

Tesi doctoral presentada per En/Na

Yolanda CÁMARA NAVARRO

amb el títol

**"Estudio funcional de la proteína desacopladora
mitocondrial UCP3 en relación con la apoptosis y
las especies reactivas de oxígeno"**

per a l'obtenció del títol de Doctor/a en

BIOLOGIA

Barcelona, 25 de juliol de 2005.

Facultat de Biologia
Departament de Bioquímica i Biología Molecular



UNIVERSITAT DE BARCELONA



I. MITOCONDRIA

I.1 MITOCONDRIA Y PRODUCCIÓN DE ENERGÍA

I.1.1 ACOPLAMIENTO DE LA FOSFORILACIÓN OXIDATIVA Y LA RESPIRACIÓN

El principal lugar de producción de energía química en una célula de mamífero que se encuentra en condiciones aeróbicas, es la mitocondria. Estos orgánulos están especializados en la conversión de energía oxidativa a energía química, mediante el sistema enzimático que configuran la **cadena respiratoria** y la **ATP sintasa**. Este sistema consta de cinco complejos multiproteicos localizados en la membrana mitocondrial interna y organizados según su potencial redox. Durante la respiración, los electrones cedidos a la cadena respiratoria por moléculas reductoras producidas durante el metabolismo oxidativo (NADH y FADH₂) se transfieren de un complejo a otro adyacente, con potencial redox superior (Figura 1):

- Complejo I o NADH-ubiquinona oxidoreductasa o NADH-deshidrogenasa
- Complejo II o Succinato-deshidrogenasa
- Complejo III o Ubiquinona-citocromo c oxidoreductasa
- Complejo IV o Citocromo Oxidasa

Debido a dicha diferencia de potencial redox, la transferencia de electrones va acompañada de liberación de energía. Dicha energía es utilizada por los diferentes complejos para expulsar protones de la matriz al espacio intermembrana y el proceso finaliza con la reducción de oxígeno a agua. De este modo, la matriz mitocondrial se basicifica, mientras que el espacio intermembrana y el espacio extramitocondrial se acidifican. Debido a la impermeabilidad de la membrana mitocondrial interna¹, se crea una diferencia de potencial electroquímico de protones o **fuerza protomotriz** ($\Delta p = \Delta\mu_{H^+}/F$, siendo F la constante de Faraday). Esta diferencia de potencial electroquímico tiene dos componentes: una de concentración (**ΔpH o diferencia de pH**) y otra de carga (**$\Delta\Psi$ o potencial de membrana**).

La fuerza protomotriz es utilizada por la ATP sintasa (Complejo V) en un proceso denominado **fosforilación oxidativa** (Mitchell, 1979). Este complejo acopla la difusión facilitada de los H⁺ a través de la membrana mitocondrial interna (dominio

¹ La membrana mitocondrial interna tiene una composición fosfolipídica inusual que incluye la cardiolipina (difosfatidilglicerol) que es particularmente impermeable a pequeños iones (Hoch, 1992).

transmembrana o F₀), a la síntesis de ATP (dominio hidrosoluble o F₁). Este fenómeno denominado **acoplamiento** de la fosforilación oxidativa con la oxidación de sustratos, asegura la coordinación entre las necesidades de ATP y el consumo de sustratos.

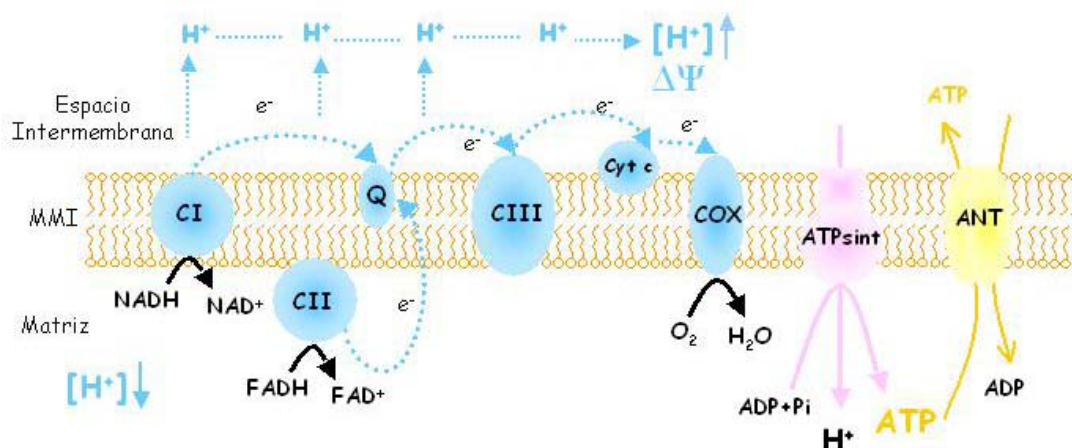


FIGURA 1: Flujo electrónico a través de los complejos de la cadena respiratoria y Adenina nucleótido translocasa (ANT).

