



**FACULTAD DE FARMACIA  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

**TRABAJO FIN DE GRADO**

**TÍTULO:**

**SEÑALIZACIÓN REDOX EN HIPOXIA**

Autor: Guillermo Álvarez-Granada Zapirain

Fecha: 08/05/2019

Tutor: Antonio Martinez Ruiz

## **1 Resumen.**

El oxígeno es una de las moléculas más importantes para el organismo. Gracias a éste, la mitocondria puede funcionar generando la energía necesaria en forma de ATP. Cuando se produce una disminución en la disponibilidad del oxígeno, conocida como hipoxia, las células tratan de acomodarse a esta nueva situación mediante la ejecución de respuestas a corto y largo plazo. En este intento de adaptación, pueden generarse en la mitocondria especies reactivas de oxígeno (*reactive oxygen species*, ROS), las cuales han sido un gran objeto de investigación científica debido a los daños irreparables que pueden originar en las células. Es importante conocer cuál es el proceso de formación de estos compuestos y qué factores modifican su producción en la mitocondria. En este trabajo se describen los resultados recientes encontrados en publicaciones científicas de equipos de investigación dedicados al estudio de la hipoxia que han abordado el mecanismo de producción de ROS en la hipoxia aguda. También, se describen los resultados de publicaciones científicas sobre la generación de los reflejos compensatorios ante la hipoxia como la hiperventilación. Por último, este trabajo recopila las principales conclusiones de los trabajos de investigación y se describen las diferentes propuestas aportadas por los diferentes equipos sobre algunos mecanismos que, aún no son del todo conocidos.

## **2 Palabras claves.**

Hipoxia, mitocondria, especies reactivas de oxígeno (ROS), superóxido, señalización celular,

## **3 Abstract.**

Oxygen is one of the most important molecules in the organism. Mitochondria generate the energy needed in form of ATP by consuming oxygen. When the oxygen availability drops, a process known as hypoxia, cells try to adapt to this new situation through the execution of acute and long-term responses. During this adaptation, reactive oxygen species (ROS) can be generated, which have been investigated for years due to the damage they can generate in cells. It is important to know the process by which these compounds are made and which factors alter their production by mitochondria. I described the main advances and results found by different groups involved in hypoxia research, which have studied the mechanism of ROS production in acute hypoxia, or its relevance in generating compensatory reflexes such as hyperventilation. I also include the main conclusions and the different proposals about some mechanisms that have not been fully described yet.

## **4 Key words.**

Hypoxia, mitochondria, reactive oxygen species (ROS), superoxide, cell signalling

## 5 Introducción.

El oxígeno es una molécula esencial para el metabolismo de las células eucariotas. Las células utilizan el oxígeno como aceptor final de electrones en la cadena transportadora de electrones mitocondrial (electron chain transport, ECT) generándose agua y un gradiente de protones que, finalmente, generará energía en forma de ATP en la oxidación fosforilativa (oxidative phosphorylation, OXPHOS). Este proceso se realiza en la membrana interna de la mitocondria, lugar donde se utilizan los productos del metabolismo como el NADH o el succinato para generar ese transporte de electrones a través de los 5 complejos mitocondriales y se forma un gradiente de concentración de protones  $H^+$  entre el espacio intermembrana y la matriz que es aprovechado por el complejo V o ATP sintasa para generar ATP.

La hipoxia se define como la disminución en la disponibilidad del oxígeno. Las células, ante esta nueva situación, desarrollan sistemas de adaptación para garantizar su supervivencia. Sin embargo, en este cambio en la disposición del oxígeno por parte de las células se pueden originar las conocidas como especies reactivas de oxígeno (reactive oxygen species, ROS), las cuales se producen debido a una reducción incompleta del oxígeno (1-2). Estas ROS, pueden originar daños celulares importantes especialmente en situaciones de estrés oxidativo ya que son capaces de oxidar la mayoría de los componentes celulares como los ácidos nucleicos, lípidos o proteínas (3) y se relacionan con la aparición de ciertas patologías como cáncer (4), Parkinson (5) o Alzheimer (6), entre otras. No obstante, investigaciones más recientes afirman que las ROS pueden tener función como segundos mensajeros y ser partícipes de una señalización celular en diferentes condiciones fisiológicas (7-8).

Se sabe que las células pueden reaccionar ante la hipoxia prolongada. Mediante la inducción de genes que codifican los factores de transcripción inducibles por hipoxia (hypoxia-inducible factor, HIF). Estos factores (los principales son HIF-1 e HIF-2) están formados por dos subunidades,  $\alpha$  y  $\beta$ , donde la subunidad  $\alpha$  resulta de gran interés ya que su estabilidad depende de oxígeno. En normoxia, la subunidad  $\alpha$  se hidroxila por las HIF propil hidroxilasas (EGLN o PHD) lo que señala su degradación por el proteasoma, pero en situaciones de hipoxia, se suprime esa reacción y la consiguiente degradación, y dicha subunidad se acumula (9). Esta estabilización permite a las células la inducción de genes de que promueven respuestas a la hipoxia originando el cambio de un metabolismo aeróbico a uno anaeróbico, disminuir las necesidades de oxígeno o variar el número de eritrocitos para mejorar la disponibilidad del oxígeno, entre otros muchos otros sistemas de adaptación ante la hipoxia (10).

Respecto a cómo reaccionan las células ante situaciones de hipoxia aguda, existe más controversia y muchos de los procesos son aún desconocidos. Se cree que la liberación masiva de ROS que se produce forma parte de esta respuesta aguda ante la hipoxia, pero muchos de los mecanismos de formación no se conocen con certeza. Informes recientes reconocen la importancia del  $Na^+$  en la matriz mitocondrial y del  $Na^+/Ca^{2+}/Li^+$  transporter (NCLX), no solo en el equilibrio del potencial de la membrana, sino sobre su posible papel en la formación de ROS (11). El NCLX actúa transportando el  $Na^+$  citosólico hacia la matriz mitocondrial en un intercambio con el  $Ca^{2+}$ , produciendo como resultado final un aumento

del  $\text{Na}^+$  de la matriz que afecta significativamente a la fluidez y difusión de la bicapa lipídica mediante su interacción con el grupo éster de los fosfolípidos de la membrana interna (13). Esta variación en la membrana podría llegar a afectar a la ECT, especialmente al papel de la ubiquinona en su transferencia de electrones entre complejos, siendo un posible factor para tener en cuenta en la formación de ROS.

Recalcar además la importancia en la producción de ROS de los complejos I y III mitocondriales. El complejo I presenta dos conformaciones, A-CI y D-CI, donde la forma D-CI se conoce como la forma desactivada y en vez de actuar como su función NADH-deshidrogenasa, catalizando la reacción de transferencia de electrones del  $\text{NADH}_2$  a la ubiquinona, actúa como un transportador  $\text{Na}^+ / \text{H}^+$  acidificando la matriz teniendo consecuencias en la producción de superóxido (14). El complejo III está siendo estudiado como posible principal productor de estos superóxidos debido a su papel en la ECT como receptor de electrones tanto del complejo I como del complejo II a través de la ubiquinona (11).

Por último, resulta importante el papel de las células del cuerpo carótido (CB) como principal quimiorreceptor de la homeostasis del  $\text{O}_2$ . Dichas células presentan canales de  $\text{K}^+$  que son activados ante la baja de la presión parcial de oxígeno arterial, produciendo la despolarización, la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  y la liberación de neurotransmisores que originan un estímulo nervioso que llegará al sistema nervioso central originando reflejos cardiorrespiratorios como por ejemplo la hiperventilación o la activación simpática. La respiración mitocondrial siempre ha sido relacionada con CB, debido a que se conoce la gran sensibilidad que presentan las células del CB ante inhibidores de la ECT y la estrecha relación entre la función mitocondrial y la tensión parcial de oxígeno (15). Por ello, se revisará el papel de la función mitocondrial sobre estos reflejos, y si puede alterar dicha respuesta.

