

**SIMPOSIO III.  
EL ÓXIDO NÍTRICO Y EL MONÓXIDO  
DE CARBONO EN LA REGULACIÓN DE LA  
HOMEOSTASIS CELULAR Y DEL DESARROLLO  
DE LA ATEROESCLEROSIS**

MEDICINA (Buenos Aires) 2005; 65 (Supl. II): 29-31

**EL ÓXIDO NÍTRICO Y EL MONÓXIDO DE CARBONO COMO METABOLITOS INHIBIDORES  
DE LA RESPIRACIÓN CELULAR**

**ALBERTO BOVERIS**

*Laboratorio de Biología de Radicales Libres, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.*

El óxido nítrico (NO) y el monóxido de carbono (CO) son metabolitos producidos normalmente en el cuerpo humano por la acción de enzimas específicas: la familia de las óxido nítrico sintasas produce NO y las hemo-oxigenasas producen CO. Desde el punto de vista cuantitativo la producción de NO es muy superior a la de CO. Los dos metabolitos comparten la propiedad de tener una gran afinidad por la citocromo oxidasa

y de actuar como inhibidores competitivos de la enzima. Las constantes de unión del NO, del CO y del O<sub>2</sub> al centro binuclear Cu<sub>g</sub>/a<sub>3</sub> son similares. Sin embargo el NO es capaz de disociarse relativamente rápido del complejo, mientras que el CO lo hace mas lentamente y el O<sub>2</sub> esta atrapado cinéticamente. Se están desarrollando drogas de aplicación clínica.

**PAPEL ANTIATEROGENICO DEL NO SOBRE LAS LIPOPROTEÍNAS.**

**LAURA E. SCHREIER**

*Laboratorio de Lípidos y Lipoproteínas, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.*

La oxidación de LDL es un evento fundamental en el desarrollo de la aterosclerosis. La LDL situada en el espacio extracelular del endotelio arterial es susceptible a la acción de las especies reactivas, que modularían en parte su grado de oxidación. La LDLox ejerce sobre el endotelio diversos efectos deletéreos que incluyen la disfunción en la síntesis, secreción ó actividad del NO contribuyendo en gran medida a amplificar la disfunción endotelial. El NO ejerce potentes acciones antioxidantes durante la oxidación de LDL, por medio del atrapamiento de radicales lipídicos involucrados en la propagación de la oxidación y preservando el a-tocoferol de LDL. Contrariamente, aumentos en el estrés oxidativo en la pared arterial conducen a la disfunción endotelial y a un aumento de la oxidación de LDL, debido en parte a la disminución de la biodisponibilidad del NO. Por otro lado, el NO puede reaccionar con el superóxido liberado en ese mismo compartimento desde las células, determinando la formación de peroxinitrito, que promueve la oxidación y nitración de LDL en un endotelio disfuncional. Si bien

el ácido úrico es un conocido antioxidante, en determinadas condiciones podría comportarse como prooxidante durante la oxidación de LDL mediada por cobre. Este efecto puede ser revertido por la acción de NO. En los últimos años se demostró que la HDL y sus enzimas asociadas, como la paraoxonasa, ejercerían una acción antioxidante importante sobre LDL. La paraoxonasa también protegería a la misma HDL de la oxidación, preservando las funciones antiaterogénicas de esta lipoproteína. Existen evidencias acerca de la inactivación parcial de paraoxonasa por parte de sustratos oxidados, mientras lleva a cabo su actividad antioxidante. Estudios que evalúen la interacción de paraoxonasa con sustancias presentes en el subendotelio, como el NO y el peroxinitrito, podrían contribuir a la comprensión del complejo mecanismo de acción de esta enzima. La acción moduladora de diversas sustancias sobre la actividad antioxidante de la paraoxonasa, constituye una meta muy atractiva para el desarrollo de futuros abordajes terapéuticos que retarden el desarrollo de la aterosclerosis.

