

# **Aconitasa Mitocondrial: Impacto metabólico de la inactivación por especies oxidantes.**

**Tesis de Maestría**

Programa de desarrollo de las Ciencias Básicas. (PEDECIBA)

Área Biología, subárea Bioquímica.

Lic. Fiorella Scandroglio.

**Orientadora.**

Dra. Laura Castro.

Departamento de Bioquímica.

Facultad de Medicina, UdelaR.

# Índice

Agradecimientos.	4
Abreviaturas	5
Resumen	7
Introducción	9
Formación de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno en la Mitocondria	9
Rol de las especies reactivas mitocondriales: señalización y disfunción mitocondrial mediada por estrés oxidativo.	13
Aconitasa mitocondrial y especies reactivas	15
El análisis del control metabólico (ACM)	17
Análisis de datos	18
Objetivos	19
Objetivo General	19
Objetivos Específicos	19
Materiales y Métodos	20
Purificación de mitocondrias de hígado, cerebro, corazón y riñón de rata.	20
Medidas del consumo de Oxígeno.	20
Determinación del Potencial de Membrana.	21
Actividad aconitasa.	22
Evaluación de la producción de peróxido de hidrogeno.	23
Expresión de Aconitasa en los diferentes órganos de rata.	23
Determinación del coeficiente de control de flujo y los umbrales respiratorios.	24
Resultados	26
Medidas de la actividad Aconitasa	26

<b>Medida de la respiración mitocondrial</b>	<b>28</b>
<b>Determinación de umbrales y coeficientes de control de flujo.</b>	<b>32</b>
<b>Determinación de Potencial de Membrana</b>	<b>37</b>
<b>Producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mitocondrial, efecto de la inhibición de la aconitasa.</b>	<b>39</b>
<b>Medidas de la expresión de la Aconitasa</b>	<b>42</b>
<b>Reactivación de Aconitasa.</b>	<b>43</b>
<b>Discusión.</b>	<b>45</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>50</b>

## **Agradecimientos.**

Primero a Laura Castro, mi tutora por guiarme en este trabajo, principalmente en ayudarme a culminar esta etapa.

Al departamento de bioquímica por abrirme sus puertas y permitirme trabajar en el divertido mundo de las mitocondrias. En especial a mis compañeros, desde los más “grandes”, Noel, Adriana, Lu. P, Gonza, Pepe, Homer, Vero T, que me han acompañado desde compartir un mate, discutir algún experimento, hasta palabras de aliento cuando las cosas no salían. En especial al grupo “junior”, mis amigos, Adrian, Lu G, Caro, Damián, Marcelo, Ceci, Ale, Vale, con quienes no solo he compartido largas jornadas de trabajo sino que me he divertido a lo largo de este camino.

A mi familia que siempre me ha apoyado, en especial a mi mamá.

A Mati mi compañero de ruta, que me aguanta todos los días.

A Juli la que me hace reír todos los días!

Este trabajo fue financiado por ANII, CSIC y PEDECIBA.

## Abreviaturas

ACM, Análisis de control metabólico.

ADP, Adenisona difosfato.

ATP, Adenosina trifosfato.

CCF, coeficiente de control de flujo.

CoQ, Coenzima Q.

CoQH<sup>·</sup> , Ubisemiquinona.

ELA ,esclerosis lateral amiotrófica

Fe-S, centro ferrosuldurado.

FMN, flavín mononucleótido

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> , peróxido de hidrógeno

IC<sub>50</sub>, actividad enzimática inhibida un 50%.

NOS, óxido nítrico sintasas

nNOS, oxido nítrico sintasasa neuronal

eNOS, oxido nítrico sintasa endotelial

iNOS oxido nítrico sintasa inducible

Prx, peroxirredoxinas

O<sub>2</sub><sup>·-</sup>, superóxido

·OH, radical hidroxilo

ONOO<sup>-</sup> peroxinitrito.

ONOOH, ácido peroxinitroso

ROS, especies reactivas del oxígeno.

RCR, relación de control respiratorio

RNS, especies reactivas del nitrógeno.

SOD, superóxido dismutasa

UCPs, proteínas desacoplantes.

$\Delta\Psi$ , potencial de membrana

## Resumen

La mitocondria, organelo de control bioenergético de las células eucariotas, constituye además un sitio de formación de especies oxidantes derivadas del oxígeno y del óxido nítrico que mediante reacciones de oxidación de biomoléculas, cumplen roles señalizadores o determinan alteraciones estructurales y funcionales mediante la disfunción mitocondrial.

El radical superóxido y especies derivadas de su reacción con óxido nítrico (peroxinitrito y radical carbonato) reaccionan rápida y selectivamente con el centro Fe-S de la aconitasa mitocondrial, determinando la inhibición de esta enzima del ciclo de Krebs. La presencia de la aconitasa oxidada y nitrada en diversos modelos animales de sepsis, inflamación, envejecimiento y diabetes la revelan como un blanco preferencial de especies oxidantes *in vivo*.

Para determinar la contribución de la inhibición de la aconitasa sobre la bioenergética celular, empleamos un estudio de control metabólico, determinando el coeficiente de control de flujo de la aconitasa sobre la respiración mitocondrial en distintos órganos de rata. Se midió la actividad aconitasa y la respiración mitocondrial en mitocondrias aisladas de cerebro, hígado, corazón y riñón de rata en presencia de fluorocitrato, un inhibidor competitivo de la aconitasa. El fluorocitrato determinó una inhibición de la aconitasa mitocondrial con valores de  $IC_{50}$  que variaron desde 7 a 24  $\mu$ M entre los órganos estudiados.

Establecimos los umbrales de inhibición de la aconitasa sobre la cadena respiratoria mitocondrial, obteniéndose valores de ~37%, ~31%, en riñón e hígado y <5% para cerebro y corazón. Los tejidos que presentaron el mayor coeficiente de control de flujo fueron cerebro y corazón ( $0.98 \pm 0.023$  y  $0.80 \pm 0.015$  respectivamente).

La actividad específica de la aconitasa mitocondrial presentó variaciones amplias entre los tejidos observándose valores desde 60 mU/mg en hígado hasta 321 mU/mg en riñón a 21% de oxígeno.

En mitocondrias de corazón y cerebro la inhibición de la aconitasa en un 50% de su actividad, determinó una disminución significativa de la producción mitocondrial de peróxido de hidrógeno y en paralelo, se observó la despolarización de membrana mitocondrial.

Nuestros resultados indican que la aconitasa ejerce un alto control sobre la respiración y sustenta que la inactivación de la aconitasa puede proporcionar un mecanismo rápido de control para frenar la formación de especies reactivas en la mitocondria.

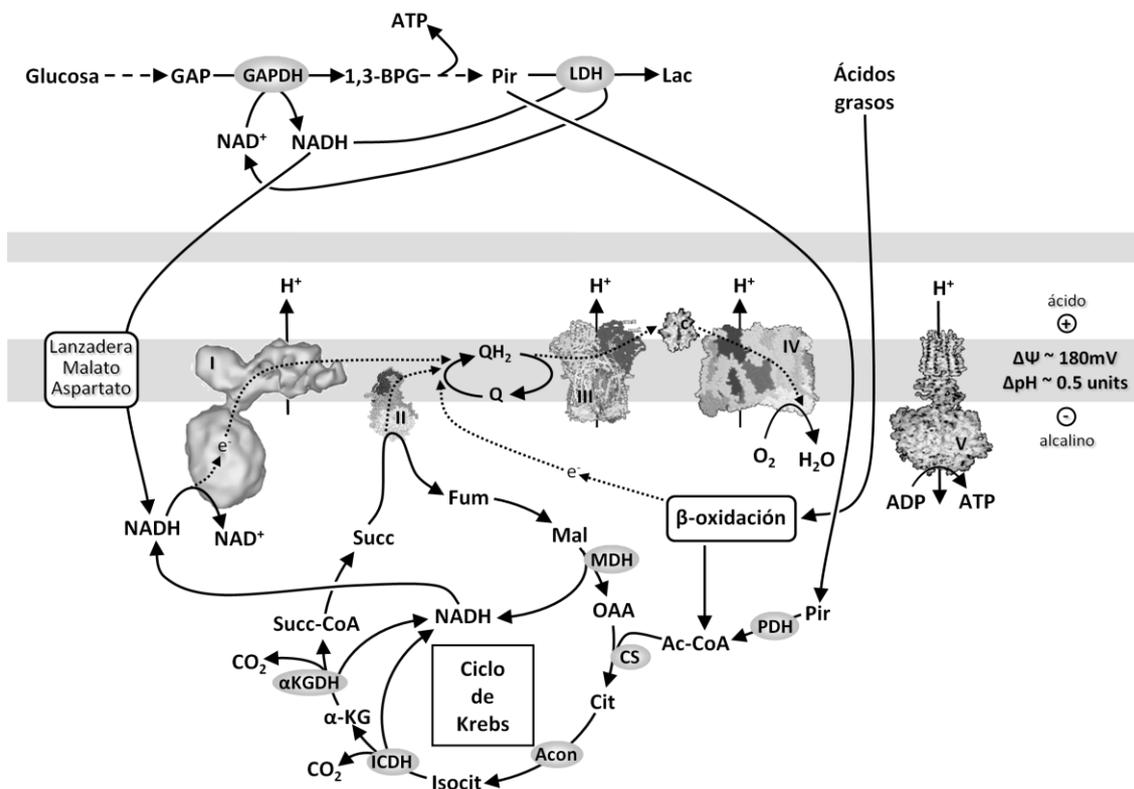
# Introducción

## ***Formación de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno en la Mitochondria***

Durante el metabolismo celular aeróbico se producen especies reactivas del oxígeno (ROS), como superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ). En células eucariotas, los principales sitios de formación de ROS son la cadena respiratoria mitocondrial, las enzimas microsomales citocromo P450 oxigenasas, las NAD(P)H oxidasas asociadas a la membrana plasmática, el metabolismo peroxisomal de ácidos grasos y retículo endoplasmático por parte de las flavoproteínas que oxidan tioles proteicos y producen peróxido de hidrógeno durante el plegamiento de proteico (1).

La mitocondria constituye el principal sitio de control bioenergético en la mayoría de las células de mamífero. El número de mitocondrias en los diferentes tejidos reflejan la función fisiológica del tejido y determinan su capacidad para llevar a cabo funciones metabólicas aeróbicas. Durante el transporte electrónico mitocondrial se genera un gradiente electroquímico (de protones) a través de la membrana mitocondrial interna el cuál se disipa al acoplarse fundamentalmente a la síntesis de ATP (Figura 1), pero también es utilizado para el transporte de cationes como el  $Ca^{2+}$  o disipado como calor

por acción de las proteínas desacoplantes (UCPs, del inglés uncoupling proteins)(2).



**Figura 1:** Esquema de la cadena de transporte de electrones y su relación con el ciclo de Krebs

La respiración mitocondrial es una importante fuente de  $O_2^-$ , se considera que entre un 0,1-2% del oxígeno consumido se convierte en  $O_2^-$ , tanto en condiciones normales o patológicas(3). Cuando la relación  $NADH/ NAD^+$  es elevada en la matriz mitocondrial el cofactor del complejo I flavín mononucleótido (FMN) queda reducido favoreciéndose la formación de  $O_2^-$ (4). También durante el transporte reverso de electrones la coenzima Q puede reducir al complejo I llevando a la formación de  $O_2^-$ , este último mecanismo, constituye una fuente importante en cerebro particularmente en enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson (5) y en síndromes de isquemia-reperfusión(6).

El complejo III acepta electrones del complejo I y II; contiene 3 grupos hemo y un centro FeS interaccionando con la coenzima Q (CoQ), durante el ciclo Q la reacción del  $O_2$  con ubiquinona (CoQH) lleva a la formación de  $O_2^-$  a ambos lados de la membrana mitocondrial interna(7). El carácter aniónico de  $O_2^-$  ( $pK_a = 4.7$ ) limita su difusión a través de las membranas. El  $O_2^-$  puede ser transformado en  $H_2O_2$  por la

superóxido dismutasa (SOD), de Mn en la matriz o CuZn en el espacio intermembrana ( $k = 2 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) o reaccionar directamente con algunos blancos de la matriz mitocondrial como por ejemplo con la aconitasa mitocondrial (aconitasa m) ( $k = 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ), o con el óxido nítrico llevando a la formación de peroxinitrito (ver luego)(8).

La velocidad de formación de superóxido por la cadena respiratoria es controlada por acción de masas: incrementándose cuando aumenta la concentración de transportadores reducidos o de oxígeno. Por esto, en estado 4 cuando la concentración de ADP es baja, la diferencia de potencial de membrana mitocondrial interna aumenta, disminuye el flujo de electrones y al aumentar la concentración de transportadores reducidos la formación de  $\text{O}_2^{\cdot -}$  aumenta. Por el contrario, en estado 3 cuando abunda el ADP y el potencial de membrana es menor, la velocidad del transporte electrónico aumenta y la formación de  $\text{O}_2^{\cdot -}$  cae(9-11). De acuerdo con esto, en mitocondrias aisladas se ha observado que la hiperpolarización de la membrana mitocondrial, levemente por encima de lo observado en el estado 3, resulta en un aumento la formación de peróxido de hidrógeno(12). Por otra parte existe evidencia de que las UCPs, cumplen roles antioxidantes, disipando el potencial de membrana mitocondrial y disminuyendo la formación de  $\text{O}_2^{\cdot -}$ (13-15).

Otros factores que influyen en la producción de ROS por la cadena respiratoria incluyen: la presencia de inhibidores de la cadena respiratoria (que favorece la hiperpolarización de la membrana mitocondrial), la presencia de agentes que realizan ciclos redox y la sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$ (16)

El óxido nítrico ( $\cdot\text{NO}$ ) es un radical libre centrado en el nitrógeno formado por la oxidación del aminoácido L-arginina a citrulina, catalizada por una familia de enzimas denominadas óxido nítrico sintasas (NOS). Se han descrito 2 isoformas constitutivas: la neuronal (nNOS) y la endotelial (eNOS), y una forma inducible (iNOS)(17). Aunque se ha postulado la presencia de una isoforma mitocondrial de la NOS, la evidencia experimental es contradictoria y la presencia de cofactores para su actividad es limitada en la matriz mitocondrial(18). El  $\cdot\text{NO}$  es una molécula hidrofóbica, lo que le permite difundir con relativa facilidad dentro de las células y a través de las membranas lipídicas y lipoproteínas, por lo tanto alcanza fácilmente la mitocondria

desde sus fuentes citosólicas. En concentraciones en el rango de pM o nM actúa como mediador en muchos procesos fisiológicos tales como la regulación del tono vascular, la neurotransmisión y la modulación de procesos inflamatorios(19). Sin embargo, a concentraciones en el rango de  $\mu\text{M}$  (como las producidas por la iNOS), el  $\cdot\text{NO}$  tiene un efecto citotóxico, reaccionando predominantemente con otras especies paramagnéticas, incluyendo el hierro de hemoproteínas o centros Fe-S,  $\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2\cdot^-$ , radicales proteicos y lipídicos(20).

