó tras la inhibición de la actividad de la iNOS con S-EITU 1 mM (resultado no mostrado). No se observó ninguna inhibición irreversible en toda la serie de concentraciones de NO utilizadas (hasta 1,8 μM).

Al utilizar una fuente de luz fría sobre la muestra cuando la concentración de O_2 era de 60 μM (Figura 4.26 B), la inhibición revirtió totalmente, al igual que en el caso anterior, y también se observó el aumento en la tasa de respiración en relación a los valores de referencia. La luz no tuvo ningún efecto en la respiración cuando las células inducidas con tetraciclina (50 ng/ml) no se trataron con L-arginina (resultado no mostrado).

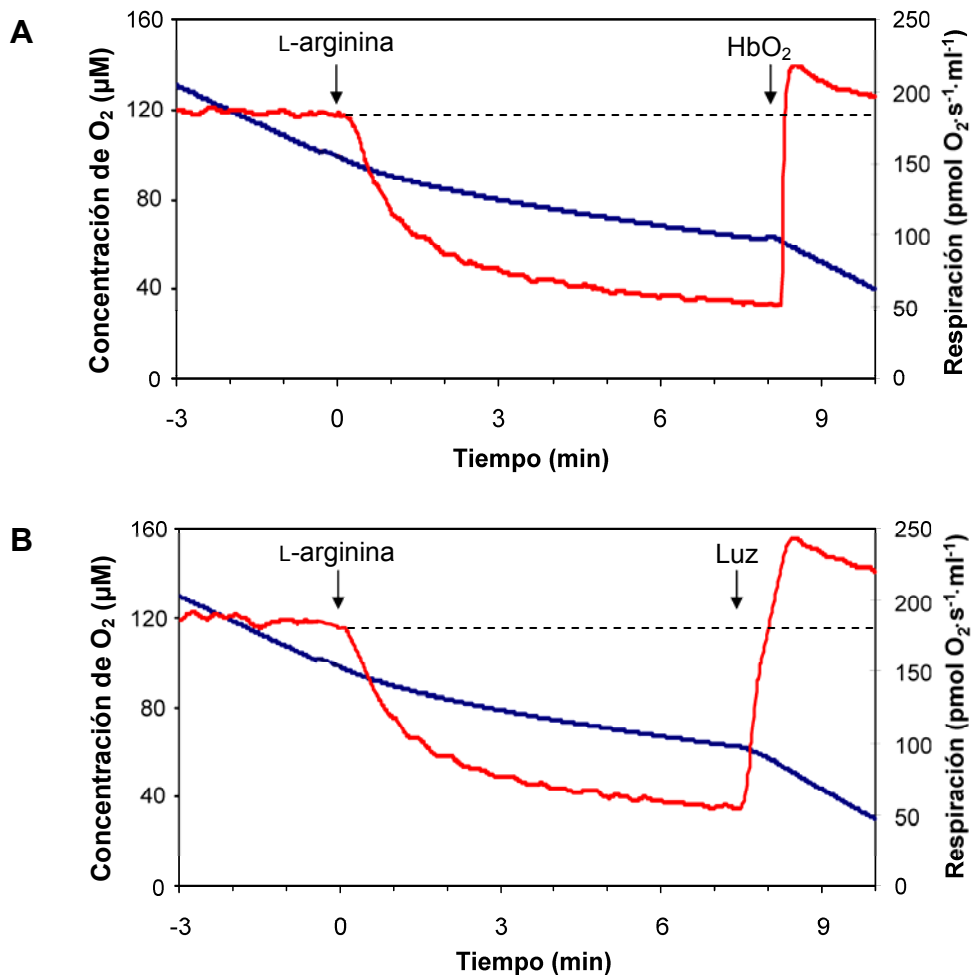


Figura 4.26. Reversibilidad de la inhibición de la respiración por el NO y estimulación de la respiración tras la eliminación del NO

Registro de la concentración de O_2 (línea azul) y del consumo de O_2 (línea roja) en células que producen una cantidad de NO elevada (tetraciclina 50 ng/ml), mostrando la inhibición de la respiración inducida por la adición de L-arginina (1 mM). La adición de HbO_2 (A), o la iluminación directa con una fuente de luz fría (B) estimularon la respiración por encima de los valores basales (línea punteada).

Para tratar de cuantificar el efecto de activación de la respiración tras la inhibición de la CcO por el NO, se definió el parámetro *factor de estimulación* (F) como la relación entre la V_{maxI} tras la eliminación del NO (J_s) y la V_{maxI} antes de la adición de L-arginina (J_{ref}), obteniéndose la expresión $F=J_s/J_{ref}$. El valor de F se situó entre los valores 1 y 1,5 y lo atribuimos a la acumulación de citocromo c reducido y a un descenso en el potencial de membrana causado por la inhibición de la CcO (Figura 4.27). Esta estimulación fue mayor a concentraciones altas de NO.

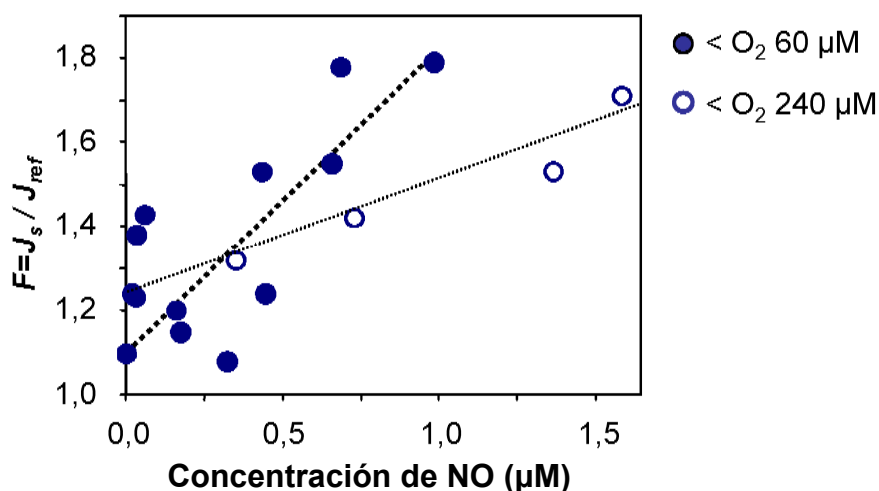


Figura 4.27. Aumento del factor de estimulación (F) en función de la concentración de NO

El factor de estimulación (F) aumenta proporcionalmente a la producción de NO. Esta estimulación sólo fue significativa a concentraciones altas de NO. Este efecto es dependiente de la concentración de O_2 . Experimentos realizados a concentraciones de $O_2 < 60 \mu M$ (círculos azules) y a concentraciones de $O_2 < 240 \mu M$ (círculos blancos).

4.4. Efecto del NO endógeno sobre la conductancia de la membrana mitocondrial interna a los protones

Los siguientes experimentos están encaminados a comprobar si el NO endógeno tiene algún efecto sobre la conductancia de la membrana mitocondrial interna a los protones. Ésta se determinó mediante la medida simultánea de la respiración y el potencial de membrana ($\Delta\psi_m$), a una concentración de O_2 de $30 \mu M$. El potencial de membrana se determinó utilizando el catión lipofílico $TPMP^+$ marcado con tritio [3H]TPMP⁺ (trifenilmetilfosfonio). En primer lugar se realizó un experimento de curso-temporal para establecer el tiempo óptimo para la distribución del [3H]TPMP⁺ entre el

citósol y la matriz mitocondrial. Las células se trataron con oligomicina (80 ng/ml) a intervalos de tiempo crecientes (0-90 min), para inhibir la ATPasa. El valor de la relación $[[^3\text{H}]\text{TPMP}^+]_{\text{matriz}}/[[^3\text{H}]\text{TPMP}^+]_{\text{citósol}}$ aumentó progresivamente en función del tiempo de incubación, alcanzando un valor máximo de 46,2 tras una incubación de 60 min y decayendo a continuación (Figura 4.28). De este modo, se determinó el valor de 60 min como el tiempo óptimo en el que la acumulación de $[^3\text{H}]\text{TPMP}^+$ en la matriz mitocondrial era máxima.

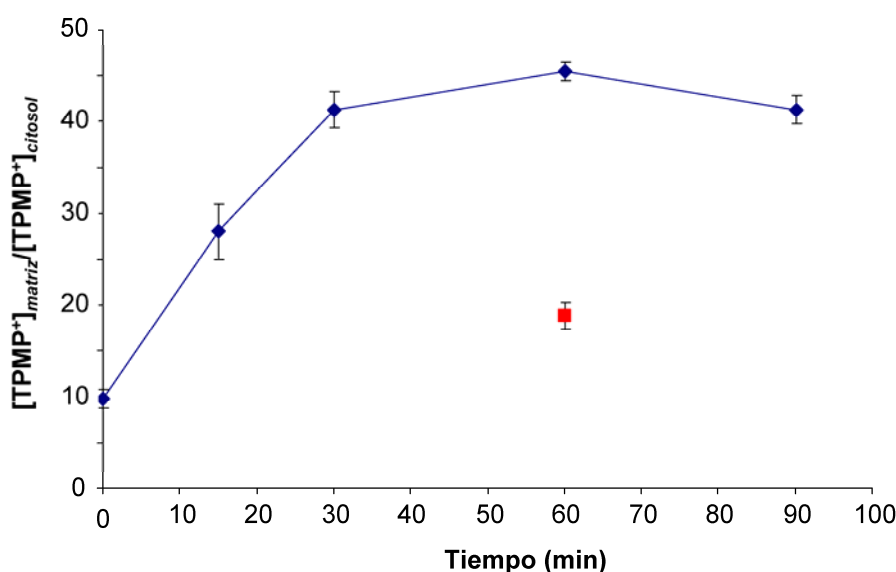


Figura 4.28. Experimento de curso-temporal de acumulación de $[^3\text{H}]\text{TPMP}^+$ en la matriz mitocondrial

Relación entre la concentración de $[^3\text{H}]\text{TPMP}^+$ en la matriz y en el citósol en función del tiempo (rombos azules). El tiempo de máxima acumulación corresponde a 60 min. La adición de FCCP (1 μM) provoca el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa y la caída del potencial de la membrana mitocondrial (cuadrado rojo). Los datos corresponden al valor medio \pm D.S. de 3 experimentos independientes.

Tras determinar el tiempo óptimo de incubación, se eligieron dos concentraciones de tetraciclina, 20 y 40 ng/ml, que producían concentraciones de NO intermedias (50 nM) o altas (600 nM), respectivamente, y se procedió a estudiar el posible efecto del NO sobre la conductancia de la membrana mitocondrial interna a los protones. Para ello, las células se trataron durante 60 min con oligomicina 80 ng/ml, TPMP^+ 0,5 μM y $[^3\text{H}]\text{TPMP}^+$ 0,2 $\mu\text{Ci/ml}$. Además, se añadió rotenona a dosis crecientes (4, 8, 16, 32 y 64 nM) para inhibir progresivamente al Complejo NADH deshidrogenasa (Complejo I) de la ETC. De este modo, se disminuyó progresivamente el potencial de la membrana mitocondrial interna ($\Delta\psi_m$).

Los valores de $\Delta\psi_m$ y de la respiración mitocondrial en las células incubadas 14-16 h con tetraciclina 20 ng/ml y tratadas sólo con oligomicina, TPMP⁺ y [³H]TPMP⁺, fueron de $102 \pm 1,7$ mV y $4,4 \pm 0,4$ pmoles $O_2 \cdot s^{-1} \cdot 10^{-6}$ células, respectivamente. En las células incubadas 14-16 h con tetraciclina 40 ng/ml se obtuvieron los valores $102 \pm 1,7$ mV y $4,1 \pm 0,4$ pmoles $O_2 \cdot s^{-1} \cdot 10^{-6}$ células (Figura 4.29).