Muchos venenos comunes son **inhibidores** específicos de alguno de los complejos de la cadena respiratoria, y actúan reprimiendo el consumo de oxígeno (por ejemplo, rotenona para el complejo I, antimicina A para el complejo III, o KCN para el IV).

Además de la síntesis de ATP, las mitocondrias realizan otras funciones para las que resulta indispensable un flujo metabólico o intercambio de metabolitos entre el citosol y la matriz mitocondrial (Ciclo de Krebs, β -oxidación de ácidos grasos, etc.). La membrana mitocondrial interna es una barrera impermeable a la mayoría de estos metabolitos. Así, el flujo se mantiene gracias a la presencia de diversos transportadores o *carriers*. Un ejemplo son el transportador de P_i, o la ANT (adenina nucleótido translocasa), que junto a los componentes de la cadena respiratoria constituyen el **sistema oxphos** (Wallace, 1989). En la membrana mitocondrial externa, la porina o VDAC (*voltage dependent anion channel*) constituye un canal que permite el paso de iones y pequeños solutos hacia el citosol (Shoshan-Barmatz and Gincel, 2003). Sin embargo, muchas proteínas y enzimas implicadas en diferentes procesos fisiológicos, quedan atrapadas en el espacio intermembrana (creatin kinasa, Smac/Diablo...).

La diferencia de potencial electroquímico generada durante la respiración no es utilizada únicamente en la fosforilación oxidativa, sino que es importante para la actividad de diversos transportadores y sistemas enzimáticos dependientes de energía, como por

ejemplo la lanzadera malato-aspartato (Azzi et al., 1967; Berry et al., 1992) o la ANT (Vignais, 1976). La energía utilizable (ΔG) a partir del transporte transmembrana de un ión, ya sea protón o no, es un reflejo de su distancia respecto al equilibrio:

$$\Delta G = z \cdot F \cdot \Delta \Psi + 2.303 \cdot R \cdot T \cdot \log ([C_{ext}]/[C_{int}])$$

F constante de Faraday

Z carga del ión

$\Delta \Psi$ potencial de membrana

R constante de gases

T temperatura absoluta

C_{int}/C_{ext} concentración en los dos compartimentos

Así, en cada proceso transmembrana, las componentes de ΔpH y $\Delta \Psi$ pueden actuar conjunta o separadamente (dependiendo de si el proceso se realiza acoplado al movimiento de H^+ o al de otros iones positivos que no pueden difundir a través de la membrana).

I.1.2 CONTROL DE LA FOSFORILACIÓN OXIDATIVA

Son muchas las teorías que tratan de explicar cuáles son los mecanismos reguladores de la tasa de respiración y fosforilación oxidativa.

En 1955, Chance y Williams propusieron que la tasa de consumo de oxígeno dependía de aquellos procesos que consumen ATP (Chance and WILLIAMS, 1955b).

Algunos autores consideran que todas las reacciones que se producen en el transporte electrónico a través de la cadena respiratoria están próximas a su equilibrio termodinámico, excepto la actividad de la citocromo oxidasa, sobre la que recaería el control del flujo respiratorio (Erecinska and Wilson, 1982). Sin embargo, otros autores proponen que la ANT sería capaz de funcionar aún lejos del equilibrio y la regulación de su actividad controlaría la tasa de consumo de oxígeno (JO_2) (Kunz et al., 1981).

El aporte de equivalentes reductores como substrato de la cadena respiratoria también puede regular el flujo. Así, otro punto del control respiratorio sería ejercido a nivel de la actividad de las deshidrogenasas de la matriz mitocondrial. Algunas de estas deshidrogenasas están a su vez controladas por los niveles de calcio (Hansford, 1985) que dependen de regulación hormonal. Los niveles intramatriciales de calcio dependen

de la actividad de dos transportadores localizados en la membrana mitocondrial interna (dependientes de la fuerza protomotriz) (Brand, 1985).

