



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales  
Departamento de Química Biológica

**Anestésicos volátiles y sus efectos sobre la cadena respiratoria.  
Regulación de la óxido nítrico sintasa mitocondrial**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de  
Química Biológica

**JOHANNA ROMINA ZUCCOLI**

Director de Tesis: Dra. Ana María Buzaleh

Consejero de Estudios. Dra. María del Carmen Ríos

Lugar de trabajo: Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias -  
Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas - Hospital de  
Clínicas “José de San Martín” - Universidad de Buenos Aires

Buenos Aires, 2019

Fecha de defensa: 29 de Marzo de 2019

---

## **Anestésicos volátiles y sus efectos sobre la cadena respiratoria. Regulación de la óxido nítrico sintasa mitocondrial**

Lugar de trabajo: Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias (CIPYP), UBA-CONICET, Hospital de Clínicas

Director: Dra. Ana María Buzaleh.

Consejero de Estudios: Dra. María Del Carmen Ríos

Las mitocondrias juegan un papel vital en el metabolismo energético; en el interior se produce la fosforilación oxidativa en la cadena de transporte de electrones y la generación de equivalentes de reducción por el ciclo del ácido tricarboxílico (TCA). La deficiencia de hemo producida por una síntesis reducida o un catabolismo acelerado provocaría un daño celular grave. Anteriormente, demostramos que los agentes porfirinogénicos afectaban a varios metabolismos en cerebro de ratones cepa *CF1* y en un modelo genético murino de Porfiria intermitente aguda (AIP). El objetivo general de esta tesis fue estudiar los mecanismos por los cuales los anestésicos volátiles alteran el metabolismo mitocondrial. Los objetivos específicos fueron: I) Dilucidar el efecto de los anestésicos volátiles sobre la cadena respiratoria mitocondrial en el encéfalo de ratón. II) Comparar los resultados en animales con otros fármacos porfirinogénicos y en condiciones patológicas del precursor del metabolismo del hemo, ácido 5-aminolevulic (ALA). III) Evaluar, en el encéfalo del ratón, la posible relación entre la biosíntesis del hemo, el ciclo del ácido tricarboxílico y la cadena respiratoria. IV) Analizar la participación de la isoforma mitocondrial de la Óxido nítrico sintasa (mtNOS) en la regulación de la cadena respiratoria. Se observaron alteraciones bioquímicas en los Complejos de la cadena respiratoria que variaban según la cepa de ratones y la mutación. Los cambios observados en las actividades del ciclo de TCA darían como resultado una deficiencia de los equivalentes de reducción del donante, NADH y FADH<sub>2</sub>, y podrían justificar las alteraciones en las actividades de los Complejos de la cadena respiratoria informados anteriormente. Los resultados refuerzan nuestros resultados previos y apoyan la hipótesis de que habría más de un factor para explicar la patogénesis de los ataques agudos de la PAI además de confirmar la porfirinogenicidad de los anestésicos volátiles.

Palabras claves: Mitocondria – Cadena Respiratoria – Ciclo de Krebs – Porfiria - Anestésicos

---

## **Volatile anaesthetics: effects on respiratory chain. Regulation of nitric oxide synthase**

Lugar de trabajo: Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias (CIPYP), UBA-CONICET, Hospital de Clínicas

Director: Dra. Ana María Buzaleh.

Consejero de Estudios: Dra. María Del Carmen Ríos

The mitochondria play a vital role in energy metabolism; inside this organelle occur oxidative phosphorylation in the electron transport chain and the generation of reduction equivalents by the tricarboxylic acid (TCA) cycle. Heme deficiency produced by a reduced synthesis or an accelerated catabolism would trigger severe cell damage. Previously we demonstrated that porphyrinogenic agents affected several brain metabolisms in encephalon *CF1* and Acute intermittent Porphyria (AIP) genetic mice model. The general aim of this Thesis was to study the mechanisms by which volatile anesthetics alter mitochondrial metabolism: For this purpose, it was proposed: I) To elucidate the effects of volatile anesthetics on the mitochondrial respiratory chain in mouse encephalon. II) To compare the results in animals treated with other porphyrinogenic drugs and under pathological conditions of high levels of the heme metabolism precursor, 5-aminolevulinic acid (ALA). III) To evaluate, in the mouse encephalon, the possible relationship between heme biosynthesis, the tricarboxylic acid cycle and the respiratory chain. IV) To analyze the participation of the mitochondrial isoform of nitric oxide synthase (mtNOS) in the regulation of the respiratory chain. Biochemical alterations in the different complexes of respiratory chain that varied according to the strain of mice and mutation were observed. The changes detected in the activities of TCA cycle would result in a deficiency of the donor reduction equivalents, NADH and FADH<sub>2</sub>, and could justify the alterations in the activities of respiratory chain complexes. Results reinforce our previous reports and support the hypothesis that there would be more than one factor to explain the pathogenesis of acute attacks. Also, data support the porphyrinogenicity of volatile anaesthetics.

Key words: Mitochondria – Chain respiratory – Krebs cycle – Porphyria - Anaesthetics

---

## Agradecimientos

Quiero comenzar agradeciendo de manera muy especial a mi directora Ana Maria Buzaleh, por haberme brindado la oportunidad de realizar esta tesis doctoral. Me siento muy afortunada de haber transitado esta experiencia tan enriquecedora bajo su dirección y lineamiento. Su dedicación, su compromiso y apoyo en este proyecto han sido muy importantes en mi formación como investigadora. Realmente quiero destacar su positiva predisposición a lo largo de todo el proyecto, en el cual siempre se involucró y facilitó los medios para poder llevarlo adelante. Fueron valoradas y apoyadas mis iniciativas dentro del marco del proyecto y supo guiarme en el desarrollo de las mismas, formándome como profesional. Fruto de este trabajo en conjunto me une a ella un gran cariño, gratitud y admiración.

Quiero agradecer también a mi co directora la Dra. Alcira Battle por su dedicación y apoyo.

Por otro lado también quiero agradecer a los directores del instituto de investigación CIPYP, la Dra. Maria Victoria Rossetti y la Dra. Victoria Parera, por la oportunidad y por el trabajo en conjunto.

A la Dra. Jimena Lavandera por todo lo que aportó a mi formación técnica, por su dedicación y paciencia.

Quiero agradecer de forma muy especial a la Dra. Silvina Ruspini por tantas cosas... como profesional se dedicó a capacitarme en técnicas con mucha rigurosidad y paciencia fruto de su gran capacidad, como compañera fue un placer enorme compartir esta experiencia que nos nutrió tanto, nos unen infinitos momentos y como amiga por siempre ser mi apoyo incondicional y mi amiga mas fiel.

A todas las personas que trabajan y trabajaron en el instituto durante el desarrollo de este proyecto, investigadores, profesionales y técnicos en su conjunto. Especialmente a la Lic. Gabriela Cervino, Lic. Laura Varela, Dra. Esther Gerez y Dra. Leda Oliveri por todo lo que me guiaron y formaron en el área de biología molecular y celular y por todo lo compartido en estos años de trabajo en conjunto. A Carmen Martinez y Viviana Melito por colaborar en mi formación en el área de química biológica y por todo lo trabajado codo a codo. A todo el grupo de becarios y pasantes por el apoyo y compromiso grupal. En particular a la Lic. Vanesa Puente, Lic. Gustavo Calvo, Lic. Lubna Abou Assali y Lic. Priscila Pagnota con quienes fruto de las jornadas laborales nos une una amistad.

A mi compañero Pablo, por su apoyo, generosidad, entrega e infinito amor y paciencia. Por enseñarme mucho como profesional y como persona. A mis hijos, Lua Rocio y Francisco Simón por ser mi fuerza y mi luz; por mostrarme que su amor es el motor mas poderoso, por haber compartido este camino juntos, gracias por toda su paciencia, generosidad y amor.

---

*Dedico esta tesis a mis hijos Lua y Francisco, mi inspiración en todo momento*

---

# ÍNDICE

<b>OBJETIVOS</b>	i
<b>ABREVIATURAS</b>	ii
<b>INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>CAPÍTULO I: LA MITOCONDRIA</b>	1
I.1 DESCUBRIMIENTO Y ESTRUCTURA	1
I.2 FUNCIÓN MITOCONDRIAL	4
I.3 CADENA DE TRANSPORTE ELECTRÓNICO Y LA FOSFORILACIÓN OXIDATIVA	5
I.4 COMPLEJOS RESPIRATORIOS MITOCONDRIALES	9
I.5 CICLO DE LOS ÁCIDOS TRICARBOXÍLICOS	23
I.6 REFERENCIAS	29
<b>CAPÍTULO II: GRUPO HEMO Y PORFIRIAS</b>	35
II.1 GRUPO HEMO: SÍNTESIS, DEGRADACIÓN Y REGULACIÓN	35
II.2 HEMOPROTEÍNAS	38
II.3 PORFIRIAS	41
II.4 MODELOS FARMACOLÓGICOS Y GENÉTICOS DE PORFIRIA AGUDA INTERMITENTE	46
II.5 MODELO GENÉTICO DE PORFIRIA AGUDA INTERMITENTE	53
II.6 REFERENCIAS	54
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	61
<b>CAPÍTULO I: MATERIALES</b>	61
I.1 EQUIPOS	61
I.2 REACTIVOS Y ENZIMAS	61
I.3 ANIMALES	62
<b>CAPÍTULO II: MÉTODOS</b>	63
II.1 GENOTIPIFICACIÓN	63
II.2 DISEÑO EXPERIMENTAL	64
II.3 PREPARACIÓN DE LAS FRACCIONES SUBCELULARES	65
II.4 DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS	66
II.5 EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT: SUBUNIDADES DE LA ATP SINTASA, CITOCROMO-C-OXIDASA Y UBIQUINOL-CITOCROMO C REDUCTASA	71
II.6 ENSAYOS INMUNOHISTOQUÍMICOS	73
II.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	73
II.8 REFERENCIAS	73

---

<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	75
<b>CAPÍTULO I: CADENA RESPIRATORIA MITOCONDRIAL: ALTERACIONES PRODUCIDAS POR ANESTÉSICOS VOLÁTILES Y OTROS AGENTES PORFIRINOGENICOS</b>	
I.1 NADH-CITOCROMO C REDUCTASA (Complejo I-III)	84
I.2 SUCCINATO-CITOCROMO C REDUCTASA (Complejo II-III)	87
I.3 SUCCINATO REDUCTASA (Complejo II)	89
I.4 CITOCROMO C OXIDASA (Complejo IV)	92
I.5 ATP SINTASA (Complejo V)	94
I.6 CONCLUSIONES CAPÍTULO I	95
<b>CAPÍTULO II: ALTERACIONES EN EL CICLO DE KREBS Y DAÑO A INTEGRIDAD MITOCONDRIAL</b>	98
II.1 ENZIMAS DEL CICLO DE KREBS	98
II.2 FUNCIONALIDAD DE LA MITOCONDRIA	101
II.3 CONCLUSIONES CAPÍTULO II	105
<b>CAPÍTULO III: ALTERACIONES EN LA ISOFORMA MITOCONDRIAL DE LA ENZIMA ÓXIDO NÍTRICOSINTASA</b>	101
III.1 ESTUDIOS INMUNOHISTOQUÍMICOS	101
III.2 ÓXIDO NÍTRICO SINTASA MITOCONDRIAL	103
III.3 CONCLUSIONES CAPÍTULO III	105
<b>CONCLUSIONES GENERALES</b>	106

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

Estudiar los mecanismos mediante los cuales los anestésicos volátiles alteran el metabolismo mitocondrial.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1) Dilucidar el efecto de los anestésicos volátiles sobre la cadena respiratoria mitocondrial en encéfalo de ratón
- 2) Comparar los resultados en animales tratados con otras drogas porfirinogénicas y bajo condiciones patológicas de elevados niveles del precursor del metabolismo del Hemo, el ácido 5-aminolevúlico (ALA)
- 3) Evaluar la relación entre la biosíntesis del Hemo, el ciclo de los ácidos tricarboxílicos y la cadena respiratoria.
- 4) Teniendo en cuenta la importancia del óxido nítrico (NO) sobre el transporte electrónico en la membrana mitocondrial, se evaluará si los agentes estudiados producen alteraciones sobre la isoforma mitocondrial de la Óxido nítrico sintasa (mtNOS).



---

## ABREVIATURAS

ADNn	Ácido desoxirribonucleico nuclear
ADNmt	Ácido desoxirribonucleico mitocondrial
ADP	Adenosín difosfato
AIA	Alilisopropilacetamida
ALA	Ácido $\delta$ -aminolevúlico
ATP	Adenosín trifosfato
ALA-S	$\delta$ -Aminolevúlico sintetasa
Cit	Citocromo
Cox	Citocromo c oxidasa
CYP	Citocromo P-450
FAD	Flavín adenín dinucleótido
FADH <sub>2</sub>	Flavín adenín dinucleótido reducido
FMN	Flavín mononucleótido
GTPasas	Guanosina trifosfatasa
i.p.	Intraperitoneal
mtNOS	Óxido nítrico sintasa mitocondrial
NAD	Nicotinamida adenina dinucleótido
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido reducido
NO	Óxido nítrico
OXPHOS	Fosforilación oxidativa
PAI	Porfiria Aguda Intermitente
PBG-D	Porfobilinógeno deaminasa
Q	Ubiquinona
ROS	Especies reactivas del oxígeno
QH <sub>2</sub>	Dehidroquinona
s.c.	Subcutánea
s.d	Desviación estándar
SDH	Succinato deshidrogenasa
SNC	Sistema nervioso central
SNP	Sistema nervioso periférico
Tris	Tris-hidroximetil-aminometano-clorhidrato
UE	Unidades enzimáticas

# CAPÍTULO I

## LA MITOCONDRIA

### I.1. DESCUBRIMIENTO Y ESTRUCTURA

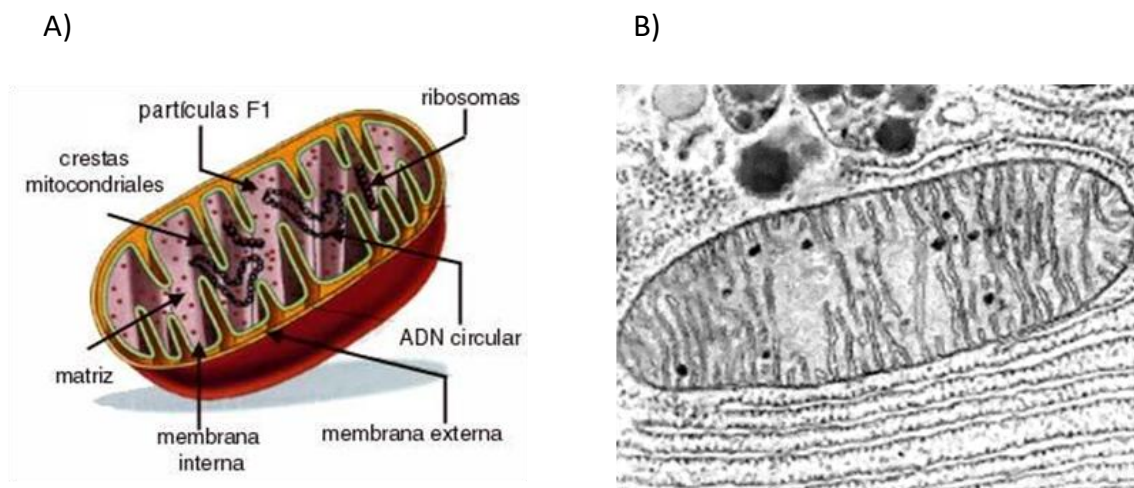
Las mitocondrias son pequeñas organelas localizadas en el citoplasma de la mayoría de las células eucariotas con excepción de los arqueozoos y eritrocitos; fueron observadas por primera vez hace más de 100 años (Altmann, 1890) y se denominaron “organismos elementales”, pensando que se trataba de organismos independientes que vivían dentro de las células eucariotas. En 1898, se las denominó por primera vez con el nombre de “mitocondrias” (Benda, 1898; Ernster & Schatz, 1981).

En 1967 se publicó la Teoría Endosimbiótica de Lynn Margulis, también llamada Teoría de la Endosimbiosis Seriada, donde describía el paso de las células procarióticas a células eucariotas mediante incorporaciones simbiogénicas de bacterias. La autora postuló que algunas organelas de las células eucariotas, como las mitocondrias, proceden de células procariotas primitivas que habrían estado en endosimbiosis con las primeras. Hoy en día existen pruebas concluyentes que demuestran que la célula eucariota moderna evolucionó a partir de la incorporación estable de las bacterias (O'Rourke, 2010).

La morfología mitocondrial es muy cambiante variando desde estructuras largas y ramificadas a pequeños elipsoides. No se encuentran en el citoplasma como orgánulos individuales, sino que adoptan diferentes formas en función del tipo celular y la demanda metabólica de la célula. Se dividen y fusionan fácilmente entre sí, a través del proceso denominado dinámica mitocondrial, logrando así mezclar sus ADNs. La dinámica mitocondrial engloba al menos tres procesos distintos: a) el remodelado del retículo mitocondrial mediante procesos de fusión/fisión, el cual se encuentra estrechamente vinculado al estado metabólico celular y es controlado por la actividad de un grupo de Guanosina trifosfatasa (GTPasas) relacionadas con la familia de las dinaminas y que manifiestan efectos opuestos; b) la motilidad mitocondrial subcelular, particularmente relevante en células polarizadas y que corresponden al desplazamiento de las mitocondrias dependiente de las proteínas kinesina 1 y 3, lo que asegura el suministro local de adenosina trifosfato (ATP) en procesos biológicos con elevados requerimientos energéticos y el uso de estas organelas como soluciones reguladoras de calcio; y c) el remodelado de la ultraestructura mitocondrial y la condensación de su matriz, procesos considerados básicamente como un reflejo del estado metabólico mitocondrial (Scalettar *et al.*, 1991;

(Hollenbeck & Saxton, 2005; Liu *et al.*, 2009). Estos procesos son dependientes del potencial de membrana y están en equilibrio acorde al tamaño y grado de conectividad de la red mitocondrial.

Las mitocondrias están formadas por una membrana externa y una membrana interna dividiéndola en dos compartimentos: la matriz y el espacio intermembrana. La membrana interna se encuentra plegada formando invaginaciones hacia el interior de la matriz, llamadas crestas mitocondriales. Los sitios de contacto entre las membranas interna y externa constan de componentes del llamado poro de membrana (Reichert, 2004) (Figura I.1).



**FIGURA I.1: ESTRUCTURA MITOCONDRIAL**

A) Esquema mitocondrial. B) Microscopía electrónica de la mitocondria

La membrana externa es una bicapa lipídica similar a la membrana plasmática, altamente permeable a iones y a otras moléculas con peso molecular inferior a 5000 Da. Contiene una gran cantidad de proteínas de membrana llamadas porinas que son la principal vía a través de la cual se intercambian los metabolitos entre la mitocondria y el citosol. Además, en la membrana externa se encuentra el sistema de translocasas TOM/TOB, que participa en el reconocimiento inicial e importación de todas las proteínas con destino mitocondrial.

La membrana interna está compuesta por un mayor contenido de proteínas y fosfolípidos como la cardiolipina y es altamente selectiva, necesitando de la presencia de numerosos transportadores específicos o translocasas de membrana gracias a los cuales se produce el transporte al interior de la mitocondria de las proteínas que fueron sintetizadas en el citoplasma; y de transportadores de grupos prostéticos necesarios para la correcta

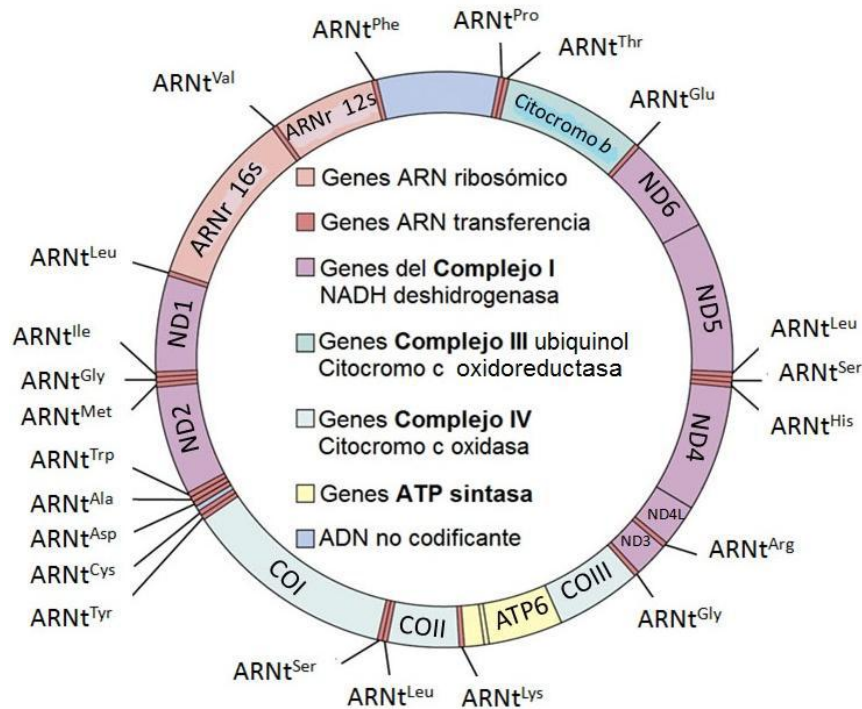
biosíntesis y funcionamiento de la cadena respiratoria mitocondrial. Es prácticamente impermeable a las sustancias polares e iones a excepción del O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O.

Dentro de la matriz mitocondrial se encuentran las enzimas del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA o ciclo de Krebs) con excepción de la enzima Succinato deshidrogenasa que se localiza en la membrana interna, enzimas de la degradación de ácidos grasos, la enzima Piruvato deshidrogenasa, ADN mitocondrial, complejos de transcripción y traducción, ribosomas e iones (magnesio, calcio y potasio).

El número y la morfología de las crestas refleja la respuesta de la mitocondria a la demanda energética de la célula, ya que es en la membrana interna donde se realiza la fosforilación oxidativa y por lo tanto, la síntesis de ATP mitocondrial. En los procesos de fusión y fisión no solo son necesarios la fusión de membranas externa e interna, sino también la mezcla de los contenidos de la matriz y la redistribución de proteínas y lípidos a través de la célula (Nakada *et al.*, 2001; Malka *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2009). En células de mamíferos, la fisión sería esencial en células proliferantes, debido a que las mitocondrias deben multiplicarse y dividirse entre células hija (Chan, 2006). El mantenimiento de la morfología mitocondrial está directamente relacionado con la estabilidad metabólica celular, generando un balance entre los procesos de fusión y de fisión, acorde a las necesidades momentáneas de la célula.

La mitocondria posee su propio genoma en un número de copias que varía de 5 a 10 (Figura 1.2), siendo independiente del ADN nuclear (ADNn). El ADNmt humano es una molécula circular de doble cadena de 16.569 pares de bases (pb) (Anderson, 1981; Montoya *et al.*, 2006) cuya composición de nucleótidos de las dos cadenas es diferente; una de ellas es rica en residuos de guanina y timina y se denomina cadena pesada (H), mientras que la otra se denomina cadena ligera (L). El genoma mitocondrial es compacto: los genes estructurales no poseen zonas ni 5' ni 3' no traducidas (UTRs), no contienen intrones y los espacios intergénicos son mínimos, llegando, en algunos casos, al solapamiento de genes consecutivos. El genoma mitocondrial codifica para 37 genes, 28 de los cuáles son codificados por la cadena pesada y 9 por la ligera. El ADNmt se encuentra formando parte de complejos nucleoproteicos asociados a la membrana interna mitocondrial denominados nucleoides (Bogenhagen *et al.*, 2003). Éste se replica y transcribe dentro de la organela, ocurriendo el proceso de traducción en la matriz mitocondrial con su propio aparato de síntesis proteica que incluye dos tipos de ARN ribosómicos (12S y 16S). La función de la maquinaria de traducción mitocondrial, similar a la encontrada en procariontes, es la síntesis de los trece polipéptidos codificados por el genoma mitocondrial y que forman parte del sistema de transporte de electrones (Montoya *et al.*, 2006; Sharma & Sampath, 2019).

La herencia del ADNmt es exclusivamente materna, normalmente el ADNmt paterno es etiquetado con una cola de ubiquitina que involucra un rápido proceso de proteólisis cuando éste entra en el ovocito (Sato & Sato, 2013).

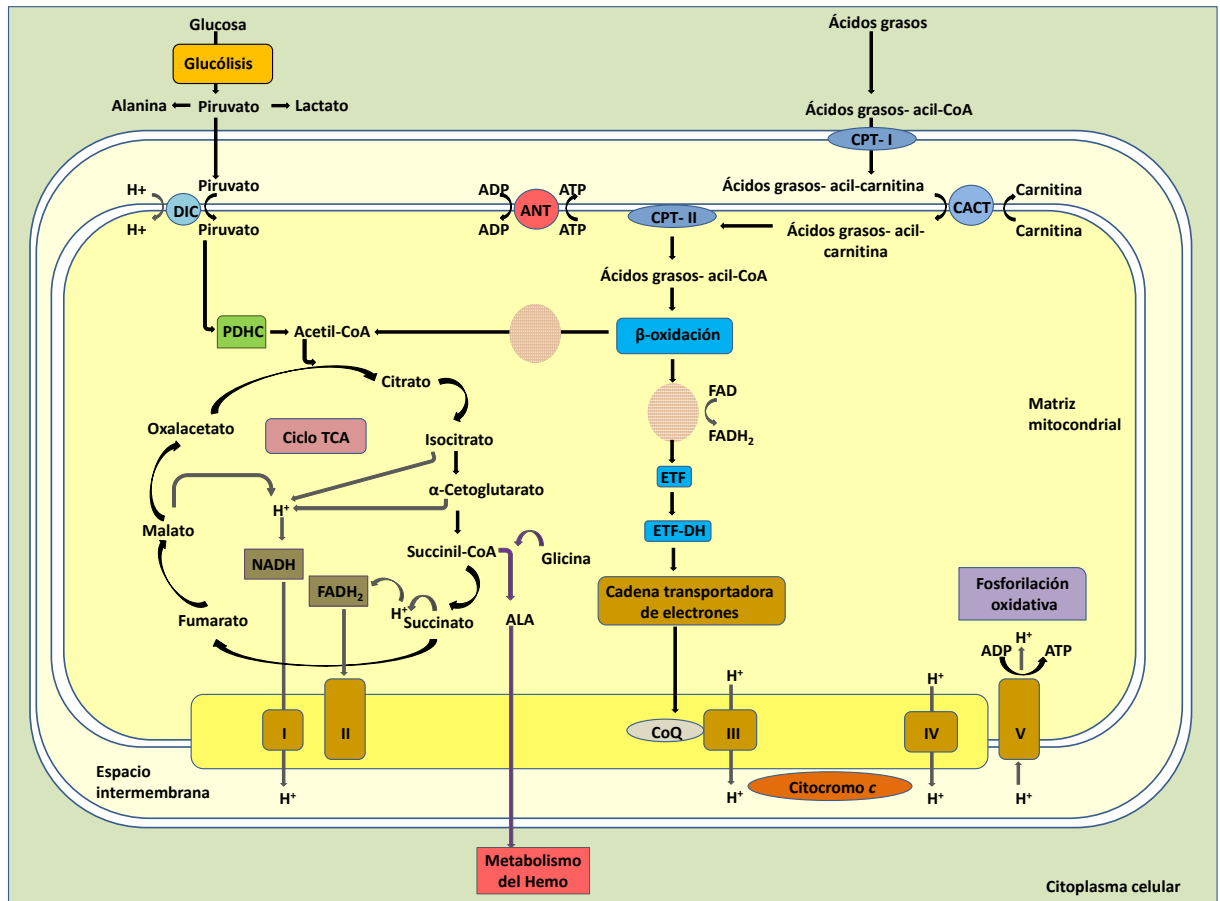


**FIGURA I.2: REPRESENTACION DE ADN MITOCONDRIAL**

Representación del ADN mitocondrial (ADNmt) humano. Localización de los genes correspondientes a las distintas subunidades de la cadena respiratoria. Se indican los ARN de transferencia (ARNt) junto al aminoácido que transporta, así como los ARN ribosómicos: ARNr 12s y ARNr 16s. Adaptado de Buera Marín (2012).

## I.2. FUNCIÓN MITOCONDRIAL

La función principal es la producción de energía en forma de ATP, a partir de los nutrientes orgánicos, mediante un proceso acoplado a un gradiente electroquímico que lleva a cabo el sistema de fosforilación oxidativa. Además, en las mitocondrias se producen algunos de los procesos metabólicos más importantes del organismo como el ciclo de los ácidos grasos, el ciclo de Krebs y la biosíntesis de aminoácidos y parte de la vía de síntesis del grupo hemo. También intervienen en otros procesos, como la apoptosis vía activación de caspasas mediante la liberación de citocromo c, la homeostasis del calcio e iones, el metabolismo lipídico y la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) (Di Mauro, 2003; Kausar *et al.*, 2018) (Figura I.3).



**FIGURA I.3: ESQUEMA DE LAS VÍAS METABÓLICAS QUE OCURREN EN LAS MITOCONDRIAS**

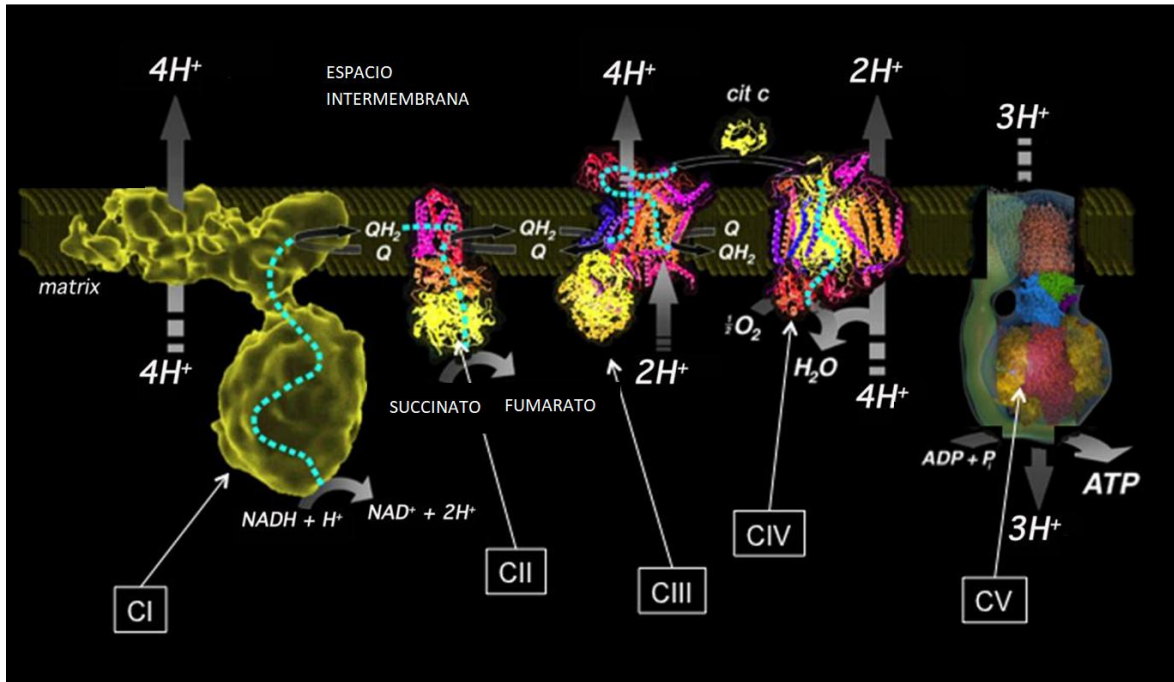
Los espirales representan la reacción de  $\beta$  oxidación, que producen la liberación de la coenzima acetil-CoA y la reducción de flavoproteínas. **ADP**: adenosina di fosfato, **ATP**: adenosina tri fosfato, **ANT**: traslocador de nucleótido adenina, **CACT**: Carnitina-acilacarnitina traslocasa, **CoQ**: coenzima Q, **CPT**: Carnitina palmitoil transferasa, **DIC**: transportador de dicarboxilato, **ETF**: flavoproteína de transferencia de electrones, **ETF-DH**: deshidrogenasa de transferencia de electrones, **FAD**: Flavín adenín dinucleótido, **FADH<sub>2</sub>**: FAD reducido, **NADH**: dinucleótido de nicotinamida adenina reducido, **PDHC**: complejo Piruvato deshidrogenasa, **TCA**: ácido tricarbóxico, **I**: Complejo I, **II**: Complejo II, **III**: Complejo III, **IV**: Complejo IV, **V**: Complejo V.

### I.3. LA CADENA DE TRANSPORTE ELECTRÓNICO Y LA FOSFORILACIÓN OXIDATIVA

El metabolismo mitocondrial tiene como función principal la producción de energía a partir de la oxidación aeróbica de sustratos. El proceso oxidativo final está acoplado a una cadena de transporte electrónico encargada de transformar los potenciales de oxidoreducción generados en forma de ATP, mediante el acoplamiento a la fosforilación oxidativa.

La glucólisis y el ciclo de Krebs generan de por sí una cantidad relativamente baja de energía en forma de ATP. Sin embargo, 6 pasos de deshidrogenación (uno en la glucólisis, otro en la reacción de la Piruvato deshidrogenasa y 4 más en el ciclo de Krebs) reducen en total 10 moles del dinucleótido nicotinamida adenina oxidado (NAD<sup>+</sup>) a dinucleótido de

nicotinamida adenina reducido (NADH) y 2 moles de flavína adenina dinucleótido oxidado (FAD) a flavina adenina dinucleótido reducido (FADH<sub>2</sub>) por mol de glucosa. La reoxidación de estos equivalentes de reducción genera la mayor parte de la energía necesaria para la síntesis de ATP. La reoxidación del NADH y FADH<sub>2</sub> tiene lugar, en las células eucariotas, en un proceso en el que se producen reacciones acopladas de oxido-reducción, con el paso de electrones a través de transportadores integrados en la membrana interna mitocondrial (Figura I.4).



**FIGURA I.4: ESQUEMA DE FOSFORILACIÓN OXIDATIVA**

CI, CII, CIII, CIV y CV: Complejos de la cadena respiratoria

La transferencia de electrones de unos transportadores a otros, que se realiza de forma secuencial a favor del potencial oxidorreductor, está acoplada al bombeo de protones desde la matriz mitocondrial al espacio intermembrana. El gradiente electroquímico que se establece se manifiesta como un gradiente de pH y una diferencia de potencial a través de la membrana mitocondrial interna (potencial de membrana mitocondrial o  $\Delta\Psi_m$ ). El último paso es la reducción del O<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>O. La energía generada por la disipación del gradiente de protones a través de la ATP sintasa es utilizada para fosforilar el ADP, con la consiguiente formación de ATP.

La fosforilación oxidativa y la cadena de transporte electrónico son llamadas conjuntamente "cadena respiratoria", o sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS), y está

constituida por 5 Complejos multienzimáticos (Tabla I.1) y 2 pequeñas moléculas que sirven de nexo de unión o lanzadera (la coenzima Q y el citocromo c).

**TABLA I.1: COMPLEJOS ENZIMÁTICOS QUE PARTICIPAN EN LA FOSFORILACION OXIDATIVA.**

Complejo	Masa	Subunidades	Grupos
I NADH DH (I)	850	42	FMN, Fe-S
II Succinato DH	140	5	FAD, Hemo, Fe-S
CoQ (Ubiquinona)			
III Ubiquinona: Citc Oxidorreductasa (cit b y c <sub>1</sub> )	250	11	Hemo, Fe-S
Citocromo C	13	1	Hemo
IV Citocromo oxidasa (Cit a a <sub>3</sub> )	160	13	Hemos, CuA, CuB

Masa expresada en kDa.

La característica más remarcable del sistema OXPHOS es que está controlado por dos genomas distintos, el ADNn y el ADNmt. De las más de 90 proteínas que forman la cadena respiratoria, 13 están codificadas por el genoma mitocondrial y todas las demás están codificadas por el nuclear.

Se ha observado en distintos organismos, desde bacterias a mamíferos, que los Complejos enzimáticos de la cadena respiratoria mitocondrial pueden agruparse en estructuras supramoleculares, con distintas estequiometrías, llamados supercomplejos (Schagger & Pfeiffer, 2000). Los supercomplejos formados por los Complejos I, III y IV son también conocidos como respirasomas. Se han descrito distintas variantes de supercomplejos. El Complejo I puede formar una asociación estable con el dímero del Complejo III, formando el supercomplejo I+III<sub>2</sub>, al cual se pueden unir de una a cuatro copias del Complejo IV, formando el supercomplejo I+III<sub>2</sub>+IV<sub>1-4</sub> o respirasoma (Schagger & Pfeiffer, 2000; Dudkina *et al.*, 2005, 2011; Schafer *et al.*, 2006; Althoff *et al.*, 2011). Asimismo, el Complejo III dimérico se puede asociar a una o dos copias del Complejo IV, dando lugar al supercomplejo III<sub>2</sub>+IV<sub>1-2</sub>, cuya primera estructura detallada se estudió en *Saccharomyces cerevisiae* (Heinemeyer *et al.*, 2007). Otros estudios indican la presencia de los Complejos II y V como supercomplejos (Acin-Perez *et al.*, 2004; Wittig & Schagger, 2009), aunque existen discrepancias respecto a este tema (Moreno-Lastres *et al.*, 2012). La formación de estos



Complejos parece ser esencial para la estabilización y/o ensamblaje de los distintos Complejos del sistema OXPHOS (Schagger *et al.*, 2004; Vonck & Schafer, 2009). El significado funcional de los supercomplejos podría ser aumentar la eficiencia del flujo de electrones entre los Complejos de la cadena respiratoria, disminuyendo las fugas de electrones o de protones y reduciendo la distancia de difusión de los transportadores electrónicos ubiquinona y citocromo c (Lenaz & Genova, 2010).

La oxidación de las coenzimas reducidas procedentes del catabolismo celular genera electrones que son cedidos a la cadena respiratoria y finalmente al oxígeno molecular (Figura I.5). El flujo de protones se transforma en energía química que es usada por el Complejo V para obtener ATP (Sala-Vila *et al.*, 2016).

	Semirreacción	E'° (V)
	$2H^+ + 2e^- \rightarrow H_2$	-0.414
I	$NAD^+ + H^+ + 2e^- \rightarrow NADH$	-0.320
	$NADP^+ + H^+ + 2e^- \rightarrow NADPH$	-0.324
	$NADH \xrightarrow{\text{deshidrogenasa (FMN)}} + 2H^+ + 2e^- \rightarrow NADH \xrightarrow{\text{deshidrogenasa (FMNH}_2)}$	-0.30
III	Ubiquinona + $2H^+ + 2e^- \rightarrow$ ubiquinol	0.045
	Citocromo $b (Fe^{3+}) + e^- \rightarrow$ Citocromo $b (Fe^{2+})$	0.077
	Citocromo $c_1 (Fe^{3+}) + e^- \rightarrow$ Citocromo $c_1 (Fe^{2+})$	0.22
	Citocromo $c (Fe^{3+}) + e^- \rightarrow$ Citocromo $c (Fe^{2+})$	0.254
IV	Citocromo $a (Fe^{3+}) + e^- \rightarrow$ Citocromo $a (Fe^{2+})$	0.29
	Citocromo $a_3 (Fe^{3+}) + e^- \rightarrow$ Citocromo $a_3 (Fe^{2+})$	0.55
	$\frac{1}{2}O_2 + 2H^+ + 2e^- \rightarrow H_2O$	0.816

$NADH \rightarrow Q \rightarrow \text{Cit } b \rightarrow \text{Cit } c_1 \rightarrow \text{Cit } c \rightarrow \text{Cit } a \rightarrow \text{Cit } a_3 \rightarrow O_2$

$FADH_2 \rightarrow Q \rightarrow \text{Cit } b \rightarrow \text{Cit } c_1 \rightarrow \text{Cit } c \rightarrow \text{Cit } a \rightarrow \text{Cit } a_3 \rightarrow O_2$

**FIGURA I.5: POTENCIALES DE REDUCCIÓN DE LOS COMPLEJOS RESPIRATORIOS**

Desde el punto de vista genético el sistema OXPHOS es único, ya que con excepción de las subunidades del Complejo II, que están todas codificadas por el genoma nuclear, el resto de los Complejos del sistema OXPHOS tiene subunidades codificadas por ambos genomas: nuclear y mitocondrial. Las subunidades nucleares se sintetizan en ribosomas libres en el citosol y se importan a la mitocondria, donde se ensamblan junto a grupos prostéticos y subunidades codificadas por el genoma mitocondrial, formando los Complejos de la cadena respiratoria con la ayuda de chaperonas o factores de ensamblaje específicos (Zara *et al.*, 2009).

I.4.COMPLEJOS RESPIRATORIOS MITOCONDRIALES

I.4.1. COMPLEJO I: NADH DESHIDROGENASA

La NADH deshidrogenasa, NADH:ubiquinona oxidorreductasa o Complejo I (EC1.6.5.3) es un gran complejo multienzimático que cataliza la transferencia de electrones del NADH a la coenzima Q actuando como una bomba de protones (Baradaran *et al.*, 2013) (Figura I.6).

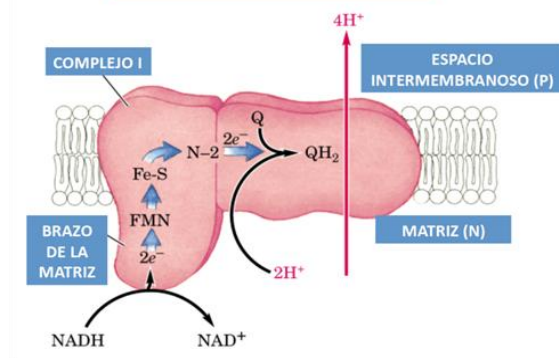


FIGURA I.6: ESQUEMA DEL COMPLEJO RESPIRATORIO

Q: Coenzima Q. Adaptado de Nelson & Cox (2004).

La transferencia de electrones se inicia mediante la oxidación del NADH ya que sus dos electrones son transferidos simultáneamente a un FMN unido no covalentemente a la enzima, y desde allí, a través de una serie de *clusters* Fe-S (transportadores de electrones capaces de aceptar un electrón por ciclo) al receptor final, la coenzima Q (ubiquinona, transportador electrónico liposoluble) (Figura I.7) o a aceptores artificiales como el ferrocianuro o el rutenio (III) hexaamina (Dupuis *et al.*, 2001; Moreno-Lastres *et al.*, 2012).

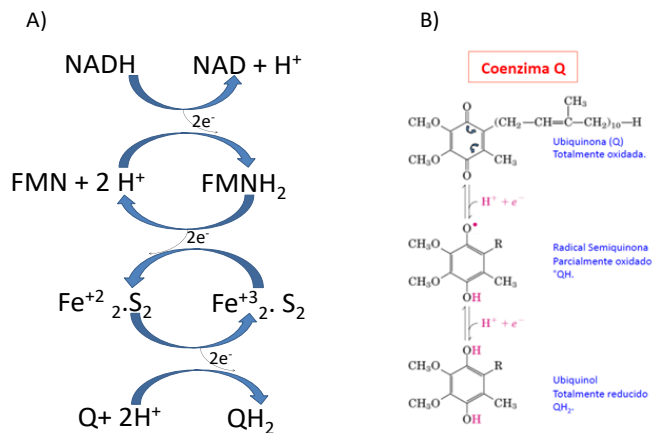
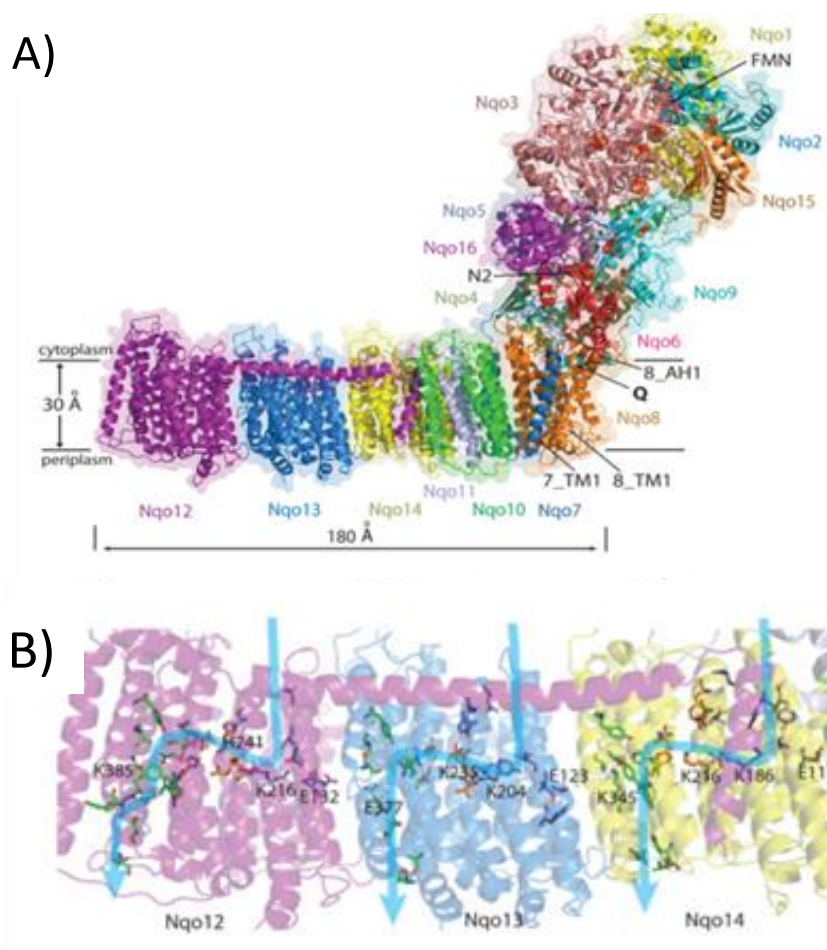


FIGURA I.7: COMPLEJO I NADH DESHIDROGENASA.