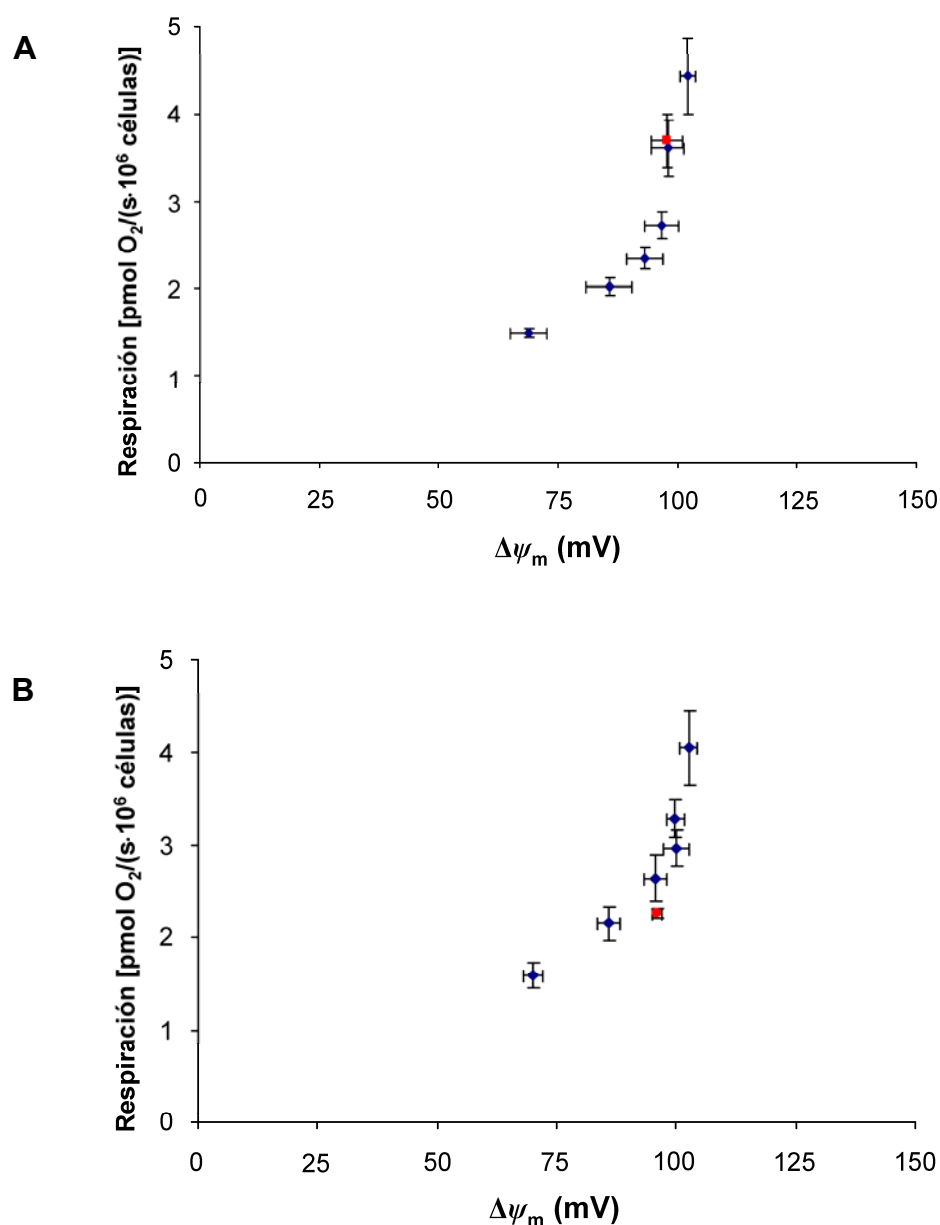


Figura 4.29. Efecto del NO endógeno sobre la conductancia de la membrana mitocondrial interna a los protones

Cinética de la conductancia a los protones en células control tratadas con 20 (A) o 40 (B) ng/ml de tetraciclina y sin L-arginina (rombos azules). El valor correspondiente al tratamiento con L-arginina (cuadrado rojo) se encuentra dentro de la curva control. Los datos corresponden al valor medio \pm S.E.M. de al menos 4 experimentos independientes.

La incubación con dosis crecientes de rotenona disminuyó los valores tanto del $\Delta\psi_m$ como de la respiración mitocondrial (Figura 4.29). La adición de L-arginina 1 mM provocó una inhibición de la respiración del 16,7% (20 ng/ml) y 44,1% (40 ng/ml) respecto a las células control (cuadrados rojos, Figura 4.29). También provocó una disminución del $\Delta\psi_m$ del 4,29% (20 ng/ml) y 6,34% (40 ng/ml). Comparando estos valores con la curva que describe la cinética de la conductancia a los protones en las células control (sin L-arginina) se concluye que la presencia de NO no influye en la conductancia de la membrana mitocondrial interna a los protones.

5. DISCUSIÓN

5.1. Sensibilidad relativa de la sGC y la respiración mitocondrial al NO endógeno a concentraciones fisiológicas de O₂

Debido a que la sGC y la CcO suelen encontrarse conjuntamente en el interior las células, la sensibilidad relativa de las dos enzimas al NO determinará el efecto biológico final que el NO vaya a desencadenar. Aunque se sabe que para activar a la sGC se requieren concentraciones de NO menores que las necesarias para inhibir a la CcO (Tablas 1.1 y 1.2 de la Introducción), los estudios realizados a este respecto no han podido esclarecer la sensibilidad de ambas enzimas cuando se utiliza una fuente de NO endógena y cuando se realiza la comparación a concentraciones fisiológicas de O₂. Algunos de estos estudios no han tenido en cuenta la influencia de la concentración de O₂ en dicha sensibilidad; otros estudios no han utilizado un modelo celular intacto (revisado en la Introducción, apartado 1.5.3). Otra limitación en este tipo de estudios ha sido el mantenimiento de un suministro de NO constante durante periodos de tiempo prolongados. Además, los donadores de NO como el DETA-NO (dietilentriamina NONOato) (Shaw *et al.*, 2009) o el SNAP (S-nitroso-N-acetil-DL-penicilamina) (Metukuri *et al.*, 2009) son empleados habitualmente como fuentes de NO a pesar de sus conocidas limitaciones a la hora de obtener una concentración constante de NO, y en cuanto a la posible formación de productos secundarios derivados del propio donador que podrían interferir con los efectos que se quieren estudiar. La utilización de estos donadores de NO ha permitido demostrar que la respiración es sensible al NO pero, en la mayoría de los casos, a unas concentraciones de O₂ mayores que las que existen *in vivo*.

La concentración de O₂ presente en los capilares sanguíneos es de 30 μM aproximadamente, y el valor medio de referencia para el interior celular es de 3 μM (Gnaiger y Kuznetsov, 2002). Estas concentraciones de O₂ no limitan la respiración mitocondrial, debido a que la afinidad de la CcO por el O₂ es muy alta, de manera que existe un amplio margen de seguridad para garantizar la fosforilación oxidativa mitocondrial (Gnaiger *et al.*, 1998; Rossignol *et al.*, 2003). A pesar de ello, a estas concentraciones de O₂, el NO puede competir de manera significativa por el centro activo de la CcO, e inhibir de este modo la respiración. El NO, al igual que otros inhibidores que aumentan el valor de la K_m de la enzima, disminuye la afinidad de la CcO por el O₂, lo que da lugar a una limitación de O₂ en situaciones aparentemente

normóxicas, fenómeno denominado “nitroxia” (Shiva *et al.*, 2005) o “hipoxia metabólica” (Xu *et al.*, 2005; Galkin *et al.*, 2007). En esta situación, la cadena de transporte de electrones (ETC) se encuentra en estado reducido, y la presencia del O₂ favorece la formación de superóxido (O₂^{•-}). En presencia de NO, esto desencadena la formación de especies reactivas del nitrógeno (RNS), como el peroxinitrito (ONOO⁻), que pueden dañar a las proteínas, los lípidos y el ADN.

Dada la gran heterogeneidad entre los estudios previos en cuanto al modelo experimental utilizado, así como a la utilización de diferentes donadores exógenos de NO (Tablas 1.1 y 1.2 de la Introducción), los resultados que tratan de determinar la sensibilidad relativa de las dos dianas principales del NO en las células no son concluyentes. En esta tesis hemos comparado la sensibilidad relativa de la sGC y de la respiración mitocondrial al NO endógeno, a una concentración de O₂ de 30 μM. Para ello, hemos utilizado respirometría de alta resolución, que permite determinar las tasas de respiración a concentraciones bajas de O₂ (< 30 μM) con mayor precisión que con los electrodos de tipo Clark convencionales. La utilización de las células Tet-iNOS 293 nos ha permitido estudiar la sensibilidad de las dos enzimas al NO endógeno, bajo las mismas condiciones experimentales y a la misma concentración de O₂ (30 μM). En este sistema celular, la adición del sustrato de la iNOS, L-arginina, desencadena la producción de NO, que activa a la sGC, dando lugar al incremento en la concentración de cGMP. Los valores máximos de producción de cGMP fueron obtenidos a concentraciones de NO (< 14,5 nM NO; Figura 4.3 E) que no tuvieron efecto sobre la respiración (Figura 4.11 y Tabla 4.2).

El cGMP sintetizado en las células es degradado por las fosfodiesterasas (PDEs) endógenas. Las PDEs no sólo degradan al cGMP, sino que también determinan su forma de señalización (Mullershausen *et al.*, 2001). El medio HBSS en el que realizamos los experimentos para determinar los niveles de cGMP no contiene ningún inhibidor de las PDEs que pudiera provocar un aumento artificial de los valores de concentración de cGMP. La adición del inhibidor de las PDEs, IBMX (0,5 mM), aumentó entre 1,3 y 1,6 veces la cantidad de cGMP detectado en los extractos celulares (Figura 4.8 B), y previno completamente la disminución en la concentración de cGMP observada a concentraciones altas de NO (Figura 4.5 B). La disminución de la concentración de cGMP es debida a la activación de la proteína quinasa dependiente de

cGMP (PKG), que activa a las PDEs (Rybalkin *et al.*, 2002; Mullershausen *et al.*, 2005; Mullershausen *et al.*, 2006). Otros trabajos sugieren que la sGC podría sufrir un fenómeno de desensibilización relacionado con la S-nitrosilación de la sGC (Sayed *et al.*, 2007) o con la fosforilación de la sGC por la PKG (Zhou *et al.*, 2008). Roy y Garthwaite (2006) observaron que una concentración de NO de 50 nM daba lugar a la máxima producción de cGMP cuando las PDE no estaban inhibidas, a pesar de que también utilizaron concentraciones de NO superiores (170 y 500 nM). Este patrón concuerda con nuestros resultados, en los que la máxima acumulación de cGMP se obtiene cuando las células producen menos de 15 nM de NO, mientras que concentraciones de NO mayores (> 700 nM) provocaban una acumulación de NO menor (Figura 4.5 B). En el citado estudio (Roy y Garthwaite, 2006) las concentraciones de NO son transitorias, lo que puede tener un efecto importante sobre la cinética de producción de cGMP por la sGC, en su caso mucho más rápida (s) que en nuestros experimentos (min).