La reacción de combinación entre  $\cdot\text{NO}$  y  $\text{O}_2\cdot^-$  transcurre a velocidades muy altas ( $k \sim 1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) y da lugar a la formación del anión peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) y su ácido conjugado, ácido peroxinitroso ( $\text{ONOOH}$ ) ( $\text{pK}_a = 6.8$ ). El  $\text{ONOO}^-$  puede oxidar por 1 o 2 electrones ( $E^\circ +1.7$  y  $+1.3$  V respectivamente) biomoléculas tales como tioles de bajo peso molecular(21, 22), ciertos residuos aminoacídicos como cisteína, metionina y triptófano (23) hemoproteínas (24) y otros centros metálicos(25). La evidencia experimental sustenta que el  $\text{ONOO}^-$  es el principal agente nitrante en la mitocondria (8).

Las mitocondrias son fuentes y blanco de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno. Estas pueden ser tóxicas en la mitocondria a través de la inactivación de proteínas que contengan centros metálicos (ej. la aconitasa y la succinato deshidrogenasa) o residuos críticos oxidables tales como cisteínas, metioninas o tirosinas. Los lípidos de membranas así como el ADNmt son también blancos de especies reactivas. La mitocondria presenta diversas defensas antioxidantes, como las enzimas superóxido dismutasa de manganeso (MnSOD)(26), las peroxirredoxinas(27) 3 y 5 (Prx 3 y Prx 5), catalasa (detectada en corazón e hígado), y antioxidantes de bajo peso molecular como el glutatión(28).

### ***Rol de las especies reactivas mitocondriales: señalización y disfunción mitocondrial mediada por estrés oxidativo.***

En condiciones fisiológicas existe una producción constante de radicales libres y especies reactivas no radicalares que tienen roles en procesos de señalización celular, sin embargo, cuando aumentan las concentraciones de estas especies pueden ocasionar modificaciones oxidativas y a la alteración funcional de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. El desbalance entre la tasa de producción de estas especies y la tasa de eliminación de las mismas por parte de compuestos y enzimas antioxidantes lleva a lo que se conoce como estrés oxidativo (29, 30). El delicado balance entre los efectos perjudiciales y beneficiosos de los radicales libres es un aspecto muy importante para los seres vivos y es mantenido mediante mecanismos denominados “regulación redox”. Estos procesos protegen a los organismos y mantienen la “homeostasis redox” controlando el estado redox *in vivo*.

Un ejemplo de la función de las ROS mitocondriales en la señalización es la respuesta a la hipoxia celular. La hipoxia genera una serie de señales celulares que disparan una respuesta adaptativa. Paradójicamente, las ROS mitocondriales, en particular el  $H_2O_2$  que difunde desde la mitocondria ha sido señalado como la especie que induce la estabilización del factor de transcripción inducible por hipoxia (HIF). La estabilización de HIF, se debe a la inactivación dependiente de  $H_2O_2$  de la prolil-hidroxilasa, enzimas que hidroxilan y marcan de esta manera a las subunidades reguladoras ( $\alpha$ ) de HIF. Además, otras respuestas se desencadenan en respuesta al aumento del  $H_2O_2$  mitocondrial en hipoxia tales como la activación de la AMPK y aumento en la concentración citosólica de calcio(31)

Por otra parte, desde la detección de la formación de  $O_2^{\cdot-}$  (y  $H_2O_2$ ) por la mitocondria, estas especies fueron vistas como subproductos tóxicos del metabolismo aeróbico que llevan a producir daño oxidativo y disfunción mitocondrial. Por ejemplo, la formación de  $O_2^{\cdot-}$  por la mitocondria aumenta con la edad en los tejidos animales. La teoría mitocondrial del envejecimiento plantea que las especies oxidantes derivadas del  $O_2^{\cdot-}$

formado en la mitocondria dañan al ADN mitocondrial (ADNmt) y que la acumulación del daño es el principal factor patogénico del envejecimiento.(32, 33)

En las células endoteliales la producción de  $O_2^-$  a nivel mitocondrial aumenta en condiciones en que el metabolismo de la célula se ve perturbado. Por ejemplo se postuló que la hiperglicemia produce un aumento en la producción de  $O_2^-$  mitocondrial(34, 35), como fuera demostrado en células endoteliales bovinas cultivadas en medio con alta concentración de glucosa (36).

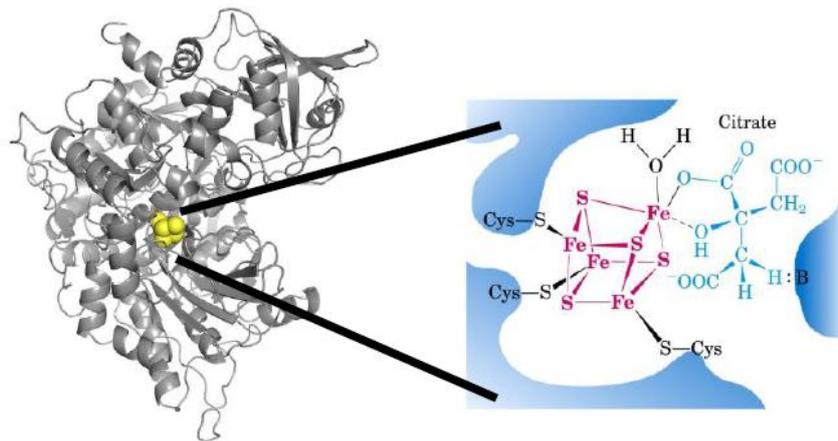
En la sepsis se observa una disminución de la contractilidad diafragmática, mediada por la producción excesiva de  $NO$ . En modelos de Sepsis en ratas, provocadas por un ligación cecal, se observó que la producción de especies reactivas que desempeñan una papel crítico en la disfunción mitocondrial determinan la hipocontractilidad diafragmática. La utilización de porfirinas de manganeso (atrapador de radicales como peroxinitrito) mejoro la disfunción diafragmática y mitocondrial, pudiendo contribuir a la prevención de la insuficiencia de órganos durante la sepsis.(37)

En diversas enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson, y ELA (esclerósia lateral amiotrófica), se ha evidenciado una disfunción mitocondrial, tanto en modelos animales como en humanos, la cual mejora mediante el tratamiento con antioxidantes dirigidos a la mitocondria , reflejando la participación primaria mitocondrial en la patogenia de estas enfermedades.(38)

La diabetes, la sepsis y las enfermedades neurodegenerativas son ejemplos de patologías donde la formación aumentada de uno o ambos radicales precursores, conduce a la formación de peroxinitrito en la mitocondria conllevando a la disfunción mitocondrial. Por lo tanto utilización de antioxidantes dirigidos a la mitocondria puede contribuir a la prevención o mejora de diversas patologías (8).

## ***Aconitasa mitocondrial y especies reactivas***

En mamíferos se pueden distinguir dos isoformas de aconitasa: una mitocondrial y una citosólica, estas son codificadas por distintos genes y presentan funciones fisiológicas diferentes. Las aconitasas son proteínas ferro-sulfuradas con un centro [4Fe-4S] en su sitio activo (Figura 2), la aconitasa mitocondrial (aconitasa m) es una deshidratasa participante del ciclo de Krebs que cataliza la interconversión específica de citrato a isocitrato pasando por un intermediario *cis*-aconitato. La aconitasa citosólica (aconitasac/IRP-1) es una enzima bifuncional: en su forma [4Fe-4S] presenta la misma actividad catalítica que la aconitasa m, pero en su forma de apoproteína se une a secuencias específicas del ARN mensajero (IREs) del receptor de transferrina y la ferritina entre otros, e interviene en la regulación de la homeostasis celular de hierro(39).



**Figura 2:** Estructura de la aconitasa mitocondrial. Se muestra su centro ferrosulfurado interactuando con su sustrato el citrato.

La aconitasa m presentan en su sitio activo el grupo prostético [4Fe-4S] este posee un átomo de hierro, Fe $\alpha$ , que no se encuentra ligado con residuos proteicos y se puede unir a grupos hidroxilo de los sustratos o del solvente (40). Es susceptible a la inactivación por O<sub>2</sub><sup>-</sup> el cual reacciona selectivamente con el grupo prostético con una constante aproximadamente 10<sup>7</sup>M<sup>1</sup>s<sup>-1</sup>, quedando con la forma [3Fe-4S]

catalíticamente inactiva. El Fe $\alpha$ , puede ser reincorporado en un proceso donde participan reductores como el GSH recuperando la actividad enzimática(41).

Dada la rápida y selectiva reacción de la aconitasa con O<sub>2</sub><sup>-</sup>, la relación entre la cantidad de aconitasa activa e inactiva ha sido usado como un método muy sensible para medir la concentración de O<sub>2</sub><sup>-</sup> en estado estacionario ([O<sub>2</sub><sup>-</sup>]<sub>ee</sub>) (42-44). En condiciones intracelulares, asumiendo que la cantidad de hierro y reductores, la concentración en estado estacionario de aconitasa m activa en presencia de O<sub>2</sub><sup>-</sup> va a estar dada por un balance entre la tasa de inactivación de la aconitasa y su tasa de reactivación.(42, 45), se puede calcular la concentración de O<sub>2</sub><sup>-</sup> a partir de la relación entre el porcentaje de aconitasa activa e inactiva.

Estudios realizados en nuestro grupo con la enzima aislada mostraron que el ONOO<sup>-</sup> oxida el centro [4Fe-4S] de la aconitasa (k =10<sup>5</sup> M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>), llevándolo a una forma [3Fe-4S] con la liberación de Fe libre inactivándose así la enzima (46). En presencia de CO<sub>2</sub>, la formación de radical carbonato también promueve la oxidación del centro ferrosulfurado (k= 10<sup>8</sup>M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>). Por otra parte, el <sup>•</sup>NO y nitrosotioles (como el nitrosoglutatión) reaccionan a altas concentraciones con el centro 4Fe-4S con constantes de reacción menores (0.65 y 0.23 M<sup>-1</sup>.s<sup>-1</sup>) y llevan a la disrupción total del centro Fe-S(46).

La inactivación de la aconitasa se ve fuertemente aumentada cuando se favorece la formación de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> y <sup>•</sup>NO simultáneamente produciendo también la nitración de la enzima(46-48).

La presencia de la aconitasa oxidada y nitrada en diversos modelos animales de sepsis, inflamación, envejecimiento y diabetes la revelan como un blanco preferencial de especies oxidantes.(49-52)

La aconitasa m eucariota evolucionó de su antecesor aconitasa B, enzima más sensible a los oxidantes que la aconitasa A que dio lugar a la aconitasa citosólica (IRP). Se ha postulado que la selección de una enzima altamente selectiva a oxidantes en la

mitocondria puede proporcionar algún tipo de mecanismo regulatorio sobre el flujo de electrones a la cadena respiratoria(53). Hasta el momento de iniciar este trabajo, no había evidencia experimental que apoyara esta hipótesis.

Por lo tanto, la inactivación de la aconitasa m por oxidantes podría proveer de un mecanismo de control del estrés oxidativo mitocondrial. La inhibición de la aconitasa m frenaría el ciclo de Krebs, disminuyendo el flujo de equivalentes de reducción que ingresan a la cadena respiratoria, reduciendo la formación de  $O_2^{\bullet-}$  por la misma, y frenando la propagación del estrés oxidativo. Al mismo tiempo, la acumulación de citrato, sustrato de la aconitasa m, contribuiría a la disminución del metabolismo mitocondrial aeróbico mediante la inhibición de la enzima glucolítica fosfofructoquinasa-1 y de la citrato sintasa, enzima del Krebs.(54, 55)

### ***El análisis del control metabólico (ACM)***

Desde fines de los noventa, se han desarrollado algunas teorías para analizar el comportamiento de sistemas metabólicos de manera sistémica, entre estos se encuentra el análisis del control metabólico(56). Esta aproximación fue formulada originalmente en los trabajos de Kacser y Burns 1973(57) y Heinrich y Rapoport 1974(58). Los postulados de este análisis se pueden resumir en las siguientes generalizaciones(56, 59):

- a) el control del flujo se distribuye en todos los componentes enzimáticos de la vía.
- b) varias enzimas pueden ejercer control significativo del flujo
- c) la distribución del control puede variar con el cambio del estado metabólico de la célula o por cambios en las condiciones del experimento.

Esta teoría considera los sistemas metabólicos como un todo, donde la respuesta del flujo original ( $\delta J$ ) a un pequeño cambio en la actividad de una enzima ( $\delta e$ ) será entonces consecuencia de todas las variaciones de las concentraciones de intermediarios. Esta respuesta puede ser cuantificada por el coeficiente de control del flujo, CCF(59, 60).

En general, las enzimas de una ruta están presentes en concentraciones mayores a las necesarias para satisfacer las demandas metabólicas. Como consecuencia una inhibición submáxima de la actividad enzimática no afecta la velocidad de todo el proceso metabólico hasta que se alcanza un nivel (umbral) de inhibición. Un concepto implícito en la existencia de los umbrales es el grado del control de la enzima sobre el proceso metabólico.(61, 62). Por ejemplo, para el caso de los complejos de la cadena respiratoria, los umbrales varían en los distintos tejidos, lo que se traduce en la disfunción tejido específica observada en las enfermedades mitocondriales (63) en las cuales la mutación de alguna proteína de un complejo respiratorio se manifiesta en una disfunción mitocondrial exclusivamente en determinado tejido.

Abordando un análisis de control metabólico, estudiamos como la actividad aconitasa m impacta sobre la respiración mitocondrial, determinado el coeficiente de control de flujo y el umbral necesario para alcanzar para este efecto. Con este abordaje se pretendió determinar el impacto de la inactivación de la aconitasa en la respiración y en la producción de oxidantes mitocondriales.

### ***Análisis de datos***

Todos los experimentos fueron realizados mínimo de 3 veces, los resultados mostrados en las imágenes corresponden a los más representativos. Se analizo con el estadístico test-t con un  $\alpha$  0.05 y P 0.05. Las graficas fueron realizadas utilizando OriginPro 8 (OriginLab Corporation).

# Objetivos

## ***Objetivo General***

Evaluar el rol de la aconitasa m como sensor mitocondrial de oxidantes mediante el abordaje de un estudio de análisis de control metabólico.

## ***Objetivos Específicos***

- 1) Medidas de la respiración en mitocondrias aisladas de diferentes órganos de rata en presencia de diferentes sustratos e inhibidores de la aconitasa (ej. fluorocitrato).
- 2) Determinar el coeficiente de control de flujo de la aconitasa m en diferentes tejidos en condiciones basales y de estrés oxidativo.
- 3) Evaluación de la relación entre la actividad aconitasa m, el potencial de membrana y la producción de ROS.

## **Materiales y Métodos**

### ***Purificación de mitocondrias de hígado, cerebro, corazón y riñón de rata.***

Las mitocondrias se obtuvieron a partir de los diferentes órganos (hígado, cerebro, corazón y riñón) de ratas Wistar macho adultos (aproximadamente 250 g). El protocolo utilizado fue aprobado por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal, CHEA, de la Facultad de Medicina de la Universidad de la República. Los animales fueron anestesiados con pentobarbital y sacrificados por dislocación cervical. Los órganos se extrajeron, se lavaron extensivamente con medio de purificación mitocondrial (MRM) y cortaron en fragmentos muy pequeños y estos fueron homogeneizados. El homogenizado se centrifuga a 1500g y el sobrenadante de esta centrifugación se centrifuga nuevamente a 12000 g, el pellet corresponde a la fracción enriquecida en mitocondrias, que se resuspende en un mínimo volumen en el medio de centrifugación con una concentración de 15-50 mg de proteínas/mL. Este protocolo se modificó en la purificación de las mitocondrias de hígado y de corazón, en Hígado el homogenizado obtenido del órgano se filtró con gasas y el sobrenadante luego de la centrifugación a 1500g también fue filtrado. En mitocondrias de corazón previo al homogenizado se trituró el órgano pasándolo por una picadora, luego se continuó con la purificación descrita previamente.

