



UNIVERSIDAD DE GRANADA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOMEDICINA

**ESTUDIO BIOENERGÉTICO MITOCONDRIAL EN LA
SEPSIS EXPERIMENTAL Y EFECTO PROTECTOR DE LA
MELATONINA**

CAROLINA ANNELIESE DOERRIER VELASCO

TESIS DOCTORAL

Granada

2015

Editorial: Universidad de Granada. Tesis Doctorales

Autora: Carolina Anneliese Doerrier Velasco

ISBN: 978-84-9125-081-4

URI: <http://hdl.handle.net/10481/40069>

ESTUDIO BIOENERGÉTICO MITOCONDRIAL EN LA
SEPSIS EXPERIMENTAL Y EFECTO PROTECTOR DE LA
MELATONINA

Memoria que presenta la licenciada en Biología
Dña. Carolina Anneliese Doerrier Velasco
como aspirante al grado de Doctor

Fdo: **Carolina Anneliese Doerrier Velaso**

VºBº de los Directores de la Tesis Doctoral

Fdo: Dr. Darío Acuña Castroviejo
Doctor en Medicina
Catedrático de Fisiología de la UGR

Fdo: Dra. Germaine Escames
Doctora en Farmacia
Profesora Titular de Fisiología de la
UGR

Universidad de Granada
2015

D. DARÍO ACUÑA CASTROVIEJO, Catedrático de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada,

CERTIFICA QUE D^a. **Carolina Anneliese Doerrier Velasco**, Licenciada en Biología, ha realizado bajo su dirección, el trabajo titulado “Estudio bioenergético mitocondrial en la sepsis experimental y efecto protector de la melatonina” reuniendo el mismo las condiciones necesarias para optar al grado de Doctor.

Granada, 28 de Enero de 2015

Vº Bº Director

La interesada

Darío Acuña Castroviejo

Carolina Anneliese Doerrier Velasco

Dña. GERMAINE ESCAMES, Profesora Titular de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada,

CERTIFICA QUE D^a. **Carolina Anneliese Doerrier Velasco**, Licenciada en Biología, ha realizado bajo su dirección, el trabajo titulado “Estudio bioenergético mitocondrial en la sepsis experimental y efecto protector de la melatonina” reuniendo el mismo las condiciones necesarias para optar al grado de Doctor.

Granada, 28 de Enero de 2015

Vº Bº Director

La interesada

Germaine Escames

Carolina Anneliese Doerrier Velasco

El doctorando **Carolina Anneliese Doerrier Velasco** y los directores de la tesis Darío Acuña Castroviejo y Germaine Escames Rosa garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Granada, 28/01/2015

Director/es de la Tesis

Doctorando

Fdo.:

Fdo.:



Este trabajo de Tesis Doctoral ha sido realizado en el Departamento de Fisiología (Grupo de investigación "Comunicación Intercelular", CTS-101) del Centro de Investigación Biomédica (CIBM) de la Universidad de Granada.

Durante la realización del siguiente trabajo, la Lda. Carolina Anneliese Doerrier Velasco fue financiada por las siguientes fuentes:

- Ayuda de RETICEF para asistencia, manutención, alojamiento y viaje (Workshop Austria), 2009.
- Ayuda de RETICEF para asistencia, alojamiento y viaje (Curso envejecimiento saludable en Santander), 2010.
- Ayuda de RETICEF para asistencia, mantenimiento, alojamiento y viaje (Estancia predoctoral en Innsbruck), 2011.
- Ayuda para la asistencia al Congreso FEPS-SECF, 2012.
- Beca del programa de doctorado de Biomedicina para la realización del curso "FORMACIÓN EN PROTECCIÓN Y EXPERIMENTACIÓN ANIMAL PARA EXPERIMENTADORES EN CIENCIAS BIOMÉDICAS CATEGORÍA B (FELASA) (5ª Edición)", 2012.
- Beca de la UGR para la realización del curso "FORMACIÓN EN PROTECCIÓN Y EXPERIMENTACIÓN ANIMAL PARA EXPERIMENTADORES EN CIENCIAS BIOMÉDICAS CATEGORÍA B (FELASA) (5ª Edición)", 2012.
- Contrato de técnico apoyo investigación FIBAO, comprendida entre mayo de 2011 y mayo de 2013.

Proyectos de investigación que han financiado este estudio:

1. **Título del proyecto:** Bases moleculares de la inhibición de la óxido nítrico sintasa inducible durante la sepsis por la melatonina y análogos sintéticos: Efecto de la edad.

Entidad Financiadora: PAI (Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa, Junta de Andalucía)

Referencia del proyecto: P07-CTS-03135 (Proyecto de Excelencia)

Cantidad (€): 366.116,00

Duración, Desde: 1-2-2008

Hasta: 31-1-2012

Investigador principal: Acuña-Castroviejo D

2. **Título del proyecto:** Regulación de la vía inflamatoria nuclear-mitocondrial por la melatonina y su modificación durante el envejecimiento: Evaluación experimental y clínica.

Entidad Financiadora: ISCIII

Referencia del proyecto: PI08-1664

Cantidad (€): 226.028,00

Duración, Desde: 1-1-2009

Hasta: 31-12-2011

Investigador principal: Acuña-Castroviejo D

Parte de los resultados presentados en esta Tesis Doctoral han sido publicados en revistas internacionales o están en preparación:

Carolina Doerrier, José A. García, Huayqui Volt, María E. Díaz-Casado, Elena Lima-Cabello, Francisco Ortiz, Marta Luna-Sánchez, Germaine Escames, Luis C. García, Darío Acuña-Castroviejo (2015). Identification of mitochondrial deficits and melatonin targets in liver of septic mice by high-resolution respirometry. *Life Sciences*. **121**, 158-165.

Carolina Doerrier, José A. García, Huayqui Volt, José A. Guerrero, Marta Luna-Sánchez, Germaine Escames, Luis C. García, Erich Gnaiger, Darío Acuña-Castroviejo (2015). Use of permeabilized myocardial fibers from septic mice to analyze mitochondrial dysfunction and melatonin targets by high-resolution respirometry (en preparación).

Carolina Doerrier C, Huayqui Volt, José A. García, Elena Díaz-Casado, Elena Lima-Cabello E, Germaine Escames, Luis C. López, Darío Acuña-Castroviejo (2014). Evaluation of melatonin treatment in mitochondria of permeabilized myocardial fibers from septic mice. *Acta Physiologica* **212**, 28.

Carolina Doerrier, Anna Draxl, Anita Wiethüchter, Andrea Eigentler, Erich Gnaiger (2012). Mitochondrial Respiration in Permeabilized Fibres versus Homogenate from Mouse Myocardium. An Application Study with the PBI-Shredder. *Mitochondrial Physiology Network* **17.03**, 1-12.

Aportaciones a congresos relacionados con la presente tesis doctoral:

[Comunicación oral]

XXXVII Congreso de la Sociedad Española de Ciencias Fisiológicas (SECF). Evaluation of melatonin treatment in mitochondria of permeabilized myocardial fibers from septic mice. 2014. Granada (España). **Doerrier C; Volt H; García JA; Díaz-Casado E; Lima-Cabello E; Escames G; López LC; Acuña-Castroviejo D.**

68th International Workshop on High-Resolution Respirometry. Mitochondrial respiration in permeabilized fibres versus homogenate from mouse myocardium. Application study with the PBI-Shredder. 2012. Schröcken (Austria). **Doerrier C;** and Eigentler A.

MitoCom lectures: Introduction to mitochondrial respiratory physiology. Mitochondrial coupling and substrate control in permeabilized fibres versus tissue homogenate from mouse heart: A comparative study aimed at evaluation of the PBS tissue shredder. 2011. Innsbruck (Austria). **Doerrier C.**

[Póster]

I WorkShop Jóvenes Biotecnólogos. Melatonin treatment prevents mitochondrial bioenergetic dysfunction in young and aged mitochondria from liver in septic mice. 2013. Granada (España). **Doerrier C;** García JA; Volt H; Escames G; Acuña-Castroviejo D.

Bioblast 2012: Conference on Mitochondrial Competence. Treatment with melatonin prevents myocardial mitochondrial dysfunction in experimental sepsis in mice. 2012. Innsbruck (Austria). **Doerrier C;** García JA; Escames G; Acuña-Castroviejo D.

Joint FEPS and the Spanish Physiological Society Scientific Congress 2012. Melatonin protects mitochondrial impairment in septic mice. 2012. Santiago de Compostela (España). **Doerrier C;** García JA; García-Corzo L; Volt H; Venegas C; Leonardo-Mendonça RC; Escames G; Acuña-Castroviejo D.

*A mis padres, mi hermano Marcell,
mi opita Cipriano, mi omi Anita y a Omar*

ABREVIATURAS Y ANGLICISMOS

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ADNmt: ADN mitocondrial.

ADNn: ADN nuclear.

ADP: Adenosín difosfato.

AFMK: N1-acetil-N2-formil-5-metoxikinuramina.

AMK: N1-acetil-5-metoxikinuramina.

aMT: Melatonina, N-acetil-5-metoxitriptamina.

ANOVA: Análisis de varianza.

ANT: Translocador de nucleótidos de adenina.

ATP: Adenosín trifosfato

BSA: Albúmina de suero bovino.

cAMP: Adenosin 3'5' monofosfato cíclico.

cGMP: Guanosina-3'-5'-monofosfato cíclico.

CI + II: Complejo I + II.

CI: Complejo respiratorio I.

CII: Complejo respiratorio II.

CIII: Complejo respiratorio III.

cit c: Citocromo c.

CIV: Complejo respiratorio IV.

CL: Cardiolipina.

CLP: Ligadura y punción cecal.

CLR: Receptores de lectina de tipo c.

c-mtNOS: Óxido nítrico sintasa mitocondrial constitutiva.

CoQ: Coenzima Q.

COX: Citocromo c oxidasa.

CS: Citrato sintasa.

CTE: Cadena de transporte electrónico mitocondrial.

CV: Complejo respiratorio V.

DNP: 2,4-dinitrofenol.

e⁻: Electrón.

eNOS: Óxido nítrico sintasa endotelial.

ETC: Cadena de transporte electrónico mitocondrial.

ETF: Flavoproteína transferidora de electrones.

ETS: Sistema de transporte de electrones.

FAD: Flavín adenín dinucleótido (oxidada).

FADH₂: Flavín adenín dinucleótido (reducida).

FCCP: Carbonil cianeto-p-trifluorometoxifenil-hidrazona.

FMN: Flavín mononucleótido.

G: Glutamato.

GSH: Glutation reducido.

GSSG: Glutation oxidado

H⁺: Protón.

H₂O: Agua.

H₂O₂: Peróxido de hidrógeno.

HIOMT: Hidroxindol-O-metil transferasa.

HO•: Radical hidroxilo.

HRR: Respirometría de alta resolución.

IMM: Membrana mitocondrial interna.

i-mtNOS: Óxido nítrico sintasa mitocondrial inducible.

iNOS: Óxido nítrico sintasa inducible.

LPO: Peroxidación lipídica.

LPS: Lipopolisacárido.

M: Malato.

MD-2: Proteína mieloides de diferenciación 2.

SOD: Superóxido dismutasa.

Mn-SOD: Manganeso-superóxido dismutasa.

MT1: Receptor de membrana tipo 1.

MT2: Receptor de membrana tipo 2.

mtNOS: Óxido nítrico sintasa mitocondrial.

MyD88: Factor mieloides de diferenciación 88.

NAD: Nicotinamida adenín dinucleótido (oxidada).

NADH: Nicotinamida adenín dinucleótido (reducida).

NADP: Nicotinamida adenín dinucleótido fosfato.

NF-κB: Factor de transcripción kappa B.

NLR: Receptores de unión al dominio de nucleótido.

nNOS: Óxido nítrico sintasa neuronal.

NO•: Óxido nítrico.

NOS: Óxido nítrico sintasa.

O₂: Oxígeno.

O₂•⁻: Anión superóxido.

Olig: Oligomicina.

ONOO⁻: Peroxinitritos.

OXPHOS: Fosforilación oxidativa.

p/v: peso/volumen.

P: Piruvato.

PAMPs: Patrones moleculares asociados a patógenos.

PC: Transportador de fosfato.

P_i: Fosfato inorgánico.

r.p.m.: Revoluciones por minuto.

RCR: Control respiratorio.

RLR: Receptores del gen inducible del ácido retinoico I-like.

RNS: Especies reactivas de nitrógeno.

ROS: Especies reactivas de oxígeno.

Rot: Rotenona.

ROX: Consumo de oxígeno residual.

RZR/ROR: Receptores retinoides.

S: Succinato.

SC: Supercomplejos.

SDH: Succinato deshidrogenasa.

SIRS: Síndrome de respuesta inmune sistémica.

SOD: Superóxido dismutasa.

TIM: Translocador de la membrana interna.

TIR: Toll/IL-1 receptor/plant R gene product homology.

TLR: Receptores tipo *Toll-like*.

TNF α : Factor de necrosis tumoral alfa.

TOM: Translocador de la membrana externa.

TPH: Enzima L-triptófano hidroxilasa.

UCI: Unidad de cuidados intensivos

UCPs: Proteínas desacoplantes.

v/v: volumen/volumen.

Δp : Fuerza protón-motriz.

ΔpH : Diferencia de pH.

$\Delta \psi$: Potencial de membrana.

ϵ : Coeficiente de extinción molar.

~ X ~

“Es intentando lo imposible como se realiza lo posible”

Henri Barsusse

“Cada uno es dueño de su destino”

SUMMARY

Sepsis, a systemic inflammatory response of the organism against an infection, represents the major cause of death in the intensive care units of developed countries. For this reason, sepsis is a disease with relevant economic and healthy costs that should be treated. Previous studies demonstrated that septic process courses with an oxidative and nitrosative stress able to damage cellular structures (such as proteins, including respiratory complexes, DNA and membrane lipids). A substantial body of evidence supports a mitochondrial dysfunction associated with sepsis. In this regard, the inflammatory response and the ROS/RNS increase during sepsis trigger mitochondrial dysfunction. Mitochondria play an important role in the energetic metabolism, but also in other processes in physiological and pathological conditions. Therefore, the analysis of mitochondrial function is crucial to understand a specific pathology such as sepsis. Moreover, an exhaustive knowledge on mitochondrial bioenergetics allows to find specific targets evaluating an effective treatment. Melatonin (N-acetyl-5-methoxytryptamine) is an amphipathic indoleamine, present in all cellular compartments including mitochondria. Melatonin acts as a potent antioxidant and anti-inflammatory molecule with other important actions. Several works have been demonstrated the beneficial effects of melatonin in sepsis. Melatonin prevents septic shock and multiple organ failure reducing, iNOS expression and ROS generation, restoring ETC activity and ATP production.

According with this background, the present work was focused in the study of mitochondrial function during sepsis. Moreover, was evaluated the properties of melatonin against mitochondrial failure during sepsis.

The objectives of this research were:

1. To determine the mitochondrial bioenergetics in liver and heart of mice at early and late phases of sepsis.
2. To identify mitochondrial substrate-dependent behavior during septic process in these tissues.
3. To assess the protective effect of melatonin administration to mice on mitochondrial function of liver and heart of septic mice.

4. To evaluate the mechanistic effects of melatonin on mitochondria using different substrate combinations in liver and heart of septic mice.

The present thesis reports on the study of mitochondrial function (of 3 mo. C57BL/6 mice) in liver and heart mouse at 8 and 24 h of sepsis induction by cecal ligation and puncture (CLP). Mainly, mitochondrial function was evaluated assessing mitochondrial respiration by high resolution respirometry (HRR). Other bioenergetic parameters including cytochrome *a + a3*, *b*, and *c + c1* content, mitochondrial mass, and mitochondrial supercomplexes (SC) formation, were analyzed. Regarding to an effective treatment, we assess melatonin, a recognize molecule with important pleiotropic functions.

Bioenergetic study in liver

Here, we analyzed mitochondrial respiration in isolated mouse liver mitochondria with different substrate combinations (glutamate/malate, glutamate/malate/succinate or succinate/rotenone) to identify mitochondrial defects and melatonin targets during sepsis. Sepsis triggers a significant decrease in state 3 respiration with CI-linked substrates at the early phase of the disease. This fall continued at 24 hours of the sepsis induction, when mitochondria showed a decline in state 3 with substrate for the CII (S+Rot). Moreover, respiratory control ratio (RCR) was significantly reduced during both phases of sepsis with all de substrate combinations used. A drop in RCR indicates an increment of uncoupling between electron transport and OXPHOS and a loss of mitochondrial membrane integrity due to septic process. This loss in the membrane integrity is related with a decline in cytochrome *c + c1* found here in the late stage of sepsis. Also, cytochrome *b* content diminished at 24 hours of sepsis. The fall in cytochrome *b* content, an important component of respiratory complex II and III, suggests impairment in these mitochondrial complexes. Mitochondrial damage generated during sepsis produces a decrease in the mitochondrial mass (determined as citrate synthase activity, a marker for mitochondrial density). However, at 8 hours of sepsis induction we found an increase in electron transport system (ETS) capacity and leak state which could constitute a mechanism to compensate the mitochondrial damage. The capacity of damaged

mitochondria to stimulate ETS capacity to decrease mitochondrial injury could have relation with the preservation of the respiratory supramolecular organization.

Melatonin administration allowed an optimal mitochondrial functionality by several pathways. In the present study, melatonin treatment in septic mice allowed a significant recovery of OXPHOS when the damage is present. Also, melatonin restored mitochondrial membrane integrity, maintaining adequate membrane fluidity and coupling, preserving both ETC activity and the proton gradient required for ATP production. Moreover, melatonin avoided the fall in the cytochrome *b* and *c + c1* content. On the other hand, melatonin treatment increases CI-linked leak respiration. Our results show bioenergetic dysfunction in liver during septic process, mainly through CI. Melatonin rises CI-leak state as a pathway to attenuate septic-related oxidative-nitrosative stress, protecting mitochondria to the damage.

In summary, we report a severe mitochondrial dysfunction in liver from septic mice, which mainly depends on a CI impairment. For this reason, mitochondrial CI should be a central therapeutic approach in the treatment of sepsis. Our work demonstrates the beneficial effects of melatonin treatment against the mitochondrial dysfunction, acting fundamentally when the damage is present.

Bioenergetic study in heart

Here, respirometric study was obtained with permeabilized myocardial fibers by HRR. Permeabilized fibers allow to identify specific defects in mitochondrial bioenergetics as a result of sepsis without disruption due to mitochondrial isolation process. Permeabilized fibers provide an evaluation of the bioenergetic system, maintaining mitochondrial ultrastructure and intracellular interactions between cellular compartments.

OXPHOS and ETS capacities with substrate combinations for CI+I and CII were strongly decreased in both phases of sepsis. In parallel, we found a loss in the proportion of complex III (CIII) incorporated in mitochondrial respiratory SC. The severe septic-dependent impairment on mitochondrial bioenergetics with CIII-linked alterations in SC structure triggers a loss of mitochondrial density in the late phase of the disease. The spite

of the drop in mitochondrial mass in the late phase of sepsis, the remaining pool of mitochondria continued with a high bioenergetics injury.

Melatonin treatment prevented mitochondrial failure, preserving OXPHOS and ETS capacities. Moreover, melatonin increased cytochrome *b* content and ameliorated the assembly of CIII in SC at the late phase of septic process. In conclusion, our results evidence an early severe sepsis-related mitochondrial impairment, which is counteracted by melatonin treatment.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	3
1. LA MITOCONDRIA	3
1.1. ORIGEN Y ESTRUCTURA	3
1.2. FUNCIONES DE LAS MITOCONDRIAS	5
1.3. BIOENERGÉTICA MITOCONDRIAL	6
1.3.1. SISTEMA OXPHOS	6
1.3.1.1. COMPONENTES DEL SISTEMA OXPHOS	7
1.3.1.2. ORGANIZACIÓN DE OXPHOS	11
1.3.2. SISTEMA DE TRANSPORTE ELECTRÓNICO	13
1.3.3. EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN MITOCONDRIAL	14
1.3.4. ACOPLAMIENTO DE LA FOSFORILACIÓN OXIDATIVA Y LA RESPIRACIÓN	17
PAPEL FISIOLÓGICO DEL DESACOPLAMIENTO MITOCONDRIAL	19
2. ESTRÉS OXIDATIVO	20
2.1. DEFINICIÓN	20
2.2. RADICALES LIBRES Y ESPECIES REACTIVAS	20
2.3. ÓXIDO NÍTRICO Y MITOCONDRIA	21
2.4. SISTEMAS ANTIOXIDANTES	21
3. SEPSIS	23
3.1. DEFINICIÓN E IMPORTANCIA SANITARIA	23
3.2. FISIOPATOLOGÍA DE LA SEPSIS	24
3.3. DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL EN LA SEPSIS	26
4. MELATONINA	28
4.1. DEFINICIÓN	28
4.2. BIOSÍNTESIS DE LA MELATONINA	28
4.3. MECANISMOS DE ACCIÓN DE LA MELATONINA	29
4.4. FUNCIONES DE LA MELATONINA	30
4.4.1. ANTIOXIDANTE	30
4.4.2. ANTIINFLAMATORIA	31
4.4.3. PAPEL DE LA MELATONINA EN LA BIOENERGÉTICA MITOCONDRIAL	31
4.4.4. PAPEL DE LA MELATONINA EN SEPSIS	31

II.	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	35
III.	MATERIALES Y MÉTODOS	39
M-1.	ANIMALES Y GRUPOS EXPERIMENTALES	39
M-2.	MODELO DE INDUCCIÓN DEL PROCESO SÉPTICO	39
M-3.	TRATAMIENTO	40
M-4.	PREPARACIÓN DE MUESTRAS	40
M-4.1.	AISLAMIENTO DE MITOCONDRIAS DE HÍGADO	40
M-4.1.1.	AISLAMIENTO DE LA FRACCIÓN MITOCONDRIAL PARA ESTUDIOS DE RESPIROMETRÍA	40
M-4.1.2	AISLAMIENTO DE LA FRACCIÓN MITOCONDRIAL PARA LA DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO TOTAL DE CITOCROMOS	41
M-4.1.2	AISLAMIENTO DE MITOCONDRIAS PARA DETERMINAR EL ENSAMBLAJE DE LOS COMPLEJOS RESPIRATORIOS EN SUPERCOMPLEJOS (SC) POR ELECTROFORESIS UNIDIMENSIONAL EN UN GEL DE POLIACRILAMIDA (BLUE NATIVE PAGE)	42
M-4.2.	AISLAMIENTO DE MITOCONDRIAS DE CORAZÓN	42
M-4.2.1.	OBTENCIÓN DE MITOCONDRIAS PARA EVALUAR EL CONTENIDO TOTAL DE CITOCROMOS	42
M-4.2.2.	AISLAMIENTO DE MITOCONDRIAS PARA DETERMINAR EL GRADO DE ENSAMBLAJE EN SC DE LOS COMPLEJOS RESPIRATORIOS	43
M-4.3.	PREPARACIÓN DE FIBRAS PERMEABILIZADAS CARDÍACAS	43
M-4.3.1.	PERMEABILIZACIÓN MECÁNICA	44
M-4.3.2.	PERMEABILIZACIÓN QUÍMICA	44
M-4.4.	PREPARACIÓN DE HOMOGENADO	45
M-4.4.1.	PREPARACIÓN DE HOMOGENADO DE HÍGADO	45
M-4.4.2.	PREPARACIÓN DE HOMOGENADO A PARTIR DE LAS MUESTRAS PROCEDENTES DE RESPIROMETRÍA (FIBRAS PERMEABILIZADAS DE CORAZÓN)	45
M-5.	MÉTODOS ANALÍTICOS	45
M-5.1.	DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS	45
M-5.2.	RESPIROMETRÍA DE ALTA RESOLUCIÓN	46
M-5.2.1.	CALIBRACIONES	49
M-5.2.2.	ESTUDIO DE LA FUNCIÓN MITOCONDRIAL MEDIANTE RESPIROMETRÍA DE ALTA RESOLUCIÓN	53
M-5.3.	DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITRATO SINTASA	56

M-5.4. DETERMINACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA DEL CONTENIDO TOTAL DE CITOCROMOS _____	57
M-5.5. ESTUDIO DEL ENSAMBLAJE EN SUPERCOMPLEJOS MITOCONDRIALES POR BNGE Y WESTERN-BLOT _____	58
M-5.5.1. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA LA BLUE NATIVE GEL ELECTROFORESIS _____	58
M-5.5.2. PREPARACIÓN DEL GEL PARA LA 1D DE BLUE NATIVE _____	58
M-5.5.3. ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS _____	59
M-5.5.4. TRANSFERENCIA DE PROTEÍNAS A MEMBRANAS DE PVDF _____	60
M-5.5.5. REVELADO INMUNOLÓGICO _____	60
M-6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO _____	61
IV. CAPÍTULO 1: ESTUDIO BIOENERGÉTICO EN HÍGADO. RESULTADOS.	67
1. ESTUDIO DE LA FUNCIÓN MITOCONDRIAL MEDIANTE RESPIROMETRÍA DE ALTA RESOLUCIÓN _____	68
1.1. DETERMINACIÓN DEL ESTADO LEAK _____	68
1.2. EFECTOS DEL PROCESO SÉPTICO, Y EL TRATAMIENTO CON MELATONINA SOBRE LA RESPIRACIÓN MITOCONDRIAL ESTIMULADA CON ADP _____	69
1.3. EVALUACIÓN DE LA INTEGRIDAD DE LA MEMBRANA MITOCONDRIAL Y EL ACOPLAMIENTO ENTRE LA FOSFORILACIÓN OXIDATIVA Y EL TRANSPORTE DE ELECTRONES _____	69
1.4. ESTIMACIÓN DE LA MÁXIMA CAPACIDAD DE LA RESPIRACIÓN MITOCONDRIAL _____	70
2. EVALUACIÓN DEL CONTENIDO MITOCONDRIAL DE CITOCROMOS _____	71
3. DETERMINACIÓN DE LOS CAMBIOS EN LA MASA MITOCONDRIAL _____	72
4. EVALUACIÓN DE LA FORMACIÓN DE SUPERCOMPLEJOS MEDIANTE BNGE	72
V. CAPÍTULO 1: ESTUDIO BIOENERGÉTICO EN HÍGADO DE RATONES SÉPTICOS. EVALUACIÓN DEL TRATAMIENTO CON MELATONINA. DISCUSIÓN	77
VI. CAPÍTULO 2: ESTUDIO BIOENERGÉTICO EN CORAZÓN. RESULTADOS	87
1. ESTUDIO DE LA FUNCIÓN MITOCONDRIAL EN FIBRAS PERMEABILIZADAS DE MIOCARDIO MEDIANTE RESPIROMETRÍA DE ALTA RESOLUCIÓN _____	89
1.1. EFECTOS DEL PROCESO SÉPTICO Y EL TRATAMIENTO CON MELATONINA SOBRE LA CAPACIDAD DE OXPHOS _____	89

1.2. ESTIMACIÓN DE LA MÁXIMA CAPACIDAD DE LA RESPIRACIÓN MITOCONDRIAL (CAPACIDAD ETS)_____	91
EL TRATAMIENTO CON MELATONINA PREVINO TOTALMENTE EL AUMENTO DEL ESTADO LEAK TANTO EN EL GRUPO S8M COMO EN S24M. LAS 24 HORAS (FIG. R11B) _____	93
LA ADMINISTRACIÓN DE MELATONINA EN LOS RATONES CON SEPSIS EVITÓ ES INCREMENTO DEL RATIO L/P, DISMINUYÉNDOLO INCLUSO RESPECTO AL CONTROL EN EL GRUPO S24M_____	93
2. EVALUACIÓN DEL CONTENIDO MITOCONDRIAL DE CITOCROMOS_____	93
3. DETERMINACIÓN DE LOS CAMBIOS EN LA MASA MITOCONDRIAL _____	94
4. EVALUACIÓN DE LA FORMACIÓN DE SUPERCOMPLEJOS MEDIANTE BNGE	95
VII. CAPÍTULO 2: ESTUDIO BIOENERGÉTICO EN CORAZÓN DE RATONES SÉPTICOS. EVALUACIÓN DEL TRATAMIENTO CON MELATONINA. DISCUSIÓN	99
VIII. CONCLUSIONS_____	107
IX. BIBLIOGRAFÍA _____	111

INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

1. LA MITOCONDRIA

El término mitocondria que procede de los vocablos griegos mitos (hilo, filamento) y chondros (gránulo) fue introducido por primera vez por Brenda (1898), aunque su presencia ya había sido descrita unos 40 años antes por Kölliker (1856), que observó dicha estructura en células musculares, y por Altmann (1890), quien identificó en sus preparaciones histológicas unos organismos elementales de la células a los que denominó “bioblasts” (gérmenes vivos), clasificándolos como entidades vivas dentro de las células. Sin embargo, no fue hasta décadas después cuando se detalló su papel fundamental en el metabolismo energético. Un avance relevante en el estudio de la mitocondria fue llevado a cabo por Bensley y Hoerr, quienes en el año 1934 aislaron por centrifugación diferencial una fracción celular que identificaron como mitocondrias (Cowdry , 1953). En 1962, Luft y colbs. describieron por primera vez una patología humana en la que se encontraba implicada la mitocondria (Luft *et al.*, 1962). A partir de este momento, al interés de la mitocondria en el metabolismo celular, se le sumó su relevancia en múltiples funciones fisiológicas como su papel en determinadas patologías (tanto en enfermedades mitocondriales como en aquellas en las que acontezca una disfunción mitocondrial), así como en la apoptosis y en el estrés oxidativo, adquiriendo por lo tanto una progresiva relevancia.

1.1. ORIGEN Y ESTRUCTURA

De todas las teorías existentes acerca del origen de este orgánulo, cabe destacar la más aceptada actualmente entre la comunidad científica, la teoría endosimbiótica (Margulis L, 1981). Dicha teoría propone que hace 700-1500 millones de años, un procariota de gran tamaño habría envuelto a un procariota aeróbico de menor tamaño constituyendo un sistema simbiótico. Esta teoría podría explicar la presencia de una doble membrana (con composición bioquímica distinta) así como la presencia de un material genético propio bastante parecido al de bacterias (el ADN mitocondrial) en las mitocondrias.

Las mitocondrias son orgánulos celulares que se localizan en el citoplasma. Presentan una amplia variedad respecto a número, morfología, tamaño y localización (en función del tipo celular y el estado metabólico), aunque generalmente poseen un tamaño

comprendido entre 1-2 μm de longitud y 0,25-0,5 μm de diámetro (**Fig. 1**). Respecto a su morfología, cabe indicar que son estructuras dinámicas ya que pueden producirse fenómenos de fusión y fisión apreciables con microscopía confocal (Karbowski & Youle, 2003; Nisoli *et al.*, 2004).

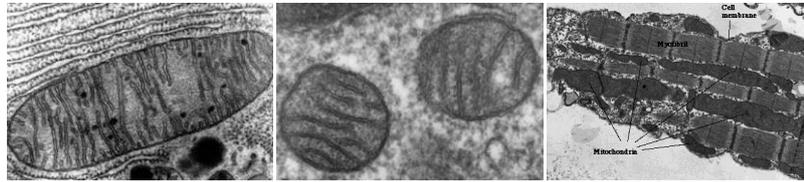


Fig. 1. Ultraestructura y diversidad mitocondrial obtenida mediante microscopía electrónica de transmisión. Fuente: Fawcett DW y Raviola E 1994 "A Textbook of Histology". Internet¹.

Estructuralmente (**Fig. 2**), la mitocondria presenta por un lado, la membrana externa que está constituida por una bicapa lipídica que contiene estructuras proteicas conocidas como porinas (que permiten el paso a moléculas de menos de 10 kDa, siendo por lo tanto permeable a iones y a la mayoría de los metabolitos) así como complejos proteicos encargados del transporte de proteínas (TOM del inglés "translocase of the outer membrane"). Por otro lado, la mitocondria posee una membrana interna que muestra una estructura plegada la cual se conoce como crestas mitocondriales. Dichas crestas permiten que esta membrana interna presente una superficie mucho mayor que la externa (existe una relación directa entre el número de crestas y la necesidad energética de la célula).

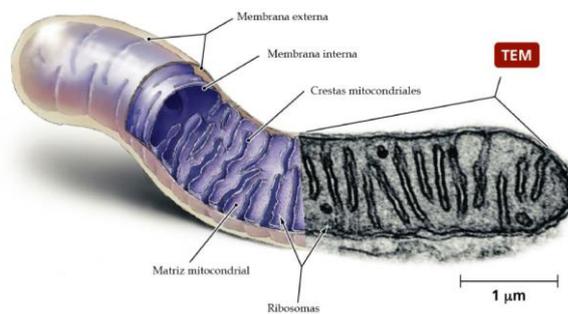


Fig. 2. Estructura de la mitocondria. Imagen tomada de Pearson Education.