La activación de la sGC fue independiente de la concentración de O₂ excepto a concentraciones muy bajas, cuando la producción de NO por la iNOS se encuentra limitada (Figura 4.8 A). En estudios anteriores al nuestro se ha determinado el efecto de la hipoxia sobre la expresión y la actividad de la sGC, observando que la hipoxia puede **inducir** (10% O₂, 21-35 días) (Schermuly *et al.*, 2008), **no afectar** (10% O₂, 5-21 días) (Kirsch *et al.*, 2008), (380 mm Hg, 21 días) (de Frutos *et al.*, 2009), (3820 metros sobre el nivel del mar, 110 días) (Pearce *et al.*, 2009) o **disminuir** (380 mm Hg, 14 días) (He *et al.*, 2007), (380 mm Hg, 2 días) (de Frutos *et al.*, 2009) la expresión de la sGC. En el trabajo de de Frutos y col. (2009), se observó que la expresión de la sGC disminuye en ratones sometidos a 2 días de hipoxia, pero esta disminución se revierte si los ratones son sometidos a 21 días de hipoxia. En cuanto a la actividad de la sGC en hipoxia, se ha observado que, bien se mantiene (Kirsch *et al.*, 2008) o disminuye (He *et al.*, 2007; Pearce *et al.*, 2009). También se ha estudiado el efecto de las ROS sobre la expresión de la sGC y la producción de cGMP en células de músculo liso de aorta de rata, observándose una disminución tanto de la expresión de la sGC como de la producción de cGMP al aumentar las ROS (Gerassimou *et al.*, 2007). En hipoxia podría ocurrir que la disminución en la concentración de O₂ pudiera aumentar la generación de las ROS pero, en todo caso, sucedería a concentraciones de O₂ menores a las que utilizamos en nuestros experimentos (< 15 μ M).

En el estudio de la interacción del NO con sus principales dianas celulares a una concentración de O₂ de 30 μM, obtuvimos unos valores de EC₅₀ para la sGC de 2,9 nM y de IC₅₀ para la respiración mitocondrial de 141 nM. Estos resultados indican que, a concentraciones fisiológicas de O₂, la sGC presenta aproximadamente 50 veces mayor afinidad por el NO que la respiración mitocondrial. Anteriormente, utilizando DEA-NO para activar a la enzima sGC purificada e inhibir la respiración mitocondrial en extractos de cerebelo de rata, se había observado que las curvas de activación de la sGC e inhibición de la CcO en función de la concentración de NO no se superponían, obteniéndose unos valores de EC₅₀ (3,9 nM) y de IC₅₀ (120 nM) (Figura 5.1) (Bellamy *et al.*, 2002), muy similares a nuestros resultados (Figura 4.7). De estas observaciones se deduce que ambas enzimas tienen diferentes rangos de activación-inhibición. Así, el NO es capaz de activar a la sGC sin inhibir la respiración mitocondrial.

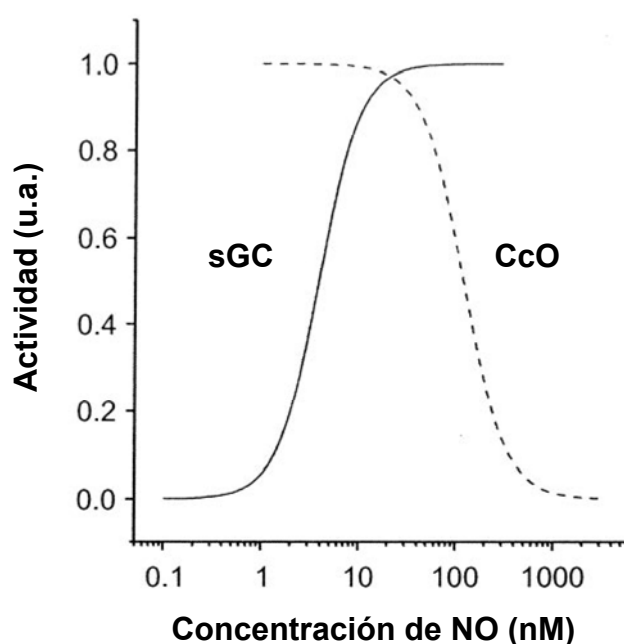


Figura 5.1. Comparación de la relación concentración de NO-respuesta para la sGC y la CcO

El rango de concentraciones de NO que activan a la sGC es menor que el que inhibe a la CcO. Las curvas de activación de la sGC e inhibición de la CcO no se superponen. Modificado de (Bellamy *et al.*, 2002).

Los experimentos de activación de la sGC y de inhibición de la CcO realizados a diferentes concentraciones de O₂, muestran cómo el O₂ puede actuar como un regulador clave de la respuesta de la sGC y la CcO al NO endógeno. En la Figura 5.2 se muestran

las actividades de la sGC y la CcO en función de la concentración de NO bajo condiciones de hiperoxia, normoxia e hipoxia (Landar y Darley-USmar, 2007).

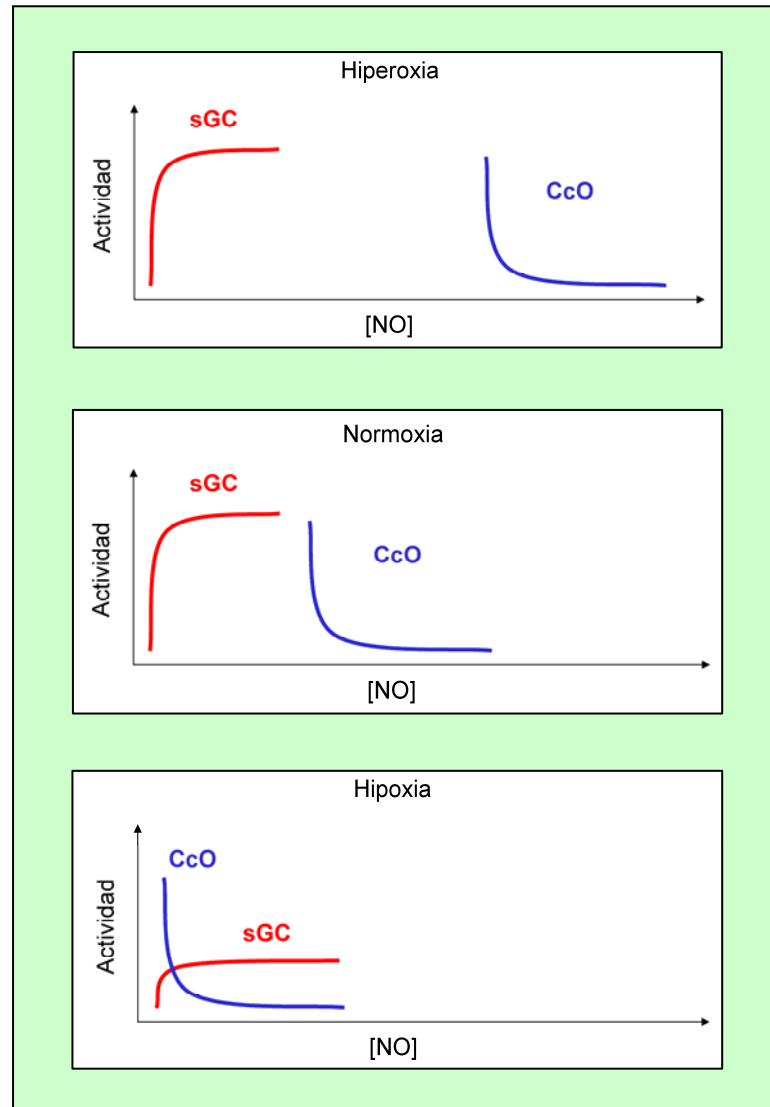


Figura 5.2. Regulación mediante la concentración de O₂ de la señalización mediada por el NO a través de la sGC y la CcO

La activación de la sGC (línea roja) y la inhibición de la CcO (línea azul) se muestran esquemáticamente en función de la concentración de NO, en condiciones de hiperoxia, normoxia e hipoxia. Se asume que el NO proviene de las NOS y que, por tanto, se requiere el O₂ para su síntesis. Modificado de (Landar y Darley-USmar, 2007).

En hiperoxia y normoxia, el O₂ no es un factor limitante para la formación de NO por las NOS, y los intervalos de concentración de NO en los que la sGC es activada y la CcO es inhibida se encuentran separados. Sin embargo, la sensibilidad de la CcO al NO aumenta en normoxia. En hipoxia, la disponibilidad reducida de O₂ se convierte en un

factor limitante para la síntesis de NO por la iNOS, debido a la alta K_m de la iNOS (25 $\mu\text{M O}_2$) (Santolini *et al.*, 2001). La disminución de NO disponible reduce la capacidad de la sGC para producir cGMP. Por el contrario, a esta concentración baja de O_2 , la CcO aumenta su sensibilidad al NO, y los rangos de activación-inhibición de ambas enzimas se superponen. Se podría interpretar que, en hipoxia, las células tratan de adaptarse inhibiendo más eficientemente su principal vía de consumo de O_2 . El concepto de que el NO y el O_2 interactúan en la regulación de sus gradientes de concentración de manera recíproca también ha sido sugerido por otros autores (Thomas *et al.*, 2001; Brookes *et al.*, 2003). Así, durante la hipoxia, debido a que la concentración de O_2 baja, disminuiría la producción de NO a partir de las NOS, aunque podría seguir produciéndose a través de la mitocondria y de la mioglobina (Shiva *et al.*, 2007). Este NO podría entonces actuar a través de la sGC para suprimir la inflamación asociada con los fenómenos de isquemia y reperfusión y, de este modo, protegería a la mitocondria de una sobrecaptación de calcio provocada por un exceso de producción de las ROS, que daría lugar a la apertura del poro de transición mitocondrial y el inicio de la apoptosis (Feissner *et al.*, 2009).

5.1.1. Consecuencias de la interacción del NO con la sGC y la CcO sobre las vías de señalización celular: fosforilación de VASP y AMPK

Para comprobar si las diferencias en la sensibilidad de la sGC y de la CcO al NO también se producen en las vías de señalización celular en las que participan, determinamos el grado de fosforilación de la fosfoproteína activada por vasodilatadores (VASP), que es fosforilada por la PKG a través de la ruta NO-sGC, así como el grado de fosforilación de la proteína quinasa activada por AMP (AMPK) que es sensible al estado energético celular. En los experimentos de dosis-respuesta, observamos unas 10-20 veces mayor sensibilidad de la ruta NO-sGC-PKG en comparación con la ruta NO-CcO-AMPK (Figuras 4.15 y 4.17): en el caso de VASP, el mayor grado de fosforilación se produce con una concentración baja de NO (no detectable; tetraciclina 2 ng/ml), mientras que en el caso de AMPK, el grado de fosforilación máxima se obtiene con una concentración alta de NO (739 nM; tetraciclina 50 ng/ml). Además, la fosforilación máxima de VASP es mucho más rápida (1 min; Figura 4.13) que la de la AMPK (15 min; Figura 4.14).

Este estudio es el primero en el que se analizan de manera conjunta ambas rutas de señalización, utilizando las mismas concentraciones de NO endógeno. La fosforilación de VASP se ha estudiado utilizando donadores de NO (Miersch *et al.*, 2008; Halvey *et al.*, 2009) y activadores de la síntesis de la eNOS, como el AVE3085 (Riad *et al.*, 2008). Halvey y col. (2009) obtuvieron el valor máximo de activación de VASP tratando a las plaquetas de rata durante 1 min con una concentración de NO menor a 10 nM, disminuyendo a concentraciones de NO mayores (hasta 50 nM). Otro ensayo se realizó utilizando el NMDA (N-metil-D-aspartato) provocando la activación intracelular de la nNOS en neuronas (Jurado *et al.*, 2004). En este trabajo observaron que la adición de NMDA provoca una estimulación de la fosforilación de VASP, seguida de un lento decaimiento. El grado de estimulación mayor de VASP se obtuvo a los 20 min tras la adición de NMDA, en contraste con los 2 min que observamos en nuestros experimentos. Esta diferencia puede ser debida al tipo celular utilizado o a la diferente cinética de producción de NO por la nNOS y la iNOS.