### ***Medidas del consumo de Oxígeno.***

El consumo de oxígeno se evaluó en preparaciones frescas de mitocondrias (0.01-0.05 mg/ml), con sustratos de los complejos mitocondriales. Para el Complejo I se utilizaron glutamato 10mM y malato 2mM, para el Complejo II se utilizó succinato 10 mM. En la evaluación de la respiración dependiente de la aconitasam se utilizaron como sustratos citrato 10 Mm y malato 2mM (64). Con cada uno de los sustratos utilizados se valoró la respiración en estado III y IV (altos niveles de ADP; bajos niveles de ADP, altos niveles de sustratos respectivamente). Para lograr el estado III se adicionó 1mM de ADP. En evaluar el efecto en la respiración mitocondrial dependiente de la actividad aconitasa se utilizó un inhibidor específico el fluorocitrato cuando las mitocondrias se

encontraban en estado III. Para corroborar si la respiración era aconitasa dependiente, luego de la inhibición se adicionó isocitrato 5 mM.

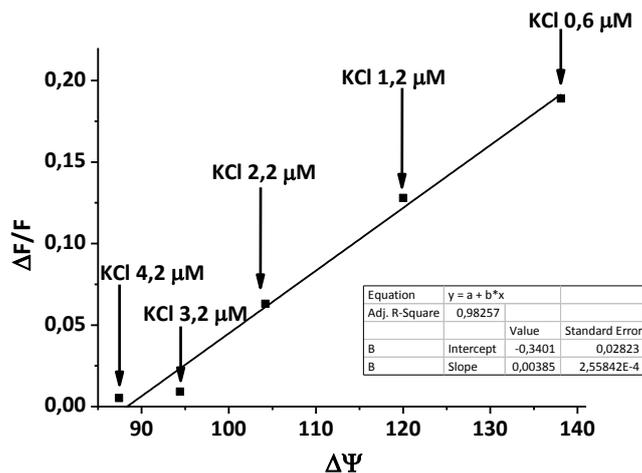
El consumo de oxígeno se valoró utilizando un oxímetro de alta resolución (Oxygraph 2K, Innsbruck, Austria). Los datos fueron tomados y analizados utilizando el software DatLab (Oroboros).

### ***Determinación del Potencial de Membrana.***

Se midió el potencial de membrana ( $\Delta\Psi$ ) mitocondrial con safranina *O* en las mitocondrias purificadas de los diferentes órganos en condiciones basales, y en los diferentes estados de respiración mitocondrial, para ello. las mitocondrias fueron purificadas en medio libre de potasio como se describe en (65)

Se valoró con los cambios de fluorescencia de la Safranina *O* (se utilizó una concentración de 5  $\mu\text{M}$ ), a una  $\lambda$  excitación de 486 nm y una  $\lambda$  emisión de 585 nm, todas las medidas se realizaron a 37°C como describen en (4, 65) utilizando un fluorímetro (FluoStar)

Para la determinación del  $\Delta\Psi$  se realizó una curva de calibración utilizando un gradiente de KCl (Figura 1). Se aplicó la ecuación de Nerst y asumimos que la concentración de  $\text{K}^+$  intramitocondrial es de 120mM(65, 66).



**Figura 3:** Curva de calibración en mitocondrias de Riñón de Rata. Donde  $\Delta F/F = ((F_{fccc} - F_{KCl}) / F_{fccc})$  y  $\Delta\Psi$  es potencial de membrana

En la grafica 3 se muestra una curva de calibración para poder determinar el potencial de membrana, donde F es la fluorescencia en presencia de FCCP y  $\Delta F$  son los cambios en florescencia correspondientes a las diferentes concentraciones de KCl.

$$\Delta\Psi = 60 \log \left[ \frac{K^+_{\text{intracelular}}}{K^+_{\text{extracelular}}} \right]$$

**Ecuación 1**, donde  $\Delta\Psi \sim 180$  mV es un  $\Delta pH \sim 0.5$  units

Con la ecuación 1 correspondiente a la ecuación de Nerst se determinó el potencial de membrana mitocondrial.

### **Actividad aconitasa.**

Se valoró la actividad aconitasa m por un ensayo directo en mitocondrias frescas sonicadas ( $15^{mg}/_{ml}$ ) se les adicono citrato y se siguió la formación del *cis*-aconitato, intermediario de la reacción de la aconitasa el cual tiene un máximo de absorbancia a 240nm (67) en 100mM Tris-HCl a pH=7.4.

Se midió la actividad luego de incubar las mitocondrias (previamente sonicadas) con concentraciones creciente de fluorocitrato (0-60  $\mu M$ ). Se determinó la concentración necesaria de fluorocitrato para inhibir un 50% la actividad aconitasa ( $IC_{50}$ ) ajustando las gráficas de actividad en función de concentración de fluorocitrato a una exponencial simple.

La actividad máxima de la aconitasa se determinó en preparados frescos de mitocondrias sonicadas de cada uno de los órganos, luego de incubar la muestra por 30 minutos en condiciones de hipoxia (2% O<sub>2</sub>) en una cámara hipoxica Coy Lab.

### ***Evaluación de la producción de peróxido de hidrogeno.***

La ROS primaria producida durante la respiración mitocondrial es O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, este radical en su dismutación genera H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (4). El Amplex Red es un sustrato no fluorescente que en presencia de peroxidasa y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es oxidado a una forma fluorescente ( $\lambda_{exc}$  = 515 nm y  $\lambda_{em}$  = 590 nm) y se utiliza como un método para la detección de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. (68)

Se evaluó la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en una suspensión de mitocondrias purificadas una concentración de 0.1 mg de proteína/ml en MRM 37 °C, en presencia de 0.5 U/ml de Peroxidasa, y sustratos citrato 10mM y malato 2mM. La formación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mitocondrial se evaluó en estado IV y en estado III de la respiración con 1mM ADP en presencia de Amplex Red (25µM), utilizando un el fluorímetro de placa (Fluostar).

En las mismas condiciones previamente mencionadas se les adiciono dos concentraciones de fluorocitrato con el fin de evaluar el efecto de la inhibición de la actividad aconitasa en la formación de O<sub>2</sub><sup>•-</sup>. Las concentraciones de fluorocitrato utilizadas son en la concentración determinada en el umbral y en el IC<sub>50</sub> como se indican en las figuras correspondientes

### ***Expresión de Aconitasa en los diferentes órganos de rata.***

Las proteínas mitocondriales (30 µg) de cerebro, corazón, hígado y riñón fueron separadas por una SDS-PAGE al 10%, y los niveles de aconitasa m en los diferentes tejidos fueron analizados por Western blot utilizando anticuerpo policlonal anti-acnitasa 2 de ABCAM (ab71440). Las proteínas fueron detectadas y analizadas por Odyssey Infrared Imaging System.

### ***Determinación del coeficiente de control de flujo y los umbrales respiratorios.***

En estudios del ACM se estudia el control relativo ejercido por cada uno de los pasos (reacciones enzimáticas) en las variables del sistema (flujos y las concentraciones de metabolitos). Este control se mide mediante la aplicación de una perturbación mientras se mide o estudia el efecto en la variable de interés después de que el sistema ha alcanzado un nuevo estado estacionario.

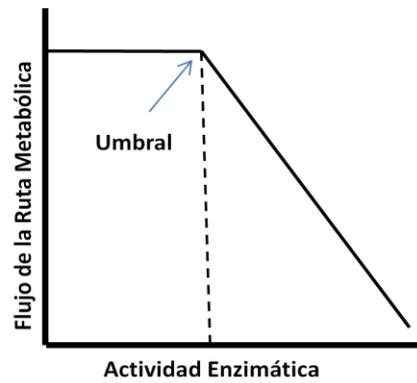
Con el fin de realizar un análisis de control metabólico de los efectos de la actividad aconitasa en la respiración mitocondrial, determinó la respiración citrato dependiente frente a agregados de fluorocitrato (las concentraciones utilizadas fueron previamente seleccionadas al medir actividad aconitasa) en estado III. Los valores de velocidad de consumo de oxígeno fueron utilizados para obtener las gráficas de respiración en función de la actividad aconitasa donde se puede determinar el coeficiente de control de flujo, un índice de contribución de la enzima al flujo de control en toda la vía. El coeficiente de control de flujo se determinó de acuerdo a la teoría de control metabólico (61).

$$C_J^I = \frac{\frac{dJ_{O_2}}{d(\text{Inhibidor})}}{\frac{dV_c}{d(\text{Inhibidor})}} \quad \text{Ecuación 2}$$

En la ecuación 2 se muestra como se determina el coeficiente de control de flujo donde se relaciona pequeñas variaciones del flujo metabólico (menos del 10% de efecto en la actividad metabólica) con respecto a la inhibición de la actividad enzimática

Como también poder determinar el umbral de inhibición el cual es un parámetro que nos indica cuanta enzima debe de estar inhibida para apreciar un efecto en la

respiración mitocondrial. El umbral se obtiene del grafico del flujo de la ruta metabólica, en este caso se evalúa el consumo de oxígeno por parte de las mitocondrias en función de la actividad enzimática, la aconitasa m. (Figura 3)



**Figura 3:** Determinación del umbral, donde se relaciona el flujo metabólico con la actividad enzimática

# Resultados

## Medidas de la actividad Aconitasa

### Titulación con fluorocitrato.

Con el fin de realizar un análisis de control metabólico se evaluó el impacto que tiene la inhibición de la aconitasa (con un inhibidor específico como es el fluorocitrato) sobre la respiración mitocondrial en distintos órganos de rata. La actividad de la enzima se realizó en mitocondrias rotas por sonicación y a una concentración de  $15 \text{ mg/ml}$ , mediante un ensayo directo siguiendo la aparición del *cis*-aconitato ( $240 \text{ nm}$ ).

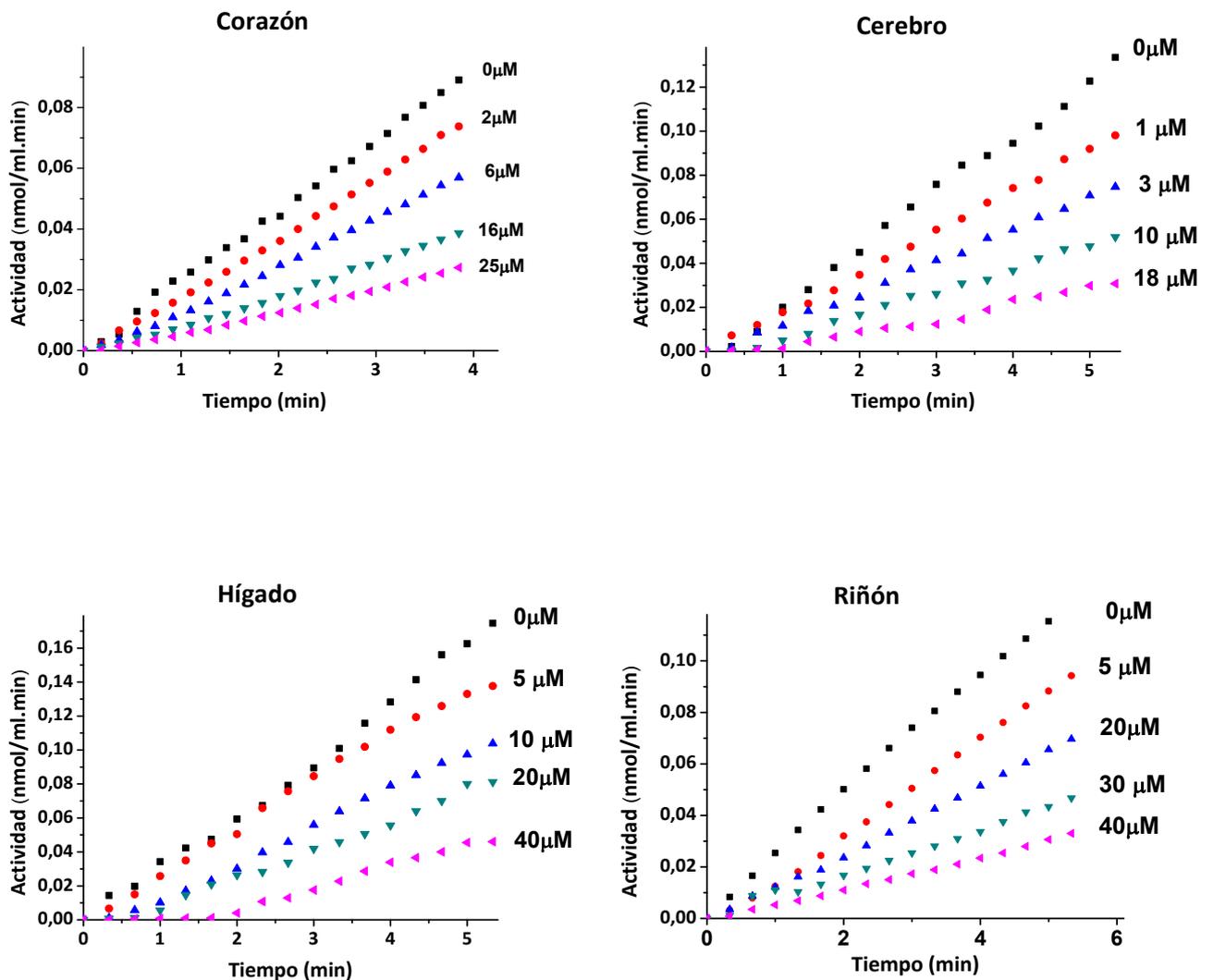
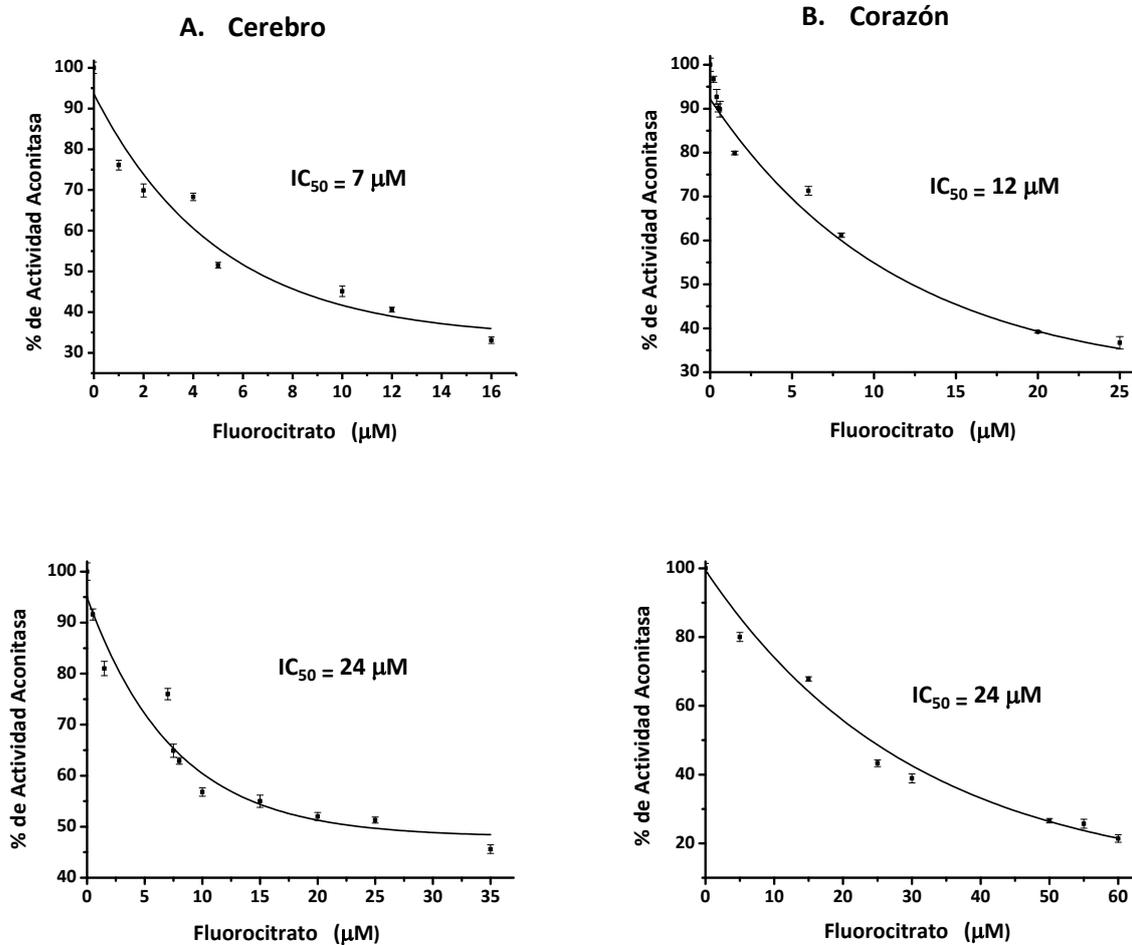


Figura 4: Actividad aconitasa de mitocondrias de corazón, cerebro, hígado y riñón, en todos los órganos se la concentración de proteínas fue de  $15 \text{ mg/ml}$ . Utilizando como inhibidor específico como el fluorocitrato, a concentraciones crecientes.