A) Esquema de transporte de electrones. B) Reducción de la coenzima Q

Este proceso produce el 40% del gradiente transmembrana generado en la oxidación del NADH por la cadena respiratoria mitocondrial. Más de cien genes están involucrados en la biosíntesis del Complejo I, que participan en: transcripción, traducción, transporte, procesamiento, inserción de cofactores y ensamblado (Hincliffe & Sazanov, 2005).

Es el mayor complejo de la cadena respiratoria, su peso molecular es de 850 kDa; en los mamíferos consta de 45 cadenas polipeptídicas, de las cuales, siete están codificadas por el genoma mitocondrial. Contiene flavin mononucleotido (FMN) como grupo prostético y 8 grupos hierro-azufre. Su estructura tienen forma de "L" con un gran dominio en la membrana (con alrededor de 60 hélices transmembrana) y un dominio periférico hidrófilico donde se produce la reducción del NADH (Figura I.8) (Carroll *et al.*, 2003).



**FIGURA I.8: COMPLEJO I NADH DESHIDROGENASA. ESTRUCTURA CRISTALOGRÁFICA (A) Y CANALES DE TRASLOCACIÓN (B)**

A) Los grupos FMN y Fe-S se muestran como esferas magenta y rojo-naranja, respectivamente, junto al grupo N<sub>2</sub> marcado. Se indican las hélices alrededor del punto de entrada (Q) en la cámara de reacción de quinona, y las posiciones en la membrana. B) Los residuos polares que recubren los canales se indican como barras con el carbono en azul oscuro para el primer medio canal (N-terminal), en verde para el segundo medio canal (C-terminal) y en naranja para conectar los residuos. Residuos clave, GluTM5 y LysTM7 del primer medio canal, Lys/HisTM8 desde la conexión y Lys/ GluTM12 desde el segundo medio canal, están etiquetados. Las rutas aproximadas de translocación de protones se indican con flechas azules (Baradaran *et al.*, 2013).

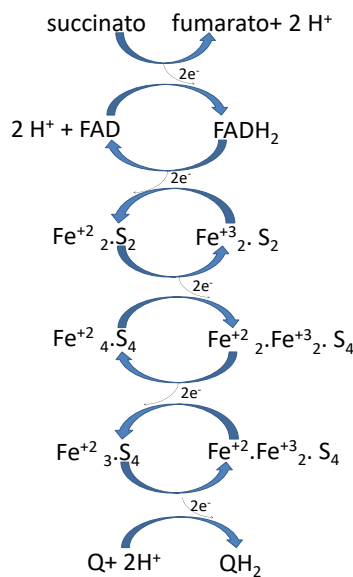
**I.4.2. COMPLEJO II: SUCCINATO DESHIDROGENASA**

La enzima Succinato deshidrogenasa (SDH), Succinato coenzima Q reductasa o Complejo II mitocondrial (EC 1.3.5.1) es un complejo proteico ligado a la membrana interna mitocondrial que interviene en la cadena de transporte de electrones y forma además parte del ciclo de Krebs; contiene FAD unido covalentemente (Aldera & Govender, 2018).

Esta enzima cataliza la reacción de oxidación del succinato a fumarato acoplándola con la reducción de la ubiquinona (Q) a ubiquinol (QH<sub>2</sub>):



El acoplamiento se realiza gracias a una cadena de oxidaciones en varias coenzimas redox incluidas en este complejo (Figura I.9). El FADH<sub>2</sub> de la Succinato deshidrogenasa, al no poder desprenderse de la enzima, debe oxidarse nuevamente *in situ*. Dentro del mecanismo de reacción, la molécula de FAD de la enzima es el aceptor de electrones de la reacción. En general la función bioquímica del FAD es oxidar los alcanos a alquenos, mientras que el NAD<sup>+</sup> oxida los alcoholes a aldehídos o cetonas. Esto es debido a que la oxidación de un alcano (como el succinato) a un alqueno (como el fumarato) es suficientemente exérgica como para reducir el FAD a FADH<sub>2</sub>, pero no para reducir el NAD<sup>+</sup> a NADH. Es poco usual hallar una unión covalente entre el FAD y una proteína; en la mayoría de los casos, el FAD se encuentra asociado a las enzimas de forma no covalente. El FADH<sub>2</sub> cede sus dos hidrógenos a la ubiquinona (coenzima Q) que se reduce a ubiquinol (QH<sub>2</sub>) y abandona la enzima, difundiendo en la bicapa lipídica hasta alcanzar el siguiente complejo enzimático III (Kim *et al.*, 2015).



**FIGURA I.9: ESQUEMA DE TRANSPORTE DE ELECTRONES MEDIANTE REACCIONES DE ÓXIDO REDUCCIÓN DENTRO DEL COMPLEJO II.**

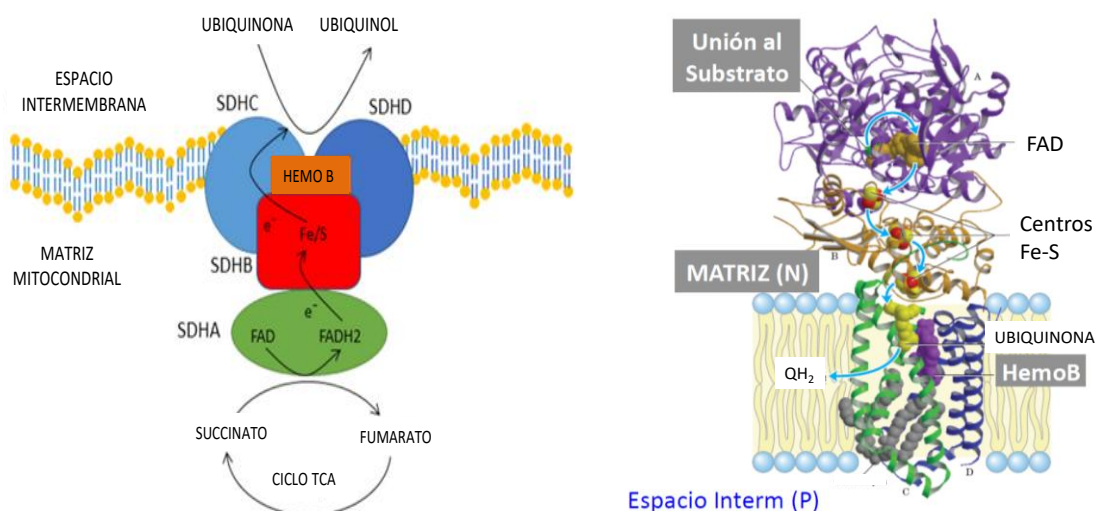
En cuanto a su cinética, posee algunas características de una enzima alostérica: es activada por succinato, fosfato, ATP y la coenzima Q reducida, y es inhibida por el malonato, un análogo estructural del succinato.

Estructuralmente, está compuesta por 4 subunidades, 2 hidrofílicas y 2 hidrofóbicas (Figura I.10):

- Subunidad A (SDHA). Es una flavoproteína hidrofílica que tiene unida covalentemente como cofactor una molécula de FAD y contiene el sitio de unión del succinato.
- Subunidad B (SDHB). También hidrofílica, contiene tres “clústers” de hierro-azufre: 2Fe-2S, 4Fe-4S y 3Fe-4S.
- Subunidad C (SDHC). Hidrofóbica, une el complejo proteico a la membrana de la mitocondria.
- Subunidad D (SDHD). Hidrofóbica. Une el complejo proteico a la membrana de la mitocondria.

Adicionalmente hay dos proteínas que participan en el montaje de la Succinato deshidrogenasa pero no forman parte de ella:

- Factor de montaje 1 (SDHAF1). Participa en la biosíntesis mitocondrial de los clústers de hierro-azufre
- Factor de montaje 2 (SDHAF2). Necesario para la inserción del FAD en la SDHA. No está claro si participa con actividad enzimática o manteniendo a la SDHA en una conformación adecuada para la unión covalente del FAD a la SDHA.



**FIGURA I.10: COMPLEJO II SUCCINATO DESHIDROGENASA. ESTRUCTURA Y VÍA FUNCIONAL**

SDHA, SDHB, SDHC y SDHD: Subunidades de la proteína

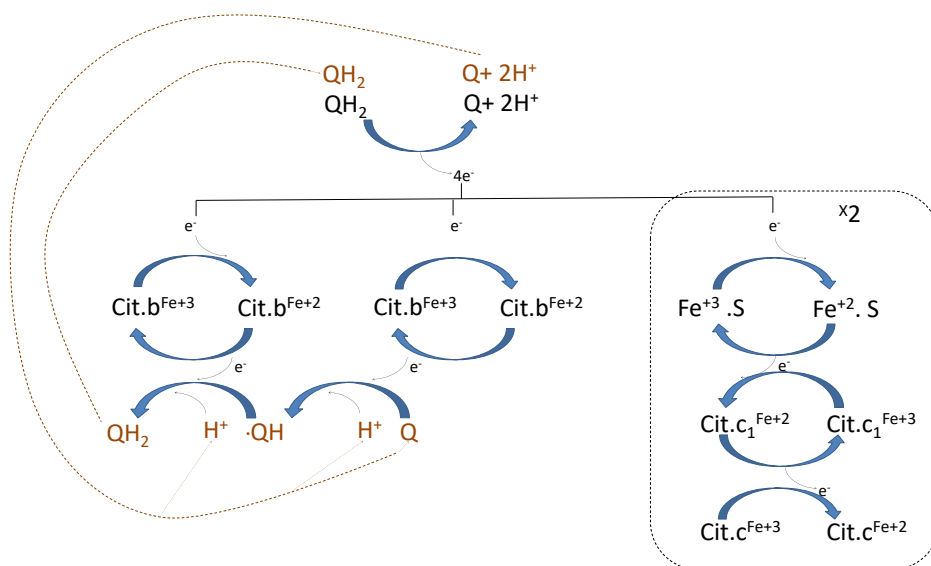
**I.4.3. COMPLEJO III: UBIQUINOL-CITOCROMO-C REDUCTASA**

El Complejo III mitocondrial (Ubiquinol citocromo c oxidoreductasa o Complejo bc1 (E.C.1.10.2.2) cataliza la transferencia de electrones desde la coenzima Q reducida al citocromo c, con una translocación de protones desde la matriz mitocondrial al espacio intermembrana (Baum et al., 1967). Pertenece a la familia de las oxidorreductasas, específicamente a aquellas que actúan sobre los difenoles y sustancias relacionadas utilizándolas como dadores y al citocromo como aceptor.

Los dos sustratos de esta enzima son la dehidroquinona (QH<sub>2</sub>) y el ferricitocromo c, mientras que sus tres productos son quinona, ferrocitocromo c y H<sup>+</sup> de acuerdo a la siguiente reacción química:



Además, cuenta con cuatro cofactores citocromo c1, citocromo b-562, citocromo b-566 y una ferredoxina con dos átomos de hierro (Iwata *et al.*, 1998). El mecanismo de reacción del Complejo III se conoce como el ciclo de la ubiquinona o ciclo Q. En este ciclo, cuatro protones son liberados en el lado positivo (P) de la membrana interna mitocondrial hacia el espacio intermembrana, y se extraen cuatro protones desde la matriz (el lado negativo de la membrana interna mitocondrial). En la reacción total, dos moléculas de ubiquinol se oxidan a ubiquinona, luego de lo cual una de las ubiquinonas se reduce a ubiquinol. Como resultado, dos electrones son transferidos desde el ubiquinol hacia la ubiquinona, por medio de dos citocromos c que actúan como intermediarios (Guo *et al.*, 2017) (Figura I.11).



**FIGURA I.11: ESQUEMA DE TRANSPORTE DE ELECTRONES DE LA REACCIÓN CATALIZADA POR EL COMPLEJO III**

Es una lipoproteína multimérica transmembrana, codificada tanto por el genoma nuclear como por el mitocondrial (concretamente; este último almacena la secuencia del citocromo b. Se encuentra en muchas bacterias y en las mitocondrias de los eucariotas aeróbicos. Su masa molecular es de 248 kDa.

Estructuralmente, el Complejo III es un homodímero funcional que ha sido cristalizado en varios organismos, incluyendo levadura, pollo y bovino (Xia *et al.*, 1997; Hunte *et al.*, 2000). En mamíferos está formado por once subunidades, tres de éstas tienen función respiratoria: citocromo b, citocromo c1 y proteína de Rieske. La subunidad citocromo b alberga dos grupos hemo tipo b (bL y bH); el citocromo c tiene un grupo hemo tipo c (c1), y la proteína hierro-azufre de Rieske posee una agrupación de dos átomos de hierro y dos de azufre (2Fe•2S) y las otras ocho constituyen subunidades estructurales o accesorias (Figura I.12).

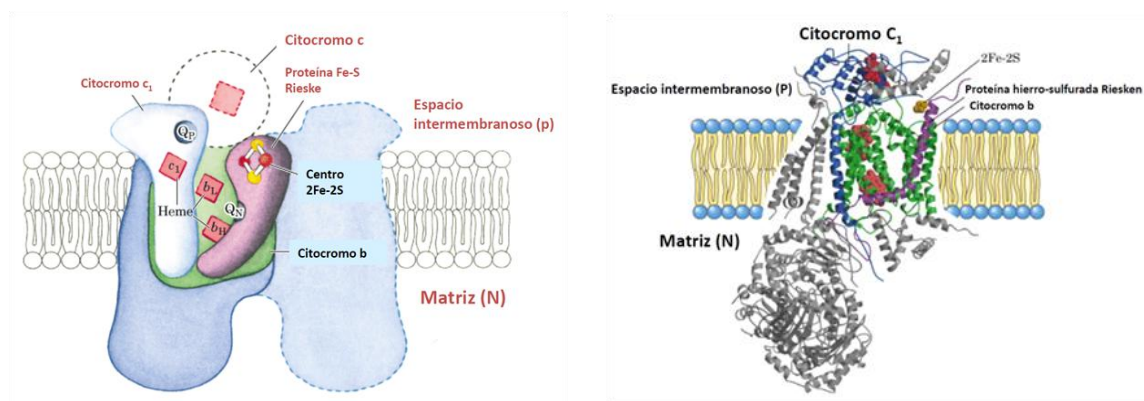
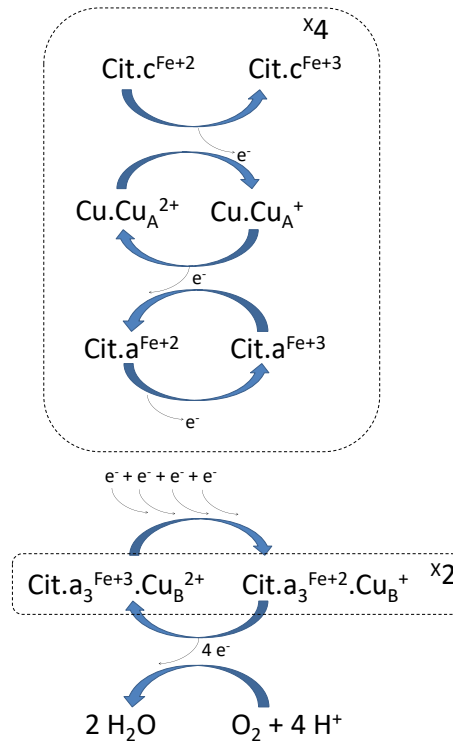


FIGURA I.12: ESTRUCTURA DEL COMPLEJO III

#### I.4.4. COMPLEJO IV: CITOCROMO C OXIDASA

La enzima Citocromo c oxidasa (Cox) o Complejo IV (EC 1.9.3.1) es una proteína transmembrana que en mamíferos incluye varios grupos prostéticos metálicos. Se trata de la última enzima de la cadena de transporte de electrones, recibiendo un electrón de cada uno de las cuatro moléculas de citocromo c; después, los transfiere a una molécula de oxígeno, reduciéndola a dos moléculas de agua. Acoplada a este proceso, se produce una translocación de protones a través de la membrana, lo cual genera un gradiente electroquímico que la enzima ATP sintasa (ATPasa) emplea para sintetizar ATP (Figura I.13). La reacción catalizada por la enzima puede resumirse como sigue:





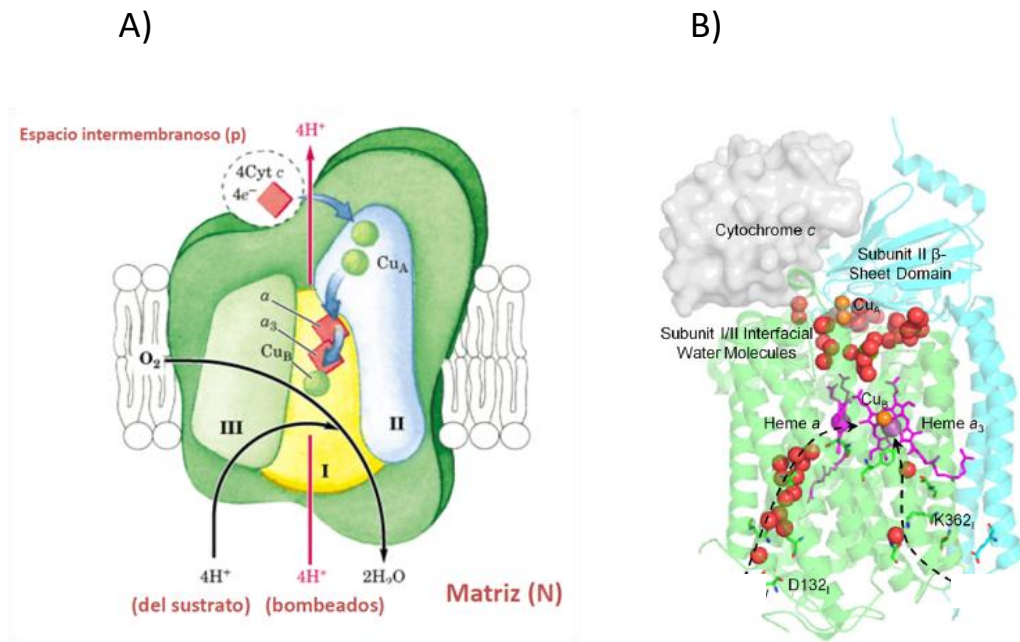
**FIGURA I.13: ESQUEMA DE TRANSPORTE DE ELECTRONES MEDIANTE REACCIONES DE ÓXIDO REDUCCIÓN DENTRO DEL COMPLEJO IV**

El citocromo c reducido, elemento anterior en la cadena de transporte de electrones, se une a la Cox en un lugar cercano al centro binuclear. Al acercarse, cede un electrón, se oxida y regresa a su estado Fe<sup>+3</sup>. El CuA del Complejo IV, que es quien acepta ese electrón, lo cede a su vez al citocromo a, y éste al centro binuclear citocromo a<sub>3</sub>- CuB. En este último Complejo los dos metales, el átomo de hierro y el de cobre, se encuentran a 4,5 Å de distancia entre sí y coordinan un ion hidróxido completamente oxidado. El mecanismo de reducción podría estar basado en un estado intermediario peróxido, que daría lugar a la producción de radicales superóxido; la hipótesis más aceptada es la rápida reducción del oxígeno molecular por aceptación de los cuatro electrones, lo que redundaría en la ruptura del enlace oxígeno-oxígeno (Voet & Voet, 2004).

Estructuralmente, está formada por 13 subunidades, de las cuales diez están codificadas por genes situados en el genoma nuclear y tres en el mitocondrial. El núcleo catalítico del Complejo IV está formado por tres subunidades transmembrana (Cox1, Cox2, Cox3), muy hidrofóbicas y codificadas en el ADNmt. Alrededor de éstas encontramos 10 subunidades más pequeñas, codificadas por el ADN nuclear y encargadas de la regulación de la función Cox y la estabilización del complejo multimérico. El complejo posee dos grupos



hemo, un citocromo a y otro a<sub>3</sub>, así como dos centros de cobre (uno denominado CuA y el otro CuB) (Tsukihara *et al.*, 1995). El citocromo a<sub>3</sub> y el CuB forman un centro binuclear en el cual se produce la reducción del oxígeno molecular a agua (Figura I.14).



**FIGURA I.14: ESTRUCTURA DE LA CITOCROMO C OXIDASA**

A) Esquema y B) Estructura subunidad I y II: verde: subunidad I, que incluye 12 alfa hélices transmembrana, hemo y un cofactor metálico; azul: subunidad II, compuesta de 2 alfa hélices transmembrana, el dominio de las hojas beta y el Cu A; esferas rojas: moléculas de agua.

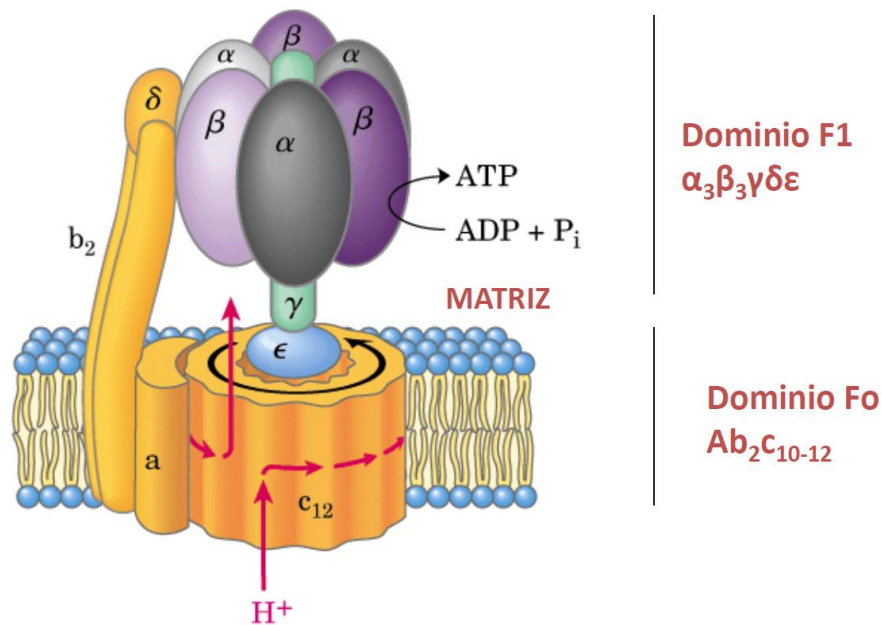
#### I.4.5. COMPLEJO V: ATP SINTASA

El Complejo ATPasa (EC 3.6.3.14) o Complejo V o FoF1-ATP sintasa (F = factor de acoplamiento) es una enzima transmembrana que cataliza la síntesis de ATP a partir de ADP, un grupo fosfato y la energía suministrada por un flujo de protones. Durante la respiración celular, el flujo de protones tiene lugar entre el espacio intermembrana y la matriz mitocondrial. La tasa de síntesis es grande, el organismo humano en fase de reposo puede formar unas 1021 moléculas de ATP por segundo.

Mediante experimentos *in vitro* se ha demostrado que la ATP sintasa actúa de forma independiente respecto a la cadena de transporte de electrones (Lieberman *et al.*, 2013).

La ATPasa es el complejo más pequeño identificado hasta ahora. Trabaja con un grado de eficiencia cercano al 100%. Esta enzima está formada por dos complejos principales: uno, que atraviesa la membrana mitocondrial interna, se llama Fo; el otro, que sobresale de la membrana, se llama F1 (Figura I.15). F1 y Fo se asocian mediante interacciones electrostáticas. El componente Fo es el motor impulsado por protones; se lo

conoce como factor sensible a la oligomicina y está formado por las subunidades a, b<sub>2</sub> y c<sub>10-14</sub>. Las subunidades c forman el «anillo c», que rota en respuesta al flujo de protones por el complejo. El segundo complejo, F<sub>1</sub>, está formado por las subunidades α<sub>3</sub>, β<sub>3</sub>, γ, δ y ε. La parte principal del complejo F<sub>1</sub>, con una masa de 371 kDa, está formada por tres dímeros αβ. La actividad catalítica de este hexámero está localizada en las subunidades β. Las subunidades γ y ε giran impulsadas por el giro del anillo c. Cada rotación de 120° de la subunidad γ induce cambios conformacionales en las subunidades α y β. Finalmente, las subunidades b<sub>2</sub>OSCP1 (*Oligomycin Sensitivity Conferring Protein*) enlazan los componentes F<sub>1</sub> y F<sub>o</sub>. (Lieberman *et al.*, 2013; Gerle, 2016; Mukherjee & Warshel, 2017).



**FIGURA I.15: COMPLEJO V ATP SINTASA**

La teoría quimiosmótica, también conocida como la teoría quimiosmótica de Mitchell (1920-1992), explica la manera en que la energía libre que se genera por la actividad de cadena de transporte de electrones se emplea para producir ATP a partir de la reacción  $ADP + P_i$ . Las coenzimas reducidas procedentes del ciclo de Krebs ( $NADH + H^+$  y  $FADH_2$ ) atraviesan una serie de complejos enzimáticos (cadena de transporte de electrones) que producen en ellas sucesivas reacciones de óxido-reducción cuyo objetivo es la utilización del flujo de electrones para bombear protones al espacio intermembrana de la mitocondria creando un gradiente electroquímico en la membrana mitocondrial interna. Las ATPasa forman ATP utilizando la energía libre procedente del gradiente de protones y sólo pueden hacerlo a través de este Complejo, ya que la membrana interna es impermeable a los protones.

La síntesis de ATP se escribe en general como:



F1 cataliza la síntesis, que es fuertemente endergónica, de ATP a partir de Pi y ADP. Mecánicamente se impulsa la reacción catalítica con la fuerza protón-motriz del gradiente de protones a través de la membrana mitocondrial causando el movimiento de giro del anillo c, y está unida al anillo c, provocándole movimientos de rotación (Figura I.16). Cada rotación de 120° de la subunidad y induce la aparición de cambios de conformación en los centros catalíticos de las unidades β de los dímeros αβ, de forma que los centros de fijación de nucleótidos van alternando entre tres estados: Estado O = estado abierto, L = unión libre y T= unión tensa. Aunque la composición de aminoácidos de las tres subunidades β es idéntica, sus conformaciones difieren en parte por la asociación a la subunidad γ. Los dímeros αβ son asimétricos, cada uno de ellos presenta una conformación diferente en cada estado. Las tres subunidades β interaccionan de tal modo que, cuando una adopta la conformación O, otra ha de adoptar la conformación L y la del otro una conformación T. La conformación T posee mayor afinidad para ATP que para ADP + Pi y disminuye con ello la constante de velocidad de la reacción en valores cercano a uno (Sperl *et al.*, 2006).

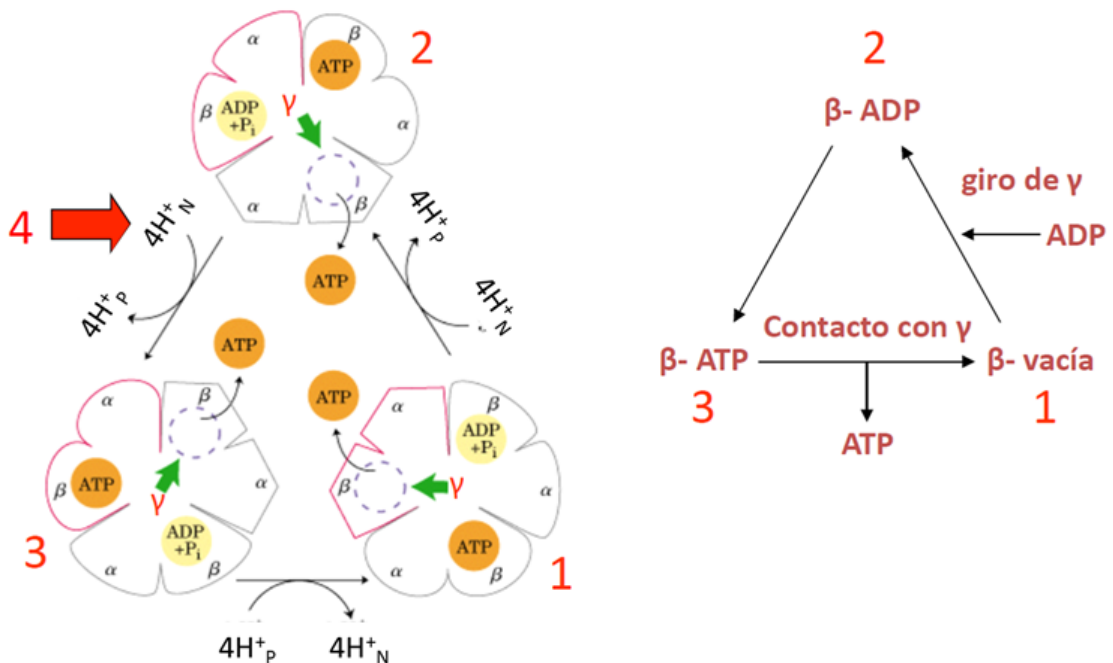


FIGURA I.16: MECANISMO DE SÍNTESIS DE ATP

El paso dependiente de energía no es la síntesis de ATP sino su liberación de un lugar de unión compacta. Esta liberación se produce por la rotación de  $\gamma$  que requiere energía, que impulsa los cambios conformacionales de los dímeros  $\alpha\beta$ . Esta liberación se produce simultáneamente con la unión del ADP y el Pi, que se habían unido previamente, se unen a un lugar T para experimentar una conversión espontánea a ATP, mientras que el lugar O, del que se liberó el ATP, une otro ADP y Pi para empezar de nuevo el proceso (Christopher *et al.*, 2002).

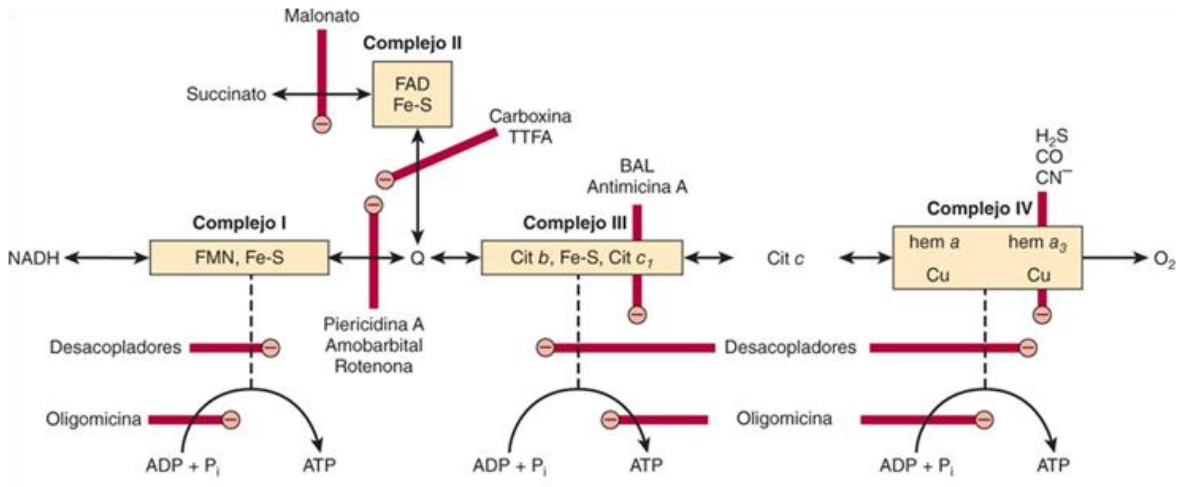
La determinación estructural del complejo FoF1 y el mecanismo de la síntesis de ATP condujo al reconocimiento de Walker y Boyer como ganadores del Premio Nobel de Química de 1997.

El gradiente electroquímico acopla el ritmo de la cadena de transporte electrónico con el ritmo de la síntesis de ATP. Debido a que el flujo electrónico necesita el bombeo de protones, el flujo electrónico no puede producirse más rápidamente que la utilización de los protones para síntesis de ATP (fosforilación oxidativa acoplada), significando en una relación estrechamente acoplada entre la oxidación y la fosforilación. Esto lleva a que los sustratos se oxiden, los electrones se transporten y el oxígeno se consuma tan solo cuando se requiere la síntesis de ATP. Por lo tanto, las mitocondrias en reposo consumen oxígeno a una velocidad lenta, pero puede incrementarse mucho en presencia de ADP. Las mitocondrias captan el ADP, lo que estimula la ATP sintasa que disminuye el gradiente de protones; entonces aumenta la respiración, puesto que se estimulan las bombas de protones para restablecer el gradiente. Por tanto se puede resumir diciendo que el “control respiratorio” es la dependencia de captación de oxígeno por las mitocondrias según la disponibilidad de ATP (Lieberman *et al.*, 2013). La membrana mitocondrial interior necesita transportadores especializados para el ADP y Pi desde el citosol hacia el interior de la mitocondria, al sitio donde se puede resíntetizar a ATP, ya que la membrana mitocondrial interna es generalmente impermeable a las moléculas con carga. Por lo tanto hay dos sistemas específicos que transportan ADP y Pi a la matriz y ATP hacia el citosol externo que son el transportador de nucleótidos de adenina translocasa y fosfato translocasa. La nucleótido de adenina translocasa une ADP y es la encargada de transportar ADP desde el citosol hacia el interior de la mitocondria, a la vez que exporta un ATP desde la matriz hacia el citosol. La fosfato translocasa transporta un Pi junto con un protón hacia la matriz (Champe *et al.*, 2005).

### I.4.6. INHIBIDORES DE LA CADENA RESPIRATORIA

Los inhibidores de la respiración son sustancias que inhiben la respiración celular, alterando la actividad de alguno de los complejos respiratorios. Según su tipo de acción son clasificados como: inhibidores de la cadena respiratoria, inhibidores de la fosforilación oxidativa o desacoplantes de la fosforilación oxidativa (Murray *et al.*, 2004).

En la Figura I.17 se muestran los sitios de acción de los inhibidores y desacoplantes de la cadena respiratoria.



**FIGURA I.17: SITIOS DE ACCIÓN DE INHIBIDORES Y DESACOPLANTES DE LA CADENA RESPIRATORIA**

Fuente Murray *et al.* (2004)

Los inhibidores del transporte de electrones más comúnmente usados pueden reunirse en tres grupos principales según el sitio de la cadena respiratoria donde actúan:

- Inhibidores del sitio I: Actúan sobre la NADH-deshidrogenasa, bloqueando la transferencia de electrones entre la flavina y la ubiquinona.
  - Barbitúricos, como el amobarbitalo o el amital
  - Piericidina A (antibiótico)
  - Rotenona (insecticida)
- Inhibidores de sitio III: Bloquean la transferencia de electrones entre citocromo b y citocromo c1
  - Antimicina

- Inhibidores de sitio IV: Actúan sobre el Hemo a3 de la Cox impidiendo su interacción con el oxígeno:
  - Cianuro
  - Monóxido de carbono
  - H<sub>2</sub>S
  - Azida

La acción de los desacoplantes consiste en disociar la oxidación en la cadena respiratoria, de la fosforilación; bloqueando la síntesis de ATP, pero permitiendo que continúe el transporte electrónico a lo largo de la cadena respiratoria hasta el O<sub>2</sub>:

- 2,4-dinitrofenol (DNP)
- Dinitrocresol
- Pentaclorofenol
- CCCP (m-clorocarbonilcianuro fenilhidrazona), 100 veces más activa que el DNP.

Los inhibidores de la fosforilación actúan sobre el Complejo enzimático V, bloqueando el paso en el cual el ADP se une al fosfato, impidiendo así que la energía del potencial electroquímico llegue al sistema fosforilante:

- Oligomicina
- Atractilósido (inhibe el transportador que introduce ADP a la mitocondria)

#### **1.4.7. REGULACIÓN DE LA CADENA RESPIRATORIA MITOCONDRIAL POR ADP, OXÍGENO Y ÓXIDO NÍTRICO**

El control de la velocidad de la Fosforilación oxidativa esta ligada a la demanda de energía celular. El consumo de O<sub>2</sub> (tasa respiratoria) esta controlado por la concentración de ADP, la cual es una medida del estado energético de la célula. La velocidad de la respiración celular aumenta si la concentración de ADP es alto, como sucede cuando los requerimientos de energía por la celula son elevados, hay un aumento de la velocidad en la degradación ATP a ADP, por lo tanto hay mayor disponibilidad de ADP para la Fosforilación oxidativa y aumenta la velocidad de la Cadena respiratoria, y la fosforilación de ADP, lo que da lugar a la regeneración de ATP. El ATP se forma a la misma velocidad en que es requerido por las actividades celulares.

El O<sub>2</sub> intracelular es necesario en concentraciones adecuadas y controladas para sostener la respiración mitocondrial y la síntesis de ATP y para mantener al mínimo las reacciones de formación de radicales libres del oxígeno. La reacción de la Cox reducida con O<sub>2</sub> es muy rápida (107-108 M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>) y la velocidad de transferencia de electrones de la

cadena respiratoria a la Cox es el factor limitante para definir la concentración operacional para la mitad de la velocidad máxima de consumo de O<sub>2</sub>. Se superpone con la concentración crítica, 2-6 μM O<sub>2</sub>, que se limita la velocidad de la respiración mitocondrial (Boveris, 1998).

La Óxido nítrico Sintasa (NOS) cataliza la síntesis de óxido nítrico (NO) a partir de L-arginina en una reacción que involucra NADPH y oxígeno. Se han descrito 4 miembros de la familia de la enzima NOS: neuronal (nNOS), endotelial (eNOS), inducible (iNOS) y mitocondrial NOS (mtNOS) (Giulivi *et al.*, 1998; Alderton *et al.*, 2001; Carreras *et al.*, 2002; Riobó *et al.*, 2002; Stuehr & Vasquez-Vivar, 2017).

La isoforma de la enzima NOS neuronal llamada nNOS (NOS I) se encuentra presente en neuronas maduras y en desarrollo (Carreras *et al.*, 2002). También se la ha identificado en astrocitos (Arbones *et al.*, 1996), en vasos sanguíneos de encéfalo y en miocitos cardíacos (Xu *et al.*, 1999) de rata; y en células epiteliales de pulmón en humanos (Asano *et al.*, 1994).

La mtNOS ha sido identificada como la isoforma nNOS $\alpha$  (Elfering *et al.*, 2002; Haynes *et al.*, 2004) y es codificada por el mismo gen de la nNOS (Kanai *et al.*, 2001). La mtNOS tiene dos modificaciones postraduccionales más que la nNOS que consisten en acilación por ácido mirístico y fosforilación del C-terminal (Elfering *et al.*, 2002; Haynes *et al.*, 2004; Carreras *et al.*, 2007). El reconocimiento de la actividad mitocondrial de la NOS en una serie de órganos con actividades específicas similares, el uso de ensayos espectroscópicos, electroquímicos y fluorescentes para detectar la producción de NO, la secuenciación de la mtNOS hepática y la dependencia de la actividad de la mtNOS sobre el estado metabólico y el potencial de membrana, apoya firmemente tanto el reconocimiento de mtNOS como una proteína constitutiva integral de la membrana mitocondrial interna y el concepto de que la liberación mitocondrial de NO es un regulador fisiológico de las funciones citosólicas y celulares (Zaobornyj *et al.*, 2016; Bombicino *et al.*, 2017). Además, mtNOS está regulada por efectores fisiológicos (Alvarez *et al.*, 2003), por tratamientos farmacológicos (Boveris *et al.*, 1998; 2002) y en situaciones patológicas, el producto de su actividad enzimática, el NO, actúa como un modulador efectivo de la función mitocondrial a través de la inhibición que ejerce sobre la actividad del Complejo IV y del Complejo III (Cleeter *et al.*, 1994). Además, mtNOS interactúa estructural y/o funcionalmente con Complejo IV (Persichini *et al.*, 2005) y con proteínas del Complejo I (Parihar *et al.*, 2008; Valdez *et al.*, 2016).

La existencia de mtNOS es consistente con una fina modulación de la función del NO en la mitocondria. La regulación de mtNOS provee un nuevo desafío dentro de la

importancia fisiológica del NO y de la mitocondria en la biología de la célula (Riobó *et al.*, 2002). Desde el punto de vista patofisiológico, NO y peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>), el producto de la reacción entre NO con anión superóxido, genera disfunción mitocondrial que puede conducir a la apoptosis; este proceso se considera relevante en las enfermedades neurodegenerativas (Bustamante *et al.*, 2002). Desde el punto de vista regulatorio, NO ejerce un rol en la captación de oxígeno mitocondrial y la producción de peróxido de hidrógeno, asignándole a la mtNOS una función regulatoria (Boyd & Cadenas, 2002). Ambos puntos de vista no son contradictorios sino complementarios; la función regulatoria puede ocurrir a niveles fisiológicos de NO y el camino patofisiológico puede ser desencadenado a niveles aumentados de NO.

El NO ha sido reconocido como un inhibidor de alta afinidad de la Cox y de la respiración mitocondrial en forma competitiva con el O<sub>2</sub> (Tatoyan & Giulivi, 1998). El NO reacciona con la Cox en sus formas oxidada y reducida. En la forma reducida el NO se une fuertemente al citocromo a<sub>3</sub><sup>2+</sup> y el CuB<sup>+</sup> actúa como un segundo sitio de unión, mientras que en la forma oxidada el NO se une al CuB<sup>2+</sup>. La actividad de la Cox aislada y de partículas submitocondriales, así como la respiración de partículas submitocondriales y de las mitocondrias aisladas es efectivamente inhibida por el NO en una concentración 0,05-1 µM (Poderoso *et al.*, 1998).

El grado de inhibición de la actividad de Cox depende de la concentración de O<sub>2</sub> en el medio de reacción; aparentemente, el NO y el O<sub>2</sub> compiten por la unión al centro binuclear formado por el Fe<sup>2+</sup> del hemo a<sub>3</sub> y el CuB<sup>+</sup> de la enzima (Costa *et al.*, 1997). La unión del NO a la Cox y la inhibición de la actividad enzimática son reversibles (Giulivi *et al.*, 1998).

El NO, además de su efecto sobre la Cox, inhibe la respiración mitocondrial en el espacio ubiquinona-citocromo b. Este efecto del NO es también reversible, pero no depende de la relación [O<sub>2</sub>]/[NO].

## **I.5. CICLO DE LOS ÁCIDOS TRICARBOXÍLICOS**

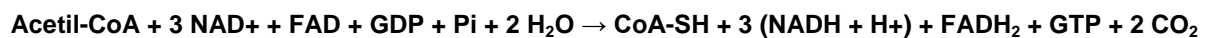
El ciclo de Krebs (ciclo del ácido cítrico o ciclo de los ácidos tricarbóxicos fue descubierto por el alemán Hans Adolf Krebs, quien obtuvo el Premio Nobel de Fisiología o Medicina en 1953, junto con Fritz Lipmann. Es una ruta metabólica, que forma parte de la respiración celular en todas las células aeróbicas, donde se libera la energía almacenada por la oxidación de acetil-CoA (proveniente de carbohidratos, lípidos y proteínas) en dióxido de carbono y energía química en forma de ATP (Meléndez-Hevia *et al.*, 1996; Bénit *et al.*, 2014; Ryan & O'Neill, 2017). Además, el ciclo proporciona precursores de ciertos



aminoácidos, así como el agente reductor NADH que es utilizado en numerosas reacciones bioquímicas. También se genera succinato, metabolito que forma parte tanto de la respiración oxidativa como de la biosíntesis del Hemo.

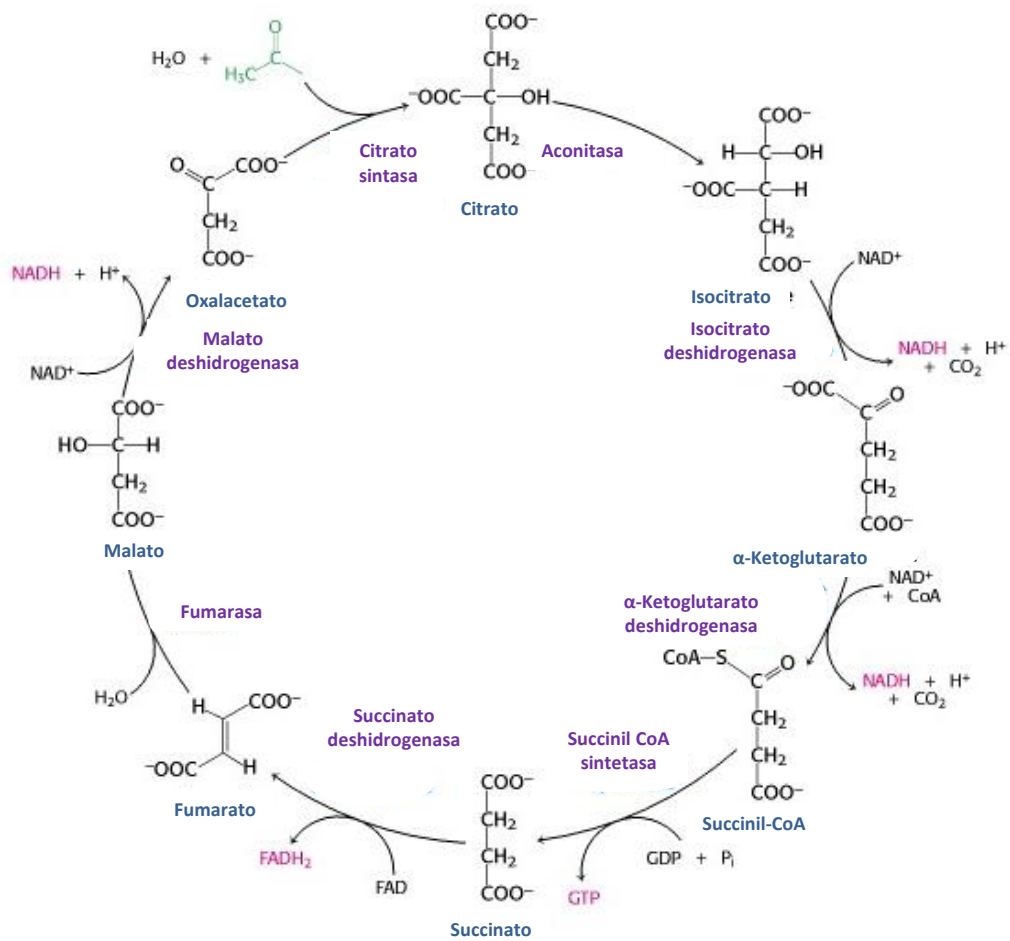
En organismos aeróbicos, el ciclo de Krebs es parte de la vía catabólica que realiza la oxidación de glúcidos, ácidos grasos y aminoácidos hasta producir CO<sub>2</sub>, liberando energía en forma utilizable: poder reductor y GTP (en algunos microorganismos se produce ATP) (Krebs & Weitzman, 1987).

