

REGULACION DE LA RESPIRACION MITOCONDRIAL POR ADP, O₂ Y NO

ALBERTO BOVERIS

Laboratorio de Radicales Libres en Biología y Medicina, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires

El O₂ intracelular es necesario en concentraciones adecuadas y controladas para sostener la respiración mitocondrial y la síntesis de ATP y para mantener al mínimo las reacciones de formación de radicales libres del oxígeno. La reacción de la citocromo oxidasa reducida con O₂ es muy rápida (10^7 - 10^8 M⁻¹ s⁻¹) y la velocidad de transferencia de electrones de la cadena respiratoria a la citocromo oxidasa es el factor definitorio para definir la concentración operacional para la semivelocidad máxima de consumo de O₂ ([O₂]_{0.5}). La concentración intracelular de O₂ en los órganos y tejidos de mamíferos, 3-25 μM, se superpone con la concentración crítica, 2-6 μM O₂, que limita la velocidad de la respiración mitocondrial.

El óxido nítrico (NO), producto de la sintetasa de óxido nítrico (NOS) del endotelio vascular, con concentraciones tisulares en el rango de 0.05-0.5 μM NO ha sido reconocido como un inhibidor de alta afinidad de la citocromo oxidasa y de la respiración mitocondrial en forma competitiva con el O₂.

Los parámetros clásicos para la descripción de la fosforilación oxidativa son: (a) la velocidad de consumo de O₂ en estado 3 o respiración activa, en presencia de exceso de sustrato, ADP y O₂, con velocidades máximas de consumo de O₂ y producción de ATP; (b) la velocidad de consumo de O₂ en estado 4 o respiración controlada, en presencia de exceso de sustrato y O₂, con velocidades bajas de consumo de O₂, donde las reacciones de transferencia de electrones son controladas vectorialmente por el potencial electroquímico del H⁺; y (c) el control respiratorio, que es el cociente entre el consumo de O₂ en estado 3/estado 4. Este valor adimensional, usualmente entre 3 y 8, indica claramente el papel del ADP en la regulación del consumo de O₂ mitocondrial y provee un índice sensible para medir el grado de acoplamiento y la integridad de la membranas interna de las mitocondrias aisladas; y (d) el índice P/O, o sea el número de fosfatos incorporados como ATP (fosforilación) por átomo (2 e⁻) de oxígeno consumido (oxidación).

La velocidad de la respiración en estado 3 tiene una relación hiperbólica con la concentración de ADP; siendo [ADP]_{0.5} (o K_{50 ADP} o incorrectamente Km_{ADP}) la concentración de ADP que provee la semivelocidad máxima de respiración, igual a 30 μM ADP para mitocondrias de hígado y a 52 μM ADP para mitocondrias de corazón. Igualmente, la velocidad de la respiración en estado 3 tiene una relación hiperbólica con la concentración de O₂, la Vmax, y la [O₂]_{0.5} (o K_{50 O₂} o incorrectamente Km_{O₂}) se calculan por ajuste hiperbólico. El valor promedio es de 1.6 μM O₂ para el estado 3 de las mitocondrias de hígado y corazón. La Vmax calculada de esta manera no difiere del consumo de O₂ medido en medios de reacción saturados con aire.

La dependencia de la respiración en estado 4 respecto de la concentración de O₂ fue examinada en: (a) la transición al estado 5 (anoxia) y (b) después de un pulso de O₂ a mitocondrias anóxicas y desenergizadas. En ambos casos, el ajuste hiperbólico de dO₂/dt versus [O₂] produjo valores similares de Vmax y de [O₂]_{0.5}; éstos últimos resultaron, en promedio, de 0.4 mM O₂ para las mitocondrias de hígado y corazón.

El NO reacciona con la citocromo oxidasa en sus formas oxidada y reducida. En la forma reducida el NO se une fuertemente al citocromo a₃²⁺ y el Cu_B⁺ actúa como un segundo sitio de unión, mientras que en la forma oxidada el NO se une al Cu_B²⁺. La actividad de la citocromo oxidasa aislada y de partículas submitocondriales, así como la respiración de partículas submitocondriales y de mitocondrias aisladas es efectivamente inhibida por el NO en el rango 0.05-1 μM. La unión del NO a la hemoproteína y la inhibición de la actividad enzimática son reversibles por lavado o por adición de mioglobina o hemoglobina al medio de reacción. El grado de inhibición de la actividad de citocromo oxidasa depende de la concentración de O₂ en el medio de reacción; aparentemente, el NO y el O₂ compiten por la unión al centro binuclear formado por el Fe²⁺ del hemo a₃ y el Cu_B⁺ de la enzima. Luego, la inhibición de la respiración mitocondrial por el NO puede expresarse como una función de la

relación $[O_2]/[NO]$; la semi-inhibición máxima de la respiración en estado 3 se alcanza a una relación $150 O_2 : 1 NO$, lo que indica la alta afinidad del NO por la citocromo oxidasa. Considerando la constante de reacción de la citocromo oxidasa con el O_2 y la 150 veces mayor reactividad del NO con la enzima, la constante de reacción del NO con la hemoproteína sería cercana al límite de Smoluchovski ($(10^{10} M^{-1}.s^{-1})$) para reacciones controladas por difusión, lo que implica que cada choque entre las dos moléculas lleva a la formación de complejo.