La figura 4 se muestra la actividad aconitasa en mitocondrias de rotas de corazón, cerebro, hígado y riñón, que a concentraciones crecientes de fluorocitrato (0-40  $\mu\text{M}$ ) la pendiente de la gráfica disminuye indicando una menor actividad de la enzima. Se puede observar la diferente sensibilidad frente al inhibidor de los órganos, siendo los más sensibles el corazón y el cerebro.

De esta manera se evaluó en los diferentes órganos con diferente perfil metabólico como son el cerebro, corazón, hígado y riñón, y su respuesta frente al inhibidor específico como el fluorocitrato. De cada titulación se determinó  $\text{IC}_{50}$  que es la concentración de un inhibidor requerida para reducir a la mitad la actividad de la proteína en estudio. Figura 5.



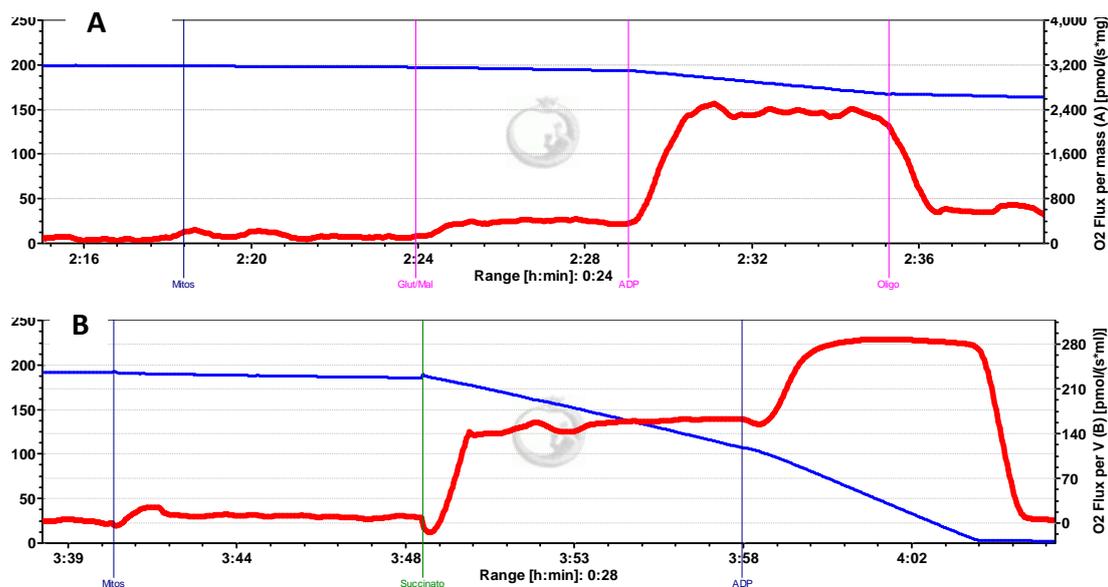
**Figura 5: Titulación con Fluorocitrato de la Actividad Aconitasa en todos los órganos.** Se grafica el porcentaje de actividad aconitasa frente a las diferentes concentraciones del

En la figura 5 se muestra la titulación de la actividad aconitasa, expresada en porcentaje, en mitocondrias aisladas con un inhibidor específico el Fluorocitrato. En cada grafica se observa un descenso exponencial de la actividad en respuesta al inhibidor, mediante un ajuste exponencial simple a cada grafico se determino el  $IC_{50}$  (concentraciones necesarias para inhibir la actividad de la enzima un 50%). Se obtuvo un  $IC_{50}$  de 7  $\mu$ M para la actividad aconitasa de mitocondrias de cerebro,  $IC_{50}$  de 12 $\mu$ M para la actividad aconitasa de mitocondrias de corazón,  $IC_{50}$  de 24 $\mu$ M para la actividad aconitasa de mitocondrias de hígado y un  $IC_{50}$  de 24 $\mu$ M para la actividad aconitasa de mitocondrias de riñón.

Con estos resultados observamos que las enzimas correspondientes a las mitocondrias de cerebro y corazón son las más sensibles frente al inhibidor.

### ***Medida de la respiración mitocondrial***

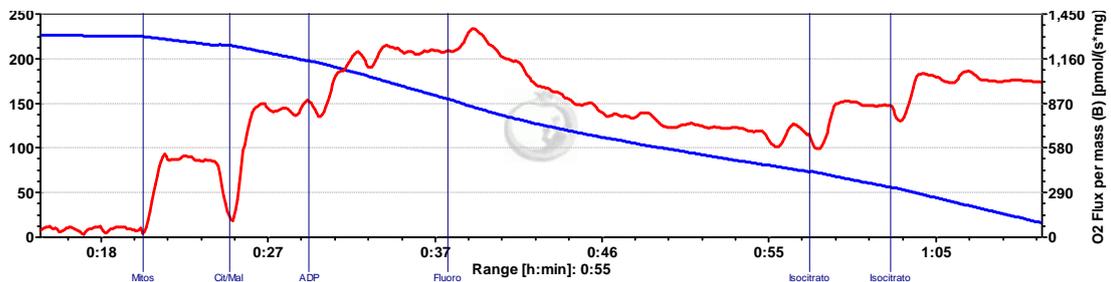
Para evaluar la respiración mitocondrial, se evaluó el consumo de oxígeno con un oxímetro de alta resolución como se detalló en la sección materiales y métodos. En cada purificación se realizó un control del funcionamiento de la cadena respiratorio y el grado de acoplamiento. Se trabajo con mitocondrias acopladas utilizando como parámetro el indice de control respiratorio RCR, la velocidad de consumo de oxígeno por las mitocondrias es lenta hasta que se añade ADP, entonces el oxígeno se consume rápidamente hasta que todo el ADP ha sido fosforilado, y en este punto, la velocidad del consumo de oxígeno disminuye nuevamente. El consumo rápido de oxígeno en presencia de ADP fue denominado estado 3 por Chance y Williams y la etapa en la cual el ADP ha sido agotado, se ha llamado estado 4. La relación de la velocidad de consumo del estado 3 sobre el estado 4 se denomina relación de control respiratorio (RCR) y proporciona una medida de la integridad de las mitocondrias y su capacidad de acoplamiento. Una relación de 1 ocurre en mitocondrias no acopladas, relaciones mayores a 2.5 indican acoplamiento(69). (RCR para ambos complejos mayor a 3).



**Figura 6:** Evaluación del consumo de oxígeno en mitocondrias purificadas de corazón, utilizando sustratos para el complejo I (<sup>glutamato 10mM</sup>/<sub>malato 2mM</sub>), **A** y utilizando succinato para el complejo II (10mM), **B**

En la figura 6 se muestra la evaluación de la respiración de mitocondrias intactas purificadas de corazón de rata. En este se observan dos trazados: una línea azul que corresponde a la concentración de O<sub>2</sub> en el medio. El trazado en rojo corresponde al flujo de oxígeno. Las líneas verticales que cortan ambos ejes son las diferentes sustancias que se les va agregando al experimento. Al comienzo de la corrida no hay consumo de oxígeno, luego se agregan mitocondrias a una concentración de 2 mg/ml, donde no se evidencia consumo de oxígeno muy bajo dependiente de sustratos endógenos. Luego se agrega glutamato 10mM-malato 2mM (se muestra en el gráfico Glu/Mal, figura 6A) donde podemos evidenciar un aumento del consumo de oxígeno, el cual es más evidente en el trazado correspondiente al flujo de oxígeno (en rojo), lo cual corresponde al estado 4. Estos sustratos se utilizan para evaluar principalmente el complejo I de la cadena respiratoria y terminan formando NADH. Luego se agrega ADP a 0.1mM y es notoria el gran consumo de oxígeno, ya que se aprecia un descenso en el trazado de la concentración de O<sub>2</sub> (línea azul) y un gran aumento del flujo de O<sub>2</sub>, lo cual corresponde al estado 3. En la figura 6 B se utilizó como sustrato el succinato para

evaluar el complejo II de la cadena respiratoria, en este caso luego del agregado del ADP, se observa un aumento del consumo de oxígeno, hasta que el oxígeno se agota. En todos los órganos evaluados que se purificaron mitocondrias en donde se controlaba la respiración y el grado de acoplamiento del complejo I y el complejo II, se trabajó con mitocondrias con un RCR mayor a 3 para ambos complejos.

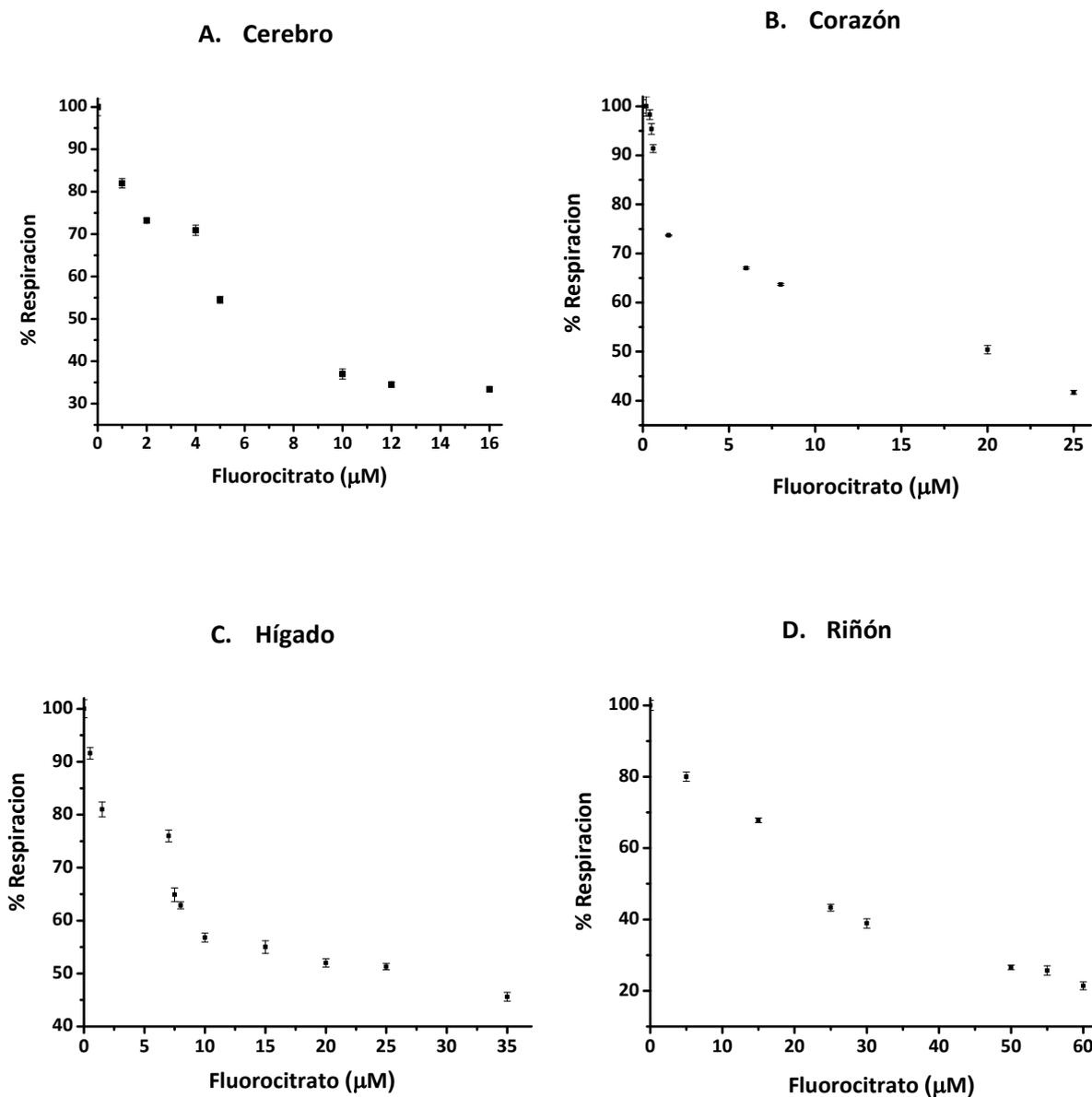


**Figura 7:** Evaluación del consumo de oxígeno utilizando citrato/malato sustratos de la aconitasa en mitocondrias purificadas de corazón.

Luego de controladas, las mitocondrias el (grado de acoplamiento para los complejos I y II) se evaluó la respiración utilizando como sustratos la mezcla de citrato - malato, de este manera la respiración mitocondrial se realizaba a partir del NADH generado en el ciclo de Krebs luego de la reacción catalizada por la aconitasa (figura 7), con las concentraciones tituladas de fluorocitrato de la actividad aconitasa de la figura 5. Se evaluó el efecto de la inhibición en la respiración mitocondrial citrato dependiente. En la figura 7 se muestra el consumo y flujo de oxígeno en mitocondrias de corazón de rata donde con el sustrato citrato/malato vemos como hay un consumo de oxígeno y un aumento del flujo de oxígeno y como en presencia del inhibidor de la aconitasa el fluorocitrato este consumo disminuye que luego es revertido cuando se le agrega el Isocitrato para que continúe el ciclo de Krebs.