El metabolismo oxidativo de glúcidos, lípidos y proteínas frecuentemente se divide en tres etapas, de las cuales el ciclo de Krebs es la segunda. En la primera etapa, los carbonos de estas macromoléculas dan lugar a acetil-CoA, e incluye las vías catabólicas de aminoácidos (p. ej. desaminación oxidativa), la beta oxidación de ácidos grasos y la glucólisis. La tercera etapa es la fosforilación oxidativa, en la cual el poder reductor (NADH y FADH<sub>2</sub>) generado se emplea para la síntesis de ATP. También proporciona precursores para muchas biomoléculas, como ciertos aminoácidos. Por ello se considera una vía anfibólica, es decir, catabólica y anabólica al mismo tiempo. El balance neto de cada ciclo es:



Las reacciones del ciclo son llevadas a cabo por 8 enzimas que oxidan completamente el acetato, en forma de acetil-CoA, y se liberan dos moléculas de dióxido de carbono y agua. A través del catabolismo de azúcares, grasas y proteínas, se produce un acetato de producto orgánico de dos carbonos en forma de acetil-CoA que entra en el ciclo de ácido cítrico. Las reacciones del ciclo también convierten tres equivalentes de NAD<sup>+</sup> en tres de NADH, un equivalente de FAD en una de FADH<sub>2</sub> y un equivalente de guanosina difosfato (GDP) en GTP ([Figura I.18](#)). El NADH y FADH<sub>2</sub> generados son a su vez utilizados por la vía de la fosforilación oxidativa para generar ATP.

El ciclo comienza con la transferencia de un grupo acetilo de acetil-CoA al compuesto aceptor de cuatro carbonos (oxaloacetato) para formar un compuesto de seis carbonos (citrato). El citrato pasa entonces por una serie de transformaciones químicas, perdiendo dos grupos carboxilo como CO<sub>2</sub>. Los carbonos transformados a CO<sub>2</sub> se originan a partir de oxaloacetato y no directamente de acetil-CoA. Los carbonos donados por acetil-CoA se convierten en parte de la columna vertebral de oxaloacetato de carbono después de la primera vuelta del ciclo de ácido cítrico. La pérdida de los carbonos donados por acetil-CoA como CO<sub>2</sub> requiere varias vueltas del ciclo del ácido cítrico (Wolfe & Jahoor, 1990).



**FIGURA I.18: CICLO DE LOS ÁCIDOS TRICARBOXÍlicos.**

Para cada grupo acetilo que entra en el ciclo de Krebs, se producen tres moléculas de NADH. Los electrones también son transferidos al aceptor de electrones Q, formando QH<sub>2</sub>. Al final de cada ciclo, el oxalacetato de cuatro carbonos ha sido regenerado, y el ciclo continúa.

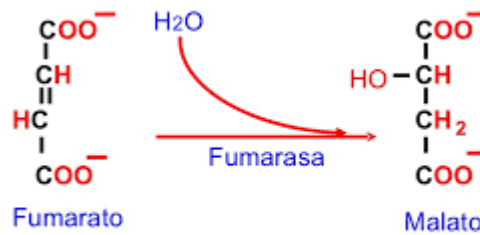
Muchas de las enzimas del ciclo de Krebs son reguladas por retroalimentación negativa, por unión alostérica del ATP, que es un producto de la vía y un indicador del nivel energético de la célula. Entre estas enzimas, se incluye el complejo de la Piruvato deshidrogenasa que sintetiza el acetil-CoA necesario para la primera reacción del ciclo a partir de piruvato, procedente de la glucólisis o del catabolismo de aminoácidos. También las enzimas Citrato sintasa, Isocitrato deshidrogenasa y α-Cetoglutarato deshidrogenasa, que catalizan las tres primeras reacciones del ciclo de Krebs, son inhibidas por altas concentraciones de ATP. Esta regulación frena este ciclo degradativo cuando el nivel

energético de la célula es bueno. Algunas enzimas son también reguladas negativamente cuando el nivel de poder reductor de la célula es elevado. El mecanismo que se realiza es una inhibición competitiva por producto (por NADH) de las enzimas que emplean NAD<sup>+</sup> como sustrato. Así se regulan, entre otros, los complejos Piruvato deshidrogenasa y Citrato sintasa (Stryer *et al.*, 2002).

A continuación se describen las enzimas Fumarasa y Aconitasa que fueron estudiadas en esta Tesis. La enzima Succinato deshidrogenasa se describió en el Item I.4.2 de este Capítulo.

### I.5.1. FUMARASA

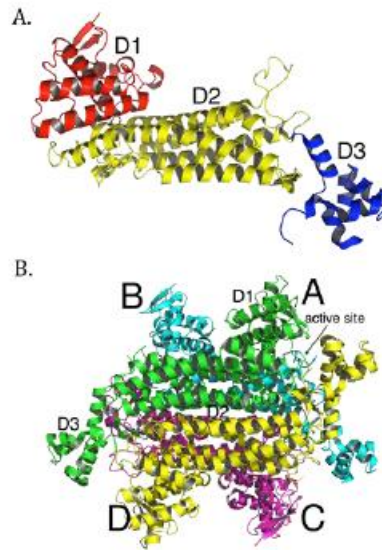
La Fumarasa (FH) o Fumarato hidratasa (EC 4.2.1.2) es una enzima que pertenece a la familia de las liasas, específicamente a las hidroliasas, que rompen enlaces carbono-oxígeno. Cataliza la reacción reversible de hidratación/deshidratación del fumarato a S-malato:



La función de la Fumarasa en el ciclo de Krebs es facilitar la producción de energía en forma de NADH. En el citosol la enzima metaboliza fumarato, que es un producto secundario del ciclo de la urea y del catabolismo de los aminoácidos. El sitio activo de esta enzima está compuesto de residuos de aminoácidos de tres de las cuatro subunidades de la enzima tetramérica (clase II) (Figura I.19). Dos residuos catalíticos ácido-base potenciales son la His-188 y la Lys-324. La fumarasa se presenta en dos formas: mitocondrial y citosólica. La isoenzima mitocondrial está involucrada en el ciclo de Krebs y la isoenzima citosólica participa en el metabolismo de los aminoácidos y del fumarato (Yogev *et al.*, 2011).

La localización celular mitocondrial se establece mediante la presencia de una secuencia señalizadora en el N-término, mientras que en la localización citosólica esta señal está ausente. Hay dos clases de Fumarasas; la clasificación depende de la disposición de las subunidades, de sus requerimientos de cofactores metálicos y de su estabilidad térmica.

- Clase I. Estas Fumarasas son capaces de cambiar de estado o volverse inactivas cuando están sometidas al calor o a la radiación. Son sensibles al anión superóxido, son dependientes del ion  $\text{Fe}^{2+}$  y son proteínas diméricas de unos 120 kDa.
- Clase II. Estas Fumarasas se encuentran en procariontas y eucariotas. Son enzimas tetraméricas de 200 kDa que contienen tres segmentos distintos de aminoácidos homólogos. Son también dependientes de hierro y son estables térmicamente.

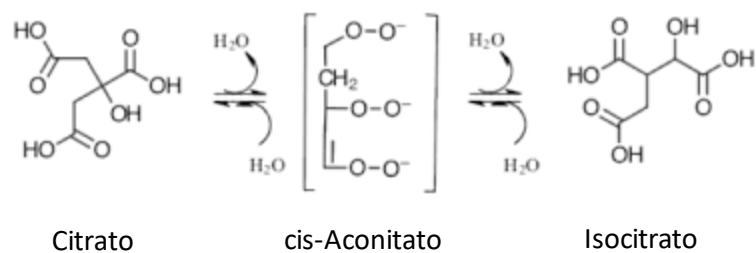


**FIGURA I.19: ESTRUCTURA DE LA FUMARASA**

A) Estructura terciaria: una única subunidad ha sido coloreada por dominio: Rojo: dominio 1, Amarillo: dominio 2 y Azul: dominio 3. B) Estructura cuaternaria el homotetrámero está coloreado por cadena, con las subunidades nombradas como A, B, C y D (PDB ID: 3E04) (Bulku *et al.*, 2018).

### I.5.2. ACONITASA

La Aconitasa (ACO) o aconitato hidratasa (EC 4.2.1.3) es una enzima que cataliza la isomerización estereoespecífica de citrato a isocitrato a través de cis-aconitato en el ciclo de Krebs de acuerdo a la siguiente reacción:



En los humanos, se encuentran presentes dos isoenzimas: la Aconitasa citosólica (ACO1) y la Aconitasa mitocondrial (ACO2); ambas proteínas están formadas por una única cadena polipeptídica que tienen más de una función (Lloyd *et al.*, 1999; Walden, 2002).

La Aconitasa es una enzima que pertenece a las proteínas ferrosulfuradas. Es una proteína muy conservada y presenta una gran homología entre mamíferos. La estructura secundaria está constituida por alfa hélices alternadas con láminas beta formando una estructura terciaria globular (Dupuy *et al.*, 2006). No dispone de estructura cuaternaria ya que sólo tiene una subunidad. Su estructura está dividida en 4 dominios globulares presentados con el siguiente orden: 4, 1, 2 y 3. Entre los dominios 3 y 4 hay un “linker joining” (estructura proteica) que varía dependiendo de la conformación funcional. En la Aconitasa citosólica es más largo y estructurado (593 a 654) que en la mitocondrial (513 a 536). El sitio activo está formado por 21 aminoácidos de los cuatro dominios (Gruer *et al.*, 1997). Las cadenas laterales son polares y forman enlaces de hidrógeno con el sustrato, lo que contribuye al gran tamaño de la proteína. Los dominios del 1 al 3 están muy compactados, a diferencia del cuarto que es mucho más flexible. Existe un plegamiento que difiere en ambos tipos en el dominio 1 para la región N-terminal, residuos del 1 al 33. Las inserciones en diferentes dominios provoca que las estructuras tridimensionales de las dos isoenzimas (citosólica y metabólica) sean distintas (Figura I.20).

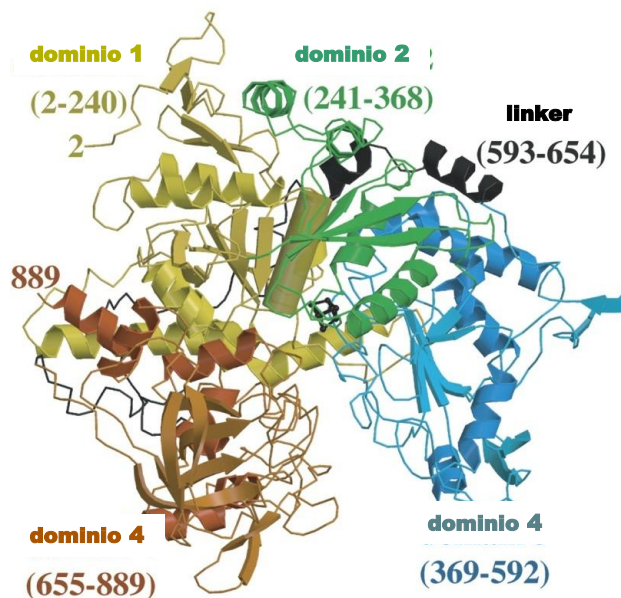


FIGURA I.20: ESTRUCTURA DE LA ACONITASA

Además de su función en el ciclo de Krebs, la Aconitasa también cumple una función estructural y reguladora en el mantenimiento del ADNmt actuando en su estabilización, formando parte de los complejos proteicos de éste, conocidos como nucleoides. El ADNmt

modela los nucleóides para influir directamente en la expresión genética mitocondrial ante cambios en el entorno celular (Kurland & Andersson, 2000). Además es susceptible a la acetilación no enzimática por metabolitos como el acetil-CoA, por lo que funcionaría como sensor de la disponibilidad de nutrientes.

### I.5.3. INHIBIDORES DEL CICLO DE LOS ÁCIDOS TRICARBOXILICOS

El ciclo tiene 3 inhibidores clásicos: fluoracetato, arsenito y malonato. El fluoracetato en forma de fluor acetil CoA reacciona con el oxalacetato y produce fluorcitrato, pero este compuesto no es reconocido por la Aconitasa y se paraliza el ciclo. El arsenito inhibe todos aquellos compuestos multienzimáticos que usan lipoamida como coenzima, y en el caso del ciclo afecta a la  $\alpha$ -Cetoglutarato deshidrogenasa. El malonato es inhibidor competitivo de la Succinato deshidrogenasa.

### I.6. REFERENCIAS

- Acin-Perez R., Bayona-Bafaluy M.P., Fernandez-Silva P., Moreno-Loshuertos R., Perez-Martos A., Bruno C., Moraes C.T., Enriquez J.A. (2004) Respiratory complex III is required to maintain complex I in mammalian mitochondria. *Mol Cell* 13:805-815.
- Aldera AP, Govender D. (2018) Gene of the month: SDH. *J Clin Pathol* 71(2):95-97.
- Alderton W.K.; Cooper, C.E.; Knowles, R.G. (2001) Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 357:593–615.
- Althoff T., Mills D.J., Popot J.L., Kuhlbrandt W. (2011) Arrangement of electron transport chain components in bovine mitochondrial supercomplex I1III2IV1. *Embo J* 30:4652-4664.
- Altmann, R.(1890) Die Elementarorganismen und ihre beziehungen zu den zellen. Elemental organisms and their relationships to the cells. Leipzig: Veit.
- Alvarez S., Valdez L.B., Zaobornyj T., Boveris A. (2003) Oxygen dependence of mitochondrial nitric oxide synthase activity. *Biochem Biophys Res Commun* 305:771–775.
- Anderson S., Bankier A.T., Barrell B.G., De Bruijn M.H., Coulson A.R., Drouin J., Eperon I.C., Nierlich D.P., Roe B.A., Sanger F. (1981) Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290(5806):457-465.
- Arbones M.L., Ribera J., Agullo L., Baltrons M.A., Casanovas A., Riveros-Moreno V., Garcia A. (1996) Characteristics of nitric oxide synthase type I of rat cerebellar astrocytes. *Glia* 18: 224–232.
- Asano K., Chee C.B., Gaston B., Lilly C.M., Gerard C., Drazen J.M., Stamler J.S. (1994) Constitutive and inducible nitric oxide synthase gene expression, regulation, and activity in human lung epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 91:10089–10093.
- Baradaran R., Berrisford J., Minhas G.S., A.L. Sazanov. (2013) Crystal structure of the entire respiratory complex I. *Nature* 494(7438):443–448.

- Baum H., Rieske J.S., Silman H.I., Lipton S.H. (1967) On the mechanism of electron transfer in complex III of the electron transfer chain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 57:798-805.
- Benda C. (1898) "Ueber die Spermatogenese der Vertebraten und höherer Evertbraten, II. Theil: Die Histiogenese der Spermien" (On spermatogenesis of vertebrates and higher invertebrates, Part II: The histogenesis of sperm), *Archiv für Anatomie und Physiologie* 73: 393-398.
- Bénil P., Letouzé E., Rak M., Aubry L., Burnichon N., Favier J., Gimenez-Roqueplo A.P., Rustin P. (2014) Unsuspected task for an old team: Succinate, fumarate and other Krebs cycle acids in metabolic remodeling 8:1330-1337
- Bogenhagen D.F., Wang Y., Shen E.L., Kobayashi R. (2003) Protein components of mitochondrial DNA nucleoids in higher eukaryotes. *Mol Cell Proteomics* 2(11):1205-1216.
- Bombicino S.S., Iglesias D.E., Rukavina-Mikusic I.A., Buchholz B., Gelpi R.J., Boveris A., Valdez L.B. (2017) Hydrogen peroxide, nitric oxide and ATP are molecules involved in cardiac mitochondrial biogenesis in Diabetes. *Free Radic Biol Med* 112:267-276.
- Boveris A. (1998) Regulación de la respiración mitocondrial por ADP, O<sub>2</sub> y NO. *Medicina (Buenos Aires)*; 58:559-560.
- Boveris A., Arnaiz S.L., Bustamante J., Alvarez S., Valdez L., Boveris A.D. (2002) Pharmacological regulation of mitochondrial nitric oxide synthase. *Meth in Enzymol* 359:328–339.
- Boyd C., Cadenas, E. (2002) Nitric oxide and cell signaling pathways in mitochondrial-dependent apoptosis. *Biol Chem* 383:411-423.
- Boyer P.D. (1997) The ATP synthase: a splendid molecular machine, *Annu Rev Biochem* 66: 717–749
- Buera Marin L. (2012) Consecuencias fisiopatológicas celulares de mutaciones en el gen *bcs1l* asociadas a déficits enzimáticos del Complejo III mitocondrial. Tesis Doctoral, Universidad Autónoma de Madrid.
- Bulku A., Weaver T.M., Berkmen M.B. (2018) Biochemical Characterization of Two Clinically-Relevant Human Fumarase Variants Defective for Oligomerization. *Open Biochem J* 12:1-15.
- Bustamante J., Bersier G., Badin R.A., Cymeryng C., Parodi A., Boveris, A. (2002) Sequential NO production by mitochondria and endoplasmic reticulum during induced apoptosis. *Nitric Oxide* 6:333-341.
- Carreras M.C., Melani M., Riobó N., Converso D.P., Gatto E.M., Poderoso J.J. (2002) Neuronal nitric oxide synthases in brain and extraneural tissues. *Meth Enzymol* 359:413-423.
- Carreras M.C., Franco M.C., Finocchietto P.V., Converso D.P., Antico Arciuch V.G., Holod S., Peralta J.G., Poderoso J.J. (2007) The biological significance of mtNOS modulation. *Front Bio* 1(12):1041-1048.
- Carroll J., Fearnley I.M., Shannon R.J., Hirst J., Walker J.E. (2003) Analysis of the subunit composition of complex I from bovine heart mitochondria. *Mol Cell Proteomics* 2:117-126.
- Champe P.C., Harvey R.A., Ferrier D.R. (2005). *Bioquímica* (tercera edición). McGraw Hill. pp. 88-91.
- Chan D.C. (2006). Mitochondrial fusion and fission in mammals. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22: 79-99.
- Christopher K. Mathews, K.E. Van Holde, Kevin G. Ahern. (2002). *Bioquímica* (tercera edición). Pearson Educación, S.A. pp. 600-615.

- 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* 345:50–54.
- Costa L.E., Méndez G., Boveris (1997) Oxygen dependence of mitochondrial function measured by high-resolution respirometry in long-term hypoxic rats. *Am J Physiol* 273: C852-C858.
- Di Mauro S., Schon E. (2003) Mitochondrial Respiratory-Chain Diseases. *N Engl J Med* 348:2656-2668.
- Dudkina N.V., Eubel H., Keegstra W., Boekema E.J., Braun H.P. (2005) Structure of a mitochondrial supercomplex formed by respiratory-chain complexes I and III. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:3225-3229.
- Dudkina N.V., Kudryashev M., Stahlberg H., Boekema, E.J. (2011) Interaction of complexes I, III, and IV within the bovine respirasome by single particle cryoelectron tomography. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:15196-15200.
- Dupuis A., Prieur I., Lunardi J. (2001) Toward a characterization of the connecting module of complex I. *J Bioenerg Biomembr* 33:159-168.
- Dupuy J., Volbeda A., Carpentier P., Darnault C., Moulis J.M., Fontecilla-Camps J.C. (2006) Crystal structure of human iron regulatory protein 1 as cytosolic aconitase. *Structure* 14(1):129-139.
- Elfering S.L., Sarkela T.M., Giulivi C. (2002) Biochemistry of mitochondrial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem* 277:38079–38086.
- Ernster, L. & Schatz, G. (1981) Mitochondria: A Historical Review. *J Cell Biol* 91(3):227s-255s
- Gerle C. (2016) On the structural possibility of pore-forming mitochondrial FoF1 ATP synthase. *Biochim Biophys Acta* 1857(8):1191-1196.
- Giulivi C., Poderoso J.J., Boveris A. (1998) Production of nitric oxide by mitochondria. *J Biol Chem* 273:11038–11043.
- Gruer M.J., Artymiuk P.J., Guest J.R. (1997) The aconitase family: three structural variations on a common theme. *Trends Biochem Sci* 22 (1):3-6.
- Guo R., Zong S., Wu M., Gu J., Yang M. (2017) Architecture of human mitochondrial respiratory megacomplex I<sub>2</sub>III<sub>2</sub>IV<sub>2</sub>. *Cell* 170:1247–1257.
- Haynes V.; Elfering S.; Traaseth N. & Giulivi C. (2004) Mitochondrial nitric-oxide synthase: Enzyme expression, characterization, and regulation. *J Bioenerg Biomembr* 36:341-346.
- Heinemeyer J., Braun H.P., Boekema E.J., Kouril R. (2007) A structural model of the cytochrome C reductase/oxidase supercomplex from yeast mitochondria. *J Biol Chem* 282: 12240-12248.
- Hinchliffe P., Sazanov L.A. (2005) Organization of iron-sulfur clusters in respiratory complex I. *Science* 309(5419):771-774.
- Hollenbeck P.J., Saxton W.M. (2005) The axonal transport of mitochondria. *J Cell Sci* 118:5411-5419.
- Hunte C., Koepke J., Lange C., Rossmannith T., Michel, H. (2000) Structure at 2.3 Å resolution of the cytochrome bc(1) complex from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* co-crystallized with an antibody Fv fragment. *Structure* 8:669-684.



- Iwata S., Lee J.W., Okada K., Lee J.K., Iwata M., Rasmussen B., Link T.A., Ramaswamy S., Jap B.K. (1998) Complete structure of the 11-subunit bovine mitochondrial cytochrome bc<sub>1</sub> complex. *Science* 281:64-71.
- Kanai A.J., Pearce L.L., Clemens P.R., Birder L.A., VanBibber M.M.; Choi S.Y., Groat W.C., Peterson J. (2001) Identification of a neuronal nitric oxide synthase in isolated cardiac mitochondria using electrochemical detection. *Proc Natl Acad Sci USA*. 98:14126–14131.
- Kausar S., Wang F., Cui H. (2018) The role of mitochondria in reactive oxygen species generation and its Implications for neurodegenerative diseases. *Cells* 7(12):E274.
- Kim E., Rath E.M., Tsang V.H., Duff A.P., Robinson B.G., Church W.B., Benn D.E., Dwight T., Clifton-Bligh R.J. (2015) Structural and functional consequences of succinate dehydrogenase subunit B mutations. *Endocr Relat Cancer* 22(3):387-397
- Krebs H.A., Weitzman P.D.J. (1987) Krebs' citric acid cycle: half a century and still turning. Londres: Biochemical Society.
- Kurland C.G., Andersson S.G.E. (2000) Origin and Evolution of the Mitochondrial Proteome. *Microbiol Mol Biol Rev* 64 (4):786-820.
- Lenaz G., Genova M.L. (2010) Structure and organization of mitochondrial respiratory complexes: a new understanding of an old subject. *Antioxid Redox Signal* 12: 961-1008.
- Lieberman M., Marks A., Peet, A. (2013) Bioquímica médica básica de Marks, un enfoque clínico (4A edición). Lippincott Williams & Wilkins, pp 325-330.
- Liu, X., Weaver, D., Shirihai, O., Hajnoczky, G. (2009) Mitochondrial 'kiss-and-run': interplay between mitochondrial motility and fusion-fission dynamics. *EMBO J*. 28:3074-3089.
- Lloyd S.J., Lauble H., Prasad G.S., Stout C.D. (1999) The mechanism of aconitase: 1.8 Å resolution crystal structure of the S642a: citrate complex. *Protein Sci* 8(12):2655-2662.
- Malka F., Guillery O., Cifuentes-Diaz C., Guillou E., Belenguer P., Lombes A., Rojo M. (2005) Separate fusion of outer and inner mitochondrial membranes. *EMBO Rep* 6:853-859.
- Margulis L. (1967) On origin of mitosing cells. *J Theor Biol* 14(3):225-274.
- Meléndez-Hevia E., Waddell T.G., Cascante M. (1996) The puzzle of the Krebs citric acid cycle: assembling the pieces of chemically feasible reactions, and opportunism in the design of metabolic pathways during evolution. *J Mol Evol* 43(3):293–303.
- Montoya J., López-Pérez M.J., Ruiz-Pesini E. (2006) Mitochondrial DNA transcription and diseases: past, present and future. *Biochim Biophys Acta* 1757(9-10):1179-1189.
- Moreno-Lastres D., Fontanesi F., Garcia-Consuegra I., Martin M.A., Arenas J., Barrientos A., Ugalde C. (2012) Mitochondrial complex I plays an essential role in human respirasome assembly. *Cell Metab* 15:324-335.
- Mukherjee S., Warshel A. (2017) The FOF1 ATP synthase: from atomistic three-dimensional structure to the rotary-chemical function. *Photosynth Res* 134(1):1-15.
- Murray R. K., Mayes P.A. Granner D. K. Rodwell V. W. (2004) Harper Bioquímica ilustrada 16ª edición. México D.F. Editorial delManual Moderno.
- Nakada K., Inoue K., Hayashi J. (2001) Interaction theory of mammalian mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun* 288:743-746.
- Nelson D.L., Cox M.C. (2004) Lehninger: principles of biochemistry (4th edn W. H. Freeman & Co., New York, 1119 pp (plus 17 pp glossary).
- O'Rourke, B. (2010) From bioblasts to mitochondria: ever expanding roles of mitochondria in cell physiology *Front. Physiol* 1:7. doi: 10.3389/fphys.2010.00007.

- Parihar M.S., Parihar A., Villamena F.A., Vaccaro P.S., Ghafourifar P. (2008) Inactivation of mitochondrial respiratory chain complex I leads mitochondrial nitric oxide synthase to become pro-oxidative, *Biochem Biophys Res Commun* 367:761–767.
- Persichini T., Mazzone V., Polticelli F., Moreno S., Venturini G., Clementi E. (2005) Mitochondrial type I nitric oxide synthase physically interacts with cytochrome c oxidase. *Neurosci Lett* 384:254–259.
- Poderoso J.J., Peralta J.G., Lisdero C.L., Carreras M.C., Radisic M., Schopfer F. (1998) Nitric oxide regulates oxygen uptake and hydrogen peroxide release by the isolated beating rat heart. *Am J Physiol* 274:C112–C119.
- Reichert A.S., Neupert W. (2004) Mitochondriomics or what makes us breathe. *Trends Genet* 20:555-562
- Riobó N.A., Melani M., Sanjuan N., Fiszman M.L., Gravielle M.C., Carreras M.C., Cadenas E., Poderoso J.J. (2002) The modulation of mitochondrial nitric-oxide synthase activity in rat brain development. *J Biol Chem* 277:42447-42455.
- Ryan D.G., O'Neill L.A.J. (2017) Krebs cycle rewired for macrophage and dendritic cell effector functions. *FEBS Lett* 591:2992–3006.
- Sala-Vila A.; Navarro-Lérida I., Sánchez-Alvarez M., Bosch M., Calvo C., López J.A., Calvo E., Ferguson C., Giacomello M., Serafini A., Scorrano L., Enriquez J.A., Balsinde J., Parton R.G.; Vázquez J., Pol A., Del Pozo M.A. (2016) Interplay between hepatic mitochondria-associated membranes, lipid metabolism and caveolin-1 in mice. *Sci Rep* 6:27351.
- Sato M., Sato K. (2013) Maternal inheritance of mitochondrial DNA by diverse mechanisms to eliminate paternal mitochondrial DNA. *Biochim Biophys Acta* 1833(8):1979-1984.
- Scalettar B.A., Abney J.R., Hackenbrock C.R. (1991) Dynamics, structure, and function are coupled in the mitochondrial matrix. *Proc Natl Acad Sci USA* 88(18):8057-8061.
- Schafer E., Seelert H., Reifschneider N.H., Krause F., Dencher N.A., Vonck J. (2006) Architecture of active mammalian respiratory chain supercomplexes. *J Biol Chem* 281: 15370-15375.
- Schagger H. & Pfeiffer K. (2000) Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *EMBO J* 19(8):1777-1783.
- Schagger H., de Coo R., Bauer M.F., Hofmann S., Godinot C., Brandt U. (2004) Significance of respirasomes for the assembly/stability of human respiratory chain complex I. *J Biol Chem* 279(35):36349-36353.
- Sharma P., Sampath H. (2019) Mitochondrial DNA Integrity: Role in Health and Disease. *Cells* 8(2).pii: E100.
- Sperl W., Jesina P., Zeman J., Mayr J.A., Demeirleir L., VanCoster R., Pícková A., Hansíková H., Houst'ková H., Krejčík Z., Koch J., Smet J., Muss W., Holme E., Houstek J. (2006) Deficiency of mitochondrial ATP synthase of nuclear genetic origin. *Neuromuscul Disord* 16(12):821.
- Stryer L., Berg J.M., Tymoczko J.L. (2002) *The Regulation of Cellular Respiration Is Governed Primarily by the Need for ATP*. Biochemistry San Francisco: W.H. Freeman. Sección 18.6.
- Stuehr DJ, Vasquez-Vivar J. (2017) Nitric oxide synthases-from genes to function. *Nitric Oxide* 63:29. doi: 10.1016/j.niox.2017.01.005.
- Tatoyan A., Giulivi C. (1998) Purification and characterization of a nitric-oxide synthase from rat liver mitochondria. *J Biol Chem* 273:11044–11048.

- Tsukihara T., Aoyama H., Yamashita E., Tomizaki T., Yamaguchi H., Shinzawa-Itoh K., Nakashima R., Yaono R., Yoshikawa S. (1995) Structures of metal sites of oxidized bovine heart cytochrome c oxidase at 2.8 Å. *Science* 269:1069-1074.
- Valdez L., Bombicino S., Iglesias D., Rukavina Mikusic I., D'Annunzio V. (2016) Mitochondrial complex I inactivation after ischemia-reperfusion in the stunned heart, in: R. Gelpi, A. Boveris, J. Poderoso (Eds.), *Advances in Biochemistry in Health and Disease. Biochemistry of Oxidative Stress: Physiopathology and Clinical Aspects*, Springer, New York, USA, pp. 245–257
- Voet D., Voet J.G. (2004) *Biochemistry*, 3rd Edition. John Wiley & Sons. pp 818-820.
- Vonck J., Schafer E. (2009) Supramolecular organization of protein complexes in the mitochondrial inner membrane. *Biochim Biophys Acta* 1793(1):117-124.
- Walden W.E. (2002) From bacteria to mitochondria: aconitase yields surprises. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99(7):4138-4140.
- Wittig I., Schagger H. (2009) Supramolecular organization of ATP synthase and respiratory chain in mitochondrial membranes. *Biochim Biophys Acta* 1787:672-680.
- Wolfe R.R., Jahoor F. (1990) Recovery of labeled CO<sub>2</sub> during the infusion of C-1- vs C-2-labeled acetate: implications for tracer studies of substrate oxidation. *Am J Clin Nutr* 51(2): 248–252.
- Xia D., Yu C.A., Kim H., Xia, J.Z., Kachurin A.M., Zhang L., Yu L., Deisenhofer J. (1997) Crystal structure of the cytochrome bc<sub>1</sub> complex from bovine heart mitochondria. *Science* 277:60-66.
- Xu K.Y., Huso D.L., Dawson T.M., Bredt D.S., Becker L.C. (1999) Nitric oxide synthase in cardiac sarcoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 96:657–662.
- Yogev O., Naamati A., Pines O. (2011) Fumarase: a paradigm of dual targeting and dual localized functions. *FEBS J* 278(22):4230-4242.
- Zaobornyj T., Iglesias D.E., Bombicino S.S., Rukavina Mikusic I.A., Valdez L.B. (2016) Biochemistry and physiology of heart mitochondrial nitric oxide synthase en: *Biochemistry of Oxidative Stress Physiopathology and Clinical Aspects* (R.J. Gelpi, A. Boveris, J. Poderoso, eds). Springer Nature, Switzerland 37-48.
- Zara V., Conte L., Trumpower B.L. (2009) Evidence that the assembly of the yeast cytochrome bc<sub>1</sub> complex involves the formation of a large core structure in the inner mitochondrial membrane. *Febs J* 276:1900-1914.

## CAPITULO II

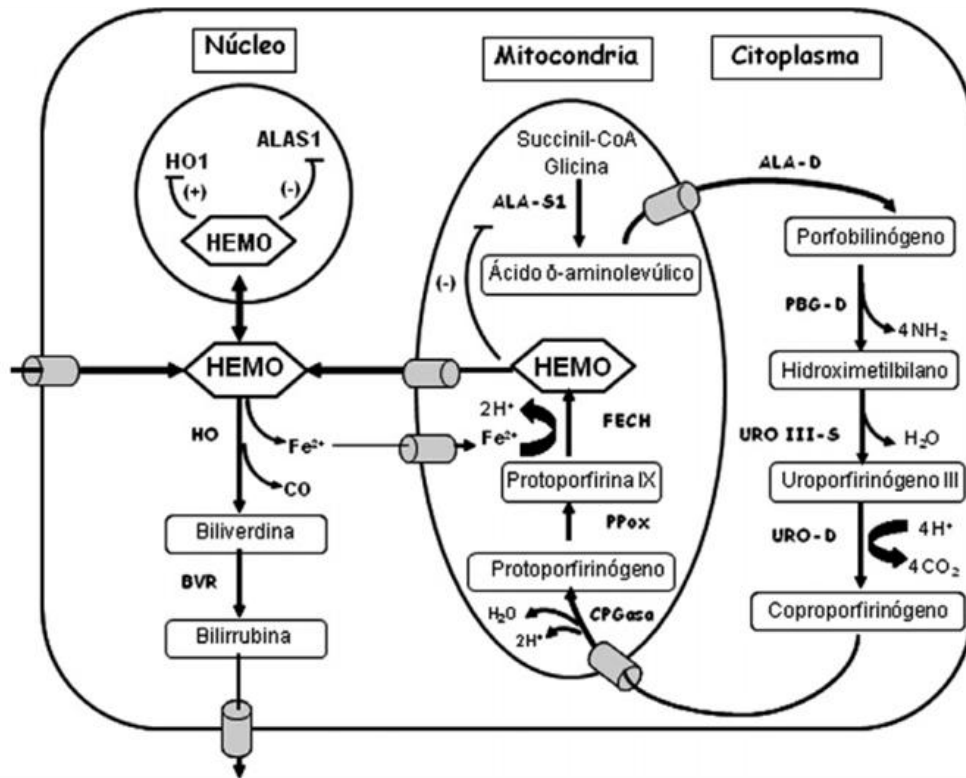
### GRUPO HEMO Y PORFIRIAS

#### II.1. GRUPO HEMO: SÍNTESIS, DEGRADACIÓN Y REGULACIÓN

El hemo es un tetrapirrol cíclico compuesto de 4 pirroles unidos por puentes metenos y con un átomo de hierro en el centro de la porfirina.

La biosíntesis del hemo es un proceso complejo que involucra ocho reacciones enzimáticas, algunas de las cuales se llevan a cabo en la mitocondria y otras en el citoplasma (Batlle, 1997) ([Figura II.1](#)).

La síntesis del hemo se inicia a partir de la condensación de moléculas pequeñas como la glicina y la succinil CoA, derivadas del ciclo de los ácidos tricarbónicos que por acción de la  $\delta$ -aminolevulónico sintetasa (ALA-S) producen una molécula del ácido  $\delta$ -aminolevulónico (ALA). La síntesis de ALA ocurre en la mitocondria y luego, se traslada al citoplasma donde dos moléculas de sustrato son condensadas por la enzima  $\delta$ -Aminolevulónico dehidrasa (ALA-D), formando el porfobilinógeno (PBG). Cuatro moléculas de PBG son condensadas en sentido "cabeza-cola" por la acción de la enzima Porfobilinógeno deaminasa (PBG-D), formándose el tetrapirrol lineal hidroximetilbilano, el cual por acción de la enzima Uroporfirinógeno III Sintetasa o Isomerasa se isomeriza y cicla para formar el Uroporfirinógeno III (UROgen III). En ausencia de Isomerasa el hidroximetilbilano se cicla no enzimáticamente para formar UROgen I, el cual sólo se acumula bajo condiciones patológicas. La enzima Uroporfirinógeno decarboxilasa (URO D), cataliza la decarboxilación de las cadenas laterales acetato del UROgen III a grupos metilo, produciendo los intermediarios con 7, 6, 5 y formando el producto final con 4 carboxilos, el Coproporfirinógeno III (COPROgen). La secuencia metabólica reingresa a la mitocondria donde la enzima Coproporfirinógeno oxidasa (CPGasa), cataliza la decarboxilación oxidativa de las cadenas laterales propionato en las posiciones 2 y 4 a grupos vinilos produciendo el protoporfirinógeno IX (PROTOgen). La Protoporfirinógeno oxidasa (PPG-ox), oxida este último a Protoporfirina IX (PROTO). El paso final en la biosíntesis del hemo es la inserción del hierro ferroso, reacción catalizada por la Ferroquelatasa (Fech).



**FIGURA II.1: BIOSÍNTESIS, DEGRADACIÓN Y REGULACIÓN DEL HEMO.**

ALA-S: δ-Aminolevúlico sintetasa, ALA-D: δ-Aminolevúlico dehidrasa, PBG-D: Porphobilinógeno deaminasa, URO III-S: Uroporfirinógeno III sintetasa, URO-D: Uroporfirinógeno decarboxilasa, CPGasa: Coproporfirinogenasa, PPox: Protoporfirinógeno oxidasa, Fe-Quel: Ferroquelatasa, HO: Hemo Oxigenasa. BVR: Biliverdina reductasa.

Debido a su naturaleza lipofílica el hemo puede atravesar las membranas en forma pasiva, pero generalmente requiere de proteínas extracelulares e intracelulares específicas como transportadores (Wandersman & Stojiljkovic, 2000; Shayeghi *et al.*, 2005). El hemo es incorporado al organismo a través de la absorción intestinal e ingresa por una proteína de membrana llamada HCP1 que también se encuentra en hígado y riñón (Andrews, 2005). Si el hemo no es degradado y pasa al torrente sanguíneo, el pasaje a través de la pared intestinal es mediado por 2 transportadores Bcrp y FLVCR (Krishnamurthy *et al.*, 2004; Quigley *et al.*, 2004). El hemo extracelular en plasma es incorporado por varias células, incluyendo los hepatocitos. El hemo en plasma se une a la albúmina y a la hemopexina, e ingresa a la célula por receptores de albúmina y hemopexina. El hemo que ingresó a las células se une a varios transportadores citosólicos y es utilizado para la formación de hemoproteínas en el retículo endoplasmático y la mitocondria (Taketani, 2005).

A pesar de que el hemo es esencial para la vida, el exceso de hemo intracelular es altamente tóxico para la célula, en parte debido a su predisposición a ser oxidado (Taketani, 2005; Hou *et al.*, 2006). Los precursores del hemo, ALA y porfirinas, generan especies reactivas de oxígeno (ROS) a partir de reacciones de autooxidación y fotoquímicas

respectivamente (Ryter & Tyrrell, 2000; Wijayanti *et al.*, 2004). El hemo se une reversiblemente al oxígeno; la reactividad del hemo con el oxígeno puede llevar a toxicidad. Alternativamente, la unión de hemo con un ligando protege contra el daño a proteínas y lípidos, y previene la citotoxicidad (Taketani, 2005).

Por lo expuesto, la concentración de hemo libre intracelular está altamente controlada a bajos niveles, de forma tal que en condiciones normales se acumulan y excretan cantidades mínimas de intermediarios. Una proporción importante del hemo se incorpora en las apoproteínas para formar hemoproteínas.

En hígado, el hemo ejerce una regulación negativa sobre el ALA-S (ALA-S 1) (Munakata *et al.*, 2004; Podvinec *et al.*, 2004; Furuyama *et al.*, 2007), siendo por lo tanto la síntesis del precursor ALA, la etapa limitante. La regulación negativa del ALAS1 ocurre en varios niveles (Figura II.2): reducción de la transcripción (Yamamoto *et al.*, 1982) y traducción (Sassa & Granick, 1970; Yamamoto *et al.*, 1983), desestabilización del ARNm (Hamilton *et al.*, 1991) e inhibición del transporte a la mitocondria del precursor de la proteína (Yamauchi *et al.*, 1980). Además, los resultados obtenidos por Yoshino *et al.* (2007) sugieren la existencia de un sistema de degradación de ALA-S 1 mitocondrial que estaría regulado por el nivel celular de hemo y representaría un punto adicional de control del hemo sobre la actividad de esta enzima.

En eritrocitos, la regulación está ejercida principalmente por la cantidad de hierro en la célula sobre la isoforma específica del ALA-S (ALA-S 2) y el receptor de transferrina, mediante un complejo mecanismo sobre la traducción de dichas proteínas (Rossetti *et al.*, 2016).

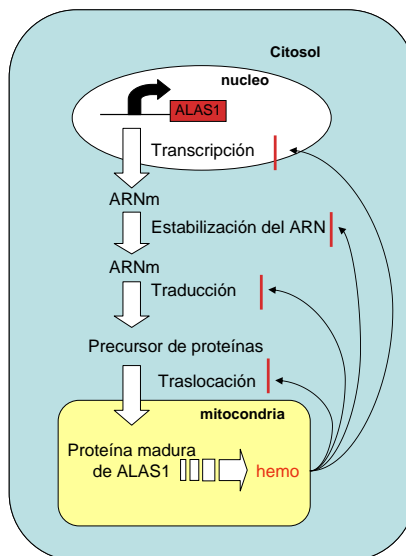
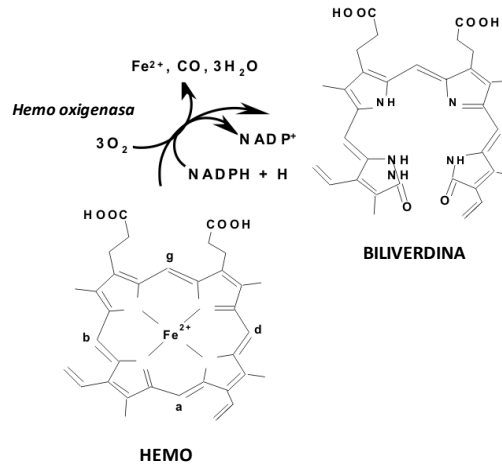


FIGURA II.2: REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE ALA-S 1.

La principal vía de degradación del hemo es catalizada por la enzima Hemo oxigenasa (HO). Los productos de esta reacción son: monóxido de carbono (CO), hierro y biliverdina (Figura II.3). La biliverdina posteriormente es convertida a bilirrubina por la enzima biliverdina reductasa y transportada al hígado para formar bilirrubina conjugada y ser excretada del organismo (Maines & Gibbs, 2005).



**FIGURA II.3: REACCIÓN CATALIZADA POR LA ENZIMA HO, CON SUS RESPECTIVOS PRODUCTOS**

La HO desempeña un rol crítico en la homeostasis del hierro fisiológico, la defensa antioxidante y los mecanismos de transducción de señales que utilizan CO como mensajero (Tomaro & Battle, 2002; Abraham & Kappas, 2008; Ryter & Choi, 2016; Liu *et al.*, 2018). La inducción específica de HO por diferentes formas de estrés oxidativo es parte de los mecanismos de defensa antioxidante de los tejidos que permite disminuir los niveles de hemo, el cual es un prooxidante, y a la vez incrementar la concentración de pigmentos biliares activos, biliverdina y bilirrubina, que pueden actuar como antioxidantes.

## II.2. HEMOPROTEÍNAS

Son metaloproteínas que poseen un grupo prostético hemo, el cual está unido permanentemente con enlaces covalentes y no covalentes a las cadenas de la proteína y están presentes en una gran cantidad de organismos. En los humanos y animales, son sintetizadas principalmente en el hígado.

Están formadas por largos polipeptidos unidos a uno o más grupos hemo, y en cada grupo hemo un átomo de hierro. La mayoría de las hemoproteínas están constituidas de manera que puedan participar en las reacciones de óxido-reducción, mediante el cambio de valencia del átomo de hierro que poseen.

Estas metaloproteínas tienen funciones muy específicas gracias al grupo hemo que poseen, en donde de acuerdo a la geometría tridimensional y el medio que se genera, pueden llevar a cabo diferentes funciones.

El hemo constituye el grupo prostético de numerosas hemoproteínas. En la [Tabla II.1](#) se mencionan las más importantes entre las que se pueden mencionar: pigmentos respiratorios como la hemoglobina y citocromos, mioglobina, Catalasa, Peroxidasas, NOS, Triptofano pirrolasa y Xantina oxidasa ([Tabla II.1](#)) (Batlle *et al.*, 1997; Wijayanti *et al.*, 2004; Tsiftoglou *et al.*, 2006; Furuyama *et al.*, 2007; Immenschuh *et al.*, 2017). Por lo tanto, el hemo está involucrado en diversos procesos biológicos fundamentales: transferencia de electrones, transporte de oxígeno, transducción de señales, procesamiento de microARN y funciones regulatorias durante la diferenciación eritroide (Chiabrando *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2018).