En los estudios sobre el patrón de activación de la AMPK por el NO, se han utilizado donadores de NO (SNAP, DETA-NO, SPER-NO) sin determinar la concentración de NO que producen (Lira *et al.*, 2007) o se ha determinado la presencia de NO utilizando el fluorocromo DAF-2 (difluoresceína-2) (Zhang *et al.*, 2008). También se ha utilizado el ONOO⁻ como activador de la AMPK (Xie *et al.*, 2006). En todos estos casos, la falta de precisión en la determinación de las concentraciones de NO que se utilizaron impiden determinar si los resultados pueden extrapolarse a una situación fisiológica. Almeida y col. (2004) observaron en astrocitos que la activación de la glucólisis se produce a través de la activación de la 6-fosfofructo-2-quinasa (PFK2) por la AMPK, inducida por la inhibición de la respiración mitocondrial por el NO. La PFK2 es la enzima responsable de la biosíntesis de la fructosa-2,6-bisfosfatasa (F2,6P(2)), un potente activador alostérico del regulador principal de la glucólisis, la 6-fosfofructo-1-quinasa (PFK1). En este estudio utilizaron astrocitos transfectados con el gen de la iNOS (pcDNA5-iNOS), un sistema similar al de células Tet-iNOS 293 utilizadas en nuestros experimentos. Además, determinaron de manera precisa la concentración de NO (1,4 μM) con un electrodo de NO similar al utilizado en nuestro estudio. En su trabajo observaron que esta concentración de NO era capaz de aumentar la fosforilación de AMPK en un intervalo de tiempo de 10 min. Este resultado es congruente con el nuestro, en donde una concentración de NO de 739 nM provoca la

fosforilación de AMPK a partir de 10 min, y manteniéndose al menos hasta los 60 min. No utilizaron concentraciones menores de NO, por lo que no sabemos cómo éstas pudieran haber afectado al patrón de activación de la AMPK en su estudio.

5.2. Modelo cinético de inhibición de la CcO por el NO y dinámica de producción y degradación del NO en la transición a anoxia

En esta tesis hemos realizado un estudio detallado de la cinética del consumo de O₂ celular a concentraciones fisiopatológicas de NO, en todo el rango de concentraciones de O₂. Basándonos en los resultados obtenidos, hemos desarrollado un modelo cinético de inhibición de la respiración celular por el NO que se ajusta a los datos experimentales y permite predecir el valor de la respiración a una concentración determinada de O₂ y NO.

Los estudios realizados en otros laboratorios no han podido obtener datos precisos de la cinética de la inhibición de la CcO por el NO a concentraciones bajas de O₂, que son fisiológicamente relevantes, debido principalmente a limitaciones técnicas. Los electrodos de O₂ de tipo Clark convencionales carecen de precisión a la hora de determinar el consumo de O₂ a concentraciones bajas del mismo. La respirometría de alta resolución permite determinar de manera precisa los valores de consumo de O₂ a concentraciones bajas de O₂ y durante la transición a anoxia (Gnaiger, 2001). Además, la inserción de un sensor de NO directamente en la cámara del respirómetro, permite realizar medidas simultáneas de producción de NO y consumo de O₂. De esta manera, hemos podido estudiar en un entorno celular la dependencia de la producción de NO por el O₂ (Figuras 4.19, 4.23 y 4.24) y determinar el grado de inhibición de la respiración inducida por el NO.

A partir de los datos obtenidos hemos desarrollado un modelo cinético de inhibición de la respiración por el NO (Figura 4.21) que tiene en cuenta tanto la inhibición competitiva (unión del NO al grupo hemo a_3) como la no competitiva (unión del NO al átomo Cu_B) de la CcO, como se ha descrito previamente en la literatura (Brunori *et al.*, 2006; Mason *et al.*, 2006; Antunes *et al.*, 2007; Cooper *et al.*, 2008). El modelo cinético asume que el sistema puede ser tratado bajo una aproximación de pseudo-equilibrio, y que dos ciclos son posibles, cada uno caracterizado por sus valores

de K_m y V_{max} . Uno de estos ciclos se corresponde con la enzima CcO libre y el otro ciclo se corresponde con la enzima CcO cuando se encuentra unida al NO. Se trata de un modelo simplificado, puesto que los detalles del ciclo catalítico de la CcO no son tenidos en cuenta, particularmente los intermediarios en el proceso de reducción del O_2 . El valor V_{max1} se corresponde con la respiración basal en células intactas a una concentración saturante de O_2 y en ausencia de NO. La respiración basal en las células se regula en unas condiciones en las que la CcO tiene una actividad moderada, significativamente menor que la capacidad máxima de la ETC y, por tanto, por debajo de la V_{max} real para la CcO (Gnaiger *et al.*, 1998). Esto se puede observar en los resultados presentados en la Tabla 4.3, y por el efecto de estimulación de la respiración inducido por el NO (Figura 4.26). Es destacable señalar que las concentraciones de NO que no son capaces de inhibir la respiración, son capaces de reducir a la CcO, y que el exceso de capacidad de la enzima es suficiente para mantener el consumo de O_2 en las células (Palacios-Callender *et al.*, 2007a). Esta observación podría explicar el efecto de estimulación del consumo de O_2 observado al revertir la inhibición de la CcO por el NO (Figura 4.26). Al aumentar la proporción de CcO reducida por la inhibición de NO, el resto de CcO aumenta su valor de *turnover* para compensar esta inhibición, de tal manera que la respiración no se vea afectada. La reversión rápida de esta inhibición provocaría un desajuste en el valor de *turnover* tras la inhibición en comparación con el valor presente antes de la inhibición. Este desajuste conlleva el aumento en la tasa de respiración tras la reversión de la inhibición por el NO. La tasa de respiración desciende de nuevo hacia los valores basales a medida que la CcO alcanza el valor de *turnover* original.

El modelo se diseñó para incorporar dos observaciones importantes, que no están reflejadas en estudios previos, realizados con la enzima CcO purificada (Torres *et al.*, 2000; Mason *et al.*, 2006). La primera es que el NO unido a la CcO oxidada actuaría como un agente reductor lento, más que como un inhibidor, donando su electrón desapareado. El ión NO^+ resultante se disociaría en una reacción no tipo redox junto a una molécula de H_2O , dando lugar a nitrito (NO_2^-) (Torres *et al.*, 2000; Antunes *et al.*, 2007). La segunda observación es que existe un ciclo de disociación del NO a partir de la especie CcO_1NO que consume O_2 , aunque con un valor de K_m alto (K_{m2}). Esto puede explicar el bajo consumo de O_2 residual que se observa experimentalmente a concentraciones altas de NO y bajas de O_2 , y que reproduce el modelo (Figura 4.22). A

pesar de que esta reacción no se ha observado inequívocamente en la enzima purificada, ha sido sugerida por Pearce y col. (2002), y ha sido demostrada directamente en un compuesto diseñado para mimetizar el centro activo binuclear de la CcO, sintetizado por Collman y col. (2008).

Nuestro modelo se ajusta a los datos experimentales y es compatible con lo que se sabe sobre la interacción entre la CcO y el NO (Pearce *et al.*, 2002; Mason *et al.*, 2006; Collman *et al.*, 2008). No obstante, no da una descripción completa de los flujos de O₂ en las células intactas, puesto que pueden existir otras reacciones entre el O₂ y el NO, bien espontáneas o bien catalizadas por otros componentes celulares diferentes a la CcO, que contribuirían al consumo de O₂. En cualquier caso, aporta una descripción sólida desde el punto de vista bioquímico y cuantitativa de los resultados, y permite predecir el valor de la respiración a una concentración determinada de O₂ y NO.

La característica más importante del modelo cinético desarrollado es que la población relativa de la forma de la CcO catalíticamente activa (O₂CcO_rNO; representada por el término $[O_2][NO]/K_{m2}K_{icNO}$ en la ecuación 4.1) es proporcional al producto de las concentraciones de NO y O₂. Esto explica porqué la enzima puede estar activa a concentraciones de inhibidor relativamente altas y también explica la relación no lineal de la IC₅₀ en función de la concentración de O₂ (Figura 4.20). Koivisto y col. (1997) mostraron una relación no lineal de la IC₅₀ frente a la concentración de O₂, utilizando mitocondrias aisladas y una fuente externa de NO (Koivisto *et al.*, 1997). Su explicación a este resultado fue la necesidad de la unión de dos moléculas de O₂ a la CcO para competir con el NO, lo cual es improbable. En el trabajo de Catherine N. Hall y David Attwell (2008) se recopilaron los valores de IC₅₀ de varios ensayos anteriores y se realizó un gráfico que sugiere una relación lineal entre el valor de IC₅₀ y la concentración de O₂ (Figura 5.3). Sin embargo, observando los datos representados, pensamos que un ajuste hiperbólico pudiera ser más preciso.

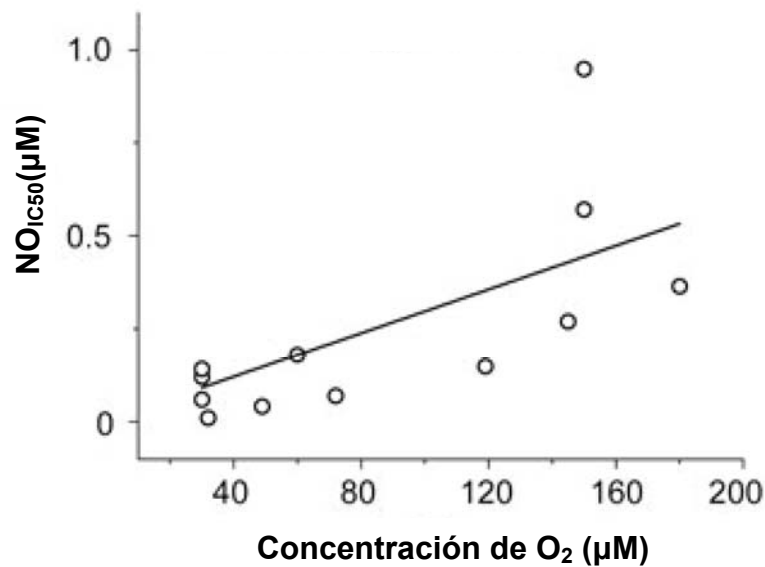


Figura 5.3. Recopilación de valores de IC₅₀ en función de la concentración de O₂

Los datos fueron obtenidos utilizando mitocondrias aisladas, y se representan en función de la concentración de O₂ a los que se calcularon. La recta calculada a partir de la ecuación 4 del trabajo de Catherine N. Hall y David Attwell trata de establecer una relación lineal entre todos estos datos. Figura adaptada de (Hall y Attwell, 2008).

Desde un punto de vista fisiopatológico, el control de la respiración mitocondrial por el NO regula los gradientes de O₂ en las células, la señalización redox y la apoptosis (Shiva y Darley-Usmar, 2003). Además, la interacción del NO con la mitocondria tiene importantes implicaciones en la biología de la isquemia (Shiva *et al.*, 2001) y la vasodilatación en situaciones de hipoxia (Palacios-Callender *et al.*, 2007b). Los estudios futuros de esta interacción nos ayudarán a clarificar los mecanismos por los cuales el NO ejerce sus acciones cardioprotectoras (Jones y Bolli, 2006).