El mecanismo concreto por el cual se producen las ROS no está claro. Este trabajo trata de realizar una revisión científica sobre la producción de ROS en la mitocondria en materia de cómo se adaptan las células ante esta disminución de la disponibilidad de oxígeno conocida como hipoxia, investigar acerca de los últimos enfoques científicos sobre las modificaciones mitocondriales que proporcionan ese ambiente para la generación de las ROS, e informar sobre el papel de las células del cuerpo carótido como principal quimiorreceptor de la bajada de presión parcial de oxígeno en sangre.

## **6 Objetivos.**

- Realizar una revisión sobre estudios recientes que abordan el mecanismo de producción de señales en la hipoxia aguda mediante la producción de ROS en la mitocondria, sintetizando los últimos descubrimientos de la materia.
- Estudiar la influencia del complejo I mitocondrial sobre las células del cuerpo carotideo, encargadas de la quimiorrecepción de la hipoxia, y sobre la ejecución de estímulos compensatorios por parte del organismo.

## **7 Materiales y métodos.**

Para la realización de este trabajo de fin de grado se ha utilizado información encontrada en los artículos científicos sobre los aspectos bioquímicos requeridos en buscadores de páginas de divulgación científica como puede ser Pubmed, BioRxiv, Science Direct o National center for Biotechnology (NCBI) junto con la información recogida en encuentros con investigadores de la materia del Instituto de investigación sanitaria Princesa del hospital Santa Cristina de Madrid.

También se ha encontrado información para la realización de este trabajo de fin de grado en publicaciones científicas de revistas como Nature, Biochemical Journal y The Journal of Clinical Investigation, además del uso del temario impartido durante el grado de farmacia respecto a los temas relacionados con este trabajo y el departamento donde ha sido propuesto.

El método de realización de este trabajo se ha realizado según la estructura clásica de artículo científico y con las pautas marcadas por la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid (UCM) respecto a la tipografía y a las características tipográficas de redacción.

## 8 Resultados y discusión.

### 1) El superóxido se dispara en los primeros minutos en hipoxia aguda (16)

El primer estudio tenía por objetivo comprobar como varía la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en células endoteliales de aorta bovina (*bovine aortic endothelial cells*, BAEC) sometidas a hipoxia en diferentes tiempos (entre 10-70 min). Para su realización, se añadió 10 minutos antes de la finalización de cada tiempo *dihydroethidium* (DHE), compuesto que reacciona con el superóxido produciendo 2-hidroxi-etidio (2-OH-E) que puede ser medido por microscopia de fluorescencia. Se añadió en la prueba a algunas células Antimicina A, inhibidor del complejo III del OXPHOS, como control positivo de la prueba debido al aumento de superóxido que produce.

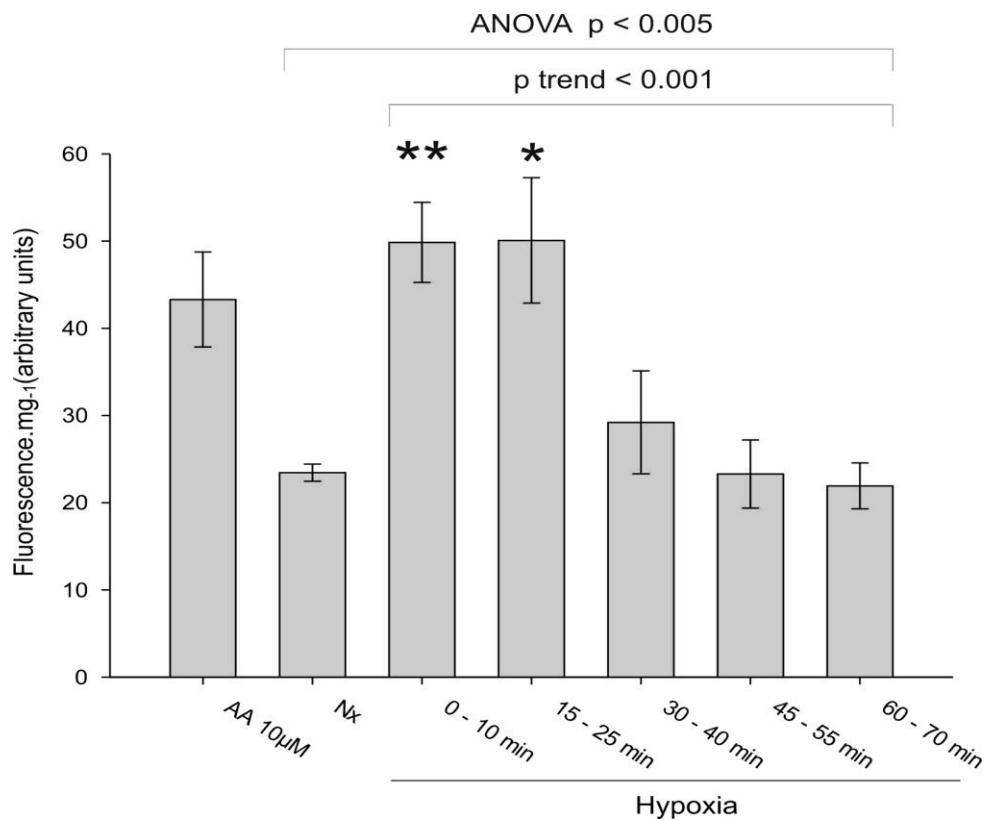
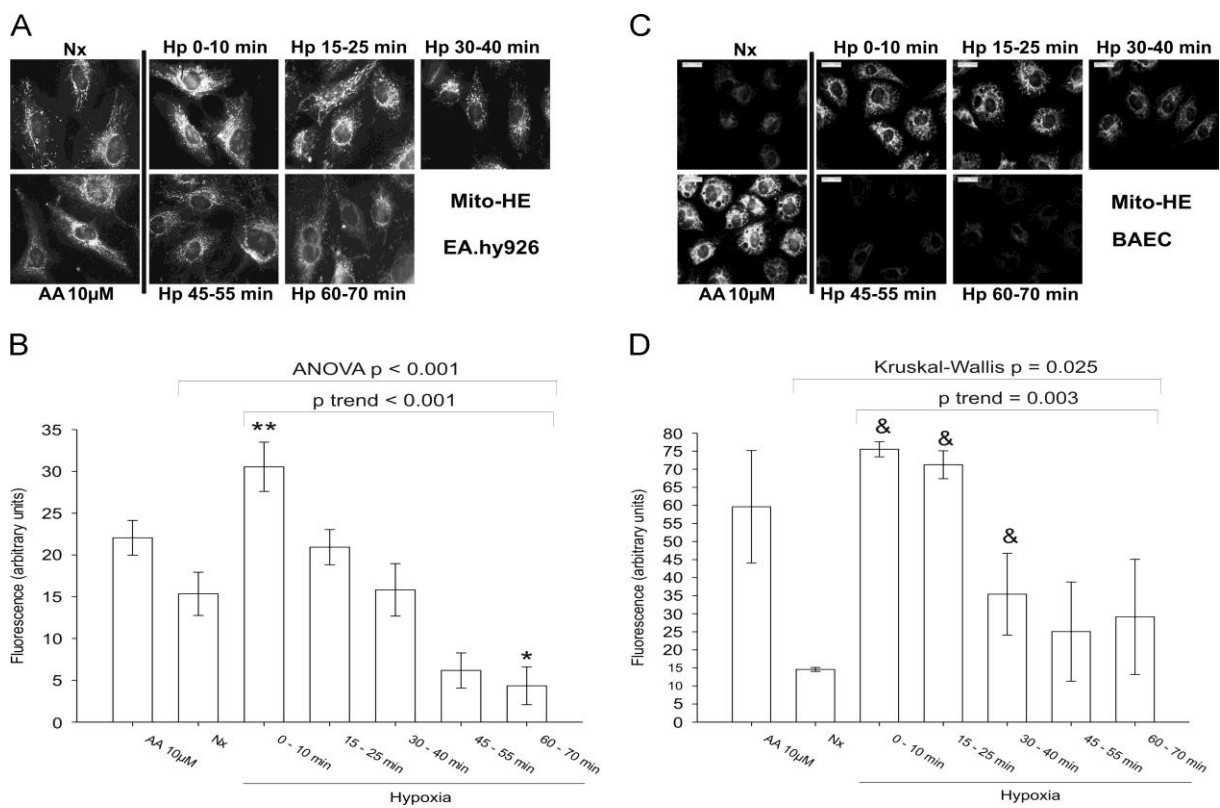


Figura 1. Detección por DHE y microscopía electrónica del superóxido producido en células endoteliales (BAEC) en función del tiempo de hipoxia aguda.