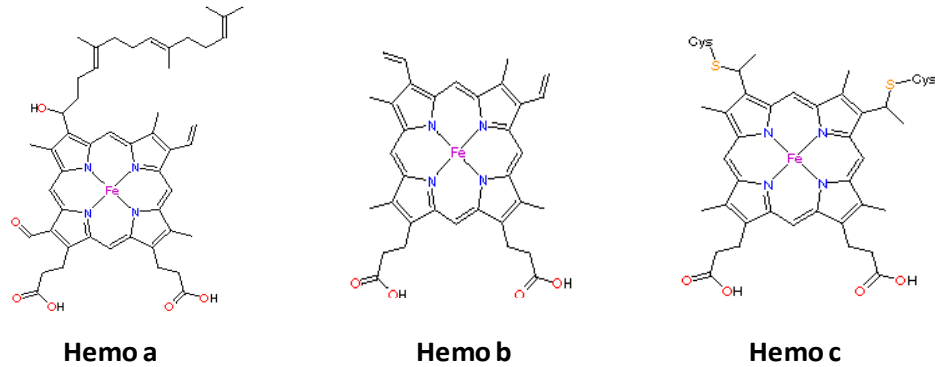
**TABLA II.1: PRINCIPALES HEMOPROTEÍNAS**

– Globinas unidoras de oxígeno: hemoglobinas, mioglobina, neuroglobina.
– Sensores de oxígeno: citoglobina (también denominada histoglobina).
– Óxido-reductasas del tipo citocromo. Citocromos respiratorios. Citocromos de metabolismo xenobiótico tipo citocromo P450. Citocromos fagocíticos del complejo NADPH-oxidasa
– Peroxidasas. Ejemplo: ciclooxigenasas, catalasa peroxisómica, triptófano dioxigenasa hepática, pirrolasas.
– Óxido nítrico-sintetasas (NOS).
– Guanilil-ciclasas solubles.
– Factores de transcripción: NPAS2/MOP4 ( <i>neuronal PAS domain protein 2/ member of the PAS superfamily 4</i> ).

En un individuo adulto sano, la población de hemoproteínas está compuesta por: 80% de hemoglobina, 4% de mioglobina, 15% de ferritina y hemosiderina y 1% de otras hemoproteínas.

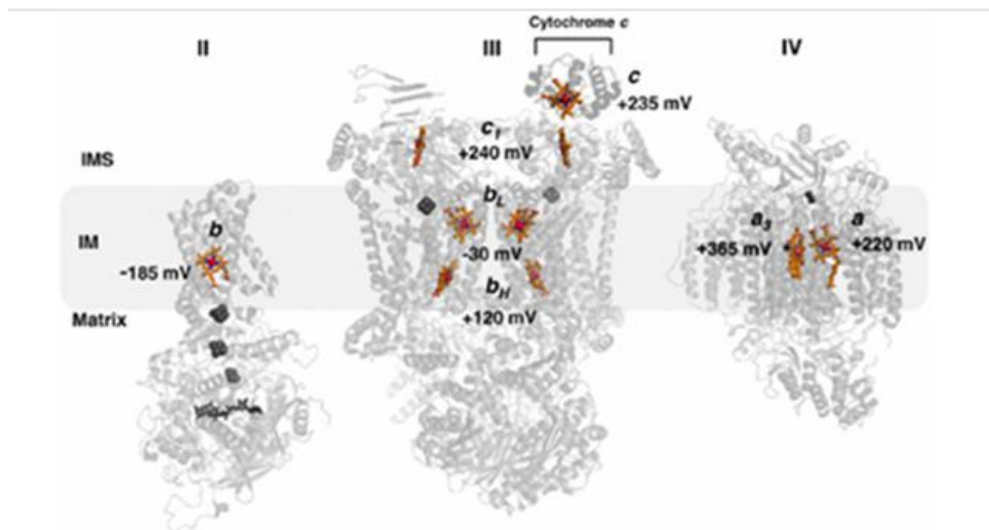


De las funciones mencionadas anteriormente que cumple el hemo como grupo prostético de numerosas proteínas, la participación en el transporte de electrones (Gray & Winkler, 1996) es de gran importancia en los mecanismos asociados con la fuerza impulsora de la fosforilación oxidativa. En células eucariotas, existen 7 hemos de estructura diferente de los cuales los hemos a, b y c (Figura II.4) están embebidos en las proteínas de la cadena de transporte de electrones, y son reducidos y oxidados aumentando los potenciales de reducción para transferir los electrones que van a reducir el oxígeno (Figura II.5).



**FIGURA II.4: ESTRUCTURA DE LOS HEMOS A, B Y C**

Estos pigmentos celulares o citocromos dan lugar a espectros de absorción característicos para el hemo b del Complejo II; hemo b del Complejo III, hemo a del Complejo IV y hemo c del Complejo III y el mediador de electrones, citocromo c. El Complejo I contiene flavina y hierro-azufre como cofactores pero no posee grupos hemo (Kim *et al.*, 2015).



**FIGURA II.5: DISTRIBUCIÓN DE LOS HEMOS B, C Y A CON RESPECTO A LOS COMPLEJOS II, III Y IV EN LA MITOCONDRIA**

La función exacta del hemo b en el Complejo II no está clara mientras que los 2 hemo b del Complejo III participan en la bifurcación del flujo de electrones para la oxidación del ubiquinol. En cuanto al hemo c de la Cox, citocromo 1, está involucrado en la transferencia de electrones al citocromo c. El único hemo a<sub>3</sub>, con el Cu<sub>B</sub>, forma el sitio catalítico del Complejo IV que une y reduce el oxígeno. Además los hemo tienen un rol importante en el ensamblaje entre los Complejos que en su ausencia no puede ocurrir. En el Complejo III, la unión covalente del hemo al apo-citocromo 1 es un prerrequisito para que este Complejo se ensamble y en el Complejo IV, el hemo es requerido para el plegamiento correcto de la subunidad Cox I.

### II.3. PORFIRIAS

Las Porfirias son un grupo de trastornos metabólicos hereditarios o adquiridos de la biosíntesis del hemo en que los patrones específicos de sobreproducción de precursores están asociados con características clínicas particulares. Cada tipo de Porfiria es el resultado de una disminución específica parcial primaria en la actividad de una de las enzimas de la vía del hemo. Como resultado de esta falla primaria, una deficiencia del producto final hemo produce un aumento secundario de la actividad del ALA-S. La sintomatología de la enfermedad está asociada con la acumulación de los precursores (ALA y PBG) y/o intermediarios (porfirinógenos) del camino biosintético del hemo.

En la [Tabla II.2](#) se mencionan los distintos tipos de Porfiria, su clasificación, la enzima afectada y la forma en que se heredan (Rossetti *et al.*, 2016).

Existen ocho tipos principales de Porfiria, que se clasifican según las características clínicas principales en cutáneas, agudas o mixtas; y según el órgano primariamente afectado en hepáticas, eritropoyéticas o hepatoeritropoyéticas.

Las Porfirias Agudas se caracterizan por la presencia de severos ataques con dolor abdominal agudo y un síndrome neurológico psíquico con ataques intermitentes; en particular, los síntomas más comunes son dolores abdominales y gastrointestinales, hipertensión, taquicardia y diferentes manifestaciones que involucran disfunciones del sistema nervioso central (SNC), periférico (SNP) y autónomo, como consecuencia de la acumulación de precursores, especialmente de ALA que se comporta como una neurotoxina. Las Porfirias Cutáneas presentan manifestación cutánea principalmente en zonas expuestas debida a la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) por acción

de la luz sobre las porfirinas acumuladas, cuya severidad depende, entre otros factores, del tipo de porfirina en exceso.

**TABLA II.2: CLASIFICACIÓN Y ASPECTOS GENERALES DE LAS PORFIRIAS**

Porfiria	Enzima afectada	Locus	Modo de herencia	Clasificación	Características
NPA	ALA-D	9q33.1	Autosómica recesiva	Hepática/aguda	Muy rara. Ataques agudos o neuropatía crónica.
PAI	PBG-D	11q23.3	Autosómica dominante	Hepática/aguda	Muy común. Ataques agudos.
PCE	Isomerasa	10q25.3-q26.3	Autosómica recesiva	Eritropoyética/cutánea	Severa fotosensibilidad y hemólisis.
PCT	URO-D	1p34	Autosómica dominante/adquirida	Hepática/cutánea	Muy frecuente. Fragilidad cutánea y enfermedad hepática crónica.
PHE	URO-D	1p34	Autosómica recesiva	Hepatoeritropoyética/cutánea	Variante homocigota de la PCT. Fotosensibilidad aumentada.
CPH	CPO	3q11.2-q12.1	Autosómica dominante	Hepática/mixta	Rara. Ataques agudos y/o fragilidad cutánea.
PV	PPOX	1q22-23	Autosómica dominante	Hepática/mixta	Ataques agudos y/o fragilidad cutánea.
PPE	FECH	18q21.3	Autosómica dominante	Eritropoyética/cutánea	Fotosensibilidad y en el 5% de los casos daño hepático.

NPA: Nueva Porfiria Aguda, PAI: Porfiria Aguda Intermitente, PCE: Porfiria Congénita Eritropoyética, PCT: Porfiria Cutánea Tardía, PHE: Porfiria Hepatoeritropoyética, CPH: Coproporfiria Hereditaria, PV: Porfiria Variegata, PPE: Protoporfiria Eritropoyética. ALA-D: 5-Aminolevúlico dehidrasa, PBG-D: Porfobilinógeno deaminasa, UROGEN III-S: Uroporfirinógeno III sintetasa, URO-D; Uroporfirinógeno decarboxilasa, CPGasa: Coproporfirinógeno oxidasa, PPOX: Prototoporfirinógeno oxidasa, FECH: Ferroquelatasa.

Las Porfirias pueden ser hereditarias o adquiridas. Las alteraciones deficitarias de cada sistema enzimático obedecen a mutaciones en diversos cromosomas (Moore, 1993; Schüller & Salamanca, 2000; Nordmann & Puy, 2002; Parera *et al.*, 2003; Kauppinen, 2005; Rossetti *et al.*, 2016).

Las drogas son los desencadenantes más comunes; entre otros factores que pueden provocar una crisis se encuentran el ayuno, la dieta, infecciones o intoxicaciones diversas.

La prevalencia de las Porfirias varía desde 0.5 a 10 por 100.000 habitantes, en diferentes poblaciones.

### II.3.1. PORFIRIA AGUDA INTERMITENTE

La Porfiria Aguda Intermitente (PAI, MIM # 176000) pertenece al tipo de Porfiria que presenta manifestaciones agudas. Es la más común de las Porfirias agudas. La prevalencia en la población argentina es de 1:125.000 (Parera *et al.*, 2003), mientras que en Europa en general es de 5,9:1.000.000 (Elder *et al.*, 2013), a excepción del norte de Suecia donde aumenta a 1:1000 y a 1:50 en la villa de Arjeplog (Thunell *et al.*, 2006).

En la población argentina la enfermedad es más frecuente en mujeres que en hombres (7:3), un 60% de los pacientes son portadores latentes, 15% de los pacientes con PAI sintomática murieron durante la crisis aguda, el porcentaje de recurrencia de los ataques agudos es del 81% (De Siervi *et al.*, 2001; Cervino *et al.*, 2015; Rossetti *et al.*, 2016).

Esta Porfiria es consecuencia de una actividad disminuida de la enzima PBG-D (EC 2.5.161), la cual tiene reducida su actividad hasta un 50%. Esto provoca un aumento en la actividad del ALA-S, con un característico exceso de ALA y PBG en sangre y orina, y de porfirinas (uroporfirina) en orina (Battle, 1997; Schüller & Salamanca, 2000; Rossetti *et al.*, 2016), debido a que la PBG-D no puede convertir todo el PBG formado en hidroximetilbilano.

Clínicamente la enfermedad se caracteriza por un síndrome abdominal agudo y un síndrome neurológico psíquico con ataques neurológicos intermitentes; en particular los síntomas más comunes son dolores abdominales y gastrointestinales, hipertensión, taquicardia y diferentes manifestaciones del SNC (Battle, 1997; De Siervi *et al.*, 2001; Piñeiro Pauwels *et al.*, 2013; Rossetti *et al.*, 2016). La manifestación clínica ocurre generalmente, durante o después de la pubertad, siendo más frecuente en mujeres de edad fértil, entre los 20 y 40 años de edad, dada la influencia de los esteroides estrogénicos.

Los ataques agudos se precipitan por una amplia variedad de drogas, siendo las más usuales los barbituratos, estrógenos, progesterona, sulfonamidas, metildopa, danazol, diazepam, fenitoína, carbamazepina, sulfonilureas, cloramfenicol, tetraciclinas, algunos antihistamínicos y algunos anestésicos (<http://www.drugs-porphyrin.org>, <http://www.porphyrin-europe.com>). Además de los fármacos existen otros factores que podrían desencadenar esta Porfiria, como ser la ingestión de alcohol, la incorporación reducida de calorías durante las dietas para adelgazar, algunas infecciones, los tratamientos hormonales y el estrés.

Esta Porfiria se transmite con carácter autosómico dominante. Se han identificado miembros asintomáticos heterocigotas en las familias con uno o más individuos afectados.

La diferencia entre los individuos sintomáticos y asintomáticos es que en estos últimos se observan niveles urinarios de ALA y PBG normales y su diagnóstico se basa en la determinación de los niveles de actividad de PBG-D en sangre. Las técnicas moleculares para identificar las mutaciones en el gen de la PBG-D constituyen una alternativa importante para realizar un diagnóstico preciso en los familiares PAI asintomáticos (De Siervi *et al.*, 2001).

Hasta el momento se han identificado alrededor de 350 mutaciones diferentes en el gen que codifica para la PBG-D (Human Gene Mutation Database: <http://www.hgmd.org>); la mayoría de estas mutaciones son “privadas” o se han detectado en unas pocas familias, lo cual indica la heterogeneidad molecular de la PAI. En 96 pacientes argentinos no relacionados estudiados genéticamente, se han hallado en el gen de la PBG-D 18 mutaciones nuevas y 18 previamente descritas. Entre las mutaciones nuevas se han encontrado: 4 mutaciones puntuales que producen cambio de aminoácido, 3 mutaciones puntuales en sitios donores de “splicing”, 3 mutaciones puntuales en sitios aceptores de “splicing”, 7 deleciones y 1 inserción y una duplicación (Parera *et al.*, 2003; Rossetti *et al.*, 2016). La mutación nueva G111R se detectó en 55 familias no relacionadas. Piñeiro Pauwels *et al.* (2013) describieron un tipo de PAI homocigota dominante en la cual se observó que la actividad de la PBG-D estaba también reducida al 50% pero el análisis genético indicó la presencia de 2 variantes en el gen de la PBG-D: p.G111R y p.E258G.

### **II.3.2. NEUROPATÍA PORFÍRICA**

La neuropatía porfírica es una combinación entre la neuropatía autonómica y neuropatía periférica. El dolor abdominal que acompaña al ataque agudo reflejaría una neuropatía autonómica. La neuropatía periférica, que puede ser severa, se produce luego del desencadenamiento del dolor abdominal, las anormalidades psiquiátricas y otras manifestaciones del SNC (Albers & Fink, 2004).

El deterioro del SNC puede provocar convulsiones y confusión, mientras que el progreso de la neuropatía sensomotora, puede llevar a una parálisis respiratoria. Como consecuencia de la neuropatía pueden presentarse arritmias que preceden a un deterioro cardíaco (Batlle, 1997)

En la actualidad existen tres teorías ampliamente aceptadas para explicar las causas de la neuropatía porfírica. Una de ellas tiene que ver con la neurotoxicidad de los precursores de las porfirinas, entre los cuales, el ALA estaría más implicado que el PBG, ya

que las crisis neuroviscerales ocurren también cuando se produce una deficiencia en la enzima ALA-D y en este caso la concentración de PBG no está elevada. Además se ha sugerido que el ALA inhibe competitivamente la unión del ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) (Brennan *et al.*, 1980). Sin embargo, muchos pacientes con PAI excretan altos niveles de ALA y PBG sin presentar síntomas (Herrick & McColl, 2005).

La otra teoría para explicar la neurotoxicidad está ligada a la deficiencia de hemo que causaría en el tejido neural una deficiencia de hemoproteínas como el citocromo P450 (CYP) y la NOS, las cuales son necesarias para la óptima función neuronal (Herrick & McColl, 2005).

Finalmente la teoría más novedosa propuesta por Homedan *et al.* (2014) postula que la inducción de ALA-S, causada por el fenobarbital produciría un desbalance en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, debido a un aumento en la utilización de succinil-CoA, sustrato del ALA-S; como consecuencia de ello disminuirían los cofactores reducidos necesarios para el transporte de electrones en las reacciones de la cadena respiratoria.

El ALA se acumula en los tejidos, y además puede cruzar la barrera hematoencefálica, causando daño en el SNC y neuropatía periférica. La neurotoxicidad del ALA involucra efectos deletéreos de ROS, entre los cuales se incluye la inhibición ligando-receptor del GABA (Brennan *et al.*, 1980). Alteraciones similares provocadas por los radicales libres generados por la autooxidación del ALA, podrían producirse en el SNP donde el ALA podría acumularse en una mayor concentración dado que no posee barrera hematoencefálica (Ryter & Tyrrell, 2000).

Estudios *in vitro* e *in vivo* demostraron que el ALA produce alquilación de bases y daño oxidativo del ADN (Onuki *et al.*, 1994; Bechara, 1996; Douki *et al.*, 1998). En mitocondrias aisladas se observó daño oxidativo asociado a la liberación de  $Ca^{++}$  de la membrana interna de la matriz mitocondrial (Hermes-Lima *et al.*, 1991; Hermes-Lima, 1995). Además, el ALA puede afectar el metabolismo intracelular del hierro por activación de la proteína reguladora del hierro (IRP-I), incrementando la síntesis del receptor de transferrina y reprimiendo la síntesis de ferritina y del ALA-S eritroidea (Carvalho *et al.*, 1997; Ryter & Tyrrell, 2000).

La administración de ALA en forma aguda o crónica produjo inducción de la actividad y expresión de HO en encéfalo de ratón, además de disminuir la expresión del ALA-S (Lavandera *et al.*, 2016). Además, el ALA alteró el sistema colinérgico y glutamérgico, el sistema de defensa antioxidante en encéfalo y el metabolismo del NO (Rodríguez, 2008; Lavandera, 2008). Los resultados de estos trabajos corroboraron el hecho de que el ALA podría atravesar la barrera hematoencefálica y acumularse en el SNC, lo cual sería una de

las causas de la neurotoxicidad observada en las Porfirias agudas (García *et al.*, 1998; Ennis *et al.*, 2003; Lavandera *et al.*, 2016).

Rodríguez *et al.* (2002) demostraron que la administración de drogas porfirinogénicas a ratones, causa una alteración en el sistema colinérgico de encéfalo. Los cambios observados en la actividad de Butirilcolinesterasa sugieren que se estarían produciendo importantes modificaciones bioquímicas en el SNC como consecuencia de los distintos tratamientos. Estos autores, también observaron alteraciones en los niveles y en la afinidad del receptor de acetilcolina muscarínico. El encéfalo, en comparación con otros órganos, tiene desventajas frente a la detoxificación de ROS ya que se produce un aumento de la fosforilación oxidativa y presenta baja actividad de las enzimas detoxificantes. Al estudiar el efecto de los agentes porfirinogénicos sobre marcadores de estrés oxidativo en el encéfalo, se observó que algunos de los agentes porfirinogénicos estudiados producían un estado de estrés oxidativo, que podría ser uno de los factores que conducen a la neuropatía porfírica (Rodríguez *et al.*, 2005).

Lavandera *et al.* (2007, 2015) describieron alteraciones en el sistema metabolizante de drogas en encéfalo y en particular en los CYP mitocondriales frente a la administración de diferentes drogas porfirinogénicas, que podrían deberse a un efecto directo sobre el sistema de metabolización de Fase I, o indirecto debido a alteraciones producidas por alguno de los agentes porfirinogénicos sobre la actividad y la expresión de ALA-S y/o HO, (Rodríguez *et al.*, 2008). También observaron modificaciones en el sistema glutamatergico (Lavandera *et al.*, 2009) y en el metabolismo del óxido nítrico (Lavandera *et al.*, 2011).

## **2.4. PORFIRIAS EXPERIMENTALES. MODELOS FARMACOLÓGICOS DE PORFIRIA AGUDA INTERMITENTE**

Se definen como Porfirias Experimentales las provocadas por xenobióticos en animales o cultivos de células aisladas, con el fin de conocer la etiopatogenia, los mecanismos alternativos tisulares, la fisiopatología, los rasgos clínico-bioquímicos y la posible prevención y terapéutica de las Porfirias. La Porfiria Experimental cobró un gran impulso a mediados del siglo pasado (Schmid *et al.*, 1954) cuando se observó que la administración de Sedormid durante varios días consecutivos a conejos normales producía un gran incremento en la excreción urinaria de PBG y uroporfirinas y su acumulación en el hígado; sin embargo, sus concentraciones en sangre y médula ósea eran normales. El cuadro era compatible con el de una Porfiria hepática, similar al de la PAI. A estos

importantes hallazgos siguió un periodo de intensa investigación que alcanzó su máximo esplendor con el descubrimiento del papel jugado por el ALA-S en la inducción de una Porfiria hepática por ciertas drogas (Granick & Urata, 1963). Hoy se conoce una extensa lista de estas drogas porfirinogénicas, que son capaces de provocar una Porfiria aún en ausencia de una predisposición genética, produciendo anormalidades metabólicas similares a las observadas durante el ataque agudo de las porfirias hereditarias humanas (Batlle, 1997; Schüller & Salamanca, 2000; Rossetti *et al*, 2016).

Los efectos producidos por los compuestos porfirinogénicos se observan tanto en individuos con Porfiria como en individuos normales, aunque en estos últimos la inducción de una manifestación porfirica requiere la administración de dosis mucho más elevadas del compuesto porfirinogénico. Este fenómeno de inducción por drogas también puede observarse en animales de experimentación así como en determinados tipos de cultivos de tejidos (Batlle, 1997).

Todos los compuestos porfirinogénicos tienen en común la propiedad de estimular marcadamente la actividad del ALA-S hepática, además de disminuir el contenido de hemo hepático, ya sea por inhibición de sus síntesis o acelerando su degradación (De Matteis, 1971; Batlle, 1997).

Se considera que el hemo regulador es un “pool” de hemo relativamente pequeño y de velocidad de recambio rápida, dentro del cual se mantiene el hemo sintetizado recientemente y fuera de él, el hemo deriva hacia la síntesis de hemoproteínas o se degrada a pigmentos biliares. En condiciones en las cuales la concentración hepática de hemo disminuye, estos mecanismos no actúan y la cantidad y actividad de ALA-S aumenta. Este desequilibrio puede producirse por dos mecanismos: 1) un defecto en la actividad de alguna de las enzimas que producirá un bloqueo parcial en la biosíntesis del hemo, 2) un aumento en la utilización o degradación del hemo hepático, que estimulará la actividad del ALA-S, de forma tal que la síntesis de precursores excederá la actividad de las siguientes enzimas de la secuencia, aun cuando todas ellas fueran normales. De estos mecanismos porfirinogénicos, el más importante es el que resulta de un bloqueo parcial en la biosíntesis del hemo (Herrick & McColl, 2005).

A continuación se describen las características principales y el mecanismo de acción de los agentes estudiados en esta Tesis.

En la [Figura II.6](#) se señalan los sitios de acción de los compuestos porfirinogénicos utilizados en esta Tesis.



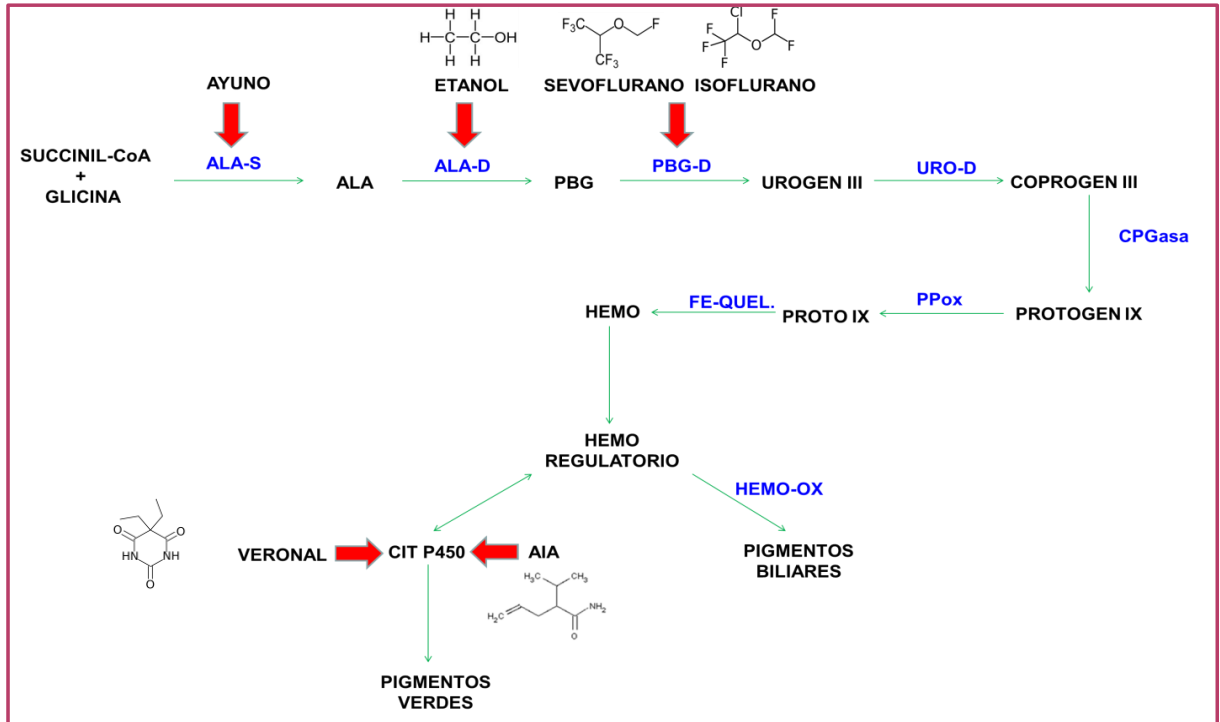


FIGURA II.6: SITIOS DE ACCIÓN DE LOS COMPUESTOS PORFIRINOGENICOS

### II.4.1. ANESTÉSICOS VOLÁTILES

El Isoflurano (1-cloro-2,2,2-trifluoroetil difluorometil éter) y el Sevoflurano (fluorometil 2,2,2-trifluoro-1 [trifluorometil]etil éter) son anestésicos volátiles que se utilizan para producir anestesia general (Quail, 1989; Behne *et al.*, 1999) (Figura II.7).

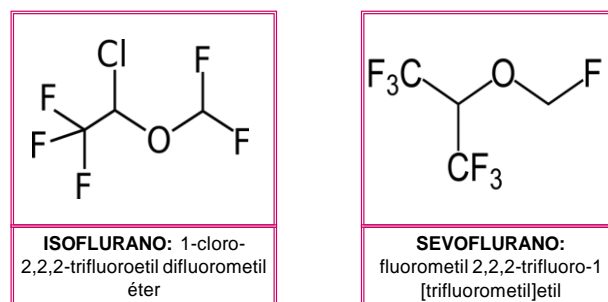


FIGURA II.7: ESTRUCTURA QUÍMICA DE LOS ANESTÉSICOS ISOFLURANO Y SEVOFLURANO

El Sevoflurano es un líquido volátil, incoloro, y con un olor agradable. La característica farmacocinética más importante del Sevoflurano es su bajo coeficiente de

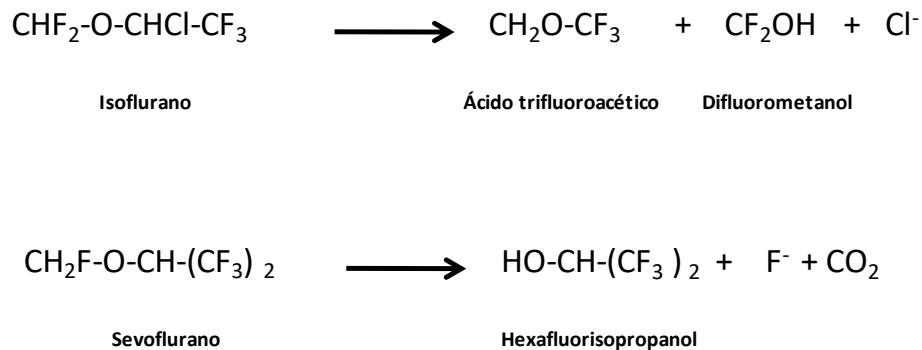
solubilidad en sangre (coeficiente sangre/gas 0,60), que permite obtener una rápida inducción y recuperación de la anestesia.

La toxicidad hepática y renal de los anestésicos volátiles éteres fluorados se produce por su biotransformación mediada por el CYP a metabolitos tóxicos, siendo el CYP2E1 la isoforma responsable del metabolismo de estos compuestos en humanos (Kharasch & Thummel, 1993).

El Isoflurano es metabolizado por vía oxidativa produciendo ácido trifluoroacético y difluorometanol que se hidrolizan para dar ácido fórmico y flúor inorgánico, siendo la tasa de biotransformación de sólo 0,1-2% del anestésico absorbido (Figura II.8).

La tasa de biotransformación del Sevoflurano es del 2-5%, mediante el metabolismo oxidativo se tiene una molécula llamada hexafluoroisopropanol que luego pasa a la Fase II del metabolismo y se conjuga con ácido glucurónico; se obtiene además flúor inorgánico (Figura II.8).

Como el resto de los anestésicos inhalatorios, el Sevoflurano actúa en múltiples lugares de la membrana e incluso en el citosol celular. A nivel de la membrana, aparte de un efecto sobre los lípidos y las proteínas, se han descrito efectos sobre los receptores GABA, canales de sodio, receptores nicotínicos y canales de calcio.



**FIGURA II.8: METABOLISMO DEL ISOFLURANO Y SEVOFLURANO**

En nuestro laboratorio demostramos que los anestésicos Enflurano e Isoflurano modifican la actividad de algunas enzimas del metabolismo del hemo, reproduciendo algunos de los signos bioquímicos de la PAI (Buzaleh *et al.*, 1997); efecto dependiente de la cepa y el sexo (Buzaleh & Batlle, 1996). El Sevoflurano causó alteraciones similares (Sampayo *et al.*, 2009). Los resultados indicaron que el uso de estos anestésicos no sólo

debe evitarse en el caso de Porfirias agudas sino que también deben utilizarse con precaución en pacientes con Porfirias hepáticas no agudas (Buzaleh *et al.*, 2004, 2009, 2013).

## II.4.2. ETANOL

En la [Figura II.9](#) se muestran las rutas principales de la oxidación del etanol. Tanto la Alcohol Deshidrogenasa (ADH) como la Aldehído Deshidrogenasa (ALDH) transfieren el hidrógeno a un aceptor NAD, que se convierte en NADH. La vía microsomal mediante la isoforma CYP2E1 se induce participando en el metabolismo del etanol. La Catalasa en condiciones de una ingesta prolongada de etanol, podría catalizar en presencia de peróxido de hidrógeno la oxidación del etanol a acetaldehído. El acetato, producto final, es metabolizado en otros tejidos, y en el propio hígado, a Acetil-CoA que entra a la vía de los ácidos tricarboxílicos. El acetaldehído es un metabolito muy reactivo, siendo considerado responsable de muchas de las acciones tóxicas secundarias al consumo de etanol (Fortea *et al.*, 1999).

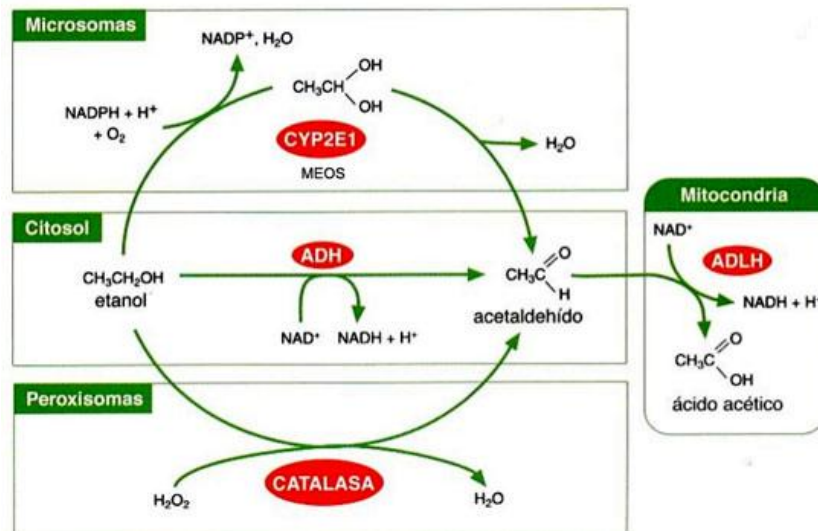


FIGURA II.9: METABOLISMO DEL ETANOL

La interacción clínica-bioquímica entre el alcohol y la biosíntesis del hemo involucra tres aspectos principales: inhibición y estímulo de algunas de las enzimas del camino biosintético del hemo; desencadenamiento de las manifestaciones bioquímicas y clínicas de las Porfirias agudas y/o Cutáneas, y desarrollo de coproporfirinurias y protoporfirinemias secundarias (Doss *et al.*, 2000).

El efecto metabólico del alcohol sobre las enzimas de la biosíntesis del hemo es muy complejo; se ha demostrado que el etanol actuaría en forma diferencial dependiendo de la dosis y el tiempo de intoxicación, activando el ALA-S y la PBG-D o inhibiendo el ALA-D, URO-D, CPGasa y Fe-Quel (Batlle *et al.*, 1979; Paredes *et al.*, 1987; Sieg *et al.*, 1991; Doss *et al.*, 2000).

La toxicidad del acetaldehído, metabolito producido a partir de etanol, podría disminuir la concentración de glutatión en el hígado, lo que contribuiría a la inhibición del ALA-D (Paredes *et al.*, 1987; Sieg *et al.*, 1991).

Por otro lado, la inducción del CYP2E1 puede desregular la biosíntesis del hemo dado que se necesita más hemo para la síntesis de esta hemoproteína.

### II.4.3. ALILISOPROPILACETAMIDA

El alilisopropilacetamida (AIA) actúa destruyendo el CYP mediante una reacción de inactivación suicida en la que el grupo hemo del CYP es el iniciador y blanco de la respuesta a este xenobiotico (Ortiz de Montellano *et al.*, 1987) (Figura II.10).

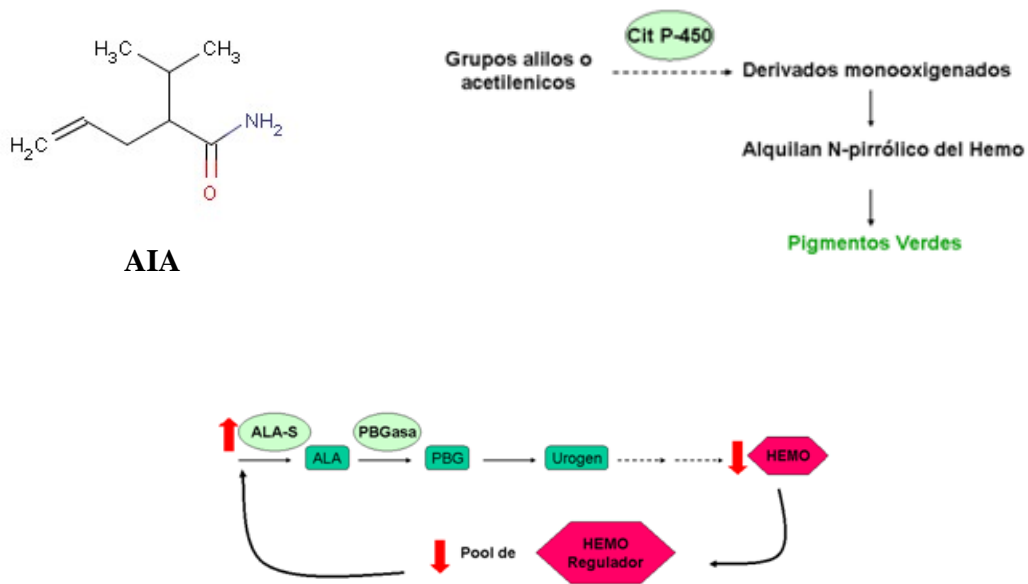


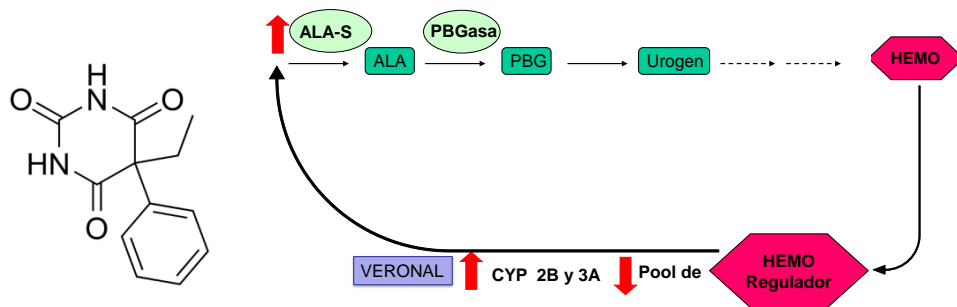
FIGURA II.10: MECANISMO DE ACCIÓN DEL AIA

El AIA produce en ratas, ratones y conejos una importante inducción del ALA-S hepática, aunque no se observa disminución en la actividad de la PBG-D en dicho tejido (Batlle, 1997), enzima disminuida en humanos con este tipo de Porfiria.

La combinación de AIA y glicerina reprodujo en ratones tanto los signos bioquímicos como clínicos observados en la PAI humana, sin embargo éste no resultó ser un buen modelo experimental para esta Porfiria ya que los animales morían luego de 1 hora (Polo *et al.*, 1987).

#### 2.4.4. VERONAL

El veronal (Barbital) (Figura II.11) es un derivado del ácido barbitúrico, ácido 5,5-dietilbarbitúrico y como tal es utilizado como hipnótico, sedante, anestésico y anticonvulsivante.



**FIGURA II.11: ESTRUCTURA DEL VERONAL Y EFECTO SOBRE LA EXPRESIÓN DE ALA-S.**

Este xenobiótico induce la síntesis de CYP específicos de las familias 2B y 3A en varios tejidos. La inducción de CYP2B y CYP3A es mediada por receptores androstano constitutivo (CAR) y pregnano X (PXR) (Handschin & Meyer, 2003).

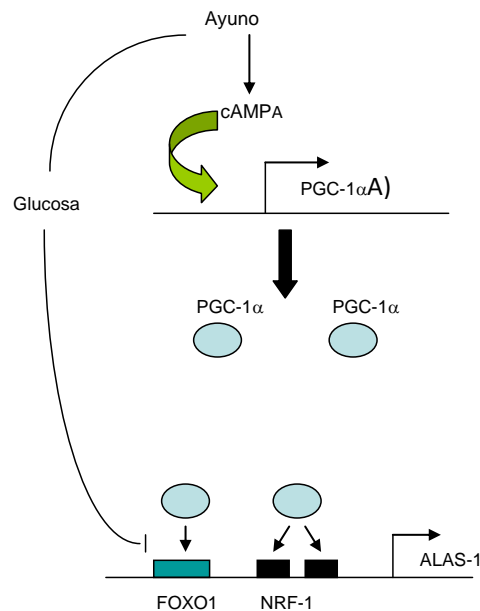
El aumento en la expresión de CYP en hígado provoca un aumento en la utilización del pool de hemo, y como consecuencia se estimula la actividad de ALA-S, acumulándose ALA (Rossetti *et al.*, 2016) (Figura II.11).

#### II.4.5. AYUNO

Los ataques agudos en pacientes que tienen algún tipo de Porfiria aguda son precipitados por el ayuno (Batlle, 1997; Thadani *et al.*, 2000).

En condiciones de ayuno se incrementa el nivel del receptor activado de proliferación de peroxisoma (PGC-1 $\alpha$ ) el cual es un coactivador transcripcional que controla muchos procesos metabólicos como la biogénesis mitocondrial, la fosforilación oxidativa y la

termogénesis adaptativa (Yoon *et al.*, 2001). Este coactivador regula la expresión de una gran cantidad de genes, incluyendo la expresión del ALA-S1. El PGC-1 $\alpha$  actúa como coactivador de NRF-1 y FOXO1, los cuales son factores de transcripción que se unen directamente al promotor del ALA-S1 (Figura II.12) (Handschin *et al.*, 2003, 2005).



**FIGURA II.12: EFECTO DEL AYUNO SOBRE LA EXPRESIÓN DE ALA-S.**

## II.5. MODELO GENÉTICO DE PORFIRIA AGUDA INTERMITENTE

Si bien ha habido un progreso considerable para entender los efectos que las mutaciones sobre la PBG-D producen a nivel estructural y funcional, todavía la neurotoxicología de la PAI y su precipitación por drogas sigue sin comprenderse. Para estudiar la patogénesis de los síntomas neurológicos, el grupo del Dr. Meyer (Lindberg *et al.*, 1996) desarrollaron un modelo genético murino deficiente en la actividad de la enzima PBG-D. En la creación de este modelo se generaron tres cepas de ratón T1, T2 y T3. En la cepa T3 se inactiva uno de los alelos por la inserción de un gen de neomina en el tercer exón del gen de PBG-D. Como resultado se obtiene una actividad enzimática del 51%, lo que indica que el alelo "wildtype" no se estaría sobreexpresando para compensar la disminución de la actividad. Sin embargo, esta cepa no mostraba una excreción aumentada de ALA en orina luego del tratamiento con fenobarbital. Debido a que la PBG-D es esencial para la

biosíntesis de hemo y el hemo es requerido por todas las células aeróbicas, los animales homocigotas para esta mutación no eran viables.

Es por esto que se procedió a generar dos cepas adicionales, T1 y T2 en las cuales la deficiencia de PBG-D sería parcial y un doble heterocigota sería viable. Para generar la cepa T1 los autores realizaron la inserción del gen de neomicina bajo el control transcripcional del promotor de la fosfoglicerato kinasa (PGK) en el primer exón de la PBG-D (Lindberg *et al.*, 1996). Como resultado se inactivó la PBG-D "housekeeping". La actividad enzimática hepática de los ratones homocigotas T1(-/-) desciende al 55,3% de los niveles normales.

Para generar la cepa T2, los autores colocaron una secuencia de "splicing" alternativo delante del gen de neomicina en el primer intrón del gen de la PBG-D. Este sitio de "splicing" alternativo compite con el sitio de *splicing* normal en el exón 3 y así causa una inactivación parcial de la PBG-D hepática. La actividad de la PBG-D hepática en los ratones T2(+/-) decae al 56,6% indicando que el proceso de *splicing* prefiere el sitio artificial. Los ratones T2(-/-) no fueron viables, lo que sugiere que estos animales poseen un tipo de daño más severo que los T1(-/-). Como esta cepa tampoco mostró signos bioquímicos de la enfermedad se procedió a cruzar las cepas T1(-/-) y T2(+/-) para disminuir aun más la actividad enzimática. Los ratones dobles heterocigotas T1/T2(-/-) muestran los típicos signos clínicos de la PAI humana luego del tratamiento con drogas como fenobarbital: una notable caída en la actividad de la PBG-D, un aumento de la actividad de ALA-S y una excreción masiva del precursor del Hemo, ALA, en orina. Ensayos de comportamiento han evidenciado una disminución en la función motora y estudios histopatológicos mostraron la existencia de neuropatía y atrofia muscular neurológica (Lindberg *et al.*, 1996).

## II.6. REFERENCIAS

- Abraham N.G., Kappas A. (2008) Pharmacological and clinical aspects of heme oxygenase. *Pharmacol Rev* 60(1):79-127.
- Albers J.W., Fink J.K. (2004) Porphyric neuropathy. *Muscle Nerve* 30(4):410-242.
- Andrews N.C. (2005) Understanding heme transport. *N Engl J Med* 353(23):2508-2509.
- Batlle A.M. del C. (1997) Porfirias y Porfirinas. Aspectos clínicos, bioquímicos y biología molecular. *Sem.: Actualizaciones Médico-Bioquímicas. Acta Bioquím Clin Latinoamer Sup* 3.
- Batlle A.M., De Xifra E.A., Stella A.M., Bustos N., With T.K. (1979) Studies on porphyrin biosynthesis and enzymes involved in bovine congenital erythropoietic porphyria. *Clin Sci* 57:63-70.
- Bechara E.J. (1996) Oxidative stress in acute intermittent porphyria and lead poisoning may be triggered by 5-aminolevulinic acid. *Braz J Med Biol Res* 29(7):841-51.