5.3. Efectos del NO endógeno sobre la conductancia de la membrana mitocondrial interna a los protones

El NO, además de inhibir el consumo de O₂ mitocondrial, también podría regular la cinética de la conductancia a los protones (H⁺). La membrana mitocondrial interna es parcialmente permeable a los protones, debido a fenómenos de asimetría o reordenamientos especiales de los fosfolípidos de la membrana, a interacciones no específicas entre los fosfolípidos y las proteínas, o bien a la existencia de proteínas que catalicen de manera específica el transporte de los protones (Stuart *et al.*, 1999; Arcisio-

Miranda *et al.*, 2009). También pueden existir diferencias en la composición de los ácidos grasos presentes en los fosfolípidos de la membrana, en función de la ingesta en la alimentación de ácidos grasos insaturados, y estas diferencias alteren la conductancia de la misma a los protones (Gerson *et al.*, 2008). Debido a la entrada de protones en la matriz mitocondrial, se produce una disminución en el gradiente de protones ($\Delta\mu_{\text{H}^+}$) generado por la ETC a ambos lados de la membrana. Esta entrada de los protones a la matriz mitocondrial por cauces distintos a la ATP sintasa se conoce como fuga de protones (*proton leak*), y constituye un ciclo fútil de protones, ya que la energía se disipa en forma de calor.

Brookes y col. (1998) observaron que el peroxinitrito (ONOO^-), producto de la reacción del NO con el radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), es capaz de provocar la peroxidación de los ácidos grasos de la membrana mitocondrial interna, y que esta peroxidación produce un aumento de la fuga de protones. En nuestro estudio, la estimulación de la producción de NO con cantidades medias (52 nM; tetraciclina 20 ng/ml) o altas (576 nM, tetraciclina 40 ng/ml) provocó una disminución de la respiración mitocondrial del 16,7% y del 44,1%, respectivamente, respecto a las células control, mientras que el potencial de membrana ($\Delta\psi_{\text{m}}$) disminuyó un 4,29% y un 6,34%, respectivamente, (Figura 4.29). Sin embargo, al representar el consumo de O_2 frente al $\Delta\psi_{\text{m}}$, en ausencia de la síntesis de ATP, el valor que se obtiene en presencia de NO se ajusta perfectamente a la curva que describe la cinética de la conductancia de la membrana mitocondrial interna a los protones y, por tanto, podemos concluir que el NO, a concentraciones menores de 500 nM, no afecta a la fuga de protones, a pesar de inhibir la respiración mitocondrial. No obstante, podría ocurrir que concentraciones patológicas de NO superiores a las utilizadas en nuestro estudio alteraran la conductancia de la membrana interna a los protones. Recientemente se ha observado que el tratamiento con un donador de NO (DETA-NO 50 μM) a corazones de rata previene la fuga de protones provocada por la isquemia, a través de un mecanismo mediado por la PKG (Borutaite *et al.*, 2009).

6. CONCLUSIONES

Las principales conclusiones que se derivan de este trabajo son:

1. La enzima guanilato ciclasa soluble (sGC) es 50 veces más sensible que la respiración mitocondrial al NO endógeno, a concentraciones fisiológicas de O₂ (30 μM).
2. La ruta de señalización celular sGC-PKG (proteína quinasa dependiente de cGMP) se activa a concentraciones de NO inferiores a las necesarias para activar la vía de señalización de la AMPK (proteína quinasa activada por AMP).
3. La inhibición de la citocromo *c* oxidasa (CcO) por el NO endógeno en células intactas puede ser descrita mediante el modelo matemático desarrollado en esta tesis, que se ajusta con precisión a los datos experimentales y es capaz de predecir el valor de la respiración a una concentración de O₂ y NO determinadas. Las características más importantes de este modelo son:
 - i. Tiene en cuenta los tipos de inhibición competitiva y no competitiva, ambos reversibles. La inhibición competitiva se produce mediante la unión del NO al grupo hemo *a*₃ reducido, actuando, en este caso, como agente reductor. La inhibición no competitiva se produce a través de la unión del NO al Cu_B oxidado, dando lugar a la inactivación total de la enzima.
 - ii. Considera la existencia de un ciclo de disociación del NO de la CcO reducida que consume O₂ con baja eficiencia.
4. La concentración de NO necesaria para inhibir a la CcO al 50% (IC₅₀) en función de la concentración de O₂ se ajusta a una función hiperbólica.

5. El NO tiene un efecto activador de la respiración, que se pone de manifiesto al revertir la inhibición de la CcO por el NO. Este efecto de estimulación es mayor a concentraciones altas de NO, y puede ser atribuido a la acumulación de citocromo *c* reducido y a un descenso en el potencial de membrana causado por la inhibición de la CcO.

6. La concentración de O₂ crítica para la producción de NO por la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) se encuentra comprendida en un estrecho margen (15-45 μM), independientemente de la concentración de O₂ a la que se induce la síntesis de NO en las células.

7. Las concentraciones fisiológicas de NO endógeno disminuyen el consumo de O₂ mitocondrial sin aumentar la conductancia de la membrana mitocondrial interna a los protones.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Alderton W.K., Cooper C.E. & Knowles R.G. (2001) Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* **357**, 593-615.
- Almeida A., Moncada S. & Bolaños J.P. (2004) Nitric oxide switches on glycolysis through the AMP protein kinase and 6-phosphofructo-2-kinase pathway. *Nat Cell Biol* **6**, 45-51.
- Andre M., Latado H. & Felley-Bosco E. (2005) Inducible nitric oxide synthase-dependent stimulation of PKGI and phosphorylation of VASP in human embryonic kidney cells. *Biochem Pharmacol* **69**, 595-602.
- Antunes F., Boveris A. & Cadenas E. (2004) On the mechanism and biology of cytochrome oxidase inhibition by nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 16774-9.
- Antunes F., Boveris A. & Cadenas E. (2007) On the Biologic Role of the Reaction of NO with Oxidized Cytochrome c Oxidase. *Antioxid Redox Signal* **9**, 1569-79.
- Arcisio-Miranda M., Abdulkader F., Brunaldi K., Curi R. & Procopio J. (2009) Proton flux induced by free fatty acids across phospholipid bilayers: new evidences based on short-circuit measurements in planar lipid membranes. *Arch Biochem Biophys* **484**, 63-9.
- Beckman J.S. & Koppenol W.H. (1996) Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol* **271**, C1424-37.
- Bellamy T.C., Wood J., Goodwin D.A. & Garthwaite J. (2000) Rapid desensitization of the nitric oxide receptor, soluble guanylyl cyclase, underlies diversity of cellular cGMP responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 2928-33.
- Bellamy T.C. & Garthwaite J. (2001) Sub-second kinetics of the nitric oxide receptor, soluble guanylyl cyclase, in intact cerebellar cells. *J Biol Chem* **276**, 4287-92.
- Bellamy T.C., Griffiths C. & Garthwaite J. (2002) Differential sensitivity of guanylyl cyclase and mitochondrial respiration to nitric oxide measured using clamped concentrations. *J Biol Chem* **277**, 31801-7.
- Boelens R., Wever R., Van Gelder B.F. & Rademaker H. (1983) An EPR study of the photodissociation reactions of oxidised cytochrome c oxidase-nitric oxide complexes. *Biochim Biophys Acta* **724**, 176-83.
- Borutaite V. & Brown G.C. (1996) Rapid reduction of nitric oxide by mitochondria, and reversible inhibition of mitochondrial respiration by nitric oxide. *Biochem J* **315**, 295-9.

- Borutaite V., Budriunaite A. & Brown G.C. (2000) Reversal of nitric oxide-, peroxyxynitrite- and S-nitrosothiol-induced inhibition of mitochondrial respiration or complex I activity by light and thiols. *Biochim Biophys Acta* **1459**, 405-12.
- Borutaite V., Morkuniene R., Arandarcikaite O., Jekabsone A., Barauskaite J. & Brown G.C. (2009) Nitric oxide protects the heart from ischemia-induced apoptosis and mitochondrial damage via protein kinase G mediated blockage of permeability transition and cytochrome c release. *J Biomed Sci* **16**, 70.
- Brand, M. D. (1995) Measurement of mitochondrial protonmotive force. Bioenergetics-A Practical Approach Oxford, UK: Oxford University Press, 39-62.
- Brealey D., Brand M., Hargreaves I., Heales S., Land J., Smolenski R., Davies N.A., Cooper C.E. & Singer M. (2002) Association between mitochondrial dysfunction and severity and outcome of septic shock. *Lancet* **360**, 219-23.
- Bredt D.S. & Snyder S.H. (1990) Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 682-5.
- Brookes P.S., Kraus D.W., Shiva S., Doeller J.E., Barone M.C., Patel R.P., Lancaster J.R., Jr. & Darley-Usmar V. (2003) Control of mitochondrial respiration by NO*, effects of low oxygen and respiratory state. *J Biol Chem* **278**, 31603-9.
- Brookes P.S., Land J.M., Clark J.B. & Heales S.J. (1998) Peroxyxynitrite and brain mitochondria: evidence for increased proton leak. *J Neurochem* **70**, 2195-202.
- Brown G.C. (1995) Nitric oxide regulates mitochondrial respiration and cell functions by inhibiting cytochrome oxidase. *FEBS Lett* **369**, 136-9.
- Brown G.C. (2001) Regulation of mitochondrial respiration by nitric oxide inhibition of cytochrome c oxidase. *Biochim Biophys Acta* **1504**, 46-57.
- Brown G.C., Bolanos J.P., Heales S.J. & Clark J.B. (1995) Nitric oxide produced by activated astrocytes rapidly and reversibly inhibits cellular respiration. *Neurosci Lett* **193**, 201-4.
- Brown G.C. & Cooper C.E. (1994) Nanomolar concentrations of nitric oxide reversibly inhibit synaptosomal respiration by competing with oxygen at cytochrome oxidase. *FEBS Lett* **356**, 295-8.
- Brune B. & Ullrich V. (1987) Inhibition of platelet aggregation by carbon monoxide is mediated by activation of guanylate cyclase. *Mol Pharmacol* **32**, 497-504.
- Brunori M., Forte E., Arese M., Mastronicola D., Giuffre A. & Sarti P. (2006) Nitric oxide and the respiratory enzyme. *Biochim Biophys Acta* **1757**, 1144-54.

- Burkhardt M., Glazova M., Gambaryan S., Vollkommer T., Butt E., Bader B., Heermeier K., Lincoln T.M., Walter U. & Palmethofer A. (2000) KT5823 inhibits cGMP-dependent protein kinase activity in vitro but not in intact human platelets and rat mesangial cells. *J Biol Chem* **275**, 33536-41.
- Butt E., Nolte C., Schulz S., Beltman J., Beavo J.A., Jastorff B. & Walter U. (1992) Analysis of the functional role of cGMP-dependent protein kinase in intact human platelets using a specific activator 8-para-chlorophenylthio-cGMP. *Biochem Pharmacol* **43**, 2591-600.
- Cadenas E., Boveris A., Ragan C.I. & Stoppani A.O. (1977) Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADH-ubiquinone reductase and ubiquinol-cytochrome c reductase from beef-heart mitochondria. *Arch Biochem Biophys* **180**, 248-57.
- Cary S.P., Winger J.A. & Marletta M.A. (2005) Tonic and acute nitric oxide signaling through soluble guanylate cyclase is mediated by nonheme nitric oxide, ATP, and GTP. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 13064-9.
- Castro L.A., Robalinho R.L., Cayota A., Meneghini R. & Radi R. (1998) Nitric oxide and peroxynitrite-dependent aconitase inactivation and iron-regulatory protein-1 activation in mammalian fibroblasts. *Arch Biochem Biophys* **359**, 215-24.
- Cleeter M.W., Cooper J.M., Darley-Usmar V.M., Moncada S. & Schapira A.H. (1994) Reversible inhibition of cytochrome c oxidase, the terminal enzyme of the mitochondrial respiratory chain, by nitric oxide. Implications for neurodegenerative diseases. *FEBS Lett* **345**, 50-4.
- Collman J.P., Dey A., Decreau R.A., Yang Y., Hosseini A., Solomon E.I. & Eberspacher T.A. (2008) Interaction of nitric oxide with a functional model of cytochrome c oxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 9892-6.
- Cooper C.E., Davies N.A., Psychoulis M., Canevari L., Bates T.E., Dobbie M.S., Casley C.S. & Sharpe M.A. (2003) Nitric oxide and peroxynitrite cause irreversible increases in the K(m) for oxygen of mitochondrial cytochrome oxidase: in vitro and in vivo studies. *Biochim Biophys Acta* **1607**, 27-34.
- Cooper C.E., Mason M.G. & Nicholls P. (2008) A dynamic model of nitric oxide inhibition of mitochondrial cytochrome c oxidase. *Biochim Biophys Acta*. **1777**, 867-76
- Cover C., Mansouri A., Knight T.R., Bajt M.L., Lemasters J.J., Pessayre D. & Jaeschke H. (2005) Peroxynitrite-induced mitochondrial and endonuclease-mediated nuclear DNA damage in acetaminophen hepatotoxicity. *J Pharmacol Exp Ther* **315**, 879-87.