Como se puede observar en la figura 1, los niveles alcanzados en los primeros minutos fueron muy notables en comparación con el resto de la prueba. Este hecho nos permite afirmar que la producción de ROS en la mitocondria se realiza principalmente en los primeros minutos de la exposición a hipoxia y va disminuyendo según va pasando el tiempo.

## 2) Las ROS se producen en la mitocondria (16)

Es primordial conocer cuál es el lugar exacto de producción de ROS en la célula. La mitocondria es el orgánulo que utiliza gran parte del oxígeno para sus funciones, por lo que también es el principal productor de ROS a nivel celular. Con el fin de saber si el superóxido en hipoxia aguda se produce en la mitocondria, se realizó un estudio donde se midió la cantidad de superóxido producido por microscopía de fluorescencia en células endoteliales bovinas (BAEC) y humanas (línea celular EA.hy926) marcadas en la mitocondria con Mito-HE, compuesto formado por DHE junto con el grupo trifenilfosfonio (TPP+), que se acumula en las mitocondrias activas debido a la carga positiva que reacciona con las cargas negativas de la matriz mitocondrial. Dichas células con Mito-HE fueron sometidas a distintas condiciones como normoxia, hipoxia aguda e hipoxia en presencia de antimicina A (inhibidor del complejo III, aumenta la producción de ROS) como control positivo de la prueba.



**Figura 2. Detección del superóxido producido en la mitocondria por Mito-HE y microscopía electrónica en células endoteliales EA.hy926 (A,B) y BAEC (C,D). Imágenes representativas de la fluorescencia de Mito-HE (A,C). Cuantificación de las imágenes (B,D). (20).**

Como se puede ver en los resultados de la figura 2, en a y c puede observar las imágenes de fluorescencia de Mito-HE en la mitocondria cuando las células Eahy926 y BAEC fueron sometidas a estados de normoxia e hipoxia.

En las gráficas b y d, las cuales son una representación de los niveles de fluorescencia obtenidos por microscopía, se puede observar el incremento agudo de los niveles de las ROS producidos en respuesta a la hipoxia en células marcadas con Mito-HE en la mitocondria, con lo que este estudio confirma la producción de superóxido en la mitocondria de las células.

3) La hipoxia aguda provoca la activación del transportador NCLX (11)

NCLX se encarga de realizar un intercambio entre el  $\text{Na}^+$  citosólico y el  $\text{Ca}^{2+}$  de la matriz mitocondrial, aumentando finalmente la concentración de  $\text{Na}^+$  en la matriz mitocondrial. En el siguiente estudio, se midió mediante microscopía de fluorescencia los niveles de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico de las células BAEC en estados de normoxia e hipoxia aguda, donde algunas células (a-d) fueron tratadas mediante la supresión genética del transportador NCLX y otras (e-h) fueron tratadas con CGP-37157, inhibidor farmacológico de NCLX.

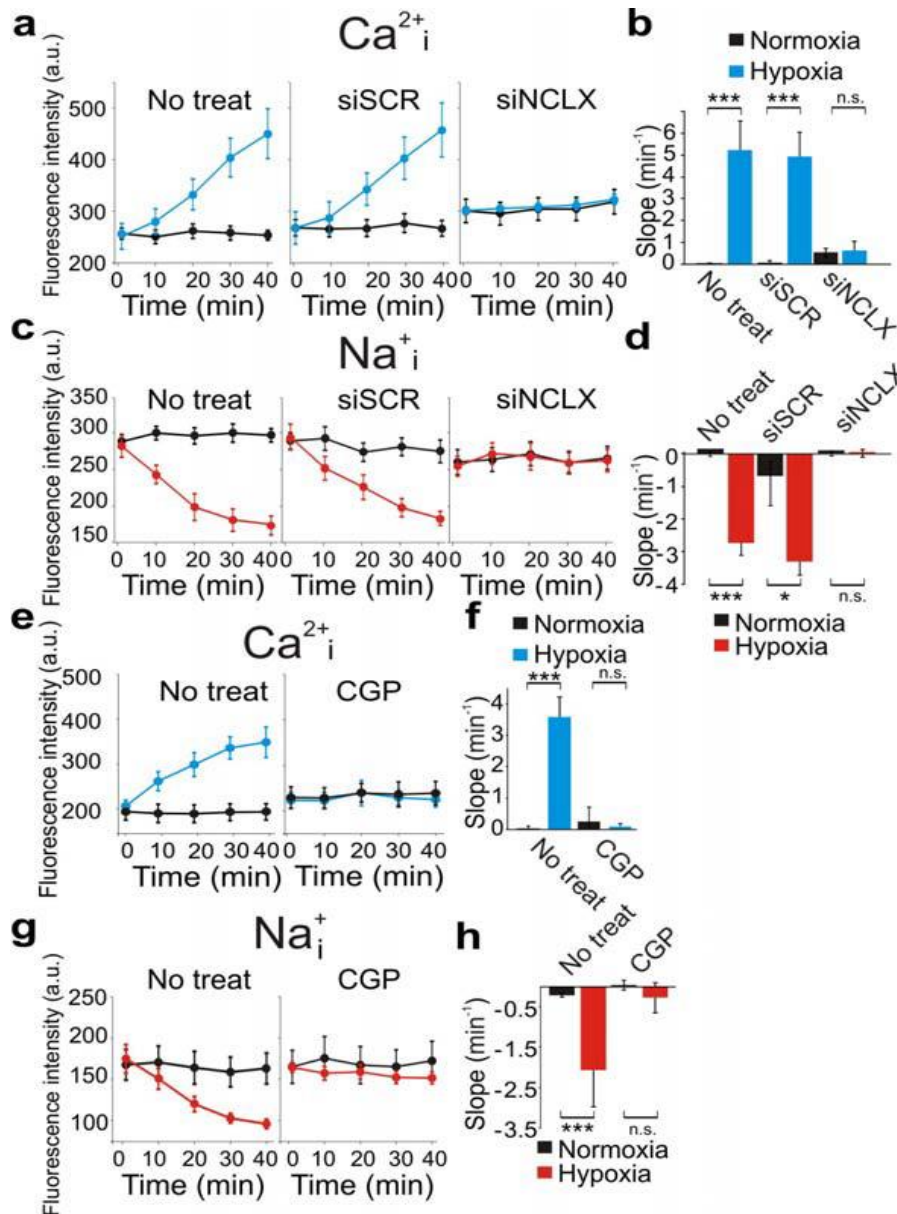


Figura 3. La hipoxia aguda activa el intercambio  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  a través de NCLX. Detección de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Na}^+$  por microscopía de fluorescencia en hipoxia aguda y normoxia. BAEC no tratadas o con silenciamiento de NCLX (a-d). BAEC tratadas o no con CGP-37157 (e-h). (11)



Como se puede observar en la figura 3, las células en estados de normoxia no presentan variaciones representativas respecto a los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Na}^+$ . No obstante, cuando las células se expusieron a estados de hipoxia, los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólicos y los niveles de  $\text{Na}^+$  citosólicos aumentaron y disminuyeron significativamente respectivamente.