- Behne M., Wilke H.J., Harder S. (1999) Clinical pharmacokinetics of sevoflurane. *Clin Pharmacokinet* 36(1):13-26.
- Brennan M.J., Cantrill R.C., Kramer S. (1980) Effect of delta-aminolaevulinic acid on GABA receptor binding in synaptic plasma membranes. *Int J Biochem* 12(5-6):833-835.
- Buzaleh A.M., Batlle A. (1996) Strain and sex differences in the effect of enflurane and isoflurane on heme metabolism in mice. *Gen Pharmac* 27:1009-1012.
- Buzaleh A.M., Vazquez E., Enriquez de Salamanca R., Batlle A. (1997) An overview on Anesthesia and Porphyrias (Review). *Endocrinol Metab* 4:267-279.
- Buzaleh A.M., García Bravo M., Navarro S., Moran Jimenez M.J., Méndez M., Batlle A., Fontanellas A., Enríquez de Salamanca R. (2004) Volatile anaesthetics induce biochemical alterations in the heme pathway in a B-lymphocyte cell line established from hepatoerythropoietic porphyria patients (LBHEP) & in mice inoculated with LBHEP cells. *Int J Biochem Cell Biol* 36:216-222.
- Buzaleh A.M., Morán-Jiménez M.J., García-Bravo M., Sampedro A., Batlle A., Enríquez de Salamanca, R. Fontanellas A. (2009) Induction of hepatic aminolevulinic acid synthetase activity by isoflurane in a genetic model for erythropoietic protoporphyria. *Cell Mol Biol* 55(1):38-44.
- Buzaleh A.M., Moreno-Carralero M.I., Méndez M., Batlle A., Enríquez de Salamanca R., Morán-Jimenez M.J. (2013) Heme metabolism, oxidative and nitrosative markers in a mouse model of hemochromatosis. Effect of isoflurane, ethanol and 5-aminolevulinic acid. *J Pathol Res* 2:15-20.
- Carvalho H., Bechara E.J., Meneghini R., Demasi M. (1997) Haem precursor delta-aminolaevulinic acid induces activation of the cytosolic iron regulatory protein1. *Biochem J* 328(Pt 3):827-832.
- Cerbino G.N., Gerez E.N., Varela L.S., Melito V.A., Parera V.E., Batlle A., Rossetti M.V. (2015) Acute intermittent porphyria in Argentina: an update. *Biomed Res* 2015:946387. doi: 10.1155/2015/946387
- Chiabrando D., Vinchi F., Fiorito V., Mercurio S., Tolosano E. (2014) Heme in pathophysiology: a matter of scavenging, metabolism and trafficking across cell membranes. *Front Pharmacol* 5:61. doi: 10.3389/fphar.2014.00061
- De Matteis, F. (1971) Drugs and porphyria. *S Afr Med J* 25:126-133.
- De Siervi A., Varela L.S., Parera V.E., Batlle A.M., Rossetti M.V. (2001) Diagnosis of latent acute intermittent porphyria by genetic analysis. *Ann Clin Biochem* 38(Pt2):149-152.
- Doss M.O., Kühnel A., Gross U. (2000) Alcohol & porphyrin metabolism. *Alcohol & Alcohol* 35:109-125.
- Douki T., Onuki J., Medeiros M.H., Bechara E.J., Cadet J., Di Mascio P. (1998) DNA alkylation by 4,5-dioxovaleric acid, the final oxidation product of 5-aminolevulinic acid. *Chem Res Toxicol* 11(2):150-157.
- Elder G., Harper P., Badminton M., Sandberg S., Deybach J.C. (2013) The incidence of inherited porphyrias in Europe. *J Inherit Metab Dis* 36:849–857.
- Ennis S.R., Novotny A., Xiang J., Shakui P., Masada T., Stummer W., Smith D.E., Keep R.F. (2003) Transport of 5-aminolevulinic acid between blood and brain. *Brain Res* 959(2):226-234.



- Fortea Sanchis M., Badenes Cuevas J., Sanchis Arna M. A. (1999) Enzimas del metabolismo del etanol: su posible contribución a la predisposición genética del alcoholismo. *Adicciones* 11(2) 115-126.
- Furuyama K., Kaneko K., Vargas P. (2007) Heme as a magnificent molecule with multiple missions: heme determines its own fate and governs cellular homeostasis. *Tohoku J Exp Med* 213:1-16.
- García S., Moretti M., Garay M., Batlle A. (1998) Delta-aminolevulinic acid transport through blood-brain barrier. *Gen Pharmacol* 31:579-582.
- Granick S., Urata G. (1963) Increase in activity of alpha-aminolevulinic acid synthetase in liver mitochondria induced by feeding of 3,5-dicarbethoxy-1,4-dihydrocollidine. *J Biol Chem* 238:821-827.
- Gray H.B., Winkler J.R. (1996) Electron transfer in proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 65:537-561.
- Hamilton J., Bement W., Sinclair P., Sinclair J., Alcedo J., Wetterhahn K. (1991) Heme regulates hepatic 5-aminolevulinic acid synthase mRNA expression by decreasing mRNA half-life and not by altering its rate of transcription. *Arch Biochem Biophys* 289:387-392.
- Handschin C., Meyer U.A. (2003) Induction of drug metabolism: the role of nuclear receptors. *Pharmacol Rev* 55(4):649-673.
- Handschin C., Lin J., Rhee J., Peyer A.K., Chin S., Wu P.H., Meyer U.A., Spiegelman B.M. (2005) Nutritional regulation of hepatic heme biosynthesis and porphyria through PGC-1 alpha. *Cell* 122(4):505-515.
- Hermes-Lima M., Valle V.G., Vercesi A.E., Bechara E.J. (1991) Damage to rat liver mitochondria promoted by delta-aminolevulinic acid-generated reactive oxygen species: connections with acute intermittent porphyria and lead-poisoning. *Biochim Biophys Acta* 1056(1):57-63.
- Hermes-Lima M. (1995) How do Ca<sup>2+</sup> and 5-aminolevulinic acid-derived oxyradicals promote injury to isolated mitochondria? *Free Radic Biol Med* 19(3):381-390.
- Herrick A.L., McColl K.E.L. (2005) Acute intermittent porphyria. *Best Practice Res Clin Gastroenterol* 19:135-249.
- Homedan C., Laafia J., Schmitt C., Gueguen N., Lefebvre T., Karim Z., Desquirit-Dumas V., Wetterwald C., Deybach J.C., Gouyac L., Puy H., Reynier P., Malthiery Y. (2014) Acute intermittent porphyria causes hepatic mitochondrial energetic failure in a mouse model. *Int J Biochem Cell Biol* 51:93-101.
- Hou S., Reynolds M.F., Horrigan F.T., Heinemann S.H., Hoshi T. (2006) Reversible binding of heme to proteins in cellular signal transduction. *Acc Chem Res* 39(12):918-924.
- Immenschuh S., Vijayan V., Janciauskiene S., Gueller F. (2017) Heme as a Target for Therapeutic Interventions. *Front Pharmacol* 8:146.
- Kauppinen R. (2005) Porphyrias. *Lancet* 365(9455):241-252.
- Kim E., Rath E.M., Tsang V.H., Duff A.P., Robinson B.G., Church W.B., Benn D.E., Dwight T., Clifton-Bligh R.J. (2015) Structural and functional consequences of succinate dehydrogenase subunit B mutations. *Endocr Relat Cancer* 22(3):387-397

Kharasch E., Thummel K. (1993) Identification of cytochrome P-450 2E1 as the predominant enzyme catalyzing human liver microsomal defluorination of sevoflurane, isoflurane and methoxyflurane. *Anesthesiology* 79:795-807.

Krishnamurthy P., Ross D.D., Nakanishi T., Bailey-Dell K., Zhou S., Mercer K.E., Sarkadi B., Sorrentino B.P., Schuetz, J.D. (2004) The stem cell marker Bcrp/ABCG2 enhances hypoxic cell survival through interactions with heme. *J Biol Chem* 279(23):24218-24225.

Lavandera J.V., Batlle A.M., Buzaleh A.M. (2007) Metabolization of porphyrinogenic agents in brain: involvement of the phase I drug metabolizing system. A comparative study in liver and kidney. *Cell Mol Neurobiol* 27(6):717-729.

Lavandera J. (2008) Rol del citocromo P-450 en la metabolización de drogas porfirinogénicas en cerebro y su modulación por el óxido nítrico. Tesis Doctoral, Universidad de Buenos Aires.

Lavandera J., Fossatti, M., Azcurra J., Batlle A., Buzaleh A.M. (2009) Glutamatergic System: another target for the action of porphyrinogenic agents. *Cell Mol Biol* 55 (1):23-28.

Lavandera J., Batlle A., Buzaleh A.M. (2011) Mice brain nitric oxide synthase response induced by anaesthetics and other porphyrinogenic drugs system: another target for the action of porphyrinogenic agents. *Drug Metab Lett* 5:25-29.

Lavandera J., Ruspini S., Batlle A., Buzaleh A.M. (2015) Cytochrome P450 expression in mouse brain: specific isoenzymes involved in phase I metabolizing system of porphyrinogenic agents in both microsomes and mitochondria. *Biochem Cell Biol* 92:1-6.

Lavandera J., Rodríguez J., Ruspini S., Meiss R., Zuccoli J., Martínez M. del C., Gerez E., Batlle A., Buzaleh, A. M. (2016) Pleiotropic effects of 5-aminolevulinic acid in mice brain. *Biochem Cell Biol* 94(4):297-305.

Lindberg R.L., Porcher C., Grandchamp B., Ledermann B., Bürki K., Brandner S., Aguzzi A., Meyer U.A. (1996) Porphobilinogen deaminase deficiency in mice causes a neuropathy resembling that of human hepatic porphyria. *Nat Genet* 12(2):195-199.

Liu X., Gu R., Hu W., Sun Z., Wang G., Wang L., Xu Y. (2018) Upregulation of heme oxygenase-1 protected against brain damage induced by transient cerebral ischemia-reperfusion injury in rats. *Exp Ther Med* 15(6):4629-4636.

Maines M.D., Gibbs P.E. (2005) 30 some years of heme oxygenase: from a "molecular wrecking ball" to a "mesmerizing" trigger of cellular events. *Biochem Biophys Res Commun* 338:568-577.

Moore M.R. (1993) Biochemistry of porphyria. *Int J Biochem* 25(10):1353-1368.

Munakata H., Sun J., Yoshida K., Nakatani T., Honda E., Hayakawa S., Furuyama K., Hayashi N. (2004) Role of the heme regulatory motif in the heme-mediated inhibition of mitochondrial import of 5-aminolevulinic acid synthase. *J. Biochem (Tokyo)* 136:233-238.

Nordmann Y., Puy H. (2002) Human hereditary hepatic porphyrias. *Clin Chim Acta* 325(1-2):17-37.

Onuki J., Medeiros M.H., Bechara E.J., Di Mascio P. (1994) 5-Aminolevulinic acid induces single-strand breaks in plasmid pBR322 DNA in the presence of Fe<sup>2+</sup> ions. *Biochim Biophys Acta* 1225(3):259-263.

- Ortiz de Montellano P.R., Mico B.A., Yost G.S. (1987) Suicidal inactivation of cytochrome P450. Formation of heme-substrate covalent adduct. *Biochem Biophys Res Commun* 83: 132-137.
- Paredes S., Kozicki P., Fukuda H., Rossetti M., Batlle A. (1987) S-adenosyl-L- methionine: its effect on aminolevulinatase and glutathione in acute ethanol intoxication. *Alcohol* 4: 81-85.
- Parera V.E., De Siervi A., Varela L., Rossetti M.V., Batlle A.M. (2003) Acute porphyrias in the Argentinean population: a review. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*49(4):493-500.
- Piñeiro Pauwels M.B., Gerez E.N., Martinez M.C., Melito V.A., Parera V.E., Batlle A., Rossetti M.V. (2013) An odd case of heteroallelic acute intermittent porphyria in the Argentinean population. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 59 Suppl:OL1855-60.
- Podvinec M., Handschin C., Looser R., Meyer U. (2004) Identification of the xenosensors regulating human 5-aminolevulinatase synthase. *Proc Natl Acad Sci* 101:9127-9132.
- Polo C., Navone N., Afonso S., Buzaleh A.M., Schoua E., Vazquez E., Batlle A. (1987) Allylisopropilacetamide and glycerine reproduce clinical and biochemical manifestations of acute intermittent porphyria in mice. *Med Sci Res* 15:1335-1336.
- Quail A.W. (1989) Modern inhalational anaesthetic agents. A review of halothane, isoflurane and enflurane. *Med J Aust.* 150(2):95-102.
- Quigley J.G., Yang Z., Worthington M.T., Phillips J.D., Sabo K.M., Sabath D.E., Berg C.L., Sassa S., Wood B.L., Abkowitz J.L. (2004) Identification of a human heme exporter that is essential for erythropoiesis. *Cell* 118(6):757-766.
- Rodríguez, J. (2008) Estudios sobre la neuropatía de la porfiria aguda experimental. Tesis Doctoral. Universidad de Buenos Aires.
- Rodríguez J.L., Buzaleh A.M., Fossati M., Azcurra J., Batlle A.M. del C. (2002) The effects of some porphyrinogenic drugs on the brain cholinergic system. *Cell Mol Biol* 48(1):103-110.
- Rodríguez J., Martínez M. del C., Gerez E., Batlle A., Buzaleh A.M. (2005) Heme oxygenase, Aminolevulinatase and the antioxidant system in the brain of mice treated with porphyrinogenic drugs. *Cell Mol Biol* 51:487-494.
- Rossetti M.V., Buzaleh A.M., Parera V.E., Fukuda H., Lombardo M.E., Lavandera J., Gerez E.N., Melito V.A., Zuccoli J.R., Ruspini S.V., Puente V.R., Diez B.A., Teijo M.J., Cerbino G., Varela L.S., Guolo M.N., Batlle A. (2016) Metabolismo del Hemo: Las dos caras de los efectos de la acumulación de precursores y porfirinas. *Acta Bioquim Clin Latinoamer Libro de Oro* 50 (4): 547-573.
- Ryter S.W., Tyrrell R.M. (2000) The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity. Heme oxygenase has both pro- and antioxidant properties. *Free Radic Biol Med* 28(2):289-309.
- Ryter S.W., Choi A.M. (2016) Targeting heme oxygenase-1 and carbon monoxide for therapeutic modulation of inflammation. *Transl Res* 167(1):7-34.
- Sampayo R., Lavandera J., Batlle A., Buzaleh A.M. (2009) Sevoflurane: its action on heme metabolism and Phase I drug metabolizing system. *Cell Mol Biol* 55 (2):134-140.
- Sassa S., Granick S. (1970) Induction of delta-aminolevulinic acid synthetase in chick embryo liver cells in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 67(2):517-522.

- Schüller A., Salamanca R. (2000) *Metabolismo de las Porphirinas y Porfirias*. Ed. Complutense, Madrid.
- Shayeghi M., Latunde-Dada G.O., Oakhill J.S., Laftah A.H., Takeuchi K., Halliday N., Khan Y., Warley A., McCann F.E., Hider R.C., Frazer D.M., Anderson G.J., Vulpe C.D., Simpson R.J., McKie, A.T. (2005) Identification of an intestinal heme transporter. *Cell* 122(5):789-801.
- Sieg I., Doss M.O., Kandels, H., Schneider J. (1991) Effect of alcohol on delta-aminolevulinic acid dehydratase and porphyrin metabolism in man. *Clin Chim Acta* 202: 211-208.
- Schmid R., Schwartz S., Watson C.J. (1954) Porphyrin content of bone marrow and liver in the various forms of porphyria. *AMA Arch Intern Med* 93(2):167-90.
- Taketani S. (2005) Acquisition, mobilization and utilization of cellular iron and heme: endless findings and growing evidence of tight regulation. *Tohoku J Exp Med* 205:297-318.
- Thadani H., Deacon A., Peters T. (2000) Diagnosis and management of porphyria. *BMJ* 320(7250):1647-1651.
- Thunell S., Floderus Y., Henrichson A., Harper P. (2006) Porphyria in Sweden. *Physiol Res* 55 (Suppl. 2): S109-S118.
- Tomaro M.L., Batlle A.M. del C. (2002) Bilirubin: its role in cytoprotection against oxidative stress. *Int J Biochem Cell Biol* 34:216-220.
- Tsiftoglou A.S., Tsamadou I.A., Papadopoulou C.L. (2006) Heme as key regulator of major mammalian cellular functions: Molecular, cellular, and pharmacological aspects. *Pharmacol Ther* 111:327-345.
- Wandersman C., Stojiljkovic I. (2000) Bacterial heme sources: the role of heme, hemoprotein receptors and hemophores. *Current Opinion in Microbiology* 3(2):215-220.
- Wijayanti N., Katz N., Immenschuh S. (2004) Biology of heme in health and disease. *Curr Med Chem* 11(8):981-986.
- Yamamoto M., Hayashi N., Kikuchi G. (1982) Evidence for the transcriptional inhibition by heme of the synthesis of delta-aminolevulinic synthase in rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 105 (3): 985-990.
- Yamamoto M., Hayashi N., Kikuchi G. (1983) Translational inhibition by heme of the synthesis of hepatic delta-aminolevulinic synthase in a cell-free system. *Biochem Biophys Res Commun* 115(1):225-231.
- Yamauchi K., Hayashi N., Kikuchi G. (1980) Cell-free synthesis of rat liver delta-aminolevulinic synthase and possible occurrence of processing of the enzyme protein in the course of its translocation from the cytosol into the mitochondrial matrix. *FEBS Lett* 115(1):15-28.
- Yoon J.C., Puigserver P., Chen G., Donovan J., Wu Z., Rhee J., Adelmant G., Stafford J., Kahn C.R., Granner D.K., Newgard C.B., Spiegelman B.M. (2001) Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1. *Nature* 413(6852):131-138.
- Yoshino K., Munakata H., Kuge O., Ito A., Ogishima T. (2007) Haeme-regulated degradation of delta-aminolevulinic synthase 1 in rat liver mitochondria. *J Biochem* 142(4):453-458.

## **CAPÍTULO I**

### **MATERIALES**

#### **I. 1. EQUIPOS**

Las centrifugaciones se efectuaron en centrifugas refrigerada (SORVALL, RC 5B, Estados Unidos) o de mesa (ROLCO 2036 ó CM-36, Argentina).

Las mediciones espectrofotométricas se llevaron a cabo en un espectrofotometro de doble haz con arreglo de diodos (Hewelwtt Packard, HP8452A diode array, Estados Unidos).

Para los homogenatos se utilizó un homogenizador ULTRA-TURRAX (Janke y Kundel, IKA-Labortechnik, Alemania) o un homogenizador manual.

Para pesar los distintos reactivos se utilizó la Balanza Mettler PC 2000.

Al realizar las distintas mediciones espectrofotométricas de actividades enzimáticas se utilizo Baño seco AccuBlock Digital Dry Bath Labnet para termostatar las reacciones.

Las Reacción en Cadena de la Polimerasa utilizada en la genotipificación se llevo a cabo en un Cicladortérmico Axygen Maxygene.

Las electroforesis en gel de agarosa se llevaron a cabo en Cubas: Horizon 58 Whatman y Thermo Scientific Easy Cast B2, Fuentes: Bio-Rad Power Pac Basic y Electrophoresis Power Supply (EPS 600). Los geles se visualizaron en un Transiluminador: Uvitec.

Para la realización de la técnica de western blot se utilizaron cubas de electroforesis y transferencia para mini geles (Amersham Pharmacia Biotech, Suecia).

El análisis densitométrico de las señales se realizó con el software de análisis de imágenes Scion Image para Windows.

#### **I.2. REACTIVOS Y ENZIMAS**

Los anestésicos Sevoflurano (fluorometil 2,2,2-trifluoro-1 [trifluorometil]etil éter) e Isoflurano (1-cloro-2,2,2-trifluoroetil difluorometil éter) fueron de Laboratorios Abbot S.A.

Para la genotipificación se utilizó el kit "MyTaq Extract-PCR Kit" (Bioline).

Los anticuerpos utilizados fueron provenientes de Santa Cruz Biotechnology.

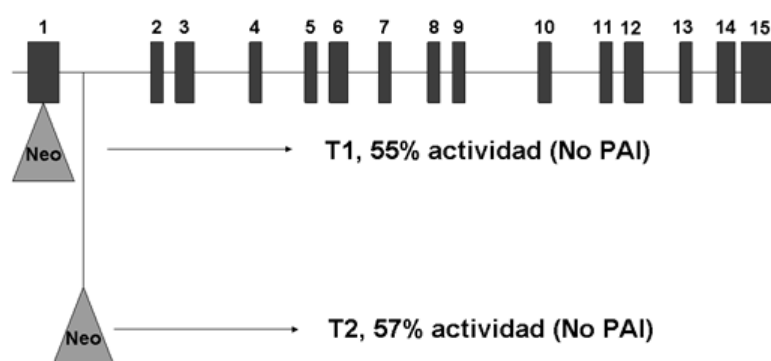
Los otros reactivos utilizados fueron de grado analítico, provenientes de Sigma Chem. Co (St. Louis, MO) y MP Biomedicals, LLC (ICN Biochemicals Inc.).

### 1.3. ANIMALES

Se utilizaron ratones pertenecientes a una población de las cepas *CF1* y *C57BL/6* machos de 25 g (6 semanas) que fueron mantenidos en condiciones controladas, agua y administración de comida *ad libitum* (Purina 3, Asociación de Cooperativas Argentinas, San Nicolás, Buenos Aires, Argentina), los cuales fueron obtenidos del Bioterio de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA.

También se utilizaron ratones macho knockout deficientes en la enzima PBG-D como modelo de PAI de 25 g (6 semanas) que fueron mantenidos en condiciones controladas, agua y administración de comida *ad libitum* (Purina 3, Asociación de Cooperativas Argentinas, San Nicolás, Buenos Aires, Argentina). Estos ratones fueron obtenidos por el grupo del Dr. Urs Meyer, Universidad de Basel, y cedidos gentilmente por el Dr. Antonio Fontanellas Romá, Laboratorio de Terapia Génica de Enfermedades Metabólicas del Centro de Investigación Aplicada, Universidad de Navarra, España.

Los ratones knockout fueron generados por la inserción de un gen de Neomicina en el gen de la PBG-D en ratones de la cepa *C57BL/6* (Figura I.1). En la línea T1 la inserción se encuentra en el 1er exón de un alelo, causando un descenso al 55% de la actividad normal de la enzima (Lindberg *et al.*, 1996).



**FIGURA I.1: GEN DE LA PBG-D, SEÑALANDO INTRONES, EXONES Y LAS INSERCCIONES DEL GEN DE NEOMICINA EN LAS CEPAS TRANSGÉNICAS T1 Y T2.**

Los animales fueron tratados según las normas establecidas por el comité de la Asociación Argentina de Especialistas en Animales de Laboratorio (AADEALC).

## CAPÍTULO II

### MÉTODOS

#### II.1. GENOTIPIFICACIÓN

Para realizar la genotipificación se utilizó el kit “Mouse genotyping kit DNA extraction kit + ReadyMix with Dye” de Kapa Biosystems. Se tomó una muestra de aproximadamente 2 mm la punta de la cola de los animales y se realizó la extracción de ADN en un sistema de incubación que contenía en un volumen final del 100 µl: KAPA Express Extract Buffer 1X y KAPA Express Extract Enzyme 2 U por reacción. Se incubó durante 10 minutos a 75 °C y luego 5 minutos a 95 °C.

Las muestras se amplificaron mediante la técnica de PCR. En un volumen final de 25 µl se colocaron: 2X KAPA2G Fast Genotyping Mix with dye 1X; Primer 1001 o NeoU 0,5 µM; Primer 2340,5 µM y DNA 10 ng. En la [Tabla II.1](#) se describen las secuencias de los primers y en la [Tabla II.2](#) se indica el programa de ciclado.

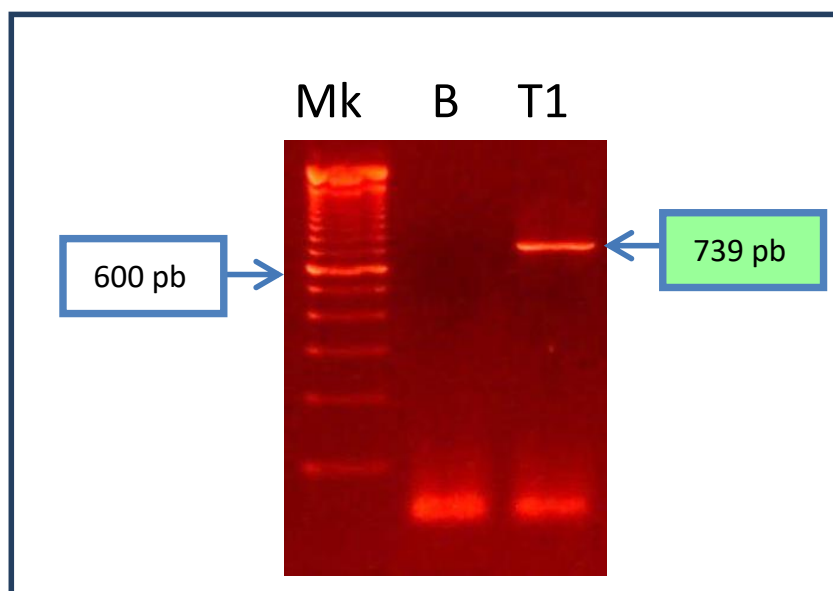
**TABLA II.1: SECUENCIA DE LOS PRIMERS UTILIZADOS PARA LA GENOTIPIFICACIÓN DE LOS ANIMALES**

Nombre	Secuencia (5´-3´)
Neo U	ATGCTCCAGACTGCCTTGGGAAAA
1001	CTTAGCCACCCACAAAAGTCCTA
2340	TTCCTACCCTAACCCAGTGCTCTA

**TABLA 3: PROGRAMA DE CICLADO UTILIZADO PARA DETECTAR LA MUTACIÓN**

Paso	Temperatura	Tiempo	Numero de Ciclos
Desnaturalización Inicial	95 °C	3 min	1
Desnaturalización	95 °C	15 seg	35
Pegado de primers	60 °C	15 seg	
Extensión	72 °C	20 seg	
Extensión Final	72 °C	1:20 min	1

Los productos de PCR se testearon en un gel de agarosa 2% teñido con bromuro de etidio. Con el juego de primers Neo U y 2340 se amplificó una banda de 739 bp correspondiente al genotipo T1. Se utilizó el marker de 100 bp (Invitrogen) (Figura II.1).



**FIGURA II.1: PATRÓN DE BANDAS OBTENIDO EN LA GENOTIPIFICACIÓN**

El producto de la amplificación por PCR se sembró en un gel de agarosa 2% en presencia de bromuro de etidio. Producto obtenido correspondiente al genotipo T1 con los primers N y 2340.

## II.2. DISEÑO EXPERIMENTAL

En la Figura II.2 se describe el diseño experimental utilizado.

Como se mencionó en el Ítem I.3, se utilizaron ratones de la cepa *CF1* y de la línea T1. En todas las experiencias, ya sea realizadas con ratones *CF1* o T1, se trabajó con 2 grupos: ratones control (no tratados) y ratones tratados.

Dado que los ratones T1 fueron generados a partir de ratones de la cepa *C57BL/6*, se usó esta cepa a fin de evaluar si había diferencias entre los niveles basales de los distintos parámetros estudiados de este fondo genético con el ratón T1.



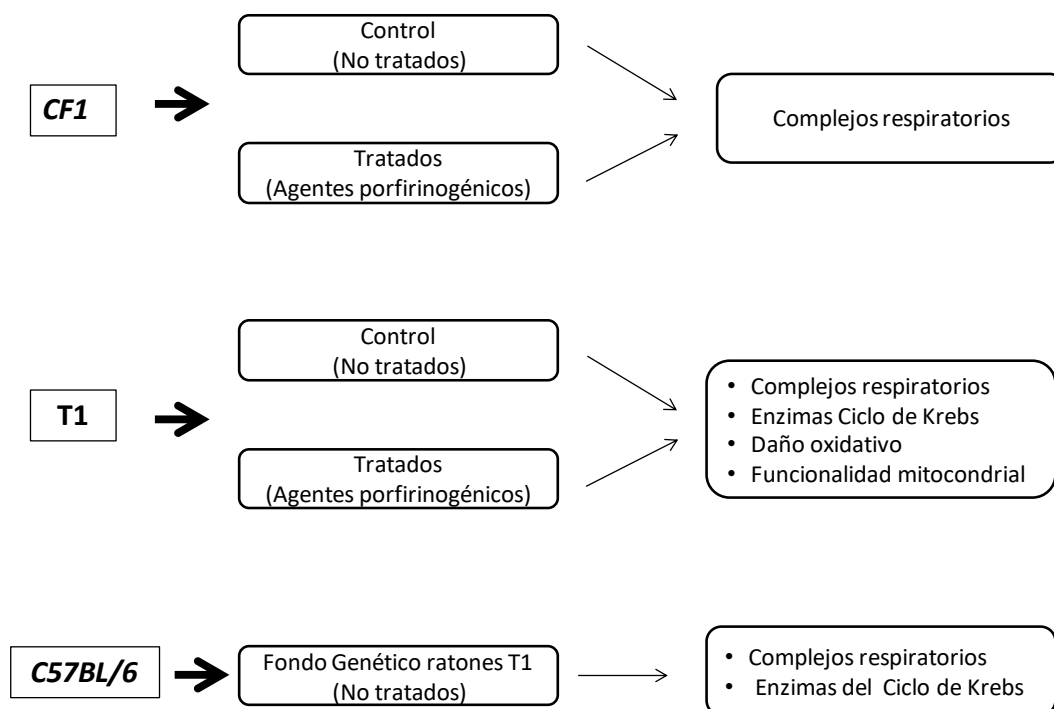


FIGURA II.2: DISEÑO EXPERIMENTAL

Los animales recibieron los siguientes tratamientos:

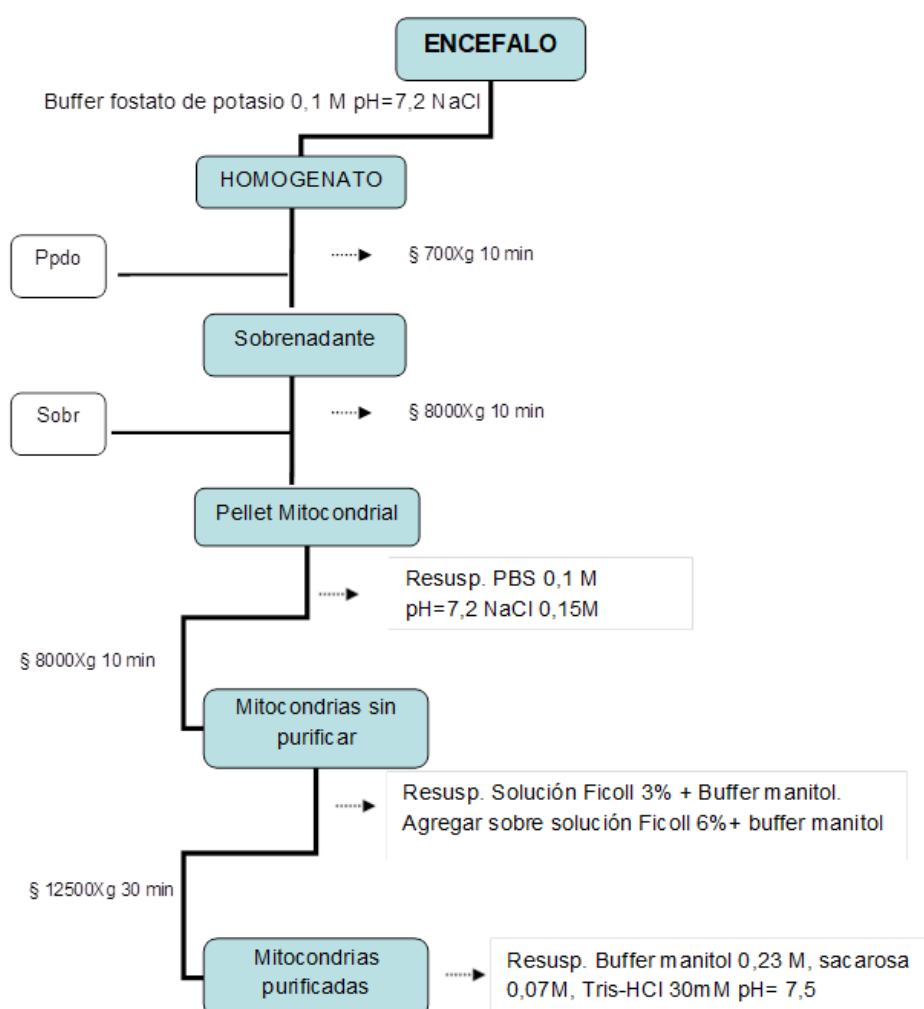
- *Anestésicos*: El Isoflurano se administró en una única dosis de 2 ml/kg (i.p.); para el Sevoflurano el tratamiento consistió en una única dosis de 1,5 ml/kg (i.p.). Los animales se sacrificaron a los 20 minutos posteriores a la inyección.
- *AIA*: Los animales recibieron una única dosis de 350 mg/kg (i.p.) (en etanol: NaCl 0.9%; 1:3 v/v) 16 horas antes del sacrificio.
- *Veronal*: Los animales recibieron 1 dosis diaria de 167 mg/kg (s.c.) (en NaCl 0.9%) durante 3 días y se sacrificaron a las 24 horas desde la última inyección.
- *Etanol*: Los animales recibieron etanol (30%, v/v) en el agua de bebida durante una semana.
- *Ayuno*: Los animales se ayunaron durante 24 horas.
- *ALA agudo*: Una dosis (40 mg/kg, i.p.) (en solución fisiológica pH=7) y se sacrificaron a las 24 horas.

Los controles recibieron el vehículo correspondiente a cada tratamiento y se sacrificaron a los tiempos indicados para cada grupo.

Las dosis y los tiempos indicados para la administración de las distintas drogas son aquellos que producen alteraciones en el metabolismo del hemo hepático cuando fueron administrados a ratones cepa *CF1*, de acuerdo a trabajos previos realizados en nuestro laboratorio (Buzaleh *et al.*, 1992, 1997; Rodriguez *et al.*, 2005; Sampayo *et al.*, 2009).

### II.3. PREPARACIÓN DE LAS FRACCIONES SUBCELULARES

En la Figura II.3 se indica el procedimiento que se llevó a cabo para la obtención de la fracción subcelular mitocondrial a partir de encéfalo.



**FIGURA II.3: ESQUEMA EXPERIMENTAL PARA EL AISLAMIENTO MITOCONDRIAL**

## II.4. DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS

Todos los parámetros se midieron en la fracción enzimática mitocondrial de encéfalo murino que fue resuspendida utilizando una solución amortiguadora de manitol 0,23 M, sacarosa 0,07 M, Tris-HCl 30 mM pH 7,5.

### II.4.1. NADH-CITOCROMO C REDUCTASA

La actividad de NADH-Citocromo C Reductasa se determinó según el método descrito por Navarro *et al.* (2005). El sistema de incubación contenía en un volumen final de 1 ml: buffer fosfato de potasio 0,1M pH 7,4; NADH 0,2mM; KCN 0,5 mM; citocromo c<sup>+3</sup> 25 μM y fracción mitocondrial (0,02 mg/ml de proteína). Se realizó un blanco de reacción que no contenía enzima. Se siguió espectrofotométricamente el aumento de la absorbancia del citocromo c<sup>+2</sup> a 550 nm ( $\epsilon=19,6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) a 37°C durante 2 minutos. Se definió una unidad enzimática (UE) como la cantidad de enzima que cataliza la formación de un nmol de citocromo c reducido por minuto en las condiciones estándar de incubación. La actividad se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$UE/ml \text{ (nmoles/ min x ml)} = \frac{\Delta \text{pend Abs}^{550} \times Vol f \times 10^3}{Vol \text{ enz} \times \epsilon}$$

$\Delta \text{pend Abs}^{550}$ : Pendiente absorbancia a 550 de la muestra -pendiente absorbancia a 550 del blanco.

$vol f$ : Volumen final.

$vol \text{ enz}$ : Volumen de fracción enzimática mitocondrial.

$\epsilon$ : Coeficiente de extinción =  $19,6 \text{ nM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

La actividad específica se calculó como UE/mg proteína.

### II.4.2. SUCCINATO-CITOCROMO C REDUCTASA

La actividad de Succinato-Citocromo C Reductasa se determinó según el método descrito por Navarro *et al.* (2005). El sistema de incubación contenía en un volumen final de 1 ml: buffer fosfato de potasio 0,1M pH7,4; succinato 5 mM; KCN 0,5 mM; citocromo c<sup>+3</sup> 25 μM y fracción enzimática mitocondrial (0,02 mg/ml). Se realizó un blanco de reacción que no contenía enzima. Se siguió espectrofotométricamente el aumento de la absorbancia del citocromo c<sup>+2</sup> a 550 nm ( $\epsilon=19,6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) a 37°C durante 2 minutos. Se definió una UE como la cantidad de enzima que cataliza la formación de un nmol de citocromo c reducido

por minuto en las condiciones estándar de incubación. La actividad se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$UE/ml \text{ (nmoles/ min x ml)} = \frac{\Delta \text{pend Abs}^{550} \times \text{Vol f} \times 10^3}{\text{Vol enz} \times \epsilon}$$

$\Delta \text{pend Abs}^{550}$ : Pendiente absorbancia a 550 de la muestra –pendiente absorbancia a 550 del blanco.

*vol f*: Volumen final.

*vol enz*: Volumen de fracción enzimática mitocondrial.

$\epsilon$ : Coeficiente de extinción =  $19,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

La actividad específica se calculó como UE/mg proteína.

Se calculó la relación entre los Complejos I-III/II-III para estimar la actividad del Complejo I con respecto al Complejo II como lo describe Shapira *et al.* (1990). Los valores de la actividad del Complejo I-III fueron divididos por la actividad del Complejo II-III. Luego con esas relaciones se calculó el promedio con su correspondiente dispersión.

### II.4.3. SUCCINATO DESHIDROGENASA

La actividad de Succinato deshidrogenasa se determinó según el método descrito por King (1967). El sistema de incubación contenía en un volumen final de 1 ml: buffer fosfato de potasio 0,2 M pH 7,4; succinato 0,6 M; EDTA 0,003 M; DCIP (2,6-diclorofenolindofenol) y fracción enzimática mitocondrial (0,02 mg/ml). Se realizó un blanco de reacción que no contenía enzima. Se siguió espectrofotométricamente el aumento de la absorbancia del DCIP a 600 nm ( $\epsilon=21 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) a 37°C durante 2 minutos. Se definió una UE como la cantidad de enzima que cataliza la formación de un nmol de DCIP reducido por minuto en las condiciones estándar de incubación. La actividad se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$UE/ml \text{ (nmoles/ min x ml)} = \frac{\Delta \text{pend Abs}^{600} \times \text{Vol f} \times 10^3}{\text{Vol enz} \times \epsilon}$$

$\Delta \text{pend Abs}^{600}$ : Pendiente absorbancia a 600 de la muestra –pendiente absorbancia a 600 del blanco.

*Vol f*: Volumen final.

*Vol enz*: Volumen de fracción enzimática mitocondrial.

$\epsilon$ : Coeficiente de extinción =  $21 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

La actividad específica se calculó como UE/mg proteína.

#### 2.4.4. CITOCROMO C OXIDASA

La actividad de la enzima Citocromo C Oxidasa se determinó según el método descrito por Yonetani *et al.* (1965). El sistema de incubación contenía en un volumen final de 1 ml: buffer fosfato de sodio 0,05M pH 7,4; citocromo c<sup>+</sup> 50 μM y fracción enzimática mitocondrial (0,02 mg/ml). Se realizó un blanco de reacción que no contenía enzima. Se siguió espectrofotométricamente la disminución de la absorbancia del citocromo c<sup>+</sup> a 550 nm ( $\epsilon=39,4 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) a 37°C durante 1 minuto. Se definió una UE como la cantidad de enzima que cataliza la oxidación de un nmol de citocromo c por minuto en las condiciones estándar de incubación. La actividad se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$UE/ml(\text{nmoles}/\text{min} \times \text{ml}) = \frac{\log(A_{550}^I - A_{550}^F) \times V_f \times 10^3}{Vol \text{ enz} \times \epsilon}$$

$A_{550}^I$ : absorbancia inicial de la muestra - absorbancia del blanco

$A_{550}^F$ : absorbancia final de la muestra - absorbancia del blanco

$vol f$ : volumen final

$vol \text{ enz}$ : volumen de fracción enzimática mitocondrial

$\epsilon$ : coeficiente de extinción =  $39,4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

La actividad específica se calculó como UE/mg proteína.

#### II.4.5. FUMARASA

La actividad de la enzima Fumarasa fue determinada según el método descrito por Homedan *et al.* (2014) con algunas modificaciones, midiendo espectrofotométricamente la formación de fumarato a partir de malato a 250 nm ( $\epsilon=2,44 \mu\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). La mezcla de reacción contenía en un volumen final de 1 ml: buffer fosfato de potasio 50 mM pH 7,4; EDTA 0,1 mM; malato 10 mM y Tritón X-100 0,2%. La reacción se inició por adición del extracto mitocondrial (50 μg/ml) y se incubó 5 minutos a 37°C. Se definió una UE como la cantidad de enzima que cataliza la formación de un nmol de fumarato por minuto en las condiciones estándar de incubación. La actividad se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$UE/ml(\text{nmoles}/\text{min} \times \text{ml}) = \frac{\Delta Abs^{250} \times Vol f}{Vol \text{ enz} \times \epsilon}$$

$\Delta Abs^{250}$ : Absorbancia a 250nm de la muestra - absorbancia a 250nm del blanco.

$Vol f$ : Volumen final.

$Vol \text{ enz}$ : Volumen de fracción enzimática mitocondrial

$\epsilon$ : Coeficiente de extinción =  $2,44 \mu\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

La actividad específica se calculó como UE/mg proteína.

### II.4.5. ACONITASA

La actividad de la enzima Aconitasa se determinó según el método descrito por Vasquez-Vivar *et al.* (2000) con algunas modificaciones, midiendo espectrofotométricamente la formación de aconitato a partir de citrato a 240 nm ( $\epsilon = 3,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). El sistema de incubación contenía en un volumen final de 1 ml: buffer Tris-HCl 90 mM pH 8, citrato 20 mM y 200  $\mu\text{l}$  de fracción mitocondrial a 37°C. Se definió una UE como la cantidad de enzima que cataliza la formación de un nmol de aconitato por minuto en las condiciones estándar de incubación. La actividad se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$UE/ml \text{ (nmoles/ min x ml)} = \frac{\Delta \text{pend Abs}^{240} \times Vol f \times 10^3}{Vol \text{ enz} \times \epsilon}$$

$\Delta \text{pend Abs}^{240}$ : Pendiente absorbancia a 240 de la muestra -pendiente absorbancia a 240 del blanco.

*Vol f*: Volumen final.

*Vol enz*: Volumen de fracción enzimática.

$\epsilon$ : Coeficiente de extinción =  $3,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

La actividad específica se calculó como UE/mg proteína.

### II.4.6. ÓXIDO NÍTRICO SINTASA

La actividad de la NOS se determinó en la fracción mitocondrial según el método descrito por Boveris *et al.* (2002), basado en la medición espectrofotométrica de la conversión de oxihemoglobina a metahemoglobina a 37°C.

El sistema de incubación contenía en un volumen final de 1 ml: buffer fosfato de potasio 50 mM pH 7,4;  $\text{CaCl}_2$  1 mM; NADPH 100  $\mu\text{M}$ ; ditioneitol 10  $\mu\text{M}$ ; SOD 2  $\mu\text{M}$ ; Catalasa 0,1  $\mu\text{M}$ ; fracción enzimática mitocondrial (0,5-1,0 mg/ml); oxihemoglobina 25  $\mu\text{M}$  y L-arginina 1 mM. Previo al agregado de la oxihemoglobina se llevó el equipo a cero. Se siguió el curso de la reacción durante 2 minutos, registrando la diferencia entre la disminución de la absorbancia a 577 y a 591 nm. Se definió una UE como la cantidad de enzima que cataliza la oxidación de 1 nmol de oxihemoglobina por minuto en las condiciones estándar de incubación. La actividad de NOS se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$UE/ml \text{ (moles/ min x ml)} = \frac{\Delta pend \times Vol f \times 10^3 \times 60 \times dil}{Vol enz \times \epsilon \times mg \text{ prot}}$$

$\Delta pend$ : pendiente de la muestra - pendiente del blanco. La pendiente se calculó a partir del gráfico de Abs. a 577-591 nm vs. tiempo (seg)

$vol f$ : volumen final de incubación

$vol enz$ : volumen de fracción enzimática mitocondrial.

$60$ : factor de conversión de segundos a minutos

$dil$ : dilución para ajustar la cantidad de proteínas a 0,5-1,0 mg/ml en el tubo de reacción

$\epsilon$ : coeficiente de extinción =  $11.2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

La actividad específica se calculó como UE/mg proteína.

#### II.4.7. DAÑO A PROTEÍNAS

El contenido de grupos carbonilos en las proteínas oxidadas se determinó según el método descrito por Mesquita *et al.* (2014). A 400  $\mu\text{l}$  de una solución de 2,4-dinitrofenilhidrazina 10 mM en  $\text{H}_3\text{PO}_4$  0,5 M se le agregó 400  $\mu\text{l}$  de la fracción mitocondrial. La solución se incubó 10 minutos a temperatura ambiente. Luego se adicionó 200  $\mu\text{l}$  de NaOH 6M y se incubó nuevamente 10 minutos a temperatura ambiente. Se midió la absorbancia a 450nm. Se realizó un blanco sin solución de proteínas. La concentración de grupos carbonilos se calculó empleando la siguiente ecuación y se expresó por mg de proteína:

$$nmoles CO/ml = \frac{\Delta Abs^{450} \times Vol f \times 10^6}{Vol frac \times \epsilon}$$

$\Delta Abs 450$ : absorbancia de la muestra a 450 nm - absorbancia del blanco de reactivos a 450 nm

$Vf$ : volumen final

$Vfrac$ : volumen de la fracción mitocondrial

$\epsilon$ : coeficiente de extinción =  $22.308 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

#### II.4.8. DAÑO A LÍPIDOS

El daño oxidativo a lípidos se determinó cuantificando los niveles de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARs) según el método descrito por Ohkawa *et al.* (1979). Esta técnica cuantifica a uno de los productos formados por la peroxidación lipídica, el malondialdehído (MDA) que reacciona con el ácido tiobarbitúrico en condiciones de bajo pH y alta temperatura, formando un cromógeno o pigmento rojo que es detectable espectrofotométricamente. Para ello a 0,1 ml de la fracción enzimática mitocondrial se le

agregó SDS 0,2% (p/v) y 1 ml de reactivo (TBA 0,3% en ácido acético 7,5% p/v; HCl 0,25 M y TCA 15% p/v). La solución se calentó durante 15 min en baño de agua a ebullición. Luego de enfriar se centrifugó a 1.000xg durante 10 min. En el sobrenadante se determinó la absorbancia a 535nm. La concentración de TBARs se expresó como nmoles de MDA empleando la siguiente ecuación y se expresó por mg de proteína:

$$nmoles\ MDA/ml = \frac{\Delta Abs^{535} \times Vol\ f \times 10^6}{Vol\ frac \times \varepsilon}$$

$\Delta Abs^{535}$ : absorbancia de la muestra a 535 nm - absorbancia del blanco de reactivos a 535 nm

*VF*: volumen final

*Vol frac*: volumen de la fracción mitocondrial

$\varepsilon$ : coeficiente de extinción =  $1,56 \times 10^5 M^{-1} cm^{-1}$

#### II.4.9. CONTENIDO DE HEMO Y CITOCROMOS

Se determinó el contenido de hemo aa3 y de citocromos aa3, citocromo b y citocromo c según lo descrito por Von Jagow & Klingenberg (1972) y Bansal *et al.* (2014). Una alícuota de la fracción mitocondrial (900 µg de proteína) se incubó en hielo durante 30 minutos en una solución de buffer fostato de sodio 25 mM pH 7,4 que contenía 2% de Tritón X-100. Se registraron las absorbancias a 445 nm para hemo aa3 (coeficiente de extinción  $164\ mM^{-1}cm^{-1}$ ), entre 605-630 para el citocromo aa3 (coeficiente de extinción  $24\ mM^{-1}cm^{-1}$ ), entre 560-575 para el citocromo b (coeficiente de extinción  $23,4\ mM^{-1}cm^{-1}$ ) y entre 550-542 para el citocromo c (coeficiente de extinción  $18,7\ mM^{-1}cm^{-1}$ ) de dicha solución (oxidado) y luego del agregado de ácido ascórbico (reducido). La concentración de hemo y citocromos se calculó utilizando la variación de absorbancia (reducido menos oxidado) de acuerdo a la siguiente ecuación y los valores se expresaron por mg de proteína:

$$nmoles/ml = \frac{\Delta Abs \times Vol\ f \times 10^3}{Vol\ frac \times \varepsilon}$$

$\Delta Abs$ : *Abs reducido - Abs oxidado*

*VF*: volumen final de buffer

*Vol frac*: volumen de fracción mitocondrial

$\varepsilon$ : coeficiente de extinción de cada compuesto a las diferentes longitudes de onda.