### Efecto de la inhibición de la actividad aconitasa en la respiración mitocondrial.

Se evaluó el efecto de la inhibición de la actividad aconitasa en la respiración mitocondrial citrato dependiente.



**Figura 8:** Efecto de la inhibición de la actividad aconitasa en la respiración mitocondrial. A. Porcentaje de respiración en mitocondrias de cerebro de rata en función de concentraciones crecientes del inhibidor. B. Porcentaje de respiración en mitocondrias de corazón de rata en función de concentraciones crecientes del inhibidor. C. Porcentaje de respiración en mitocondrias de Hígado de rata en función de concentraciones crecientes del inhibidor. D. Porcentaje de respiración en mitocondrias de Riñón de rata en función de concentraciones crecientes del inhibidor.

En la figura 8 se relaciona el porcentaje de respiración en función de concentraciones creciente de inhibidor. Los órganos más sensibles al fluorocitrato son el cerebro y el corazón ya que rápidamente disminuye el porcentaje de respiración a bajas concentraciones del inhibidor.

### ***Determinación de umbrales y coeficientes de control de flujo.***

Se determinaron los coeficientes de control de flujo; ( $C_f^I$ , CCF) según (70).

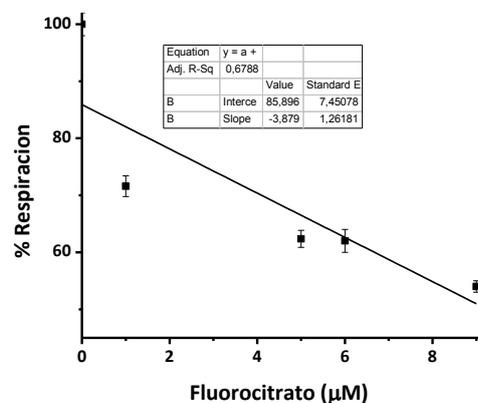
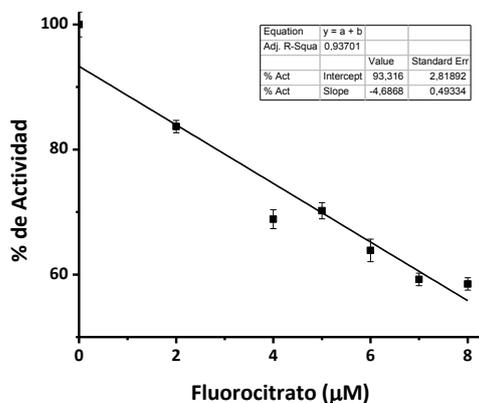
Se eligieron los primeros puntos en que baja la respiración y la actividad aproximadamente un descenso del 10%, utilizando un inhibidor específico como es el fluorocitrato, para la aconitasa mitocondrial.

Luego de elegido esos puntos se grafica el porcentaje de actividad con respecto al inhibidor y hallo la recta que mejor se ajusta y determinamos la pendiente. Hago los mismos para la respiración (vía metabólica que se quiere estudiar), y obtengo la pendiente.

El coeficiente de control de flujo sería la relación entre la pendiente de la respiración y la pendiente obtenida en la actividad. (Ver sección Materiales y Métodos)

### **Determinación del coeficiente de control de flujo.**

#### **Corazón**

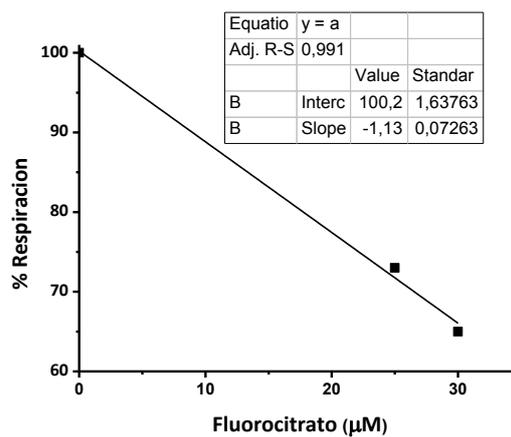
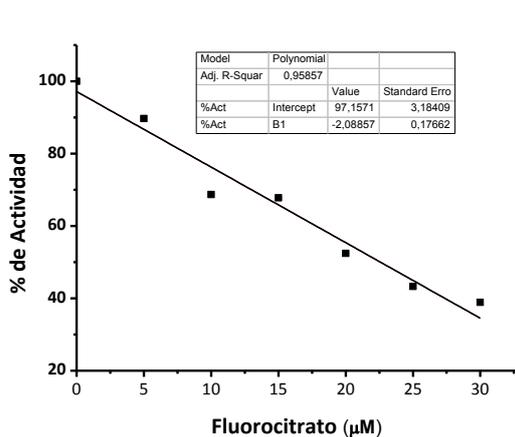


En la grafica de % de Actividad obtuve una pendiente de -4.6868. En el grafico de % de Respiración se obtuvo una pendiente de -3.879.

Por lo tanto el CCF = 0.83.

El coeficiente de control de flujo para mitocondrias de corazón tiene un valor de 0.83, lo que indica que la aconitasa mitocondrial ejerce un gran control metabólico en la respiración mitocondrial citrato dependiente.

### Riñón

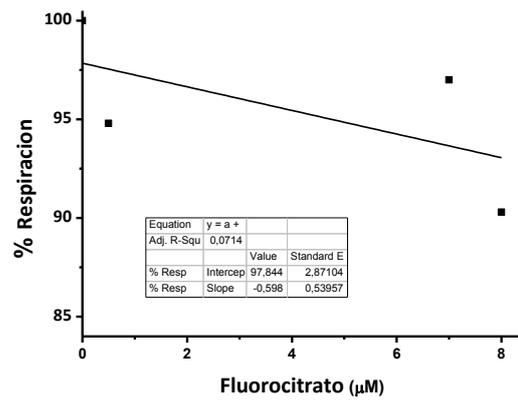
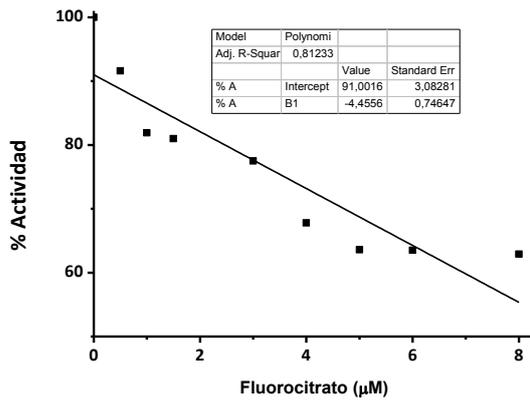


En la grafica de % de Actividad obtuve una pendiente de -2.08857. En el grafico de % de Respiración se obtuvo una pendiente de -1.138.

Por lo tanto el CCF = 0.54.

En mitocondrias de Riñón se obtuvo un coeficiente de control de flujo de 0.54, esto indica que la aconitasa mitocondrial no ejerce un gran control metabólico en la respiración citrato dependiente.

## Hígado

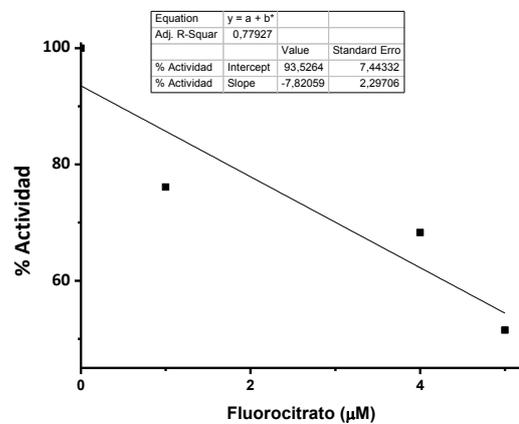
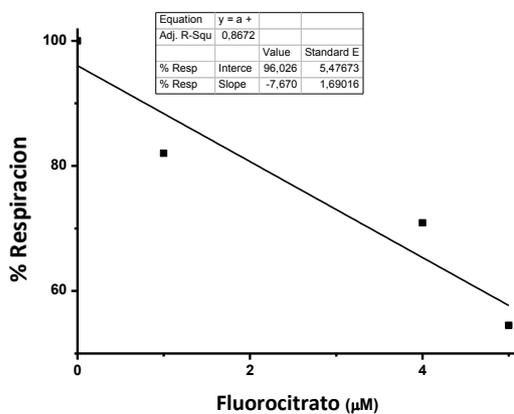


En la grafica de % de Actividad obtuve una pendiente de -4.45569. En el grafico de % de Respiración se obtuvo una pendiente de -0.5985.

$CCF = -0.5985 / -4.45569 = 0.1343$ .

En mitocondrias de hígado se obtuvo un coeficiente de control de flujo de 0.13 lo cual nos indica que la aconitasa no ejerce ningún control metabólico en la respiración mitocondrial.

## Cerebro



En la grafica de % de Actividad obtuve una pendiente de -7.82059. En el grafico de % de Respiración se obtuvo una pendiente de -7.6705.

CCF= -0.98

En mitocondrias de cerebro se obtuvo un coeficiente de control de flujo de 0.98 es el valor más próximo a 1, lo que indica que la aconitasa mitocondrial en este órgano ejerce una gran control metabólico en la respiración citrato dependiente.

En la tabla 1 se muestra los coeficientes de control de flujo obtenidos en cada órgano.

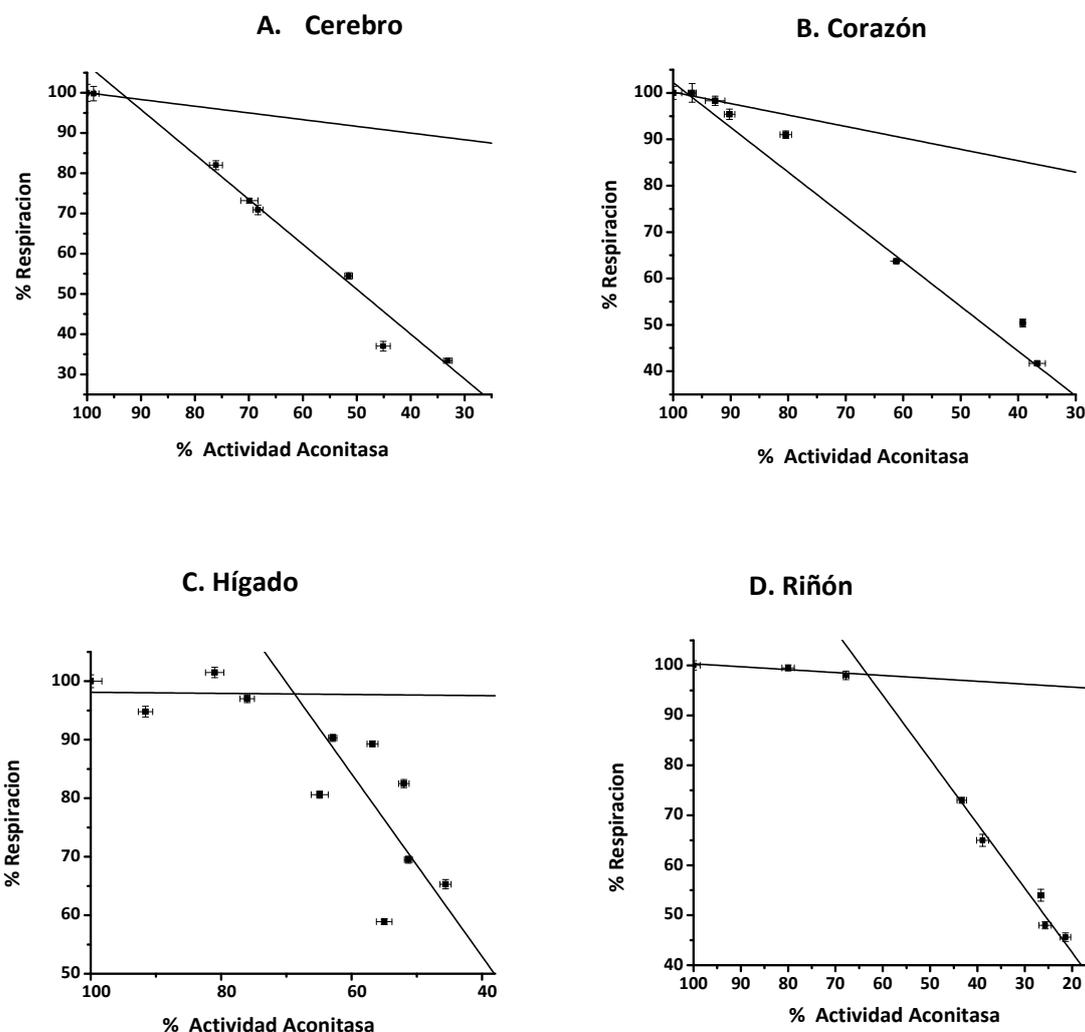
<b>Órgano</b>	<b>Coefficiente de Control</b>
Cerebro	$0.98 \pm 0.023$
Corazón	$0.8 \pm 0.015$
Hígado	$0.13 \pm 0.008$
Riñón	$0.54 \pm 0.018$

**Tabla 1:** se muestran los coeficientes de control de flujo de los diferentes órganos.

En tabla 1 muestran los coeficientes de control de flujo obtenidos de los diferentes órganos donde se obtuvo los siguientes valores: Cerebro de 0.98, Corazón 0.8, Hígado 0.13, Riñón 0.54.

Esto indica que en cerebro y corazón la actividad aconitasa ejerce un gran control en la respiración mitocondrial citrato dependiente. En mitocondrias de Hígado es donde se obtuvo el menor coeficiente de control de flujo siendo de 0.13.

## Determinación de los Umbrales



**Figura 9:** Determinación de los umbrales en mitocondrias de Cerebro, Corazón, Hígado y Riñón de rata. Se relacionan las graficas de % de respiración y % de actividad. A. Umbral de inhibición en mitocondrias de Cerebro donde se obtuvo 95%. B. Umbral de inhibición en mitocondrias de Corazón donde se obtuvo 98%. C. Umbral de inhibición en mitocondrias de Hígado donde se obtuvo 69%. D. Umbral de inhibición en mitocondrias de Riñón donde se obtuvo 63%.

En la figura 9 se muestran las curvas de umbral de los diferentes tejidos analizados, se pueden distinguir dos tipos distintos de comportamiento como se informó anteriormente (70). En un tipo de gráfico se aprecia una meseta que es seguida por una disminución del flujo de oxígeno esto se observa en hígado (Figura 9 C) y el riñón (Figura 9 D), donde se obtuvieron umbral de 69% y 63% respectivamente.

Otro tipo de gráfico que se obtuvo es donde la meseta no es evidente, que es lo que se obtuvo para las mitocondrias de corazón (Figura 9 B) y el cerebro (Figura 9 A) donde los umbrales dieron valores de 98% y 95% respectivamente. Lo que indica que solo inhibiendo un 2% la actividad aconitasa en corazón y un 5% de la actividad en cerebro ya se pueden apreciar efectos en la respiración mitocondrial.

Estos resultados concuerdan con los valores de los coeficientes de control de flujo, los órganos con mayor CCF fueron cerebro y corazón así como también se obtuvo mayor umbral, lo que nos da la pauta que son los órganos en los cuales la actividad aconitasa regula la cadena respiratoria así como también es la más sensible a los efectos de la respiración.