Este cambio no se produjo en las células que fueron tratadas con los inhibidores del NCLX, tanto genéticos como farmacológicos, con lo que se puede concluir que el transportador NCLX se activa en las células en estados de hipoxia aguda.

#### 4) El complejo I es necesario para la activación de NCLX (11)

Resulta de importancia para la comunidad científica conocer si los complejos de la cadena de transporte de electrones pueden estar implicados en la activación de NCLX. Para ello realizaron estudios donde se midió mediante microscopía de fluorescencia la cantidad de  $\text{Ca}^{+2}$  y  $\text{Na}^+$  citosólico en células BAEC bajo diversas condiciones, como normoxia e hipoxia, supresión de la subunidad NDUFS4 (subunidad del complejo I), supresión de RISP (subunidad del complejo III) y bajo la presencia de varios inhibidores farmacológicos selectivos de los diferentes complejos mitocondriales (pieridina A-CI, antimicina A-CIII, KCN-CIV).

En los resultados de la figura 4 se puede observar que los niveles de  $\text{Ca}^{+2}$  y  $\text{Na}^+$  citosólicos solamente se mantienen estables cuando se encuentra afectado el complejo I, bien mediante la supresión de la subunidad NDUFS4 (a-b) o mediante inhibidores farmacológicos como la pieridina A (c-d), por lo que el estudio confirma que el complejo I participa en la activación de NCLX.

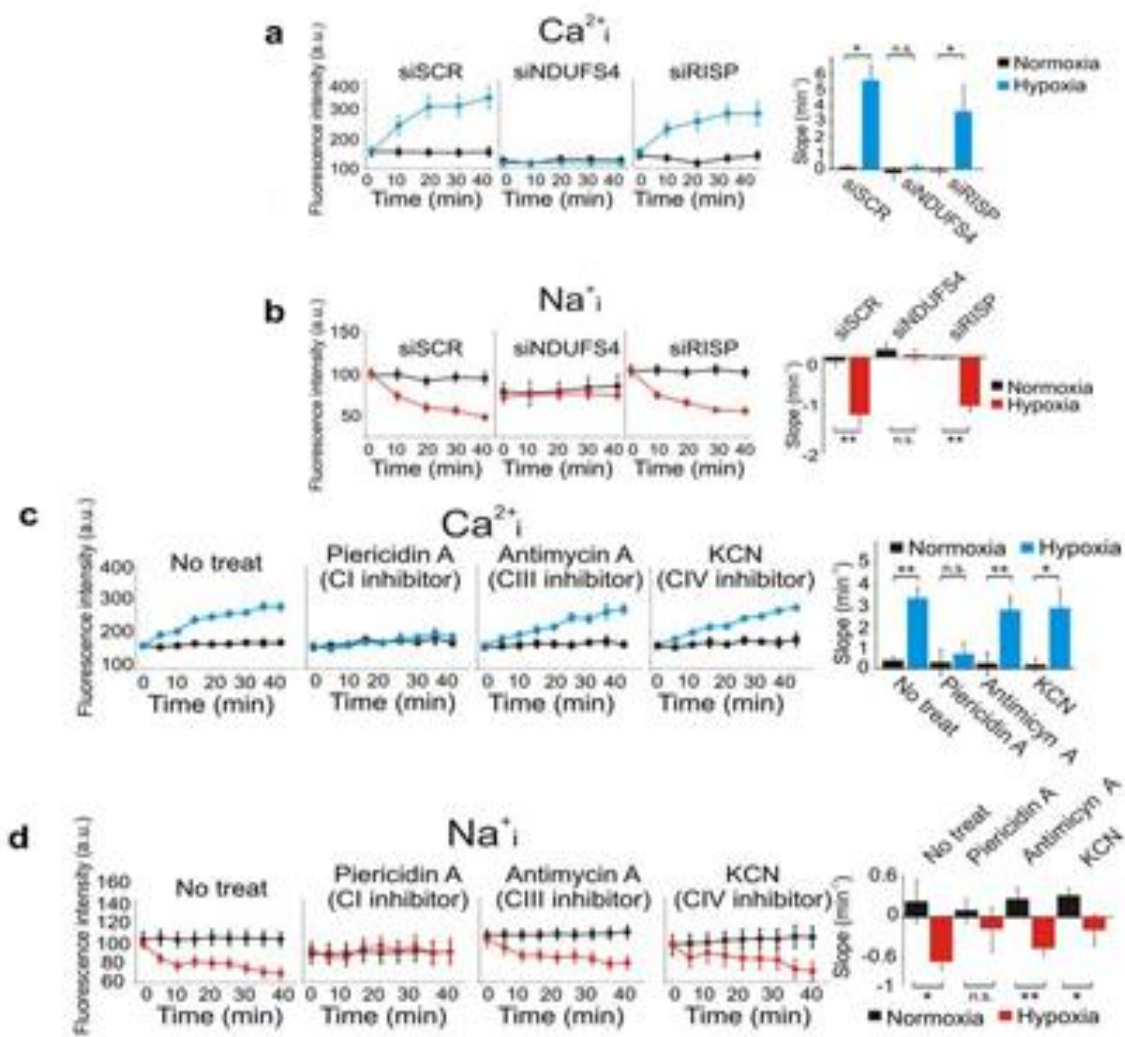


Figura 4. La activación en hipoxia de NCLX depende del complejo I. Microscopía de fluorescencia de los niveles de  $Ca^{2+}$  y  $Na^+$  citosólicos con diferentes inhibidores. Efecto del silenciamiento en el CI (NDUFS4) y CIII (RISP) en BAEC (a,b). Efecto de inhibidores de OXPHOS sobre los niveles de  $Ca^{2+}$  y  $Na^+$  (c,d). (11).

- 5) El cambio conformacional del complejo I del estado A-CI a D-CI se favorece en hipoxia independientemente de NCLX (11)

El complejo I presenta dos estados, donde el estado D del complejo I funciona como un transportador  $Na^+/H^+$ , introduciendo protones en la matriz y provocando su acidificación. Dicho cambio conformacional, tiene como característica la exposición del residuo Cys-39 de la subunidad ND3 del CI. Dicha subunidad sirvió como base en el siguiente estudio, donde se midió en células BAEC mediante marcaje fluorescente la exposición del residuo Cys-39, que representa la forma D-CI del complejo, junto con inhibidores del transportador NCLX para observar la posible relación entre ambos. Además, se midió cómo varía el pH mitocondrial en células tratadas con hipoxia y con inhibidores de NCLX. En el estudio se utiliza el ratio TMR/Spyro ND3, el cual representa la cantidad de Cys39 marcado accesible frente al total de proteína ND3 identificado mediante espectrometría de masas (a) como prueba identificadora de la exposición de Cys39.