Además, estas estructuras son esenciales, ya que en ellas tiene lugar la fosforilación oxidativa, y son claves en la liberación del citocromo c como señal proapoptótica.

¹ <http://remf.dartmouth.edu/images/mammalianLungTEM/>
<http://www.ruf.rice.edu/~bioslabs/studies/mitochondria/mitotheory.html>

Esta membrana está compuesta de un 20% de lípidos (versus el 50% en la externa), con un porcentaje elevado de cardiolipina (CL). La característica composición de esta membrana, que presenta una composición fundamentalmente proteica (80 % de proteínas y 20 % de lípidos) la convierte en una verdadera barrera selectiva, que hace que únicamente sea permeable al oxígeno, al dióxido de carbono y al agua. Además, en esta estructura se localizan una serie de proteínas y complejos tales como los complejos de la cadena de transporte electrónico, la ATP sintasa, los complejos TIM (del inglés "*translocase of the inner membrane*") encargados de la importación de proteínas, y las proteínas desacoplantes (UCPs del inglés "*uncoupling proteins*"). Las membranas interna y externa definen dos compartimentos en la mitocondria: el espacio intermembrana (espacio situado entre las dos membranas), y la matriz mitocondrial que queda englobada por la membrana interna (en donde se encuentran los ribosomas, el ADN mitocondrial, casi todas las enzimas del ciclo de Krebs, las enzimas de la β -oxidación de los ácidos grasos, FAD, NAD, NADP, ADP y ATP).

1.2. FUNCIONES DE LAS MITOCONDRIAS

En mamíferos, el 95% del ATP que se emplea para obtener la energía necesaria para las actividades celulares (biosíntesis, transporte de iones y moléculas...) se genera en las mitocondrias. De ahí a que la función más característica que se asocia a las mitocondrias sea la de la producción aeróbica de la energía en forma de ATP. Sin embargo, también cabe destacar la existencia de otras funciones importantes, tales como la termogénesis (proceso por el cual se genera calor al producirse un desacoplamiento de la fosforilación oxidativa), la homeostasis del calcio (las mitocondrias captan calcio cuando éste alcanza un valor crítico en el citosol, produciéndose cambios en el interior de la mitocondria que pueden afectar a determinadas enzimas del ciclo de Krebs o incluso pueden generar un incremento de las especies reactivas de oxígeno y la apertura del poro de transición mitocondrial), y su participación tanto en la síntesis de aminoácidos, nucleótidos, fosfolípidos como en los fenómenos de apoptosis.

1.3. BIOENERGÉTICA MITOCONDRIAL

Como ya se ha mencionado con anterioridad, la principal fuente energética celular es la respiración mitocondrial. Los macronutrientes (hidratos de carbono, lípidos y proteínas) son degradados enzimáticamente a través de las rutas catabólicas (glucólisis, β -oxidación de los ácidos grasos y oxidación de los aminoácidos) hasta la obtención de acetil CoA. El acetil CoA, en el interior de la mitocondria, es utilizado en el ciclo de Krebs para “alimentar” con electrones vía NADH y FADH₂ (moléculas que presentan una elevada capacidad donadora de electrones) a proteínas de los complejos respiratorios I y II de la cadena de transporte electrónico mitocondrial (CTE), donde tiene lugar la fosforilación oxidativa (**Fig.3**).

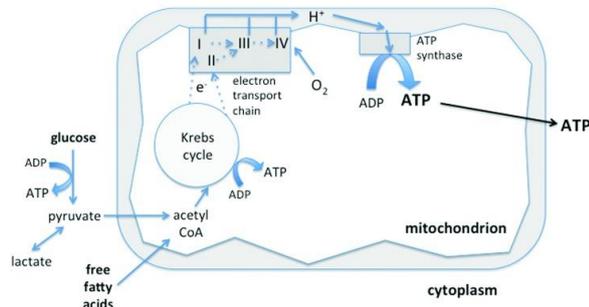


Fig. 3. Producción aeróbica de ATP en la mitocondria. Imagen tomada de Singer M, 2014 “The role of mitochondrial dysfunction in sepsis-induced multi-organ failure”.

1.3.1. Sistema OXPHOS

Las mitocondrias poseen un sistema enzimático (sistema OXPHOS), constituido por la cadena de transporte electrónico (formada por los complejos respiratorios CI, CII, CIII y CIV), transportadores de electrones móviles (coenzima Q y citocromo c) y la ATP sintasa o complejo V (CV). La ATP sintasa es la encargada de la conversión de energía oxidativa en energía química. La cadena de transporte electrónico recibe electrones a partir de la oxidación de sustratos (NADH y FADH₂) de la glucólisis, del ciclo de Krebs, y de la β -oxidación de los ácidos grasos, electrones que son transferidos mediante reacciones de óxido-reducción a través de los complejos (embebidos en la membrana mitocondrial interna) hasta la reducción del oxígeno. Los electrones procedentes del NADH son transferidos a través del CI, la ubiquinona o coenzima Q (CoQ), el CIII y el citocromo c (cit c), hasta llegar finalmente al CIV donde dichos electrones serán cedidos al oxígeno molecular produciéndose H₂O. Por otro lado, cuando los electrones son cedidos desde el FADH₂ (por ejemplo a partir de la succinato deshidrogenasa, de la glicerol 3-P deshidrogenasa o la flavoproteína transferidora de electrones: ETF ubiquinona

oxidorreductasa), éstos se dirigen a través del CII hacia la ubiquinona e igualmente hacia el CIII, cit c y CIV donde ocurrirá la reducción del oxígeno.

Como consecuencia de la diferencia de potencial redox, la transferencia de electrones libera energía, la cual es empleada para el bombeo de protones. Es decir, la transferencia está acoplada a un transporte vectorial de protones (en los complejos I, III y IV, los cuales se denominan sitios de acoplamiento) a través de la membrana mitocondrial interna, desde la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembrana. Debido a la impermeabilidad de la membrana mitocondrial interna, este gradiente crea una diferencia de potencial electroquímico de protones (basificándose la matriz mitocondrial y acidificándose el espacio intermembrana) también denominado fuerza protón-motriz ($\Delta p = \Delta \mu_{H^+}/F$; siendo F la constante de Faraday). Esta fuerza protón-motriz (que muestra dos componentes: un componente de concentración, ΔpH o diferencia de pH, y un componente de carga, $\Delta \psi$ o potencial de membrana) es utilizada por la ATP sintasa para que los protones regresen a la matriz mitocondrial y se genere ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico, fenómeno conocido como fosforilación oxidativa (**Fig. 4**) (Mitchell, 1961, 1966).

1.3.1.1. Componentes del sistema OXPHOS

Como se ha mencionado con anterioridad, el sistema OXPHOS está constituido por cuatro complejos enzimáticos (CI-CIV), dos transportadores electrónicos móviles (CoQ y cit c), la ATP sintasa y además el transportador fosfato (Pi o PC) y la adenina nucleótido translocasa (ANT) (**Fig. 4**).

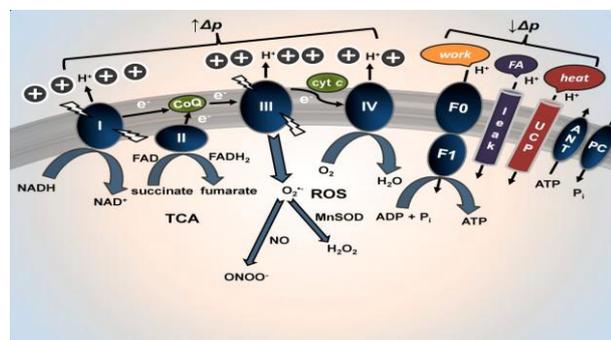


Fig. 4. Representación esquemática de los componentes de OXPHOS y de la fuga de protones a través de vías independientes y dependientes de las proteínas desacoplantes UCPs. Imagen tomada de Hroudová J, 2013 " Mitochondrial Functions in Mood Disorders".

Complejo I o NADH-ubiquinona oxidorreductasa o NADH deshidrogenasa

El CI, también denominado NADH-ubiquinona oxidorreductasa o NADH deshidrogenasa, es el punto de entrada a la CTE de los electrones procedentes del NADH. Los electrones del NADH son transferidos a un flavin mononucleótido (FMN) y

posteriormente van pasando de uno en uno a través de los 8 centros Fe-S hasta reducir la ubiquinona a ubiquinol. De forma acoplada tiene lugar un bombeo de protones desde la matriz al espacio intermembrana.

El CI, cuyo peso molecular es de aproximadamente 980 kDa, presenta una estructura con forma de "L" con 2 brazos perpendiculares. Por un lado, un brazo hidrofóbico (el cual se encuentra anclado en la membrana mitocondrial interna) y por otro uno hidrofílico (localizado en la matriz mitocondrial). Múltiples subunidades componen este complejo respiratorio, codificadas tanto por ADN nuclear (ADNn) como por ADN mitocondrial (ADNmt). Cabe destacar una de las subunidades que constituyen el CI, la subunidad NDUFA9, la cual alberga el sitio de unión del NADH/NADPH (Saraste, 1999; Papa *et al.*, 2004; Papa *et al.*, 2012).

Complejo II o Succinato ubiquinona oxidoreductasa

El CII o succinato ubiquinona oxidoreductasa (SDH) se localiza en la cara interna de la membrana mitocondrial interna, formando parte del ciclo de Krebs y de la respiración aeróbica. Este complejo cataliza la oxidación del succinato a fumarato, produciéndose por lo tanto la reducción de de FADH₂ a FAD. Posteriormente, los electrones son transferidos a la ubiquinona.

Estructuralmente, el complejo II presenta un dominio periférico expuesto a la matriz mitocondrial y otro dominio integrado en la membrana. El primero está constituido por dos subunidades: la flavoproteína (con un sitio de unión covalente al FAD) y tres centros Fe-S. El segundo dominio funciona como anclaje de las subunidades del dominio periférico a la membrana mitocondrial interna y es requerido para la reducción-oxidación de la quinona. El CII se caracteriza porque se diferencia de los demás complejos respiratorios por dos aspectos. Por un lado, sus subunidades se encuentran codificadas por ADNn. Por otro lado, es el único complejo de la CTE que no bombea protones al espacio intermembrana (Saraste, 1999; Hagerhall, 1997; Sun *et al.*, 2005).

Complejo III o citocromo bc1 o ubiquinol citocromo c oxidoreductasa

El CIII se encarga de transferir los electrones desde la CoQ reducida (ubiquinol) al cit c. Este proceso implica una translocación de protones desde la matriz mitocondrial al espacio intermembrana.

Respecto a su estructura, el CIII, que está anclado a la membrana mitocondrial interna y presenta un peso molecular de 240 kDa, es un homodímero donde cada monómero está formado por 11 subunidades, todas ellas codificadas por ADNn a excepción de la subunidad MTCYB (correspondiente al citocromo b) que es codificada por ADNmt. 3 de las subunidades constituyen el centro catalítico del complejo multiproteico: el citocromo c_1 (que contiene el grupo hemo c_1), la proteína hierro-azufre de Rieske y el citocromo b (que contiene los grupos hemo b_{562} (bH) y b_{566} (bL)) (Saraste, 1999; Papa *et al.*, 2012).

Complejo IV o Citocromo c oxidasa

El CIV de la CTE se encarga de catalizar la transferencia de 4 electrones desde el citocromo c al oxígeno molecular. Estos electrones transportados desde el cit c, son empleados para reducir el O_2 a H_2O , con translocación de bombeo de protones al espacio intermembrana.

El CIV o citocromo c oxidasa (COX) es un dímero de aproximadamente 200 kDa de peso molecular, presente en la membrana mitocondrial interna. El centro funcional del complejo proteico está formado por las 3 principales subunidades (I, II y III), las cuales están codificadas por ADNmt. Rodeando a este *core* se encuentran 10 pequeñas subunidades codificadas por ADNn (Saraste, 1999; Papa *et al.*, 2012).

Transportadores móviles

En la CTE existen 2 transportadores móviles, los cuales se encargan de transferir electrones conectando entre sí los complejos respiratorios. Estos transportadores sufren cambios en su estado redox pudiendo así desplazarse en la bicapa lipídica.

1) Coenzima Q

La CoQ, también llamada ubiquinona (2,3 dimetoxi-5-metil, 6-poliprenilbenzoquinona) es una molécula lipofílica (por lo cual está presente en prácticamente todas las membranas celulares) y también hidrofóbica. Posee varias funciones conocidas, destacando entre ellas su capacidad antioxidante (en su forma reducida) y su papel como componente de la cadena de transporte electrónico. Concretamente, la CoQ, se encarga de transportar electrones en la CTE mitocondrial desde los complejos I y II hasta el CIII (Bentinger *et al.*, 2010; Mitchell, 1975).

La CoQ presenta 3 estados redox: oxidado (ubiquinona), radical semiquinona (ubisemiquinona) y reducido (ubiquinol).

2) *Citocromo c*

Otro transportador móvil de la cadena respiratoria es el cit c. Se trata de una proteína de 104 aminoácidos, muy conservada evolutivamente, codificada por ADNn que se localiza en el espacio intermembrana mitocondrial.

El cit c se caracteriza por ser una proteína multifuncional, implicada tanto en procesos necesarios para la supervivencia como para la muerte celular. Por un lado, forma parte de la cadena de transporte mitocondrial, siendo indispensable para la producción de energía, ya que está implicada en la transferencia de electrones desde el CIII al CIV. En oposición a esta característica funcional, el cit c interviene en el proceso apoptótico formando parte del apoptosoma (la liberación del cit c al citosol es una señal clave que desencadena la cascada apoptótica dependiente de caspasas). Cabe destacar, que el cit c tiene capacidad antioxidante actuando como depurador de especies reactivas de oxígeno (ROS). Además otras funciones han sido descritas, tales como su actividad como peroxidasa de la CL, así como su implicación en el transporte de otras proteínas a través de las translocasas TIMs y TOMs (Huttemann *et al.*, 2011; Pasdois *et al.*, 2011; Pereverzev *et al.*, 2003).

ATP sintasa

La ATP sintasa o CV es un complejo multiproteico encargado de aprovechar la energía generada por la cadena de transporte de electrones para llevar a cabo la producción de ATP mediante la fosforilación de ADP. La ATP sintasa consta de dos dominios: F0 y F1. La fracción F1, localizada en la matriz mitocondrial, constituye el centro catalítico del complejo donde tiene lugar la síntesis de ATP, mientras que la fracción F0 que se encuentra anclada en la membrana mitocondrial interna, actúa como un canal de protones y dirige la energía liberada en la disipación del gradiente electroquímico a la región F1.

El CV se denomina ATP sintasa ya que puede actuar también de modo inverso. Cuando el gradiente de protones disminuye puede hidrolizar ATP para bombear

protones al espacio intermembrana y así contribuir a mantener el potencial de membrana (Saraste, 1999).

Adenina nucleótido translocasa

La adenina nucleótido translocasa (ANT) es una proteína mitocondrial que cataliza el intercambio de ADP por ATP a través de la membrana mitocondrial interna.

Transportador fosfato

La membrana mitocondrial interna (IMM del inglés “*inner mitochondrial membrane*”) contiene una serie de sistemas de transporte para metabolitos, entre los que destaca (además de la ANT, las UCPs, y el transportador de oxoglutarato) el transportador fosfato (PiC). El transportador fosfato interviene en la importación de P_i desde el citosol a la matriz mitocondrial. Funciona de manera coordinada con la ANT, permitiéndose mediante ambos transportadores el intercambio de ADP y P_i citoplasmático por ATP de la matriz mitocondrial. Ambos transportadores, junto con la ATP sintasa constituyen el complejo ATP sintasoma, facilitándole precisamente a la ATP sintasa los sustratos necesarios (Pedersen, 2007).

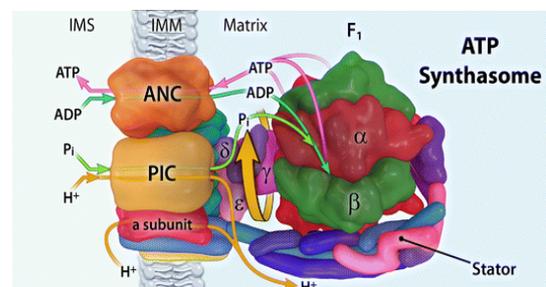


Fig. 5. ATP sintasoma. Complejo ATP sintasoma constituido por el transportador mitocondrial de fosfato (PIC), el transportador de nucleótidos de adenina (ANC) y la ATP sintasa. Imagen tomada de Pedersen PL, 2007 “Transport ATPases into the year 2008: a brief overview related to types, structures, functions and roles in health and disease”.

1.3.1.2. Organización de OXPHOS

Aunque la estructura de los complejos respiratorios se conoce detalladamente, la organización física de la cadena respiratoria ha sido ampliamente discutida en las últimas décadas. En el año 1955, Chance y Willians propusieron el “**modelo del estado sólido**” (Chance & Williams, 1955a, 1955b, 1956). En este modelo los complejos respiratorios (CI-IV) se empaquetan de manera ordenada y próxima para garantizar la accesibilidad y una alta eficiencia en el transporte de electrones. Este tipo de organización fue progresivamente desplazado por el denominado “**modelo del estado fluido o de**

colisiones randomizadas” (Hackenbrock *et al.*, 1986). En este modelo se ha asumido que los diferentes componentes de la cadena respiratoria se encontraban “flotando” como entidades independientes y libres en la membrana interna mitocondrial, produciéndose la transferencia de electrones mediante colisiones al azar y transportadores móviles (CoQ y cit c). Sin embargo, este modelo clásico ha sido cuestionado en los últimos años. Concretamente, en el año 2000 el conocimiento sobre la organización de la cadena respiratoria dio un giro drástico, siendo Schägger y cols. quienes demostraron por primera vez mediante la técnica blue native gel electrophoresis (BNGE), la organización supramolecular en ensamblaje de los complejos respiratorios en los denominados supercomplejos (SC) (Schagger & Pfeiffer, 2000). Esta asociación implica un transporte de electrones mucho más eficiente, así como una disminución de la producción de ROS. Estos nuevos hallazgos demostraron la existencia de una asociación estable de los complejos respiratorios y por lo tanto, la reformulación del modelo sólido. Existe un modelo intermedio, propuesto por Acín-Pérez y cols., el **“modelo de plasticidad”** (Acin-Perez *et al.*, 2008). En este modelo coexisten los dos tipos de organizaciones, es decir, tanto los complejos respiratorios ensamblados en estructuras supramoleculares (SC), como los que se encuentran en forma libre. El modelo de plasticidad sugiere que los complejos respiratorios pueden cambiar su distribución desde estructuras libres a supercomplejos y viceversa, reorganizándose para lograr un óptimo rendimiento adaptándose al metabolismo celular.

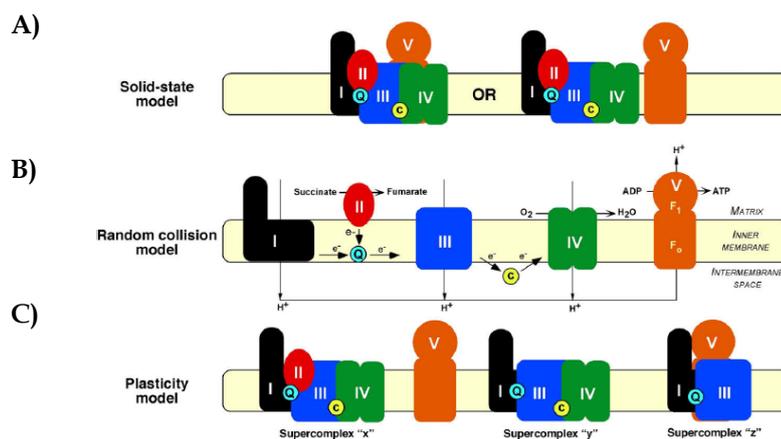


Fig. 6. Modelos propuestos de organización del sistema OXPHOS. A) Modelo sólido. B) Modelo fluido o de colisiones randomizadas. C) Modelo de plasticidad. Tomado de Schon EA, 2008.

Acín-Pérez y cols. demostraron que los SC purificados presentaban la capacidad de respirar (determinado con un electrodo de Clark), sugiriendo que estas estructuras estudiadas *in vitro*, también pueden respirar *in vivo*. Además observaron que los SC se asocian con una gran variedad de combinaciones: I+III+IV (denominado también respirasoma), I+III, III+IV.

1.3.2. Sistema de transporte electrónico

Tradicionalmente, cuando se habla de cadena de transporte electrónico mitocondrial (CTE, en inglés ETC de “*electron transport chain*”) (Nicholls & Ferguson SJ, 2002), nos referimos exactamente a la cascada termodinámica lineal que tiene lugar desde el CI (con tres sitios de acoplamiento) o desde el CII (con dos sitios de acoplamiento) hasta el aceptor final, el oxígeno, para formar agua. Sin embargo, CTE, es una terminología ampliamente empleada pero inapropiada, ya que la situación real engloba una convergencia del flujo de electrones desde el CI, el CII, la flavoproteína transferidora de electrones (ETF del inglés “*electron-transferring flavoprotein*”), la cual aporta electrones procedentes de la β -oxidación de ácidos grasos a la CoQ, desde la glicerol-fosfato deshidrogenasa, así como desde otras enzimas. Es decir, realmente nos encontramos ante un sistema de transporte mitocondrial (ETS, del inglés “*electron transfer system*”) (Gnaiger, 2012a). Por lo tanto, ETS hace referencia a la convergencia de los electrones procedentes de las distintas vías mencionadas, siendo el punto de confluencia la CoQ (Q-junction).

En condiciones fisiológicas, la combinación de sustratos para los complejos I + II permite la capacidad máxima tanto de OXPHOS como del ETS debido al efecto aditivo de las distintas vías convergentes a nivel de Q-junction (**Fig. 7**).

Se ha demostrado gracias a una serie de experimentos basados en respirometría de alta resolución, que la separación experimental de dichas vías conlleva a una disminución de la respiración de entre el 30 % (si se emplean sólo sustratos para el CI) y el 64 % (para el CII). No obstante, para el estudio detallado de la función mitocondrial en una determinada patología o condición, es de sumo interés determinar artificialmente las distintas ramificaciones del ETS, ya que pueden proporcionar información relevante.

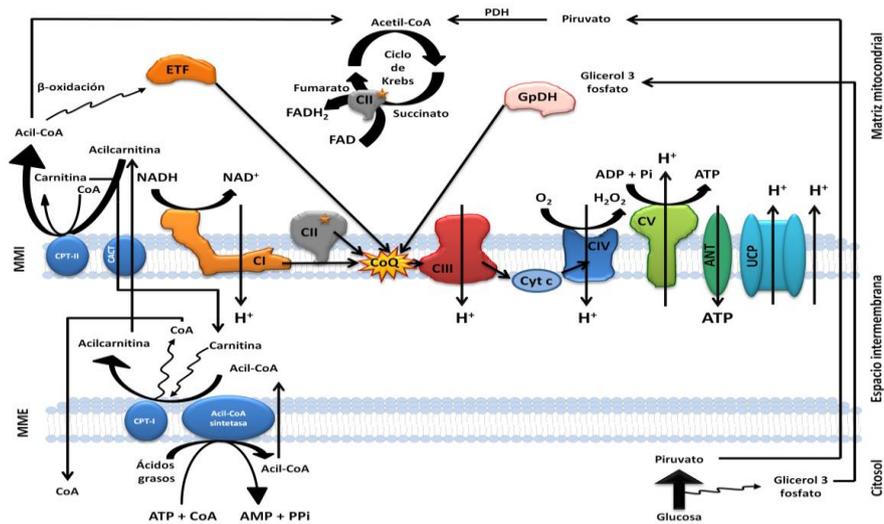


Fig. 7. Convergencia de electrones en el sistema de transporte electrónico (ETS) a nivel de la coenzima Q (CoQ): "Q-junction".

1.3.3. Evaluación de la función mitocondrial

La mitocondria juega un papel clave en el metabolismo energético, por ello, es indispensable el estudio de la función mitocondrial tanto en estados de salud como de enfermedad. Existen diversos métodos para el análisis de la función mitocondrial, sin embargo uno de los más empleados, dada la información que proporciona es la determinación del consumo de oxígeno. Mediante respirometría se puede evaluar la función/disfunción mitocondrial monitorizando los cambios que tienen lugar por adición de distintos sustratos, inhibidores... No obstante, otros métodos, tales como la determinación del potencial de membrana, o el estudio de diversas enzimas metabólicas, se emplean de igual modo para comprobar y cuantificar el grado de disfunción bioenergética.

Como ya se ha mencionado con anterioridad, la técnica más empleada para valorar la función mitocondrial es la determinación del consumo de oxígeno. Esta medida puede realizarse en diversos tipos de muestras (mitocondrias aisladas, homogenado, fibras o células permeabilizadas o células intactas). Cada tipo de muestra presenta una serie de ventajas y desventajas que tienen que tenerse en cuenta a la hora de desarrollar una investigación determinada (Brand & Nicholls, 2011; Gnaiger, 2014; Pecinova *et al.*, 2011; Picard *et al.*, 2011; Saks *et al.*, 1998). Bajo un punto de vista fisiológico, cabría pensar que el estudio en células intactas es el mejor método a emplear, ya que permite un análisis

bioenergético *in vivo*, proporcionando por lo tanto los datos que más se asemejan a la realidad. Desafortunadamente, las células intactas presentan una considerable limitación, ya que determinadas moléculas no pueden atravesar la membrana celular (como sucede por ejemplo con el ADP). Para evitar dicha limitación, en muchas líneas de investigación se emplean células permeabilizadas. Sin embargo, en numerosas ocasiones el propio modelo experimental puede ser en sí mismo una limitación a la hora de trabajar con cultivos celulares. Por esta razón, el método clásico para la preparación de tejido es el aislamiento mitocondrial. No obstante al aislar la fracción mitocondrial existe cierta pérdida de masa mitocondrial, hecho que hay que tener en cuenta para una correcta valoración. Cuando se evalúa la función mitocondrial en músculo, además del aislamiento de mitocondrias, la preparación de fibras permeabilizadas es el método más empleado, siendo además el que mejor conserva la población mitocondrial (preservando casi el 100% de la misma), manteniendo al mismo tiempo la organización intracelular. Las principales ventajas y desventajas de los distintos métodos de preparación de muestras quedan recogidas en la **tabla 1**.

En definitiva, teniendo en cuenta todos estos aspectos, hay que optar por el método más adecuado para cada modelo experimental.

Para determinar la función-disfunción mitocondrial, el consumo de oxígeno se evalúa en distintas condiciones experimentales: en los estados respiratorios. Concretamente, el **estado 3**, es uno de los parámetros de mayor relevancia para estudiar la función bioenergética mitocondrial (Chance & Williams, 1955b). El estado 3 se obtiene tras la adición de una concentración determinada (no estandarizada) de ADP a la incubación de la muestra mitocondrial con determinados sustratos. El ADP es una señal que provoca una estimulación de la utilización de sustratos energéticos con la consecuente producción de ATP. Por lo tanto, el estado 3 permite evaluar la capacidad respiratoria máxima estimulada por ADP. No obstante, generalmente, las concentraciones empleadas de ADP no son saturantes, por lo que no tienen que reflejar la capacidad máxima de OXPHOS. Por esta razón, cada vez más investigadores optan por emplear adiciones consecutivas de una concentración determinada de ADP hasta obtener la concentración adecuada para cada sistema (concentración saturante), la cual nos reflejaría la **capacidad de OXPHOS** (Gnaiger, 2012b). Es importante considerar que este estado respiratorio está controlado tanto por la actividad del reciclaje de ADP (dependiente de la ANT, del transportador

fosfato y de la ATP sintasa), como por la oxidación de los sustratos (como la tasa de sustratos, el procesamiento de enzimas, los complejos de la cadena respiratoria, el pool de CoQ y cit c, así como de la concentración de oxígeno). Por ello, la inhibición de cualquiera de estos procesos podría disminuir este parámetro (Brand & Nicholls, 2011).

Método de preparación	Ventajas	Desventajas
Células intactas	<ul style="list-style-type: none"> * Refleja el comportamiento que sucede <i>in vivo</i>. * Mantiene las interacciones y estructuras mitocondriales. * No hay pérdida mitocondrial debido al proceso de obtención de la muestra. 	<ul style="list-style-type: none"> * Impermeabilidad de la membrana celular a ciertas moléculas (como el ADP), restringiéndose las opciones experimentales. * Utilización no factible en todos los modelos experimentales. * Más errores de interpretación.
Células permeabilizadas	<ul style="list-style-type: none"> * Permeabilidad de la membrana celular. * Mantiene las interacciones y estructuras mitocondriales. 	<ul style="list-style-type: none"> * Utilización no factible en todos los modelos experimentales.
Mitocondrias aisladas	<ul style="list-style-type: none"> * Permite la separación de subpoblaciones mitocondriales. * No existe interferencia con factores citosólicos. 	<ul style="list-style-type: none"> * Disminución de la masa mitocondrial que podría implicar la pérdida de las mitocondrias más dañadas. * Las interacciones mitocondriales son alteradas. * Se necesita más cantidad de tejido.
Fibras permeabilizadas	<ul style="list-style-type: none"> * Es necesaria una cantidad mínima de tejido. * Conserva casi el 100 % de la población mitocondrial. * Presentes todos los tipos de mitocondrias. * No se alteran las interacciones celulares. * No se fragmenta la morfología mitocondrial. 	<ul style="list-style-type: none"> * Es requerido el uso de detergentes. * Heterogeneidad resultados.
Homogenado	<ul style="list-style-type: none"> * Poca cantidad de tejido es requerida. * Preparación muy rápida. * Reproducibilidad. * No es requerido el uso de detergentes. * Homogeneidad resultados. 	<ul style="list-style-type: none"> * Existe cierta pérdida de contenido mitocondrial.

Tabla 1. Ventajas e inconvenientes que presentan los distintos tipos de muestras que pueden emplearse para la evaluación de la función mitocondrial.

Tras el estado 3, cuando todo el ADP es fosforilado a ATP, la respiración se enlentece proporcionando el denominado **estado 4**. El estado 4 representa el **estado leak**, es decir, la respiración en un estado de no fosforilación cuando el consumo de oxígeno es mantenido principalmente para compensar la fuga de protones a través de la membrana mitocondrial

interna, cuando la ATP sintasa no está activa, reflejando un desacoplamiento intrínseco. Es posible, que en las preparaciones mitocondriales pueda existir una contaminación de actividad ATPasa (que reciclan el ATP sintetizado a ADP), la cual proporciona una sobreestimación de la respiración en el estado leak. Este aspecto se soluciona frecuentemente con la adición de oligomicina (inhibidor específico de la ATP sintasa) o tomando el estado leak sin presencia de adenilato (Brand & Nicholls, 2011). Por lo tanto el estado leak puede obtenerse de tres maneras: 1) cuando todo el ADP es transformado en ATP (correspondería al clásico estado 4), 2) antes de la adición de ADP a la preparación mitocondrial (sin adenilato) y 3) empleando oligomicina (Gnaiger, 2012b).

Un indicador del acoplamiento entre la cadena respiratoria y la fosforilación oxidativa viene dado por el denominado **cociente de control respiratorio (RCR)**, el cual también determina el estado de la integridad de la membrana interna mitocondrial. El índice RCR se calcula como el cociente entre el consumo medio de oxígeno en el estado 3 y leak.

ESTADO	DESCRIPCIÓN
LEAK	Se trata de un estado no fosforilativo, cuando el consumo de oxígeno es mantenido principalmente para compensar la fuga de protones a través de la membrana mitocondrial interna, cuando la ATP sintasa no está activa.
Capacidad de OXPPOS	Capacidad respiratoria de la mitocondria en un estado ADP activado de la fosforilación oxidativa, a concentraciones saturantes de ADP.
Capacidad ETS	Es la capacidad respiratoria del sistema de transporte electrónico, obtenida experimentalmente (estado completamente desacoplando de la mitocondria) mediante el uso de un agente desacoplante a la dosis adecuada. La capacidad ETS, depende de los complejos respiratorios (CI-CIV), la flavoproteína ETF, la glicerolfosfato deshidrogenasa, así como de los transportadores de la membrana mitocondrial interna, del ciclo TCA y otras deshidrogenasas de la matriz mitocondrial.
Consumo de oxígeno residual (ROX)	Es el consumo de oxígeno debido a reacciones oxidativas en la mitocondria, independiente de la respiración mitocondrial. Se obtiene tras la adición de inhibidores de los distintos complejos respiratorios.