- Choi H.C., Song P., Xie Z., Wu Y., Xu J., Zhang M., Dong Y., Wang S., Lau K. & Zou M.H. (2008) Reactive nitrogen species is required for the activation of the AMP-activated protein kinase by statin in vivo. *J Biol Chem* **283**, 20186-97.
- de Frutos S., Nitta C.H., Caldwell E., Friedman J. & Gonzalez Bosc L.V. (2009) Regulation of soluble guanylyl cyclase- α 1 expression in chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension: role of NFATc3 and HuR. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **297**, L475-86.
- Deguchi T. & Yoshioka M. (1982) L-Arginine identified as an endogenous activator for soluble guanylate cyclase from neuroblastoma cells. *J Biol Chem* **257**, 10147-51.
- Denicola A. & Radi R. (2005) Peroxynitrite and drug-dependent toxicity. *Toxicology* **208**, 273-88.
- Draijer R., Vaandrager A.B., Nolte C., de Jonge H.R., Walter U. & van Hinsbergh V.W. (1995) Expression of cGMP-dependent protein kinase I and phosphorylation of its substrate, vasodilator-stimulated phosphoprotein, in human endothelial cells of different origin. *Circ Res* **77**, 897-905.
- Elahi M.M. & Matata B.M. (2006) Free radicals in blood: evolving concepts in the mechanism of ischemic heart disease. *Arch Biochem Biophys* **450**, 78-88.
- Erusalimsky J.D. & Moncada S. (2007) Nitric Oxide and Mitochondrial Signaling. From Physiology to Pathophysiology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **27**, 2524-31.
- Feissner R.F., Skalska J., Gaum W.E. & Sheu S.S. (2009) Crosstalk signaling between mitochondrial Ca²⁺ and ROS. *Front Biosci* **14**, 1197-218.
- Fesenko E.E., Kolesnikov S.S. & Lyubarsky A.L. (1985) Induction by cyclic GMP of cationic conductance in plasma membrane of retinal rod outer segment. *Nature* **313**, 310-3.
- Fischer T.A., Palmethofer A., Gambaryan S., Butt E., Jassoy C., Walter U., Sopper S. & Lohmann S.M. (2001) Activation of cGMP-dependent protein kinase I β inhibits interleukin 2 release and proliferation of T cell receptor-stimulated human peripheral T cells. *J Biol Chem* **276**, 5967-74.
- Forstermann U., Boissel J.P. & Kleinert H. (1998) Expressional control of the 'constitutive' isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III). *FASEB J* **12**, 773-90.
- Furchgott R.F. & Zawadzki J.V. (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* **288**, 373-6.

- Gadelha F.R., Thomson L., Fagian M.M., Costa A.D., Radi R. & Vercesi A.E. (1997) Ca²⁺-independent permeabilization of the inner mitochondrial membrane by peroxynitrite is mediated by membrane protein thiol cross-linking and lipid peroxidation. *Arch Biochem Biophys* **345**, 243-50.
- Galkin A., Higgs A. & Moncada S. (2007) Nitric oxide and hypoxia. *Essays Biochem* **43**, 29-42.
- Gambaryan S., Butt E., Marcus K., Glazova M., Palmethofer A., Guillon G. & Smolenski A. (2003) cGMP-dependent protein kinase type II regulates basal level of aldosterone production by zona glomerulosa cells without increasing expression of the steroidogenic acute regulatory protein gene. *J Biol Chem* **278**, 29640-8.
- Garthwaite J., Charles S.L. & Chess-Williams R. (1988) Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. *Nature* **336**, 385-8.
- Garthwaite J., Southam E., Boulton C.L., Nielsen E.B., Schmidt K. & Mayer B. (1995) Potent and selective inhibition of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase by 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one. *Mol Pharmacol* **48**, 184-8.
- Gerassimou C., Kotanidou A., Zhou Z., Simoes D.D., Roussos C. & Papapetropoulos A. (2007) Regulation of the expression of soluble guanylyl cyclase by reactive oxygen species. *Br J Pharmacol* **150**, 1084-91.
- Gerson A.R., Brown J.C., Thomas R., Bernards M.A. & Staples J.F. (2008) Effects of dietary polyunsaturated fatty acids on mitochondrial metabolism in mammalian hibernation. *J Exp Biol* **211**, 2689-99.
- Ghafourifar P. & Cadenas E. (2005) Mitochondrial nitric oxide synthase. *Trends Pharmacol Sci* **26**, 190-5.
- Gibb B.J., Wykes V. & Garthwaite J. (2003) Properties of NO-activated guanylyl cyclases expressed in cells. *Br J Pharmacol* **139**, 1032-40.
- Gnaiger E. (2001) Bioenergetics at low oxygen: dependence of respiration and phosphorylation on oxygen and adenosine diphosphate supply. *Respir Physiol* **128**, 277-97.
- Gnaiger E. & Kuznetsov A.V. (2002) Mitochondrial respiration at low levels of oxygen and cytochrome c. *Biochem Soc Trans* **30**, 252-8.
- Gnaiger E., Lassnig B., Kuznetsov A., Rieger G. & Margreiter R. (1998) Mitochondrial oxygen affinity, respiratory flux control and excess capacity of cytochrome c oxidase. *J Exp Biol* **201**, 1129-39.

- Gnaiger E., Mendez G. & Hand S.C. (2000) High phosphorylation efficiency and depression of uncoupled respiration in mitochondria under hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 11080-5.
- Griffiths C. & Garthwaite J. (2001) The shaping of nitric oxide signals by a cellular sink. *J Physiol* **536**, 855-62.
- Griffiths C., Wykes V., Bellamy T.C. & Garthwaite J. (2003) A new and simple method for delivering clamped nitric oxide concentrations in the physiological range: application to activation of guanylyl cyclase-coupled nitric oxide receptors. *Mol Pharmacol* **64**, 1349-56.
- Hagen T., Taylor C.T., Lam F. & Moncada S. (2003) Redistribution of intracellular oxygen in hypoxia by nitric oxide: effect on HIF1alpha. *Science* **302**, 1975-8.
- Halvey E.J., Vernon J., Roy B. & Garthwaite J. (2009) Mechanisms of activity-dependent plasticity in cellular no-cGMP signaling. *J Biol Chem* **284**, 25630-41.
- Hall C.N. & Attwell D. (2008) Assessing the physiological concentration and targets of nitric oxide in brain tissue. *J Physiol* **586**, 3597-615.
- Hall C.N. & Garthwaite J. (2006) Inactivation of nitric oxide by rat cerebellar slices. *J Physiol* **577**, 549-67.
- Hall C.N. & Garthwaite J. (2009) What is the real physiological NO concentration in vivo? *Nitric Oxide* **21**, 92-103.
- Hardie D.G. (2004) The AMP-activated protein kinase pathway--new players upstream and downstream. *J Cell Sci* **117**, 5479-87.
- Hardie D.G., Hawley S.A. & Scott J.W. (2006) AMP-activated protein kinase--development of the energy sensor concept. *J Physiol* **574**, 7-15.
- Hawley S.A., Davison M., Woods A., Davies S.P., Beri R.K., Carling D. & Hardie D.G. (1996) Characterization of the AMP-activated protein kinase kinase from rat liver and identification of threonine 172 as the major site at which it phosphorylates AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem* **271**, 27879-87.
- He L., Chen J., Liu X., Dinger B. & Fidone S. (2007) Enhanced nitric oxide-mediated chemoreceptor inhibition and altered cyclic GMP signaling in rat carotid body following chronic hypoxia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **293**, L1463-8.
- Hogg N. & Kalyanaraman B. (1999) Nitric oxide and lipid peroxidation. *Biochim Biophys Acta* **1411**, 378-84.

- Hue L. & Rider M.H. (2007) The AMP-activated protein kinase: more than an energy sensor. *Essays Biochem* **43**, 121-37.
- Ignarro L.J., Buga G.M., Wood K.S., Byrns R.E. & Chaudhuri G. (1987) Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 9265-9.
- Irvine J.C., Ritchie R.H., Favalaro J.L., Andrews K.L., Widdop R.E. & Kemp-Harper B.K. (2008) Nitroxyl (HNO): the Cinderella of the nitric oxide story. *Trends Pharmacol Sci* **29**, 601-8.
- Jones S.P. & Bolli R. (2006) The ubiquitous role of nitric oxide in cardioprotection. *J Mol Cell Cardiol* **40**, 16-23.
- Jurado S., Rodriguez-Pascual F., Sanchez-Prieto J., Reimunde F.M., Lamas S. & Torres M. (2006) NMDA induces post-transcriptional regulation of alpha2-guanylyl-cyclase-subunit expression in cerebellar granule cells. *J Cell Sci* **119**, 1622-31.
- Jurado S., Sanchez-Prieto J. & Torres M. (2004) Elements of the nitric oxide/cGMP pathway expressed in cerebellar granule cells: biochemical and functional characterisation. *Neurochem Int* **45**, 833-43.
- Kemp B.E., Stapleton D., Campbell D.J., Chen Z.P., Murthy S., Walter M., Gupta A., Adams J.J., Katsis F., van Denderen B., Jennings I.G., Iseli T., Michell B.J. & Witters L.A. (2003) AMP-activated protein kinase, super metabolic regulator. *Biochem Soc Trans* **31**, 162-8.
- Kim-Shapiro D.B., Schechter A.N. & Gladwin M.T. (2006) Unraveling the reactions of nitric oxide, nitrite, and hemoglobin in physiology and therapeutics. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **26**, 697-705.
- Kirsch M., Kemp-Harper B., Weissmann N., Grimminger F. & Schmidt H.H. (2008) Sildenafil in hypoxic pulmonary hypertension potentiates a compensatory up-regulation of NO-cGMP signaling. *Faseb J* **22**, 30-40.
- Knowles R.G., Palacios M., Palmer R.M. & Moncada S. (1989) Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 5159-62.
- Ko F.N., Wu C.C., Kuo S.C., Lee F.Y. & Teng C.M. (1994) YC-1, a novel activator of platelet guanylate cyclase. *Blood* **84**, 4226-33.
- Koivisto A., Matthias A., Bronnikov G. & Nedergaard J. (1997) Kinetics of the inhibition of mitochondrial respiration by NO. *FEBS Lett* **417**, 75-80.