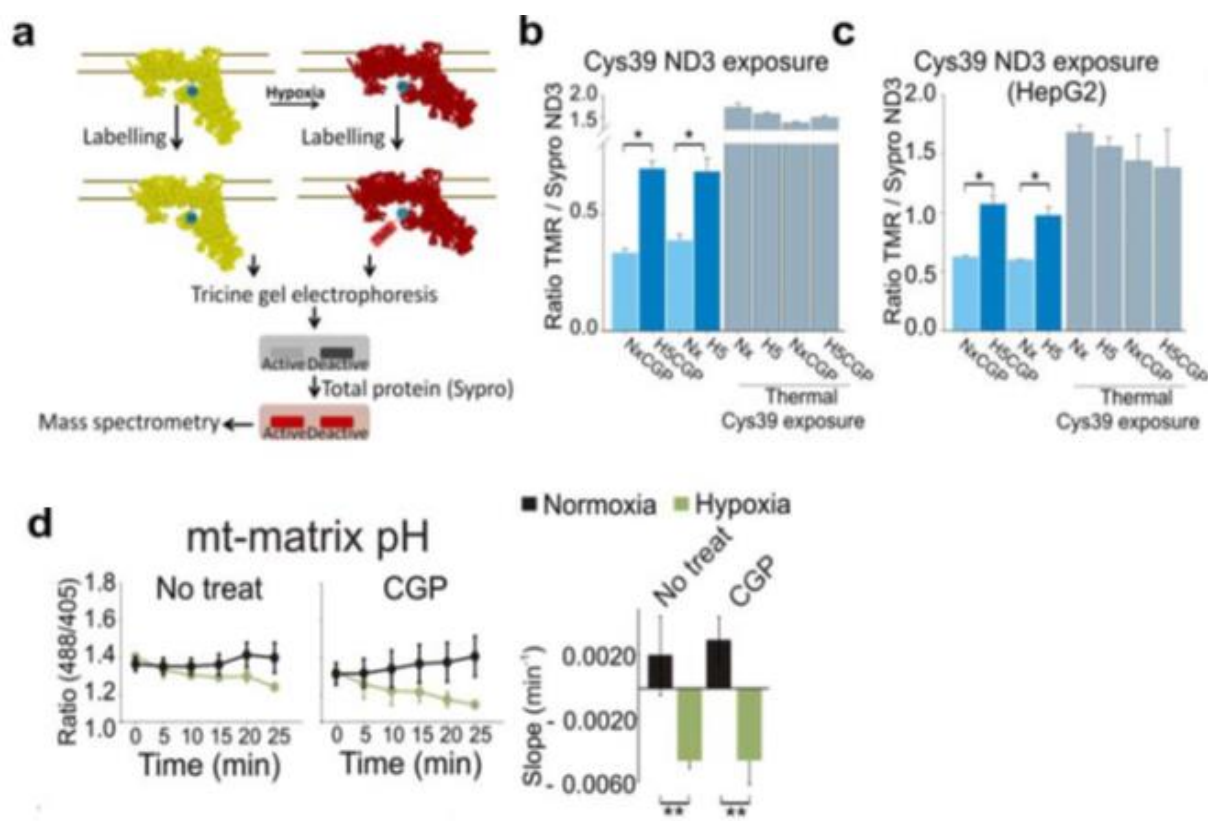


Figura 5. La hipoxia aguda promueve la transición A/D del complejo I independientemente de la actividad de NCLX en células BAEC. Exposición de ND3 Cys39 medida mediante el ratio TMR/Spyro ND3 (identificado por espectrometría de masas, a) en células BAEC (b) o HepG2 (c). Medida del pH de la matriz mitocondrial en células BAEC con tratamiento o no con CGP (d). (11).

Los resultados del estudio se muestran en la figura 5. Como se puede ver en la figura, a-c nos habla de la exposición de Cys39 mediante el ratio TMR/Spyro ND3 en diferentes estados de hipoxia sometidos en la prueba (Nx-Normoxia, H5-Hipoxia5min, NxCGP-NormoxiaCGP e H5CGP-Hipoxia5minCGP), siendo "Thermal Cys39 exposure" el control positivo de desactivación del complejo I. Se puede observar viendo los resultados en b-c que la transición es favorecida en estados de hipoxia en la célula independientemente de la inhibición farmacológica de NCLX por CGP. En d, se observa como los niveles de pH en la matriz disminuyen independientemente de la inhibición por CGP del NCLX en las células tratadas con hipoxia.

De esta forma, el estudio afirma que el transportador NCLX no influye en el cambio conformacional del estado A-CI a D-CI que se da en la hipoxia aguda. Este resultado lleva a algunos equipos a plantearse el papel del complejo I. Existen hipótesis donde ven al complejo I como sensor en sí mismo de la hipoxia, siendo el cambio conformacional un evento primario en esta respuesta.

6) El complejo III es responsable de la formación de ROS independientemente de NCLX (11)

Numerosos estudios señalan al complejo III como principal responsable de la generación de ROS. De esta forma el siguiente estudio se realizó con el objetivo de comprobar la contribución del complejo III mitocondrial a la formación de superóxido.

Mediante microscopía de fluorescencia se comprobó la formación de superóxido producido en células BAEC bajo condiciones diferentes como la inhibición genética de la subunidad RISP del complejo III, o bajo la adición de sustratos como mixotiazol (inhibidor del sitio Q<sub>o</sub> de la ubiquinona en CIII), NaCl (sustrato activador de NCLX) o CGP (inhibidor de NCLX).

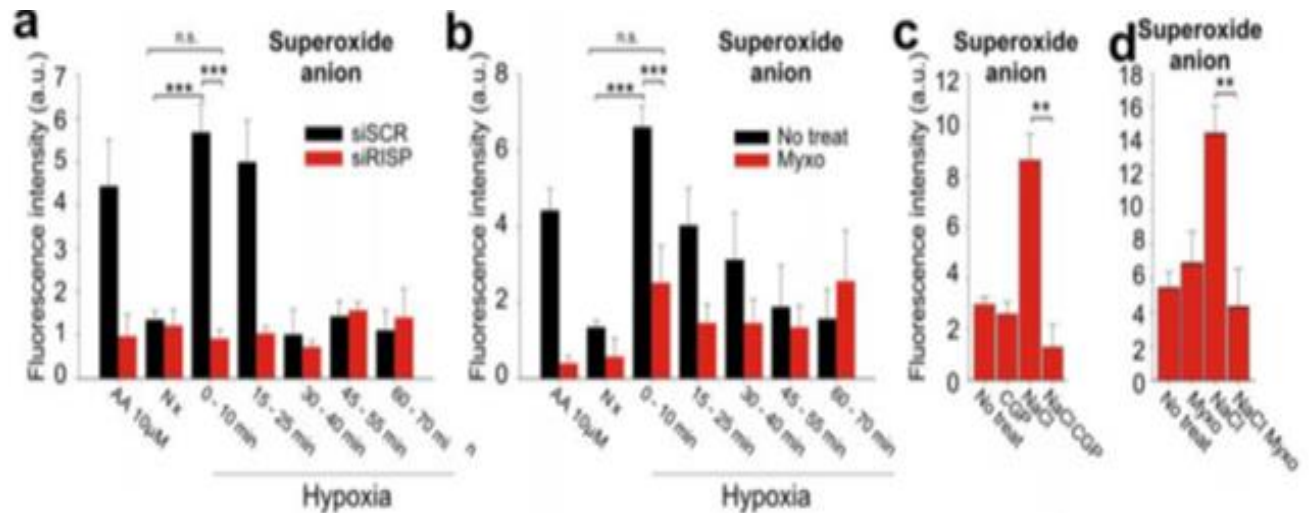


Figura 6. Detección de superóxido en hipoxia y normoxia por microscopía electrónica tras la incubación con DHE en células endoteliales BAEC con silenciamiento de RISP (a) o tratamiento con mixotiazol (b). Detección del superóxido con DHE tras la adición de NaCl en células BAEC con CGP (c) o mixotiazol (d). (11)

En los resultados aportados por la figura 6, las gráficas a-b nos informan sobre una drástica reducción de la producción de superóxido en hipoxia en las células tratadas con el silenciamiento de RISP (subunidad del complejo III) y con mixotiazol (inhibidor farmacológico del complejo III). Esto nos da una clara señal de la importancia del complejo III en la producción de ROS en hipoxia aguda.