#### **II.4.10.FUNCIONALIDAD DE LA MITOCONDRIA. ENSAYO DEL MTT**

Para evaluar la actividad mitocondrial celular se utilizó el ensayo de MTT (Mosmann, 1983) que se basa en la reducción del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) realizada por la enzima mitocondrial Succinato-deshidrogenasa en un compuesto coloreado de color azul (formazan). Para ello a 50  $\mu$ l de la fracción mitocondrial se le agregó 5  $\mu$ l de MTT (5 mg/ml) y se incubó en oscuridad a 37°C durante 90 minutos. Luego se centrifugó a 10000 rpm durante 15 minutos y el precipitado se extrajo con 200  $\mu$ l de dimetilsulfóxido. En un lector de placas tipo Elisa, se registró la absorbancia a 570 nm y se descontó la absorbancia a 620 nm debida a la turbidez de la muestra. Los resultados se expresaron como porcentaje respecto del control y se normalizaron por la cantidad de proteína.

#### **II.4.11. CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS**

La concentración de proteínas se midió por el método de Lowry *et al.* (1951) para todas las determinaciones bioquímicas descriptas o por el método de Bradford (1976) para cuantificar las proteínas para sembrar en la electroforesis de la técnica de Western Blot.

#### **II.5. EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT: SUBNUNIDADES DE LA ATP SINTASA, CITOCROMO-C-OXIDASA Y UBIQUINOL-CITOCROMO C REDUCTASA**

La expresión de Citocromo c (7H8), COX4 (F-8), COX2 (D-5) nNOS y ATP5A se determinó en mitocondrias de encéfalo.

Se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida 7,5% para ATP5A y nNOS12% COX4 (F-8) y COX2 (D-5), 15%, citocromo C (7H8), en condiciones desnaturalizantes. Las muestras se desnaturalizaron durante 5 minutos a 100 °C por el agregado de buffer de siembra en una relación 1:1 (v/v) que contenía: 1,25 ml de buffer Tris-HCl 1 M pH 6,7; 1 ml de glicerol; 0,5 ml de  $\beta$ -mercaptoetanol; 3 ml de SDS (10%, p/v); 1 mg de azul de bromofenol. Se sembraron 10  $\mu$ g de proteínas. Se utilizó como buffer de corrida Tris 25 mM; glicina 192 mM y SDS 1%, pH 8,3. La electroforesis se llevó a cabo aplicando un voltaje inicial de 300 volts hasta atravesar el gel "stacking" y luego a un voltaje constante de 160 volts. Se puso a punto final de la electroforesis dependiendo el peso molecular de la proteína que se iba a detectar. Para la ATP5A el tiempo de electroforesis fue de 60

minutos, para la nNOS 90 minutos, mientras que para el resto de las proteínas se aplicaron menores rangos de tiempo.

Finalizada la electroforesis se realizó la transferencia de las proteínas desde el gel de poliacrilamida a la membrana de nitrocelulosa que se llevó a cabo en un equipo de electrotransferencia de acuerdo a lo descrito por Towbin *et al.* (1979). Para ello previamente se realizó un lavado del gel en el buffer de transferencia que contenía Tris 25 mM; glicina 192 mM, SDS 1%, pH 8,3 y metanol 20% (v/v), durante 15 minutos; simultáneamente la membrana de nitrocelulosa se lavó durante 2 minutos en agua y otros 10 minutos en el buffer de transferencia. En el dispositivo de transferencia se colocó el gel sobre papel Whatman 3 MM, y sobre el gel la membrana de transferencia que luego se cubrió con papel Whatman. La transferencia se realizó durante 40-50 minutos a un voltaje constante de 90 volts.

Luego de la transferencia, la membrana se bloqueó "overnight" con leche 5% o con seroalbúmina bovina (BSA) 5%, a 4°C. Luego se realizaron 2-4 lavados de 15 minutos con una solución que contenía Tris 20 mM, NaCl 137 mM, pH 7,6 y Tween 0,1%-0,2% (v/v) (TBS-T). Las membranas fueron incubadas con los distintos anticuerpos durante 1 hora a temperatura ambiente.

Las diluciones de los anticuerpos utilizados fueron las siguientes:

- antiCitocromo C (7H8) (Santa Cruz, Biotechnology) (dil 1:500) en TBS-T 0,1%.
- anti COX4 (F-8) (Santa Cruz, Biotechnology) (dil 1:200) en TBS-T 0,1%.
- anti COX2 (D-5) (Santa Cruz, Biotechnology) (dil 1:300) en TBS-T 0,1%.
- anti ATP5A (Santa Cruz, Biotechnology) (dil 1:500) en TBS-T 0,1%.
- anti nNOS/NOS I (Santa Cruz Biotechnology) (dil 1:500) en TBS-T 0,1% sin BSA.

Como segundo anticuerpo se utilizó anti-rabbit IgG-HRP (Horse-Raddish Peroxidase) en una dil 1:8000.

Luego de la incubación con el primer y segundo anticuerpo se realizaron 2-5 lavados en TBS-T 0,1-0,2% durante 15 minutos; la frecuencia y la duración de los lavados varió dependiendo del anticuerpo.

La detección de las bandas se realizó mediante el sistema ECL (Enhanced Chemiluminiscent System, Amersham). Se agregó sobre la membrana 1,5 ml del reactivo quimioluminiscente, y se lo dejó reaccionar durante 1 minuto. Luego la membrana se puso en contacto con una placa radiográfica y se dejó exponiendo durante distintos tiempos dependiendo de la señal emitida por cada membrana. Posteriormente las placas se

colocaron en solución reveladora durante 3 minutos, se lavaron con agua y se fijaron durante otros 3 minutos.

Las autorradiografías se cuantificaron en unidades de scanner relativas y se normalizaron por el control de carga utilizando la técnica de tinción de la membrana con rojo ponceau (Romero-Calvo *et al.*, 2010; Johnson, 2012). Los resultados se expresaron como porcentaje respecto de valor control tomado como 100%.

## II.6. ENSAYOS INMUNOHISTOQUÍMICOS

Se estudió la expresión de NOS mediante ensayos inmunohistoquímicos. Se extrajo el cerebro, se cortó y se fijó en 10% de formol. Las muestras se incluyeron en parafina. Se realizaron cortes de los mismos por micrótopo (3-5  $\mu\text{m}$ ) y se tiñeron con hematoxilina-eosina. Para la detección de la localización celular de las distintas isoformas de NOS y de HO-1 se usaron anticuerpos específicos y el sistema streptavidina-biotina-peroxidasa con 3, 3'-diaminobenzidina (DAB) para el revelado. La actividad endógena de peroxidasa se inhibió usando 3% de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en agua destilada. Se incubaron los cortes de tejido con suero normal de cabra, lavándose luego con buffer Tris pH 7.6. Posteriormente se incubó "overnight" a temperatura ambiente con el anticuerpo primario específico Anti nNOS/NOS I (Santa Cruz Biotechnology) o Anti iNOS/NOS II (UPSTATE) (Santa Cruz Biotechnology) (dilución 1:200) y, luego, con el antisuero secundario biotinilado. Finalmente se procedió a la incubación con estreptavidina-peroxidasa y se reveló la reacción con (DAB) bajo microscopio. Todas las fotografías tienen una magnificación original de 250x y los insets 400x.

## II.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se calculó el promedio y la desviación estándar de cada variable para cada grupo experimental. Las diferencias estadísticas entre los grupos tratados y no tratados se analizaron usando el análisis de varianza para una variable (ANOVA) realizado con el programa excel (Microsoft), estableciéndose un nivel de probabilidad menor a 0,05 para considerar diferencias significativas. Todos los resultados se expresaron como porcentaje tomando al control del día en el que se realizaron las experiencias como 100%.

## II.8. REFERENCIAS

- Bansal S., Biswas G., Avadhani N.G. (2014) Mitochondria-targeted heme oxygenase-1 induces oxidative stress and mitochondrial dysfunction in macrophages, kidney fibroblasts and in chronic alcohol hepatotoxicity. *Redox Biol* 2:273–283.
- Boveris S., Lores Arnaiz J., Bustamante S., Alvarez L., Valdez A.D., Boveris A.D., Navarro A. (2002) Pharmacological regulation of mitochondrial nitric oxide synthase. En *Methods in Enzymology* (Eds. E. Cadenas & L. Packer) vol 359, pp 328-339, Elsevier Inc.
- Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.
- Buzaleh A.M., Enriquez de Salamanca R., Batlle, A.M. (1992) Administration of the anesthetic isoflurane to mice: a model for acute intermittent porphyria? *J Pharmacol Toxicol Methods* 28(4):191-197.
- Johnson M. (2012) Loading Controls for Western Blots. *Mater Methods* 2:114. Doi: <http://dx.doi.org/10.13070/mm.en.2.114>.
- King T.E. (1967) Preparation of succinate dehydrogenase and reconstitution of succinate oxidase *Methods. Enzymol* 10:322-331.
- Lindberg R.L., Porcher C., Grandchamp B., Ledermann B., Bürki K., Brandner S., Aguzzi A., Meyer U.A. (1996) Porphobilinogen deaminase deficiency in mice causes a neuropathy resembling that of human hepatic porphyria. *Nat Genet* 12(2):195-199.
- Lowry O., Rosebrough N., Farr A., Randall R. (1951) Protein measurement with the Follin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275.
- Mesquita C.S., Oliveira R., Bento F., Geraldo D., Rodrigues J.V., Marcos J, O. (2014) Simplified 2,4-dinitrophenylhydrazine spectrophotometric assay for quantification of carbonyls in oxidized proteins. *Anal Biochem* 458: 69–71.
- Mosmann T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application of proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65:55-63.
- Navarro A., Gómez C., Sánchez-Pino M.J., González H., Bández M.J., Boveris A.D., Boveris A. (2005) *Am. J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 289:1392–1399.
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95(2):351-358.
- Rodríguez J., Martínez M. del C., Gerez E., Batlle A., Buzaleh A.M. (2005) Heme oxygenase, Aminolevulinic acid synthetase and the antioxidant system in the brain of mice treated with porphyrinogenic drugs. *Cell Mol Biol* 51:487-494.
- Romero-Calvo I., Ocón B., Martínez-Moya P., Suárez M.D., Zarzuelo A., Martínez-Augustin O., de Medina F.S. (2010) Reversible Ponceau staining as a loading control alternative to actin in Western blots. *Anal Biochem* 401(2):318-320
- Sampayo R., Lavandera J., Batlle A., Buzaleh, A.M. (2009) Sevoflurane: its action on heme metabolism and Phase I drug metabolizing system. *Cell Mol Biol* 55 (2):134-140.
- Schapira A. H. V., Cooper J. M., Dexter D., Jenner P., Clark J. B., and Marsden C. D. (1990) Mitochondrial Complex I deficiency in Parkinson's disease. *J Neurochem* 54(3):823-827.
- Towbin H., Staehelin T., Gordon J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 76: 4350-4354.

Vásquez-Vivar J., Kalyanaraman B., Kennedyll M. C. (2000) Mitochondrial aconitase is a source of hydroxyl radical. An electron spin resonance investigation. *J Biol Chem* 275(19):14064-14069.

Von Jagow G. & Klingenberg M. (1972) Close correlation between antimycin titer and cytochrome b(T) content in mitochondria of chloramphenicol treated *Neurospora crassa*. *FEBS Lett* 24(3):278-282.

Yonetani T. & Ray G.S. (1965) Studies on cytochrome oxidase. *J BiolChem* 240, 3392-3398.

## CAPÍTULO I

### CADENA RESPIRATORIA MITOCONDRIAL: ALTERACIONES PRODUCIDAS POR ANESTÉSICOS VOLÁTILES Y OTROS AGENTES PORFIRINOGENICOS

Con el fin de estudiar el efecto de las diferentes drogas porfirinogénicas sobre la cadena respiratoria mitocondrial en encéfalo murino, se midieron las actividades de las enzimas NADH-Citocromo C Reductasa (Complejo I-III), Succinato Deshidrogenasa (Complejo II), Succinato-Citocromo C Reductasa (Complejo II-III) y Citocromo C Oxidasa (Complejo IV) en ratones *CF1* que recibieron anestésicos volátiles, etanol, AIA, veronal, y bajo condiciones de ayuno. Además se comparó con animales que recibieron ALA.

Para poder profundizar la acción de las drogas mencionadas y trabajar en condiciones similares a las de la PAI, se trabajó con un modelo genético de este tipo de Porfiria que como se mencionó en el Capítulo de Materiales y Métodos son ratones knockout deficientes en la enzima PBG-D. En este grupo además de los parámetros medidos anteriormente se evaluó la expresión de la ATPasa (Complejo V).

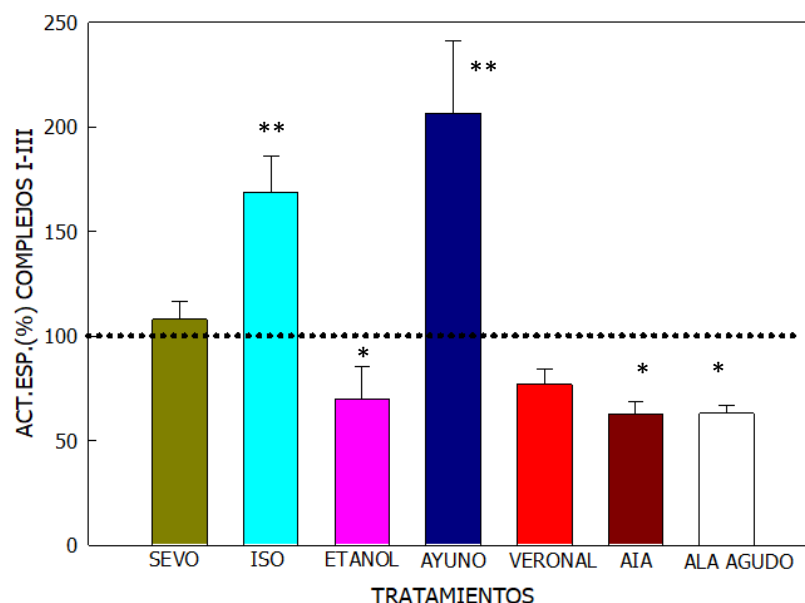
Con el fin de validar dicho modelo, se establecieron los niveles basales de las actividades enzimáticas estudiadas en los ratones T1 y se los comparó con los niveles basales de ratones "Wild type" de la cepa *C57BL/6*.

#### I.1. NADH-CITOCROMO C REDUCTASA (Complejo I-III)

##### I.1.1. ESTUDIOS REALIZADOS EN RATONES *CF1*

El efecto del Isoflurano, Sevoflurano, etanol, AIA, Veronal, ayuno y ALA sobre la actividad del Complejo I-III en ratones *CF1* se muestra en la [Figura I.1](#).

La actividad del Complejo I-III se indujo por el tratamiento con Isoflurano 69% ( $p < 0,01$ ) y en condiciones de ayuno 106% ( $p < 0,01$ ). Se observó una reducción en el grupo de animales que recibió etanol (30%;  $p < 0,05$ ) y AIA (38%;  $p < 0,05$ ). No se observaron variaciones significativas luego de la administración de Sevoflurano, y Veronal. Cuando se administró ALA, la actividad disminuyó significativamente (37%;  $p < 0,05$ ).



**FIGURA I.1: EFECTO DEL SEVOFLURANO, ISOFLURANO, ETANOL, VERONAL, AIA, ALA AGUDO Y CONDICIONES DE AYUNO SOBRE LA ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE LA ENZIMA NADH-CITOCROMO C REDUCTASA (COMPLEJO I-III), EN CEREBRO DE RATONES MACHOS CF1.**

SEVO: Sevoflurano, ISO: Isoflurano AIA: Alilisopropilacetamida, ALA: Ácido 5-Aminolevúlico. La actividad del Complejo I-III se expresa como porcentaje tomando al control del día en que se realizaron las experiencias como 100% (...). Valor control promedio:  $55,9 \pm 17,7$  nmol/mg. Los datos representan el valor medio  $\pm$  d.s. de 4-6 animales. (\*)  $p < 0,05$ ; (\*\*)  $p < 0,01$ : diferencia significativa entre el grupo tratado y el grupo control. Otros detalles experimentales se describen en Materiales y Métodos.

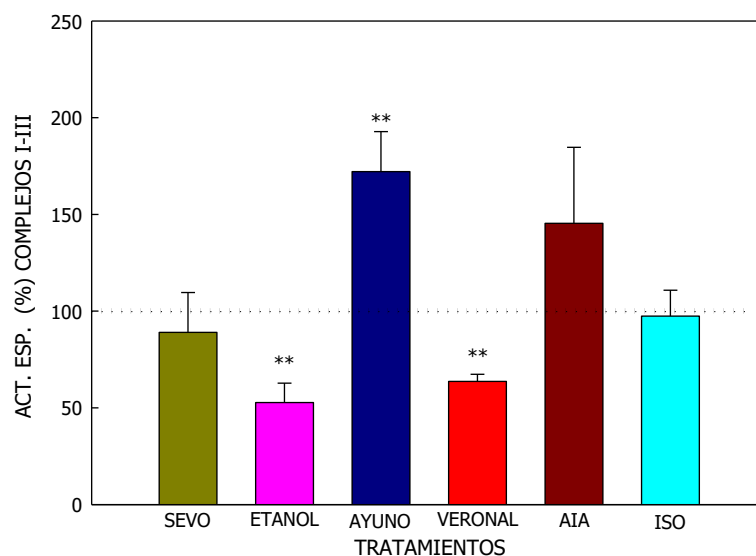
### I.1.2. ESTUDIOS REALIZADOS EN RATONES T1

Resultó de interés establecer si había diferencias en la actividad del Complejo I-III debido a la variación genética que presenta el modelo genético de PAI, por lo cual se realizó la validación del modelo murino comparando las mediciones obtenidas en los ratones PAI con los *C57BL/6* "Wild Type".

La actividad del Complejo I-III fue similar en ambos grupos de ratones, no evidenciando entonces variaciones significativas debidas a la mutación (Actividad específica *C57BL/6*:  $64,1 \pm 1,6$  nmol/mg; T1:  $71,2 \pm 33,1$  nmol/mg;  $p = 0,39$ ).

En ratones T1 el efecto del Sevoflurano, Isoflurano, etanol, AIA, Veronal y ayuno sobre la actividad del Complejo I-III se muestra en la [Figura I.2](#).

La actividad del Complejo I-III se indujo 72% ( $p < 0,01$ ) debido al ayuno en los ratones T1; mientras que se observó una reducción por el tratamiento con etanol (48%;  $p < 0,01$ ) y Veronal (38%;  $p < 0,05$ ). No se observaron variaciones significativas en la actividad enzimática debido a la administración de Sevoflurano y AIA.



**FIGURA I.2: EFECTO DEL SEVOFLURANO, ETANOL, VERONAL, AIA Y DEL AYUNO SOBRE LA ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE LA ENZIMA NADH-CITOCROMO C REDUCTASA (COMPLEJO I-III), EN CEREBRO DE RATONES MACHO T1.**

SEVO: Sevoflurano, ISO: Isoflurano AIA: Alilisopropilacetamida. La actividad del Complejo I-III se expresa como porcentaje tomando al control del día en que se realizaron las experiencias como 100% (...). Valor control promedio:  $71,2 \pm 33,1$  nmol/mg. Los datos representan el valor medio  $\pm$  d.s. de 4-6 animales. (\*\*\*)  $p < 0,01$ : diferencia significativa entre el grupo tratado y el grupo control. Otros detalles experimentales se describen en Materiales y Métodos.

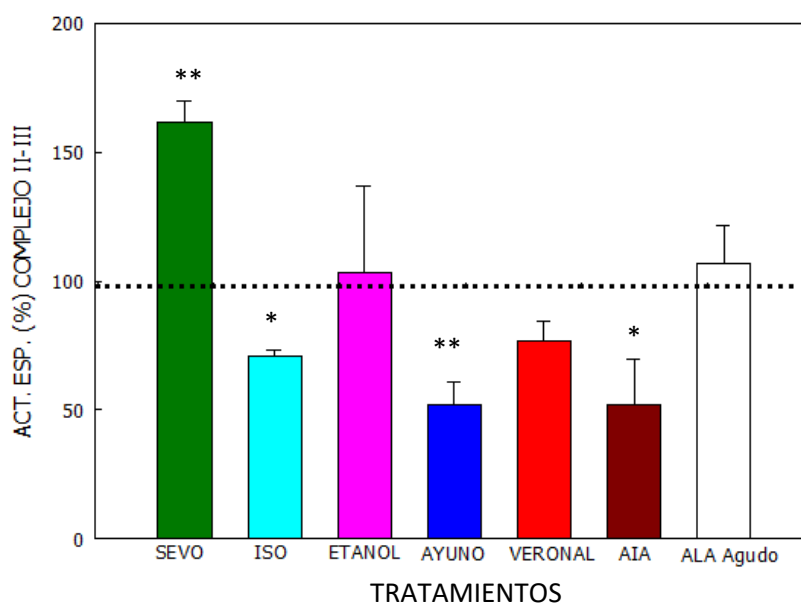
## I.2. SUCCINATO-CITOCROMO C REDUCTASA (Complejo II-III)

### I.2.1. ESTUDIOS REALIZADOS EN RATONES CF1

El efecto del Isoflurano, Sevoflurano, etanol, AIA, Veronal, ayuno y ALA sobre la actividad del Complejo II-III en ratones CF1 se muestra en la [Figura 1.3](#).

La actividad del Complejo II-III se indujo por el tratamiento con Sevoflurano (61,5%;  $p < 0,01$ ) y se redujo debido a la administración de Isoflurano (30%;  $p < 0,05$ ), AIA (49%;  $p < 0,01$ ) y en condiciones de ayuno (48%,  $p < 0,01$ ); sin que se produzcan modificaciones en dicha actividad enzimática en los animales que recibieron Veronal. Tampoco varió la actividad en el grupo que recibió ALA.





**FIGURA I.3: EFECTO DEL SEVOFLURANO, ISOFLURANO, ETANOL, VERONAL, AIA, ALA AGUDO Y CONDICIONES DE AYUNO SOBRE LA ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE LA ENZIMA SUCINATO-CITOCROMO C REDUCTASA (COMPLEJO II-III), EN CEREBRO DE RATONES MACHOS CF1.**

SEVO: Sevoflurano, ISO: Isoflurano AIA: Alilisopropilacetamida, ALA: Ácido 5-Aminolevúlico. La actividad del Complejo I-III se expresa como porcentaje tomando al control del día en que se realizaron las experiencias como 100% (...). Valor control promedio:  $16,3 \pm 5,9$  nmol/mg. Los datos representan el valor medio  $\pm$  d.s. de 4-6 animales. (\*)  $p < 0,05$ ; (\*\*)  $p < 0,01$ : diferencia significativa entre el grupo tratado y el grupo control. Otros detalles experimentales se describen en Materiales y Métodos.

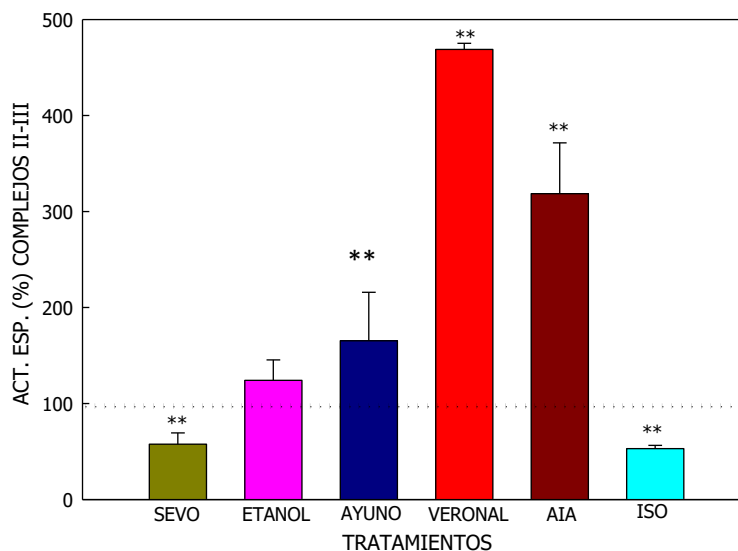
### I.2.2. ESTUDIOS REALIZADOS EN RATONES T1

Como se mencionó en el ítem anterior, en primera instancia se evaluó si había diferencias en la actividad del Complejo II-III debido a la variación genética comparando los valores de cerebro de los ratones PAI con los del grupo *C57BL/6* "Wild Type".

No se observaron variaciones significativas entre los valores basales de actividad del Complejo II-III entre ambos grupos (Actividad específica *C57BL/6*:  $12,8 \pm 0,7$  nmol/mg; T1:  $20,5 \pm 8,6$  nmol/mg;  $p = 0,28$ ).

En ratones T1 el efecto del Sevoflurano, Isoflurano, etanol, AIA, Veronal y ayuno sobre la actividad del Complejo II-III se muestra en la [Figura I.4](#).

La actividad del Complejo II-III se indujo por el tratamiento con Veronal (369%;  $p < 0,01$ ), debido al AIA (218%;  $p < 0,01$ ) y en condiciones de ayuno (48%;  $p < 0,01$ ). Se observó una disminución por la administración tanto de Sevoflurano (43%;  $p < 0,01$ ) como de Isoflurano (47%;  $p < 0,01$ ). No hubo alteraciones en la actividad enzimática en el grupo de ratones que recibió etanol.



**FIGURA I.4: EFECTO DEL SEVOFLURANO, ETANOL, VERONAL, AIA Y DEL AYUNO SOBRE LA ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE LA ENZIMA SUCINATO-CITOCROMO C REDUCTASA (COMPLEJO II-III), EN CEREBRO DE RATONES MACHO T1.**

SEVO: Sevoflurano, ISO: Isoflurano AIA: Alilisopropilacetamida. La actividad del Complejo I-III se expresa como porcentaje tomando al control del día en que se realizaron las experiencias como 100% (...). Valor control promedio:  $20,5 \pm 8,6$  nmol/mg. Los datos representan el valor medio  $\pm$  d.s. de 4-6 animales. (\*\*)  $p < 0,01$ : diferencia significativa entre el grupo tratado y el grupo control. Otros detalles experimentales se describen en Materiales y Métodos.

### I.3. RELACIÓN ACTIVIDAD DE LOS COMPLEJOS I-III Y II-III

Con el fin de profundizar en las alteraciones que producían los agentes estudiados sobre la cadena respiratoria, se calculó la relación entre los Complejos I-III y II-III. Los resultados se muestran en la [Tabla I.1](#).

Como se puede observar, la relación en todos los casos fue mayor a 1 lo que estaría indicando una mayor actividad del Complejo I respecto del Complejo II.

Para los ratones *CF1* el valor de la relación del control fue mayor para los tratamientos con ambos anestésicos volátiles, Veronal, AIA y ALA, lo que indicaría una mayor actividad del Complejo I en los controles. En el caso del ayuno y etanol, el valor de la relación de los ratones tratados superó al de los ratones no tratados, manifestando un aumento en la actividad del Complejo I debido a estos tratamientos.

Tanto el Veronal como el AIA administrado a los grupos de ratones *CF1* y T1 causaron una disminución en la actividad del Complejo I. Este resultado fue similar en ratones T1 debido al ayuno y al etanol. Sin embargo, en ratones *CF1* se observó un

efecto contrario, detectándose un aumento en la actividad del Complejo I luego del ayuno o el tratamiento con etanol.

**TABLA I.1: RELACIÓN DE ACTIVIDAD ENTRE LOS COMPLEJOS I-III Y II-III**

AGENTE	GRUPO	RELACIÓN I-III/II-III	
		Ratones CF1	Ratones T1
Sevoflurano	Control	9,06 ± 1,95	1,87 ± 0,39
	Tratado	5,23 ± 0,87	3,17 ± 1,22
Isoflurano	Control	4,03 ± 0,99	1,76 ± 0,32
	Tratado	2,14 ± 0,17	2,76 ± 0,43
Etanol	Control	10,05 ± 0,26	5,30 ± 0,17
	Tratado	13,40 ± 1,23	2,30 ± 0,53
Ayuno	Control	15,06 ± 6,54	12,1 ± 0,60
	Tratado	29,14 ± 3,31	4,90 ± 0,94
Veronal	Control	2,41 ± 0,21	3,42 ± 0,31
	Tratado	1,82 ± 0,31	2,25 ± 0,83
AIA	Control	5,38 ± 0,78	6,96 ± 0,98
	Tratado	3,90 ± 0,26	3,06 ± 0,99
ALA	Control	5,31 ± 1,24	---
	Tratado	3,32 ± 0,44	---

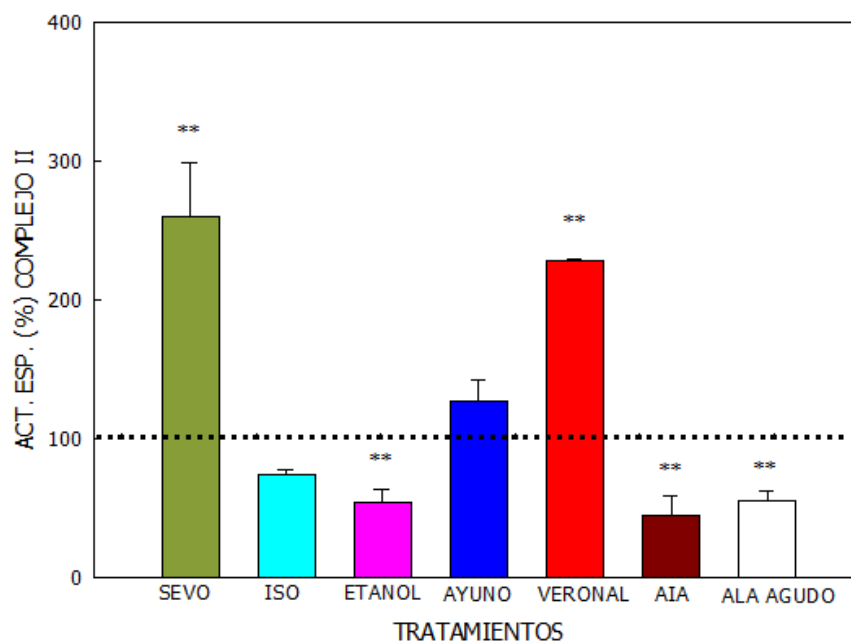
AIA: alilisopropilacetamida, ALA: ácido 5-aminolevúlico. La relación se calculó dividiendo los valores de actividad individuales del Complejo I-III por la actividad del Complejo II-III. Los datos representan el valor medio ± d.s. de 4-6 animales.

Para los ratones T1 ambos anestésicos volátiles mostraron un valor mayor en la relación para los ratones tratados respecto de los controles, lo que indicaría un incremento en la actividad del Complejo I; a diferencia de los otros tratamientos en donde el valor de los controles superó al de los tratados.

## I.4. SUCCINATO REDUCTASA (Complejo II)

### I.4.1. ESTUDIOS REALIZADOS EN RATONES *CF1*

El efecto del Isoflurano, Sevoflurano, etanol, AIA, Veronal, ayuno y ALA sobre la actividad del Complejo II en ratones *CF1* se muestra en la [Figura I.5](#).



**FIGURA I.5: EFECTO DEL SEVOFLURANO, ISOFLURANO, ETANOL, VERONAL, AIA, ALA AGUDO Y CONDICIONES DE AYUNO SOBRE LA ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE LA SUCCINATO DESHIDROGENASA (COMPLEJO II), EN CEREBRO DE RATONES MACHOS *CF1*.**

SEVO: Sevoflurano, ISO: Isoflurano AIA: Alilisopropilacetamida, ALA: Ácido 5-Aminolevúlico. La actividad del Complejo I-III se expresa como porcentaje tomando al control del día en que se realizaron las experiencias como 100% (....). Valor control promedio:  $70,7 \pm 13,0$  nmol/mg. Los datos representan el valor medio  $\pm$  d.s. de 4-6 animales. (\*\*)  $p < 0,01$ : diferencia significativa entre el grupo tratado y el grupo control. Otros detalles experimentales se describen en Materiales y Métodos.

La actividad del Complejo II se indujo por el tratamiento con Sevoflurano (160,5%;  $p < 0,01$ ) y por acción del Veronal (127%;  $p < 0,01$ ). Sin embargo se observó una disminución cuando se administró etanol (46%;  $p < 0,01$ ) o AIA (51%;  $p < 0,01$ ). No se produjeron modificaciones significativas en la actividad enzimática debido al tratamiento con Isoflurano o en condiciones de ayuno. En el grupo que recibió ALA, la actividad también se redujo significativamente (55%,  $p < 0,01$ ).

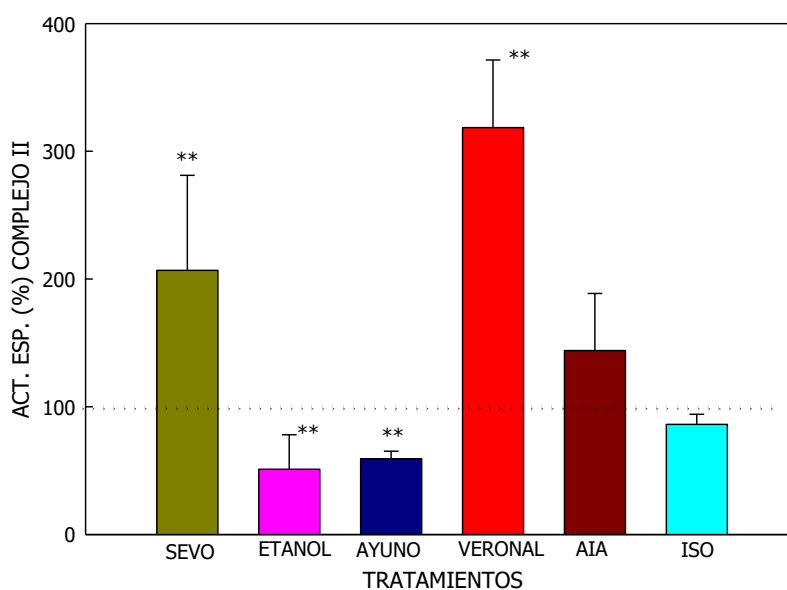
### I.4.2. ESTUDIOS REALIZADOS EN RATONES *T1*

Resultó de interés establecer si había diferencias en la actividad del Complejo II debido a la variación genética que presenta el modelo genético de PAI, por lo cual se

realizó la validación del modelo murino comparando las mediciones obtenidas en los ratones PAI con los *C57BL/6* "Wild Type".

Los valores de actividad del Complejo II no mostraron diferencias debidas a la presencia de la mutación (Actividad específica *C57BL/6*:  $59,6 \pm 3,8$  nmol/mg; T1:  $53,9 \pm 24,3$  nmol/mg;  $p=0,75$ ).

El efecto del Sevoflurano, etanol, AIA, Veronal y del ayuno sobre la actividad del Complejo II en ratones T1 se muestra en la Figura I.6.



**FIGURA I.6: EFECTO DEL SEVOFLURANO, ETANOL, VERONAL, AIA Y CONDICIONES DE AYUNO SOBRE LA ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE LA SUCCINATO DESHIDROGENASA (COMPLEJO II), EN CEREBRO DE RATONES MACHO T1.**

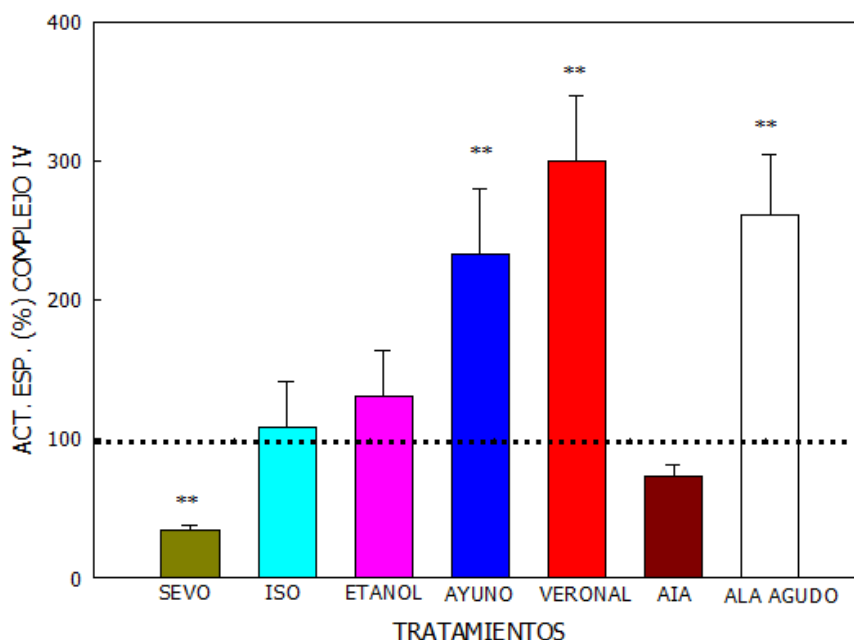
SEVO: Sevoflurano, ISO: Isoflurano AIA: Alilisopropilacetamida. La actividad del Complejo I-III se expresa como porcentaje tomando al control del día en que se realizaron las experiencias como 100% (...). Valor control promedio:  $53,9 \pm 24,3$  nmol/mg. Los datos representan el valor medio  $\pm$  d.s. de 4-6 animales. (\*\*)  $p<0,01$ : diferencia significativa entre el grupo tratado y el grupo control. Otros detalles experimentales se describen en Materiales y Métodos.

La actividad del Complejo II se indujo por el tratamiento con Sevoflurano (107%;  $p<0,01$ ) y por acción del Veronal (218%;  $p<0,01$ ). Se observó una reducción en animales que recibieron etanol (49%;  $p<0,01$ ) y cuando fueron ayunados (41%;  $p<0,01$ ). No se produjeron modificaciones en la actividad enzimática luego de la administración de AIA e Isoflurano.

## I.5. CITOCROMO C OXIDASA (Complejo IV)

### I.5.1. ESTUDIOS REALIZADOS EN RATONES *CF1*

El efecto del Isoflurano, Sevoflurano, etanol, AIA, Veronal, ayuno y ALA sobre la actividad del Complejo IV en ratones *CF1* se muestra en la [Figura I.7.](#)



**FIGURA I.7: EFECTO DEL SEVOFLURANO, ISOFLURANO, ETANOL, VERONAL, AIA, ALA AGUDO Y CONDICIONES DE AYUNO SOBRE LA ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE LA CITOCROMO C OXIDASA (COMPLEJO IV), EN CEREBRO DE RATONES MACHOS *CF1*.**

SEVO: Sevoflurano, ISO: Isoflurano AIA: Alilisopropilacetamida, ALA: Ácido 5-Aminolevúlico. La actividad del Complejo I-III se expresa como porcentaje tomando al control del día en que se realizaron las experiencias como 100% (...). Valor control promedio:  $4,2 \pm 1,6$  nmol/mg. Los datos representan el valor medio  $\pm$  d.s. de 4-6 animales. (\*\*)  $p < 0,01$ : diferencia significativa entre el grupo tratado y el grupo control. Otros detalles experimentales se describen en Materiales y Métodos.

La actividad del Complejo IV se indujo por acción del Veronal (300%;  $p < 0,01$ ) y en condiciones de ayuno (133%;  $p < 0,01$ ); y se redujo por el tratamiento con Sevoflurano (77%;  $p < 0,01$ ). No se produjeron modificaciones en la actividad enzimática por los tratamientos con Isoflurano, AIA y etanol. El ALA produjo una inducción (161%;  $p < 0,01$ ) sobre la actividad de este Complejo.

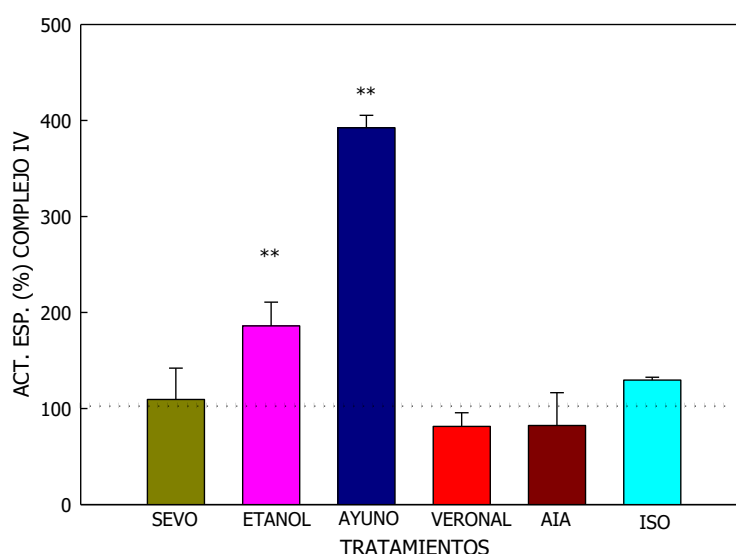
### I.5.2. ESTUDIOS REALIZADOS EN RATONES T1

Resultó de interés establecer si había diferencias en la actividad del Complejo IV debido a la variación genética que presenta el modelo genético de PAI, por lo cual

se realizó la validación del modelo murino comparando las mediciones obtenidas en los ratones PAI con los *C57BL/6* "Wild Type".

No se observaron variaciones significativas en los niveles basales de actividad de la Cox entre el grupo de ratones *C57* y el modelo genético (Actividad específica *C57BL/6*:  $3,6 \pm 0,2$  nmol/mg; T1:  $4,2 \pm 1,9$  nmol/mg;  $p=0,32$ ).

El efecto del Sevoflurano, etanol, AIA, Veronal y ayuno sobre la actividad del Complejo IV en ratones T1 se muestra en la [Figura I.8](#).



**FIGURA I.8: EFECTO DEL SEVOFLURANO, ETANOL, VERONAL, AIA Y CONDICIONES DE AYUNO SOBRE LA ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE LA CITOCROMO C OXIDASA (COMPLEJO IV), EN CEREBRO DE RATONES MACHO T1.**

SEVO: Sevoflurano, ISO: Isoflurano AIA: Alilisopropilacetamida. La actividad del Complejo IV se expresa como porcentaje tomando al control del día en que se realizaron las experiencias como 100% (...). Valor control promedio:  $4,2 \pm 1,9$  nmol/mg. Los datos representan el valor medio  $\pm$  d.s. de 4-6 animales. (\*\*)  $p<0,01$ : diferencia significativa entre el grupo tratado y el grupo control. Otros detalles experimentales se describen en Materiales y Métodos.

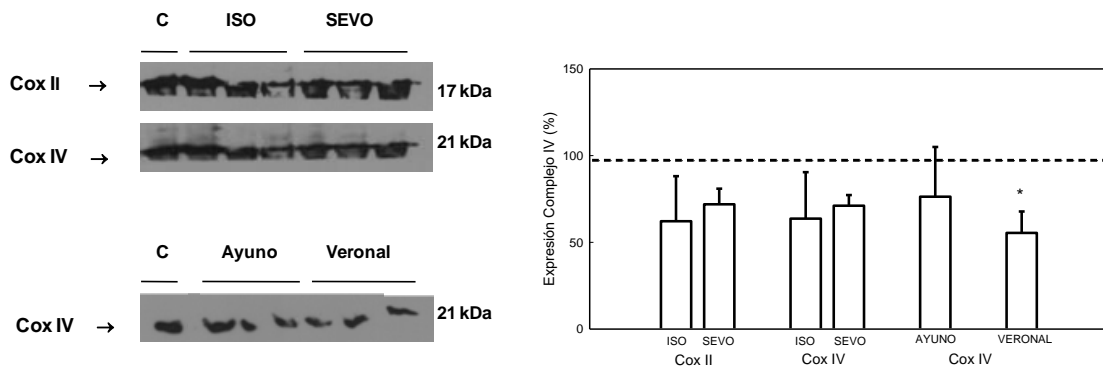
La actividad del Complejo IV se indujo por el tratamiento con etanol (86%;  $p<0,01$ ) y por el ayuno (392%;  $p<0,01$ ). No hubo variaciones en la actividad enzimática en los ratones que recibieron Sevoflurano, Isoflurano, AIA o Veronal.

### I.5.3. NIVELES DE EXPRESIÓN COMPLEJO IV

Dado que los efectos de los agentes estudiados sobre el Complejo IV fueron menos pronunciados en los ratones T1 a diferencia de lo que se observaba en los otros Complejos, resultó interesante evaluar si se veía afectada la expresión de esta proteína. La expresión se midió en los grupos que recibieron los anestésicos y en el

grupo tratado con veronal en el cual la actividad enzimática estaba muy aumentada en los ratones *CF1* y sin variación en los ratones T1. Independientemente de que los resultados fueron similares frente al ayuno, dado que esta condición está muy relacionada con los ataques agudos de Porfiria fue interesante ver si además el aumento en la actividad estaba relacionado con un aumento en la expresión.