Tabla 2. Estados respiratorios. Tomado de Gnaiger E (2009)(Gnaiger, 2009)

1.3.4. Acoplamiento de la fosforilación oxidativa y la respiración

El acoplamiento entre la síntesis de ATP y la oxidación de sustratos en la cadena de transporte electrónico no es completo, ya que existe un flujo de protones que retorna a la matriz mitocondrial a través de otras vías independientes a la ATP sintasa. Es decir, existe

una disociación entre los dos procesos acoplados (transporte de electrones y fosforilación oxidativa) que ocurre cuando se produce una disipación del gradiente electroquímico a través de la membrana interna, que promueve el escape de protones hacia la matriz y el consecuente descenso del potencial de membrana, lo cual disminuye la producción de ATP.

Existen tres conceptos distintos de los estados de acoplamiento o desacoplamiento mitocondrial (Gnaiger, 2012b):

- **Uncoupled.** Se trata del desacoplamiento intrínseco que tiene lugar en condiciones fisiológicas.
- **Dyscoupled.** Hace referencia a la respiración desacoplada como consecuencia de una situación patológica.
- **Noncoupled.** El estado no acoplado es el inducido experimentalmente mediante el uso de determinados desacoplantes químicos, tales como el 2,4-dinitrofenol (DNP) o el carbonylcyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP). Estas sustancias generan un aumento del consumo de oxígeno (la cadena de transporte mitocondrial se estimula hasta su capacidad máxima) como mecanismo compensatorio del descenso de la fuerza protón-motriz que desencadenan. Por lo tanto, mediante el uso de un desacoplante (en la concentración óptima) se puede obtener una estimación de la máxima respiración mitocondrial en el estado no acoplado (noncoupled) de la capacidad ETS.

El desacoplamiento puede originarse debido a los procesos que se detallan a continuación (Kadenbach, 2003):

- *Debido a componentes que incrementen la permeabilidad de la membrana a protones o cationes (desacoplamiento extrínseco):*
 - **Proton leak:** Se trata de la difusión de protones a través de la membrana mitocondrial interna, no asociada a la síntesis de ATP, debida a cambios en la permeabilidad de la misma. Es el mecanismo predominante responsable de un acoplamiento incompleto. En condiciones fisiológicas, aproximadamente el 20-25% de la tasa metabólica basal es debida al fenómeno de proton leak mitocondrial.
 - **Ácidos grasos.**

- **Desacoplantes químicos:** Los desacoplantes químicos (tales como el DNP, FCCP o el CCCP) actúan como protonóforos, disipando totalmente el gradiente de protones en la mitocondria.
- **Desacoplantes moleculares** como las proteínas desacoplantes (**UCPs**, del inglés “*uncoupling proteins*”), que están presentes en la membrana interna mitocondrial y disipan de forma controlada el gradiente de protones, constituyendo un mecanismo estratégico muy común en los seres vivos para regular la eficiencia energética (**Fig. 7**). Las UCPs forman una subfamilia dentro del grupo de transportadores de anions mitocondriales (**MACP**, del inglés “*mitochondrial anion carrier family*”). La proteína UCP-1, que desvía la producción de energía a la formación de calor, fue la primera identificada, y actualmente se han descrito cinco tipos (de la UCP-1 a la UCP-5). La mitocondria puede provocar un leve desacoplamiento (en inglés “*mild uncoupling*”) mediante las UCPs para prevenir un incremento en la fuerza protón-motriz como mecanismo defensivo frente al estrés oxidativo, reduciendo la producción de especies reactivas de oxígeno como el anión superóxido (Ledesma *et al.*, 2002).

- **Debido a una disminución en la eficiencia de la bomba de protones (desacoplamiento intrínseco):**

- **Proton slip:** Tiene lugar por una disminución de la eficiencia en las bombas de protones, de tal forma que se expulsan al espacio intermembrana menos protones por electrón de los esperados. Hasta la fecha, únicamente se ha descrito la existencia de *slip* como regulador y con significado fisiológico en la F_0F_1 -ATP sintasa y en el complejo respiratorio IV (citocromo c oxidasa).

Papel fisiológico del desacoplamiento mitocondrial

El desacoplamiento tiene un papel importante ya que permite ajustar el metabolismo energético, minimizando el daño oxidativo al moderar la fuerza protón-motriz y por ende la producción de ROS. Ante una situación de daño oxidativo, las células aeróbicas son capaces de provocar un leve desacoplamiento entre la respiración y la fosforilación oxidativa, generando una caída en el potencial de membrana mitocondrial para prevenir la formación de ROS (fundamentalmente del anión superóxido) sin una caída deletérea de la síntesis de ATP. Además, otras funciones fisiológicas han sido atribuidas al proceso de desacoplamiento, tales como la termogénesis o su implicación en la muerte celular (Echtay, 2007; Sluse, 2012).

2. ESTRÉS OXIDATIVO

2.1. DEFINICIÓN

Se trata de un desequilibrio entre sustancias prooxidantes y antioxidantes a favor de las primeras, generando un daño oxidativo que desencadena alteraciones fisiológicas. El estrés oxidativo puede producirse por un incremento de las sustancias prooxidantes, por deficiencia de las antioxidantes o por ambos motivos simultáneamente.

2.2. RADICALES LIBRES Y ESPECIES REACTIVAS

Un radical libre es cualquier especie química (molécula o átomo) capaz de existir de forma independiente y que presenta uno o más electrones desapareados en su estructura (Cheeseman & Slater, 1993; Halliwell *et al.*, 1992). Precisamente, la elevada reactividad que presentan radica en la presencia de electrones desapareados (el grado de reactividad viene determinado por la localización de dichos electrones). Los radicales libres tienden a reaccionar con otras moléculas próximas, ganando o cediendo electrones, con la finalidad de adquirir una conformación más estable, pero pudiendo transformar dichas moléculas en especies reactivas (moléculas muy reactivas que tienen al menos un electrón en un orbital de mayor contenido energético).

La mitocondria es la principal fuente endógena de radicales libres (Murphy, 2009). Dado que la transferencia de electrones a través de la cadena de transporte electrónico mitocondrial no es perfecta, se produce un escape de electrones que reaccionan con el oxígeno molecular (aceptor final de electrones), fenómeno conocido como pérdida o fuga de electrones o en inglés electron leak (e^- leak), produciéndose el anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (HO^{\bullet}) (Romero & Bueno, 1989).

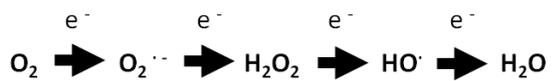


Fig. 8. Generación de ROS por escape de electrones en la cadena de transporte mitocondrial.

Cuando se produce estrés oxidativo o nitrosativo (balance desequilibrado en el que predominan las especies reactivas de oxígeno ROS o nitrógeno RNS respectivamente), se produce un fracaso mitocondrial responsable de una disminución del ATP (que promueve la activación de factores apoptóticos, que tras provocar la apoptosis de las células, finalmente desencadena una reacción inflamatoria por la activación del sistema inmune) y de lesiones a las membranas, proteínas y al ADN.

2.3. ÓXIDO NÍTRICO Y MITOCONDRIA

El óxido nítrico (NO•) es un radical libre sintetizado por la enzima óxido nítrico sintetasa (NOS), que regula la respiración mitocondrial. El NO• de la mitocondria procede mayoritariamente de la propia NOS mitocondrial (mtNOS), que presenta dos isoformas, una constitutiva (c-mtNOS proveniente de nNOS) y otra inducible (i-mtNOS que proviene de la iNOS) (Alderton *et al.*, 2001; Andrew & Mayer, 1999; Zaobornyj & Ghafourifar, 2012). Ambas isoformas, en condiciones normales, contribuyen de forma equitativa a la producción de óxido nítrico mitocondrial. No obstante, cuando se produce un proceso inflamatorio, tal como la sepsis, se induce la i-mtNOS generando grandes cantidades de NO• (Boveris *et al.*, 2002; Escames *et al.*, 2003).

El NO• es un competidor fisiológico del oxígeno por el sitio de unión del complejo IV de la cadena de transporte mitocondrial. En condiciones fisiológicas, en un tejido oxigenado (20 μM de O_2) el ratio $[\text{O}_2]/[\text{NO}\bullet]$ presenta un valor comprendido entre 500 y 1000, produciéndose una inhibición competitiva del CIV de un 16-26%. No obstante, cuando se produce un incremento de la producción de NO• (por encima de 30 μM), el NO• se une (de forma reversible) al complejo citocromo c oxidasa (IV) y a los complejos I y III (siendo el CI más susceptible a ser inhibido por el NO• que el CIII; IC_{50} (CI) = 0.1 μM , IC_{50} (CIII) = 0.2 μM), reduciendo el transporte de electrones, lo que favorece el escape de electrones y la consecuente producción de ROS, especialmente del anión superóxido ($\text{O}_2\bullet^-$) (Boveris *et al.*, 2000; Brown, 1999; Cadenas, 2004). Además, el NO• tiene la capacidad de reaccionar de forma muy rápida con el anión $\text{O}_2\bullet^-$, produciéndose peroxinitritos (ONOO^-), moléculas muy tóxicas que se unen a los complejos respiratorios, pero de manera irreversible. Como consecuencia tiene lugar una disfunción mitocondrial que finaliza con la muerte celular (Brown, 1999; Brown & Borutaite, 2002). En resumen, el NO• actúa por un lado como un regulador fisiológico y por otro, como agente citotóxico (Brown, 1999).

2.4. SISTEMAS ANTIOXIDANTES

Un antioxidante es cualquier sustancia que cuando está presente a bajas concentraciones en presencia de un sustrato oxidable, retrasa o previene la oxidación del mismo.

La mitocondria posee una serie de sistemas antioxidantes para “luchar” contra la generación de especies reactivas, las cuales como ya se ha comentado, acontecen

fundamentalmente en la mitocondria. Entre todos los sistemas antioxidantes, podemos destacar:

- Superóxido dismutasa (SOD).
- Catalasa.
- Pool glutation.
- Coenzima Q.
- **Melatonina.**

La mitocondria también presenta dos mecanismos antioxidantes que dependen de las UCPs y del citocromo c. Cuando se generan especies reactivas de oxígeno, como el anión $O_2^{\bullet-}$, la primera defensa de la mitocondria es producir un leve desacoplamiento con la finalidad de reducir el potencial de membrana mitocondrial y así poder reducir el $O_2^{\bullet-}$ (Skulachev, 1999). Si este sistema “defensivo” no resulta suficientemente eficaz, entra en juego el citocromo c que hay disuelto en el espacio intermembrana. El citocromo c oxida el $O_2^{\bullet-}$ transformándolo en O_2 ($cyt. c^{+3} + O_2^{\bullet-} \rightarrow cyt. c^{+2} + O_2$) (Korshunov *et al.*, 1999).

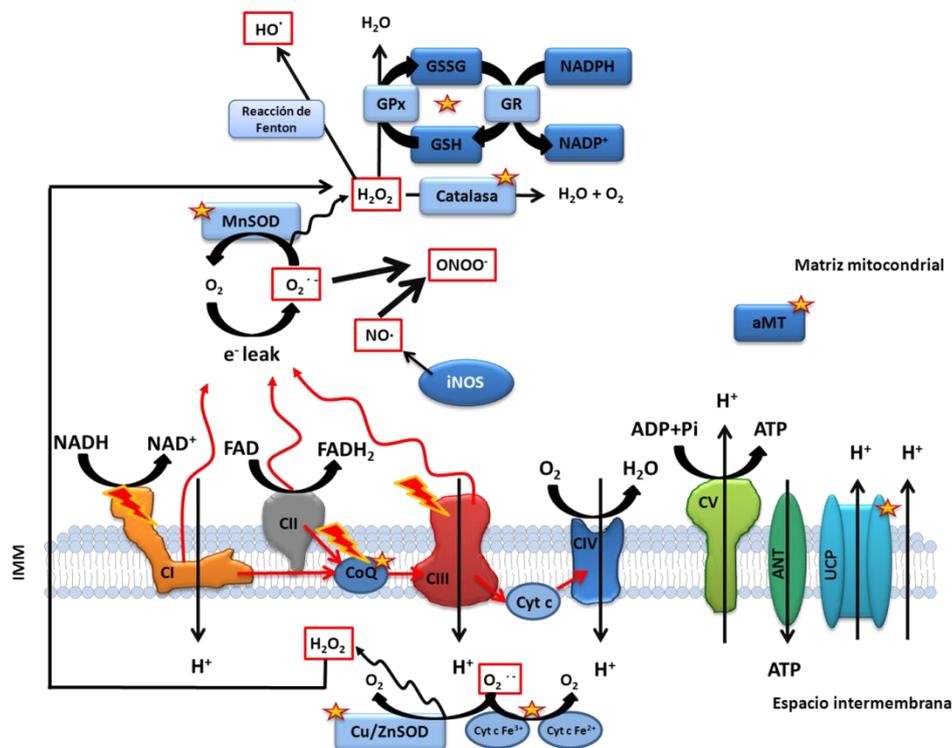


Fig. 9. Producción de especies reactivas y detoxificación en la mitocondria.

3. SEPSIS

3.1. DEFINICIÓN E IMPORTANCIA SANITARIA

La sepsis es una respuesta sistémica del organismo frente a una infección. En primer lugar, es importante señalar el problema semántico que desde hace años ha envuelto al concepto de sepsis. En 1991, tuvo lugar entre las sociedades norteamericanas (*The American College of Chest Physicians* y *The Society of Critical Care Medicine*) una Conferencia de Consenso que unificó conceptos relacionados, tales como septicemia, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS), sepsis, sepsis grave y shock séptico. Estas definiciones establecen una evolución progresiva de la sepsis, desde una infección inicial (sepsis) hasta el estado más grave: el shock séptico (**tabla 3**).

DEFINICIONES DE SEPSIS Y TRASTORNOS ASOCIADOS A LA SEPSIS

Septicemia	Conjunto de situaciones clínicas en las que se encuentran microorganismos en la sangre. Este término es ambiguo y se recomienda su eliminación.
Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS)	Respuesta inflamatoria sistémica a diversos estímulos (traumatismo, infección). Su diagnóstico exige dos o más de las siguientes alteraciones: <ol style="list-style-type: none"> 1. Temperatura > 38° C o < 36° C 2. Frecuencia cardíaca: > 90 latidos/min 3. Frecuencia respiratoria: > 20 respiraciones/min o PaCO₂ < 32 mm Hg 4. Recuento leucocitario: > 12000 cel/mm³, < 4000 cel/mm³ o > 10% de formas inmaduras
Sepsis	Respuesta sistémica a la infección. La infección se considera un fenómeno microbiano caracterizado por una respuesta inflamatoria a la presencia de microorganismos. La respuesta sistémica a la infección se manifiesta por dos o más de las siguientes alteraciones: <ol style="list-style-type: none"> 1. Temperatura > 38° C o < 36° C 2. Frecuencia cardíaca: > 90 latidos/min 3. Frecuencia respiratoria: > 20 respiraciones/min o PaCO₂ < 32 mm Hg 4. Recuento leucocitario: > 12000 cel/mm³, < 4000 cel/mm³ o > 10% de formas inmaduras
Sepsis grave	Sepsis asociada con disfunción orgánica, hipoperfusión o hipotensión. La hipoperfusión o las alteraciones de la perfusión pueden cursar con acidosis láctica (> 2 mmol/l), oliguria (< 0,5 ml/kg/h al menos durante 1h o < 30 ml/2h) y alteraciones del estado mental (escala de Glasgow 11). La hipotensión se define como tensión arterial sistólica (TAS) < 90 mm Hg o disminución de > 40 mm Hg del valor basal en hipertensos con ausencia de otras causas conocidas de hipotensión. Sepsis con hipotensión (TAS < 90 mm Hg o disminución de > 40 mm Hg del valor basal), a pesar de la adecuada resucitación de líquidos i.v., asociada con alteraciones de la perfusión, que pueden cursar, entre otros trastornos, con acidosis láctica (> 2 mmol/l), oliguria (< 0,5 ml/kg/h al menos durante 1h o < 30 ml/2h) y alteraciones del estado mental (escala de Glasgow 11).
Shock séptico	Sepsis con hipotensión (TAS < 90 mm Hg o disminución de > 40 mm Hg del valor basal), a pesar de la adecuada resucitación de líquidos i.v., asociada con alteraciones de la perfusión, que pueden cursar, entre otros trastornos, con acidosis láctica (> 2 mmol/l), oliguria (< 0,5 ml/kg/h al menos durante 1h o < 30 ml/2h) y alteraciones del estado mental (escala de Glasgow 11).

Tabla 3. Definiciones de sepsis y trastornos asociados establecidos en la Conferencia Consenso de las sociedades "The American College of Chest Physicians y The Society of Critical Care Medicine". Tomado de Durán HJ et al., 2002.

Posteriormente, en 1994, se produjo un nuevo encuentro, esta vez de la comunidad científica europea; encuentro en el que se intentó delimitar aún más las definiciones establecidas previamente. Fue a partir del 2004 (Levy *et al.*, 2003) cuando se realizó un último consenso respecto a las subclasificaciones de sepsis, que ha permitido que tanto los estudios como las estadísticas realizadas al respecto, muestren datos fiables.

El factor tiempo-dependiente es clave en el grado de disfunción del paciente con sepsis, ya que cuanto más tiempo transcurra desde el inicio del proceso séptico hasta la implantación de un tratamiento determinado, mayor será el daño orgánico así como la mortalidad de dichos pacientes. Estudios epidemiológicos recientes revelan una incidencia creciente de personas que desarrollan un proceso séptico (previéndose que continúe dicho incremento, fundamentalmente como consecuencia del envejecimiento de la población) (Angus *et al.*, 2001a; Mayr *et al.*, 2014). Concretamente, en los Estados Unidos se estima que la incidencia de la sepsis severa es de 300 casos por cada 100.000 habitantes, presentando la cuarta parte de los casos que desarrollan sepsis severa una gran probabilidad de morir. Cuando el paciente presenta shock séptico muestra una elevada probabilidad de morir, siendo esta aproximadamente del 50 % (Mayr *et al.*, 2014).

Además, cabe destacar que la sepsis es especialmente severa en la población envejecida (mayores de 65 años), comprendiendo aproximadamente el 60% de los casos de sepsis, mostrando también una mortalidad mayor comparada con los pacientes jóvenes (Angus *et al.*, 2001b; Martin *et al.*, 2006a; Turnbull *et al.*, 2009).

Por lo tanto, es importante destacar tanto la gran incidencia de esta afección, su elevada mortalidad (prácticamente invariable en los últimos veinte años) y morbilidad. Todos estos factores, sumados a que sea la primera causa de hospitalización en las unidades de cuidados intensivos (UCI) de países desarrollados, convierten a la sepsis en un gran problema para el sistema sanitario, acarreando además un costo económico bastante elevado (a partir de recientes resultados se estima que en EEUU el coste hospitalario anual ocasionado por pacientes con septicemia se encuentra entre los 14 billones de dólares) (Mayr *et al.*, 2014).

3.2. FISIOPATOLOGÍA DE LA SEPSIS

La sepsis es una enfermedad que resulta de una respuesta inmune innata exacerbada ante una infección. Las células del sistema inmune presentan receptores de

reconocimiento de patrones (PRRs del inglés "*patterns recognition receptors*"), que identifican estructuras muy conservadas que presentan los patógenos en su membrana. Estos motivos bacterianos reconocidos por el sistema inmune se denominan patrones moleculares asociados a la patogenicidad (PAMPs del inglés "*pathogen-associated molecular patterns*"), y pueden ser lipopolisacáridos en el caso de bacterias Gram negativas; exotoxinas, peptidoglicanos o ácido lipoteico en Gram positivas entre otros componentes bacterianos, víricos, fúngicos y parásitos (Cohen, 2002). Según los datos recogidos en el último estudio del "*European Prevalence of Infection in Intensive Care*" (EPIC II), la sepsis está originada fundamentalmente por bacterias Gram negativas (con una frecuencia del 62.2 %), y Gram positivas (46.8 %) (Mayr *et al.*, 2014). Ya sean los compuestos desencadenantes del proceso séptico de distinta procedencia, y disparen diferentes mecanismos de transducción iniciales, existe una gran similitud tanto en la fisiopatología como en las manifestaciones clínicas de la sepsis, ya que en definitiva, el huésped reacciona ante la invasión sistémica con una respuesta inmunoinflamatoria que está regulada por mediadores comunes (Bermejo & Duarte, 2003). Los PRRs se agrupan en 4 categorías distintas: receptores Toll-like (TLR del inglés "*Toll-like receptors*"), receptores de lectina de tipo c (CLR del inglés "*C-type lectin receptors*"), receptores del gen inducible del ácido retinoico I-like (RLR del inglés "*retinoic acid inducible gene I-like receptor*") y receptores de unión al dominio de nucleótido (NLR del inglés "*nucleotide-binding oligomerization domain like receptor*"). A través de la interacción de PRRs y PAMPs se activan las células inmunes, iniciándose la cascada inflamatoria (Angus & van der Poll, 2013).

Concretamente, cuando la sepsis es inducida por bacterias Gram negativas, el lipopolisacárido LPS (que se trata de una endotoxina consistente en un fosfoglicolípido anclado a la membrana bacteriana unido covalentemente a un heteropolisacárido hidrofílico), se une a unas proteínas plasmáticas llamadas proteínas de unión al LPS (LBP del inglés "*lipopolisaccharide binding protein*") que transfieren los monómeros de LPS a una glicoproteína de membrana (que forma parte del sistema receptor de LPS) de monocitos, macrófagos y polimorfonucleares llamada CD14; y a los receptores TLR (que también son componentes del sistema receptor de LPS) desencadenando una transducción de señales (de la que es responsable el dominio intracelular TIR), es decir, una vía de señalización que induce la liberación de citoquinas, estimulando la respuesta inmune. Los TLRs constituyen una importante parte del sistema inmune innato, que actúa como puente

entre éste y el sistema inmune adaptativo. Un tercer componente del sistema, necesario para que se produzca el reconocimiento de la endotoxina es MD-2 (del inglés “myeloid differentiation protein-2”).

La estimulación por LPS provoca una serie de señales que finalizan en la síntesis de moléculas proinflamatorias para poder acabar con la infección. Por un lado, se va a producir la activación del factor de transcripción NF- κ B (que puede activarse tanto por la vía de MyD88 como por una vía alternativa en la que también se genera el factor IRF3), mientras que por otra vía se van a activar otros factores de transcripción tales como la proteína activadora 1, el elemento de respuesta a suero y el elemento de respuesta a AMP_c (Takeuchi & Akira, 2001). El NF- κ B es un factor de transcripción que regula más de 200 genes implicados en la inflamación, la apoptosis y la proliferación celular, y por lo tanto tiene un papel importante en la fisiopatología del proceso séptico (Liu & Malik, 2006).

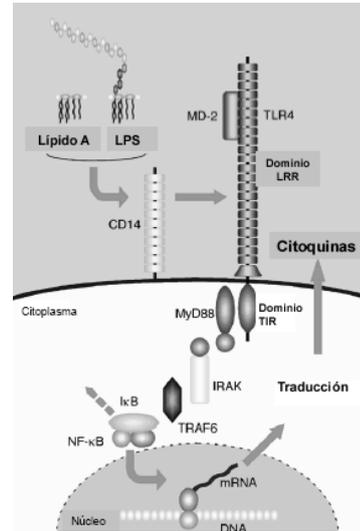


Fig.10. Reconocimiento del LPS.

3.3. DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL EN LA SEPSIS

Numerosos estudios avalan la existencia de una disfunción mitocondrial asociada a la sepsis (Brealey & Singer, 2003; Brealey *et al.*, 2004). Existen diversas vías implicadas en la disfunción mitocondrial durante la sepsis. Por un lado, debido al proceso séptico se produce una inducción de la iNOS en las células inmunológicas, liberándose óxido nítrico. Como ya se ha mencionado con anterioridad, el NO• presenta un papel dual. En este caso, muestra un efecto beneficioso como agente bactericida y vasodilatador con la finalidad de reclutar células inmunes en la zona infectada. No obstante, dado que la sepsis es una infección generalizada no localizada, la iNOS (tanto la isoforma citosólica como la mitocondrial) se induce en otros muchos tipos celulares (Crespo *et al.*, 1999; Escames *et al.*, 2003, 2006c, 2007; Lopez *et al.*, 2006b; Ortiz *et al.*, 2014). Este incremento considerable de la producción de NO• intramitocondrial, es responsable de la inhibición reversible tanto del complejo IV como de los complejos I y II, reduciéndose el transporte de electrones y por lo tanto favoreciéndose el escape de los mismos y la consecuente producción de más especies reactivas de oxígeno (ROS), fundamentalmente del anión O₂•⁻ (Alvarez &

Boveris, 2004; Crespo *et al.*, 1999; Escames *et al.*, 2003, 2006c, 2007; Lopez *et al.*, 2006b; Ortiz *et al.*, 2014). Además, el $\text{NO}\bullet$, reacciona con el anión $\text{O}_2^{\bullet-}$, generando los peroxinitritos (ONOO^-), que se unen a los complejos respiratorios inhibiéndolos de manera irreversible (Brown & Borutaite, 2002). También se ha descrito que la actividad de todos los complejos respiratorios disminuye significativamente durante la sepsis (Escames *et al.*, 2006c; Lopez *et al.*, 2006b; Ortiz *et al.*, 2014). Debido a la inhibición de los complejos respiratorios y a la caída en su actividad, se promueve la fuga de electrones y consecuentemente la formación de más especies reactivas.

Además, durante el proceso séptico disminuye la capacidad antioxidante y aumenta la peroxidación lipídica (LPO) de las membranas. El cociente GSH/GSSG experimenta una caída debido al incremento de la concentración de glutation disulfuro (GSSG) y el descenso de los niveles de glutation reducido (GSH) (Crespo *et al.*, 1999; Escames *et al.*, 2006c, 2007; Lopez *et al.*, 2006b; Ortiz *et al.*, 2014).

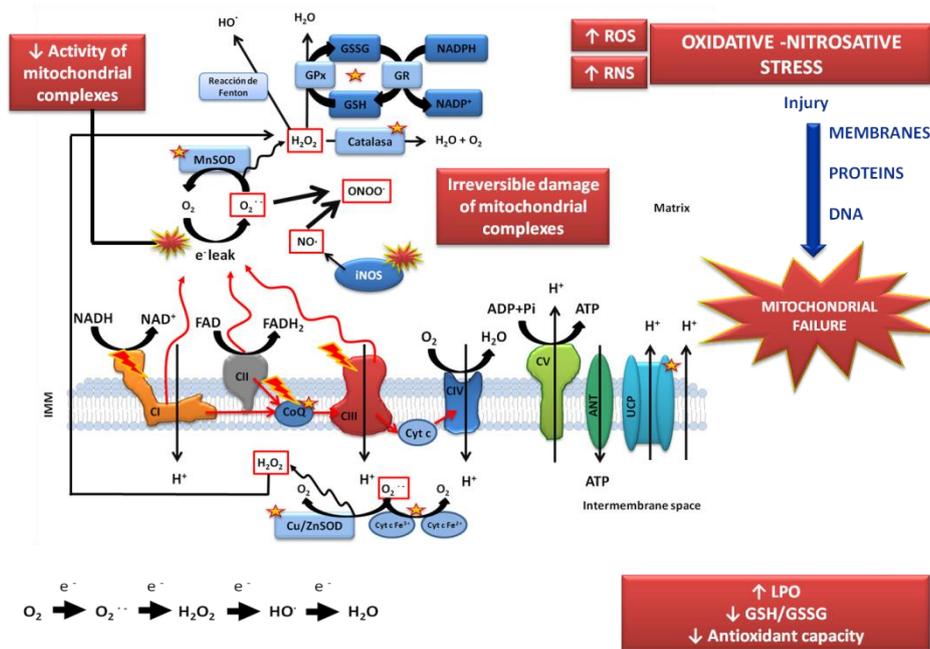


Fig. 11. Representación de los principales eventos bioenergéticos durante el proceso séptico.

En definitiva, debido a la sepsis se genera un estrés oxidativo/nitrosativo, que provoca daño a proteínas, ADN y membranas causando una disfunción mitocondrial severa y un fallo bioenergético, que finalmente conduce a la muerte celular.

4. MELATONINA

4.1. DEFINICIÓN

La melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) es una indolamina descrita en 1917 por McCord y Allen (McCord & Allen, 1917), que fue aislada por primera vez por Lerner en el año 1958 (Lerner *et al.*, 1958).

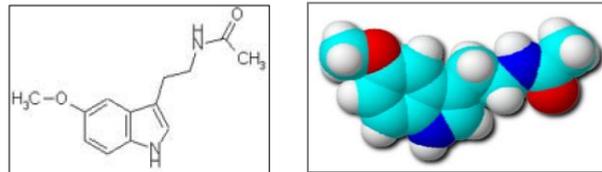


Fig. 12. Estructura de la melatonina

Se trata de una hormona muy conservada evolutivamente, que se puede encontrar en todos los compartimentos subcelulares (dado que su naturaleza lipofílica y hidrofílica le permite atravesar todas las barreras biológicas para prevenir el daño oxidativo-nitrosativo), aunque predomina significativamente en el núcleo y en la mitocondria, es decir, en aquellos lugares donde se originan los radicales libres, con la finalidad por lo tanto de disminuir la toxicidad celular (Acuna-Castroviejo *et al.*, 2003; Menendez-Pelaez & Reiter, 1993; Menendez-Pelaez *et al.*, 1993; Venegas *et al.*, 2012).

4.2. BIOSÍNTESIS DE LA MELATONINA

Al principio, se pensaba que la melatonina únicamente se originaba en la glándula pineal, desde donde se liberaba rápidamente al sistema vascular, accediendo a todos los tejidos, compartimentos celulares y fluidos corporales. No obstante, con posterioridad se ha demostrado que además de la producción pineal, la melatonina se sintetizaba en prácticamente todos los tejidos (Kvetnoy, 2002; Stefulj *et al.*, 2001; Acuna-Castroviejo *et al.*, 2014). Cabe destacar que la producción de melatonina extrapineal es mucho mayor que la pineal (varía en función del tejido, aunque alcanza valores del rango micromolar) (Stefulj *et al.*, 2001; Venegas *et al.*, 2012; Acuna-Castroviejo *et al.*, 2014). Además, no exhibe el ritmo característico de la melatonina pineal, la cual sí presenta un ritmo circadiano que alcanza sus niveles máximos durante la noche, sobre las 2-4 de la madrugada. Por otro lado, una característica a destacar es que la melatonina extrapineal permanece en el tejido, sin salir a

la circulación a pesar de encontrarse en concentraciones muy elevadas. Todo esto sugiere una acción diferente a la pineal, que probablemente debido a su capacidad antioxidante y antiinflamatoria sea como protección local en un tejido determinado (Venegas *et al.*, 2012).

La biosíntesis pineal de melatonina (controlada por el fotoperíodo) se origina a partir del triptófano, que tras penetrar en el pinealocito por transporte activo en contra de gradiente de concentración, es hidroxilado en posición 5 por la enzima L-triptófano hidroxilasa (TPH) generándose 5-hidroxitriptófano. Este 5-hidroxitriptófano sufre una descarboxilación mediada por la 5-hidroxitriptófano descarboxilasa transformándose en serotonina. La enzima N-acetil transferasa (NAT) acetila la serotonina dando lugar a la N-acetilserotonina que mediante una metilación por la hidroxindol-O-metil transferasa (HIOMT) genera la melatonina (Fig. 13). La melatonina pineal, una vez sintetizada es vertida al torrente circulatorio.

Respecto a la melatonina no pineal, cabe mencionar que se sintetiza por la misma vía metabólica que la pineal, y en la cantidad necesaria en el tejido en cuestión sin difundir de unos a otros.

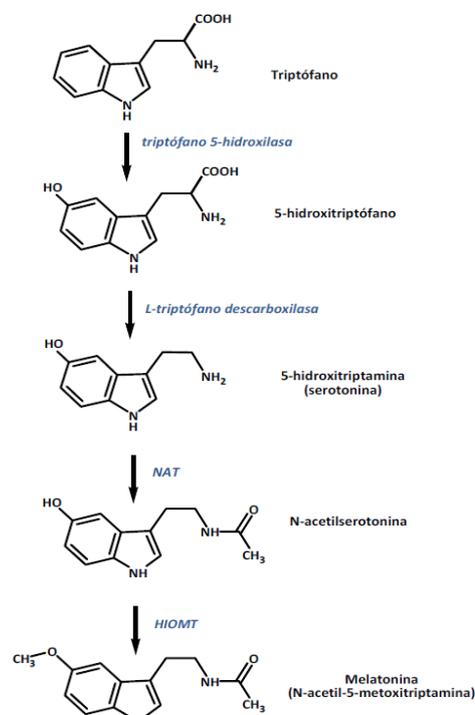


Fig. 13. Esquema de la síntesis de la melatonina.