## LA EXPOSICIÓN A LA ALTURA (4340 M) AUMENTA LA ACTIVIDAD Y EXPRESIÓN DE LA NOS MITOCONDRIAL DE CORAZÓN DE RATA

<sup>1</sup>LAURA B. VALDEZ, <sup>1</sup>TAMARA ZAORBORNYJ, <sup>2</sup>GUSTAVO F. GONZALES Y <sup>1</sup>ALBERTO BOVERIS

<sup>1</sup>Laboratorio de Radicales Libres en Biología (PRALIB-CONICET), Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires. Junín 956, C1113AAD, Buenos Aires, Argentina. <sup>2</sup>Instituto de Investigaciones de la Altura, Facultad de Ciencias y Filosofía, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Perú.

La exposición a la altura constituye una situación fisiopatológica que produce tanto efectos positivos (efecto cardioprotector) como negativos para la salud de los seres humanos y animales. El estado estacionario intracelular de NO es considerado el factor determinante más probable de la adaptación a la altura. Las mitocondrias de corazón de rata producen NO en las reacciones de las óxido nítrico sintasas mitocondrial (mtNOS) y endotelial (eNOS). El objetivo del trabajo fue determinar la actividad de mtNOS de corazón e hígado de ratas expuestas a la altura (en condiciones naturales) y compararla con otras actividades enzimáticas mitocondriales y con parámetros de la adaptación. Las ratas fueron divididas en dos grupos: un grupo fue mantenido a nivel del mar (Lima; 100 kPa) y otro fue transportado a Cerro de Pasco (4340 m; 61.3 kPa). Los animales fueron sacrificados a los 7, 14, 21, 42 y 84 días. Las ratas expuestas a la altura respondieron con un arresto en la ganancia de peso y una hiper-

trofia significativa (200%) del ventrículo derecho. El nivel de hematocrito a los 84 días de exposición a la altura fue 40% mayor que el valor determinado en ratas que permanecieron a nivel del mar. La altura incrementó específica y significativamente (80%) la actividad de la mtNOS de corazón, ya que la actividad de mtNOS de hígado y la eNOS citosólica de corazón no se modificaron. El aumento en la actividad de mtNOS se correlacionó con un incremento del 60% en los niveles de expresión de la NOS determinada en la fracción mitocondrial de corazones de ratas expuestas a la altura. Asimismo, se observó una correlación lineal ( $r^2 = 0.85$ ) entre los niveles de hematocrito y la actividad de mtNOS cardíaca. El aumento en la expresión y actividad de la mtNOS de corazón forma parte de la respuesta fisiológica de adaptación a la altura. El incremento en la producción de NO por mitocondrias de corazón podría ser esencial en el desarrollo de un efecto cardioprotector en situaciones de hipoxia.

## LA INTERNALIZACIÓN MITOCONDRIAL DE LAS ÓXIDO NÍTRICO SINTASAS CITOSÓLICAS Y LA HOMEOSTASIS CELULAR.

M. CECILIA CARRERAS

Laboratorio de Metabolismo del Oxígeno, Hospital de Clínicas, Universidad de Buenos Aires.

En la endotoxemia, los lipopolisacáridos producen la liberación masiva de citoquinas proinflamatorias que inducen la liberación de diversos mediadores biológicos. El óxido nítrico (NO) es liberado a partir de la inducción de la NO sintasa inducible (iNOS). El hígado, el músculo esquelético y el diafragma sufren un deterioro temprano en la evolución del cuadro séptico relacionado con la expresión de iNOS predominantemente en las células parenquimatosas. Nuestro grupo ha demostrado alteraciones en la función mitocondrial diafragmática durante la endotoxemia y la participación de la iNOS en la génesis de este fenómeno a través del aumento en las concentraciones en el estado estacionario de NO y anión superóxido, y su producto de reacción, peroxinitrito que resulta en la disminución de la fuerza contráctil. En el hígado, hemos observado la internalización mitocondrial de la iNOS por western blot, con la aparición de una significativa produc-

ción  $Ca^{2+}$ -independiente de NO que se apreció ausente en las mitocondrias de animales controles inyectados con solución salina estéril, en las cuales la producción de NO es  $Ca$ -dependiente por la mtNOS. El aumento de la producción intramitocondrial de NO se encontró relacionado con una mayor producción mitocondrial de radicales libres del oxígeno y anión peroxinitrito y la concomitante nitración de las proteínas mitocondriales. El peroxinitrito produce el deterioro de la función mitocondrial, en parte por nitración e inhibición del complejo I mitocondrial como se ha descrito en diversas enfermedades neurodegenerativas y en la misma condición séptica. La comprensión del mecanismo de translocación de la iNOS a las mitocondrias y una posible inhibición farmacológica de este mecanismo podría permitir controlar el daño mitocondrial en la endotoxemia y por lo tanto limitar la subsecuente falla orgánica.