En la tabla c se puede observar como la producción de superóxido es favorecida por la adición de NaCl. Pero cuando se administra GCP-37157 (inhibidor de NCLX) este efecto de producción de superóxido se inhibe.

Lo mismo ocurre en la tabla d, la adición de NaCl dispara la producción de superóxido, pero cuando se administra junto con el mixotiazol, se inhibe la producción de superóxido.

Con todos estos resultados el estudio nos da una clara señal que la producción de ROS en hipoxia aguda depende del complejo III independientemente de NCLX.

7) El bloqueo del flujo de Na<sup>+</sup> hacia la matriz mitocondrial afecta a las respuestas a largo plazo ante la hipoxia (11)

Existen hipótesis sobre la influencia del transportador NCLX y del Na<sup>+</sup> de la matriz mitocondrial en la expresión genética a largo plazo como respuesta a situaciones de hipoxia aguda.

Con este fin, se realizó este estudio donde se midió la estabilización de HIF-1α por Western-Blott de células BAEC y células endoteliales humanas de la vena umbilical (HUVEC) en condiciones de normoxia, hipoxia y de inhibición farmacológica por CGP-37157 (inhibidor de NCLX y, por tanto, del flujo de Na<sup>+</sup> hacia la matriz).

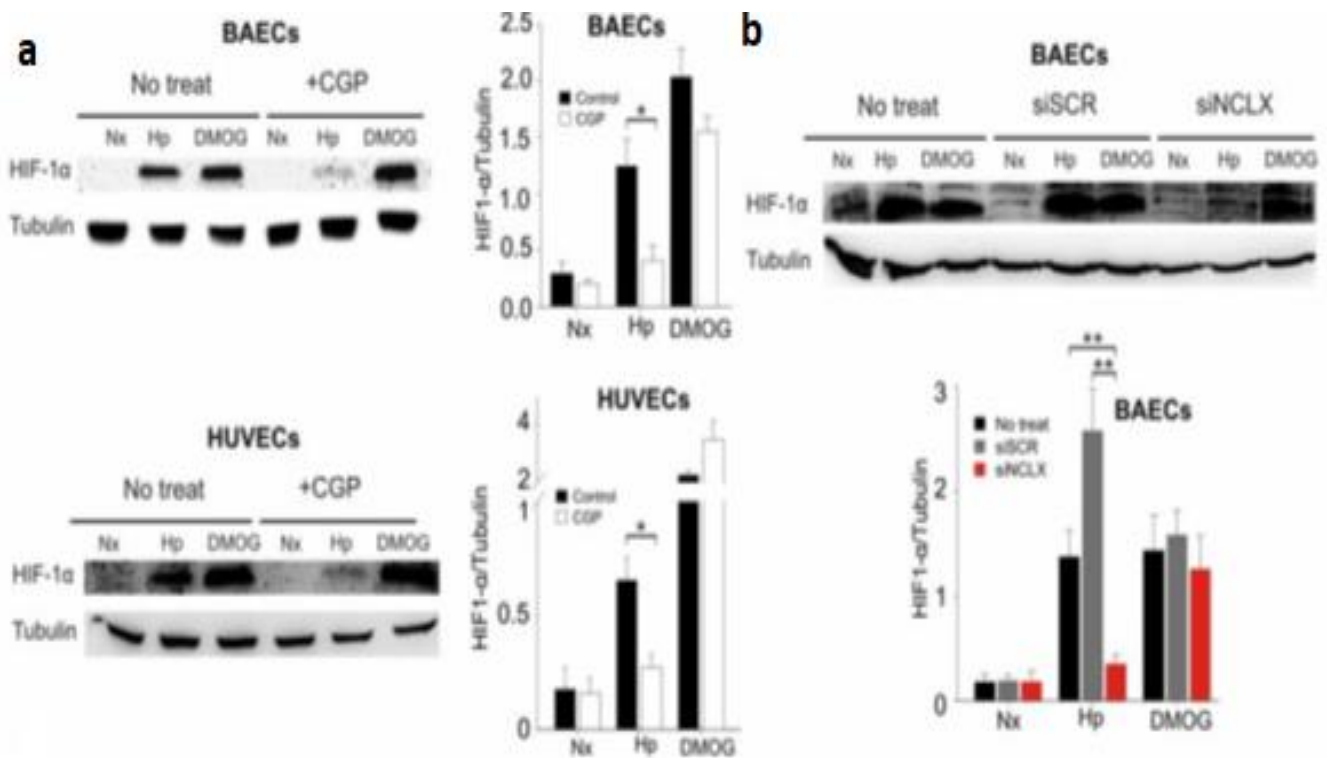


Figura 1. La inhibición del flujo de Na<sup>+</sup> hacia la matriz mitocondrial afecta a las respuestas a largo plazo contra la hipoxia en células BAEC y HUVEC. Estabilización de HIF-1α medida por Western-Blot en células endoteliales expuestas a normoxia e hipoxia con la presencia de CGP (a) y con el silenciamiento de NCLX (b). (11).

Como se puede observar en los resultados de la figura 7, la estabilización de HIF-α, expresada como la proporción entre HIF-α y tubulina, se inhibe notablemente en presencia de CGP respecto al control tanto en células BAEC como HUVEC en estados de hipoxia (a). También el silenciamiento de NCLX en hipoxia inhibió la estabilización de HIF-α en células BAEC (b).

Con estos resultados se puede confirmar que la inhibición del flujo de Na<sup>+</sup> hacia la matriz mitocondrial es capaz de inhibir las respuestas a largo plazo contra la hipoxia. De esta forma, queda indicado el importante papel del NCLX sobre la transcripción genética de HIF y sus respuestas a largo plazo.

8) Animales con inactivación del complejo I no presentan reflejos fisiológicos ante la hipoxia (17)

La hiperventilación es el reflejo más importante ante la hipoxia del organismo. Las células del cuerpo carótido (CB) son los quimiorreceptores encargados de producir el estímulo nervioso para que se produzca la hiperventilación cuando baja el nivel de oxígeno en la sangre (hipoxemia). La inhibición de los canales de K de estas células puede inducir la despolarización, la entrada de Ca y liberación de neurotransmisores que acabarán produciendo el reflejo.

De esta forma, se quiere estudiar cómo puede afectar y qué relación tienen el complejo I y la ejecución de reflejos ante la hipoxia como la hiperventilación. Para ello se realizó un estudio donde ratones control y ratones con el gen *NDUFS2* mutado, el cual afecta al sitio de unión de la ubiquinona en el complejo I, se les midió la frecuencia respiratoria (respiraciones/minuto) en condiciones de normoxia, hipoxia, e hipercapnia. Además, mediante inmunotinción se observó y cuantificó el volumen de las células del cuerpo carótido (CB) en ratones control y mutados.

Como se observa en la figura 8. bajo condiciones de hipoxia, los ratones control presentaron una respiración acelerada debido a los reflejos de hiperventilación. No obstante, los ratones con el gen mutado no presentaron dicho reflejo y, por tanto, no tuvieron variación respecto a la frecuencia respiratoria. (Fig A/B)

Bajo condiciones de hipercapnia, ambos ratones reaccionaron con el reflejo ante la situación. (Fig C/D)

También se observó mediante inmunotinción de la tirosina hidroxilasa (TH) que los ratones con el gen mutado preservaban una hipertrofia con una apariencia histológica normal del cuerpo carótido. (Fig E-G)

Con todos estos resultados, se puede concluir que la inactivación del complejo I abole el reflejo de hiperventilación en hipoxia, pero no en hipercapnia, manteniendo la estructura histológica de la célula.