Aunque la aconitasa no se considera que sea una enzima limitante de la velocidad en el ciclo del ácido cítrico, su inhibición podría afectar la generación de NADH por el ciclo de Krebs, así como también el suministro de electrones a la cadena de transporte como se prevé por el coeficiente de control de flujo obtenidos, especialmente para el cerebro y el corazón.

### ***Determinación de Potencial de Membrana***

Se evaluó el potencial de membrana ( $\Delta\Psi$ ) mitocondrial utilizando safranina O como se describió en materiales y métodos, en una suspensión de mitocondrias purificadas en diferentes condiciones: en **MRM** (medio de respiración mitocondrial), **M+C** (malato y citrato), **M+C+A** (malato, citrato, ADP), **M+C+I<sub>u</sub>** (malato, citrato, la aconitasa inhibida a una concentración umbral), **M+C+I<sub>50%</sub>** (malato, citrato, la aconitasa inhibida al 50% de su actividad).

Para la determinación del  $\Delta\Psi$  se realizó una curva de calibración utilizando un distintas concentraciones de KCl. Se aplicó la ecuación de Nerst y asumimos que la concentración de  $K^+$  intramitocondrial es de 120mM como fuera reportado previamente (65, 66).

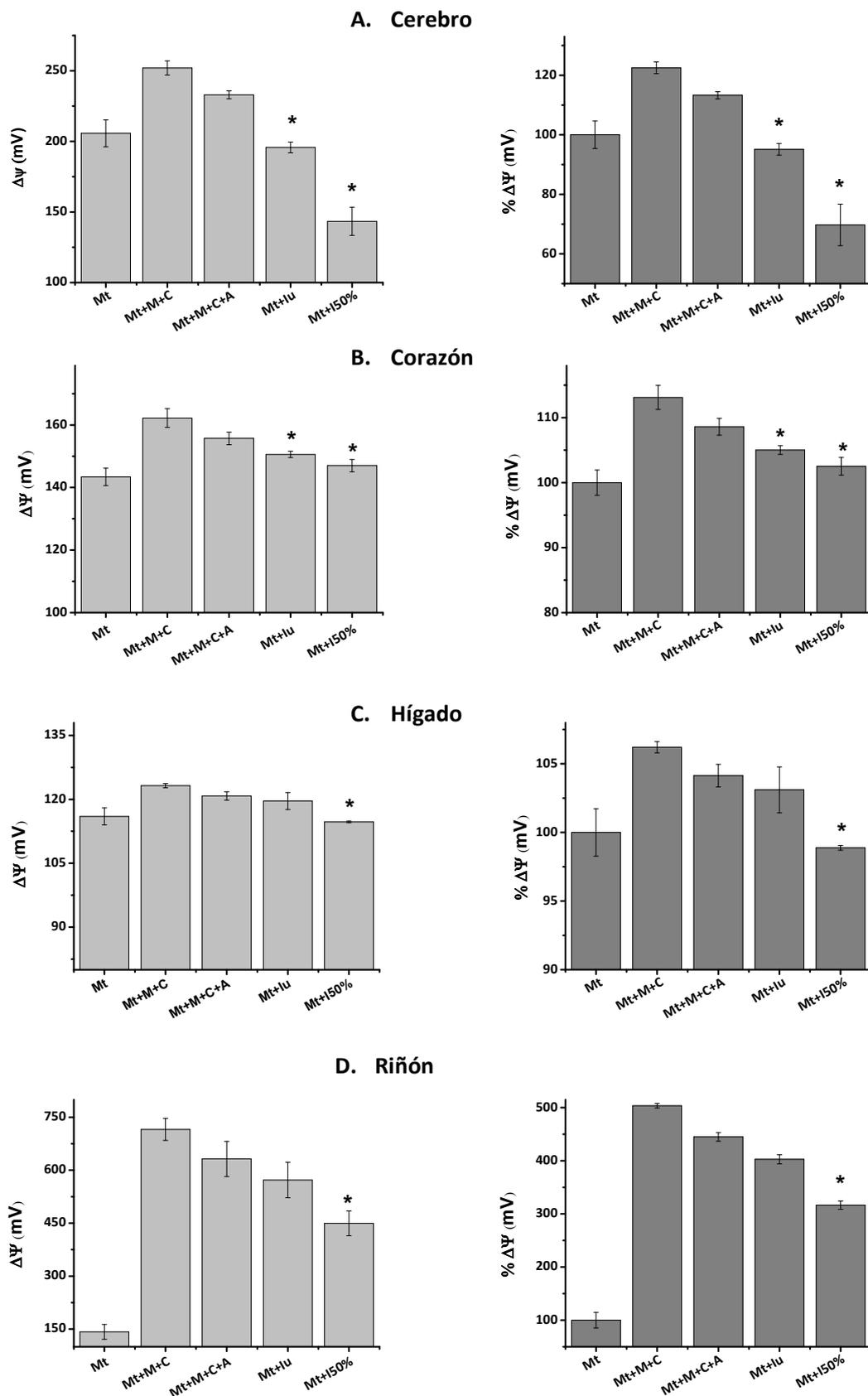


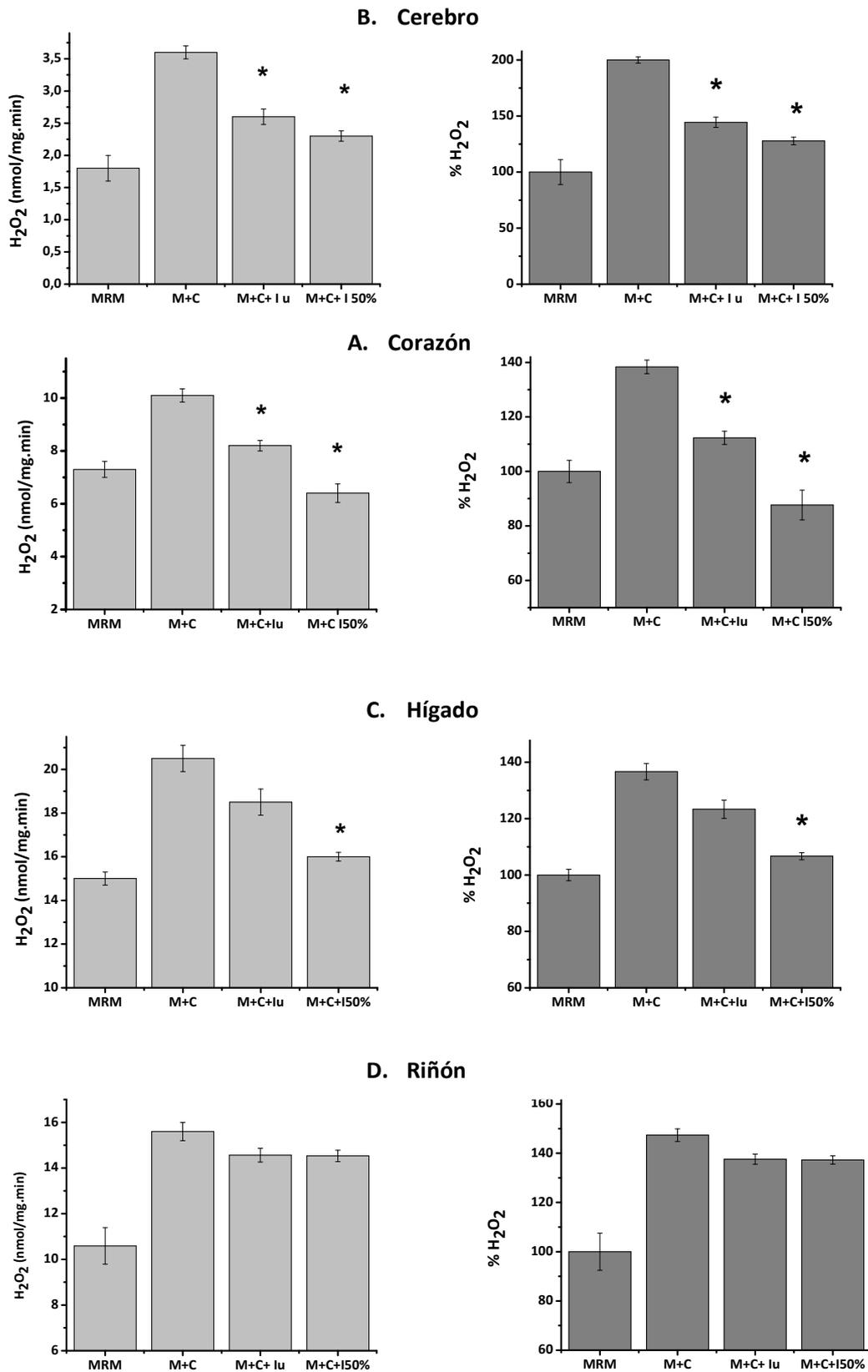
Figura 10: Determinación de los potenciales de Membrana. El potencial de membrana disminuye cuando la aconitasa se encuentra inhibida. El lado izquierdo de cada imagen corresponde a los valores de potencial en cada condición, del lado derecho las graficas corresponden al porcentaje del potencial. A. Potencial de membrana en mitocondrias de cerebro..B. Potencial de membrana en mitocondrias de corazón. C. Potencial de membrana en mitocondrias de Hígado. D. Potencial de membrana en mitocondrias de Riñón.

El potencial de membrana aumenta en todos los órganos en presencia de sustrato (citrato y el malato), en presencia de ADP este potencial se disipa disminuyendo su valor como se muestra en la figura 10. En los órganos como el cerebro y el corazón el  $\Delta\Psi$  disminuye significativamente cuando la aconitasa es inhibida en el umbral, esto no sucede en órganos como el hígado y el riñón. En todos los órganos cuando la aconitasa es inhibida un 50% de su actividad disminuye el  $\Delta\Psi$ .

Estos resultados concuerdan con los obtenidos previamente en el coeficiente de control de flujo y los umbrales, en mitocondrias de cerebro y corazón son los que tienen mayor CCF, esto puede significar que esta la aconitasa regula el flujo de la cadena respiratoria provocando que se disipe el potencial de membrana.

### ***Producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mitocondrial, efecto de la inhibición de la aconitasa.***

Dado que la formación de ROS mitocondrial aumenta cuando los complejos de la membrana mitocondrial interna están mayoritariamente reducidos, lo que lleva a una hiperpolarización mitocondrial, se midió la formación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en mitocondrias aisladas en presencia de fluorocitrato(4). Se utilizó un método fluorescente como se explicara en la sección materiales y métodos. Se evaluó la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en una suspensión de mitocondrias purificadas en diferentes condiciones: en **MRM** (medio de respiración mitocondrial), **M+C** (malato y citrato), **M+C+Iu** (malato, citrato, la aconitasa inhibida a una concentración umbral), **M+C+I<sub>50%</sub>** (malato, citrato, la aconitasa inhibida al 50% de su actividad). Todas las medidas se realizaron en Amplex Red (25μM) y en presencia de de 0.5 U/ml de Peroxidasa.



**Figura 11: La inhibición de la actividad lleva a una disminución de la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en mitocondrias de Corazón de rata.** El flujo de peróxido de hidrogeno se midió en un suspensión de de mitocondrias donde se siguió la oxidación del Amplex Red. El lado izquierdo de cada imagen corresponde a los flujos de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con respecto a cada condición, del lado derecho las graficas corresponden al porcentaje de formación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A. Formación H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en mitocondrias de Cerebro. B. Formación H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en mitocondrias de Corazón. C. Formación H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en mitocondrias de Hígado. D. Formación H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en mitocondrias de Riñón. \*p < 0.05 respecto a la condición con Malato y Citrato.

En la figura 11 A se muestra la producción de peróxido  $H_2O_2$  (nmol/mg.min) en mitocondrias de cerebro. El flujo de peróxido de hidrogeno se midió en medio de respiración mitocondrial (MRM) siendo de  $1.8 \pm 0.2$  nmol/mg.min. En presencia de malato y citrato (M+C) aumenta a  $3.6 \pm 0.1$  nmol/mg.min y con fluorocitrato a concentraciones donde se observa el umbral de inhibición (M+C+I u) disminuye significativamente a  $2.6 \pm 0.12$  nmol/mg.min; y  $2.3 \pm 0.08$  nmol/mg.min cuando se utilizó una concentración de fluorocitrato que inhibió 50% la actividad aconitasa.

En la figura 11 B se muestra la producción de peróxido  $H_2O_2$  (nmol/mg.min) en mitocondrias de corazón. El flujo de peróxido de hidrogeno observado es mayor y la disminución observada al inhibir la aconitasa es estadísticamente significativa ((MRM)  $7.3 \pm 0.3$  nmol/mg.min, (M+C)  $10.1 \pm 0.25$  nmol/mg.min, (M+C+I u)  $8.2 \pm 0.2$  nmol/mg.min; (M+C+I50%)  $6.4 \pm 0.35$  nmol/mg.min.

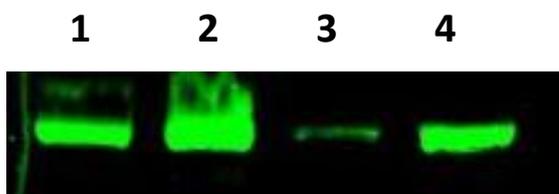
De la misma forma se evaluó la producción de peróxido  $H_2O_2$  en mitocondrias de hígado y riñón, mostrándose los resultados en las Figuras 11C y D respectivamente. El hígado fue el órgano dónde se evidenció la mayor producción de  $H_2O_2$  en condiciones basales y luego de agregado los sustratos ( $15 \pm 0.3$  nmol/mg.min, y  $20.5 \pm 0.6$  nmol/mg.min). La presencia de fluorocitrato que produce una inhibición del 50% de la aconitasa, inhibe significativamente el flujo de  $H_2O_2$  detectado. Sin embargo, la inhibición de la aconitasa no tuvo efecto en el flujo de  $H_2O_2$  en las mitocondrias de riñón (Figura 11D).

La producción de  $H_2O_2$  y  $O_2^{\bullet -}$  en la mitocondria aumentan cuando la cadena respiratoria tiene abundantes sustratos y la membrana mitocondrial interna se encuentra hiperpolarizada (11). En los órganos como el cerebro y el corazón el flujo de  $H_2O_2$  disminuye significativamente cuando la aconitasa es inhibida en el umbral, esto no sucede en órganos como el hígado y el riñón..

Estos resultados concuerdan con los obtenidos previamente en el coeficiente de control de flujo y los umbrales, en mitocondrias de cerebro y corazón son los que tienen mayor CCF, esto puede significar que esta la aconitasa regula el flujo de la cadena respiratoria provocando una disminución de las ROS.

### **Medidas de la expresión de la Aconitasa**

Se evaluó por western blot la expresión de la aconitasa en mitocondrias de los diferentes órganos.