Otros mecanismos han sido propuestos, como por ejemplo los cambios en el volumen de la mitocondria. Se ha visto que un aumento de volumen mitocondrial puede estimular la actividad de la cadena respiratoria (Halestrap, 1989) pero este fenómeno parece depender del tipo de osmolito contenido en el medio en el que se realiza la experimentación (Devin et al., 1997).

Debido a la controversia existente en cuanto a los factores que controlan el flujo respiratorio y la fosforilación oxidativa, Tager et al. (Groen et al., 1982) aplicaron el concepto del análisis de control metabólico a mitocondrias aisladas. Así, utilizando inhibidores específicos para los diferentes componentes del sistema oxphos, establecieron que el control de la fosforilación oxidativa se reparte en diversas etapas, y que esta distribución es susceptible de variar en función de las condiciones metabólicas (velocidad de utilización de ATP).

En ausencia de trabajo o consumo de ATP (relación ATP/ADP elevada), la respiración mitocondrial (**estado 4**) está controlada por la entrada pasiva de H⁺ a través de la membrana mitocondrial interna o *proton leak*. En esta situación, la velocidad de respiración se adecuará a la pérdida de gradiente, de modo que se mantenga la fuerza protomotriz necesaria para el funcionamiento de los procesos biológicos dependientes de dicha fuerza. En estas condiciones, no se produce ningún trabajo por lo que la energía derivada del flujo electrónico a través de la cadena respiratoria se transforma en calor.

Cuando se da una situación en la que se consume ATP, y por tanto, existe trabajo, se produce tanto a nivel mitocondrial (**estado 3**) como a nivel celular, una estimulación de la utilización de los substratos energéticos, del consumo de oxígeno por la cadena respiratoria y de la síntesis de ATP (Chance and WILLIAMS, 1955a). La hidrólisis de ATP necesaria para el aporte energético requerido, disminuye la relación ATP/ADP. El flujo a través de ANT depende de las concentraciones citosólicas y mitocondriales de ATP y ADP, así como del potencial de membrana ($\Delta\Psi$) (Klingenberg, 1979). Cuando el metabolismo celular hidroliza el ATP, se favorece la salida del ATP matricial al citosol en intercambio con ADP, lo que disminuye la relación ATP/ADP mitocondrial. Como consecuencia, se produce una estimulación de la ATP sintasa (sensible a las concentraciones mitocondriales de ATP, ADP y P_i y a la fuerza protomotriz (LaNoue et al., 1986). La disminución de fuerza protomotriz asociada a la síntesis de ATP

estimula a su vez la actividad de la cadena respiratoria (Brown et al., 1990b; Nicholls, 1974b) y por tanto, la oxidación de NADH.

Igualmente, la disminución en la relación NADH/NAD^+ mitocondrial, provoca un aumento en la actividad de las deshidrogenasas que participan en el ciclo de Krebs (Hansford, 1980), disminuyendo la relación Acetil-CoA/CoA. Finalmente, la disminución de las relaciones NADH/NAD^+ y Acetil-CoA/CoA estimulan la piruvato deshidrogenasa (Hansford, 1980) y la β -oxidación.

Por tanto, en una célula que se encuentre en una situación intermedia entre el estado 4 y 3, la velocidad de respiración dependerá de la hidrólisis de ATP, de la actividad de ANT, de la disponibilidad de equivalentes reducidos para la cadena respiratoria y de la permeabilidad pasiva de la membrana mitocondrial interna. Un aumento en la disponibilidad de sustratos oxidables (Brown et al., 1990a), estimula el flujo a través de la cadena respiratoria aumentando la fuerza protomotriz (Nobes et al., 1990b) y favoreciendo tanto la síntesis de ATP, como los fenómenos de pérdida pasiva a través de la membrana mitocondrial interna.

La relación entre estado 3 y 4, denominada **coeficiente de control respiratorio**, es un indicativo del grado de dependencia de la fosforilación oxidativa por parte de la cadena respiratoria, o acoplamiento. Los estados respiratorios se definieron experimentalmente valorando el comportamiento respiratorio de mitocondrias aisladas durante la incubación en un medio isotónico (Figura 2), y responden por tanto, a situaciones artificiales. Así, se define como respiración en estado 4 a la tasa de consumo de oxígeno en ausencia de ADP, y por tanto, de fosforilación oxidativa. Al añadir ADP se produce un incremento en la tasa de consumo de oxígeno, respiración en estado 3, que es más grande cuánto mayor sea el grado de acoplamiento.