4.3. MECANISMOS DE ACCIÓN DE LA MELATONINA

Actualmente existen cuatro mecanismos de acción propuestos:

- Unión a receptores de membrana (MT1 y MT2).
 - MT1: Cuando la melatonina se une al receptor MT1 se modulan señales intracelulares que inhiben la adenilato ciclasa y estimulan el inositol fosfato.
 - MT2: Cuando se une a la melatonina se inhibe la formación de los mensajeros secundarios cAMP y cGMP.
- Interacción con receptores nucleares (RZR/ROR).

- Interacción con proteínas citosólicas (calmodulina, calreticulina, y protein kinasa C).
- Depurador de radicales libres.
 - Acción directa: Ya que presenta la capacidad de depurar especies reactivas de oxígeno y nitrógeno.
 - Acción indirecta: Capacidad para inducir la expresión y actividad de algunas enzimas antioxidantes.

4.4. FUNCIONES DE LA MELATONINA

4.4.1. Antioxidante

La melatonina (aMT) y algunos de sus metabolitos, que tienen la capacidad de alcanzar todos los compartimentos subcelulares (incluidas las mitocondrias, en donde se puede acumular una gran concentración) ya que son tanto liposolubles como hidrosolubles, pueden interactuar con especies reactivas (tales como $O_2^{\bullet-}$ o HO^{\bullet}) estabilizándolas, es decir, actuarían como un depurador de radicales libres y especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno (Acuna-Castroviejo *et al.*, 2001).

Concretamente, la melatonina puede actuar sobre el radical hidroxilo (HO^{\bullet}) dando lugar a un compuesto, la 3-OH-melatonina cíclica, que puede emplearse como marcador del estrés oxidativo ya que se elimina por la orina (Tan *et al.*, 1998, 2002). La aMT también tiene la capacidad de depurar el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) generando AFMK (N-acetil-N-formil-5-metoxikinuramina) (Tan *et al.*, 2002). Estos productos originados por la melatonina cuando reaccionan con especies reactivas de oxígeno (la 3-OH-melatonina cíclica y el AFMK (que por deformilación forma AMK) son también potentes agentes antioxidantes.

Además, la melatonina puede depurar RNS. El nitrógeno del anillo pirrólico de la aMT reacciona con los altamente tóxicos peroxinitritos ($ONOO^-$), produciendo 1-nitrosomelatonina y 1-hidroximelatonina y, pudiendo generar otro compuesto: el 6-hidroximelatonina (también excretado por la orina, por lo que puede emplearse como marcador del estrés nitrosativo) que es un antioxidante de gran eficacia.

Otro efecto antioxidante de la melatonina comprende una reducción tanto de los niveles de peroxidación lipídica (LPO) basales como de los estimulados por el estrés oxidativo (Reiter *et al.*, 2003).

Como se ha mencionado con anterioridad, la melatonina como depurador de radicales libres, tiene además de la acción directa una acción indirecta. Se trata de la capacidad de estimular la actividad y la expresión de otros sistemas antioxidantes. Estimula el pool glutatión (aumentando la actividad de la glutatión peroxidasa y reductasa), la superóxido dismutasa (SOD) y la catalasa (Acuna-Castroviejo *et al.*, 2001; León *et al.*, 2004; Reiter *et al.*, 2003).

4.4.2. Antiinflamatoria

La melatonina inhibe la activación de NF- κ B (que se trata de un factor que induce la transcripción de mediadores de la inflamación) (Kleinert *et al.*, 1998) y reduce la inducción de la óxido nítrico sintasa inducible citosólica (iNOS) y mitocondrial (i-mtNOS) (Escames *et al.*, 2003; Ortiz *et al.*, 2014) restaurando los valores normales de NO•.

4.4.3. Papel de la melatonina en la bioenergética mitocondrial

La melatonina, que difunde al interior de las mitocondrias atravesando la membrana mitocondrial interna, juega un rol muy importante en la homeostasis mitocondrial. En la mitocondria, incrementa la actividad de los complejos de la cadena de transporte electrónico y consecuentemente la producción de ATP, disminuye el consumo de oxígeno (de manera concentración-dependiente) por una bajada en el flujo de oxígeno en el estado 3 y, mantiene los índices RCR y ADP:O. La melatonina también produce una disminución del potencial de membrana, reduciendo la probabilidad de que se escapen electrones y por lo tanto se formen especies reactivas (López *et al.*, 2009).

4.4.4. Papel de la melatonina en sepsis

La melatonina mediante su capacidad antioxidante directa e indirecta, así como a través de su actividad antiinflamatoria, previene el shock séptico y la disfunción orgánica múltiple, preservando una adecuada función mitocondrial. Los principales mecanismos por los que mantiene la función mitocondrial (dañada en el proceso séptico) son los que se detallan a continuación. Por un lado reduce la expresión de la enzima iNOS,

disminuyendo así los elevados niveles de NO• y ROS (Crespo *et al.*, 1999; Escames *et al.*, 2003, 2006c, 2007; Ortiz *et al.*, 2014). Además, la melatonina es capaz de restaurar la actividad de la CTE (incluso llegando a incrementar la actividad de algunos complejos respiratorios por encima de los niveles basales), así como la producción de ATP (Escames *et al.*, 2003, 2006c, 2007; Lopez *et al.*, 2006b; Ortiz *et al.*, 2014). También actúa normalizando la homeostasis del pool de glutatión y previniendo la peroxidación lipídica de las membranas (LPO del inglés “*lipid peroxidation*”) (Crespo *et al.*, 1999; Escames *et al.*, 2006c, 2007; Lopez *et al.*, 2006b; Ortiz *et al.*, 2014); Martín *et al.* 2000 FASEB J). Asimismo, se ha descrito un incremento significativo de la supervivencia debido al tratamiento con melatonina durante la sepsis (Escames *et al.*, 2006, 2007; Reynolds *et al.*, 2003).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

Existen numerosas vías implicadas en la disfunción mitocondrial durante el proceso séptico. Al comienzo de la sepsis, la respuesta inflamatoria desencadena alteraciones morfológicas y estructurales en la mitocondria (Crouser *et al.*, 1999; Singer & Brealey, 1999). Posteriormente, la activación de la poli-polimerasa (PARP-1) permite un consumo masivo de NAD⁺, lo que conlleva a una disminución de su disponibilidad, limitando por lo tanto la producción de ATP. Las citoquinas proinflamatorias producidas durante la sepsis participan en la inhibición del complejo piruvato deshidrogenasa (PDH), el cual reduce los sustratos de OXPHOS, favoreciendo una caída adicional en la producción de ATP (Regueira *et al.*, 2009; Wendel & Heller, 2010). En paralelo, durante la sepsis tiene lugar un incremento significativo de la expresión de la isoforma inducible de la óxido nítrico sintasa (i-NOS), con el consecuente aumento de los niveles de NO•. En la mitocondria, dicho NO• (que constituye un competidor fisiológico del oxígeno por el sitio de unión en el complejo IV de la cadena de transporte electrónico) inhibe reversiblemente el CIV de la CTE y, de manera concentración-dependiente, inhibe progresivamente otros complejos respiratorios. Además, el NO• puede reaccionar con el O₂•⁻ generando los altamente tóxicos peroxinitritos (ONOO⁻) (Crespo *et al.*, 1999; Escames *et al.*, 2003), los cuales inhiben irreversiblemente todos los complejos respiratorios.

Por lo tanto, la sepsis cursa con un estrés oxidativo-nitrosativo, capaz de dañar proteínas, ADN y lípidos de membrana, afectándose sistemas antioxidantes, tales como el pool glutatión (que sufre una depleción), la catalasa y la superóxido dismutasa, y causando tanto una disfunción mitocondrial severa como fallo bioenergético (Alvarez & Boveris, 2004; Escames *et al.*, 2003; Lopez *et al.*, 2006a).

Existe un consistente background que muestra que la mitocondria es la principal diana intracelular de la melatonina (Acuna-Castroviejo *et al.*, 2001, 2007, 2011). La melatonina previene el shock séptico y el fallo orgánico múltiple, reduciendo entre otros mecanismos, la expresión de la iNOS, mitigando los elevados niveles de NO• y ROS, y restableciendo la actividad de la CTE, así como de la producción de ATP (Acuna-

Castroviejo *et al.*, 2001, 2007, 2011; Escames *et al.*, 2003, 2007; Lopez *et al.*, 2009; Lopez *et al.*, 2006a).

Nuestra hipótesis es que la melatonina actúa específicamente en la mitocondria para contrarrestar el efecto deletéreo de la sepsis en la capacidad bioenergética mitocondrial, aumentando la eficiencia respiratoria. Este efecto de la melatonina debe ser suficiente para mantener una capacidad de producción de ATP, que explique los efectos protectores de la melatonina observados.

OBJETIVOS

Evaluar en hígado y corazón de ratones:

- 1) El efecto del proceso séptico sobre la bioenergética mitocondrial durante la etapa temprana y tardía de dicha patología.
- 2) El comportamiento mitocondrial sustrato-dependiente durante la sepsis.
- 3) El papel protector de la administración de melatonina sobre la función mitocondrial en ratones sépticos
- 4) El mecanismo de acción de la melatonina sobre la función mitocondrial durante el proceso séptico con distintas combinaciones de sustratos.

MATERIALES Y MÉTODOS

III. MATERIALES Y MÉTODOS

M-1. ANIMALES Y GRUPOS EXPERIMENTALES

Para la realización del presente estudio se han empleado ratones de la cepa C57/BL6, proporcionados por Harland (Barcelona, Spain) en condiciones estériles. Dichos ratones se mantuvieron bajo un fotoperiodo (ciclo de luz-oscuridad 12:12), temperatura ($22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) y humedad ($40\% \pm 1^{\circ}\text{C}$) constantes. Los ratones tuvieron libre acceso tanto a bebida como a comida (*ad libitum*). Todos los experimentos se llevaron a cabo acorde a las guías española (R.D. 53/2013) y europea (CETS#123) para la protección de animales utilizados para experimentación y otros fines científicos.

Se determinó la función mitocondrial tanto en hígado como en corazón de ratones-de 3 meses de edad; estableciéndose los siguientes grupos experimentales:

- Grupo control (C).
- Grupo de ratones con sepsis, sacrificados a las 8 horas de la inducción del proceso séptico (S8).
- Grupo de de ratones con sepsis, sacrificados a las 24 horas (S24).
- Grupo S8 tratado con melatonina (S8 M).
- Grupo S8 tratado con melatonina (S24 M).

M-2. MODELO DE INDUCCIÓN DEL PROCESO SÉPTICO

La sepsis se indujo por ligadura y punción cecal (CLP) (Wichterman *et al.*, 1980). En primer lugar, los ratones fueron anestesiados con equitensin intraperitoneal (1 ml/kg) y posteriormente se realizó una laparotomía media para abrir la cavidad abdominal. Una vez localizado y liberado el ciego, se drenaron retrógradamente las heces del colon ascendente hacia el ciego mediante presión manual. A continuación, se ligó el ciego justo por debajo de la válvula ileocecal y se perforó 3 veces con una aguja de calibre 22 la superficie cecal antimesentérica. Por último, se recolocó el paquete intestinal en la cavidad peritoneal y se suturó la pared abdominal aplicándose povidona yodada a la herida (Rittirsch *et al.*, 2009).

M-3. TRATAMIENTO

Se administraron 3-4 dosis (30 mg/kg de melatonina, disuelta en una proporción etanol:suero salino del 0.25% v/v) de forma secuencial de acuerdo al esquema mostrado en la **Fig. 14**.

- 30 min antes de la intervención quirúrgica (intraperitoneal).
- Inmediatamente tras la inducción del proceso séptico (subcutánea).
- 4 horas después de la operación (subcutánea).
- 8 horas después de la inducción de la sepsis mediante CLP (únicamente en el grupo experimental S24 M) (subcutánea).

Los animales se sacrificaron por dislocación cervical a las 8 ó 24 horas tras la inducción de la sepsis. Una vez sacrificados los ratones de los distintos grupos experimentales, se extrajeron rápidamente los hígados y los corazones para proceder a la preparación de la muestra. Para minimizar el daño mitocondrial, todos los procedimientos se llevaron a cabo en hielo.

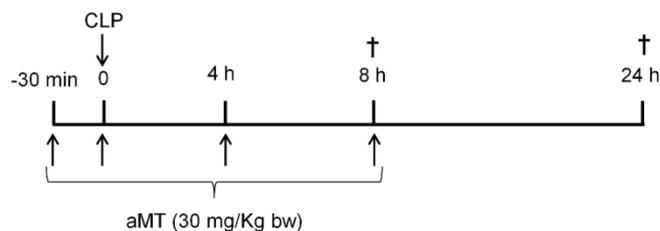


Fig. 14. Diagrama esquemático de la administración de melatonina en los ratones con sepsis inducida.

M-4. PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Las preparaciones mitocondriales se realizaron siguiendo protocolos previamente optimizados.

M-4.1. AISLAMIENTO DE MITOCONDRIAS DE HÍGADO

M-4.1.1. AISLAMIENTO DE LA FRACCIÓN MITOCONDRIAL PARA ESTUDIOS DE RESPIROMETRÍA

Tras el sacrificio de los ratones, se obtuvieron rápidamente los hígados para realizar la extracción mitocondrial. Para prevenir y/o minimizar el posible daño mitocondrial, todos

los procesos se llevaron a cabo en frío (Gnaiger *et al.*, 2000). Las mitocondrias de hígado se prepararon según el protocolo descrito por Lopez A (Lopez *et al.*, 2009). En primer lugar, se lavaron 0,5 g de hígado (correspondientes al lóbulo mayor) en suero salino fisiológico frío. El tejido se troceó con tijeras y homogenizó a 800 r.p.m. (1:10 p/v) con un homogeneizador de Teflón (Stuart Scientific, mod SS2, USA) en medio de aislamiento (**tampón A**) que contiene 250 mM de sacarosa, 0,5 mM de Na₂EDTA, 10 mM de Tris y 1 g/l de BSA libre de ácidos grasos, con un pH de 7,4 ajustado con HCl a 4° C. El homogenado fue centrifugado a 600 x g (todas las centrifugaciones llevadas a cabo para realizar el aislamiento de la fracción mitocondrial se realizaron en la centrífuga Beckman Avanti™ 30, California, USA, con un rotor de ángulo fijo F1010) durante 5 min a 4° C. El sobrenadante resultante se centrifugó de nuevo a 10.000 x g durante 10 min. Tras dicha centrifugación, el pellet obtenido se resuspendió en medio de aislamiento sin BSA (**tampón B**) con la finalidad de obtener una alícuota para la posterior determinación de proteínas mediante el método Bradford (Bradford, 1976). La muestra se centrifugó de nuevo (tras la previa adición de medio de aislamiento con BSA) a 10.000 x g durante 5 min. El pellet final fue resuspendido en **medio de respiración MiR05** (EGTA 0,5 mM, MgCl₂ ·6H₂O 3 mM, taurina 20 mM, KH₂PO₄ 10 mM, HEPES 20 mM, sacarosa 110 mM, K-lactobionato 60 mM y 1 g/l de BSA libre de ácidos grasos, pH 7,1 a 30° C, ajustado con KOH).

Tras el proceso de extracción mitocondrial, la fracción de mitocondrias crudas obtenida se mantuvo en hielo durante 1 hora para permitir la reestructuración de las membranas.

M-4.1.2 AISLAMIENTO DE LA FRACCIÓN MITOCONDRIAL PARA LA DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO TOTAL DE CITOCROMOS

El procedimiento para aislar mitocondrias de hígado para posteriormente determinar el contenido total de citocromos fue realizado según describe Navarro A con algunas modificaciones (Navarro *et al.*, 2009).

En primer lugar, se extrajo rápidamente el hígado (una vez sacrificado el animal por dislocación cervical), se pesó (0,5 g) y se lavó en **medio MST** frío que contiene 0,23 M de manitol, 0,07 M de sacarosa, 1mM de EDTA y Tris-HCl 5-10 mM con un pH de 7,2. Todos los procedimientos se llevaron a cabo en frío, tanto para evitar daño mitocondrial como para mantener una temperatura constante. Tras el lavado, el tejido se troceó y homogenizó a 800 r.p.m. en un homogeneizador de Teflón (Stuart Scientific, mod SS2,

USA) tras añadirsele medio MST (proporción 1:10 p/v). El homogenado resultante se centrifugó durante 10 min a 700 x g y a 4° C en una centrífuga Beckman Avanti™ 30, con un rotor de ángulo fijo F1010. El sobrenadante resultante se centrifugó de nuevo a 7.000 x g durante 10 min. El pellet resultante se resuspendió en medio MST, guardándose una alícuota para medir proteínas. El pellet final se mantuvo en hielo hasta que se llevaron a cabo las medidas espectrofotométricas (dentro de un período máximo de una hora).

M-4.1.2 AISLAMIENTO DE MITOCONDRIAS PARA DETERMINAR EL ENSAMBLAJE DE LOS COMPLEJOS RESPIRATORIOS EN SUPERCOMPLEJOS (SC) POR ELECTROFORESIS UNIDIMENSIONAL EN UN GEL DE POLIACRILAMIDA (BLUE NATIVE PAGE)

La preparación mitocondrial se llevó a cabo según el protocolo descrito por Fernandez-Vizarra (Fernandez-Vizarra *et al.*, 2002).

El tejido se lavó y homogenizó (4 ml/g de hígado) en el **tampón C** (que contiene 0.32 M de sacarosa, 1 mM de EDTA, 10 mM de Tris-HCl, y pH 7,4 a 4 ° C) a 600 r.p.m. (Stuart Scientific, mod SS2, USA). El homogenado resultante fue centrifugado a 1.000 x g durante 5 min (4° C). El sobrenadante se repartió en tubos eppendorf y fue centrifugado de nuevo a 14.400 x g durante 2 min a 4° C. Los pellets resultantes se resuspendieron con el **tampón C** y centrifugaron dos veces más. Por último, el pellet final, correspondiente a la fracción mitocondrial, se resuspendió en 600 µl del **tampón C**, y se alicuotó para su conservación a - 80 ° C hasta su posterior utilización. La concentración de proteínas se determinó a partir de una alícuota.

M-4.2. AISLAMIENTO DE MITOCONDRIAS DE CORAZÓN

M-4.2.1. OBTENCIÓN DE MITOCONDRIAS PARA EVALUAR EL CONTENIDO TOTAL DE CITOCROMOS

Al igual que en hígado, todos los procedimientos de extracción se llevaron a cabo en frío, para de este modo minimizar el daño mitocondrial (Gnaiger *et al.*, 2000).

El corazón se obtuvo rápidamente tras el sacrificio del animal. Una vez lavado en el **medio MST** (0,23 M de manitol, 0,07 M de sacarosa, 1mM de EDTA y Tris-HCl 5-10 mM con un pH de 7,2) se troceó y resuspendió en el **tampón MST** (1:10 p/v) para su posterior homogenización a 800 r.p.m. (Stuart Scientific, mod SS2, USA). El homogenado resultante

se centrifugó a $700 \times g$ durante 10 min (4°C), obteniéndose un sobrenadante que se centrifugó de nuevo a $7.000 \times g$ durante 10 min (4°C). El pellet final obtenido se resuspendió en medio MST y se conservó en hielo hasta la posterior determinación del contenido de citocromos (dentro del intervalo máximo de una hora tras el proceso de extracción). Se tomó una alícuota para la determinación de proteínas por el método Bradford.

M-4.2.2. AISLAMIENTO DE MITOCONDRIAS PARA DETERMINAR EL GRADO DE ENSAMBLAJE EN SC DE LOS COMPLEJOS RESPIRATORIOS

Las mitocondrias cardíacas se obtuvieron a partir de corazones frescos según el protocolo establecido por Fernández-Vizarra (Fernandez-Vizarra *et al.*, 2002). Tras el lavado del corazón en **medio D** fresco (0.075 M de sacarosa, 1 mM de EGTA, 10 mM de Tris-HCl, 0.1 % de BSA libre de ácidos grasos, pH 7,4), éste se trocó y homogenizó (10 ml/g de corazón) a 600 r.p.m. (Stuart Scientific, mod SS2, USA) en el medio D. El homogenado se centrifugó a $1.000 \times g$ durante 5 min a 4°C para eliminar núcleos y restos celulares. El sobrenadante obtenido se dividió en tubos eppendorf y se centrifugó a $12.000 \times g$ durante 10 min (4°C). El pellet resultante se resuspendió en 10 volúmenes de medio D y se centrifugó dos veces a $14.400 \times g$ durante 2 min (4°C) para lavar la fracción mitocondrial. Finalmente, el pellet mitocondrial se resuspendió en 70 μl del tampón D y se almacenó a -80°C hasta su posterior estudio, tomándose una alícuota para la determinación de proteínas.

M-4.3. PREPARACIÓN DE FIBRAS PERMEABILIZADAS CARDÍACAS

Para la determinación de la función mitocondrial en tejido cardíaco, se prepararon fibras permeabilizadas. Tras el sacrificio del animal, el corazón se transfirió rápidamente a un medio de preservación frío: **medio BIOPS** (del inglés, "*biopsy preservation solution*"), el cual está compuesto por 2,77 mM de CaK_2EGTA , 7,23 mM K_2EGTA , Na_2ATP , 6,56 mM de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 20 mM de taurina, 15 mM $\text{Na}_2\text{Phospho-creatina}$, 20 mM imidazol, 0,5 mM Dithiothreitol, 50 mM MES; pH 7,1). Una vez se comenzaba la preparación de las fibras (en un intervalo máximo de una hora tras el sacrificio del ratón), se eliminaba tanto el tejido conectivo como los capilares del corazón. Posteriormente se tomaba tejido correspondiente al miocardio del ventrículo izquierdo y se procedía a la permeabilización en dos pasos (**Fig. 15**) (Pesta & Gnaiger, 2012).

- *Permeabilización mecánica.*

- *Permeabilización química.*

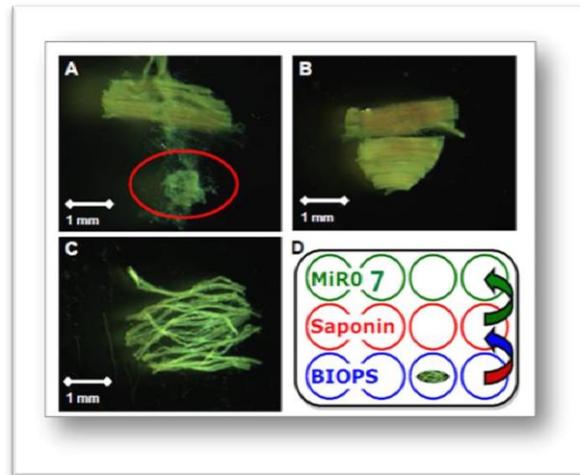


Fig. 15. Permeabilización de fibras. A-C) Permeabilización mecánica. B) Permeabilización química. Tomado de Pesta D, 2012.

M-4.3.1. PERMEABILIZACIÓN MECÁNICA

En primer lugar, los haces de fibras se separaron mecánicamente mediante la utilización de pinzas con una punta angular especial. Se obtuvo una adecuada permeabilización mecánica después de 1-2 min, tras observar un cambio en la coloración del tejido de rojo a un color pálido (**Fig. 15**).

M-4.3.2. PERMEABILIZACIÓN QUÍMICA

Tras la permeabilización mecánica, las fibras se situaron en un pocillo con 2 ml de medio BIOPS frío. Para llevar a cabo la permeabilización química dichas fibras se transfirieron a otro pocillo con 2 ml de BIOPS y saponina, la cual se preparó previamente en fresco (50 mg/ml in BIOPS). La permeabilización se realizó manteniendo las fibras en agitación y frío (en hielo y en cámara fría) durante 30 min. Finalmente, las fibras permeabilizadas se lavaron durante 10 min, tras ser situadas en otro pocillo con **medio de respiración MiR06Cr** (0.5 mM EGTA, 3 mM MgCl₂·6H₂O, 20 mM taurina, 10 mM KH₂PO₄, 20 mM HEPES, 110 mM D-sacarosa, 1 g/l BSA libre de ácidos grasos, 60 mM ácido lactobiónico y 280 unidades/ml de catalasa, a pH 7.1, enriquecido con 3 mg/ml de

creatina) (**Fig. 15**). Para preservar la función mitocondrial todos los procedimientos se realizaron en hielo – frío.

M-4.4. PREPARACIÓN DE HOMOGENADO

M-4.4.1. PREPARACIÓN DE HOMOGENADO DE HÍGADO

Tras el sacrificio del ratón, el hígado se lavó inmediatamente en suero salino y, posteriormente se troceó y homogenizó en **medio CPT** (0.05 M Tris-HCl y 0.15 M KCl, pH 7.5) en una proporción del 10 % (p/v). Posteriormente, el homogenado resultante se sonicó para romper la membrana mitocondrial mediante el homogenizador con ultrasonidos Sonopuls UW 2070 (Bandelin, Berlin, Alemania).

M-4.4.2. PREPARACIÓN DE HOMOGENADO A PARTIR DE LAS MUESTRAS PROCEDENTES DE RESPIROMETRÍA (FIBRAS PERMEABILIZADAS DE CORAZÓN)

Una vez finalizado el experimento de respirometría de alta resolución, se tomaron de la cámara del oxígrafo las muestras de fibras permeabilizadas y medio de respiración (2 ml) y, se recolectaron en un tubo Falcon. Seguidamente, se lavaron las cámaras del oxígrafo con 2 ml de medio de respiración fresco (MiR06Cr). Tras lavarse las cámaras el volumen se juntó con la muestra correspondiente, obteniéndose 4 ml de medio de respiración con la muestra (fibras permeabilizadas). Posteriormente, se homogenizó y sonicó (Sonopuls UW 2070, Bandelin, Berlin, Alemania).

M-5. MÉTODOS ANALÍTICOS

M-5.1. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS

El método empleado para la determinación de proteínas ha sido el método Bradford (Bradford, 1976). La elección de este método ha sido principalmente debido a su gran sensibilidad y rapidez.

El método Bradford se basa en la unión de un colorante hidrofóbico, Comassie Blue G-250 a las proteínas. El colorante, en solución ácida, existe en dos formas una azul y otra naranja. Las proteínas se unen a la forma azul para formar un complejo proteína-colorante (con un coeficiente de extinción mayor que el colorante libre) que es fácilmente detectable por un análisis espectrofotométrico (realizado en el espectrofotómetro Multispec-1501). La medida se realiza a 595 nm. Para llevar a cabo la determinación de

proteínas, es indispensable elaborar una curva patrón (con una proteína patrón, la albúmina sérica bovina, BSA). Los resultados se expresan en mg proteína/ml.

Este método es sensible (1-15 μg), simple, rápido, barato y pocas sustancias interfieren en su determinación. Entre las sustancias que interfieren están los detergentes y las soluciones básicas.

M-5.2. RESPIROMETRÍA DE ALTA RESOLUCIÓN

La función mitocondrial se evaluó midiendo la respiración mitocondrial mediante respirometría de alta resolución con el oxígrafo O2k (OROBOROS INSTRUMENTS, Innsbruck, Austria).

La respirometría es una medida de la respiración celular, aplicada tanto a sistemas ecológicos, organismos, órganos, tejidos, células y mitocondrias. No obstante, la **respirometría de alta resolución** (del inglés, "*high resolution respirometry*", **HRR**) presenta una serie de ventajas y adaptaciones frente a otras técnicas clásicas de análisis respirométrico. Se trata de una técnica mediante la cual se monitoriza continuamente la concentración de oxígeno en un sistema cerrado (ya que la cámara de incubación está sellada por los tapones de titanio, evitándose la difusión del aire de la habitación en el medio durante las mediciones). Además, la HRR combina una serie de características que le proporcionan un nivel único de resolución cuantitativa en la determinación de la concentración de oxígeno y el flujo de oxígeno.



Fig. 16. Oxígrafo de alta resolución.

El oxígeno se detecta gracias a los sensores polarográficos de oxígeno (POS) que son electrodos de tipo Clark. El sensor consiste en un cátodo de oro y un electrodo de referencia de Ag-AgCl (ánodo), inmersos en una solución saturada de KCl (electrolito) y separados de la solución problema (nuestra muestra o el medio de respiración para las calibraciones) por una membrana de teflón permeable al oxígeno. Entre el cátodo y el ánodo se establece un voltaje constante de -0.6 V (voltios). El oxígeno de la muestra difunde a través de una solución electrolítica hacia el cátodo donde se reduce originando

un cambio de intensidad de corriente entre ánodo y cátodo directamente proporcional a la PO_2 .

La intensidad de la corriente generada entre los electrodos va a ser proporcional a la concentración de oxígeno en la solución problema. La corriente generada se convierte en una señal externa (en un voltaje, es decir, un potencial eléctrico) que se amplifica y que podemos analizar con el software DatLab (OROBOROS INSTRUMENTS, Innsbruck, Austria). Dicho software nos permite además controlar *on-line*, durante el transcurso de un experimento, diversas condiciones para su desarrollo.

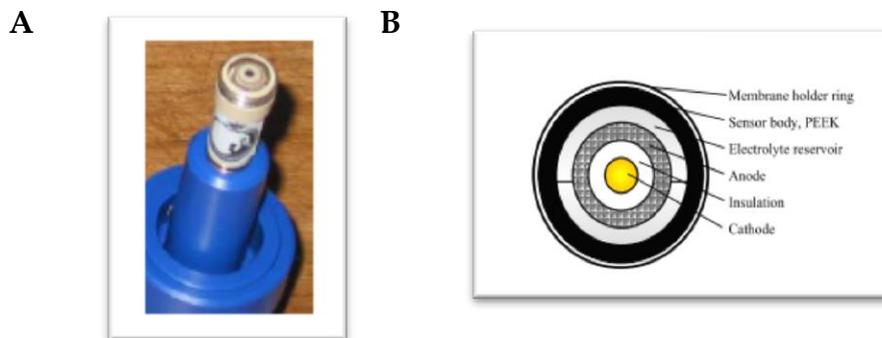


Fig. 17. Sensor polarográfico de oxígeno (POS). A) Imagen del POS. B) Esquema de las partes del sensor polarográfico de oxígeno.

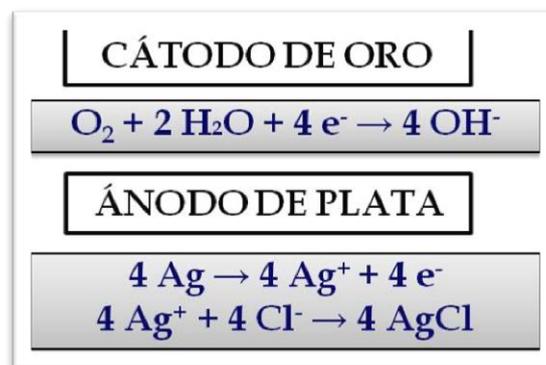


Fig. 18. Reacciones que tienen lugar en el cátodo y en el ánodo.

Algunas de las características que distinguen la HRR de los oxígrafos tradicionales empleados en estudios de respiración mitocondrial se exponen a continuación:

- Los **límites de detección** del flujo de oxígeno ($1 \text{ pmol s}^{-1} \text{ cm}^3$) y de la concentración de oxígeno ($0,005 \text{ } \mu\text{M O}_2$).
- Se requieren **pequeñas cantidades de muestra**, lo que conlleva un agotamiento más paulatino del oxígeno en el sistema, permitiendo que el tiempo se prolongue, pudiendo así evaluar la actividad respiratoria en cada estado metabólico y realizar complejos protocolos de adiciones. Además, para prolongar los experimentos que conllevan un mayor consumo de oxígeno, y evitar la anoxia-hipoxia en las cámaras del oxígrafo, es posible realizar reoxigenaciones (tanto abriendo las cámaras durante un breve período de tiempo como aplicando peróxido de hidrógeno en un medio de respiración adecuado).
- Existe la posibilidad de realizar **2 réplicas simultáneas o 2 experimentos diferentes al mismo tiempo** ya que posee **dos cámaras independientes**.
- Como protección, tanto las **cámaras, los sensores, como el sistema electrónico están blindados** con un bloque de cobre y acero inoxidable.
- Los sensores polarográficos de oxígeno (**POS**) quedan en contacto con la muestra gracias a que la cámara cilíndrica posee una **inserción angular**, situando la membrana que cubre el POS en la posición óptima para la agitación en la cámara.
- Todos los **materiales** que están en contacto con el medio de respiración, están diseñados para **minimizar la difusión y no reaccionan con el medio**.
- El **oxígrafo dispone de Peltier electrónico** completamente integrado, que permite un control sobre la **regulación de la temperatura** (en un rango comprendido entre los $2 - 45^\circ \text{ C}$, con un error de $\pm 0,001^\circ \text{ C}$). Además presenta **agitadores controlados**, así como la posibilidad de **encender/apagar la luz de las cámaras** para aquellos experimentos que conlleven algún componente fotosensible.
- Dispone de un **sistema de adición automático (TIP-2k)**.