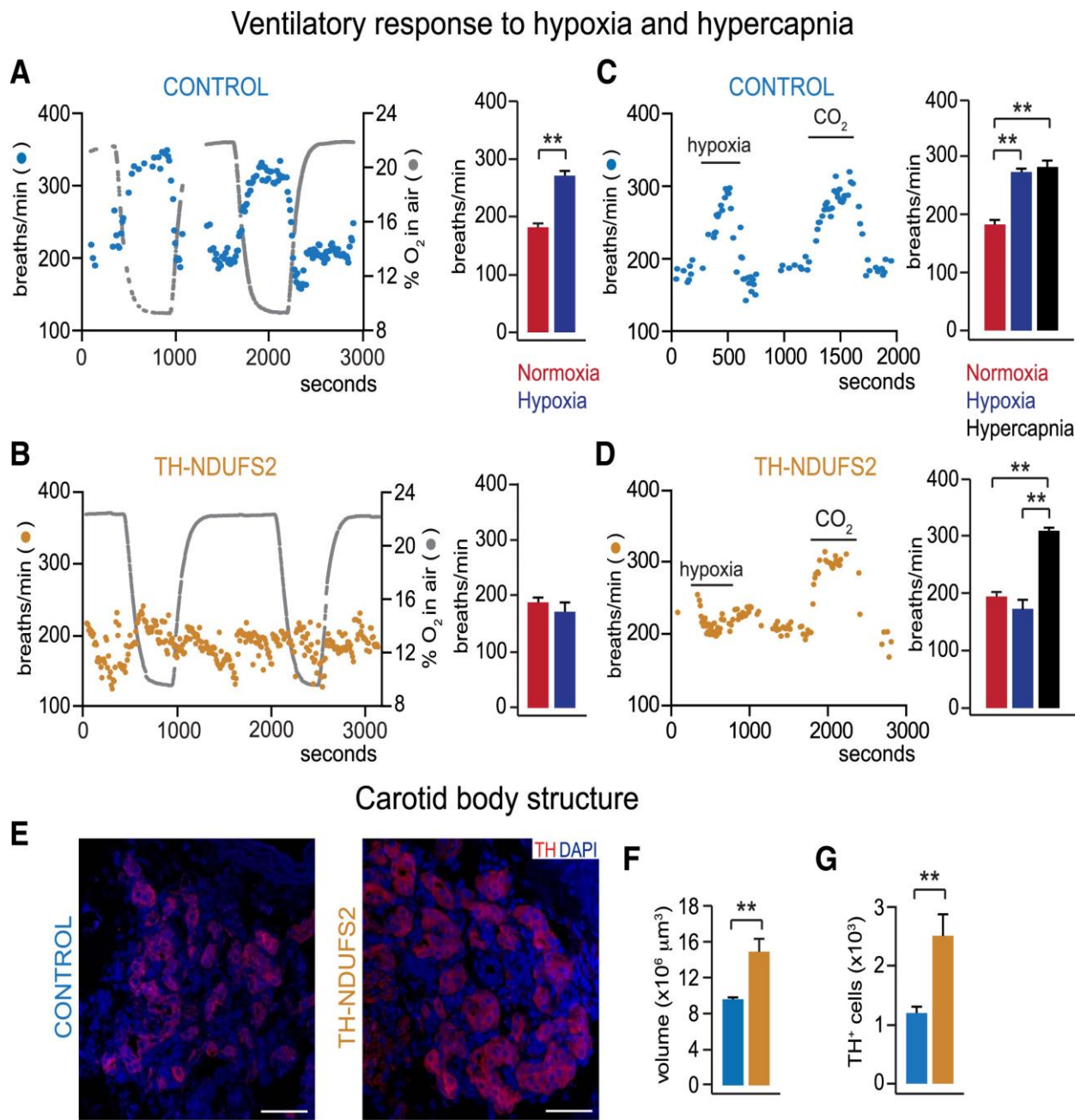


Figura 2. Ausencia de respuesta de hiperventilación en ratones con NDUFS2 mutado, preservando la integridad celular. Cambios en la frecuencia respiratoria durante hipoxia en ratones control y con NDUFS2 mutado (a,b). Cambios en la frecuencia respiratoria durante hipoxia o hipercapnia en ratones control y con NDFUS2 mutado (c,d). Inmunotinción de la tirosina hidroxilasa (TH) de CB en ratones control y mutados (e). Cuantificación del volumen total de de CB (f) y número de células TH+ (g) en ratones control y mutados. (21).

## 9 Conclusiones

En la hipoxia aguda, las células producen superóxido, y este superóxido, es producido mayoritariamente en la mitocondria en los primeros minutos de la exposición a hipoxia, alcanzándose en 1 hora los mismos niveles que las células en estado de normoxia. Estos estudios proponen que la liberación rápida en los primeros minutos de hipoxia del superóxido sirve a la célula como instrumento de señalización y respuesta a la hipoxia con el fin de adaptarse a esta nueva situación (16).

El complejo III es el principal responsable de la formación de ROS, debido a su importante papel como receptor de electrones provenientes tanto del complejo I como del complejo II vía ubiquinona, y como se ha podido ver en los resultados, esta formación es dependiente del papel del transportador NCLX y de la entrada de  $\text{Na}^+$  en la matriz mitocondrial. Esto puede ser explicado según la teoría propuesta por el equipo de investigación encargado de la realización de la prueba, donde proponen que, debido a la disminución de la fluidez de la membrana interna de la mitocondria a causa de la entrada de  $\text{Na}^+$ , el sitio  $\text{Q}_i$  del complejo III, situado en la membrana interna, se vería afectado por la reducción de la fluidez. Esta reducción enlentecería la transferencia de electrones desde CIII hasta CoQ oxidada situada en el sitio  $\text{Q}_i$ , incrementando la vida media de la forma semiquinona en el sitio  $\text{Q}_0$ , produciendo el superóxido (11).

La hipoxia aguda provoca la activación del transportador NCLX, el cual como ya se ha visto se encarga de introducir en la matriz mitocondrial  $\text{Na}^+$ , aportando de esta forma nuevas funciones al  $\text{Na}^+$  en la mitocondria, en contra de lo que se pensaba hasta el momento que únicamente intervenía en el equilibrio del potencial de membrana. Se ha conocido también debido a los resultados obtenidos que el complejo I es necesario para la activación de este transportador NCLX. Esto se debe a que el NCLX es activado cuando la matriz es acidificada, esta disminución del pH se produce cuando el complejo I cambia de conformación a la forma D-CI en hipoxia comportándose como un transportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ . Con esta información podemos concluir que NCLX necesita del complejo I para activarse y que la hipoxia promueve una acidificación de la matriz dependiente del complejo I. Además, la activación de NCLX, complejo I dependiente, produce la formación de superóxido por el complejo III, haciendo de esta forma al complejo I un pilar fundamental en el proceso de señalización ante la hipoxia y de gran influencia sobre la producción de superóxido por el complejo III.(11).

Los resultados de los trabajos también concluyen que la inhibición de la entrada de  $\text{Na}^+$  en la matriz es causante de la inhibición de la producción de respuestas adaptativas a la hipoxia a largo plazo como la inducción de genes regulados por HIF en células endoteliales, dando una nueva función al papel del transportador NCLX y  $\text{Na}^+$  en las células en estados de hipoxia (11).

La inactivación del complejo I en las células del cuerpo carótido en animales inhibe la producción de reflejos compensatorios ante la hipoxia como la hiperventilación. De esta



forma se consigue impedir la despolarización de las células del cuerpo carotideo inhibiendo los canales de K y por tanto la liberación neurotransmisores que generarán dicho reflejo, dando una importancia fisiológica más que relevante al papel del complejo I en la hipoxia (17).