La **relación P:O** (o síntesis de ATP en relación al consumo de oxígeno en estado 3) es una medida de la eficiencia de la fosforilación oxidativa respecto a la respiración. Esta eficiencia no depende únicamente el grado de acoplamiento, sino que también influye la disponibilidad de sustratos y la naturaleza de los mismos. De hecho, sustratos poco energéticos como el succinato, dan lugar a relaciones P:O inferiores que aquellos sustratos que dan lugar a poder reductor en forma de NADH. El succinato genera FADH_2 , y éste dona sus electrones al complejo II que los cede al complejo III directamente, perdiendo la contribución del complejo I al gradiente de protones.

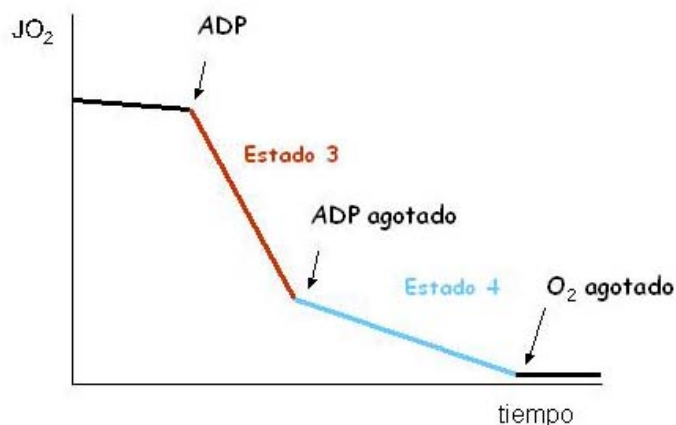


FIGURA 2: Ejemplo de registro del consumo de oxígeno (JO_2) de una muestra de mitocondrias aisladas en un medio isotónico conteniendo sustrato y fosfato. La adición de ADP causa un incremento de la tasa de respiración basal (estado 3). Una vez agotado el ADP añadido, e inhibida por tanto la síntesis de ATP, el consumo de oxígeno decae (estado 4). La respiración en estado 4 es habitualmente superior a la tasa de respiración basal debido a la hidrólisis de parte del ATP formado en estado 3.

I.1.3 MODIFICACIONES DEL RENDIMIENTO DE LA FOSFORILACIÓN OXIDATIVA: DESACOPLAMIENTO

Ante una disminución en la fuerza protomotriz no asociada a síntesis de ATP, la actividad de la cadena respiratoria se incrementa para compensar dicha pérdida de gradiente. Por tanto, el acoplamiento entre respiración y fosforilación oxidativa no es perfecto, y una parte de la respiración se ocupa exclusivamente de mantener el potencial de membrana, y no está relacionada con la fosforilación oxidativa. La capacidad de dissociar estos dos procesos (**desacoplamiento**) juega un importante papel en los fenómenos de regulación del metabolismo celular.

El desacoplamiento puede deberse a dos fenómenos: *proton leak* o *slip*. El **proton leak** se produce como consecuencia de la difusión de protones a través de la membrana mitocondrial interna en forma no asociada a la síntesis de ATP. El **slip** hace referencia a la variación de la estequiometría de reacción en los complejos de la cadena respiratoria, lo que provoca la expulsión al espacio intermembrana de un número de protones por electrón, inferior al esperable teóricamente. Ambos procesos disminuyen la fuerza protomotriz, y con ello, la eficiencia de la fosforilación oxidativa.

Los **desacoplantes químicos**, a diferencia de los inhibidores de complejos respiratorios, provocan un descenso en la fuerza protomotriz acompañado de un aumento en la tasa de respiración para compensar dicha disminución. Entre los desacoplantes químicos más comunes se encuentran el dinitrofenol (DNP), la carbonilcianida-4-trifluorometoxifenilhidrazona (FCCP) o la carbonilcianida-3-clorofenilhidrazona (CCCP). Estos compuestos actúan como agentes protonofóricos, atravesando la membrana mitocondrial interna en forma protonada, disipando así, el gradiente electroquímico formado durante la respiración. La adición de estos compuestos supone el colapso del potencial de membrana, lo que conlleva la aceleración de la cadena respiratoria hasta su capacidad máxima. Dado a la capacidad de estos compuestos de internarse en la membrana mitocondrial interna y afectar así a su estabilidad, un exceso de los mismos puede suponer una inhibición de la actividad de la cadena respiratoria².