La respirometría de alta resolución nos permite evaluar la función mitocondrial tanto en condiciones fisiológicas como patológicas, empleando diversos tipos de muestras: mitocondrias aisladas, homogenados, cultivos celulares, parásitos, fibras permeabilizadas y biopsias.

M-5.2.1. CALIBRACIONES

En un sistema cerrado, la situación ideal sería que la concentración de oxígeno permanezca constante, no obstante, en la práctica esto no sucede, ya que a bajas presiones de oxígeno en la cámara se produce una leve “back-diffusion” (difusión de oxígeno hacia el interior de la cámara), mientras que a elevados niveles de oxígeno hay una difusión del oxígeno hacia fuera de la cámara, a lo que se le suma el consumo de oxígeno por el POS.

Dado que estos errores interfieren en la eficiencia de nuestras medidas, es de suma importancia determinarlos. Mediante HRR esto es posible debido a los siguientes puntos:

- El sistema está formado con materiales adecuados que minimizan la posible difusión del oxígeno y que no interfieren ni reaccionan con el medio ni con la muestra (cámaras de vidrio, stoppers de PVDF o titanio, agitadores cubiertos de PEEK o PVDF).
- De forma rutinaria se lleva a cabo un “instrumental background” (error instrumental) con las condiciones de cada protocolo experimental (temperatura, agitación...).
- Una vez realizado el “instrumental background”, el software DatLab realiza una corrección automática del flujo de oxígeno.
- Calibraciones de oxígeno.

En definitiva, en HRR, tanto los materiales, las distintas calibraciones que se llevan a cabo para determinar la difusión de oxígeno, así como el consumo de oxígeno por parte de los sensores, proporcionan la base de la alta precisión y calidad de los resultados obtenidos.

M-5.2.1.1. Calibraciones

Se llevaron a cabo dos tipos de calibraciones, bajo cada condición experimental (temperatura, medio de respiración, agitación...) al principio y al final de cada tanda de experimentos. Por un lado, se realizó una **calibración estática** del sensor POS, basada en una calibración de dos puntos (denominadas “**air calibration**” y “**zero calibration**”). Estos 2 puntos, son obtenidos en condiciones de saturación de oxígeno en la cámara (air calibration) y de una concentración nula de oxígeno (zero calibration), es decir, se determinó la señal del POS a una saturación del aire al 0 y al 100% (que corresponde con R0 y R1) (**Fig. 19**). Tras la estabilización de la señal, R1 debe mostrar un voltaje menor a 10

V, concretamente entre 4 – 5 V para el control automático de la ganancia 2 (“gain” 2, empleado en las preparaciones mitocondriales, ya que se usa dentro del rango de 200 – 300 μM de oxígeno) y 2 V para gain 1 (utilizado en fibras permeabilizadas de corazón debido a que éstas se mantienen en las cámaras con una concentración de oxígeno comprendida entre 500 y 400 μM).

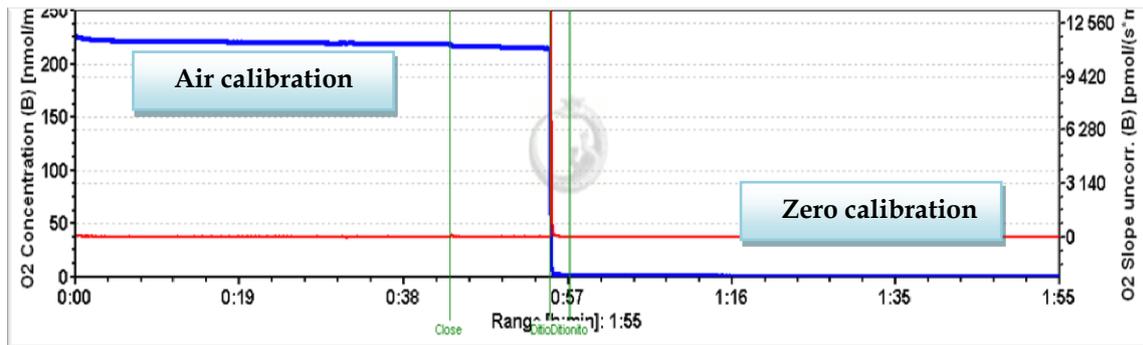


Fig. 19. Air/zero calibration. La línea azul muestra la concentración de oxígeno presente en la cámara (nmol/ml), mientras que la línea roja representa el consumo de oxígeno (pmol/(s*mg)). La primera parte de la calibración se lleva a cabo con las cámaras del oxígrafo abiertas, a máxima saturación de oxígeno (“air calibration”); mientras que la última parte nos muestra el flujo de oxígeno cuando el oxígeno presente en la cámara se ha agotado completamente como consecuencia de la adición de ditionito sódico (“zero calibration”).

La calibración a una saturación del 100 % de aire, “Air-calibration”, se realizó diariamente (**Fig. 20**). Una vez establecidos los parámetros correspondientes de dicha calibración, se cerraron las cámaras del oxígrafo y se continuó midiendo el consumo de oxígeno para chequear la posible existencia de contaminación biológica en el medio o en las cámaras. Una vez comprobado que el flujo de oxígeno en las cámaras cerradas es menor que 4 pmol/(s*mg), podemos afirmar que el sistema no está contaminado (**Fig.20**).

Por otro lado, también se realizó, al comienzo de cada calibración, un control de la respuesta del sensor, la llamada **calibración dinámica (stirrer test)** (**Fig. 20**).

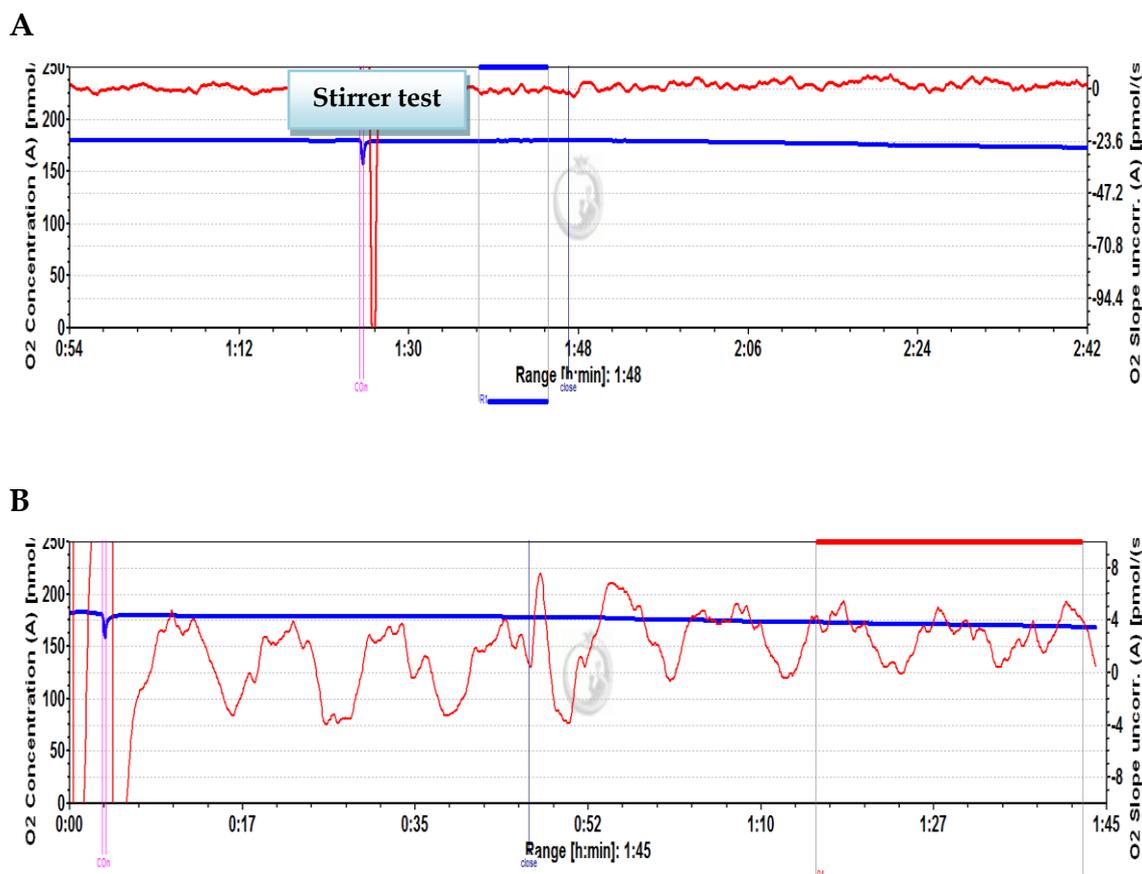


Fig. 20. "Air calibration" diaria. A) Air calibration y stirrer test (realizados con la cámara abierta). B) Comprobación de la ausencia de contaminación en el sistema (cámara cerrada).

M-5.2.1.2. Experimento para determinar el error instrumental: "Instrumental Background"

Como ya se ha mencionado anteriormente, se procedió tanto al comienzo como a la finalización de cada tanda experimental, a la determinación del error instrumental (instrumental background) (Fig. 21). Existen dos formas de realizar este test, con la adición secuencial del gas noble helio (He) o con una solución de ditionito sódico. Para la obtención de los resultados, se tomaron marcadores en el flujo de oxígeno: antes de la primera adición que ocasiona una caída de la concentración de oxígeno (J^o 1), y tras las siguientes adiciones de He o de la solución de ditionito sódico (J^o 2, J^o 3 y J^o 4). A partir de los 4 puntos obtenidos se elabora la ecuación empleada para la normalización de los experimentos.

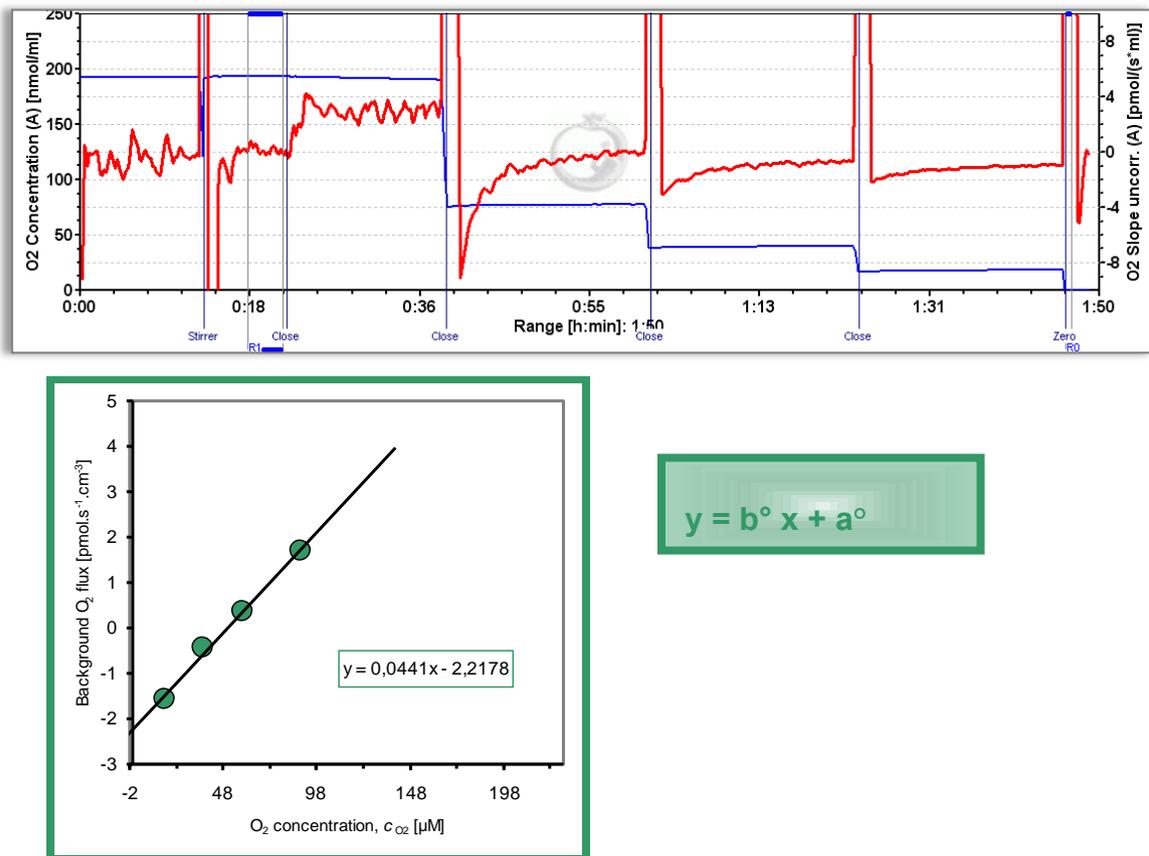


Fig. 21. Calibración del error instrumental: "Instrumental Background".

Es importante destacar que tanto las calibraciones como el "instrumental background" deben efectuarse en las mismas condiciones (de temperatura, voltaje, medio de respiración, agitación, gain sensor) que los experimentos que se realicen a posteriori.

En definitiva, todas las características del oxígrafo O2k, junto con las calibraciones, permiten minimizar la difusión del oxígeno proporcionándonos la base experimental para una gran exactitud en las medidas.

M-5.2.2. ESTUDIO DE LA FUNCIÓN MITOCONDRIAL MEDIANTE RESPIROMETRÍA DE ALTA RESOLUCIÓN

M-5.2.2.1. HRR en mitocondrias aisladas de hígado

Las condiciones en las que se han llevado a cabo los experimentos de respirometría en mitocondrias aisladas de hígado son las siguientes: 30° C de temperatura, 750 r.p.m. de agitación, usando una concentración final de proteína mitocondrial comprendida entre

0,3-0,4 mg/ml por cámara en un volumen de 2 ml de **medio de respiración MiR05** (Lopez *et al.*, 2009). Dicho medio fue equilibrado previamente en condiciones de saturación de aire ("air-calibration") en las mismas condiciones. El consumo de oxígeno fue expresado en pmol/s*mg protein.

Se emplearon 2 protocolos diferentes (protocolos SUIIT del inglés "*substrate-uncoupler-inhibitor titration*") para determinar los parámetros respiratorios (Gnaiger, 2008).

Protocolo 1

En el protocolo 1 (**Fig. 22A**), se le suministraron a las mitocondrias aisladas 5 mM de malato (M), 5 mM de glutamato (G) y 5 mM de succinato (S) como sustratos respiratorios para los complejos I y II (CI + II). Para la estimulación de la respiración dependiente de ADP (estado 3) se le añadió 0.20 mM de ADP (D) (Lopez *et al.*, 2009). Una vez se consumió todo el ADP, se inhibió el CI con 2.5 μ M de rotenona (Rot). Tras una posterior adición de ADP para obtener el estado 3 dependiente del CII, se aplicó una concentración de 5 μ g/ml de oligomicina (Olig) (inhibidor de la ATP sintasa) para evaluar el estado leak sin presencia de adenilato.

Protocolo 2

Por otro lado, se empleó un segundo protocolo (**Fig. 22B**) para determinar la función mitocondrial a partir del CI adicionando malato (5 mM) y glutamato (5 mM). Se proporcionó 0.20 mM de ADP a las mitocondrias para obtener el estado 3 con dichos sustratos (GM). Posteriormente, se suministró succinato (5 mM) como sustrato que proporciona electrones al CII y de nuevo ADP. Finalmente, se adicionó en una concentración óptima a cada experimento el agente desacoplante carbonylcyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazine (FCCP), para estimar la máxima capacidad del sistema de transporte electrónico (ETS) para los complejos CI + II y CII (éste último obtenido tras la inhibición del CI por rotenona) (Gnaiger, 2009).

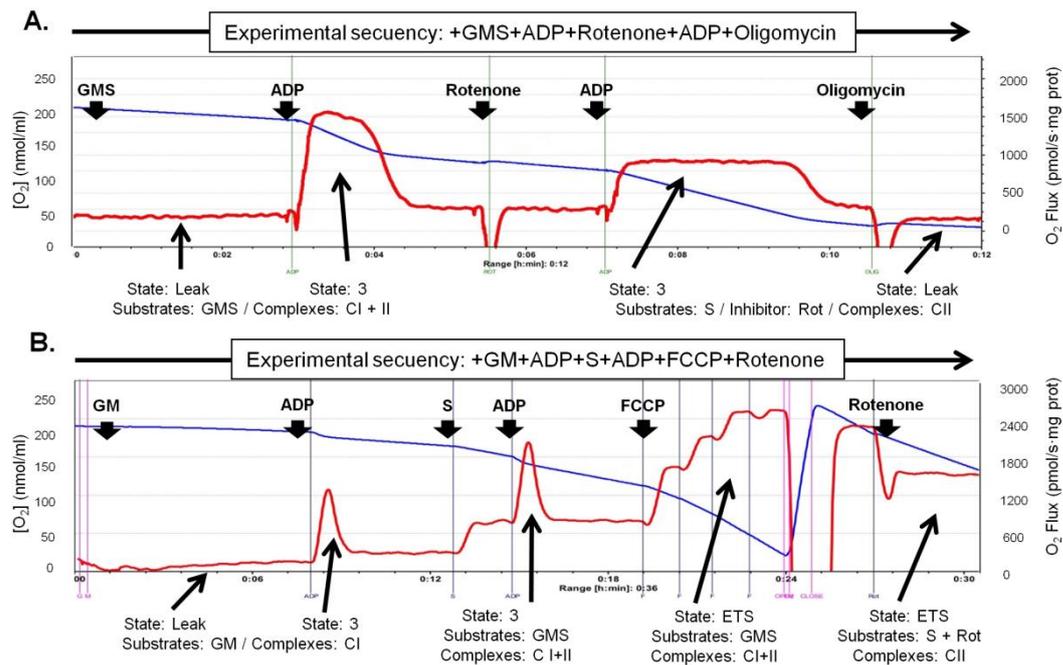


Fig. 22. Trazos típicos obtenidos mediante HRR en los experimentos llevados a cabo en mitocondrias aisladas de hígado de ratón. A) Protocolo 1. B) Protocolo 2.

Cuando el sistema lo requería, a fin de evitar un estado de hipoxia o anoxia, se llevó a cabo una reoxigenación de las cámaras. Dicha reoxigenación se realizó abriendo las cámaras hasta que se alcanzó una concentración de oxígeno adecuada. Una vez obtenida dicha concentración se cerraron las cámaras y se esperó a que el consumo de oxígeno se estabilizara para continuar con el experimento diseñado.

Una vez finalizados los experimentos, los datos se normalizaron por las calibraciones-correcciones correspondientes, así como por la concentración de proteína. Posteriormente, los datos se analizaron *off-line* mediante el software específico DatLab 4.

Además del estado 3 (respiración dependiente de la síntesis de ATP), del estado leak (respiración destinada a la fuga de protones, independiente de la síntesis de ATP) y de la máxima capacidad del sistema ETS (inducida artificialmente con el uso de un desacoplante), se calculó un ratio relevante bajo el punto de vista de la bioenergética mitocondrial. Concretamente, se determinó el ratio del control respiratorio (RCR), calculado como el cociente entre el flujo de oxígeno de la respiración en estado 3 y estado leak, empleando las 3 combinaciones de sustratos para los CI + II, CI y CII.

M-5.2.2.2. HRR fibras permeabilizadas de miocardio

Mediante HRR también se evaluó la función mitocondrial en fibras permeabilizadas de miocardio. Las medidas de consumo de oxígeno fueron llevadas a cabo en dos cámaras que contenían 2 ml del medio de respiración MiR06Cr en continua agitación (750 r.p.m.) a 37 ° C.

El flujo de oxígeno (expresado en pmol/s*mg de tejido) se determinó por la adición de las fibras permeabilizadas ($0.7 \pm$ mg peso húmedo/cámara) en el medio MiR06Cr del interior de la cámara del oxígrafo. Tras la adición se elevó la concentración de oxígeno de la cámara (alrededor de 400 nmoles de oxígeno) mediante la adición de O₂. Tras alcanzar dicho valor se cerró inmediatamente la cámara. Durante el transcurso de todo el experimento los niveles de oxígeno se mantuvieron en un rango de 450 - 250 μM para impedir una limitación de oxígeno en la cámara, es decir, una situación de anoxia o hipoxia en el interior de la cámara que pudiese influir en el estado mitocondrial. Dicho mantenimiento fue conseguido por pequeñas adiciones de una solución stock de H₂O₂ (200 mM) cuando se observaba que el consumo de oxígeno se acercaba al límite. Para evitar un posible daño derivado de éste H₂O₂, se controlaron las adiciones de H₂O₂ (adiciones de 1-3 μl), en un medio de respiración provisto de catalasa (siendo la concentración final de catalasa de 280 u/ml).

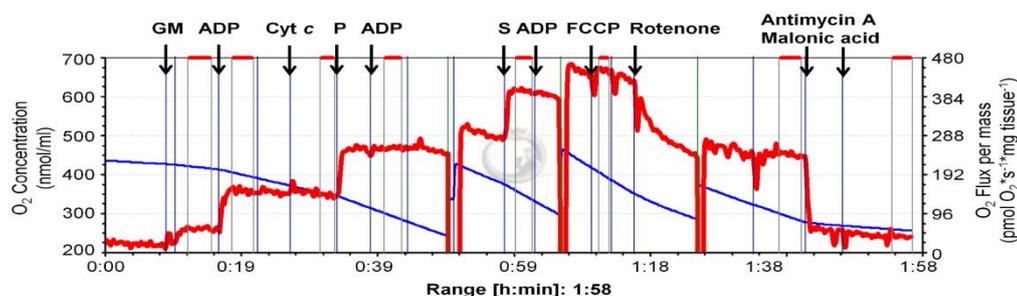


Fig. 23. Trazos típicos obtenidos mediante HRR en los experimentos llevados a cabo en fibras permeabilizadas de miocardio de ratón.

Como se observa en la Fig. 23, se empleó un protocolo SUIT para estudiar la función respiratoria mitocondrial en fibras permeabilizadas de corazón. La capacidad OXPHOS para el CI se determinó con 10 mM de glutamato (G) y 2 mM de malato (M) como sustratos, tras la adición de ADP en una concentración saturante. Posteriormente, la integridad de la membrana mitocondrial externa se evaluó mediante la adición de 10 μM de citocromo c (cyt c), 5 mM de piruvato (P) y nuevas concentraciones saturantes de ADP

se emplearon para obtener la capacidad OXPHOS con otra combinación de sustratos para el CI (GMP). Una vez obtenida la capacidad OXPHOS para el CI, se empleó 10 mM de succinato y concentraciones saturantes de ADP hasta alcanzar la capacidad OXPHOS con flujo de electrones convergente desde los complejos respiratorios CI+II. A continuación, se añadió el agente desacoplante carbonylcyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP) en una concentración óptima (0.5 - 1 μ M) para estimar la máxima capacidad ETS para CI+II. También se obtuvo la capacidad ETS para el CII mediante la adición de 1 μ M rotenona. Finalmente, mediante el uso de inhibidores de los complejos mitocondriales tales como el ácido malónico (5 mM) y la antimicina A (2.5 μ M), obtuvimos el consumo de oxígeno no mitocondrial (ROX). ROX fue empleado para corregir la respiración mitocondrial.

Los datos adquiridos *on-line* se analizaron posteriormente *off-line* mediante el software DatLab 4.

M-5.3. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITRATO SINTASA

La citrato sintasa (CS) (E.C.4.1.3.7) es una enzima del ciclo de Krebs, presente en la matriz mitocondrial, la cual es comúnmente empleada como marcador de masa mitocondrial. La actividad de la CS se determinó espectrofotométricamente (UV-1603, Shimadzu, Kyoto, Japan) a 30 °C en homogenado de hígado (ver apartado M-4.4.1. PREPARACIÓN DE HOMOGENADO DE HÍGADO) o de corazón (en este caso el homogenado procede de las fibras permeabilizadas empleadas en los experimentos de respiración mitocondrial, ver apartado M-4.4.2 PREPARACIÓN DE HOMOGENADO A PARTIR DE LAS MUESTRAS PROCEDENTES DE RESPIROMETRÍA (FIBRAS PERMEABILIZADAS DE CORAZÓN)).

Se incubaron 5 ó 200 μ l de muestra (para hígado y corazón respectivamente) a 30 °C durante 5 min con 10 mM de tampón Tris-HCl, el cual contenía 10 mM de acetyl-CoA, 1 mM de ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB), a un pH 7.6. La reacción se inició por la adición de 10 mM de oxalacetato. Tras añadir el oxalacetato la actividad CS se determinó inmediatamente en una cuveta de cuarzo de 1 ml. Tras 1 min de retardo, la absorbancia se midió a 412 nm (siendo el coeficiente de extinción $\epsilon=13\ 600\text{M}^{-1}\ \text{cm}^{-1}$) durante 2 min. La actividad CS es proporcional al contenido de mitocondria en el medio de reacción expresado como $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína.

M-5.4. DETERMINACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA DEL CONTENIDO TOTAL DE CITOCROMOS

La técnica se basó en la posibilidad de medir espectrofotométricamente los estados oxidado y reducido de los citocromos y mediante la diferencia de sus espectros y la ecuación de Lambert, determinar la cantidad de los mismos que hay presente en la membrana mitocondrial de cada muestra objeto de estudio.

Para determinar el contenido total de citocromos ($a+a3$, b , and $c+c1$) se empleó el espectrofotómetro Multispec-1501. En primer lugar, se midió el blanco constituido por 750 μl de un tampón fosfato 100 mM y 250 μl de deoxicolato sódico. Tras obtener el blanco se añadió la muestra y tras esperar 1 min se midió el espectro oxidado. Posteriormente, se adicionó ditionito sódico y transcurridos 40 segundos se procedió a la lectura del espectro reducido.

Mediante el software Shimadzu HYPER-UV se estableció la diferencia entre el escáner reducido y el oxidado. A partir de las absorbancias resultantes y la ecuación de Lambert se obtuvieron los valores correspondiente a la abundancia total de citocromos (nmoles citocromo/ mg proteína).

Ecuación de Lambert:

$$\text{Citocromo (nmoles cit/mg prot)} = \frac{\text{Absorbancia} * V_{\text{final}} * 10^3}{\epsilon_{\text{cit}} * V_{\text{muestra}} * [\text{proteína}]_{\text{muestra}}}$$

Donde:

V_{final} : Volumen total en la cubeta.

ϵ_{cit} : Coeficiente de extinción molar.

V_{muestra} : Volumen de muestra adicionado a la cubeta.

$[\text{proteína}]_{\text{muestra}}$: Concentración de proteínas (mg/ml) de la muestra.

La información sobre la longitud de onda y los coeficientes de extinción molar para los distintos citocromos están recogidos en la tabla 4.

Citocromo	Longitud de onda	Coefficiente de extinción molar
Citocromo <i>a + aa3</i>	605 nm	22 mM ⁻¹ cm ⁻¹
Citocromo <i>b</i>	562 nm	22 mM ⁻¹ cm ⁻¹
Citocromo <i>c + c1</i>	550 nm	19 mM ⁻¹ cm ⁻¹

Tabla 4. Longitud de onda y coeficientes de extinción molar para el citocromo a + aa3, b y c + c1.

M-5.5. ESTUDIO DEL ENSAMBLAJE EN SUPERCOMPLEJOS MITOCONDRIALES POR BNGE Y WESTERN-BLOT

M-5.5.1. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA LA BLUE NATIVE GEL ELECTROFORESIS

A partir de las mitocondrias aisladas como se describe en los apartados M-4.1.2 y M-4.2.2 (para hígado y corazón respectivamente), se tomó un volumen de muestra correspondiente a 100 µg de proteína. Dichas mitocondrias se centrifugaron a 17.000 × g durante 3 min a 4 °C. El pellet mitocondrial resultante se resuspendió en el **tampón E** (1 M ácido 6-aminohexanoico, 50 mM Bis-Tris-HCl, pH 7.0) para obtener una concentración final de 10 mg/ml. Posteriormente, las proteínas de membrana se solubilizaron con digitonina (4 g/g), e incubaron durante 5 min en hielo. Tras esta incubación se procedió a centrifugar las mitocondrias a 13.000 × g durante 30 min. A continuación, se añadieron 3 µl de **tampón de carga** (colorante azul brillante al 5 %; Brilliant Blue G: Serva Blue G, en 1 M ácido 6-aminohexanoico, 1:20) al sobrenadante (Acín-Pérez *et al.*, 2008).

M-5.5.2. PREPARACIÓN DEL GEL PARA LA 1D DE BLUE NATIVE

Para separar las proteínas mitocondriales de los complejos respiratorios se emplearon geles de acrilamida-bisacrilamida en condiciones no desnaturizantes. Los geles se prepararon en gradiente del 3 % al 13 % (según se describe en la tabla 5), empleando un

formador de gradientes acoplado a una bomba de vacío (Minipuls3, Gilson) a un flujo constante de 17.

Composición	3 %	13 %	Stacking
Gradiente	Resolving	Resolving	
AB mix 48:1,5 (48 g acrilamida, 1,5 g Bis-Acrilamida)	0,305 ml	0,866 ml	0,25 ml
Buffer 3X (150 mM Bis- Tris, 1,5 M ácido 6- aminohexanoico, pH 7)	1,667 ml	1,111 ml	1 ml
H ₂ O milliQ	3 ml	0,713 ml	1,75 ml
Glicerol al 87 %	-	0,643 ml	-
APS 20 %	20 µl	7 µl	12,5 µl
TEMED	4 µl	3 µl	3 µl

Tabla 5. Composición del gel en gradiente (3-13 %) para realizar la electroforesis.

M-5.5.3. ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS

Las proteínas de las mitocondrias obtenidas en el apartado M-5.6.1 se cargaron y separaron en un gel de acrilamida-bisacrilamida con un gradiente de 3-13 % (ver apartado M-5.6.1) usando el sistema de electroforesis mini-PROTEAN Tetra Cell electrophoresis system (Bio-Rad, California, USA) a 4 °C. Las condiciones iniciales de la electroforesis para facilitar la entrada de las proteínas en el gel fueron 90 V durante 30 min. Transcurrido este periodo, se incrementó el voltaje a 300 V durante 1:15 horas. El amperaje fue limitado a 15 mA/gel.

Con la finalidad de que el exceso de Serva Blue G pudiera interferir en pasos posteriores del ensayo, el **tampón del cátodo A** (50 mM tricina, 15 mM Bis Tris, 0,02% Blue G -250, pH 7) se reemplazó por el **tampón del cátodo B** (50 mM Bis Tris, pH 7) una vez el frente migró las dos terceras partes del gel.

M-5.5.4. TRANSFERENCIA DE PROTEÍNAS A MEMBRANAS DE PVDF

Una vez finalizada la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF (Inmobilon ®-P, Millipore) mediante el sistema Trans-Blot SD Transfer Cell (Bio-Rad), aplicando un voltaje constante de 100 V durante 1 hora.

Previamente a la transferencia, se sumergieron en el **tampón de transferencia** (25 mM Tris, 192 mM glicina, 20 % metanol, pH 8,3) el gel, el papel whatman y las esponjas durante 5 min. La membrana de PVDF se lavó en metanol durante 1 min para su activación, y a continuación 10 min en el tampón de transferencia. Por último, sobre un *cassette* de transferencia se dispuso el siguiente orden de montaje: esponja y papel Whatman empapados en tampón de transferencia. Sobre éstos, se colocó la membrana de PVDF equilibrada y el gel previamente equilibrado, eliminando las posibles burbujas formadas y finalmente, otro papel Whatman y esponja empapados en tampón de transferencia. El montaje así formado se dispuso sobre el módulo de electrodos siguiendo la orientación recomendada por el fabricante y todo ello se introdujo en una cubeta de electroforesis con tampón de transferencia.

M-5.5.5. REVELADO INMUNOLÓGICO

Para la detección de los complejos respiratorios se empleó la técnica Western-blot. Esta técnica consiste en una incubación con un anticuerpo primario que reconoce a la proteína de interés presente en la muestra, seguida de una segunda incubación con un anticuerpo secundario que se une al anticuerpo primario. Finalmente se revela mediante la adición de un sustrato que, en presencia de la enzima, da lugar a una señal luminosa.