- Konorev E.A., Hogg N. & Kalyanaraman B. (1998) Rapid and irreversible inhibition of creatine kinase by peroxynitrite. *FEBS Lett* **427**, 171-4.
- Lacza Z., Pankotai E., Csordas A., Gero D., Kiss L., Horvath E.M., Kollai M., Busija D.W. & Szabo C. (2006) Mitochondrial NO and reactive nitrogen species production: does mtNOS exist? *Nitric Oxide* **14**, 162-8.
- Landar A. & Darley-Usmar V.M. (2007) Evidence for oxygen as the master regulator of the responsiveness of soluble guanylate cyclase and cytochrome c oxidase to nitric oxide. *Biochem J* **405**, e3-4.
- Landmesser U., Harrison D.G. & Drexler H. (2006) Oxidant stress-a major cause of reduced endothelial nitric oxide availability in cardiovascular disease. *Eur J Clin Pharmacol* **62**, 13-9.
- Lira V.A., Soltow Q.A., Long J.H., Betters J.L., Sellman J.E. & Criswell D.S. (2007) Nitric oxide increases GLUT4 expression and regulates AMPK signaling in skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **293**, E1062-8.
- Lizasoain I., Moro M.A., Knowles R.G., Darley-Usmar V. & Moncada S. (1996) Nitric oxide and peroxynitrite exert distinct effects on mitochondrial respiration which are differentially blocked by glutathione or glucose. *Biochem J* **314**, 877-80
- Lucas K.A., Pitari G.M., Kazerounian S., Ruiz-Stewart I., Park J., Schulz S., Chepenik K.P. & Waldman S.A. (2000) Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. *Pharmacol Rev* **52**, 375-414.
- Martinez-Ruiz A. & Lamas S. (2009) Two decades of new concepts in nitric oxide signaling: from the discovery of a gas messenger to the mediation of nonenzymatic posttranslational modifications. *IUBMB Life* **61**, 91-8.
- Mason M.G., Nicholls P., Wilson M.T. & Cooper C.E. (2006) Nitric oxide inhibition of respiration involves both competitive (heme) and noncompetitive (copper) binding to cytochrome c oxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 708-13.
- Massberg S., Gruner S., Konrad I., Garcia Arguinzonis M.I., Eigenthaler M., Hemler K., Kersting J., Schulz C., Muller I., Besta F., Nieswandt B., Heinzmann U., Walter U. & Gawaz M. (2004) Enhanced in vivo platelet adhesion in vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP)-deficient mice. *Blood* **103**, 136-42.
- Massberg S., Sausbier M., Klatt P., Bauer M., Pfeifer A., Siess W., Fassler R., Ruth P., Krombach F. & Hofmann F. (1999) Increased adhesion and aggregation of platelets lacking cyclic guanosine 3',5'-monophosphate kinase I. *J Exp Med* **189**, 1255-64.

- Mateo J., Garcia-Lecea M., Cadenas S., Hernandez C. & Moncada S. (2003) Regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha by nitric oxide through mitochondria-dependent and -independent pathways. *Biochem J* **376**, 537-44.
- Mayer B., Kleschyov A.L., Stessel H., Russwurm M., Munzel T., Koesling D. & Schmidt K. (2009) Inactivation of soluble guanylate cyclase by stoichiometric S-nitrosation. *Mol Pharmacol* **75**, 886-91.
- McGee S.L. & Hargreaves M. (2008) AMPK and transcriptional regulation. *Front Biosci* **13**, 3022-33.
- Metukuri M.R., Namas R., Gladstone C., Clermont T., Jefferson B., Barclay D., Hermus L., Billiar T.R., Zamora R. & Vodovotz Y. (2009) Activation of latent transforming growth factor-beta1 by nitric oxide in macrophages: role of soluble guanylate cyclase and MAP kinases. *Wound Repair Regen* **17**, 578-88.
- Miersch S., Espey M.G., Chaube R., Akarca A., Tweten R., Ananvoranich S. & Mutus B. (2008) Plasma membrane cholesterol content affects nitric oxide diffusion dynamics and signaling. *J Biol Chem* **283**, 18513-21.
- Mollnau H., Schulz E., Daiber A., Baldus S., Oelze M., August M., Wendt M., Walter U., Geiger C., Agrawal R., Kleschyov A.L., Meinertz T. & Munzel T. (2003) Nebivolol prevents vascular NOS III uncoupling in experimental hyperlipidemia and inhibits NADPH oxidase activity in inflammatory cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **23**, 615-21.
- Moncada S. & Bolaños J.P. (2006) Nitric oxide, cell bioenergetics and neurodegeneration. *J Neurochem* **97**, 1676-89.
- Moncada S. & Erusalimsky J.D. (2002) Does nitric oxide modulate mitochondrial energy generation and apoptosis? *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 214-20.
- Mullershausen F., Koesling D. & Friebe A. (2005) NO-sensitive guanylyl cyclase and NO-induced feedback inhibition in cGMP signaling. *Front Biosci* **10**, 1269-78.
- Mullershausen F., Lange A., Mergia E., Friebe A. & Koesling D. (2006) Desensitization of NO/cGMP signaling in smooth muscle: blood vessels versus airways. *Mol Pharmacol* **69**, 1969-74.
- Mullershausen F., Russwurm M., Thompson W.J., Liu L., Koesling D. & Friebe A. (2001) Rapid nitric oxide-induced desensitization of the cGMP response is caused by increased activity of phosphodiesterase type 5 paralleled by phosphorylation of the enzyme. *J Cell Biol* **155**, 271-8.
- Murad F. (1986) Cyclic guanosine monophosphate as a mediator of vasodilation. *J Clin Invest* **78**, 1-5.

- Nisoli E., Clementi E., Paolucci C., Cozzi V., Tonello C., Sciorati C., Bracale R., Valerio A., Francolini M., Moncada S. & Carruba M.O. (2003) Mitochondrial biogenesis in mammals: the role of endogenous nitric oxide. *Science* **299**, 896-9.
- Oess S., Icking A., Fulton D., Govers R. & Muller-Esterl W. (2006) Subcellular targeting and trafficking of nitric oxide synthases. *Biochem J* **396**, 401-9.
- Orstavik S., Natarajan V., Tasken K., Jahnsen T. & Sandberg M. (1997) Characterization of the human gene encoding the type I alpha and type I beta cGMP-dependent protein kinase (PRKG1). *Genomics* **42**, 311-8.
- Palacios-Callender M., Hollis V., Frakich N., Mateo J. & Moncada S. (2007a) Cytochrome c oxidase maintains mitochondrial respiration during partial inhibition by nitric oxide. *J Cell Sci* **120**, 160-5.
- Palacios-Callender M., Hollis V., Mitchison M., Frakich N., Unitt D. & Moncada S. (2007b) Cytochrome c oxidase regulates endogenous nitric oxide availability in respiring cells: a possible explanation for hypoxic vasodilation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 18508-13.
- Palacios-Callender M., Quintero M., Hollis V.S., Springett R.J. & Moncada S. (2004) Endogenous NO regulates superoxide production at low oxygen concentrations by modifying the redox state of cytochrome c oxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 7630-5.
- Palmer R.M., Ferrige A.G. & Moncada S. (1987) Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* **327**, 524-6.
- Parihar A., Vaccaro P. & Ghafourifar P. (2008) Nitric oxide irreversibly inhibits cytochrome oxidase at low oxygen concentrations: evidence for inverse oxygen concentration-dependent peroxynitrite formation. *IUBMB Life* **60**, 64-7.
- Paula S., Volkov A.G., Van Hoek A.N., Haines T.H. & Deamer D.W. (1996) Permeation of protons, potassium ions, and small polar molecules through phospholipid bilayers as a function of membrane thickness. *Biophys J* **70**, 339-48.
- Pearce L.L., Kanai A.J., Birder L.A., Pitt B.R. & Peterson J. (2002) The catabolic fate of nitric oxide: the nitric oxide oxidase and peroxynitrite reductase activities of cytochrome oxidase. *J Biol Chem* **277**, 13556-62.
- Pearce L.L., Kanai A.J., Epperly M.W. & Peterson J. (2005) Nitrosative stress results in irreversible inhibition of purified mitochondrial complexes I and III without modification of cofactors. *Nitric Oxide* **13**, 254-63.

- Pearce W.J., Williams J.M., White C.R. & Lincoln T.M. (2009) Effects of chronic hypoxia on soluble guanylate cyclase activity in fetal and adult ovine cerebral arteries. *J Appl Physiol* **107**, 192-9.
- Pfeifer A., Klatt P., Massberg S., Ny L., Sausbier M., Hirneiss C., Wang G.X., Korth M., Aszodi A., Andersson K.E., Krombach F., Mayerhofer A., Ruth P., Fassler R. & Hofmann F. (1998) Defective smooth muscle regulation in cGMP kinase I-deficient mice. *Embo J* **17**, 3045-51.
- Poderoso J.J., Carreras M.C., Lisdero C., Riobo N., Schopfer F. & Boveris A. (1996) Nitric oxide inhibits electron transfer and increases superoxide radical production in rat heart mitochondria and submitochondrial particles. *Arch Biochem Biophys* **328**, 85-92.
- Pollock J.S., Forstermann U., Mitchell J.A., Warner T.D., Schmidt H.H., Nakane M. & Murad F. (1991) Purification and characterization of particulate endothelium-derived relaxing factor synthase from cultured and native bovine aortic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 10480-4.
- Poulos T.L. (2006) Soluble guanylate cyclase. *Curr Opin Struct Biol* **16**, 736-43.
- Radi R., Rodriguez M., Castro L. & Telleri R. (1994) Inhibition of mitochondrial electron transport by peroxynitrite. *Arch Biochem Biophys* **308**, 89-95.
- Radomski M.W., Palmer R.M. & Moncada S. (1987) Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. *Lancet* **2**, 1057-8.
- Reid H.M. & Kinsella B.T. (2003) The alpha, but not the beta, isoform of the human thromboxane A2 receptor is a target for nitric oxide-mediated desensitization. Independent modulation of Tp alpha signaling by nitric oxide and prostacyclin. *J Biol Chem* **278**, 51190-202.
- Rengasamy A. & Johns R.A. (1996) Determination of Km for oxygen of nitric oxide synthase isoforms. *J Pharmacol Exp Ther* **276**, 30-3.
- Riad A., Westermann D., Van Linthout S., Mohr Z., Uyulmaz S., Becher P.M., Rutten H., Wohlfart P., Peters H., Schultheiss H.P. & Tschöpe C. (2008) Enhancement of endothelial nitric oxide synthase production reverses vascular dysfunction and inflammation in the hindlimbs of a rat model of diabetes. *Diabetologia* **51**, 2325-32.
- Richter C. (1987) Biophysical consequences of lipid peroxidation in membranes. *Chem Phys Lipids* **44**, 175-89.
- Ross M.F., Da Ros T., Blaikie F.H., Prime T.A., Porteous C.M., Severina, II, Skulachev V.P., Kjaergaard H.G., Smith R.A. & Murphy M.P. (2006) Accumulation of lipophilic dications by mitochondria and cells. *Biochem J* **400**, 199-208.