Los resultados de la expresión de las subunidades Cox II y Cox IV para los tratamientos con anestésicos volátiles Sevoflurano e Isoflurano en el grupo de ratones T1 se muestran en la [Figura I.9](#).



**FIGURA I.9: EXPRESIÓN DE LA CITOCROMO C OXIDASA EN CEREBRO DE RATONES T1**

ISO: Isoflurano, SEVO: Sevoflurano. El autorradiograma muestra el análisis por Western Blot de la expresión de Cox. La columna representa la señal normalizada y cuantificada con un analizador de imágenes de 3 experimentos y se expresa como porcentaje tomando al grupo control como 100% (---).  $p < 0,05$ : diferencia significativa entre el grupo tratado y el grupo control. Otros detalles experimentales se describen en Materiales y Métodos.

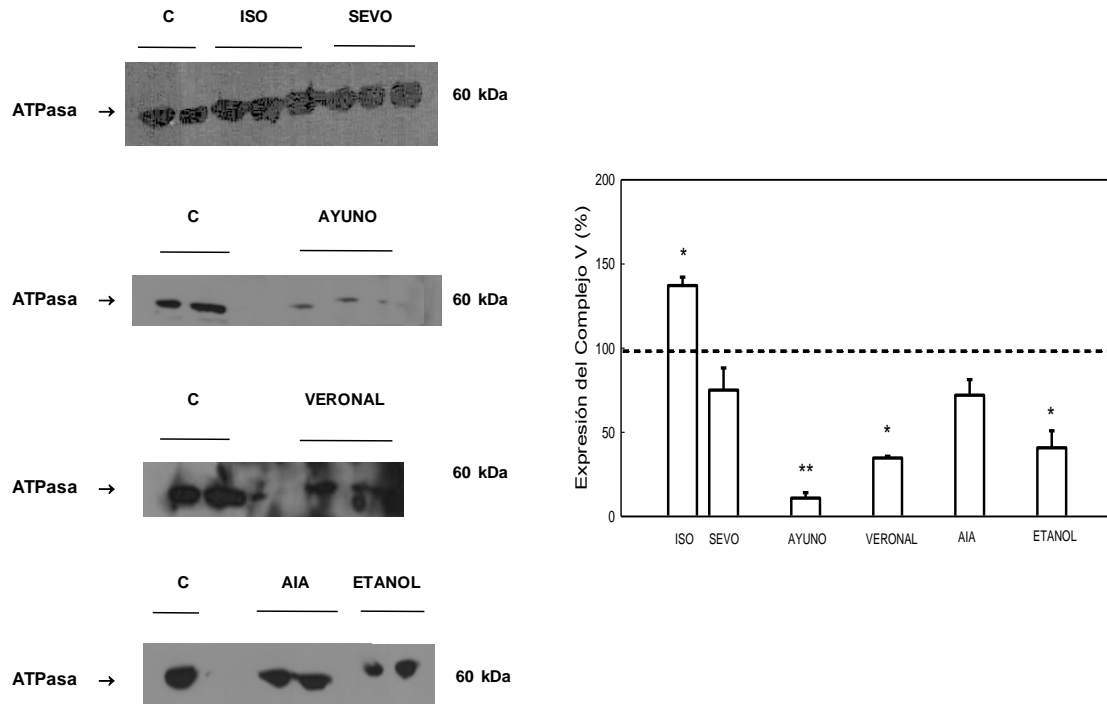
Los niveles de ambas isoformas mostraron una leve disminución de la expresión cuando el anestésico estudiado fue el Sevoflurano sin que dichas diferencias fueran estadísticamente significativas respecto de los valores controles.

Dado que no hubo variaciones en la expresión de ambas subunidades, para los tratamientos con veronal o en ratones ayunados, únicamente se evaluó la expresión de la subunidad Cox IV ([Figura I.9](#)). Se observó una disminución significativa en el grupo que recibió veronal sin que se produjeran variaciones en ratones ayunados.



### I.6. ATP SINTASA (Complejo V)

Se midieron los niveles de expresión proteica de la enzima ATPasa en los ratones T1 que fueron sometidos a los distintos tratamientos. Los resultados se muestran en la Figura I.10.



**FIGURA I.10: EXPRESIÓN DE LA ATPASA EN CEREBRO DE RATONES T1**

ISO: Isoflurano, SEVO: Sevoflurano, AIA: Alilisopropilacetamida. El autorradiograma muestra el análisis por Western Blot de la expresión de la ATPasa. La columna representa la señal normalizada y cuantificada con un analizador de imágenes de 3 experimentos y se expresa como porcentaje tomando al grupo control como 100% (-----). (\*)  $p < 0,05$ ; (\*\*)  $p < 0,01$ : diferencia significativa entre el grupo tratado y el grupo control. Otros detalles experimentales se describen en Materiales y Métodos.

La expresión proteica de ATPasa se indujo en animales que recibieron Isoflurano (30%,  $p < 0,05$ ). Una importante reducción en la expresión de ATPasa se produjo debido al ayuno (90%,  $p < 0,01$ ), Veronal (65%,  $p < 0,05$ ) y etanol (60%,  $p < 0,05$ ). El Sevoflurano y el AIA no afectaron los niveles de esta proteína.

## I.7. CONCLUSIONES CAPÍTULO I

En este Capítulo se estudiaron los efectos de los anestésicos volátiles y de otros agentes porfirinogénicos y el ALA sobre la cadena respiratoria en encéfalo de ratones *CF1* y en ratones T1, modelo de PAI.

Para poder evaluar en conjunto los efectos de cada tratamiento sobre los parámetros estudiados, se presentan los resultados anteriormente mostrados de forma cualitativa en ratones *CF1* (Tabla I.2).

**TABLA I.2: ACCIÓN DE AGENTES PORFIRINOGENICOS Y ALA SOBRE LA ACTIVIDAD DE LOS COMPLEJOS RESPIRATORIOS EN RATONES *CF1***

Ratones <i>CF1</i>				
Tratamientos	Complejos respiratorios			
	I-III	II-III	II	IV
SEVOFLURANO	=	↑	↑	↓
ISOFLURANO	↑	↓	=	=
ETANOL	↓	=	↓	=
AYUNO	↑	↓	=	↑
VERONAL	=	=	↑	↑
AIA	↓	↓	↓	=
ALA AGUDO	↓	=	↓	↑

↑ Aumento significativo respecto del grupo no tratado; ↓ Descenso significativo respecto del grupo no tratado; (=) Sin cambios significativos. AIA: Alilisopropilacetamida, ALA: Ácido 5-Aminolevulíco

En los ratones *CF1* se observaron alteraciones en los Complejos I a IV de la cadena respiratoria que dependieron del agente estudiado, afectando la actividad de uno o más Complejos.

El Isoflurano causó alteraciones bioquímicas importantes que afectaron la actividad de los Complejo I-III y II-III. El Sevoflurano aumentó la actividad de los Complejos II-III, II y IV.

El AIA causó una disminución en la actividad de los complejos respiratorios: I-III, II-III y II. El Veronal actuó aumentando la actividad de los Complejos II y IV, siendo

muy importante la inducción causada. El etanol generó alteraciones bioquímicas en los Complejos I-III y II. El ayuno afectó la actividad de los Complejos I-III, II-III y IV.

Bajo condiciones patofisiológicas de altas concentraciones de ALA, se produjo una disminución en la actividad de los Complejos I-III y II, sin embargo una importante inducción se detectó sobre la actividad del Complejo IV.

Estos resultados indicarían que los agentes estudiados afectaron los Complejos respiratorios lo que llevaría a la disrupción de la función mitocondrial, generando además un daño oxidativo, que podría ser consecuencia de las alteraciones sobre el metabolismo del hemo debida a los tratamientos.

A continuación se mencionan los principales resultados obtenidos al evaluar los efectos de los anestésicos volátiles y de otros agentes porfirinogénicos sobre la actividad de los Complejos respiratorios en un modelo genético de PAI (Tabla I.3).

**TABLA I.3: ACCIÓN DE AGENTES PORFIRINOGENICOS SOBRE LA ACTIVIDAD DE LOS COMPLEJOS RESPIRATORIOS I AL IV Y LA EXPRESIÓN DEL COMPLEJO V EN RATONES T1**

Ratones T1					
Tratamientos	Complejos respiratorios				
	I-III	II-III	II	IV	V
SEVOFLURANO	=	↓	↑	=	=
ISOFLURANO	=	↓	=	=	↑
ETANOL	↓	=	↓	↑	↓
AYUNO	↑	↑	↓	↑	↓
VERONAL	↓	↑	↑	=	↓
AIA	=	↑	=	=	=

↑ Aumento significativo respecto del grupo no tratado; ↓ Descenso significativo respecto del grupo no tratado; (=) Sin cambios significativos. AIA: Alilisopropilacetamida

Al igual que lo observado cuando se trabajó con ratones *CF1*, las alteraciones en el modelo T1 sobre los Complejos I a V de la cadena respiratoria dependieron del agente estudiado y también todos afectaron a alguno de los Complejos.

El Sevoflurano inhibió la actividad del Complejo II-III pero indujo la actividad del Complejo II. El efecto del Isoflurano se produjo tanto sobre la expresión del Complejo V, causando una inducción en los niveles de proteína, como sobre el Complejo II-III disminuyendo su actividad. Ni el Sevoflurano ni el Isoflurano modificaron la actividad o la expresión del Complejo IV.

El AIA causó una inducción en la actividad del Complejo II-III. El Veronal actuó disminuyendo la actividad del Complejo I-III y la expresión del Complejo V, además de inducir la actividad de los Complejos II-III y II. El etanol generó alteraciones bioquímicas en los Complejo I-III y II, disminuyendo su actividad, pero indujo el Complejo IV; por otro lado también disminuyó la expresión del Complejo V. El ayuno afectó los Complejos I-III, II-III y IV incrementando sus actividades; pero disminuyó la del Complejo II, así como la expresión del Complejo V.

En conclusión en este modelo de PAI, donde la biosíntesis del hemo se encuentra afectada, se observó una importante alteración en la cadena respiratoria que podría ser uno de los factores desencadenantes del ataque agudo.

Si comparamos los resultados en los ratones PAI respecto de los *CF1*, el Complejo II fue el más sensible en los ratones PAI respecto de los ratones *CF1*, lo que indicaría una mayor susceptibilidad a la acción de desencadenantes de Porfiria. Los efectos del ayuno fueron independientes de la mutación. Se observó una mayor sensibilidad de los ratones PAI al veronal, reflejado en los efectos sobre la actividad del Complejo II la cual no había variado en los ratones controles pero sufrió una importante inducción en los PAI. A excepción del etanol, el cual indujo la actividad del Complejo IV que había permanecido inalterada cuando este xenobiótico se administró a ratones *CF1*, una menor respuesta se observó en los ratones PAI frente al resto de los xenobióticos ya sea al medir la actividad o al evaluar la expresión. Es de destacar que los efectos mencionados no se deberían a la presencia de la mutación dado que no se observaron variaciones en los niveles basales de los Complejos respiratorios del modelo genético de PAI respecto al ratón "Wild Type".

El Complejo I es en general el más vulnerable de los Complejos de la Cadena Respiratoria afectando la integridad y la función mitocondrial (Shapira *et al.*, 1990). En ratones T1 la relación de los complejos I-III/II-III fue de mayor magnitud en ratones tratados con anestésicos volátiles respecto a los no tratados. Esta relación fue inversa en los *CF1* que recibieron los anestésicos. En el resto de los tratamientos, el patrón de la relación I-III/II-III fue variado. Es de destacar que la respuesta frente al veronal fue similar tanto en los ratones *CF1* como en los T1, disminuyendo la actividad del

Complejo I independientemente de la mutación. Estos resultados proveen una estimación del Complejo I, indicando una alteración como consecuencia de todos los tratamientos estudiados.

Se ha descrito *in vitro* que el Isoflurano y el Sevoflurano despolarizan la membrana mitocondrial por inhibición de la cadena de transporte de electrones y en particular inhibiendo el Complejo I (Bains *et al.*, 2006, 2009). En nuestro trabajo, se demostró que ambos anestésicos afectaron *in vivo* a la cadena respiratoria.

Shapira *et al.* (1990) demostraron que en individuos con enfermedad de Parkinson la actividad del Complejo I estaba disminuída. En el caso de los ratones modelo de PAI, la deficiencia en el Complejo I podría ser secundario al daño producido por el estrés oxidativo previamente descrito en encéfalo de ratones *CF1* (Rodríguez *et al.* 2005) y en el modelo de PAI (Ruspini *et al.*, 2018), aunque también se observó esta tendencia para algunos tratamientos en ratones *CF1* como en el caso de los anestésicos volátiles. Es de destacar que esta relación que podría estar asociada a alguna patología, la encontramos para diferentes tratamientos en ambos grupos de ratones, con y sin alteración genética, resaltando que en el caso de los ratones normales, al ser sometidos al tratamiento con anestésicos volátiles, la actividad del Complejo I es mayor en el grupo control y por el contrario en ratones PAI es mayor en el grupo tratado.

Homedan *et al.* (2014) observaron que en un modelo murino genético de PAI expuestos al fenobarbital, esta droga producía en hígado disminución en la actividad de los Complejos respiratorios. En este trabajo nosotros evaluamos el efecto del veronal, un análogo del fenobarbital, en encéfalo tanto en *CF1* como en un modelo murino genético de PAI y observamos aumento o disminución dependiendo del Complejo medido pero el Complejo I estimado a través de la relación I-III/II-III dio disminuído.

Díaz *et al.* (2012) observaron una vulnerabilidad específica diferencial en las distintas regiones del cerebro, en defectos específicos de la cadena respiratoria. La corteza piriforme fue la principal región afectada mostrando una disminución en la actividad del Complejo III, mientras la corteza retrosplenial / cingulada se vio afectada en menor medida. En la corteza piriforme observaron deficiencia del Complejo IV. Tales diferencias en la vulnerabilidad regional son comunes en enfermedades neurodegenerativas asociadas a defectos en la cadena de transporte de electrones mitocondrial, como lo muestran los análisis de encéfalo en pacientes con Alzheimer.

Vilas Boas Mota *et al.* (2018) observaron en el hipocampo esclerótico de pacientes con Epilepsia una marcada reducción en la expresión del Complejo IV, al igual que nosotros observamos debido al tratamiento con etanol, ayuno y Veronal. En pacientes de edades avanzadas que padecen la enfermedad de Alzheimer también se ha descrito una disfunción de la ATP sintasa (Complejo V) mitocondrial (Gauba *et al.*, 2017). Torres-Sanchez *et al.* (2018) propusieron que la producción excesiva de ROS en neuronas en la esclerosis múltiple podría generar cambios en las propiedades de la membrana mitocondrial, modificando su fluidez y afectando la actividad de la ATPasa.

A pesar de los vínculos considerables entre la biosíntesis del hemo y el metabolismo energético mitocondrial, muy pocos estudios han abordado la posible afectación de un defecto del metabolismo energético mitocondrial en la PAI, la mayoría de ellos se realizaron en distintos tejidos, mayoritariamente en hígado (Homedan *et al.*, 2014, 2015), y no han analizado los efectos sobre el cerebro.

Una vez más podemos observar que estos agentes afectan más de un metabolismo con lo cual como ya mencionamos anteriormente, no habría sólo una causa para justificar el desencadenamiento del ataque agudo y entender las bases patofisiológicas que llevan al mismo.

## 1.8. REFERENCIAS

Bains R, Moe MC, Larsen GA, Berg-Johnsen J, Vinje ML.(2006) Volatile anaesthetics depolarize neural mitochondria by inhibition of the electron transport chain. *Acta Anaesthesiol Scand* 50 (5):572–579.

Bains R., Moe M.C, Vinje M.I., Berg-Johnsen J. (2009) Isoflurane-induced depolarization of neural mitochondria increases with age. *Acta anaesthesiol scand* 53:85–92.

Diaz F., Garcia S., Padgett K.R. Moraes C.T. (2012) A defect in the mitochondrial complex III, but not complex IV, triggers early ROS-dependent damage in defined brain regions. *Hum Mol Genet* 21(23):5066-5077.

Gauba E., Guo L., Du H. (2017) Cyclophilin D Promotes Brain Mitochondrial F1FO ATP Synthase Dysfunction in Aging Mice. *J Alzheimers Dis.* 55(4):1351–1362.

Homedan C., Laafia J., Schmitt C., Gueguen N., Lefebvre T., Karim Z., Desquirit-Dumas V., Wetterwald C., Deybach J.C., Gouyac L., Puy H., Reynier P., Malthiery Y. (2014) Acute intermittent porphyria causes hepatic mitochondrial energetic failure in a mouse model. *Int J Biochem Cell Biol* 51:93-101.

Homedan C., Schmitt C., Laafi J., Gueguen N., Desquirit-Dumas V., Lenglet H., Karim Z., Gouya L., Deybach J.C., Simard G., Puy H., Malthiery Y., Reynier P. (2015) Mitochondrial energetic defects in muscle and brain of a Hmbs<sup>-/-</sup> mouse model of acute intermittent porphyria. *Hum Mol Genet.* 24(17):5015-5023.

Rodríguez J., Martínez M. del C., Gerez E., Batlle A., Buzaleh A.M. (2005) Heme oxygenase, Aminolevulinic acid synthetase and the antioxidant system in the brain of mice treated with porphyrinogenic drugs. *Cell Mol Biol* 51:487-494.

Ruspini S.F., Zuccoli J.R., Lavandera J.V., Martínez M. del C., Oliveri L.M., Gerez E.N., Batlle A., Buzaleh A.M. (2018) Effects of volatile anaesthetics on heme metabolism in a murine genetic model of Acute Intermittent Porphyria. A comparative study with other porphyrinogenic drugs. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 1862(6):1296-1305.

Schapira A. H. V., Cooper J. M., Dexter D., Jenner P., Clark J. B., Marsden C. D. (1990) Mitochondrial Complex I deficiency in Parkinson's disease. *J Neurochem* 54(3):23-827.

Torres-Sanchez E. D., Pacheco-Moises F.P., Macias-Islas M. A., Morales-Sanchez E. W., Ramirez-Ramirez V., Celis de la Rosa A. J., Cid-Hernandez M., Sorto-Gomez T. E., Ortiz G.G. (2018) Effect of fish and olive oil on mitochondrial ATPase activity and membrane fluidity in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis treated with interferon beta 1-b. *Nutr Hosp* 35(1):162-168.

Vilas Boas Mota M., Cunha Zaidan B., Morato do Canto A., Ghizoni E., Tedeschi H., De Souza Queiroz L., Alvim M.K.M., Cendes F., Lopes-Cendes I., Almeida Schenka A., Schwambach Vieira A., Rogerio F. (2018) ATP Synthase Subunit Beta Immunostaining is Reduced in the Sclerotic Hippocampus of Epilepsy Patients. *Cell Mol Neu* 39(1): 149–160.

## CAPÍTULO II

### ALTERACIONES EN EL CICLO DE KREBS Y DAÑO A INTEGRIDAD MITOCONDRIAL

Con el fin de estudiar el efecto de las diferentes drogas porfirinogénicas sobre la cadena respiratoria y relacionarlo con alteraciones en el metabolismo del hemo, se midieron las actividades de las enzimas Fumarasa y Aconitasa, pertenecientes al ciclo de Krebs en un modelo murino de PAI. Por otro lado también se evaluó el grado de daño a proteínas y lípidos en mitocondrias de encéfalo murino. Los ratones que recibieron anestésicos volátiles, etanol, AIA, veronal o que se sometieron a 24 horas de ayuno.

Cabe mencionar que una de las teorías del desencadenamiento de la neuropatía Porfírica es la que relaciona a un desbalance energético producido por la disminución de los equivalentes de reducción disponibles para la cadena respiratoria y que podría deberse a un menor funcionamiento del ciclo de Krebs por una disminución de acetil CoA, sustrato del ALA-S.

Para validar el modelo murino genético de PAI, se establecieron los niveles basales de las actividades enzimáticas estudiadas en modelo genético murino y se los comparó con los niveles basales de ratones "Wild type" de la cepa *C57BL/6*.

#### II.1. ENZIMAS DEL CICLO DE KREBS

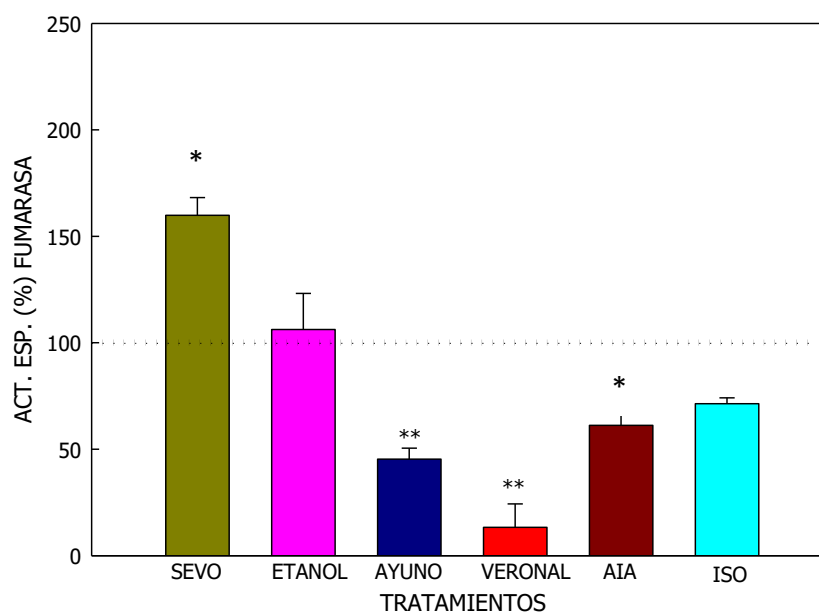
##### II.1.1. FUMARASA

Resultó de interés establecer si había diferencias en la actividad de la Fumarasa debido a la variación genética que presenta el modelo genético de PAI, por lo cual se realizó la validación del modelo murino comparando las mediciones obtenidas en los ratones PAI con los *C57BL/6* "Wild Type".

Los niveles basales de la enzima Fumarasa fueron similares en ambos grupos, no observándose variaciones debidas a la presencia de la mutación (Actividad específica *C57BL/6*:  $77,8 \pm 8,8$  nmol/mg; T1:  $66,3 \pm 16,6$  nmol/mg;  $p=0,07$ ).

El efecto de las distintas drogas y condiciones porfirinogénicas sobre la actividad de la enzima Fumarasa de encéfalo en un modelo murino de PAI se muestra en la Figura II.1.





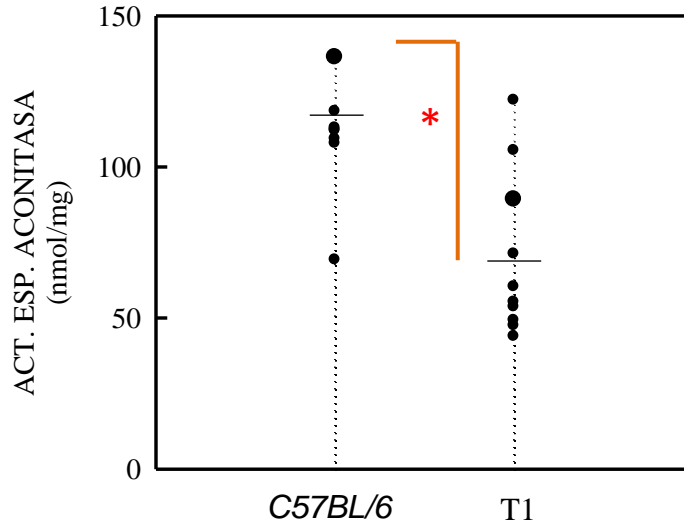
**FIGURA II.1: EFECTO DEL SEVOFLURANO, ETANOL, VERONAL, AIA Y CONDICIONES DE AYUNO SOBRE LA ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE LA ENZIMA FUMARASA, EN CEREBRO DE RATONES MACHO T1.**

SEVO: Sevoflurano, ISO: Isoflurano AIA: Alilisopropilacetamida. La actividad del Complejo I-III se expresa como porcentaje tomando al control del día en que se realizaron las experiencias como 100% (...). Valor control promedio:  $66,3 \pm 16,6$  nmol/mg. Los datos representan el valor medio  $\pm$  d.s. de 4-6 animales.  $p < 0,05$ ; (\*\*)  $p < 0,01$ : diferencia significativa entre el grupo tratado y el grupo control. Otros detalles experimentales se describen en Materiales y Métodos.

La actividad de la enzima se incrementó 60% ( $p < 0,05$ ) en los ratones tratados con Sevoflurano, mientras que el Isoflurano y el etanol no causaron alteraciones significativas. Se observó una disminución por efecto del Veronal (87%;  $p < 0,01$ ), AIA (40%;  $p < 0,05$ ) y en condiciones de ayuno (55%;  $p < 0,01$ ).

### II.1.2. ACONITASA

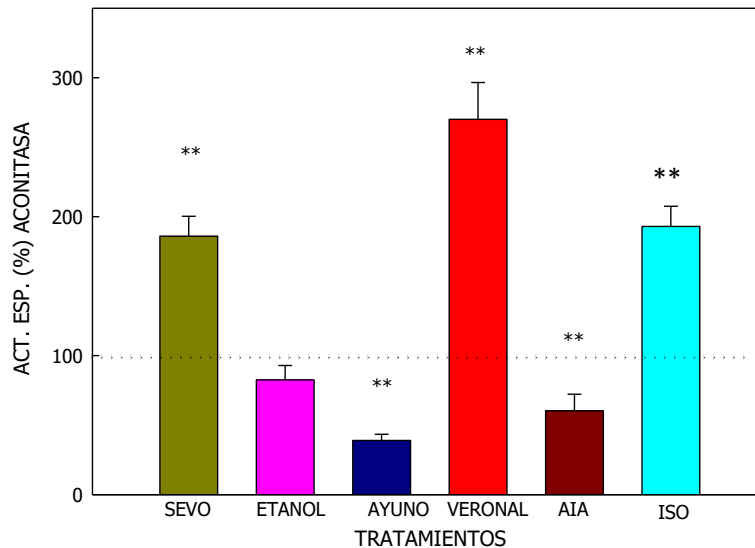
Resultó de interés establecer si había diferencias en la actividad de la enzima Aconitasa debido a la variación genética que presenta el modelo genético de PAI, por lo cual se realizó la validación del modelo murino comparando las mediciones obtenidas en los ratones PAI con los C57BL/6 "Wild Type". Los resultados se muestran en la [Figura II.2](#). La actividad específica basal de la Aconitasa en los ratones PAI fue significativamente menor ( $p < 0,05$ ) respecto a la actividad en los ratones "Wild Type".



**FIGURA II.2: NIVELES BASALES DE ACTIVIDAD DE LA ENZIMA ACONITASA**

— Actividad promedio. (\*)  $p < 0,05$ : diferencia significativa entre el modelo genético de PAI y los ratones “wild type”. Otros detalles experimentales se describen en Materiales y Métodos

El efecto de las distintas drogas y condiciones porfirinogénicas sobre la actividad de la enzima Aconitasa en ratones T1 se muestra en la [Figura II.3](#).



**FIGURA II.3: EFECTO DEL SEVOFLURANO, ETANOL, VERONAL, AIA Y CONDICIONES DE AYUNO SOBRE LA ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE LA ENZIMA ACONITASA, EN CEREBRO DE RATONES MACHO T1.**

SEVO: Sevoflurano, ISO: Isoflurano AIA: Alilisopropilacetamida. La actividad de Aconitasa se expresa como porcentaje tomando al control del día en que se realizaron las experiencias como 100% (...). Valor control promedio:  $69,8 \pm 25,5$  nmol/mg. Los datos representan el valor medio  $\pm$  d.s. de 4-6 animales. (\*\*)  $p < 0,01$ : diferencia significativa entre el grupo tratado y el grupo control. Otros detalles experimentales se describen en Materiales y Métodos.

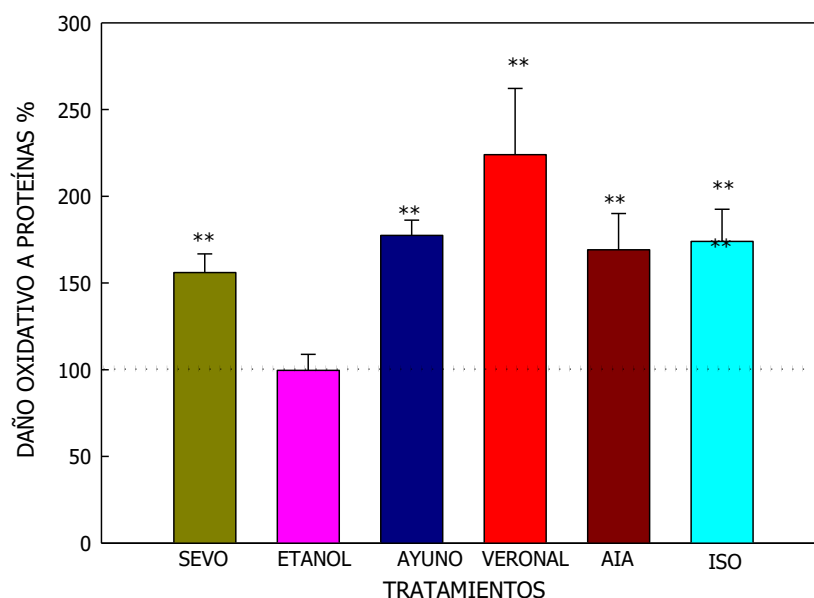
La actividad enzimática se incrementó 269% ( $p<0,01$ ) debido al tratamiento con Veronal, 86% ( $p<0,01$ ) por acción del Sevoflurano y 93% ( $p<0,01$ ) por el Isoflurano. Se observó una disminución del 60% ( $p<0,01$ ) por efecto del AIA y del 61% ( $p<0,01$ ) en los ratones ayunados.

## II.2. FUNCIONALIDAD DE LA MITOCONDRIA

### II.2.1. DAÑO A PROTEÍNAS MITOCONDRIALES

Se evaluó el daño oxidativo sobre proteínas ocasionado por el efecto de las distintas drogas y condiciones porfirinogénicas en encéfalo en un modelo murino de PAI. Los resultados se muestran en la [Figura II.4](#).

Se observaron daños a proteínas mitocondriales en todos los tratamientos, con excepción del etanol.



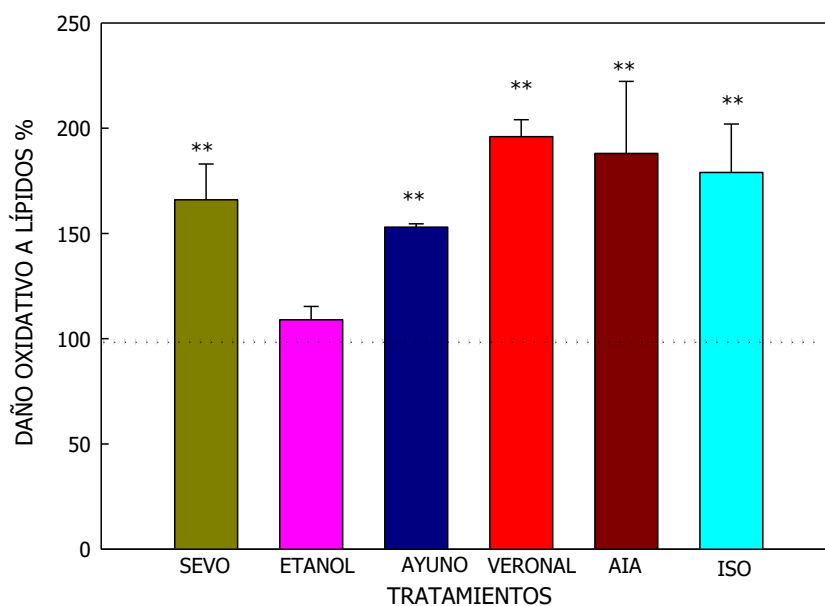
**FIGURA II.4: EFECTO DEL SEVOFLURANO, ETANOL, VERONAL, AIA Y CONDICIONES DE AYUNO SOBRE PROTEÍNAS MITOCONDRIALES, EN CEREBRO DE RATONES MACHO T1.**

SEVO: Sevoflurano, ISO: Isoflurano, AIA: Alilisopropilacetamida. Los valores se expresan como porcentaje tomando al control del día en que se realizaron las experiencias como 100% (...). Los datos representan el valor medio  $\pm$  d.s. de 4-6 animales. (\*\*)  $p<0,01$ : diferencia significativa entre el grupo tratado y el grupo control. Otros detalles experimentales se describen en Materiales y Métodos.

### II.2.2. DAÑO A LÍPIDOS MITOCONDRIALES

Se evaluó el daño oxidativo lipídico ocasionado por el efecto de las distintas drogas y condiciones porfirinogénicas los lípidos mitocondriales de encéfalo en un modelo murino de PAI se muestra en la [Figura II.5](#).

Se observó daños a lípidos mitocondriales en todos los tratamientos, con excepción del etanol.



**FIGURA II.5: EFECTO DEL SEVOFLURANO, ETANOL, VERONAL, AIA Y CONDICIONES DE AYUNO SOBRE LÍPIDOS MITOCONDRIALES, EN CEREBRO DE RATONES MACHO T1.**

SEVO: Sevoflurano, ISO: Isoflurano AIA: Alilisopropilacetamida. Los valores se expresan como porcentaje tomando al control del día en que se realizaron las experiencias como 100% (...). Los datos representan el valor medio  $\pm$  d.s. de 4-6 animales. (\*\*)  $p < 0,01$ : diferencia significativa entre el grupo tratado y el grupo control. Otros detalles experimentales se describen en Materiales y Métodos.

### II.2.3. NIVELES DE HEMO Y CITOCROMOS

Con el fin de evaluar si las alteraciones detectadas sobre las enzimas de la Cadena Respiratoria podrían deberse a variaciones en los niveles de hemo como grupo prostético de las mismas, se cuantificó el contenido de hemo aa3 y de los citocromos aa3, b y c en encéfalo de animales T1 que recibieron los anestésicos Isoflurano y Sevoflurano, y los otros agentes porfirinogénicos. En la [Tabla II.1](#) se muestran los resultados obtenidos.

No se observaron diferencias significativas en los niveles de hemo ni en los distintos citocromos cuantificados debido al tratamiento con los anestésicos. Una importante reducción (70%;  $p < 0,05$ ) se observó en animales tratados con AIA y también en animales ayunados aunque en menor proporción. Por el contrario debido al veronal y al etanol, los niveles se indujeron más del 100% ( $p < 0,05$ ).

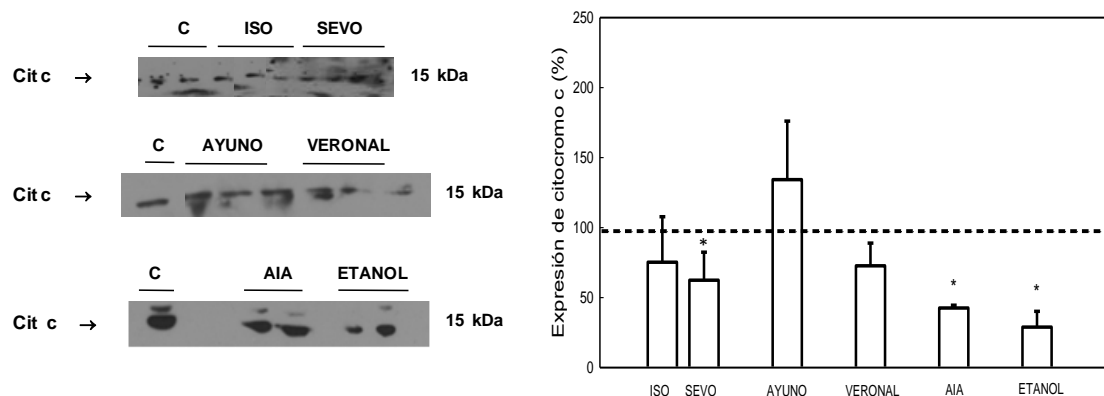
**TABLA II.1: CONTENIDO DE HEMO Y CITOCROMOS LUEGO DEL TRATAMIENTO CON ISOFLURANO Y SEVOFLURANO**

Tratamiento	Contenido de hemo y citocromos (%)			
	Hemo aa3	Citocromo b	Citocromo c	Citocromo aa3
Isoflurano	139,4 ± 13,1	85,1 ± 23,8	120,0 ± 30,3	130,9 ± 30,3
Sevoflurano	86,1 ± 10,5	73,6 ± 9,2	148,9 ± 3,2*	103,2 ± 18,0
Etanol	128,6 ± 68,2	303,7 ± 135,6*	237,7 ± 117,8*	470,8 ± 202,0*
Ayuno	60,1 ± 3,7*	65,2 ± 3,8*	65,7 ± 1,3*	85,5 ± 5,4
Veronal	305,9 ± 134,5*	242,1 ± 92,2*	268,1 ± 108,6*	267,78 ± 119,7*
AIA	25,8 ± 12,0*	25,0 ± 14,0*	25,5 ± 10,0*	25,48 ± 14,0*

AIA: alilisopropilacetamida. Los valores se expresan como porcentaje tomando al control del día en que se realizaron las experiencias como 100%. (\*)  $p < 0,05$ : diferencia significativa entre el grupo tratado y el grupo control. Los detalles experimentales se describen en Materiales y Métodos.

Además teniendo en cuenta que una disminución de los niveles de citocromo c podría ser un indicador de daño mitocondrial, se midió la expresión de esta proteína en mitocondria de ratones T1. Los resultados se muestran en la [Figura II.6](#).

Se observó una disminución en los niveles de Citocromo c debido al tratamiento con Sevoflurano (30%;  $p < 0,05$ ), mientras que el Isoflurano no produjo alteraciones. Una disminución similar se detectó en animales que recibieron AIA o etanol. El veronal o la situación de ayuno no produjeron variaciones significativas.



**FIGURA II.6: EXPRESIÓN DE CITOCROMO C EN CEREBRO DE RATONES T1**

ISO: Isoflurano, SEVO: Sevoflurano, AIA: Alilisopropilacetamida. El autorradiograma muestra el análisis por Western Blot de la expresión del Citocromo C. La columna representa la señal normalizada y cuantificada con un analizador de imágenes de 3 experimentos y se expresa como porcentaje tomando al grupo control como 100% (-----). (\*)  $p < 0,05$ : diferencia significativa entre el grupo tratado y el grupo control. Otros detalles experimentales se describen en Materiales y Métodos.

#### II.2.4. FUNCIONALIDAD MITOCONDRIAL

Para profundizar en la evaluación del estado de la mitocondria se realizó el ensayo de MTT. La experiencia se realizó en ratones T1 que recibieron tratamiento con los distintos agentes porfirinogénicos. Los resultados se muestran en la Tabla II.2.

**TABLA II.2: FUNCIONALIDAD DE LA MITOCONDRIA**

Tratamiento	Ensayo MTT (%)
Isoflurano	140,1 ± 22,1*
Sevoflurano	93,7 ± 14,9
Etanol	122,9 ± 29,4
Ayuno	67,7 ± 0,9*
Veronal	173,0 ± 15,4*
AIA	282,1 ± 129,0*

AIA: alilisopropilacetamida. Los valores se expresan como porcentaje tomando al control del día en que se realizaron las experiencias como 100%. (\*)  $p < 0,05$ : diferencia significativa entre el grupo tratado y el grupo control. Los detalles experimentales se describen en Materiales y Métodos.

El ensayo de MTT presentó alteraciones significativas en los animales T1 tratados con Isoflurano, veronal, AIA o ayunados. Los valores no variaron debido al Sevoflurano y etanol.

### II.3. CONCLUSIONES CAPÍTULO II

En este Capítulo se evaluaron los efectos de los anestésicos volátiles y de otros agentes porfirinogénicos sobre el Ciclo de Krebs en ratones T1.

Al igual que en el Capítulo I se muestran los resultados obtenidos en forma cualitativa a fin de tener una visión más general de los mismos (Tabla II.1). En dicha Tabla también se agregaron los efectos sobre la actividad de la Succinato deshidrogenasa, enzima que además de formar parte de la Cadena respiratoria (Complejo II), integra el Ciclo de Krebs.

**TABLA II.I: ACCIÓN DE AGENTES PORFIRINOGENICOS Y ALA SOBRE LA ACTIVIDAD DE ENZIMAS DEL CICLO DE KREBS EN RATONES T1**

Ratones T1			
Tratamientos	Ciclo de Krebs		
	Fumarasa	Aconitasa	Succinato deshidrogenasa
SEVOFLURANO	↑	↑	↑
ISOFLURANO	=	↑	=
ETANOL	=	=	↓
AYUNO	↓	↓	↓
VERONAL	↓	↑	↑
AIA	↓	↓	=

↑ Aumento significativo respecto del grupo no tratado; ↓ Descenso significativo respecto del grupo no tratado; (=) Sin cambios significativos. AIA: Alilisopropilacetamida

Se observaron alteraciones en las enzimas del ciclo de Krebs evaluadas que dependieron del agente estudiado, como se desprende de la Tabla II.1.

El Isoflurano causó alteraciones bioquímicas que afectaron únicamente la actividad de la Aconitasa. Un efecto similar se observó debido al Sevoflurano que además aumentó la actividad de la enzima Fumarasa y de la Succinato deshidrogenasa. El Veronal también causó una importante alteración bioquímica reduciendo la actividad de la Fumarasa, mientras que causó una inducción en la actividad de la Aconitasa y de la Succinato deshidrogenasa. El ayuno produjo una disminución en la actividad de las enzimas estudiadas. El etanol no causó alteraciones bioquímicas significativas en ninguna de las enzimas estudiadas en este Capítulo, si bien había causado una disminución en la actividad de la Succinato deshidrogenasa. El tratamiento con AIA generó variaciones bioquímicas similares en la actividad de Fumarasa y Aconitasa, disminuyendo las actividades enzimáticas.

Las alteraciones observadas en las enzimas medidas del Ciclo de Krebs podrían causar una deficiencia de los cofactores que proveen los equivalentes de reducción necesarios para la Cadena respiratoria.

No hay que dejar de mencionar que los ratones T1 tienen disminuida genéticamente la enzima PBG-D y como consecuencia de ello inducida la primera enzima de la biosíntesis del hemo, el ALA-S (Lieberg *et al.*, 1996; Ruspini *et al.*, 2018). Además, la actividad de la Aconitasa está disminuida espontáneamente debido a la mutación, lo que indicaría una alteración basal en el funcionamiento del ciclo de Krebs en cerebro de ratones modelo de PAI.

La conjunción de los factores mencionados anteriormente conduciría a una alteración de la función mitocondrial. Sin embargo a excepción del ayuno, el ensayo del MTT reveló una mitocondria activa.

Hay que destacar que todos los tratamientos, con excepción del etanol, causaron daño a proteínas y lípidos en diferentes magnitudes dependiendo del agente o condición empleada.

La determinación de la magnitud de la peroxidación lipídica es dificultosa debido a que los productos de la misma son muy reactivos y de corta vida. El MDA es el aldehído más significativo obtenido en dicha degradación y también el más cuantificado (Practico *et al.*, 1998). Sin embargo, aunque poco específica, la reacción del TBA se considera un método muy sensible para la determinación de la peroxidación lipídica en tejidos animales (Ohkawa *et al.*, 1979) y con tal finalidad se utiliza con frecuencia. Se han observado niveles elevados de derivados de la peroxidación lipídica en cerebro de pacientes con enfermedad de Alzheimer (Selley *et*



*al.*, 2002), enfermedad de Parkinson (Dexter *et al.*, 1989), así como también en líquido cefalorraquídeo de pacientes con esclerosis lateral amiotrófica (Peterson *et al.*, 2001).

Se observó también que evaluando la integridad mitocondrial a través de la presencia de Citocromo c mitocondrial, la mayoría de los tratamientos produjeron alteraciones ya sea en los niveles o en su expresión que podrían justificarse en general teniendo en cuenta los mecanismos de metabolización de los distintos xenobióticos estudiados. Estos resultados fueron similares a cuando se cuantificaron los niveles de otros tipos de hemo.

Además de trastornos mitocondriales específicos, el deterioro de la función mitocondrial se ha vinculado también a muchas enfermedades neurodegenerativas y al envejecimiento, posiblemente por alteraciones en la cadena de transporte de electrones que puede producir un exceso de radicales libres, conduciendo a la producción de daño oxidativo (Diaz *et al.*, 2012). Con excepción del etanol y Sevoflurano, en ratones T1 hemos observado que el resto de los tratamientos afectan la funcionabilidad mitocondrial. Pero por otro lado todos ellos han afectado la actividad de los Complejos respiratorios que la componen.

Dado que los radicales libres pueden causar daño en la estructura y/o función de proteínas, ácidos nucleicos y los lípidos de la membrana, son considerados factores contribuyentes de los procesos degenerativos y que estarían involucrados en el desencadenamiento de las diferentes enfermedades neurodegenerativas (Quintana *et al.* 2010). Los resultados observados en ratones T1, con excepción del etanol muestran que los tratamientos generan daño oxidativo tanto en proteínas como en lípidos mitocondrial y esto podría contribuir al deterioro de la función mitocondrial.

Los resultados obtenidos en este Capitulo tambien refuerzan lo reportado previamente y dan sustento a nuestra hipótesis en la cual se sostiene que hay más de un factor alterado que explicaría la patogénesis del ataque agudo en la PAI (Lavandera, 2008; Rodríguez, 2008).

En la mitocondria se estarían afectando en simultáneo la biosíntesis del hemo (Ruspini *et al.*, 2018), la cadena respiratoria y el ciclo de Krebs, ya sea por acciones directas sobre estos caminos metabólicos o por la interrelacion que hay entre ellos.