La membrana de PVDF con las proteínas transferidas se sometió a un bloqueo de sitios específicos de unión al anticuerpo, mediante la incubación durante 1 hora a temperatura ambiente en una solución que contenía PBS, 0.1 % Tween 20 y leche desnatada en polvo al 5 %. Finalizado el bloqueo, las membranas se incubaron durante la noche con anticuerpos primarios específicos frente al CI (1:5000, anti-NUDFA9, ab14713, Abcam) y al CIII (1:5000, anti-ubiquinol-cytochrome *c* reductase core protein I, ab110252, Abcam). Una vez transcurrida la incubación con anticuerpos primarios, las membranas se lavaron 3 veces con PBS y 0.1 % de Tween 20 a temperatura ambiente, e incubaron con el anticuerpo secundario HRP goat anti-mouse Ig (1:5000, 554002, BD Bioscience

Pharmingén) durante 1 hora a temperatura ambiente. La inmunoreactividad fue obtenida tras revelar las membranas con el revelador ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (RPN2232, GE Healthcare). Por último, tras tratar las membranas con una solución de stripping (Restore Western Blot Stripping Buffer, Thermo Scientific), se empleó el anticuerpo VDAC (1:5000, voltage-dependent anion channel, ab14734, Abcam) como control de carga.

La imagen se digitalizó mediante el sistema Kodak Image Station 2000 R (Eastman Kodak Company, Rochester, NY, USA) y cuantificó empleando el software 1D Image Analysis software 3.6.

M-6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos en la presente tesis doctoral se analizaron con el programa GraphPad InStat, empleando el análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido del test estadístico Student-Newman-Keuls post-hoc. Los resultados se expresaron como el valor medio \pm el error estándar (S.E.M.). El nivel de significación estadística se tomó como $P < 0.05$.

CAPÍTULO 1

ESTUDIO BIOENERGÉTICO

EN HÍGADO

RESULTADOS

IV. CAPÍTULO 1: ESTUDIO BIOENERGÉTICO EN HÍGADO. RESULTADOS.

Los resultados de este capítulo están recogidos en la publicación:

Identification of mitochondrial deficits and melatonin targets in liver of septic mice by high-resolution respirometry. Carolina Doerrier, José A. García, Huayqui Volt, María E. Díaz-Casado, Elena Lima-Cabello, Francisco Ortiz, Marta Luna-Sánchez, Germaine Escames, Luis C. López, Darío Acuña-Castroviejo. *Life Sciences*, 2015, **121**:158-65.

En este trabajo se ha evaluado la función mitocondrial dependiente de la edad durante el proceso séptico, así como el efecto sobre la misma del tratamiento con melatonina. Las determinaciones se realizaron “*ex vivo*” en mitocondrias frescas aisladas a partir de hígado de ratón. El estudio se ha centrado fundamentalmente en la evaluación de la bioenergética con la técnica de respirometría de alta resolución (HRR), mediante la adición de distintas combinaciones de sustratos, con la finalidad de detectar posibles daños a nivel del complejo respiratorio I (CI) y/o del complejo II (CII). Además, se emplearon sustratos fisiológicos para el estudio de ambos complejos respiratorios conjuntamente (CI+II).

Se recogen aquí los resultados de la evaluación del efecto del proceso séptico en su etapa inicial (S8) y tardía (S24) sobre la bioenergética mitocondrial en ratones jóvenes (3 meses de edad), así como el rol protector de la melatonina sobre estos ratones sépticos.

Para la evaluación de la función mitocondrial a través de los complejos respiratorios se emplearon 3 combinaciones de sustratos: glutamato + malato (GM) para el CI, succinato y rotenona (S+Rot) para el CII y la combinación de GMS para estudiar el CI+II de manera conjunta.

1. ESTUDIO DE LA FUNCIÓN MITOCONDRIAL MEDIANTE RESPIROMETRÍA DE ALTA RESOLUCIÓN.

1.1. DETERMINACIÓN DEL ESTADO LEAK

El **estado LEAK** representa el consumo de oxígeno destinado fundamentalmente para compensar la fuga de protones a través de la membrana mitocondrial interna, en un estado no fosforilativo de la respiración. Para impedir una sobreestimación de dicho estado, debido a una posible contaminación en la muestra de actividad ATPasa (mediante la cual puede ocurrir un reciclaje de ATP), se determinó el estado LEAK sin adenilato para el CI y CI+II o con oligomicina (inhibidor de la ATP sintasa) para el CII (Brand & Nicholls, 2011).

Los ratones exhibieron un aumento de LEAK durante la fase inicial de la **sepsis** (S8) con sustratos para el CI y para el CII, el cual retornó a los valores controles a las 24 horas de la sepsis (S24) (**Fig. R1B y R1C**). Con la combinación de sustratos GMS, es decir, con sustratos para los complejos CI+CII, no se detectaron cambios significativos en el estado LEAK durante la sepsis (**Fig. R1A**).

El tratamiento con **melatonina** redujo significativamente el LEAK a las 8 horas del comienzo de la sepsis con todos los sustratos ensayados (**Fig. R1A, R1B y R1C**). A las 24 horas de la sepsis, la melatonina aumentó el estado LEAK durante la respiración con GM (**Fig. R1B**).

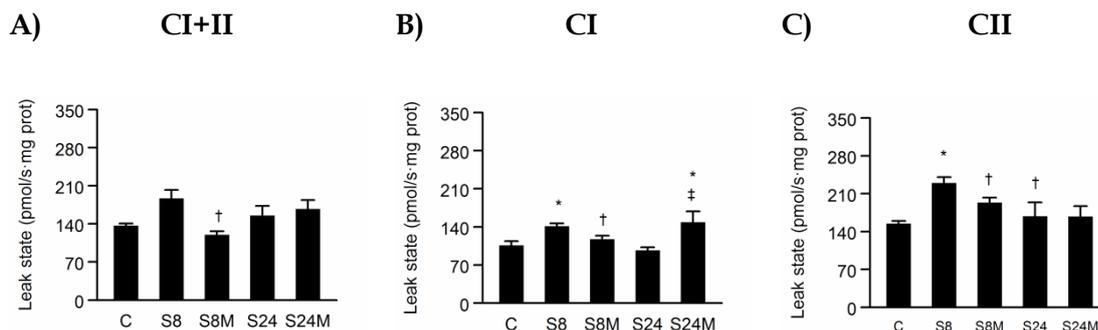


Fig. R1. Efectos de la sepsis y del tratamiento con melatonina sobre el consumo de oxígeno en el estado LEAK en mitocondrias de hígado. **A)** Combinación de sustratos para los complejos CI+CII (GMS). **B)** GM como sustratos para el CI. **C)** Succinato y rotenona para evaluar el complejo CII. * $P < 0.05$ vs grupo control joven; † $P < 0.05$ vs S8; ‡ $P < 0.05$ vs S24. Los datos recogidos en esta figura corresponden a los valores medios \pm SEM de 8 individuos por grupo experimental, con 2 réplicas por individuo.

1.2. EFECTOS DEL PROCESO SÉPTICO, Y EL TRATAMIENTO CON MELATONINA SOBRE LA RESPIRACIÓN MITOCONDRIAL ESTIMULADA CON ADP

Los ratones mostraron una reducción significativa del **estado 3** a las 8 horas (S8) del comienzo de la sepsis con GMS (CI+II) y con GM (CI) (**Fig. R2A y R2B**), sin cambios con S (CII) (**Fig. R2C**). Sin embargo, a las 24 horas (S24) de la inducción de la sepsis, el estado 3 fue significativamente menor que el control con todas las combinaciones de sustratos (**Fig. R2A, R2B y R2C**). El tratamiento con **melatonina** mejoró el estado 3 tanto con GMS (**Fig. R2A**) como con GM (**Fig. R2B**), a las 8 y 24 horas (S8 y S24) del comienzo del proceso séptico y, con S (CII) a las 24 horas (S24) (**Fig. R2C**).

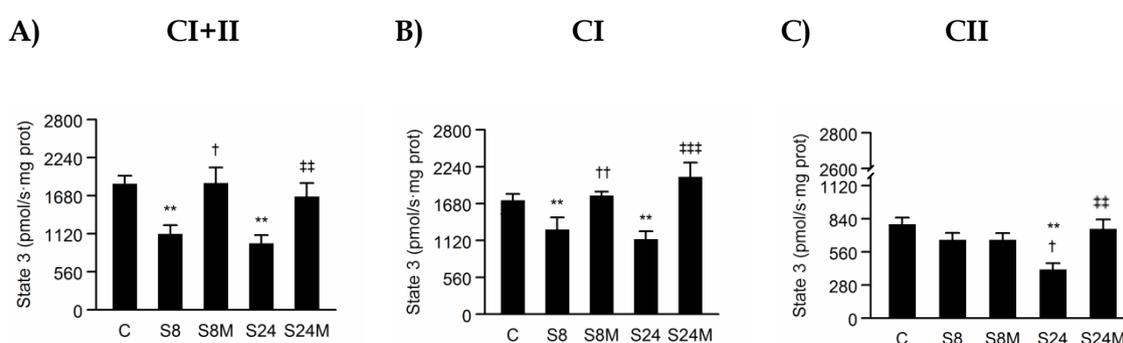


Fig. R2. Efectos de la sepsis y del tratamiento con melatonina sobre la respiración mitocondrial dependiente de ADP (estado 3) en mitocondrias de hígado de ratón. **A)** Combinación de sustratos para los complejos CI+CII (GMS). **B)** GM como sustratos para el CI. **C)** Succinato y rotenona para evaluar el complejo CII. ** $P < 0.01$ vs grupo control joven; † $P < 0.05$ y †† $P < 0.01$ vs S8; ‡ $P < 0.05$ y ‡‡ $P < 0.01$ vs S24. Los datos mostrados corresponden a la media \pm SEM de $n=8$ (2 réplicas por individuo).

1.3. EVALUACIÓN DE LA INTEGRIDAD DE LA MEMBRANA MITOCONDRIAL Y EL ACOPLAMIENTO ENTRE LA FOSFORILACIÓN OXIDATIVA Y EL TRANSPORTE DE ELECTRONES

El control respiratorio (**RCR**) se calcula como el cociente entre el consumo de oxígeno durante el estado 3 y el estado LEAK. El ratio RCR refleja la integridad de la membrana mitocondrial interna así como el acoplamiento mitocondrial entre la fosforilación oxidativa y el transporte de electrones.

En los ratones, RCR disminuyó significativamente a las 8 horas después de la sepsis (S8) con todas las combinaciones de sustratos (**Fig. R3A, R3B y R3C**), y se mantuvo bajo a las 24 horas (S24) del comienzo de la sepsis (**Fig. R3A, R3B y R3C**). El tratamiento con **melatonina** evitó la caída del ratio RCR dependiente de la sepsis.

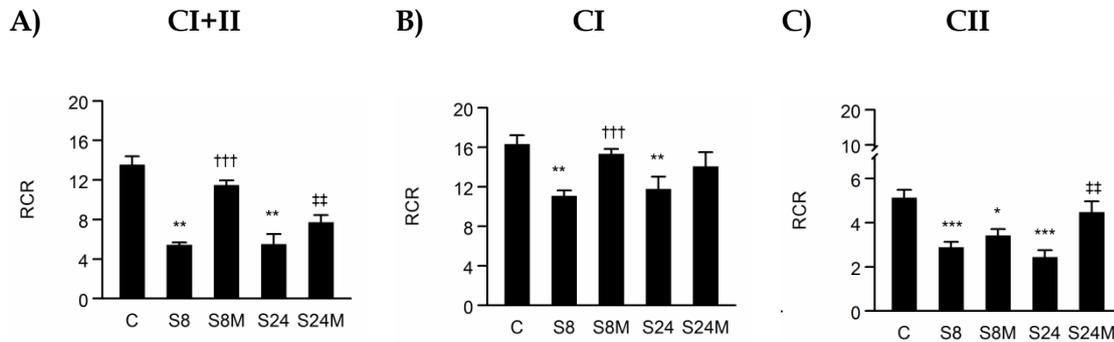


Fig. R3. Control respiratorio RCR en mitocondrias de hígado de ratón. A) Combinación de sustratos para los complejos CI+CII (GMS). B) GM como sustratos para el CI. C) Succinato y rotenona para evaluar el complejo. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ y *** $P < 0.001$ vs grupo control n; ††† $P < 0.001$ vs S8; ‡‡ $P < 0.01$ vs S24. Los resultados recogidos en esta figura corresponden a la media \pm SEM de $n=8$ (2 réplicas por individuo).

1.4. ESTIMACIÓN DE LA MÁXIMA CAPACIDAD DE LA RESPIRACIÓN MITOCONDRIAL

La capacidad máxima del sistema de transporte electrónico (**capacidad ETS**), es decir, el consumo de oxígeno máximo en preparaciones mitocondriales, se puede estimar mediante titulaciones consecutivas con concentraciones óptimas de un agente desacoplante tal como el FCCP.

Los ratones mostraron un aumento significativo del consumo máximo de oxígeno en la etapa temprana de la **sepsis** (S8) en presencia de GMS y S (**Fig. R4A y R4B**), retornando a los valores del grupo control a las 24 horas de la sepsis (S24). La administración de **melatonina** no afectó a la capacidad ETS a las 8 horas de la inducción de la sepsis (S8), pero sí la aumentó a las 24 horas (S24) con las combinaciones de sustratos GMS y S (**Fig. R4A y R4B**).

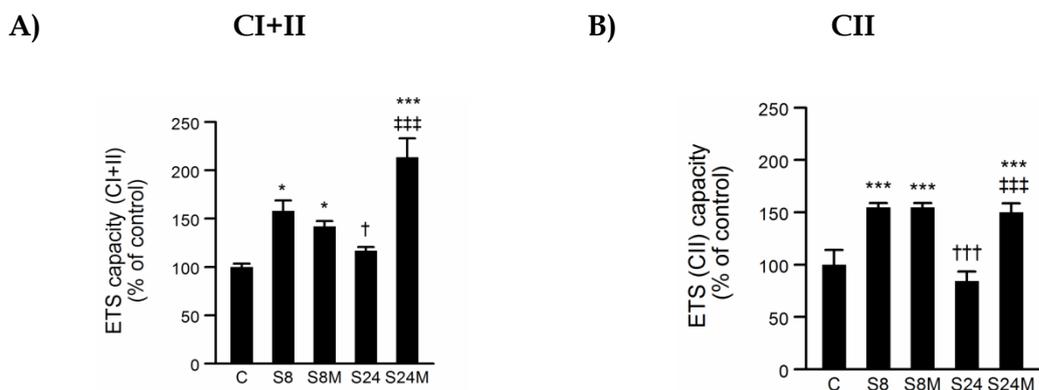


Fig. R4. Capacidad ETS estimada mediante la adición del desacoplante FCCP en mitocondrias de hígado de ratón. A) Combinación de sustratos para los complejos CI+II (GMS). **B)** Succinato y rotenona para evaluar el complejo CII. * $P < 0.05$ y *** $P < 0.001$ vs grupo control; † $P < 0.05$ y ††† $P < 0.001$ vs S8; ‡‡‡ $P < 0.001$ vs S24. Media \pm SEM, $n=8$ (2 réplicas por individuo).

2. EVALUACIÓN DEL CONTENIDO MITOCONDRIAL DE CITOCROMOS.

El contenido mitocondrial de **citocromos $a+a_3$, b , y $c+c_1$** se determinó en las membranas mitocondriales de hígado (Fig. R5A, R5B y R5C). En coherencia con los resultados obtenidos en este estudio, se encontró una reducción significativa en el contenido de citocromos b , y $c+c_1$ en ratones a las 24 horas (S24) del comienzo de la **sepsis** (Fig. R5B y R5C), un efecto impedido por la **melatonina**. No obstante, el citocromo $a+a_3$ no cambió significativamente durante ninguna etapa estudiada de la sepsis, ni con el tratamiento con melatonina (Fig. R5A).

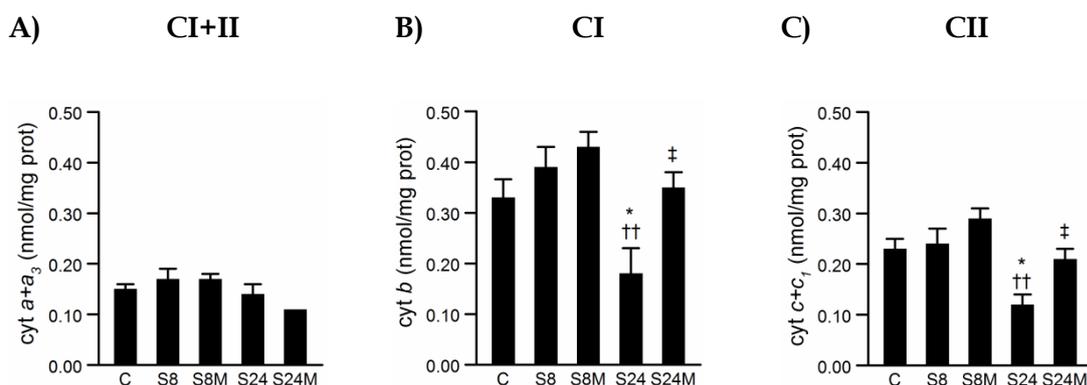
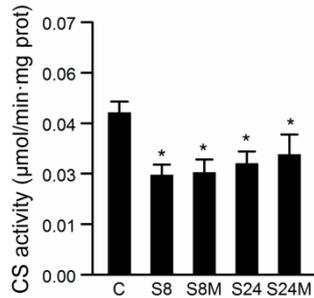


Fig. R5. Contenido total de citocromos en mitocondrias de hígado de ratón. A) Contenido de citocromo $a+a_3$. **B)** Contenido de citocromo b . **C)** Contenido de citocromo $c+c_1$. * $P < 0.05$ vs grupo control; †† $P < 0.01$ vs S8; ‡ $P < 0.05$ vs S24. Media \pm SEM, $n=8$ (2-3 réplicas por individuo).

3. DETERMINACIÓN DE LOS CAMBIOS EN LA MASA MITOCONDRIAL.

La determinación de la **actividad citrato sintasa (CS)** se usó como índice de la masa mitocondrial (**Fig. R6**). Los ratones mostraron una reducción significativa en la actividad CS a las 8 y 24 horas del comienzo de la **sepsis**, que no pudo ser evitada con el tratamiento con **melatonina**.



*Fig. R6. Determinación de la actividad citrato sintasa (CS) en homogenado de hígado de ratón como índice de la masa mitocondrial. * $P < 0.05$ vs grupo control. Media \pm SEM, $n=8$ (2-3 réplicas por individuo).*

4. EVALUACIÓN DE LA FORMACIÓN DE SUPERCOMPLEJOS MEDIANTE BNGE.

Mediante la primera dimensión de la electroforesis azul nativa en geles de poliacrilamida (BN-PAGE) seguida de inmunoelectrotransferencia con anticuerpos específicos, se detectó la proporción de **CI y CIII** que forma parte de los **SC** respiratorios, así como la proporción de **complejos libres** (no incorporados en estas estructuras supramoleculares) en mitocondrias de hígado (**Fig. R7**). Los ratones mostraron una ligera tendencia no significativa a disminuir los ratios SC/CI-libre y SC/CIII-libre durante la **sepsis** (**Fig. R7A2 y R7B2**). El tratamiento con **melatonina** no mostró ningún efecto significativo en los grupos estudiados.

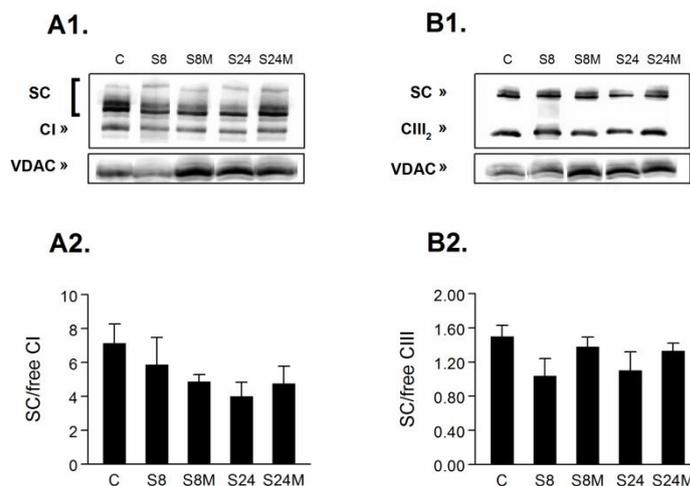


Fig. R7. Supercomplejos mitocondriales (SC) obtenidos mediante BN-PAGE en mitocondrias de hígado de ratón. A1) Imagen obtenida tras el revelado a partir de electroforesis azul nativa (BNGE) seguida de inmunoelectrotransferencia de la proporción del CI constituyendo SC y en estado libre. Anti-NUDFA9 fue empleado para detectar el CI, mientras que el anticuerpo VDAC fue usado como control de carga. **A2)** Cociente SC/CI libre obtenido del análisis densitométrico. **B1)** BNGE e inmunoelectrotransferencia de los SC. El anticuerpo anti-ubiquinol-cytochrome c reductase core protein I fue usado para detectar la cantidad de complejo III en estado libre y constituyendo SC. **B2)** SC/CIII ratio obtenido del análisis densitométrico del complejo III en forma libre y formando parte de los SC. Media \pm SEM, n=8 (2 réplicas por individuo).

DISCUSIÓN

V. CAPÍTULO 1: ESTUDIO BIOENERGÉTICO EN HÍGADO DE RATONES SÉPTICOS. EVALUACIÓN DEL TRATAMIENTO CON MELATONINA. DISCUSIÓN.

El daño mitocondrial y el fallo bioenergético se ha relacionado con la elevada mortalidad en sepsis, aunque los mecanismos que subyacen a la disfunción mitocondrial no están totalmente claros. El exceso de $\text{NO}\bullet$ y de ROS producido durante la respuesta inflamatoria puede inhibir a los complejos de la ETC, reduciendo el flujo de electrones a través de la cadena respiratoria. La consecuente fuga de electrones promueve la formación de más ROS y RNS, incluyendo a los altamente tóxicos peroxinitritos (ONOO^-), los cuales inhiben irreversiblemente a los complejos respiratorios y a otras enzimas mitocondriales, incluyendo la aconitasa y la Mn-SOD. Sin embargo, el daño funcional de la mitocondria durante la sepsis está también sujeto a debate. Algunos autores muestran el papel crítico de la mitocondria en el proceso séptico, mientras que otros encuentran un aumento del estado 3 de la respiración y/o diferencias entre las respuestas mitocondriales durante la fase inicial y tardía de la sepsis. Estas controversias sobre la función mitocondrial durante la sepsis probablemente dependan de la fuente mitocondrial objeto de estudio, incluyendo los distintos modelos animales y tejidos usados, los métodos de aislamiento empleados, el modelo experimental de inducción de la sepsis, así como la fase de la enfermedad en la que la función mitocondrial es evaluada. Aquí, usando HRR, nosotros analizamos el curso de la función-disfunción mitocondrial durante la sepsis, comparando los datos obtenidos en la fase inicial, a las 8 horas de la inducción de la sepsis por CLP, con los obtenidos a las 24 horas de CLP, cuando el shock séptico y el fallo multiorgánico ocurren.

Nuestros resultados muestran un declive progresivo del consumo de oxígeno durante la sepsis. Comparado con el grupo control, los ratones sépticos exhibieron una reducción significativa comprendida entre el 26% y 40% del estado 3 de la respiración, con GM y GMS como sustratos a las 8 horas, respectivamente. Esta caída respecto a los controles fue mayor a las 24 horas de la sepsis (47-34%), cuando la reducción del estado 3 también se hizo notoria con S (un 48% menor que el grupo control).

La reducción de la capacidad respiratoria mitocondrial en la fase inicial de la sepsis fue acompañada en paralelo de una bajada en el ratio RCR a las 8 y 24 horas de la sepsis. La bajada en el RCR indica un desacoplamiento entre la ETC y OXPHOS durante

la sepsis, el cual es mucho más significativo que el “leve” desacoplamiento (en inglés “mild” uncoupling) empleado por las mitocondrias en condiciones fisiológicas para reducir la fuga de electrones y consecuentemente la producción de ROS.

La gran bajada del ratio RCR obtenido no sólo refleja un desacoplamiento, sino que también muestra una pérdida de la integridad de la membrana mitocondrial interna, compatible con el proton leak y la pérdida de eficiencia de las bombas de protones (Ledezma *et al.*, 2002; Brand & Esteves, 2005; Mourier *et al.*, 2010).

De hecho, observamos un aumento de proton leak durante la fase temprana de la sepsis (con sustratos para el CI y el CII), sugiriendo un leve desacoplamiento entre la respiración y la síntesis de ATP. La pérdida de la integridad de la membrana mitocondrial interna es además apoyada por una reducción en el contenido mitocondrial de citocromo $c+c_1$ a las 24 horas de la sepsis. El contenido de citocromo b , el cual está distribuido entre los complejos II y III en la mitocondria, también decrece a las 24 horas de la sepsis, sugiriendo una disfunción de esos complejos y un daño en ETC. Sin embargo, el contenido mitocondrial de citocromos $a+a_3$ no cambió, sugiriendo esto que el complejo IV operaba adecuadamente.

Los complejos mitocondriales de la ETC están embebidos en la membrana mitocondrial interna como entidades libres o como estructuras supramoleculares llamadas supercomplejos (SC) (Reifschneider *et al.*, 2006; Acín-Pérez *et al.*, 2008; Rosca *et al.* 2011; Lenaz & Genova, 2012; García-Corzo *et al.*, 2013). Estos SC son estabilizados por la cardiolipina (CL) (Zhang *et al.*, 2002; Pfeiffer *et al.*, 2003; Rosca *et al.*, 2011), la cual es fácilmente oxidada por ROS (Singer & Brealey 1999; López *et al.*, 2006b; Escames *et al.*, 2006; Garrabou *et al.*, 2012). Por esta razón decidimos evaluar si durante el proceso séptico podían aparecer alteraciones en la organización supramolecular de los complejos respiratorios. Nuestros resultados mostraron mínimos cambios en los ratios SC/CI libre y SC/CIII libre durante el proceso séptico. Estos datos concuerdan con los obtenidos por Callahan y cols. (2005), quienes detectaron la existencia de disfunción mitocondrial en ratas con sepsis sin encontrar cambios en los complejos intactos de la ETC usando BN-PAGE (Callahan & Supinski, 2005). Sin embargo, con técnicas desnaturalizantes, Callahan y cols. (2005) determinaron las proteínas individuales de la ETC, mostrando diferencias significativas en muchas subunidades (incluyendo el citocromo b y c_1 del complejo III) a las 36 y 48 horas de la administración de la endotoxina. A pesar de las diferencias en el modelo animal y en el método experimental para inducir la sepsis, parece claro que en la

fase temprana del proceso, las mitocondrias dañadas responden a un estatus hiperoxidativo manteniendo una adecuada organización de los complejos individuales de la ETC, así como de los SC, y además la respiración ligada al CII. En apoyo a esta hipótesis, detectamos una estimulación de la capacidad ETS (con sustratos para CI+II y CII) para compensar el daño mitocondrial (fundamentalmente ligado al CI) durante la sepsis.

Actualmente, no existen evidencias claras sobre cómo operan los mecanismos específicos en la organización y estabilización de los SC durante el proceso séptico. Nos planteamos la hipótesis de que el daño mitocondrial en las mitocondrias aisladas de hígado de ratones sépticos no es suficiente para producir alteraciones significativas en la organización supramolecular en SC. De acuerdo con esta observación, O'Toole y cols. (O'Toole *et al.*, 2010) no encontraron diferencias significativas en la formación de SC relacionadas con la edad en mitocondrias de riñón a pesar de que mostraron la existencia de disfunción mitocondrial. En contraposición, otros estudios sí mostraron modificaciones en la formación de SC dependientes de la edad en mitocondrias de corazón y cerebro (Frenzel *et al.*, 2010; Gómez *et al.*, 2009). Consecuentemente, los cambios en la formación de los SC pueden depender, entre otras consideraciones, del modelo experimental y del tipo de tejido/órgano analizado.

Estas observaciones son también consistentes con estudios previos que muestran que las ROS/RNS producidas durante la sepsis se acumulan en la fase tardía de la enfermedad, incrementando el daño oxidativo mitocondrial y la pérdida de la integridad de las membranas mitocondriales (Escames *et al.*, 2006; López *et al.*, 2006b; Berg *et al.*, 2011). Además, la disminución de la actividad CS aquí encontrada sugiere una reducción de la masa mitocondrial durante el proceso séptico. Por lo tanto, el defecto en OXPHOS durante la sepsis puede depender de ambas condiciones, una reducción de la masa mitocondrial y una pérdida de la integridad de la membrana mitocondrial interna (Marcinek, 2004). El citocromo c, un transportador móvil de la ETC, está implicado en múltiples funciones celulares como el transporte de electrones, la apoptosis, la peroxidación de la CL e incluso presenta actividad depuradora de ROS (Korshunov *et al.*, 1999; Huttemann *et al.*, 2011). La pérdida de citocromo c mitocondrial durante la sepsis probablemente refleje su salida al citosol, activando la cascada apoptótica y la consecuente muerte celular (Berg *et al.*, 2011).

La melatonina es un potente antioxidante y antiinflamatorio endógeno, capaz de mantener la homeostasis mitocondrial en múltiples condiciones fisiopatológicas (Crespo *et al.*, 1999; Tan *et al.*, 2001; 2011; Escames *et al.*, 2003, 2006b; Tapias *et al.*, 2009; Paradies *et al.*, 2010). En el presente trabajo, mostramos que la administración de melatonina en ratones sépticos, produce una recuperación del consumo de oxígeno en la respiración estimulada por ADP en ambas fases de la sepsis (fase inicial y tardía), con combinaciones de sustratos para los complejos respiratorios CI+II y CI, y en la fase tardía con sustratos ligados al CII, precisamente actuando cuando el daño acontece. Estos datos están de acuerdo con estudios previos que muestran los efectos beneficiosos de la melatonina mejorando la actividad de los complejos de la ETC, así como la actividad y la expresión del sistema de defensa mitocondrial antioxidante (Escames *et al.*, 2003, 2006b; López *et al.*, 2009; Ortiz *et al.*, 2014). La administración de melatonina generalmente recupera el daño en OXPHOS dependiente de la sepsis, restableciendo por lo tanto la funcionabilidad mitocondrial.

También mostramos que la melatonina restablece la integridad de las membranas mitocondriales y el grado de acoplamiento a las 8 y 24 horas de la sepsis a través de los complejos CI+II. Estos resultados podrían ser debidos a la prevención de la peroxidación de las membranas mitocondriales, manteniéndose una adecuada fluidez de membrana (García *et al.*, 2001). Además, la melatonina previene totalmente la caída del contenido de citocromos *b* y *c+c₁* en la fase tardía de la sepsis, impidiendo la disfunción de la ETC. La melatonina también es capaz de mantener el grado de acoplamiento entre ETC y OXPHOS, preservando la actividad de la cadena de transporte electrónico y el gradiente de protones requerido para la síntesis de ATP. Por otro lado, detectamos que el tratamiento con melatonina incrementó el estado LEAK dependiente del CI a las 24 horas de la inducción de la sepsis (S24M). Proton leak constituye una vía para atenuar la producción mitocondrial de ROS y por consiguiente, para proteger frente al daño oxidativo-nitrosativo. Nuestros resultados muestran un daño bioenergético durante el proceso séptico, principalmente ligado al CI, el cual junto con el CIII constituye uno de los principales sitios de producción de ROS en la ETC. El incremento de la respiración en el estado LEAK dependiente del CI en el grupo S24M, podría constituir otro mecanismo defensivo a través del cual la melatonina limita la producción de ROS y RNS mediante la activación de las proteínas desacoplantes UCPs. UCP2 y UCP3 permiten un “leve” desacoplamiento para moderar la formación de radicales libres (Brand & Esteves 2005).

De acuerdo con esta hipótesis, Teodoro y cols. (2014) encontraron que el tratamiento con melatonina incrementó dos veces la expresión de los niveles de la proteína UCP2 y mantuvo unos altos niveles de expresión de la UCP3 durante el estrés oxidativo causado por ácido palmítico en células de músculo esquelético (Teodoro *et al.*, 2014).

El presente estudio también mostró que la melatonina incrementó entre un 65% y un 97% la máxima estimulación de ETS a las 24 horas de la inducción de la sepsis. La capacidad ETS es un estado no acoplado inducido experimentalmente, el cual depende de muchos componentes mitocondriales tales como los complejos respiratorios (I-IV), la flavoproteína transferidora de electrones (ETF), el complejo glicerofosfato deshidrogenasa, otros transportadores a través de la membrana mitocondrial interna, el ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) y otras deshidrogenasas de la matriz mitocondrial. La capacidad ETS refleja el máximo flujo dependiente de todos los componentes que constituyen el sistema ETS en un determinado estado fisiológico o patológico. El tratamiento con melatonina podría estimular uno o más de dichos componentes mitocondriales en respuesta al daño oxidativo, para así mejorar la bioenergética mitocondrial de los ratones sépticos tratados con melatonina.

El tratamiento con melatonina mejoró la calidad mitocondrial sin modificar la masa mitocondrial (cantidad mitocondrial) durante el proceso séptico. Por lo tanto, la melatonina protege a los ratones del daño oxidativo mitocondrial dependiente de la sepsis, manteniendo una adecuada función bioenergética.