- Ross M.F., Kelso G.F., Blaikie F.H., James A.M., Cocheme H.M., Filipovska A., Da Ros T., Hurd T.R., Smith R.A. & Murphy M.P. (2005) Lipophilic triphenylphosphonium cations as tools in mitochondrial bioenergetics and free radical biology. *Biochemistry (Mosc)* **70**, 222-30.
- Rossignol R., Faustin B., Rocher C., Malgat M., Mazat J.P. & Letellier T. (2003) Mitochondrial threshold effects. *Biochem J* **370**, 751-62.
- Roy B. & Garthwaite J. (2006) Nitric oxide activation of guanylyl cyclase in cells revisited. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 12185-90.
- Roy B., Halvey E.J. & Garthwaite J. (2008) An enzyme-linked receptor mechanism for nitric oxide-activated guanylyl cyclase. *J Biol Chem* **283**, 18841-51.
- Ruiz-Stewart I., Tiyyagura S.R., Lin J.E., Kazerounian S., Pitari G.M., Schulz S., Martin E., Murad F. & Waldman S.A. (2004) Guanylyl cyclase is an ATP sensor coupling nitric oxide signaling to cell metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 37-42.
- Rusche K.M., Spiering M.M. & Marletta M.A. (1998) Reactions catalyzed by tetrahydrobiopterin-free nitric oxide synthase. *Biochemistry* **37**, 15503-12.
- Russwurm M., Behrends S., Harteneck C. & Koesling D. (1998) Functional properties of a naturally occurring isoform of soluble guanylyl cyclase. *Biochem J* **335**, 125-30.
- Russwurm M. & Koesling D. (2004) NO activation of guanylyl cyclase. *Embo J* **23**, 4443-50.
- Rybalkin S.D., Rybalkina I.G., Feil R., Hofmann F. & Beavo J.A. (2002) Regulation of cGMP-specific phosphodiesterase (PDE5) phosphorylation in smooth muscle cells. *J Biol Chem* **277**, 3310-7.
- Santolini J., Meade A.L. & Stuehr D.J. (2001) Differences in three kinetic parameters underpin the unique catalytic profiles of nitric-oxide synthases I, II, and III. *J Biol Chem* **276**, 48887-98.
- Sarti P., Giuffre A., Forte E., Mastronicola D., Barone M.C. & Brunori M. (2000) Nitric oxide and cytochrome c oxidase: mechanisms of inhibition and NO degradation. *Biochem Biophys Res Commun* **274**, 183-7.
- Sausbier M., Schubert R., Voigt V., Hirneiss C., Pfeifer A., Korth M., Kleppisch T., Ruth P. & Hofmann F. (2000) Mechanisms of NO/cGMP-dependent vasorelaxation. *Circ Res* **87**, 825-30.

- Sayed N., Baskaran P., Ma X., van den Akker F. & Beuve A. (2007) Desensitization of soluble guanylyl cyclase, the NO receptor, by S-nitrosylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 12312-7.
- Sayed N., Kim D.D., Fioramonti X., Iwahashi T., Duran W.N. & Beuve A. (2008) Nitroglycerin-induced S-nitrosylation and desensitization of soluble guanylyl cyclase contribute to nitrate tolerance. *Circ Res* **103**, 606-14.
- Schermuly R.T., Stasch J.P., Pullamsetti S.S., Middendorff R., Muller D., Schluter K.D., Dingendorf A., Hackemack S., Kolosionek E., Kaulen C., Dumitrascu R., Weissmann N., Mittendorf J., Klepetko W., Seeger W., Ghofrani H.A. & Grimminger F. (2008) Expression and function of soluble guanylate cyclase in pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J* **32**, 881-91.
- Schlossmann J., Ammendola A., Ashman K., Zong X., Huber A., Neubauer G., Wang G.X., Allescher H.D., Korth M., Wilm M., Hofmann F. & Ruth P. (2000) Regulation of intracellular calcium by a signalling complex of IRAG, IP3 receptor and cGMP kinase I β . *Nature* **404**, 197-201.
- Schlossmann J. & Hofmann F. (2005) cGMP-dependent protein kinases in drug discovery. *Drug Discov Today* **10**, 627-34.
- Schrammel A., Behrends S., Schmidt K., Koesling D. & Mayer B. (1996) Characterization of 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one as a heme-site inhibitor of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. *Mol Pharmacol* **50**, 1-5.
- Seo H.G., Takata I., Nakamura M., Tatsumi H., Suzuki K., Fujii J. & Taniguchi N. (1995) Induction of nitric oxide synthase and concomitant suppression of superoxide dismutases in experimental colitis in rats. *Arch Biochem Biophys* **324**, 41-7.
- Shaw C.A., Webb D.J., Rossi A.G. & Megson I.L. (2009) Cyclic GMP protects human macrophages against peroxynitrite-induced apoptosis. *J Inflamm (Lond)* **6**, 14.
- Shirato M., Sakamoto T., Uchida Y., Nomura A., Ishii Y., Iijima H., Goto Y. & Hasegawa S. (1998) Molecular cloning and characterization of Ca²⁺-dependent inducible nitric oxide synthase from guinea-pig lung. *Biochem J* **333**, 795-9.
- Shiva S., Brookes P.S., Patel R.P., Anderson P.G. & Darley-Usmar V.M. (2001) Nitric oxide partitioning into mitochondrial membranes and the control of respiration at cytochrome c oxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 7212-7.
- Shiva S. & Darley-Usmar V.M. (2003) Control of the nitric oxide-cytochrome c oxidase signaling pathway under pathological and physiological conditions. *IUBMB Life* **55**, 585-90.

- Shiva S., Huang Z., Grubina R., Sun J., Ringwood L.A., MacArthur P.H., Xu X., Murphy E., Darley-Usmar V.M. & Gladwin M.T. (2007) Deoxymyoglobin is a nitrite reductase that generates nitric oxide and regulates mitochondrial respiration. *Circ Res* **100**, 654-61.
- Shiva S., Oh J.Y., Landar A.L., Ulasova E., Venkatraman A., Bailey S.M. & Darley-Usmar V.M. (2005) Nitroxia: the pathological consequence of dysfunction in the nitric oxide-cytochrome c oxidase signaling pathway. *Free Radic Biol Med* **38**, 297-306.
- Smolenski A., Poller W., Walter U. & Lohmann S.M. (2000) Regulation of human endothelial cell focal adhesion sites and migration by cGMP-dependent protein kinase I. *J Biol Chem* **275**, 25723-32.
- Stasch J.P., Becker E.M., Alonso-Alija C., Apeler H., Dembowski K., Feurer A., Gerzer R., Minuth T., Perzborn E., Pleiss U., Schroder H., Schroeder W., Stahl E., Steinke W., Straub A. & Schramm M. (2001) NO-independent regulatory site on soluble guanylate cyclase. *Nature* **410**, 212-5.
- Stasch J.P. & Hobbs A.J. (2009) NO-independent, haem-dependent soluble guanylate cyclase stimulators. *Handb Exp Pharmacol*, 277-308.
- Stone J.R. & Marletta M.A. (1995) Heme stoichiometry of heterodimeric soluble guanylate cyclase. *Biochemistry* **34**, 14668-74.
- Stone J.R., Sands R.H., Dunham W.R. & Marletta M.A. (1995) Electron paramagnetic resonance spectral evidence for the formation of a pentacoordinate nitrosyl-heme complex on soluble guanylate cyclase. *Biochem Biophys Res Commun* **207**, 572-7.
- Stone J.R. & Marletta M.A. (1996) Spectral and kinetic studies on the activation of soluble guanylate cyclase by nitric oxide. *Biochemistry* **35**, 1093-9.
- Stuart J.A., Brindle K.M., Harper J.A. & Brand M.D. (1999) Mitochondrial proton leak and the uncoupling proteins. *J Bioenerg Biomembr* **31**, 517-25.
- Stuart J.A., Cadenas S., Jekabsons M.B., Roussel D. & Brand M.D. (2001) Mitochondrial proton leak and the uncoupling protein 1 homologues. *Biochim Biophys Acta* **1504**, 144-58.
- Stuehr D.J., Kwon N.S. & Nathan C.F. (1990) FAD and GSH participate in macrophage synthesis of nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun* **168**, 558-65.
- Stuehr D.J. & Marletta M.A. (1985) Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to Escherichia coli lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**, 7738-42.

- Suzuki T., Suematsu M. & Makino R. (2001) Organic phosphates as a new class of soluble guanylate cyclase inhibitors. *FEBS Lett* **507**, 49-53.
- Thomas D.D., Liu X., Kantrow S.P. & Lancaster J.R., Jr. (2001) The biological lifetime of nitric oxide: implications for the perivascular dynamics of NO and O₂. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 355-60.
- Torres J., Sharpe M.A., Rosquist A., Cooper C.E. & Wilson M.T. (2000) Cytochrome c oxidase rapidly metabolises nitric oxide to nitrite. *FEBS Lett* **475**, 263-6.
- Witczak O., Orstavik S., Natarajan V., Frengen E., Jahnsen T. & Sandberg M. (1998) Characterization of the gene encoding the human type II cGMP-dependent protein kinase. *Biochem Biophys Res Commun* **245**, 113-9.
- Wollert K.C., Fiedler B., Gambaryan S., Smolenski A., Heineke J., Butt E., Trautwein C., Lohmann S.M. & Drexler H. (2002) Gene transfer of cGMP-dependent protein kinase I enhances the antihypertrophic effects of nitric oxide in cardiomyocytes. *Hypertension* **39**, 87-92.
- Wooldridge A.A., MacDonald J.A., Erdodi F., Ma C., Borman M.A., Hartshorne D.J. & Haystead T.A. (2004) Smooth muscle phosphatase is regulated in vivo by exclusion of phosphorylation of threonine 696 of MYPT1 by phosphorylation of Serine 695 in response to cyclic nucleotides. *J Biol Chem* **279**, 34496-504.
- Wykes V. & Garthwaite J. (2004) Membrane-association and the sensitivity of guanylyl cyclase-coupled receptors to nitric oxide. *Br J Pharmacol* **141**, 1087-90.
- Xia Y. (2007) Superoxide generation from nitric oxide synthases. *Antioxid Redox Signal* **9**, 1773-8.
- Xie Z., Dong Y., Zhang M., Cui M.Z., Cohen R.A., Riek U., Neumann D., Schlattner U. & Zou M.H. (2006) Activation of protein kinase C zeta by peroxynitrite regulates LKB1-dependent AMP-activated protein kinase in cultured endothelial cells. *J Biol Chem* **281**, 6366-75.
- Xu W., Charles I.G. & Moncada S. (2005) Nitric oxide: orchestrating hypoxia regulation through mitochondrial respiration and the endoplasmic reticulum stress response. *Cell Res* **15**, 63-5.
- Xu W., Liu L., Charles I.G. & Moncada S. (2004) Nitric oxide induces coupling of mitochondrial signalling with the endoplasmic reticulum stress response. *Nat Cell Biol* **6**, 1129-34.
- Yui Y., Hattori R., Kosuga K., Eizawa H., Hiki K. & Kawai C. (1991) Purification of nitric oxide synthase from rat macrophages. *J Biol Chem* **266**, 12544-7.

- Zhang J., Xie Z., Dong Y., Wang S., Liu C. & Zou M.H. (2008) Identification of nitric oxide as an endogenous activator of the AMP-activated protein kinase in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* **283**, 27452-61.
- Zhao Y., Brandish P.E., Ballou D.P. & Marletta M.A. (1999) A molecular basis for nitric oxide sensing by soluble guanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 14753-8.
- Zhao Y., Brandish P.E., DiValentin M., Schelvis J.P., Babcock G.T. & Marletta M.A. (2000) Inhibition of soluble guanylate cyclase by ODQ. *Biochemistry* **39**, 10848-54.
- Zhou Z., Sayed N., Pyriochou A., Roussos C., Fulton D., Beuve A. & Papapetropoulos A. (2008) Protein Kinase G Phosphorylates Soluble Guanylyl Cyclase on Serine 64 and Inhibits Its Activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **28**, 1803-10.
- Zou G. & Skeel R.D. (2003) Robust biased Brownian dynamics for rate constant calculation. *Biophys J* **85**, 2147-57.