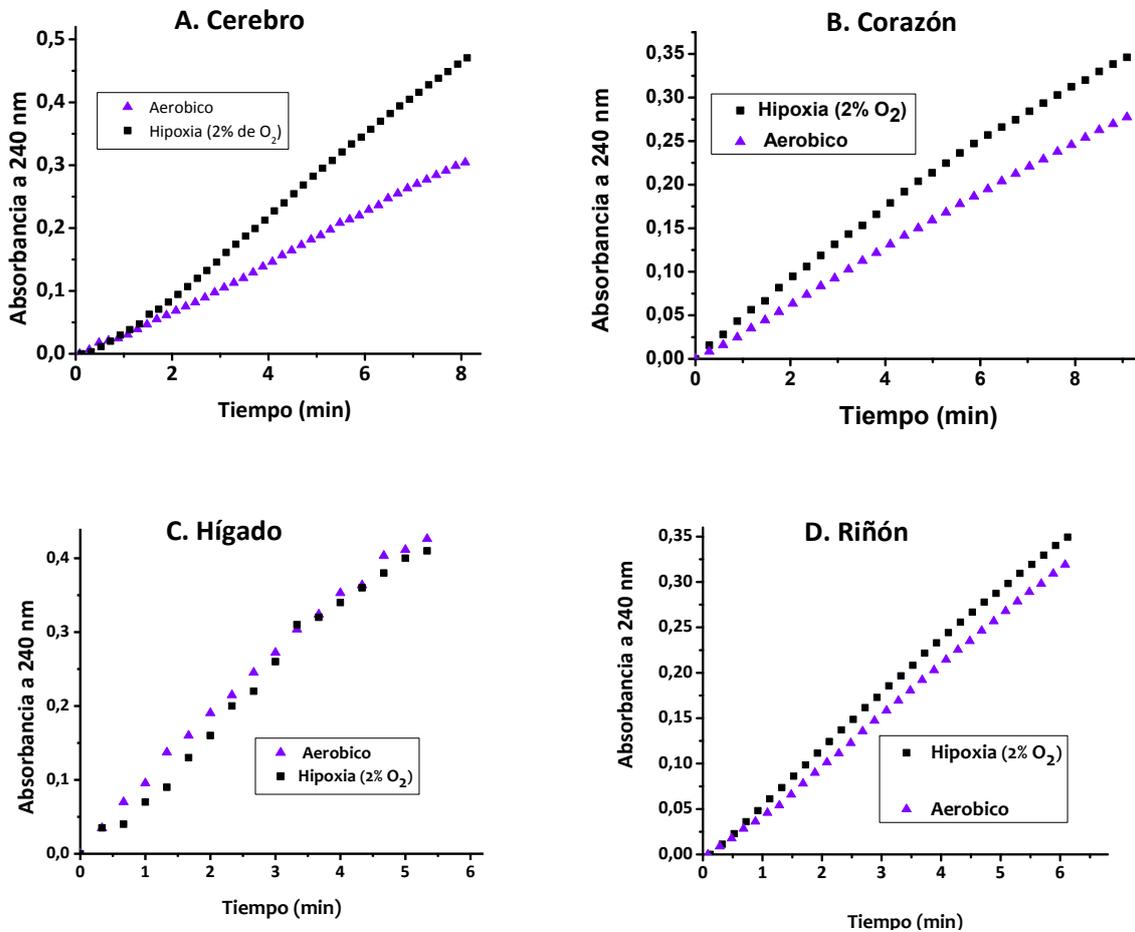


**Figura 12: Comparación de los niveles de aconitasa en fracciones enriquecidas en mitocondrias aisladas de Cerebro, Corazón, Hígado y Riñón en fracciones enriquecidas en mitocondrias.** Muestras conteniendo 30  $\mu\text{g}$  de proteína fueron corridas en geles de poliacrilamida al 10% en condiciones desnaturalizantes y se realizó ensayo de Western blot anti-aconitasa. **Carril 1**, Fracción enriquecida en mitocondrias de Cerebro. **Carril 2**, Fracción enriquecida en mitocondrias de Corazón. **Carril 3** Fracción enriquecida en mitocondrias de Hígado. **Carril 4**, fracción enriquecida en mitocondrias de Riñón.

Como se describió en materiales y métodos se utilizó anticuerpo específico para la aconitasa mitocondrial. Se realizó un western blot para evaluar la expresión de la enzima aconitasa en los diferentes órganos, en la figura 12 se muestra la expresión de la actividad aconitasa donde en el carril 1 se corrió una fracción enriquecida en mitocondrias de Cerebro. En el carril 2, una fracción enriquecida en mitocondrias de Corazón, en el carril 3 Fracción enriquecida en mitocondrias de Hígado y en el carril 4, fracción enriquecida en mitocondrias de Riñón.

Se puede apreciar que el órgano que tiene mayor expresión es en corazón, luego le sigue el cerebro y el riñón que aparentan tener la misma expresión de enzima, sin embargo en cerebro se observa una mayor actividad específica, como se mencionó previamente una fracción de la aconitasa se encuentra inactiva en condiciones basales y refleja la formación de  $\text{O}_2^-$  (44).

## Reactivación de Aconitasa.



**Figura 13: Actividad aconitasa en presencia y ausencia de O<sub>2</sub>:** Cálculo de las actividades específicas en mitocondrias aisladas de los diferentes órganos en presencia de 21% de O<sub>2</sub> y en condiciones de Hipoxia al 2% de O<sub>2</sub>. \* Estadísticamente significativo test de student-Newman-Keuls p<0,05

En la figura 13 se muestra las actividades de la aconitasa mitocondrial en los diferentes órganos en presencia de O<sub>2</sub> (21%) y en condiciones de Hipoxia 2%. En la figura 13 A y 13 B se pueden apreciar que en condiciones de Hipoxia se logra mayor actividad aconitasa siendo en los órganos como en el cerebro y corazón, donde la enzima ejerce un gran control metabólico en la respiración citrato dependiente. En la figuras 13 C y

13 D, las cuales corresponden a mitocondrias de Hígado y Riñón no se observa diferencias en la actividad aconitasa en presencia O<sub>2</sub> y en hipoxia.

En la tabla 2 se realizó el cálculo de las actividades específicas de la actividad aconitasa en mitocondrias aisladas de cada órgano en presencia O<sub>2</sub> y en hipoxia. Para lograr las condiciones de hipoxia se incubo durante 1 hr en una cámara hipoxica.

	AE (mU/mg) 21% O <sub>2</sub>	AE (mU/mg) 2% O <sub>2</sub>
<b>Riñón</b>	321 ± 25	307 ± 30
<b>Cerebro</b>	115 ± 15	163 ± 12 *
<b>Corazón</b>	296±13	334±14 *
<b>Hígado</b>	59,2 ± 3	55 ± 7

**Tabla 2: Actividades específicas:** Calculo de las actividades específicas en mitocondrias aisladas de los diferentes órganos en presencia de 21% de O<sub>2</sub> y en condiciones de Hipoxia al 2% de O<sub>2</sub>. \* Estadísticamente significativo test de student-Newman-Keuls p<0,05

En la tabla 2 se muestran los valores de las actividades específicas de las mitocondrias en los diferentes órganos en condiciones de 21% O<sub>2</sub> y en condiciones de Hipoxia. Se destaca las diferencias de la actividad en cerebro y corazón.

En cerebro la actividad específica en condiciones de normoxia es de 115 ± 15mU/mg y en condiciones de hipoxia 163 ± 12 mU/mg, se destaca el gran aumento de la actividad específica en condiciones de hipoxia. Otro órgano que es significativo el cambio en la actividad específica es en corazón en condiciones de O<sub>2</sub> al 21% la actividad específica de 296±13 mU/mg y en condiciones de hipoxia al 2% la actividad específica es de 334±14 mU/mg.

En mitocondrias de hígado y riñón no hay cambio significativo en la actividad específica en condiciones de normoxia e hipoxia.

## Discusión.

Se realizó un análisis de control metabólico para evaluar el rol de la aconitasa m sobre el ciclo de Krebs y la respiración mitocondrial. Pudimos comprobar que la inhibición de la aconitasa puede provocar un impacto en el metabolismo mitocondrial disminuyendo el ingreso de equivalente reductores a la cadena de transporte de electrones, disipando el  $\Delta\Psi$  y generando una reducción en la producción de  $O_2^{\cdot-}$  y  $H_2O_2$ .

Extensa literatura previa a este trabajo evidenciaba que la actividad de la aconitasa mitocondrial es sensible a la formación de especies reactivas del oxígeno y el nitrógeno tanto en condiciones fisiológicas como patológicas. (42, 44, 47, 49, 71) en diferentes tipos celulares, tejidos y organismos

Debido a la selectividad del  $O_2^{\cdot-}$  por el centro [Fe-S] de la aconitasa, la determinación de la actividad aconitasa se utiliza como ensayo para evaluar los niveles de  $O_2^{\cdot-}$  en diferentes tipos celulares y en mitocondrias en diferentes condiciones. (41-43, 72). Sin embargo el impacto de la inhibición de la aconitasa en el metabolismo mitocondrial no había sido investigado hasta el presente trabajo.

En este trabajo demostramos que en mitocondrias de cerebro y corazón la aconitasa ejerce un gran control metabólico en la cadena respiratoria, ya que presentan los coeficientes de control de flujo más altos (0.98, 0.8 respectivamente), como también un elevado umbral (95% en cerebro, 98% en corazón); esto significa que inhibiendo solo un 5% de la actividad de la enzima se puede generar un impacto en la cadena respiratoria en estos órganos. Estas diferencias observadas en los distintos órganos coinciden con los hallados en pacientes con Ataxia de Friedreich, enfermedad que se debe a la presencia de frataxina mutada no funcional que determina una alteración en la síntesis de centros Fe-S. En estos pacientes la sintomatología refleja la deficiencia de aconitasa en cerebro y corazón aunque deficiencia en la síntesis de centros Fe-S se da en todos los órganos (73). Además, en un trabajo reciente (74) se reporta que en un paciente pediátrico que presentaba mutaciones sin sentido en el gen de la ACO2, la inhibición significativa de la actividad aconitasa en fibroblastos de piel, acompañado de una inhibición de la respiración celular y sintomatología neurológica concomitante a estos hallazgos, en línea con nuestros resultados.

Para que opere como un sensor redox, la aconitasa m tendría que ser inactivada *in vivo* en forma reversible. Esto se ha visto por ejemplo durante la isquemia/repercusión en corazones de ratas: la aconitasa presentó una pérdida de actividad durante la isquemia y una recuperación en su actividad durante la reperfusión(75). En esta situación, la inhibición de la aconitasa mitocondrial no solo limitaría la formación de  $O_2^{\cdot-}$  y  $H_2O_2$  por parte de la cadena de transporte de electrones sino también impediría la sobrecarga  $Ca^{2+}$  al reducir el gradiente de protones a través de membrana mitocondrial interna, resultando en uno de los efectos beneficiosos del preconditionamiento isquémico.

La mitocondria contiene varias defensas antioxidantes (por ejemplo: MnSOD, Glutación Peroxidasa, y PeroxiredoxinIII) que reaccionan con las especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno una vez formadas. Otros mecanismos antioxidantes mitocondriales operan disminuyendo la producción de especies oxidantes. Así, a través de mecanismos que disminuyen el gradiente electroquímico mitocondrial y por lo tanto formación  $O_2^{\cdot-}$  (por ejemplo: proteínas desacoplantes, canales de  $K^+$ -ATP). En el presente trabajo, mostramos que la inhibición de la aconitasa mitocondrial podría actuar como un sensor, inactivándose rápidamente e inhibiendo la formación de  $O_2^{\cdot-}$  y  $H_2O_2$  en la cadena respiratoria, particularmente en cerebro y corazón.

La función de sensor redox de la aconitasa m, regulando el ciclo de ácido cítrico y la producción de ROS en la mitocondria, podría funcionar en forma coordinada con otros sensores. Por ejemplo utilizando técnicas de proteómica, se identificaron proteínas mitocondriales que contienen tioles, capaces de reaccionar con bajo niveles de  $H_2O_2$ (fisiológicamente relevantes) y se postula que estas pueden ejercer algún control redox en el metabolismo mitocondrial.(76). Entre estas se encuentra la piruvato deshidrogenasa quinasa 2, enzima reguladora del complejo multienzimático Piruvato deshidrogenasa. La piruvato deshidrogenasa quinasa 2 tiene dos cisteínas muy sensibles a la oxidación (Cys 45 y 392) e inactivación. De este modo, disminuyendo la fosforilación del complejo de la Piruvato Deshidrogenasa y aumentando la producción de Acetil CoA(77), se favorece la formación ROS. A su vez, los mismos niveles de ROS inactivan a la aconitasa a través de la oxidación de su grupo Fe-S; por tanto, por lo

tanto, el ciclo de Krebs estaría enlentecido, limitando el suministro de sustratos a la cadena de transporte de electrones, apoyando el concepto de que las ROS en la mitocondria van a afectar varios sitios, regulando el metabolismo mitocondrial. Este mecanismo en el cual se incrementa la formación de acetil-CoA, pero la aconitasa es inhibida, puede cambiar el balance entre el metabolismo de los carbohidratos y el de las grasas y podría explicar el mantenimiento de una enzima altamente sensible al  $O_2^-$  (78). En apoyo a este concepto, se ha visto que ratones knock-out homocigotos para la MnSOD que mueren al cumplir aproximadamente una semana, presentaron una disminución significativa en la actividad aconitasa, acompañando cardiopatías y aumento de grasa en el hígado y músculo (79). Además, los ratones heterocigotos para la MnSOD, en los que se generó resistencia a la insulina (80), los antioxidantes mitocondriales provocan una disminución del contenido graso y protegieron de la resistencia de insulina (81), demostrando el concepto de la producción controlada  $O_2^-$  puede regular el flujo de electrones por la fosforilación oxidativa o redireccionar el uso de citrato a la síntesis de grasas a través de la inhibición de la aconitasa.

Otras modificaciones post-traduccionales han sido encontradas en la aconitasa tales como la fosforilación de la enzima en órganos como el músculo esquelético en humanos (82), y en corazones de rata con diabetes tipo I (83). El ejercicio conlleva una des-fosforilación de la aconitasa y aumenta su actividad catalítica llevando la formación de isocitrato. (82). La fosforilación de la aconitasa mitocondrial esta mediada por la proteína quinasa C; en corazones de ratas diabéticas, se encuentra aumentada la actividad catalítica de la aconitasa en sentido inverso, llevando a la formación de citrato (83). En corazones de ratas diabéticas, se encuentra aumentado la concentración de citrato (84), por lo tanto, tanto el mecanismo de regulación de la actividad aconitasa por fosforilación-desfosforilación y por modificaciones redox podrían operar de forma conjunta en detener o disminuir el flujo del ciclo de Krebs, Figura 14.

En el ciclo de Krebs convergen el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas, generando GTP (ATP) y proporcionando NADH así como  $FADH_2$ , estos últimos son los sustratos de la cadena de transporte de electrones, para luego por la fosforilación oxidativa dar a la formación de ATP. Un mecanismo importante para el control de metabolismo de energía celular está conseguido a través de las enzimas de ciclo de

ácido cítrico como son la citrato sintasa, la isocitrato deshidrogenasa y la  $\alpha$  - cetoglutarato deshidrogenasa , las cuales se encuentran reguladas alostéricamente siendo inhibidas por sus productos, ATP, y una relación alta de  $\text{NADH/NAD}^+$ . En particular, la  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa, la cual es considerada un punto de regulación central del ciclo, es también un blanco y generador de ROS (85) pero su inactivación mediada por ROS es mucho menos sensible que la aconitasa mitocondrial. En este trabajo realizando una aproximación del análisis de control metabólico limitado a la aconitasa mitocondrial, obtuvimos evidencia de que esta puede controlar el flujo de metabolitos en el ciclo del Krebs logrando regular el flujo de la cadena de transporte de electrones y por lo tanto modificando la producción de ROS en la mitocondria. Esta función reguladora de la aconitasa parece ser tejido específica (principalmente en cerebro y corazón) y este control en el flujo metabólico puede deberse a más de un mecanismo entre los que se incluyen el Control redox dado por el grupo Fe-S y fosforilación/desfosforilación (Figura 5). Bajo condiciones las cuáles se promueve que el centro de la aconitasa se encuentre de la forma 3Fe-4S y/o la enzima este fosforilada, la concentración de citrato aumentaría, el flujo del ciclo de ácido cítrico sería enlentecido y la producción de radicales libres por la cadena de transporte de electrones disminuiría.