El NO, además de su efecto sobre la citocromo oxidasa, inhibe la respiración mitocondrial en el espacio ubiquinona-citocromo *b*. Partículas submitocondriales de corazón de rata adicionadas con $0.4-0.5 \mu M$ NO disminuyen su actividad de succinato-citocromo *c* reductasa a la mitad y muestran reducción del citocromo *b*. Esta segunda acción del NO en la cadena respiratoria mitocondrial lleva a velocidades aumentadas de producción de O_2^- en partículas submitocondriales y de H_2O_2 en mitocondrias enteras y también requiere $0.4-0.5 \mu M$ NO para un efecto semimáximo. Este efecto del NO es también reversible, pero no depende de la relación $[O_2]/[NO]$. Se entiende que la producción de O_2^- se debe a la autoxidación de la ubisemiquinona (reacción de Boveris-Cadenas).

La consideración de la regulación del consumo celular de O_2 por la relación $[O_2]/[NO]$ es de interés fisiológico, ya que la concentración de O_2 en los órganos de los mamíferos, en general de $3-25 \mu M O_2$, y en el corazón de $3-8 \mu M O_2$, se encuentra en un rango en el cual compete con el NO, a su vez en concentraciones de $0.05-0.2 \mu M$, en niveles que dependen de la estimulación de la NOS endotelial. La resultante es una inhibición fisiológica de la respiración del 20-30 %.

Una distribución tisular mas homogénea del O_2 se obtiene por acción del NO liberado por la NOS endotelial en respuesta a las situaciones de hipoxia o ischemia; el NO aumenta la provisión de O_2 a través de la vasodilatación y, a su vez, disminuye la velocidad respiratoria por inhibición de la citocromo oxidasa permitiendo al O_2 difundir a mayores distancias a lo largo de su gradiente de concentración. Este efecto hace menos abrupto el gradiente de la pO_2 en el tejido permitiendo un metabolismo microaeróbico en la transición normoxia-anoxia.

La producción mitocondrial de O_2^- dependiente de NO, provee un mecanismo regulatorio para la remoción de la inhibición de la citocromo oxidasa por el propio NO. Una concentración creciente en rampa de NO en el tejido hipóxico o anóxico producirá sucesivamente: (a) una in-

hibición de la citocromo oxidasa y del consumo de O_2 , favorecida por la baja relación $[O_2]/[NO]$; y (b) una inhibición de la transferencia de electrones en el espacio ubiquinona-citocromo *b*. En condiciones de reoxigenación, la producción y la concentración en estado estacionario de O_2^- , aumentadas con respecto a las condiciones normales, llevarán al establecimiento de un mecanismo regulatorio por el cual el O_2^- removerá el NO ligado reversiblemente a la citocromo oxidasa a través de la reacción de Moncada-Beckman ($O_2^- + NO \Rightarrow ONOO^-$). El peroxinitrito ($ONOO^-$) a su vez, oxida en forma monovalente a la ubiquinona generando ubisemiquinona y mas O_2^- siguiendo en la remoción del NO, en el llamado ciclo ubiquinol/NO (Poderoso-Cadenas). De acuerdo con esta interpretación, corazones de rata perfundidos y latiendo, suplementados con un pulso de bradiquinina, muestran también como pulsos, simultáneamente una inhibición de la respiración y una liberación del NO al perfusado, y una ligeramente retrasada liberación de H_2O_2 en el mismo perfusado.

Una NOS localizada en la membrana interna de las mitocondrias de hígado de rata ha sido recientemente descrita. La enzima usa L-arginina (K_m $5-7 \mu M$) y NADPH y es activada por Ca^{2+} ; la actividad se determina fácilmente en partículas submitocondriales, fragmentos mitocondriales o mitocondrias permeabilizadas por tolueno. La suplementación de mitocondrias de hígado de rata con L-arginina o inhibidores de la NOS lleva, respectivamente, a una inhibición o a una aceleración de la respiración, lo que parece indicar que la NOS mitocondrial participa de la regulación de la respiración celular.

Bibliografía

- Boveris, A. *Meth.Enzymol*, 105, 429-435 (1984)
- Boveris, A., E. Cadenas, A.O.M. Stoppani. *Biochem J* 156: 425 (1976)
- Costa, L.E., G. Méndez, A. Boveris. *Am J Physiol* 273: C852-C858 (1997)
- Chance, B., H. Sies, A. Boveris. *Physiol Rev* 59: 527-605 (1979)
- Giulivi, C., J.J. Poderoso A. Boveris. *J Biol Chem* 273: 11038-11043 (1998)
- Poderoso, J.J., J.G. Peralta, C.L. Lisdero, M.C. Carreras, M. Radisic, F. Schopfer, E., Cadenas, E., A. Boveris. *Am J Physiol* 274: C112-C118 (1998)
- Poderoso, J.J., M.C. Carreras, C. Lisdero, N. Riobó, F. Schopfer, A. Boveris. *Arch Biochem Biophys* 328: 85-92 (1996)
- Poderoso, J.J., M.C. Carreras, F. Schöpfer, N. Riobó, A.D. Boveris, C. Giulivi, E. Cadenas, A. Boveris. *Free Rad Biol Med* (en prensa)