## RESPUESTA DE LAS ÓXIDO NÍTRICO SINTASAS MITOCONDRIAL Y CITOSÓLICA AL SHOCK ENDOTÓXICO

**SILVIA ALVAREZ, MARÍA CECILIA CIMOLAI, PILAR BARRIOS ROTELA Y ALBERTO BOVERIS**

*Laboratorio de Biología de Radicales Libres (PRALIB-CONICET), Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.*

La endotoxemia constituye un paradigma de inflamación generalizada con aumentos masivos de NO y citoquinas en fluidos biológicos, con daño sistémico al endotelio vascular y con respiración tisular inadecuada aunque el aporte de oxígeno no es limitante. El consumo de oxígeno en cortes de tejido se encontró aumentado (con respecto al valor control) 1,5 veces en corazón y 1,3 veces en diafragma. Esto indicaría una población mitocondrial en estado 3, aumentada. Las mitocondrias de corazón y diafragma producen 0.69 y 0.77 nmol NO/min. mg proteína; velocidades que corresponden a un 45 y 24% de la máxima producción de NO celular, respectivamente. El shock séptico y la endotoxemia tiene su origen en una exacerbada respuesta inflamatoria que lleva al daño mitocondrial. El músculo esquelético es uno de los órganos blanco en endotoxemia, mostrando un aumento en la producción de NO y un estrés oxidativo temprano.

Un marcado aumento en la actividad de la mtNOS se observó en ratas endotoxémicas (10 mg LPS/kg peso, 6 h de tratamiento): 90% en diafragma y 30% en corazón. La actividad de la NOS presente en el citosol (iNOS) se observa aumentada en diafragma en un 50% con respecto a el valor control; no registrándose variación alguna en corazón. La producción mitocondrial de  $O_2^-$  y  $H_2O_2$  aumenta 2-3 veces con respecto a valores control en ratas endotoxémicas. La actividad de Mn-SOD aumenta al doble en animales tratados, mientras que la actividad de catalasa no muestra variación significativa. Una hipótesis que permite explicar los mecanismos moleculares involucrados en la compleja condición endotoxémica es que la aumentada producción de NO por la mtNOS lleva a una excesiva producción de peroxinitrito y a la nitración de proteínas en la matriz mitocondrial, causando disfunción mitocondrial y deficiencia contráctil.

## OXIDO NÍTRICO MITOCONDRIAL Y CELULAR Y LA MODULACIÓN DE LA SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR EN PROLIFERACIÓN, ENVEJECIMIENTO Y NEURODEGENERACIÓN

**JUAN JOSÉ PODEROSO**

*Laboratorio de Metabolismo del Oxígeno, Hospital de Clínicas, Universidad de Buenos Aires.*

En el estado estacionario, el óxido nítrico (NO) se encuentra en las mitocondrias en concentración nanomolar. La fuente de NO en las organelas resulta de la actividad física de las NO sintasas (NOS) canónicas en el citosol o en membrana celular, o de la producción más sostenida de NO por mtNOS en la membrana mitocondrial interna. Los procesos de «signaling» intracelular, sus efectos sobre la proliferación normal y el envejecimiento y la patogénesis de la neurodegeneración, se han vinculado al NO, al estado redox y a la función mitocondrial. Hemos observado que el aumento del índice de proliferación normal en la embriogénesis y en el crecimiento tumoral se

asocian a una disminución controlada de NO y a una falta de maduración de la cadena de transporte de electrones. En cambio, un aumento del NO mitocondrial con estrés oxidativo caracterizan al arresto de la proliferación; diferenciación y apoptosis y al proceso de envejecimiento normal. Se infiere que el «signaling» para procesos normales de crecimiento y senescencia o anormales como proliferación tumoral y neurodegeneración se define en las mitocondrias a través de variaciones de la velocidad de transferencia de electrones dependiente de efectos modulables del NO sobre los componentes mitocondriales.