## Bibliografía

1. Santos CX, et al. Mechanisms and implications of reactive oxygen species generation during the unfolded protein response: roles of endoplasmic reticulum oxidoreductases, mitochondrial electron transport, and NADPH oxidase. *Antioxid Redox Signal*. 2009;11(10):2409-27.
2. Vian Azzu, Brand MD. The on-off switches of the mitochondrial uncoupling proteins. *Biochemical Sciences*. 2009;35(5):298-307.
3. Turrens. JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *Journal Physiology*. 2003;552(2):335-44.
4. Tahara EB NF, Kowaltowski AJ. Tissue-, substrate-, and site-specific characteristics of mitochondrial reactive oxygen species generation. *Free Radic Biol Med*. 2009;46:1283-97.
5. A. Panov, S. Dikalov, N. Shalbuyeva, G. Taylor, T. Sherer, Greenamyre JT. Rotenone model of Parkinson disease: multiple brain mitochondria dysfunctions after short term systemic rotenone intoxication. *J Biol Chem*. 2005;280(51):42026-35.
6. Chouchani ET, Pell VR, Gaude E, Akseptijevic D, Sundier SY, Robb EL, et al. Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS. *Nature*. 2014;215:431-5.
7. D. Han, E. Williams, Cadenas E. Mitochondrial respiratory chain-dependent generation of superoxide anion and its release into the intermembrane space. *Biochem J*. 2001;353(2):411-6.
8. Castro L, et al. Mitochondrial protein tyrosine nitration. *Free Radical*. 2011;45:37-57.
9. Cadenas E, KJ D. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol Med*. 2000;29:222-30.
10. Kussmaul L, J H. The mechanism of superoxide production by NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) from bovine heart mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:7607-12.
11. Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J*. 2009;417:1-13.
12. Korshunov SS, Skulachev VP, AA S. High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS Lett*. 1997;416:15-8.
13. Kadenbach B. Intrinsic and extrinsic uncoupling of oxidative phosphorylation. *Biochim Biophys Acta*. 2003;1604:77-94.
14. Kim-Han JS, Reichert SA, Quick KL, LL D. BMCP1: a mitochondrial uncoupling protein in neurons which regulates mitochondrial function and oxidant production. *J Neurochem*. 2001;79(658-68).
15. Echtay K. Mitochondrial uncoupling proteins—What is their physiological role? *Free Radical Biology & Medicine*. 2007;43:1351–71.
16. Kowaltowski AJ, de Souza-Pinto NC, Castilho RF, Vercesi AE. Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med*. 2009;47:333-43.
17. Marletta MA. Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J Biol Chem*. 1993;268(17):12231-4.
18. Brookes P. Mitochondrial nitric oxide synthase. *Mitochondrion*. 2004;3:187-204.
19. Ignarro LJ. Nitric oxide as a unique signaling molecule in the vascular system: a historical overview. *J Physiol Pharmacol*. 2002;53(4 Pt 1):503-14.
20. Alvarez MN, M. Trujillo, and R. Radi. Peroxynitrite formation from biochemical and cellular fluxes of nitric oxide and superoxide. *Methods Enzymol*. 2002;53(4 Pt 1):503-14.
21. Radi R, Beckman J.S.,. Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J Biol Chem* 1991;266(7):4244-50.

22. C Quijano, B Alvarez, R M Gatti, O Augusto, Radi R. Pathways of peroxynitrite oxidation of thiol groups. *Biochem J.* 1997;1:167-73.
23. Alvarez B, Radi R. Peroxynitrite reactivity with amino acids and proteins. *Amino Acids* 2003;25 295-311.
24. Cassina AM, Hodara R, Souza JM, Thomson L, Castro L, Ischiropoulos H, et al. Cytochrome c nitration by peroxynitrite. *J Biol Chem* 2000 275:21409-15.
25. Radi R RM, Castro L, Telleri R. Inhibition of mitochondrial electron transport by peroxynitrite. *Arch Biochem Biophys.* 1994;308:89-95.
26. Fridovich I. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem.* 1995;64 97-112.
27. Cao Z, Lindsay J.G. , Isaacs N.W. Mitochondrial peroxiredoxins. *Subcell Biochem.* 2007;44:295-315.
28. AJ Kowaltowski, LE Netto, Vercesi A. The thiol-specific antioxidant enzyme prevents mitochondrial permeability transition. Evidence for the participation of the participation of reactive species in this mechanism. *J Biol Chem.* 1998;273(2):12766-9.
29. Sies H. Oxidative stress II. Oxidant and antioxidants. London: Academic Press, . 1991.
30. Sies H. Biological redox systems and oxidative stress. *Cell Mol Life Sci.* 2007;64: 2181-8.
31. Robert B Hamanaka, S N. Chandel *Trends. Biochemical Sciences.* 2012;35(9):505-13.
32. Dong Kyun W and G.S. Shadel. Mitochondrial Stress Signals Revise an Old Aging Theory *Cell.* 2011;144:11-2.
33. Pamplona R. Mitochondrial DNA Damage and Animal Longevity: Insights from Comparative Studies. *Journal of Aging Research,*. 2011.
34. Nishikawa T and Araki E. Investigation of a novel mechanism of diabetic complications: impacts of mitochondrial reactive oxygen species. *Rinsho Byori.* 2008;56(8):712-9.
35. Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi S, Matsumura T, Kaneda Y, et al. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* 2000 404.:787-90.
36. Quijano C, et al., . Enhanced mitochondrial superoxide in hyperglycemic endothelial cells: direct measurements and formation of hydrogen peroxide and peroxynitrite. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007;293(6): H3404-14.
37. Nin N, et al., . Septic diaphragmatic dysfunction is prevented by Mn(III)porphyrin therapy and inducible nitric oxide synthase inhibition. *Intensive Care Med.* 2004;30: p. 2271-8.
38. Cassina P, et al. Mitochondrial dysfunction in SOD1G93A-bearing astrocytes promotes motor neuron degeneration: prevention by mitochondrial-targeted antioxidants. *J Neurosci,*. 2008;28(16):4115-22.
39. Beinert HaKM. Aconitase, a two-faced protein: enzyme and iron regulatory factor. *FASEB J.* 1993; 7(15): 1442-9.
40. Robbins A H, Stout C D. Structure of activated aconitase: formation of the [4Fe-4S] cluster in the crystal. *Proc Natl Acad Sci U S A,*. 1989;86(10):3639-43.
41. Gardner PR. Aconitase: sensitive target and measure of superoxide. *Methods Enzymol.* 2002;349:9-23.
42. Gardner PR ND, White CW. Aconitase is a sensitive and critical target of oxygen poisoning in cultured mammalian cells and in rat lungs. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994;91:12248-52.
43. Gardner PR RI, Epstein LB, White CW,. Superoxide radical and iron modulate aconitase activity in mammalian cells. *J Biol Chem.* 1995;270:13399-405.
44. Gardner PR. Aconitase: sensitive target and measure of superoxide. *Methods Enzymol.* 2002;349:9-23.

45. Gardner PR, et al., . Dioxygen-dependent metabolism of nitric oxide in mammalian cells. . *Free Radic Biol Med.*, 2001;31(2):191-204.
46. Tortora V QC, Freeman B, Radi R, Castro L. Mitochondrial aconitase reaction with nitric oxide, S-nitrosoglutathione, and peroxyxynitrite: mechanisms and relative contributions to aconitase inactivation. *Free Radic Biol Med.* 2007;42:1075-88.
47. Castro LA, Robalinho RL, Cayota A, Meneghini R, Radi R. Nitric oxide and peroxyxynitrite-dependent aconitase inactivation and iron-regulatory protein-1 activation in mammalian fibroblasts. *Arch Biochem Biophys.* 1998 Nov 15;359(2):215-24.
48. Aulak KS, et al., . Dynamics of protein nitration in cell and mitochondria. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004;286:H30-8.
49. Aulak KS MM, Yan L, West KA, Massillon D, Crabb JW, Stuehr DJ. Proteomic method identifies proteins nitrated in vivo during inflammatory challenge. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98:12056–61.
50. Koeck T CJ, Crabb JW, Stuehr DJ, Aulak KS. Glucose-modulated tyrosine nitration in beta cells: targets and consequences. *Arch Biochem Biophys.* 2009;484:221-31.
51. Koeck T FX, Hazen SL, Crabb JW, Stuehr DJ, Aulak KS. Rapid and selective oxygen regulated protein tyrosine denitration and nitration in mitochondria. *J Biol Chem.* 2004;279:27257–62.
52. Turko IV LL, Aulak KS, Stuehr DJ, Chang JY, Murad F. Protein tyrosine nitration in the mitochondria from diabetic mouse heart. Implications to dysfunctional mitochondria in diabetes. *J Biol Chem.* 2003;278:33972–7.
53. Armstrong JS WM, Yang H, Jones DP. The redox regulation of intermediary metabolism by a superoxideaconitase rheostat. . *Bioessays.* 2004;26:894-900.
54. Gardner PR, Fridovich I. Inactivation-reactivation of aconitase in *Escherichia coli*. A sensitive measure of superoxide radical. *J Biol Chem.* 1992;270 8757-63.
55. Longo VD ea. Mitochondrial superoxide decreases yeast survival in stationary phase. *Arch Biochem Biophys.* 1999;365(1):131-42.
56. Meléndez-Hevia E, Riol-Cimas, J.M. y Torres N.V. La teoría del control y su aplicación al metabolismo. *Anales de química.* 1987;83:224-43.
57. Kacser HyB, J.A. The control of flux. *Symp Soc Exp Biol.* 1973;27:65-104.
58. Heinrich RyR, T.A. A linear steady-state treatment of enzymatic chains. General properties, control and effector strength. *Eur J Biochem.* 1974;42:89-95.
59. Kacser H PJW. Control of metabolism: what do we have to measure? *Trends Biochem Sci.* 1987;12:5-14.
60. Cornish-Bowden A. Chapter 10: Kinetics of multienzyme system. In: Press. P, editor. *Fundamental of Enzyme Kinetics.* London; 2002.
61. Kacser H, JA. B. The control of flux. *Biochem Soc Trans.* 1995;23:341–66.
62. Lion S ea. An extension to the metabolic control theory taking into account correlations between enzyme concentrations. . *Eur J Biochem.* 2004;271(22): 4375-91.
63. Rossignol R, Faustin B, Rocher C, Malgat M, Mazat JP, T L. Mitochondrial threshold effects. . *Biochem J* 2003;370 751-62.
64. Mallajosyula JK CSJ, Rajagopalan S, Nicholls DG, Andersen JK. Metabolic control analysis in a cellular model of elevated MAO-B: relevance to Parkinson's disease. *Neurotox Res.* 2009;16:186-93.
65. Figueira TR MD, Vercesi AE, Castilho RF. Safranin as a fluorescent probe for the evaluation of mitochondrial membrane potential in isolated organelles and permeabilized cells. *Methods Mol Biol.* 2012;810:103-17.
66. Karl. E. O AKERMAN, WIKSTROM MKF. Safranin as a probe of the mitochondrial membrane potential. *FEBS Lett.* 1976;68(2):191-7.

67. Darley-Usmar VM, Rickwood D, WILSON MT. Mitochondria: a practical approach. Darley-Usmar VM, editor.; 1987.
68. Tatyana V. Votyakova, Reynolds IJ. Detection of hydrogen peroxide with Amplex Red: interference by NADH and reduced glutathione auto-oxidation. *Arch Biochem Biophys.* 2004;431(1):138-44.
69. Liza A. Pon EAS. Mitochondria. *Methods in Cell Biology.* 2007;80.
70. Rossignol R MM, Mazat JP, Letellier T. Threshold effect and tissue specificity. Implication for mitochondrial cytopathies. *J Biol Chem.* 1999;274:33426–32.
71. Gardner PR, Raineri I, Epstein LB, White CW. Superoxide radical and iron modulate aconitase activity in mammalian cells. *J Biol Chem.* 1995 Jun 2;270(22):13399-405.
72. Aulak KS MM, Yan L, West KA, Massillon D, Crabb JW, Stuehr DJ. Proteomic method identifies proteins nitrated in vivo during inflammatory challenge. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98:12056-61.
73. Stemmler TL LE, Pain D, Dancis A. Frataxin and mitochondrial FeS cluster biogenesis. *J Biol Chem.* 2010;285:26737–43.
74. Roa Sadat, Emanuele Barca, Ruchi Masand, Taraka R. Donti, Ali Naini, Darryl C. De Vivo, et al. Functional cellular analyses reveal energy metabolism defect and mitochondrial DNA depletion in a case of mitochondrial aconitase deficiency. *Molecular Genetics and Metabolism.* 2016;118(1):28-34.
75. Bulteau AL LK, Ikeda-Saito M, Isaya G, Szweda LI. Reversible redox-dependent modulation of mitochondrial aconitase and proteolytic activity during in vivo cardiac ischemia/reperfusion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102:5987–91.
76. Hurd TR PT, Harbour ME, Lilley KS, Murphy MP. Detection of reactive oxygen species-sensitive thiol proteins by redox difference gel electrophoresis: implications for mitochondrial redox signaling. *J Biol Chem.* 2007;282:22040–51.
77. Hurd TR CY, Abakumova I, Chouchani ET, Baranowski B, Fearnley IM, et al. Inactivation of pyruvate dehydrogenase kinase 2 by mitochondrial reactive oxygen species. *J Biol Chem.* 2012;287:35153–60.
78. Walden WE. From bacteria to mitochondria: aconitase yields surprises. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002(99):4138–40.
79. Li Y HT, Carlson EJ, Melov S, Ursell PC, Olson JL, et al. Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. *Nat Genet.* 1995;11:376–81.
80. Hoehn KL SA, Hohnen-Behrens C, Turner N, Hoy AJ, Maghzal GJ, et al. Insulin resistance is a cellular antioxidant defense mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106:17787–92.
81. Rodriguez-Cuenca S CH, Logan A, Abakumova I, Prime TA, Rose C, et al. Consequences of long-term oral administration of the mitochondria-targeted antioxidant MitoQ to wild-type mice. *Free Radic Biol Med.* 2010;48:161-72.
82. Zhang SJ SM, Lanner JT, Thorell A, Westerblad H, Katz A. Activation of aconitase in mouse fasttwitch skeletal muscle during contraction-mediated oxidative stress. *2007;293:1154–9.*
83. Lin G BR, MacLeod KM. Regulation of mitochondrial aconitase by phosphorylation in diabetic rat heart. *Cell Mol Life Sci.* 2009;66:919-32.
84. Chen V IC, Fong BC, Spitzer JJ. The effects of acute and chronic diabetes on myocardial metabolism in rats. *Diabetes.* 1984;33:1078–84.
85. Tretter L A-VV. Alpha-ketoglutarate dehydrogenase: a target and generator of oxidative stress. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2005;360:2335–45.