Proteínas, lípidos e iones regulan la actividad del complejo I. Así como diferentes tejidos, condiciones fisiológicas o enfermedades que pueden influir en dicha actividad, dando como resultado consecuencias desde el punto de vista de formación de ROS. La hipoxia y anoxia están presentes en muchas situaciones fisiológicas y fisiopatológicas, de esta forma el estudio del complejo I resulta mucho más relevante además de como modulador de la homeostasis de la mitocondria. El estudio de las células del cuerpo carotideo y la desactivación del complejo I de la mitocondria, no solo nos permite conocer más sobre los conocimientos de la quimiorrepción del oxígeno, sino también sobre la patogénesis de varias enfermedades, como el Parkinson o el síndrome de Leigh, las cuales son causadas por una deficiencia en el complejo I. (14,18).

Estas han sido las principales conclusiones de los equipos de investigación implicados en esta materia a partir de las pruebas anteriormente mencionadas. No obstante, tanto en diversos artículos científicos como información recopilada en encuentros con investigadores del área, aún existe controversia sobre el papel real del transportador NCLX y su verdadera implicación en hipoxia. Investigaciones futuras sobre el tema tratarán de esclarecer este debate con el objetivo de profundizar en la señalización de la respuesta mitocondrial producida ante la hipoxia, además de la función de cada uno de los componentes que participan en este proceso de adaptación celular.

## 10 Bibliografía

- 1) M.P. Murphy. **How mitochondria produce reactive oxygen species.** Biochem. J., 417 (2009), pp. 1-13, [10.1042/BJ20081386](https://doi.org/10.1042/BJ20081386)
- 2) J.F. Turrens. **Mitochondrial formation of reactive oxygen species.** J. Physiol., 552 (2003), pp. 335-344, [10.1113/jphysiol.2003.049478](https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.049478)
- 3) H. Sies. **Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine.** Redox Biol., 4C (2015), pp. 180-183, [10.1016/j.redox.2015.01.002](https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.01.002)
- 4) N.S. Chandel, D.A. Tuveson. **The promise and perils of antioxidants for cancer patients.** N. Engl. J. Med., 371 (2014), pp. 177-178, [10.1056/NEJMcibr1405701](https://doi.org/10.1056/NEJMcibr1405701)
- 5) D.J. Surmeier, J.N. Guzman, J. Sanchez, P.T. Schumacker. **Physiological phenotype and vulnerability in Parkinson's disease.** Cold Spring Harb. Perspect. Med., 2 (2012), p. a009290, [10.1101/cshperspect.a009290](https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009290)
- 6) R.K. Chaturvedi, M. Flint Beal. **Mitochondrial diseases of the brain.** Free Radic. Biol. Med., 63 (2013), pp. 1-29, [10.1016/j.freeradbiomed.2013.03.018](https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.03.018)
- 7) C. Nathan. **Specificity of a third kind: reactive oxygen and nitrogen intermediates in cell signaling.** J. Clin. Investig., 111 (2003), pp. 769-778, [10.1172/JCI18174](https://doi.org/10.1172/JCI18174)
- 8) L.A. Sena, N.S. Chandel. **Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species.** Mol. Cell, 48 (2012), pp. 158-167, [10.1016/j.molcel.2012.09.025](https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.09.025)
- 9) W.G. Kaelin Jr, P.J. Ratcliffe. **Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway.** Mol. Cell, 30 (2008), pp. 393-402. [10.1016/j.molcel.2008.04.009](https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.04.009)
- 10) P.J. Ratcliffe. **Oxygen sensing and hypoxia signalling pathways in animals: the implications of physiology for cancer.** J. Physiol., 591 (2013), pp. 2027-2042. [10.1113/jphysiol.2013.251470](https://doi.org/10.1113/jphysiol.2013.251470)
- 11) Hernansanz-Agustín P., Ramos E., Villa-Piña T., Navarro E., Parada E., Moreno L., Izquierdo-Álvarez A., Oliva T., Cabrera-García J.D., Cortés A., Tello D., Acín-Pérez R., Buendía I., Rodríguez-Aguilera J.C., Navas P., Cogolludo A., Martínez-del-Pozo A., Egea J., G. López M., Bogdanova A., Enríquez J.A., Martínez-Ruiz A. **Mitochondrial Na<sup>+</sup> import controls oxidative phosphorylation and hypoxic redox signalling.** Free Radical Biology and Medicine. Volume 120, Supplement 1, 20 May 2018, Page S29 <http://dx.doi.org/10.1101/385690>
- 12) Bers, D. M., Barry, W. H. & Despa, S. **Intracellular Na<sup>+</sup> regulation in cardiac myocytes.** Cardiovasc Res 57, 897-912, (2003). [10.1016/s0008-6363\(02\)00656-9](https://doi.org/10.1016/s0008-6363(02)00656-9)
- 13) Rainer A. Böckmann,\* Agnieszka Hac,† Thomas Heimbürg,† and Helmut Grubmüller. **Effect of Sodium Chloride on a Lipid Bilayer.** Biophys J. 2003 Sep;85(3):1647-55. Doi: [10.1016/S0006-3495\(03\)74594-9](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(03)74594-9)
- 14) Hernansanz-Agustín P., Ramos E., Navarro E., Parada E., Sánchez-López N., Peláez-Aguado L., Cabrera-García J.D., Tello D., Buendía I., Marina A., Egea J., López M.G., Bogdanova A., Martínez-Ruiz A. **Mitochondrial complex I deactivation is related to superoxide production in acute hypoxia.** Redox Biol. 2017 Aug;12:1040-1051. doi: [10.1016/j.redox.2017.04.025](https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.04.025). Epub 2017 Apr 21 <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.04.025>

- 15) Gao L., González-Rodríguez P., Ortega-Sáenz P., López-Barneo J. **Redox signaling in acute oxygen sensing.** Redox Biol. 2017 Aug;12:908-915. doi: 10.1016/j.redox.2017.04.033. Epub 2017 Apr 26  
<https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.04.033>
- 16) Hernansanz-Agustín P., Izquierdo-Álvarez A., Sánchez-Gómez F.J., Ramos E., Villa-Piña T., Lamas S., Bogdanova A., Martínez-Ruiz A. **Acute hypoxia produces a superoxide burst in cells.** Free Radic Biol Med. 2014 Jun;71:146-56. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.03.011. Epub 2014 Mar 15.  
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.03.011>
- 17) Fernández-Agüera M.C., Gao L., González-Rodríguez P., Pintado C.O., Arias-Mayenco I., García-Flores P., García-Pergañeda A., Pascual A., Ortega-Sáenz P., López-Barneo J. **Oxygen Sensing by Arterial Chemoreceptors Depends on Mitochondrial Complex I Signaling.** Cell Metab. 2015 Nov 3;22(5):825-37. doi: 10.1016/j.cmet.2015.09.004. Epub 2015 Oct 1. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.09.004>
- 18) Babot, M., Birch, A., Labarbuta, P. & Galkin, A. **Characterisation of the active/de-active transition of mitochondrial complex I.** Biochim Biophys Acta 1837, 1083-1092, (2014). <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2014.02.018>
- 19) Fiedorczuk, K. et al. **Atomic structure of the entire mammalian mitochondrial complex I.** Nature 538, 406-410, (2016). 10.1038/nature19794
- 20) Carafoli, E., Tiozzo, R., Lugli, G., Croveti, F. & Kratzing, C. **The release of calcium from heart mitochondria by sodium.** J Mol Cell Cardiol 6, 361-371, (1974). [https://doi.org/10.1016/0022-2828\(74\)90077-7](https://doi.org/10.1016/0022-2828(74)90077-7)
- 21) Cox, D. A. & Matlib, M. A. **A role for the mitochondrial Na(+)-Ca<sup>2+</sup> exchanger in the regulation of oxidative phosphorylation in isolated heart mitochondria.** J Biol Chem 268, 938-947, (1993). doi: 10.3748/wjg.v12.i5.796