## II.4. REFERENCIAS

Dexter F., Saidel G.M., Rudy Y. (1989) Simulation of the diffusion of acetylcholine in the neuroeffector junctions of the sinus node. *J Theor Biol* 141(4):505-514.

Diaz F., Garcia S., Padgett K.R., Moraes C.T. (2012) A defect in the mitochondrial complex III, but not complex IV, triggers early ROS-dependent damage in defined brain regions. *Hum Mol Genet* 21(23):5066-5077.

Lavandera J. (2008) Rol del citocromo P-450 en la metabolización de drogas porfirinogénicas en cerebro y su modulación por el óxido nítrico. Tesis Doctoral. Universidad de Buenos Aires.

Lindberg R.L., Porcher C., Grandchamp B., Ledermann B., Bürki K., Brandner S., Aguzzi A., Meyer U.A. (1996) Porphobilinogen deaminase deficiency in mice causes a neuropathy resembling that of human hepatic porphyria. *Nat Genet* 12(2):195-199.

Ohkawa H., Ohishi N., Yagi K. (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95(2):351-358.

Peterson J.W., Bo L., Mork S., Chang A., Trapp B.D. (2001) Transected neurites, apoptotic neurons, and reduced inflammation in cortical multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol* 50:389-400.

Praticò D., Barry O.P., Lawson J.A., Adiyaman M., Hwang S.W., Khanapure S.P., Iuliano L., Rokach J., FitzGerald G.A. (1998) IPF2alpha-I: an index of lipid peroxidation in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95(7):3449-3454.

Quintana A., Kruse S.E., Kapur R.P., Sanz, E., Palmiter R.D. (2010) Complex I deficiency due to loss of Ndufs4 in the brain results in progressive encephalopathy resembling Leigh syndrome. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 107 10996-11001.

Rodriguez J. (2008) Estudios sobre la neuropatía de la porfiria aguda experimental. Tesis doctoral. Universidad de Buenos Aires.

Ruspini S.F., Zuccoli J.R., Lavandera J.V., Martínez M. del C., Oliveri L.M., Gerez E.N., Batlle A., Buzaleh A.M. (2018) Effects of volatile anaesthetics on heme metabolism in a murine genetic model of Acute Intermittent Porphyria. A comparative study with other porphyrinogenic drugs. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 1862(6):1296-1305.

Selley M.L., Close D.R., Stern S.E. (2002) The effect of increased concentrations of homocysteine on the concentration of (E)-4-hydroxy-2-nonenal in the plasma and cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 23(3):383-388.

## CAPÍTULO III

### ALTERACIONES EN LA ISOFORMA MITOCONDRIAL DE LA ENZIMA ÓXIDO NÍTRICO SINTASA

El hemo es el grupo prostético de un gran número de proteínas que cumplen diversas funciones biológicas, por lo que juega un papel vital en el metabolismo celular, las biotransformaciones químicas, la detoxificación de drogas, el transporte de oxígeno, la respiración mitocondrial y la transducción de señales. Es una de las moléculas biológicamente más diversificada en la naturaleza, y su deficiencia podría desencadenar un daño celular severo.

La importancia del NO en cerebro está determinada por sus efectos fisiológicos en las neuronas, la glía y el sistema vascular y en condiciones patológicas por su participación en enfermedades neurodegenerativas.

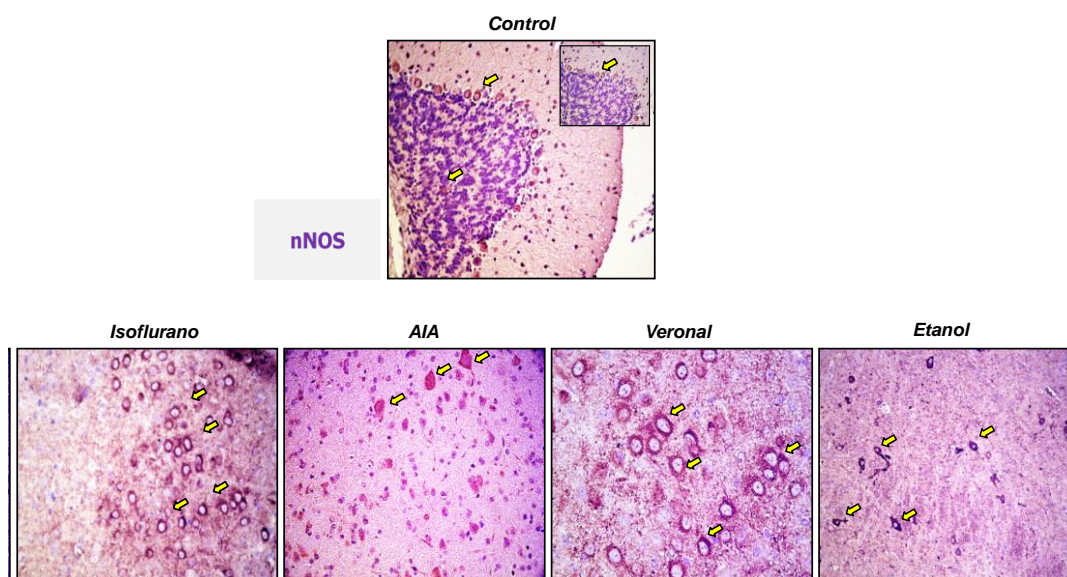
Una de las teorías para explicar la patofisiología del ataque agudo en las Porfirias estaría relacionada con bajos niveles de hemo como cofactor de hemoproteínas entre ellas la NOS. Previamente se observó que la actividad y expresión de NOS en encéfalo de ratón varió según la droga estudiada.

Por lo expuesto, en este Capítulo se muestran los resultados obtenidos cuando se analizó el efecto de los agentes porfirinogénicos sobre isoformas de la NOS (nNOS, iNOS) en diferentes células cerebrales de ratón. Además se midió la actividad de mtNOS y/o su expresión en mitocondria de cerebro frente a los distintos tratamientos.

#### III.1. ESTUDIOS INMUNOHISTOQUÍMICOS

Se utilizó la técnica de inmunohistoquímica usando anticuerpos específicos y el sistema streptavidina-biotina-peroxidasa con DAB para el revelado, para evaluar el efecto de los agentes porfirinogénicos sobre la expresión proteica de isoformas de la NOS en diferentes células cerebrales de ratón, para lo cual se contó con la colaboración del Dr. R. Meiss (Academia Nacional de Medicina).

Estos estudios se realizaron en los ratones *CF1* y los resultados obtenidos al analizar la expresión de nNOS e iNOS se muestran en las Figuras III.1 y III.2 respectivamente.



**FIGURA III.1: EFECTO DEL ISOFLURANO, AIA, VERONAL Y ETANOL SOBRE LA EXPRESIÓN DE ISOFORMA NEURONAL DE LA ÓXIDO NÍTRICO SINTASA EN CÉLULAS DEL CEREBRO DE RATONES CF1**

Control: aumento x250, Inset: x400. Isoflurano y Veronal: x400. AIA y etanol: x250. AIA: Alilisopropilacetamida

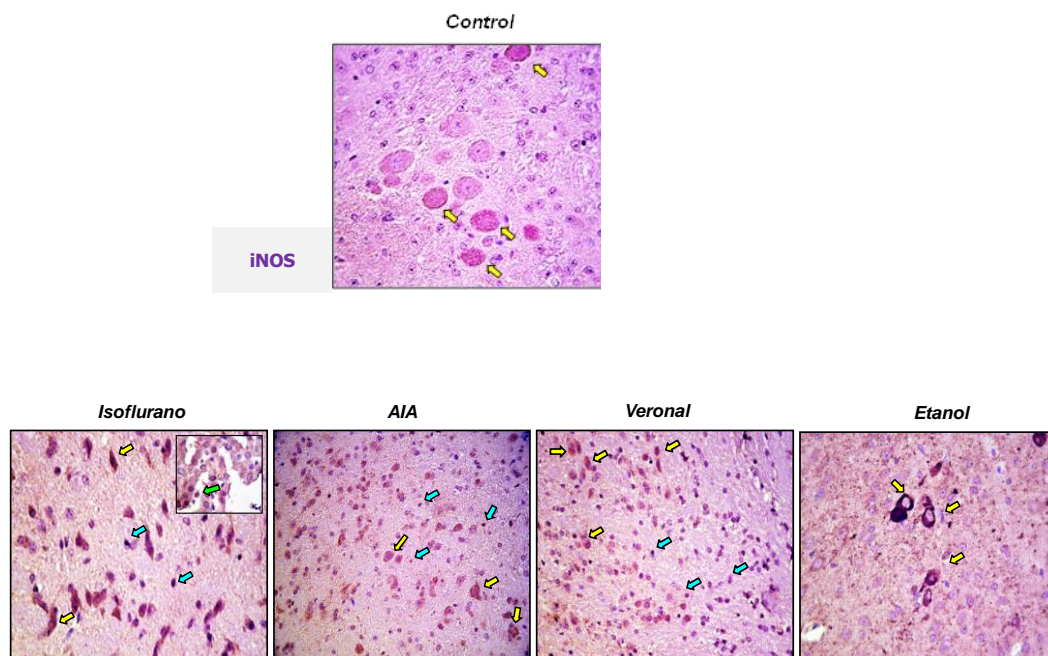
Las principales observaciones que se pueden mencionar al analizar las imágenes de la expresión de nNOS (Figura III.1) son:

- **Control:** La corteza del cerebelo muestra marcación levemente positiva en las células de Purkinje,
- **Isoflurano:** Marcación positiva intensa en neuronas para n-NOS.
- **AIA:** Marcación positiva moderada en neuronas para n-NOS.
- **Veronal:** Marcación positiva intensa en neuronas (granulosas) para n-NOS.
- **Etanol:** Marcación positiva intensa en neuronas para n-NOS.
- La marcación para n-NOS fue negativa en células de la glia en todos los casos.

En cuanto a la expresión de la iNOS (Figura III.2) se pudo observar :

- **Control:** Marcación positiva leve en neuronas y negativa en células de la glia para i-NOS.
- **Isoflurano:** Marcación positiva moderada en neuronas e intensa en células de la glia para i-NOS. Inset: El plexo coroideo muestra epitelio con marcación positiva intensa en citoplasma y núcleo para iNOS.
- **AIA:** Marcación positiva leve/moderada en neuronas y moderada en células de la glia para i-NOS.

- **Veronal:** Marcación positiva moderada en neuronas y en células de la glia.
- **Etanol:** Marcación positiva intensa en neuronas aisladas y moderada en células de la glia para i-NOS.



**FIGURA III.2: EFECTO DEL ISOFLURANO, AIA, VERONAL Y ETANOL SOBRE LA EXPRESIÓN DE LA ISOFORMA INDUCIBLE DE LA ÓXIDO NÍTRICO SINTASA EN CÉLULAS DEL CEREBRO DE RATONES *CF1***

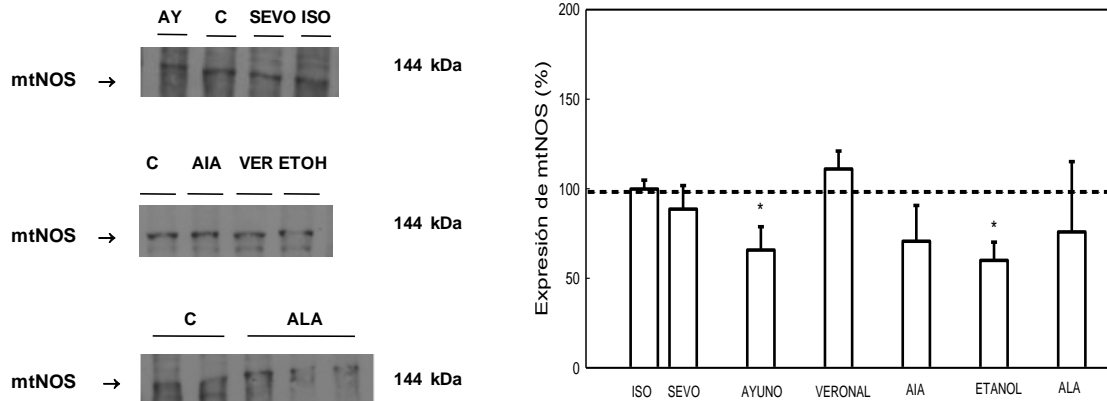
Control: aumento x400, Inset: x400. Isoflurano y etanol: x400. AIA: x250. AIA: Alilisopropilacetamida

## III.2. ÓXIDO NÍTRICO SINTASA MITOCONDRIAL

### III.2.1. ESTUDIOS REALIZADOS EN RATONES *CF1*

Se midieron los niveles de expresión proteica de la isoforma mitocondrial de la NOS en los ratones *CF1* que fueron sometidos a los distintos tratamientos. Los resultados se muestran en la [Figura III.3](#).

No se produjeron variaciones significativas en la expresión de la mtNOS en ninguno de los grupos estudiados, a excepción del ayuno y el etanol.

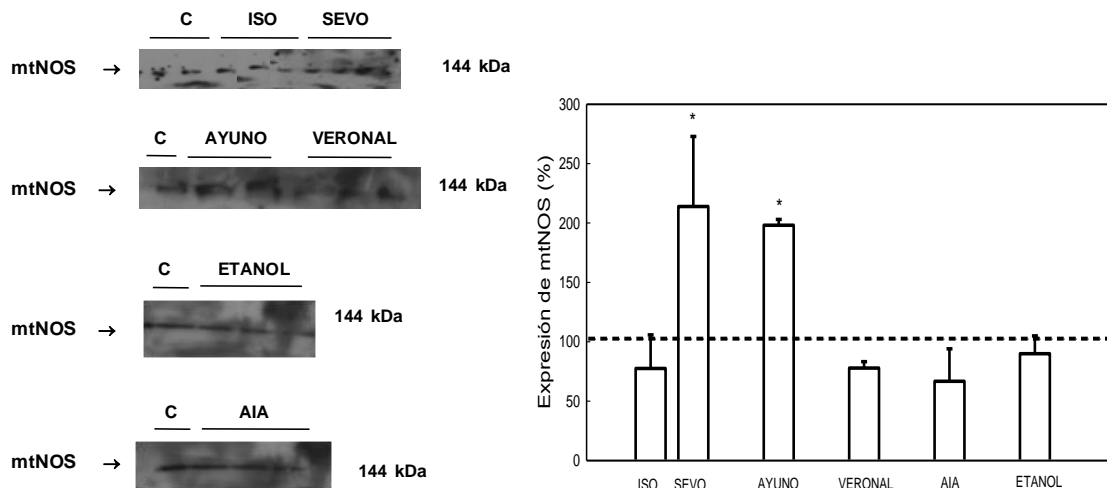


**FIGURA III.3: EXPRESIÓN DE LA ÓXIDO NÍTRICO SINTASA MITOCONDRIAL EN CEREBRO DE RATONES CF1**

ISO: Isoflurano, SEVO: Sevoflurano, AIA: alilisopropilacetamida. El autorradiograma muestra el análisis por Western Blot de la expresión de mtNOS. La columna representa la señal normalizada y cuantificada con un analizador de imágenes y se expresa como porcentaje tomando al grupo control como 100% (--). (\*)  $p < 0,05$ : diferencia significativa entre el grupo tratado y el grupo control. Otros detalles experimentales se describen en Materiales y Métodos.

### III.2.2. ESTUDIOS REALIZADOS EN RATONES T1

Se estudió si se producían alteraciones en la expresión de mtNOS en cerebro de ratones T1 causada por la administración de los diferentes tratamientos. Los resultados se muestran en la [Figura III.4](#).



**FIGURA III.4: EXPRESIÓN DE LA ÓXIDO NÍTRICO SINTASA MITOCONDRIAL (mtNOS) EN CEREBRO DE RATONES T1**

ISO: Isoflurano, SEVO: Sevoflurano, AIA: Alilisopropilacetamida. El autorradiograma muestra el análisis por Western Blot de la expresión de mtNOS. La columna representa la señal normalizada y cuantificada con un analizador de imágenes y se expresa como porcentaje tomando al grupo control como 100% (--). (\*)  $p < 0,05$ : diferencia significativa entre el grupo tratado y el grupo control. Otros detalles experimentales se describen en Materiales y Métodos.

El Isoflurano no produjo efectos sobre la expresión de mtNOS. Sin embargo, una importante inducción en la expresión proteica (70%;  $p < 0,05$ ) se observó luego de la administración de Sevoflurano. El ayuno causó una inducción similar. No se observaron variaciones significativas luego del tratamiento con AIA, etanol o veronal.

Para corroborar si el aumento en la expresión observado luego del tratamiento con Sevoflurano se correlacionaba con un aumento en la actividad enzimática, se midió la actividad de mtNOS luego del tratamiento con Isoflurano y Sevoflurano. En ambos casos se detectó una inducción como se indica en la [Tabla III.1](#)

**TABLA III.1: ACTIVIDAD ESPECÍFICA mtNOS EN RATONES T1**

TRATAMIENTO	Act. Esp. mtNOS (%)
Isoflurano	201,14 ± 20,5 *
Sevoflurano	211,16 ± 35,2 *

Los valores se expresan como porcentaje tomando al control del día en que se realizaron las experiencias como 100%. (\*)  $p < 0,05$ : diferencia significativa entre el grupo tratado y el grupo control. Los detalles experimentales se describen en Materiales y Métodos.

### III.3. CONCLUSIONES

A continuación se mencionan los principales resultados obtenidos al evaluar los efectos de los anestésicos volátiles y de otros agentes porfirinogénicos sobre la NOS.

Los estudios inmunohistoquímicos revelaron que en los ratones *CF1* se detectó expresión positiva de n-NOS e i-NOS en neuronas. En neuronas, la expresión proteica de nNOS aumentó frente a todos los xenobióticos ensayados; una marca más intensa para iNOS se vio únicamente luego de la anestesia, veronal y etanol. Además se detectó inducción de la expresión en el plexo coroideo y en células de la glia en la mayoría de los grupos.

Cuando se estudió la expresión proteica de mtNOS por Western blot no se produjeron variaciones en la enzima de ratones *CF1* debido a los anestésicos. Sin embargo, un aumento se detectó en el modelo genético de PAI causado por el Sevoflurano que se correlacionó con un aumento en la actividad, mientras que para el

Isoflurano el efecto se observó sólo sobre la actividad enzimática. Lavandera *et al.* (2011) demostraron en cerebro de ratones *CF1* un aumento en la actividad de mtNOS causado por el Isoflurano.

Estudios *in vitro* han demostrado que la mayoría de los anestésicos inhiben las hemoenzimas, sugiriendo que los anestésicos podrían tener afinidad por la mitad hémica de dichas proteínas (Chen *et al.*, 1994). Por otro lado el NO media la vasodilatación producida por esta clase de drogas, entonces, en tejidos cerebrales, durante la anestesia, son posibles tanto un incremento como una disminución de las concentraciones de NO. Baumane *et al.* (2002) observaron que la acción de los anestésicos volátiles está ligada a un incremento en el contenido de NO en la corteza, dependiente de la actividad de la NOS. Sjakste *et al.* (2005) encontraron un incremento en el contenido de NO en la corteza de cerebro de ratas luego de la anestesia con Sevoflurano e Isoflurano.

La activación de mtNOS llevaría a un incremento en la síntesis de NO en la mitocondria, lo cual podría derivar en un aumento de anión superóxido y, dependiendo de los niveles de SOD, un aumento de peróxido de hidrógeno (Sarkela *et al.*, 2001; Riobó *et al.*, 2002). Esta situación de estrés oxidativo podría producirse luego de la administración de los anestésicos. Rodríguez *et al.* (2005) observaron una disminución en la actividad de SOD citoplasmática por efecto de los anestésicos agudos.

Hay que tener en cuenta que el cerebro es especialmente sensible a las ROS (Campese *et al.*, 2004; Schiavone *et al.*, 2013) y al estrés oxidativo producido por el ALA y podrían ser una de las razones que conducirían a la sintomatología neurológica de la PAI (Halliwell, 2001; Adhikari *et al.*, 2006).

Muchos estudios *in vivo* han examinado los efectos del etanol sobre los caminos de señalización del NO en encéfalo, los resultados obtenidos han sido contradictorios; algunos autores han encontrado disminución de expresión de NOS (Zima *et al.*, 1998), mientras que otros observaron ambos efectos, incremento (Xia *et al.*, 1999; Dizon *et al.*, 2004) o disminución (Fataccioli *et al.*, 1997) en la actividad de la NOS. La magnitud y la dirección del cambio en la expresión de la NOS dependería del tipo de célula, y del tiempo de exposición (Davis & Syapin, 2005). Nuestros resultados mostraron que la expresión de mtNOS no varió luego de 1 semana de administración de etanol en el modelo de PAI, sin embargo estaba disminuída en los ratones *CF1*.

La inhibición de NOS tendría consecuencias sobre las funciones biológicas mediadas por NO, produciendo alteraciones en el SNC. La inhibición de la NOS podría



deberse a una reducción del pool de hemo libre como resultado de la acción de las drogas porfirinogénicas ensayadas.

Como se mencionó en la Introducción Ítem I.4.7, la mtNOS y su producto NO modulan la función mitocondrial inhibiendo los complejos I, III y IV (Navarro & Boveris, 2008; Bombicino *et al.*, 2017). Además la mtNOS es regulada por numerosos factores. Nuestros resultados mostraron en ratones *CF1* ayunados una reducción en los niveles de expresión de la mtNOS que se correlacionaba con un aumento en la actividad de los Complejos I-III y IV. En ratones alcoholizados si bien se produjo una disminución en los niveles proteicos de mtNOS, también se observó una disminución en la actividad del Complejo I evidenciando que estarían actuando otros factores en la regulación de la cadena respiratoria.

### III.4 REFERENCIAS

- Adhikari A., Penatti C., Resende R., Ulrico H., Britto L. & Bechara, E. (2006) 5-Aminolevulinic acid and 4,5-dioxovaleric acid ions decrease GABA(A) receptor density in neuronal cells, synaptosomes and rat brain. *Brain Res* 1093:95–104.
- Baumane L., Dzintare M., Zvejniece L., Meirena D., Lauberte L., Sile V., Kalvinsh I., Sjakste N. (2002) Increased synthesis of nitric oxide in rat brain cortex due to halogenated volatile anesthetics confirmed by EPR spectroscopy. *Acta Anaesthesiol Scand* 46:378-383.
- Bombicino S.S., Iglesias D.E., Rukavina-Mikusic I.A., Buchholz B., Gelpi R.J., Boveris A., Valdez L.B. (2017) Hydrogen peroxide, nitric oxide and ATP are molecules involved in cardiac mitochondrial biogenesis in Diabetes. *Free Radic Biol Med* 112:267-276.
- Campese V.M., Ye S., Zhong H., Yanamadala V., Ye Z., Chiu J. (2004) Reactive oxygen species stimulate central and peripheral sympathetic nervous system activity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287:H695–H703.
- Chen Q.M., Queen G., LaBella F.S. (1994) Lipid oxygenases and general anesthesia: effects of general anesthetics on cytochrome P450 monooxygenase (P450), prostaglandin synthase (PGS) and 12-lipoxygenase (LP). *Can J Physiol Pharmacol* 72: 357-365.
- Davis R.L., Syapin P.J. (2005) Interactions of alcohol and nitric-oxide synthase in the brain. *Brain Res Reviews* 49:494-504.
- Dizon M.L.V., Brown L.A., Black S.M. (2004) Brain Nitric Oxide Synthase levels increase in response to antenatal ethanol exposure. *Alcohol Alcoholism* 39:101-105.
- Fataccioli V., Gentil M., Nordmann R., Rouach H. Inactivation of cerebellar nitric oxide synthase by ethanol in vitro. *Alcohol Alcoholism* 32:683-691.
- Lavandera J., Batlle A., Buzaleh A.M. (2011) Mice brain nitric oxide synthase response induced by anaesthetics and other porphyrinogenic drugs system: another target for the action of porphyrinogenic agents. *Drug Metab Lett* 5:25-29.
- Navarro A., Boveris A. (2008) Mitochondrial nitric oxide synthase, mitochondrial brain dysfunction in aging, and mitochondria-targeted antioxidants. *Adv Drug Deliv Rev* 60(13-14):1534-1544.

Riobó, N.A.; Melani, M.; Sanjuán, N.; Fiszman, M.L.; Gravielle, M.C.; Carreras M.C, Cadenas, E. & Poderoso, J.J. (2002) The modulation of mitochondrial Nitric-oxide Synthase activity in rat brain development. *J Biol Chem* 277:42447-42455.

Rodríguez J.L., Martínez M. del C., Gerez E., Batlle A., Buzaleh A.M. (2005) Heme oxygenase, aminolevulinate acid synthetase and the antioxidant system in the brain of mice treated with porphyrinogenic drugs. *Cell Mol Biol* 51:487-494.

Sarkela T.M., Berthiaume J., Elfering S., Gybina A.A., Giulivi C. (2001) The modulation of oxygen radical production by nitric oxide in mitochondria. *J Biol Chem* 276:6945-6949.

Sjakste N., Sjakste J., Boucher J.L., Baumane L., Sjakste T., Dzintare M., Meirena D., Sharipova J., Kalvinsh I. (2005) Putative role of nitric oxide synthase isoforms in changes of nitric oxide concentration in rat brain cortex and cerebellum following sevoflurane and isoflurane anaesthesia. *Eur J Pharmacol* 513:193-205.

Xia J., Simonyi A., Sun G.Y. (1999) Chronic ethanol and iron administration on iron content, neuronal nitric oxide synthase, and superoxide dismutase in rat cerebellum. *Alcoholism Clin Exp Res* 23:702-707.

Zima T., Druga R., Stipek S. (1998) The influence of chronic moderate ethanol administration on NADPH-diaphorase (nitric oxide synthase) activity in rat brain. *Alcohol* 33:341-346.

## CONCLUSIONES GENERALES

La mitocondria juega un rol vital en el metabolismo energético y muerte celular, la homeostasis del calcio y la generación de ROS.

El hemo es una de las moléculas biológicamente más diversificadas en la naturaleza; siendo cofactor en una gran variedad de proteínas como la Citocromo c oxidasa y los citocromos. La disminución de hemo ya sea por fallas en su biosíntesis o por un catabolismo acelerado, promueve colapso del potencial de membrana mitocondrial, estrés oxidativo, alteración de la homeostasis del Ca<sup>++</sup> y liberación de citocromo c de la mitocondria, induciendo apoptosis.

Además, el hemo es un cofactor crucial de los componentes clave de la fosforilación oxidativa, como la Ubiquinol-citocromo c óxido reductasa (Complejo III, hemo bL y bH), la Citocromo oxidasa (Complejo IV, hemo a y a<sub>3</sub>) y el citocromo c, que transportan electrones desde el Complejo III al Complejo IV. La actividad de la enzima ALA-S depende del ciclo de Krebs para su sustrato; se ha demostrado que la succinil-CoA y la isoforma eritroide ALAS-2 interactúan directamente a través de un dominio de unión específico C-terminal con la subunidad beta de la Succinil-CoA sintetasa 2 (Bishop *et al.*, 2012).

Las Porfirias son enfermedades producidas por alteraciones en la biosíntesis del hemo. Cada tipo de Porfiria es el resultado de una deficiencia parcial de alguna de las enzimas de dicho camino metabólico, caracterizada por un patrón específico de acumulación y excreción de intermediarios. Todas las Porfirias hepáticas agudas presentan síntomas neurológicos que consisten en dolor abdominal agudo con disfunción autonómica, global o focal del sistema nervioso central (SNC) y polineuropatía motora. El daño neurológico y la degeneración axonal pueden ser las lesiones patológicas primarias con desmielinización secundaria.

Existen tres teorías para explicar las causas del ataque neurológico agudo: Una relacionada con la neurotoxicidad de precursores de la biosíntesis del hemo, principalmente el ALA, y la otra con la reducción del pool de hemo celular. Finalmente la teoría más novedosa postula un desbalance en el ciclo de los ácidos tricarbóxicos, debido a un aumento en la utilización de succinil-CoA, sustrato del ALA-S, y como consecuencia de ello disminuirían los cofactores reducidos, necesarios para el transporte de electrones en las reacciones de la cadena respiratoria.

Los fármacos, y en particular los anestésicos, son factores exógenos que precipitan ataques en las porfirias agudas, además del ayuno y el estrés. Un elevado porcentaje de individuos con Porfiria aguda desarrolla una crisis luego o durante una cirugía. Por lo tanto, es de suma importancia estudiar el potencial efecto porfirinogénico de los anestésicos.

Trabajos realizados en nuestro laboratorio demostraron que los anestésicos Enflurano e Isoflurano modifican la actividad de algunas enzimas del metabolismo del hemo, reproduciendo algunos de los signos bioquímicos de la PAI efecto dependiente de la cepa y el sexo. Dentro de la línea de investigación cuyo objetivo es elucidar los mecanismos que conducen a la neuropatía porfírica, en nuestro laboratorio se demostró que la administración de conocidas drogas porfirinogénicas a ratones produce alteración en el sistema colinérgico y el glutamatergico; el metabolismo del hemo y el sistema de defensa antioxidante, el sistema metabolizante del drogas de Fase I y el metabolismo del óxido nítrico en encéfalo de ratones cepa *CF1*. Alteraciones similares también fueron observadas en un modelo murino de PAI, observando una mayor susceptibilidad a la acción de los anestésicos.

El objetivo general de esta Tesis fue: Estudiar los mecanismos mediante los cuales los anestésicos volátiles alteran el metabolismo mitocondrial.

Se analizó el efecto de los anestésicos volátiles como el Sevoflurano y el Isoflurano y de otras drogas ó condiciones porfirinogénicas sobre la cadena respiratoria mitocondrial en encéfalo de ratón. Se midieron las actividades de: NADH-Citocromo C reductasa (Complejo I-III), Succinato-Citocromo C reductasa (Complejo II-III), Succinato deshidrogenasa (Complejo II) y Citocromo c oxidasa (Complejo IV). Se cuantificó la relación entre las actividades de los Complejos I-III y I-II para estimar la actividad del Complejo I. Se detectaron alteraciones en los distintos Complejos de la cadena respiratoria mitocondrial. El Isoflurano causó alteraciones bioquímicas importantes que afectaron la actividad del Complejo I-III y en menor medida al Complejo II-III y al Complejo II. El Sevoflurano afectó la actividad de los Complejos II-III, II y IV. El etanol generó alteraciones bioquímicas en el Complejo II pero no en el Complejo II-III, afectando también al Complejo I-III. El ayuno afectó la actividad de los Complejos I-III, II-III y IV. El Veronal y el ALA agudo afectaron la actividad de los Complejos I-III, II y IV. El tratamiento con AIA modificó la actividad de los Complejos I-III y del II. En conclusión, todos los tratamientos causaron variaciones en la cadena respiratoria alterando uno o más Complejos.

Teniendo en cuenta los datos observados resultó de interés evaluar si dichas alteraciones también se observaban en un modelo murino genético de PAI. En los ratones T1 el ayuno indujo la actividad del Complejo I-III y redujo la de los Complejos II y IV. El tratamiento con Veronal aumentó la actividad de los Complejos II-III y II. El etanol disminuyó la actividad de los Complejos I-III y II e indujo al IV. El Sevoflurano aumentó la actividad del Complejo II. El AIA indujo la actividad del Complejo II-III.

Con el fin de evaluar si las modificaciones observadas en la cadena respiratoria podrían deberse a una alteración en la disponibilidad de los cofactores obtenidos en el ciclo de Krebs, se decidió analizar el efecto de estas drogas y condiciones porfirinogénicas en las enzimas Fumarasa y Aconitasa en cerebro de ratones T1.

La actividad de la enzima Fumarasa en estos ratones aumentó debido al tratamiento con Sevoflurano; mientras que bajo efectos de ayuno, administración de veronal o AIA, se observó una reducción en la actividad de Fumarasa. No se observaron alteraciones en el tratamiento con Isoflurano y etanol. Cuando se midió la actividad de Aconitasa, también se observó un aumento luego de que los animales recibieran veronal, Sevoflurano e Isoflurano; mientras que la actividad disminuyó debido al tratamiento con AIA y al ayuno.

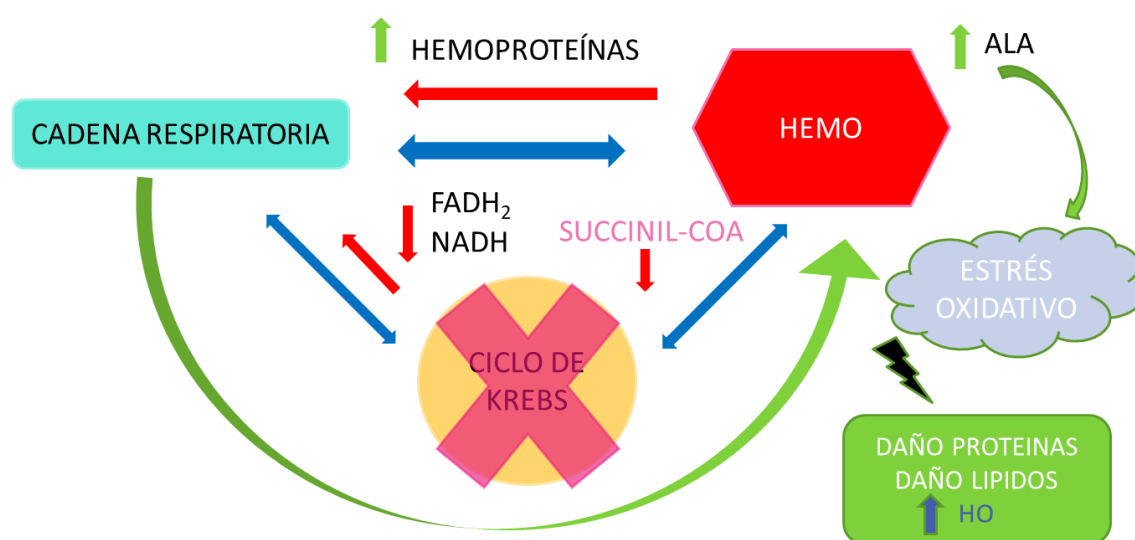
La respiración con succinato impulsada por el Complejo II también se vio afectada significativamente tanto en los ratones *CF1* como en T1. Estos resultados sugieren una cataplerosis del ciclo de Krebs inducida por los distintos agentes porfirinogénicos y anestésicos volátiles, causada por la retirada masiva de succinil-CoA por la inducción de ALA-S, de modo que el ciclo de Krebs es incapaz de suministrar los cofactores reducidos a la cadena respiratoria.

Los Complejos I-III contienen grupos de hierro-azufre que podrían ser el motivo del estrés oxidativo generado por la sobreproducción de ALA en la PAI. Se sabe que dichos grupos de hierro-azufre representan objetivos críticos para los ROS (Rötig et al., 2002) que contribuyen a la fisiopatología de la PAI (Hermes-Lima et al., 1992).

Se evaluó la funcionalidad de la mitocondria analizando si los distintos tratamientos generaban daño a proteínas y a lípidos; además se midió el contenido de hemo y citocromos. Se observaron en todos los tratamientos con excepción del etanol, daño tanto a lípidos como a proteínas. El contenido de hemo y citocromos no varió debido a los anestésicos sin embargo la expresión de citocromo c estaba disminuida luego del tratamiento con Sevoflurano. Un aumento en los niveles de hemo y citocromo se observó debido al tratamiento con etanol y Veronal; y una disminución a causa del

AIA y las condiciones de ayuno. Independientemente de todas estas alteraciones la funcionalidad de la mitocondria no se vio alterada.

En el siguiente esquema se muestra la interrelación entre los metabolismos y cómo la alteración de uno de ellos produce un desbalance en la mitocondria afectando a las otras vías.



El fuerte aumento de la actividad de la enzima ALA-S durante las crisis de la PAI probablemente consume la mayor parte de succinil-CoA que está disponible en las mitocondrias. La sustracción aguda de este metabolito intermediario podría alterar el ciclo de Krebs, un fenómeno conocido como cataplerosis, que generalmente se compensa con reacciones anapleróticas que contrarrestan la falta del metabolito (Nelson & Cox, 2000). Los resultados obtenidos indicarían que las enzimas mitocondriales de la cadena respiratoria y del ciclo de Krebs estarían implicadas transitoriamente en el desencadenamiento del ataque agudo de la PAI.

Sin embargo, además de esta hipótesis de cataplerosis y con respecto a la estrecha interconexión de las vías metabólicas involucradas, no se puede excluir la participación de otros mecanismos ni en el deterioro de la cadena respiratoria ni en los trastornos metabólicos mitocondriales. Tampoco hay que considerar el impacto directo o indirecto de la deficiencia de hemo y la sobreproducción de ALA en la respiración, y el daño oxidativo.

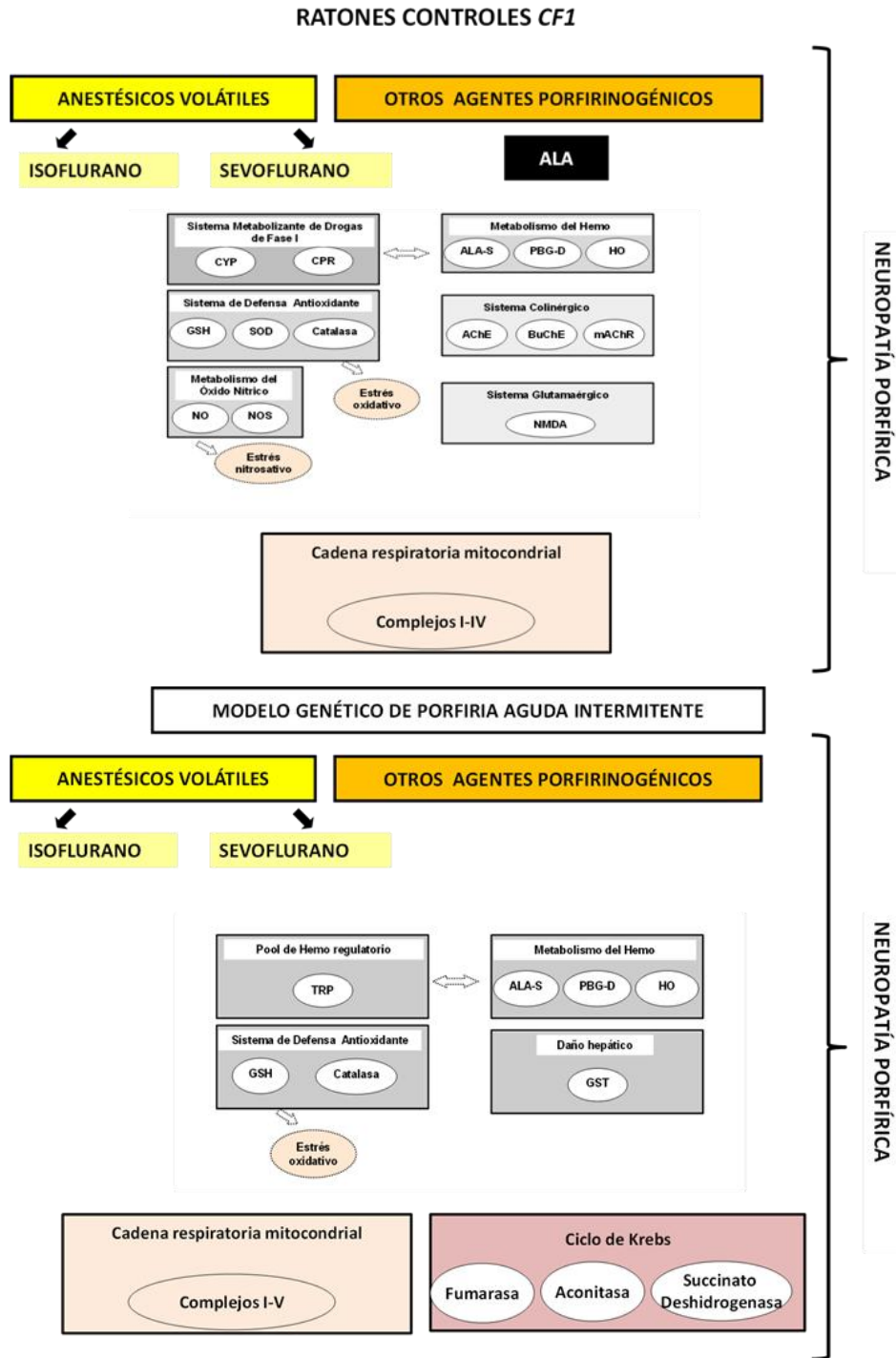
Entre los compuestos que afectan al metabolismo de la mitocondria, el óxido nítrico (NO) ha adquirido recientemente un papel central. La producción de NO

mitocondrial es catalizada por mtNOS. El NO posee, además de su rol fisiológico, numerosos efectos patofisiológicos sobre la mitocondria. El NO inhibe la Cox, último Complejo del transporte electrónico mitocondrial, desencadenando apoptosis y además genera especies reactivas de nitrógeno como peroxinitrito, que inhibe los Complejos mitocondriales I, II, IV y V, la Aconitasa, la creatina quinasa, y la superóxido dismutasa mitocondrial y daña la membrana liberando citocromo c. Este proceso es relevante en las enfermedades neurodegenerativas.

Los efectos fisiológicos del NO se observan en las neuronas, la glia y el sistema vascular; además se ha descrito su participación en condiciones patológicas en enfermedades neurodegenerativas; y como mencionáramos anteriormente una de las teorías para explicar la patofisiología del ataque agudo en las Porfirias estaría relacionada con bajos niveles de hemo como cofactor de hemoproteínas entre ellas la NOS. Se estudió la expresión de esta enzima en diferentes células del cerebro en los ratones que recibieron los diferentes tratamientos, siendo dicha expresión más significativa en las células de la glia para iNOS. Además se observó inducción proteica de mtNOS luego del tratamiento con Sevoflurano.

En los esquemas que se muestran a continuación están compilados los estudios realizados en esta Tesis con investigaciones previas de nuestro laboratorio tanto para ratones *CF1* como aquellos metabolismos estudiados en el modelo genético de PAI (Rodríguez *et al.*, 2002, 2005; Lavandera *et al.*, 2007, 2011, 2015, 2016; Ruspini *et al.*, 2018).

Los resultados refuerzan lo previamente descrito acerca de la variedad de metabolismos afectados por las drogas porfirinogénicas, que conducirían a la patogénesis del ataque agudo en el desencadenamiento de las Porfirias, y dan sustento a nuestra hipótesis en la cual se sostiene que hay más de un factor alterado que explicaría la patogénesis del ataque agudo en la PAI; en el cual se estarían afectado en simultáneo la biosíntesis del hemo (Ruspini *et al.*, 2018), la cadena respiratoria y el ciclo de Krebs, ya sea por acciones directas sobre estos caminos metabólicos o por la interrelación que hay entre ellos.



Este es el primer trabajo que evaluó la acción de los anestésicos volátiles en un modelo genético de PAI estudiando en la mitocondria 3 metabolismos que están íntimamente relacionados como ser la cadena respiratoria, el ciclo de Krebs y el metabolismo del NO, confirmando nuestros resultados previos acerca de la porfirinogenicidad de dichos compuestos y en general la multiplicidad de sitios de acción de las drogas porfirinogénicas lo que hacen difícil establecer una única causa para el desencadenamiento del ataque agudo en la PAI.



**BIBLIOGRAFIA**

- Bishop D.F., Tchaikovskii V., Hoffbrand A.V., Fraser M.E., Margolis S. (2012) X-linked sideroblastic anemia due to carboxyl-terminal ALAS2 mutations that cause loss of binding to the subunit of succinyl-CoA synthetase (SUCLA2). *J Biol Chem* 287:28943–28955
- Hermes-Lima M., Castilho R.F., Valle V.G., Bechara E.J., Vercesi A.E. (1992) Calcium-dependent mitochondrial oxidative damage promoted by 5-aminolevulinic acid. *Biochim Biophys Acta* 1180:201–206.
- Lavandera J.V., Batlle A.M., Buzaleh A.M. (2007) Metabolization of porphyrinogenic agents in brain: involvement of the phase I drug metabolizing system. A comparative study in liver and kidney. *Cell Mol Neurobiol* 27(6):717-729.
- Lavandera J., Batlle A., Buzaleh A.M. (2011) Mice brain nitric oxide synthase response induced by anaesthetics and other porphyrinogenic drugs system: another target for the action of porphyrinogenic agents. *Drug Metab Lett* 5:25-29.
- Lavandera J., Ruspini S., Batlle A., Buzaleh A.M. (2015) Cytochrome P450 expression in mouse brain: specific isoenzymes involved in phase I metabolizing system of porphyrinogenic agents in both microsomes and mitochondria. *Biochem Cell Biol* 92:1-6.
- Lavandera J., Rodríguez J., Ruspini S., Meiss R., Zuccoli J., Martínez M. del C., Gerez E., Batlle A., Buzaleh, A. M. (2016) Pleiotropic effects of 5-aminolevulinic acid in mice brain. *Biochem Cell Biol* 94(4):297-305.
- Nelson DL, Cox M.M. (2000) *Lehninger Principles of Biochemistry*, 3d edition, 567-597.
- Rötig A., Sidi D., Munnich A., Rustin P. (2002) Molecular insights into Friedreich's ataxia and antioxidant-based therapies. *Trends Mol Med* 8:221–224.
- Rodríguez J.L., Buzaleh A.M., Fossati M., Azcurra J., Batlle A.M. del C. (2002) The effects of some porphyrinogenic drugs on the brain cholinergic system. *Cell Mol Biol* 48(1):103-110.
- Rodríguez J., Martínez M. del C., Gerez E., Batlle A., Buzaleh A.M. (2005) Heme oxygenase, Aminolevulinic acid synthetase and the antioxidant system in the brain of mice treated with porphyrinogenic drugs. *Cell Mol Biol* 51:487-494.
- Ruspini S.F., Zuccoli J.R., Lavandera J.V., Martínez M. del C., Oliveri L.M., Gerez E.N., Batlle A., Buzaleh A.M. (2018) Effects of volatile anaesthetics on heme metabolism in a murine genetic model of Acute Intermittent Porphyria. A comparative study with other porphyrinogenic drugs. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 1862(6):1296-1305.