Nuestros datos apoyan que para obtener información fiable sobre la bioenergética mitocondrial, la respiración debe ser examinada con diferentes combinaciones de sustratos. Aquí, usando HRR, el análisis de la respiración mitocondrial nos permitió identificar los diferentes cambios en la función de los complejos respiratorios I y II durante la sepsis; los cuales podrían no ser identificados cuando la respiración es analizada a través de los complejos CI y CII conjuntamente. Por lo tanto, confirmamos que la disfunción mitocondrial en sepsis depende fundamentalmente del daño del CI, e identificamos las dianas implicadas en los efectos beneficiosos del tratamiento con melatonina. Los resultados apoyan que el CI mitocondrial debería constituir la principal diana terapéutica en el tratamiento de la sepsis, mientras que el uso clínico de melatonina para mejorar el desenlace clínico de los pacientes con sepsis debe ser considerado.

CAPÍTULO 2

ESTUDIO BIOENERGÉTICO

EN CORAZÓN

RESULTADOS

VI. CAPÍTULO 2: ESTUDIO BIOENERGÉTICO EN CORAZÓN. RESULTADOS.

Los resultados de este capítulo están recogidos en la publicación número 2:

Use of permeabilized myocardial fibers from septic mice to analyze mitochondrial dysfunction and melatonin targets by high-resolution respirometry. Carolina Doerrier, José A. García, Huayqui Volt, Jose A Guerrero, Marta Luna-Sánchez, Germaine Escames, Luis C. López, Erich Gnaiger, Darío Acuña-Castroviejo. En preparación.

El análisis de la función mitocondrial es crucial para entender una patología específica, y poder evaluar posibles dianas terapéuticas. En el presente capítulo hemos analizado la función mitocondrial (a los 3 meses de edad) del corazón de ratones durante el proceso séptico, a las 8 y 24 horas de inducción de la sepsis. De igual modo, se evaluó el papel protector de la melatonina sobre la fisiología mitocondrial durante la sepsis.

Los ensayos respirométricos se determinaron empleando respirometría de alta resolución (HRR). La HRR, llevada a cabo en fibras miocárdicas permeabilizadas, permite evaluar el sistema bioenergético manteniendo la ultraestructura mitocondrial y las interacciones intracelulares, que son fundamentales para una funcionalidad adecuada. El desacoplamiento, así como la capacidad de OXPHOS y ETS (utilizando diferentes combinaciones de sustratos) se evaluaron en fibras permeabilizadas. Otros parámetros bioenergéticos analizados fueron el contenido total de citocromos en mitocondria, así como la actividad citrato sintasa mitocondrial (marcador de la masa mitocondrial). Además, para detectar cambios en la organización supramolecular de la cadena de transporte, los complejos respiratorios de las mitocondrias cardíacas se evaluaron mediante la técnica BN-PAGE, seguida de Western-blot.

Numerosos estudios demuestran las ventajas de trabajar con fibras permeabilizadas. El análisis de la función mitocondrial en fibras permeabilizadas permite mantener las interacciones mitocondriales normales y la organización dentro de la célula en comparación con procedimientos convencionales, tales como el aislamiento mitocondrial.

Además, las fibras permeabilizadas conservan las propiedades de las mitocondrias, permitiendo un rendimiento adecuado de todas las subpoblaciones mitocondriales (contenido mitocondrial $\geq 95\%$) y una mezcla representativa tanto de las mitocondrias funcionales como de las dañadas (Gnaiger, 2009; Kuznetsov *et al.*, 2008; Saks *et al.*, 1998; Picard *et al.*, 2011). Por ello, en este trabajo hemos estudiado los efectos patológicos específicos sobre la función mitocondrial en fibras miocárdicas permeabilizadas durante el proceso séptico para investigar así el perfil bioenergético sin interrupción debido al procedimiento de aislamiento. Además, se evaluó el papel protector de la melatonina sobre el deterioro bioenergético mitocondrial asociado a la sepsis.

1. ESTUDIO DE LA FUNCIÓN MITOCONDRIAL EN FIBRAS PERMEABILIZADAS DE MIOCARDIO MEDIANTE RESPIROMETRÍA DE ALTA RESOLUCIÓN.

1.1. EFECTOS DEL PROCESO SÉPTICO Y EL TRATAMIENTO CON MELATONINA SOBRE LA CAPACIDAD DE OXPHOS

En primer lugar, se analizó el **flujo de oxígeno específico de masa** (consumo de oxígeno por unidad de masa muscular, concretamente mg de tejido peso húmedo) a concentraciones de ADP saturantes, obteniéndose por lo tanto la capacidad de **OXPHOS** con diferentes sustratos fisiológicos (**Fig. R8A**). La capacidad OXPHOS relacionada con el CI con GM y GMP como sustratos (CI_{OXPHOS}) disminuyó en fibras permeabilizadas de ratones sépticos comparados con el grupo control (siendo un 69.64 % y 79.90 % más bajo a las 8 y 24 h respectivamente). Usando GMPS como cóctel de sustratos para CI+II ($CI+II_{OXPHOS}$), la capacidad máxima fisiológica de la fosforilación oxidativa disminuyó un 76,43% a las 8 y un 76.19 % a las 24 horas tras la inducción de la sepsis experimental.

En lo que respecta a identificar si las alteraciones de la función respiratoria mitocondrial se deben a cambios en la masa mitocondrial, el **consumo de oxígeno** obtenido en la capacidad de OXPHOS fue normalizado por la **masa mitocondrial** (**Fig. R8B**), determinada como **actividad CS** (ver apartado 3, **Fig. R13**). La capacidad OXPHOS en presencia de GM como sustratos vinculados al NAD disminuyó significativamente en ambas fases de sepsis (S8 y S24) (70.58 % y 82.79 %, respectivamente). Del mismo modo, la capacidad OXPHOS con sustratos ligados al CI, tales como GMP, mostró una disminución significativa durante el proceso séptico (68.71% y 77.01 % menor que en el grupo control a las 8 y 24 horas respectivamente). Por otro lado, la capacidad de OXPHOS obtenida con GMPS como sustratos fisiológicos para los complejos respiratorios CI+II también se alteró considerablemente durante la sepsis experimental (mostrando una inhibición del 76.43 % a las 8 horas y del 76.19 % a las 24 horas).

Las capacidades de OXPHOS normalizadas por masa (CI_{OXPHOS} y $CI+II_{OXPHOS}$) fueron completamente restauradas con el tratamiento con **melatonina** en la fase tardía de la sepsis (S24M) con todos los sustratos fisiológicos utilizados (**Fig. 8A**). La melatonina mejoró significativamente la capacidad de OXPHOS con GMPS como sustratos ligados a CI+CII en la fase inicial de la sepsis (S8M). Además, detectamos valores similares tanto en

el grupo control como en el grupo S8M con GM y GMP como sustratos. Cuando los datos de consumo de oxígeno se normalizaron por la actividad CS (**Fig. R8B**), se obtuvieron resultados comparables a los obtenidos al normalizar por masa (**Fig. R8A y B**). La administración de melatonina mantuvo la capacidad de OXPHOS como en los controles con GMP en el grupo S8M y, con GMPS en ambos grupos de ratones sépticos tratados con melatonina (S8M y S24M). El tratamiento con melatonina mejoró significativamente OXPHOS en S8M frente a S8 con GM como sustratos, mientras que la incrementó respecto al grupo control a las 24 horas (S24M) con sustratos para el CI (GM y GMP).

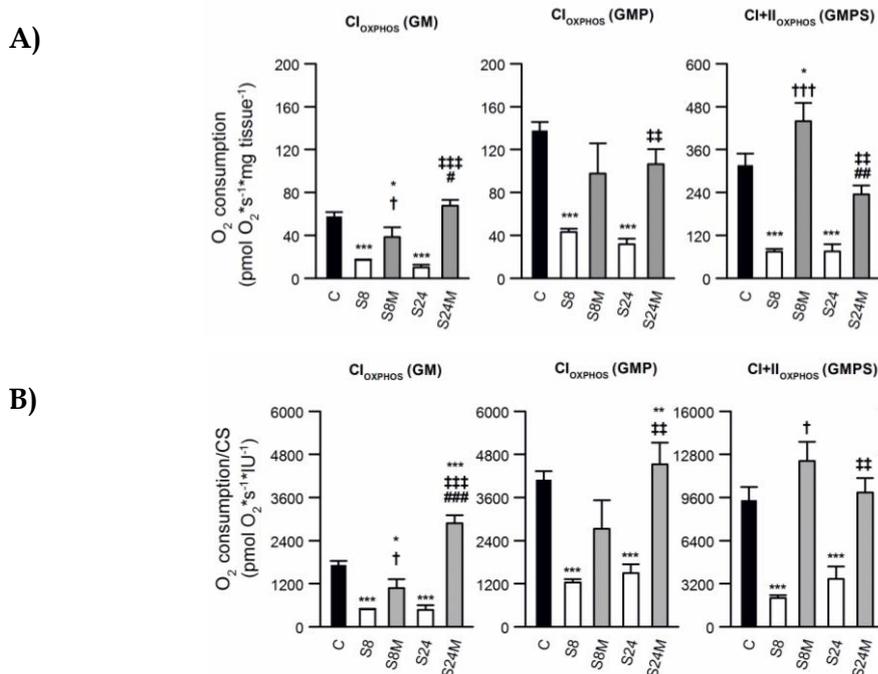


Fig. R8. Efectos de la sepsis y del tratamiento con melatonina sobre OXPHOS (obtenido a con diversas combinaciones de sustratos: GM y GMP para el CI, GMPS para CI+II) en fibras permeabilizadas de miocardio de ratón. A) Consumo de oxígeno normalizado por masa específica (mg tejido de peso húmedo). **B)** Capacidad de OXPHOS normalizada por la actividad CS. Los datos mostrados corresponden a la media \pm SEM, $n = 6-8$ por grupo (con 2 réplicas por individuo). Los valores con diferencias significativas están marcados con * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ y *** $P < 0,001$ vs C; † $P < 0,05$ y ††† $P < 0,001$ vs S8; ‡‡ $P < 0,01$ y ‡‡‡ $P < 0,001$ vs S24; # $P < 0,05$, ## $P < 0,01$ y ### $P < 0,001$ vs S8M.

1.2. ESTIMACIÓN DE LA MÁXIMA CAPACIDAD DE LA RESPIRACIÓN MITOCONDRIAL (CAPACIDAD ETS)

Mediante la adición de la concentración óptima del agente desacoplante FCCP pudimos estimar la máxima capacidad del sistema, es decir, la capacidad ETS (estado respiratorio no acoplado). La capacidad ETS (normalizada por **mg/tejido**) para CI+II disminuyó en el grupo de ratones sépticos frente al control un 75.39 % a las 8 horas, mostrando una inhibición similar a las 24 horas (79.59 % menos respecto al control). La capacidad ETS ligada al CII (obtenida con succinato y rotenona) también presentó una fuerte caída debido a la sepsis (80.35 % a las 8 horas y 82.45 % a las 24 horas respecto al grupo control) (**Fig. R9A**).

Cuando la capacidad ETS fue normalizada por la **actividad CS (Fig. R9B)**, observamos que el deterioro en la capacidad OXPHOS encontrado se asoció con un descenso paralelo en la capacidad ETS (CI+II_{ETS}). Además, la respiración ligada al CII, CII_{ETS}, fue significativamente diferente durante la sepsis (mostrando una reducción del 80.35 % y 82.45 % a las 8 y 24 horas respectivamente respecto al grupo control).

La disminución sepsis-dependiente de la capacidad ETS (para CI+II_{ETS} y CII_{ETS}) fue totalmente prevenida mediante la administración de **melatonina** tanto en la fase temprana de la sepsis (S8M) como en la tardía

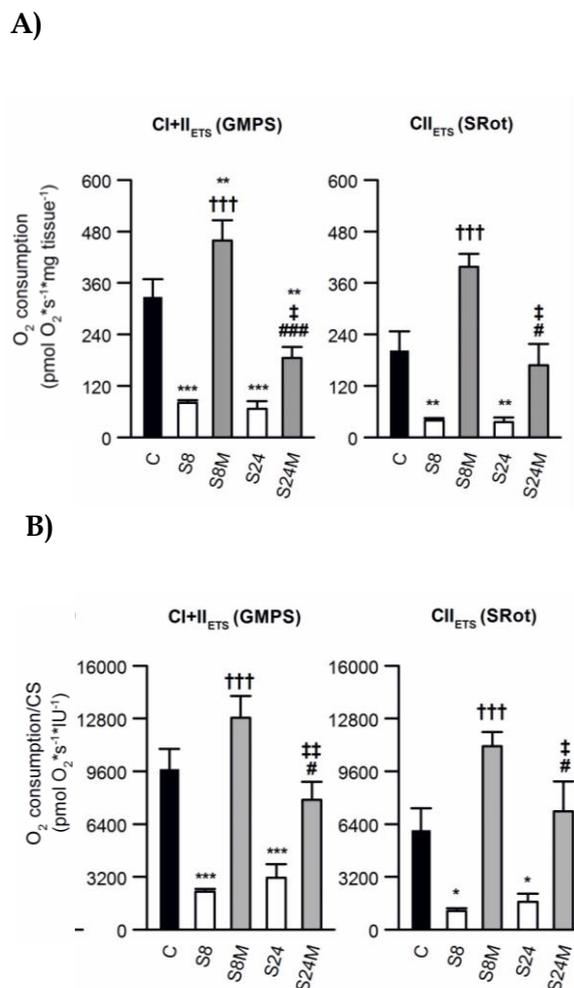


Fig. R9. Capacidad ETS obtenida mediante la adición del agente desacoplante FCCP en fibras permeabilizadas de miocardio de ratón. ETS con GMPS como sustratos para CI+II y SRot para el CII. A) Consumo de oxígeno normalizado por masa específica (mg tejido de peso húmedo). B) Capacidad de OXPHOS normalizada por la actividad CS. Los datos mostrados corresponden a la media \pm SEM, $n = 6-8$ por grupo (con 2 réplicas por individuo). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ y * $P < 0,001$ vs C; ††† $P < 0,001$ vs S8; † $P < 0,05$ y †† $P < 0,01$ vs S24; # $P < 0,05$ y ### $P < 0,001$ vs S8M.**

(S24M) con sustratos para el CII (CII_{ETS}) (**Fig. R9A**). Cuando los datos se normalizaron por la actividad de CS, se obtuvieron resultados comparables (**Fig. R9A y B**). La caída de la capacidad máxima ETS dependiente del proceso séptico (tanto para CI+II_{ETS} como para CII_{ETS}) fue completamente contrarrestada mediante el tratamiento con melatonina (tanto a las 8 como a las 24 horas) (**Fig. R9B**).

1.3. CONTROL DE CALIDAD: TEST DEL CITOCROMO C

Como control de calidad de nuestras muestras se añadió citocromo c exógeno en los ensayos respirométricos (**Fig. R10 derecha**). El efecto del citocromo c fue calculado como el cociente del flujo de oxígeno antes y después de la adición de citocromo c. No se encontraron diferencias significativas entre ninguno de los grupos experimentales evaluados (**Fig. R10 izquierda**).

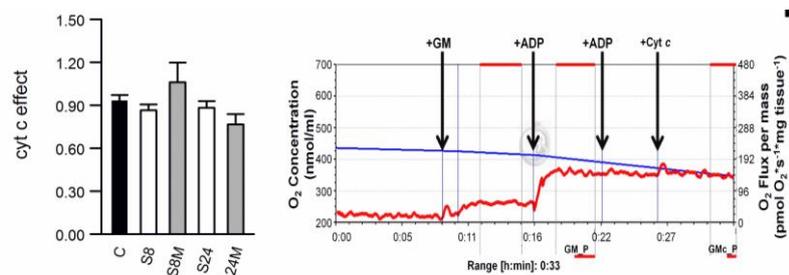


Fig. R10. Test del citocromo c para evaluar la integridad de la membrana mitocondrial externa en la preparación de fibras permeabilizadas de corazón de ratón. **Izquierda)** Efecto del citocromo c. Ratio calculado como el cociente entre el consumo de oxígeno antes y después de la adición de citocromo c. **Derecha)** Trazos del consumo de oxígeno (línea roja) obtenidos mediante HRR que muestran la ausencia de estimulación de la respiración tras añadir citocromo c exógeno en la cámara del oxígrafo. Media \pm SEM, n=8 (2 réplicas por individuo).

1.4. DESACOPLAMIENTO MITOCONDRIAL

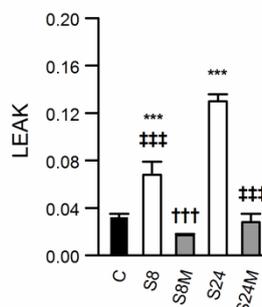
El estado LEAK (L) representado como FCR (*del inglés, "Flux Control Ratio"*) mostró un incremento significativo durante el proceso séptico (**Fig. R11A**), tanto a las 8 como a las 24 horas.

El tratamiento con **melatonina** previno totalmente el aumento del estado leak tanto en el grupo S8M como en S24M.

L/P, definido como el cociente entre la respiración en el estado LEAK (L) (estado L en ausencia de adenilato, obtenido al inicio del protocolo de respiración, con GM como sustratos) y la capacidad de OXPHOS (P) (obtenida en presencia de los mismos sustratos para el CI), es empleado como un ratio que nos indica el acoplamiento mitocondrial. En el presente estudio detectamos que el cociente L/P presentó un aumento inicial de un 77.35 % a las 8 horas del comienzo de la sepsis, aumento que incrementó dramáticamente hasta un 382.87 % a las 24 horas (**Fig. R11B**).

La administración de **melatonina** en los ratones con sepsis evitó el incremento del ratio L/P, disminuyéndolo incluso respecto al control en el grupo S24M.

A)



B)

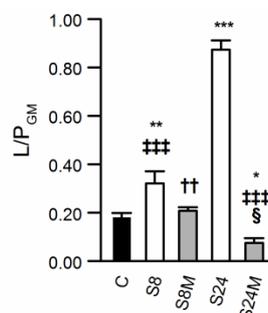


Fig. R11. Ratios para el desacoplamiento mitocondrial obtenido en fibras permeabilizadas de corazón de ratón. A) LEAK representado como FCR (del inglés, "Flux Control Ratio"). **B)** L/P ratio. Media \pm SEM, $n=8$ (2 réplicas por individuo). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ y *** $P < 0,001$ vs C; †† $P < 0,01$ y ††† $P < 0,001$ vs S8; ††† $P < 0,001$ vs S24; # $P < 0,05$ vs S8M.

2. EVALUACIÓN DEL CONTENIDO MITOCONDRIAL DE CITOCROMOS.

El contenido de **citocromo $a+a_3$, b , y $c+c_1$** determinado espectrofotométricamente en mitocondrias aisladas de corazón (**Fig. R12A, R12B y R12C**) no se vio modificado durante la sepsis experimental en ninguna de sus fases estudiadas.

El tratamiento con **melatonina** únicamente influyó en la abundancia de citocromo b , la cual incrementó significativamente respecto al grupo control (**Fig. R12B**).

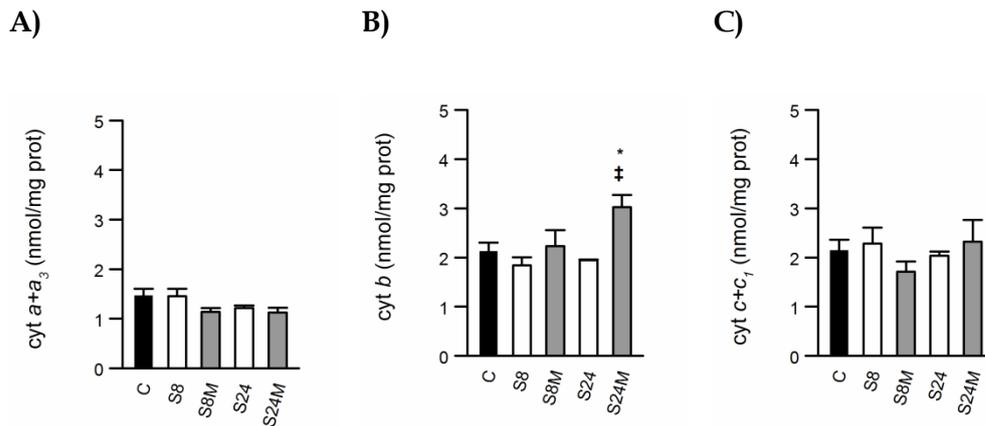


Fig. R12. Contenido total de citocromos en mitocondrias de corazón de ratones. A) Contenido de citocromo a+a₃. **B)** Contenido de citocromo b. **C)** Contenido de citocromo c+c₁. * P < 0.05 vs C; † P < 0.05 vs S24. Media ± SEM, n=8 (2-3 réplicas por individuo).

3. DETERMINACIÓN DE LOS CAMBIOS EN LA MASA MITOCONDRIAL.

La **actividad citrato sintasa (CS)**, empleada como marcador de la densidad mitocondrial, fue determinada a partir de homogenado de corazón obtenido desde las muestras de fibras permeabilizadas procedentes de HRR.

Los ratones mostraron una reducción significativa en la actividad CS en la fase tardía del proceso séptico (a las 24 horas del comienzo de la sepsis), caída que no pudo ser contrarrestada mediante el tratamiento con **melatonina (Fig. R13)**.

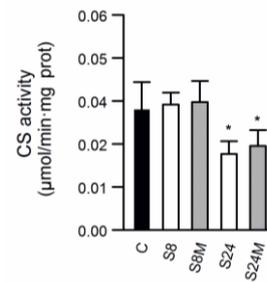


Fig. R13. Determinación de la actividad citrato sintasa (CS) en homogenado de corazón procedente de las muestras del oxígrafo. * P < 0.05 vs grupo control. Media ± SEM, n=8 (2-3 réplicas por individuo).

4. EVALUACIÓN DE LA FORMACIÓN DE SUPERCOMPLEJOS MEDIANTE BNGE.

Mediante BN-PAGE seguida de inmunoelectrotransferencia con anticuerpos específicos para el CI y CIII, se evaluó la proporción de CI y CIII que se encuentra ensamblada en los SC respiratorios, así como la proporción en estado libre en mitocondrias aisladas de corazón (Fig. R14).

Mediante la disminución en el ratio SC/CIII-libre, detectamos una reducción significativa del CIII integrado en los SC respiratorios durante ambas fases de la sepsis experimental (Fig. R14).

La melatonina fue capaz de preservar el ratio SC/CIII-libre a las 24 horas (S24M).

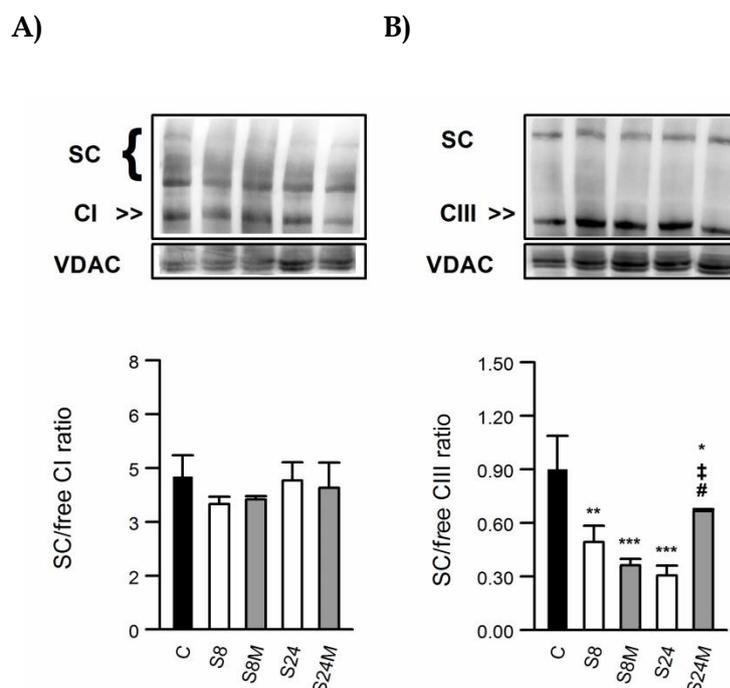


Fig. R14. Supercomplejos mitocondriales (SC) obtenidos en mitocondrias de corazón. A. Arriba) Imagen obtenida tras el revelado a partir de BNGE seguida de inmunoelectrotransferencia de la proporción del CI constituyendo SC y en estado libre. Anti-NUDFA9 fue empleado para detectar el CI, mientras que el anticuerpo VDAC fue usado como control de carga. **A. Abajo)** SC/CI libre obtenido del análisis densitométrico. **B. Arriba)** BNGE e inmunoelectrotransferencia de los SC. El anticuerpo anti-ubiquinol-cytochrome c reductase core protein I fue usado para detectar la cantidad de CIII en estado libre y constituyendo SC. **B. Abajo)** SC/CIII. Media \pm SEM, $n=8$ (2 réplicas por individuo). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ y *** $P < 0,001$ vs C; ‡ $P < 0,05$ vs S24; # $P < 0,05$ vs S8M.

DISCUSIÓN

VII. CAPÍTULO 2: ESTUDIO BIOENERGÉTICO EN CORAZÓN DE RATONES SÉPTICOS. EVALUACIÓN DEL TRATAMIENTO CON MELATONINA. DISCUSIÓN.

Estudios previos han revelado que la sepsis induce disfunción miocárdica y daño mitocondrial (Álvarez & Boveris, 2004; Li *et al.*, 2013; Ortiz *et al.*, 2014). Sin embargo, defectos específicos en la cadena de transporte ocasionados en esta patología pueden no ser identificados correctamente, entre otras causas, debido a una pérdida de la integridad o del contenido mitocondrial durante el proceso de aislamiento. Además, aunque existen evidencias relevantes acerca de las propiedades antisépticas de la melatonina, se desconoce información relacionada con su lugar de acción específico a nivel mitocondrial. Por lo tanto, en el presente estudio mediante el uso de HRR en fibras permeabilizadas de miocardio hemos sido capaces de evaluar los cambios que acontecen en la función mitocondrial como resultado de la sepsis, identificando defectos específicos así como los efectos del tratamiento con melatonina sobre la bioenergética, preservando tanto la arquitectura celular como las interacciones entre los compartimentos celulares.

Disfunción mitocondrial en la fase inicial de la sepsis

Los desacuerdos encontrados en la literatura sobre la función mitocondrial en la sepsis probablemente se deben a diferencias en las condiciones experimentales así como a los métodos empleados (Kantrow *et al.*, 1997; Kozlov *et al.*, 2006). En el presente estudio, se evaluó la función mitocondrial en fibras miocárdicas permeabilizadas por HRR, lo que permitió el mantenimiento de un entorno intracelular adecuado, muy similar al comportamiento *in vivo*, donde se conservan las interacciones mitocondriales y la morfología. Por otra parte, las fibras permeabilizadas contienen un alto pool mitocondrial con una presencia de entorno $\geq 95\%$ de las mitocondrias intactas, entre las cuales están tanto las mitocondrias funcionales como aquellas que pueden estar dañadas debido a una patología determinada (Kuznetsov *et al.*, 2008).

En primer lugar, se determinó el flujo de oxígeno normalizado por mg de tejido (peso húmedo), observándose que tanto la capacidad de OXPHOS como de ETS, analizada con diferentes sustratos fisiológicos, mostró un grave declive en ambas fases de la sepsis. Para identificar si las alteraciones encontradas en la función respiratoria mitocondrial se deben a cambios en la masa mitocondrial, se determinó la actividad de CS

(marcador de densidad mitocondrial) a partir de homogenados procedentes de las fibras permeabilizadas de corazón utilizadas en las mediciones de respiración. Para evaluar los defectos mitocondriales fiables relacionados con lesiones en el proceso séptico, los flujos se normalizaron por la actividad CS, encontrándose que la respiración mitocondrial dependiente del CI, CI+II en OXPHOS, así como dependiente de CI+II y CII en ETS mostró una caída dramática durante la sepsis.

Nuestros resultados reflejan un daño bioenergético severo en las capacidades de OXPHOS y ETS al inicio del proceso séptico (S8), el cual continua hasta las 24 horas del mismo (S24), permitiendo una pérdida de mitocondrias dañadas al final de la enfermedad (como refleja la disminución de la actividad CS, empleada como marcador de densidad mitocondrial). No obstante, a pesar de la pérdida de masa mitocondrial a las 24 horas, el remanente mitocondrial presentó una alta disfunción bioenergética. Además, la reducción en OXPHOS y ETS fue análoga con todas las combinaciones de sustratos empleadas, implicando defectos tanto en el CI como en el CII durante la sepsis experimental. La disfunción mitocondrial aquí mostrada probablemente resulte como consecuencia del daño oxidativo-nitrosativo tanto a nivel celular como mitocondrial, así como a la depleción de los sistemas antioxidantes, previamente descritos (Álvarez & Boveris, 2004) (Escames *et al.*, 2003).

Control de calidad

Debido a la incapacidad del citocromo c para pasar a través de la membrana mitocondrial externa cuando esta está intacta, se adicionó citocromo c exógeno para evaluar la integridad de esta membrana en nuestras preparaciones (Kuznetsov *et al.*, 2008). La ausencia de estimulación en la respiración mitocondrial una vez añadido el citocromo c en el grupo de control, nos reveló la adecuada preparación de las fibras permeabilizadas. Por otro lado, los ensayos polarográficos del citocromo c también pueden proporcionar información importante sobre el proceso de apoptosis en los grupos experimentales. Al no encontrarse diferencias significativas entre los grupos experimentales puede sugerir que no existe liberación del citocromo c durante la sepsis. De acuerdo con estos resultados, el contenido de citocromo c determinado por el método espectrofotométrico tampoco se vio modificado por el proceso séptico.

Desacoplamiento mitocondrial durante la sepsis

El considerable incremento de la respiración mitocondrial en el estado LEAK durante el proceso séptico podría ser debido a que el estrés oxidativo puede inducir desacoplamiento mitocondrial para reducir la producción de ROS y, por lo tanto, reducir el daño celular durante la sepsis (Brand & Esteves, 2005). En apoyo de esta idea, encontramos un incremento significativo del ratio empleado como control de acoplamiento L/P (en inglés, *coupling control ratio*) en la fase inicial de la sepsis, el cual continúa aumentando de manera dramática en la fase tardía de la enfermedad. L/P muestra el grado de desacoplamiento fisiológico-patológico como un índice con un límite superior de 1 para la ausencia de acoplamiento y, un valor de 0 como límite inferior cuando nos referimos a un sistema completamente acoplado (Gnaiger, 2014). La presencia de un incremento de la respiración desacoplada durante la sepsis (desacoplamiento patológico: *dyscoupling respiration*) refleja la existencia de mecanismos independientes de la generación de ATP, tales como la fuga de protones (proton leak), proton slip, ciclo de los cationes (cation cycling), así como la fuga de electrones (electron leak). Las proteínas desacoplantes UCPs podrían ser las responsables del incremento del estado LEAK para así mitigar el daño mitocondrial en la sepsis.

La organización supramolecular mitocondrial de complejos respiratorios en SC es modificada durante la sepsis

En lo que respecta a la organización estructural de los complejos respiratorios, Acín-Pérez y col. propusieron que los complejos mitocondriales de la ETC se pueden encontrar tanto libres como asociados en estructuras supramoleculares llamadas supercomplejos (SC) (Acín-Pérez *et al.*, 2008). La asociación en SC proporciona una mayor eficiencia en el flujo de electrones al facilitar la transferencia de electrones a través de los complejos enzimáticos respiratorios. En consecuencia, la formación de SC minimiza la generación de ROS (Maranzana *et al.*, 2013). Por lo tanto, en el presente trabajo se compararon las proporciones de los CI y CIII en estado libre, así como las proporciones de estos complejos que se encuentran incorporadas dentro de los SC. En dichos experimentos, únicamente detectamos una caída significativa del CIII integrado en SC durante la sepsis experimental. Un aumento en la producción de ROS/RNS durante la sepsis genera un estrés oxidativo-nitrosativo acompañado de peroxidación lipídica de las membranas (LPO). Este daño lesiona a fosfolípidos relevantes de la membrana mitocondrial interna (IMM) como la cardiolipina (CL) (Petrosillo *et al.*, 2004). La CL juega un papel relevante en el proceso bioenergético mitocondrial (Paradies *et al.*, 2014).

Además, se ha relacionado a la CL tanto con los SC como con la estabilización de los complejos respiratorios CIII y CIV (Pfeiffer *et al.*, 2003; Wenz *et al.*, 2009). Consecuentemente, los SC respiratorios mitocondriales se desestabilizaron durante la sepsis. Por otra parte, de acuerdo con nuestros resultados, Ortiz y col. demostraron una disminución en las actividades de los complejos respiratorios mitocondriales CIII y CIV de corazón en el mismo modelo experimental (Ortiz *et al.*, 2014). Probablemente, el estado oxidativo generado en la sepsis induce un defecto mitocondrial grave tanto en los SC como en los complejos respiratorios CIII y CIV libres, que conlleva a una pérdida de la capacidad OXPHOS y ETS con todos los sustratos utilizados. La CL también está implicada en la unión de la creatina mitocondrial en la superficie exterior de la IMM en la proximidad de la ANT, contribuyendo a la integridad de la red mitocondrial (Wallimann *et al.*, 2011; Guzun *et al.*, 2011). Por lo tanto, cualquier cambio en la CL, como consecuencia del estrés oxidativo, podría modificar las interacciones mitocondriales y en consecuencia, el metabolismo energético (Callahan & Supinski, 2007).

La melatonina protege contra la disfunción bioenergética mitocondrial en sepsis

La melatonina actúa como un antioxidante y agente anti-inflamatorio, protegiendo frente al daño oxidativo-nitrosativo (Acuña-Castroviejo D. *et al.*, 2001, 2011; Tan *et al.*, 2001). El tratamiento con melatonina fue capaz de prevenir el severo declive bioenergético observado en sepsis, e incluso consiguió mejorar respecto al grupo control, con algunas combinaciones empleadas las capacidades de OXPHOS y ETS en ambas fases del proceso séptico. De igual modo, la melatonina a pesar de no evitar la pérdida de contenido mitocondrial a las 24 horas del comienzo de la sepsis, también fue capaz de proteger a las mitocondrias del daño séptico cuando OXPHOS y ETS fueron normalizados mediante la actividad CS. Por otra parte, el tratamiento con melatonina, al preservando a las mitocondrias del daño oxidativo, manteniendo una adecuada funcionabilidad mitocondrial, evitó un aumento del desacoplamiento mitocondrial debido al proceso séptico, previniendo así la disfunción mitocondrial.

La melatonina protege frente a el daño mitocondrial a través de sus múltiples acciones directas e indirectas actuando como una molécula antioxidante y antiinflamatoria: depurando radicales libres, disminuyendo la producción de ROS y RNS, estimulando los sistemas antioxidantes, disminuyendo la fuga de electrones e inhibiendo de la expresión de la iNOS (Reiter *et al.*, 2013; Mauriz *et al.*, 2013). En el presente estudio,

la melatonina previno la disfunción mitocondrial, aunque como ya se ha mencionado no previno la modificación del contenido mitocondrial durante la sepsis. Probablemente, las mitocondrias más dañadas fueron eliminadas tanto en los grupos de ratones sépticos con tratamiento con melatonina como sin el mismo. Sin embargo, las mitocondrias que no fueron eliminadas en los grupos sépticos (S8 y S24) se alteraron funcionalmente en contraposición a las tratadas con melatonina (S8M y S24M).

Por otro lado, el tratamiento con melatonina, después de 24 horas tras la inducción de la sepsis, permitió conservar la organización supramolecular mitocondrial (SC/CIII) en valores similares al grupo control. Paralelamente, la melatonina aumentó significativamente el contenido de citocromo *b*, un componente del CIII, en el grupo S24M. Precisamente, la subunidad *b* del CIII está fuertemente asociada con la CL en levadura (Zhang *et al.*, 2005). El efecto pleiotrópico de la melatonina contra el daño oxidativo y nitrosativo implica protección frente a ROS/RNS preservando componentes de la membrana mitocondrial tales como la CL (Paradies *et al.*, 2010), así como la integridad y función de las membranas y de los SC. En este contexto, la melatonina es capaz de mantener una bioenergética óptima.

En conclusión, las fibras permeabilizadas de miocardio permitieron detectar daño durante la sepsis en diferentes componentes mitocondriales, incluyendo un defecto severo en la capacidad de OXPHOS y ETS con diversas combinaciones de sustratos. Además, las mitocondrias de ratones sépticos presentaron una modificación significativa en la organización de la estructura supramolecular, disminuyendo el contenido de CIII incorporado en SC. Finalmente, el fuerte daño mitocondrial desencadenó un descenso del contenido de mitocondrias dañadas. Como mecanismo de respuesta ante el daño celular ocasionado en el proceso séptico, la sepsis induce un desacoplamiento mitocondrial para intentar reducir dicho daño.

Nuestros datos demuestran que la administración de melatonina, un depurador de radicales libres con alta capacidad antioxidante y anti-inflamatoria, protege a las mitocondrias del daño oxidativo-nitrosativo, evitando defectos en la capacidad OXPHOS y ETS en corazón durante el proceso séptico. Probablemente, debido a la importante función de la melatonina sobre el estrés oxidativo en la sepsis, la melatonina mantiene una adecuada organización mitocondrial, lo cual permite un buen funcionamiento mitocondrial. Este estudio proporciona evidencia directa del papel protector de la

melatonina sobre la función mitocondrial en la sepsis, lo cual tiene importantes consecuencias biomédicas.

CONCLUSIONS

VIII. CONCLUSIONS.

From the results obtained in the present work we can conclude:

1. The analysis of mitochondrial respiration by HRR, allowed us to identify specific changes in CI and CII function in liver and heart of septic mice, which could not be identified when respiration is analyzed through CI + CII together.
2. The bioenergetic analysis showed a severe mitochondrial dysfunction in liver and heart of mice at early (8 h) and late (24 h) phases of sepsis, which was accompanied with a reduction in mitochondrial content and in mitochondrial uncoupling, reflecting an attempt to reduce the damage during sepsis.
3. In liver, the sepsis-dependent mitochondrial dysfunction was mainly related to CI impairment.
4. In permeabilized fibres from heart mice, mitochondrial dysfunction could be related to showed a significant modification in the organization of CIII-dependent supramolecular structure during sepsis, yielding a strong defects in OXPHOS and ETS capacities.
5. Melatonin treatment protected mitochondria from sepsis-associated damage, maintaining an appropriate mitochondrial homeostasis in liver and heart from young septic mice.
6. The results support that mitochondrial impairments of CI in liver and CI+CII in heart, which may lead to bioenergetic deficits during sepsis, were prevented by melatonin administration. These results indentified important clues during sepsis process and provided valuable experimental information for the clinical utility of melatonin in systemic inflammation.

BIBLIOGRAFÍA

IX. BIBLIOGRAFÍA.

Acín-Pérez R, Fernández-Silva P, Peleato ML, Pérez-Martos A, & Enríquez JA (2008). Respiratory active mitochondrial supercomplexes. *Mol Cell* 32, 529-539.

Acuña CD, Escames G, López LC, Ortiz F, López A, & García JA (2009).

Evidencias de la utilidad de la melatonina frente al envejecimiento y los procesos neurodegenerativos.

Psicogeriatría 1, 3-21.

Acuña CD, López LC, Escames G, López A, García JA, & Reiter RJ (2011).

Melatonin-mitochondria interplay in health and disease. *Curr Top Med Chem* 11, 221-240.

Acuña-Castroviejo D, Escames G, León J, Carazo A, & Khaldy H (2003).

Mitochondrial regulation by melatonin and its metabolites. *Adv Exp Med Biol* 527, 549-557.

Acuña-Castroviejo D, Escames G, Rodríguez MI, & López LC (2007).

Melatonin role in the mitochondrial function. *Front Biosci* 12, 947-963.

Acuña-Castroviejo D, Escames G, Venegas C, Diaz-Casado ME, Lima-Cabello E, López LC, Rosales-Corral S, Tan DX, & Reiter RJ (2014). Extrapineal melatonin: sources, regulation, and potential functions. *Cell Mol Life Sci*.

Acuña-Castroviejo D, Martín M, Macías M, Escames G, León J, Khaldy H, & Reiter RJ (2001). Melatonin, mitochondria, and cellular bioenergetics. *J Pineal Res* 30, 65-74.

Acuña-Castroviejo D., López LC, Escames G, López A, García JA, & Reiter RJ (2011). Melatonin-mitochondria interplay in health and disease. *Curr Top Med Chem* 11, 221-240.

Alderton WK, Cooper CE, & Knowles RG (2001). Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 357, 593-615.

Álvarez S & Boveris A (2004). Mitochondrial nitric oxide metabolism in rat muscle during endotoxemia. *Free Radic Biol Med* 37, 1472-1478.

- Andrew PJ & Mayer B (1999). Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovasc Res* 43, 521-531.
- Angus DC & van der Poll T (2013). Severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med* 369, 840-851.
- Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, & Pinsky MR (2001a). Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med* 29, 1303-1310.
- Bentinger M, Tekle M, & Dallner G (2010). Coenzyme Q--biosynthesis and functions. *Biochem Biophys Res Commun* 396, 74-79.
- Berg RM, Moller K, & Bailey DM (2011). Neuro-oxidative-nitrosative stress in sepsis. *J Cereb Blood Flow Metab* 31, 1532-1544.
- Bermejo A & Duarte J (2003). Mechanisms of transduction of lipopolysaccharide. *Ars Pharmaceutica* 44 (2), 121-139.
- Boveris A, Alvarez S, & Navarro A (2002). The role of mitochondrial nitric oxide synthase in inflammation and septic shock. *Free Radic Biol Med* 33, 1186-1193.
- Boveris A, Costa LE, Poderoso JJ, Carreras MC, & Cadenas E (2000). Regulation of mitochondrial respiration by oxygen and nitric oxide. *Ann N Y Acad Sci* 899, 121-135.
- Brand MD & Esteves TC (2005). Physiological functions of the mitochondrial uncoupling proteins UCP2 and UCP3. *Cell Metab* 2, 85-93.
- Brand MD & Nicholls DG (2011). Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochem J* 435, 297-312.
- Brealey D & Singer M (2003). Mitochondrial Dysfunction in Sepsis. *Curr Infect Dis Rep* 5, 365-371.
- Brealey D, Karyampudi S, Jacques TS, Novelli M, Stidwill R, Taylor V, Smolenski RT, & Singer M (2004). Mitochondrial dysfunction in a long-term rodent model of sepsis and organ failure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 286, R491-R497.
- Brown GC & Borutaite V (2002). Nitric oxide inhibition of mitochondrial

- respiration and its role in cell death. *Free Radic Biol Med* 33, 1440-1450.
- Brown GC (1999). Nitric oxide and mitochondrial respiration. *Biochim Biophys Acta* 1411, 351-369.
- Cadenas E (2004). Mitochondrial free radical production and cell signaling. *Mol Aspects Med* 25, 17-26.
- Callahan LA & Supinski GS (2007). Diaphragm and cardiac mitochondrial creatine kinases are impaired in sepsis. *J Appl Physiol* (1985) 102, 44-53.
- Chance & Williams (1956). The respiratory chain and oxidative phosphorylation. *Advances in enzymology and related subjects of biochemistry*.
- Chance B & Williams GR (1955a). A method for the localization of sites for oxidative phosphorylation. *Nature* 176, 250-254.
- Chance B & Williams GR (1955b). Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. III. The steady state. *J Biol Chem* 217, 409-427.
- Cheeseman KH & Slater TF (1993). An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull* 49, 481-493.
- Cohen J (2002). The immunopathogenesis of sepsis. *Nature* 420, 885-891.
- Cowdry EV (1953). Historical background of research on mitochondria. *J Histochem Cytochem* 1, 183-187.
- Crespo E, Macías M, Pozo D, Escames G, Martin M, Vives F, Guerrero JM, & Acuña-Castroviejo D (1999). Melatonin inhibits expression of the inducible NO synthase II in liver and lung and prevents endotoxemia in lipopolysaccharide-induced multiple organ dysfunction syndrome in rats. *FASEB J* 13, 1537-1546.
- Crouser ED, Julian MW, & Dorinsky PM (1999). Ileal VO₂-O₂ alterations induced by endotoxin correlate with severity of mitochondrial injury. *Am J Respir Crit Care Med* 160, 1347-1353.
- Echtay KS (2007). Mitochondrial uncoupling proteins--what is their physiological role? *Free Radic Biol Med* 43, 1351-1371.

- Escames G, Acuña-Castroviejo D, López LC, Tan DX, Maldonado MD, Sánchez-Hidalgo M, León J, & Reiter RJ (2006a). Pharmacological utility of melatonin in the treatment of septic shock: experimental and clinical evidence. *J Pharm Pharmacol* 58, 1153-1165.
- Escames G, León J, Macías M, Khaldy H, & Acuña-Castroviejo D (2003). Melatonin counteracts lipopolysaccharide-induced expression and activity of mitochondrial nitric oxide synthase in rats. *FASEB J* 17, 932-934.
- Escames G, López A, García JA, García L, Acuña-Castroviejo D, García JJ, & López LC (2010). The role of mitochondria in brain aging and the effects of melatonin. *Curr Neuropharmacol* 8, 182-193.
- Escames G, López LC, Ortiz F, López A, García JA, Ros E, & Acuña-Castroviejo D (2007). Attenuation of cardiac mitochondrial dysfunction by melatonin in septic mice. *FEBS J* 274, 2135-2147.
- Escames G, López LC, Ortiz F, Ros E, & Acuña-Castroviejo D (2006b). Age-dependent lipopolysaccharide-induced iNOS expression and multiorgan failure in rats: effects of melatonin treatment. *Exp Gerontol* 41, 1165-1173.
- Escames G, López LC, Tapias V, Utrilla P, Reiter RJ, Hitos AB, León J, Rodríguez MI, & Acuña-Castroviejo D (2006c). Melatonin counteracts inducible mitochondrial nitric oxide synthase-dependent mitochondrial dysfunction in skeletal muscle of septic mice. *J Pineal Res* 40, 71-78.
- García JJ, Pinol-Ripoll G, Martínez-Ballarín E, Fuentes-Broto L, Miana-Mena FJ, Venegas C, Caballero B, Escames G, Coto-Montes A, & Acuña-Castroviejo D (2011). Melatonin reduces membrane rigidity and oxidative damage in the brain of SAMP8 mice. *Neurobiol Aging* 32, 2045-2054.
- García-Corzo L, Luna-Sánchez M, Doerrier C, García JA, Guarás A, Acín-Pérez R, Bullejos-Peregrín J, López A, Escames G, Enríquez JA, Acuña-Castroviejo D, & López LC (2013). Dysfunctional Coq9 protein causes predominant encephalomyopathy associated with CoQ deficiency. *Hum Mol Genet* 22, 1233-1248.
- Garrabou G, Moren C, López S, Tobias E, Cardellach F, Miró O, & Casademont J (2012). The effects of sepsis on mitochondria. *J Infect Dis* 205, 392-400.

- Gnaiger E (2009). Capacity of oxidative phosphorylation in human skeletal muscle: new perspectives of mitochondrial physiology. *Int J Biochem Cell Biol* 41, 1837-1845.
- Gnaiger E (2012a). Mitochondrial pathways to complexes I+II: convergent electron transfer at the Q-junction and additive effect of substrate combinations. In *Mitochondrial pathways and respiratory control. An introduction to OXPHOS analysis*, ed. OROBOROS MiPNet Publications, pp. 29-43. Mitochondr Physiol Network 17.18. OROBOROS MiPNet Publications, Innsbruck.
- Gnaiger E (2012b). Respiratory states, coupling control and coupling control ratios. In *Mitochondrial pathways and respiratory control. An introduction to OXPHOS analysis*, ed. OROBOROS MiPNet Publications, pp. 44-50. Mitochondr Physiol Network 17.18. OROBOROS MiPNet Publications, Innsbruck.
- Gnaiger E (2014). Isolated Mitochondria or Permeabilized Tissues and Cells. *Mitochondrial Physiology Network* 11.05, 1-5.
- Gnaiger E (2014). Mitochondrial Pathways and Respiratory Control. An Introduction to OXPHOS Analysis. OROBOROS MiPNet Publications 2014, Axams.
- Guzun R, Timohhina N, Tepp K, Gonzalez-Granillo M, Shevchuk I, Chekulayev V, Kuznetsov AV, Kaambre T, & Saks VA (2011). Systems bioenergetics of creatine kinase networks: physiological roles of creatine and phosphocreatine in regulation of cardiac cell function. *Amino Acids* 40, 1333-1348.
- Hackenbrock CR, Chazotte B, & Gupte SS (1986). The random collision model and a critical assessment of diffusion and collision in mitochondrial electron transport. *J Bioenerg Biomembr* 18, 331-368.
- Hagerhall C (1997). Succinate: quinone oxidoreductases. Variations on a conserved theme. *Biochim Biophys Acta* 1320, 107-141.
- Halliwell B, Evans PJ, Kaur H, & Chirico S (1992). Drug derived radicals: mediators of the side effects of anti-inflammatory drugs? *Ann Rheum Dis* 51, 1261-1263.

- Huttemann M, Pecina P, Rainbolt M, Sanderson TH, Kagan VE, Samavati L, Doan JW, & Lee I (2011). The multiple functions of cytochrome c and their regulation in life and death decisions of the mammalian cell: From respiration to apoptosis. *Mitochondrion* 11, 369-381.
- Kadenbach B (2003). Intrinsic and extrinsic uncoupling of oxidative phosphorylation. *Biochim Biophys Acta* 1604, 77-94.
- Kantrow SP, Taylor DE, Carraway MS, & Piantadosi CA (1997). Oxidative metabolism in rat hepatocytes and mitochondria during sepsis. *Arch Biochem Biophys* 345, 278-288.
- Karbowski M & Youle RJ (2003). Dynamics of mitochondrial morphology in healthy cells and during apoptosis. *Cell Death Differ* 10, 870-880.
- Kleinert H, Wallerath T, Fritz G, Ihrig-Biedert I, Rodríguez-Pascual F, Geller DA, & Forstermann U (1998). Cytokine induction of NO synthase II in human DLD-1 cells: roles of the JAK-STAT, AP-1 and NF-kappaB-signaling pathways. *Br J Pharmacol* 125, 193-201.
- Korshunov SS, Krasnikov BF, Pereverzev MO, & Skulachev VP (1999). The antioxidant functions of cytochrome c. *FEBS Lett* 462, 192-198.
- Kozlov AV, Staniek K, Haindl S, Piskernik C, Ohlinger W, Gille L, Nohl H, Bahrami S, & Redl H (2006). Different effects of endotoxic shock on the respiratory function of liver and heart mitochondria in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 290, G543-G549.
- Kuznetsov AV, Veksler V, Gellerich FN, Saks V, Margreiter R, & Kunz WS (2008). Analysis of mitochondrial function in situ in permeabilized muscle fibers, tissues and cells. *Nat Protoc* 3, 965-976.
- Kvetnoy I (2002). Extrapyramidal melatonin in pathology: new perspectives for diagnosis, prognosis and treatment of illness. *Neuro Endocrinol Lett* 23 Suppl 1, 92-96.
- Ledesma A, de Lacoba MG, & Rial E (2002). The mitochondrial uncoupling proteins. *Genome Biol* 3, REVIEWS3015.
- Lenaz G & Genova ML (2012). Supramolecular organisation of the mitochondrial respiratory chain: a new challenge for the mechanism and control

of oxidative phosphorylation. *Adv Exp Med Biol* 748, 107-144.

Lerner AB, Case JD, Takahashi Y, Lee TH, & Mori W (1958). Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. *J Am Chem Soc* 80, 2587-2592.

Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, Opal SM, Vincent JL, & Ramsay G (2003). 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med* 31, 1250-1256.

Li L, Hu BC, Chen CQ, Gong SJ, Yu YH, Dai HW, & Yan J (2013). Role of mitochondrial damage during cardiac apoptosis in septic rats. *Chin Med J (Engl)* 126, 1860-1866.

Liu SF & Malik AB (2006). NF-kappa B activation as a pathological mechanism of septic shock and inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 290, L622-L645.

López A, García JA, Escames G, Venegas C, Ortiz F, López LC, & Acuña-Castroviejo D (2009). Melatonin protects the mitochondria from oxidative damage reducing oxygen consumption,

membrane potential, and superoxide anion production. *J Pineal Res* 46, 188-198.

López LC, Escames G, Ortiz F, Ros E, & Acuña-Castroviejo D (2006a). Melatonin restores the mitochondrial production of ATP in septic mice. *Neuro Endocrinol Lett* 27, 623-630.

López LC, Escames G, Tapias V, Utrilla P, León J, & Acuña-Castroviejo D (2006b). Identification of an inducible nitric oxide synthase in diaphragm mitochondria from septic mice: its relation with mitochondrial dysfunction and prevention by melatonin. *Int J Biochem Cell Biol* 38, 267-278.

Luft R, Ikkos D, Palmieri G, Ernster L, & afzelius B (1962). A case of severe hypermetabolism of nonthyroid origin with a defect in the maintenance of mitochondrial respiratory control: a correlated clinical, biochemical, and morphological study. *J Clin Invest* 41, 1776-1804.

Maranzana E, Barbero G, Falasca AI, Lenaz G, & Genova ML (2013). Mitochondrial respiratory supercomplex association limits production of reactive

- oxygen species from complex I. *Antioxid Redox Signal* 19, 1469-1480.
- Marcinek DJ (2004). Mitochondrial dysfunction measured in vivo. *Acta Physiol Scand* 182, 343-352.
- Margulis L. Symbiosis in cell evolution. Freeman. 1981. New York.
- Mauriz JL, Collado PS, Veneroso C, Reiter RJ, & Gonzalez-Gallego J (2013). A review of the molecular aspects of melatonin's anti-inflammatory actions: recent insights and new perspectives. *J Pineal Res* 54, 1-14.
- Mayr FB, Yende S, & Angus DC (2014). Epidemiology of severe sepsis. *Virulence* 5, 4-11.
- McCord CO & Allen EP (1917). Evidences associating pineal gland function with alterations in pigmentation. *J Exp Zool* 23, 207-224.
- Menendez-Pelaez A & Reiter RJ (1993). Distribution of melatonin in mammalian tissues: the relative importance of nuclear versus cytosolic localization. *J Pineal Res* 15, 59-69.
- Menendez-Pelaez A, Poeggeler B, Reiter RJ, Barlow-Walden L, Pablos MI, & Tan DX (1993). Nuclear localization of melatonin in different mammalian tissues: immunocytochemical and radioimmunoassay evidence. *J Cell Biochem* 53, 373-382.
- Mitchell P (1961). Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature* 191, 144-148.
- Mitchell P (1966). Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. *Biol Rev Camb Philos Soc* 41, 445-502.
- Mitchell P (1975). Protonmotive redox mechanism of the cytochrome b-c1 complex in the respiratory chain: protonmotive ubiquinone cycle. *FEBS Lett* 56, 1-6.
- Mourier A, Devin A, & Rigoulet M (2010). Active proton leak in mitochondria: a new way to regulate substrate oxidation. *Biochim Biophys Acta* 1797, 255-261.
- Murphy MP (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J* 417, 1-13.

- Nicholls DG & Ferguson SJ. Bioenergetics 3. Academic Press. 2002.
- Nisoli E, Falcone S, Tonello C, Cozzi V, Palomba L, Fiorani M, Pisconti A, Brunelli S, Cardile A, Francolini M, Cantoni O, Carruba MO, Moncada S, & Clementi E (2004). Mitochondrial biogenesis by NO yields functionally active mitochondria in mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 16507-16512.
- Ortiz F, García JA, Acuña-Castroviejo D, Doerrier C, López A, Venegas C, Volt H, Luna-Sánchez M, López LC, & Escames G (2014). The beneficial effects of melatonin against heart mitochondrial impairment during sepsis: inhibition of iNOS and preservation of nNOS. *J Pineal Res* 56, 71-81.
- O'Toole JF, Patel HV, Naples CJ, Fujioka H, & Hoppel CL (2010). Decreased cytochrome c mediates an age-related decline of oxidative phosphorylation in rat kidney mitochondria. *Biochem J* 427, 105-112.
- Papa S, Martino PL, Capitanio G, Gaballo A, De RD, Signorile A, & Petruzzella V (2012). The oxidative phosphorylation system in mammalian mitochondria. *Adv Exp Med Biol* 942, 3-37.
- Papa S, Petruzzella V, Scacco S, Vergari R, Panelli D, Tamborra R, Corsi P, Picciariello M, Lambo R, Bertini E, & Santorelli FM (2004). Respiratory complex I in brain development and genetic disease. *Neurochem Res* 29, 547-560.
- Paradies G, Paradies V, De B, V, Ruggiero FM, & Petrosillo G (2014). Functional role of cardiolipin in mitochondrial bioenergetics. *Biochim Biophys Acta* 1837, 408-417.
- Paradies G, Petrosillo G, Paradies V, Reiter RJ, & Ruggiero FM (2010). Melatonin, cardiolipin and mitochondrial bioenergetics in health and disease. *J Pineal Res* 48, 297-310.
- Pasdois P, Parker JE, Griffiths EJ, & Halestrap AP (2011). The role of oxidized cytochrome c in regulating mitochondrial reactive oxygen species production and its perturbation in ischaemia. *Biochem J* 436, 493-505.
- Pecinova A, Drahota Z, Nuskova H, Pecina P, & Houstek J (2011). Evaluation of basic mitochondrial functions using rat tissue homogenates. *Mitochondrion* 11, 722-728.

- Pedersen PL (2007). Transport ATPases into the year 2008: a brief overview related to types, structures, functions and roles in health and disease. *J Bioenerg Biomembr* 39, 349-355.
- Pereverzev MO, Vygodina TV, Konstantinov AA, & Skulachev VP (2003). Cytochrome c, an ideal antioxidant. *Biochem Soc Trans* 31, 1312-1315.
- Petrosillo G, Ruggiero FM, Pistolesse M, & Paradies G (2004). Ca²⁺-induced reactive oxygen species production promotes cytochrome c release from rat liver mitochondria via mitochondrial permeability transition (MPT)-dependent and MPT-independent mechanisms: role of cardiolipin. *J Biol Chem* 279, 53103-53108.
- Pfeiffer K, Gohil V, Stuart RA, Hunte C, Brandt U, Greenberg ML, & Schagger H (2003). Cardiolipin stabilizes respiratory chain supercomplexes. *J Biol Chem* 278, 52873-52880.
- Picard M, Taivassalo T, Ritchie D, Wright KJ, Thomas MM, Romestaing C, & Hepple RT (2011). Mitochondrial structure and function are disrupted by standard isolation methods. *PLoS One* 6, e18317.
- Regueira T, Andresen M, & Djafarzadeh S (2009). [Mitochondrial dysfunction during sepsis, impact and possible regulating role of hypoxia-inducible factor-1alpha]. *Med Intensiva* 33, 385-392.
- Reifschneider NH, Goto S, Nakamoto H, Takahashi R, Sugawa M, Dencher NA, & Krause F (2006). Defining the mitochondrial proteomes from five rat organs in a physiologically significant context using 2D blue-native/SDS-PAGE. *J Proteome Res* 5, 1117-1132.
- Reiter RJ, Tan DX, Mayo JC, Sainz RM, León J, & Czarnocki Z (2003). Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanisms and pathophysiological implications in humans. *Acta Biochim Pol* 50, 1129-1146.
- Reiter RJ, Tan DX, Rosales-Corral S, & Manchester LC (2013). The universal nature, unequal distribution and antioxidant functions of melatonin and its derivatives. *Mini Rev Med Chem* 13, 373-384.
- Reynolds FD, Dauchy R, Blask D, Dietz PA, Lynch D, & Zuckerman R (2003). The

- pineal gland hormone melatonin improves survival in a rat model of sepsis/shock induced by zymosan A. *Surgery* 134, 474-479.
- Rodríguez MI, Escames G, López LC, García JA, Ortiz F, López A, & Acuña-Castroviejo D (2007). Melatonin administration prevents cardiac and diaphragmatic mitochondrial oxidative damage in senescence-accelerated mice. *J Endocrinol* 194, 637-643.
- Romero AD & Bueno GJ (1989). [Free radicals of oxygen and antioxidants in medicine]. *Rev Clin Esp* 184, 345-346.
- Rosca M, Minkler P, & Hoppel CL (2011). Cardiac mitochondria in heart failure: normal cardiolipin profile and increased threonine phosphorylation of complex IV. *Biochim Biophys Acta* 1807, 1373-1382.
- Saks VA, Veksler VI, Kuznetsov AV, Kay L, Sikk P, Tiivel T, Tranqui L, Olivares J, Winkler K, Wiedemann F, & Kunz WS (1998). Permeabilized cell and skinned fiber techniques in studies of mitochondrial function in vivo. *Mol Cell Biochem* 184, 81-100.
- Saraste M (1999). Oxidative phosphorylation at the fin de siècle. *Science* 283, 1488-1493.
- Schagger H & Pfeiffer K (2000). Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *EMBO J* 19, 1777-1783.
- Singer M & Brealey D (1999). Mitochondrial dysfunction in sepsis. *Biochem Soc Symp* 66, 149-166.
- Skulachev VP (1999). Mitochondrial physiology and pathology; concepts of programmed death of organelles, cells and organisms. *Mol Aspects Med* 20, 139-184.
- Sluse FE (2012). Uncoupling proteins: molecular, functional, regulatory, physiological and pathological aspects. *Adv Exp Med Biol* 942, 137-156.
- Stefulj J, Hortner M, Ghosh M, Schauenstein K, Rinner I, Wolfler A, Semmler J, & Liebmann PM (2001). Gene expression of the key enzymes of melatonin synthesis in extrapineal tissues of the rat. *J Pineal Res* 30, 243-247.
- Strehler BL. *Time, Cells, and Aging*. 1-456. 1962. New York, Academic Press.

Sun F, Huo X, Zhai Y, Wang A, Xu J, Su D, Bartlam M, & Rao Z (2005). Crystal structure of mitochondrial respiratory membrane protein complex II. *Cell* 121, 1043-1057.

Takeuchi O & Akira S (2001). Toll-like receptors; their physiological role and signal transduction system. *Int Immunopharmacol* 1, 625-635.

Tan DX, Manchester LC, Burkhardt S, Sainz RM, Mayo JC, Kohen R, Shohami E, Huo YS, Hardeland R, & Reiter RJ (2001). N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine, a biogenic amine and melatonin metabolite, functions as a potent antioxidant. *FASEB J* 15, 2294-2296.

Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, Plummer BF, Hardies LJ, Weintraub ST, Vijayalaxmi, & Shepherd AM (1998). A novel melatonin metabolite, cyclic 3-hydroxymelatonin: a biomarker of in vivo hydroxyl radical generation. *Biochem Biophys Res Commun* 253, 614-620.

Tan DX, Reiter RJ, Manchester LC, Yan MT, El-Sawi M, Sainz RM, Mayo JC, Kohen R, Allegra M, & Hardeland R (2002). Chemical and physical properties

and potential mechanisms: melatonin as a broad spectrum antioxidant and free radical scavenger. *Curr Top Med Chem* 2, 181-197.

Tapias V, Escames G, López LC, López A, Camacho E, Carrión MD, Entrena A, Gallo MA, Espinosa A, & Acuña-Castroviejo D (2009). Melatonin and its brain metabolite N(1)-acetyl-5-methoxykynuramine prevent mitochondrial nitric oxide synthase induction in parkinsonian mice. *J Neurosci Res* 87, 3002-3010.

Turnbull IR, Clark AT, Stromberg PE, Dixon DJ, Woolsey CA, Davis CG, Hotchkiss RS, Buchman TG, & Coopersmith CM (2009a). Effects of aging on the immunopathologic response to sepsis. *Crit Care Med* 37, 1018-1023.

Venegas C, García JA, Escames G, Ortiz F, López A, Doerrier C, García-Corzo L, López LC, Reiter RJ, & Acuña-Castroviejo D (2012). Extrapineal melatonin: analysis of its subcellular distribution and daily fluctuations. *J Pineal Res* 52, 217-227.

Wallimann T, Tokarska-Schlattner M, & Schlattner U (2011). The creatine kinase

system and pleiotropic effects of creatine. *Amino Acids* 40, 1271-1296.

Wendel M & Heller AR (2010). Mitochondrial function and dysfunction in sepsis. *Wien Med Wochenschr* 160, 118-123.

Wenz T, Hielscher R, Hellwig P, Schagger H, Richers S, & Hunte C (2009). Role of phospholipids in respiratory cytochrome bc(1) complex catalysis and supercomplex formation. *Biochim Biophys Acta* 1787, 609-616.

Zaobornyj T & Ghafourifar P (2012). Strategic localization of heart mitochondrial NOS: a review of the evidence. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 303, H1283-H1293.

Zhang M, Mileykovskaya E, & Dowhan W (2002). Gluing the respiratory chain together. Cardiolipin is required for supercomplex formation in the inner mitochondrial membrane. *J Biol Chem* 277, 43553-43556.

Zhang M, Mileykovskaya E, & Dowhan W (2005). Cardiolipin is essential for organization of complexes III and IV into a supercomplex in intact yeast mitochondria. *J Biol Chem* 280, 29403-29408.