Para valorar el grado de desacoplamiento mitocondrial se ha utilizado clásicamente el coeficiente de control respiratorio (estado 3/estado 4), pero esta relación no es suficiente para evidenciar desacoplamientos suaves o *mild uncouplings*. Habitualmente se realizan mediciones de la tasa de consumo de oxígeno en estado 4 y en presencia de oligomicina, lo que se ha denominado coloquialmente **estado 4 “verdadero”** (Figura 3). La tasa de respiración no acoplada no depende de la demanda de ATP, y por tanto, es insensible a **oligomicina** (inhibidor específico de la ATP sintasa). La adición de este compuesto permite observar únicamente aquellas modificaciones independientes de la fosforilación oxidativa. En estos ensayos, se utiliza como sustrato preferencial el succinato³. A pesar de ser menos energético, su entrada a la mitocondria no depende del potencial electroquímico de protones, lo que permite asegurar la disponibilidad de sustrato independientemente del grado de desacoplamiento. Ante un desacoplamiento se produce una aceleración de la respiración en estado 4. Cuando el grado de desacoplamiento es muy elevado, esto puede afectar incluso a la capacidad máxima respiratoria evidenciándose con la adición de un desacoplante químico.

² En las aproximaciones experimentales en que se utiliza un desacoplante químico es, por tanto, recomendable ajustar la dosis máxima, evitando posibles efectos inhibidores. En nuestro sistema experimental elegimos el CCCP por permitir un rango de concentraciones más elevado que el DNP.

³ A fin de evitar el transporte reverso de electrones hacia el complejo I, también suele adicionarse un inhibidor específico de este complejo, como la rotenona.

Así, ante una disminución de la fuerza protomotriz, la cadena respiratoria se acelera para compensar la pérdida de gradiente. En experimentos realizados también en estado IV “verdadero” y con succinato como sustrato, se valora la relación $\Delta\Psi$ - J_{O_2} a concentraciones crecientes de malonato (inhibidor del complejo II) para disminuir progresivamente la fuerza protomotriz. Al bloquear la entrada de electrones a la cadena respiratoria, ésta no puede compensar la pérdida de gradiente, pero el descenso en la fuerza protomotriz es más rápido a potenciales elevados. Por tanto, la relación existente entre consumo de oxígeno y fuerza protomotriz no es lineal (Nicholls, 1974a) (Figura 4A). Nicholls propuso que la linealidad se pierde debido a que la membrana mitocondrial interna gana en conductividad, está más desacoplada, al aumentar el $\Delta\Psi$.

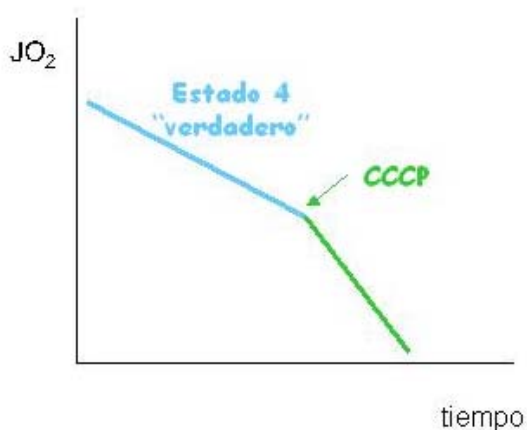


FIGURA 3: . Ejemplo de registro del consumo de oxígeno de una muestra de mitocondrias en estado 4 “verdadero”. La adición posterior de CCCP provoca el incremento esperado en la respiración ante un desacoplamiento.

En realidad, la pérdida de linealidad observada entre fuerza protomotriz y respiración podría deberse a una permeabilidad a los protones, o una estequiometría de reacción en los complejos de la cadena respiratoria, variable en función de la fuerza protomotriz o del flujo electrónico (Brand, 1990a; Murphy and Brand, 1987; Papa et al., 1991; Wrigglesworth et al., 1990). En cualquier caso, el gradiente de protones sería más difícil de mantener a potenciales de membrana elevados (O'Shea et al., 1984), con lo que la tasa de consumo de oxígeno necesaria para mantener la fuerza electromotriz debería ser superior que a potenciales inferiores.

Esta relación no-lineal existe tanto en mitocondrias aisladas como en células enteras (Brand, 1990b; Nobes et al., 1990a), lo que significa que la respiración no acoplada a la síntesis de ATP depende fuertemente de la fuerza protomotriz. Así, la eficiencia de la oxidación fosforilativa está inversamente relacionada (aunque no de forma lineal) con la fuerza protomotriz a la que tiene lugar la síntesis de ATP.

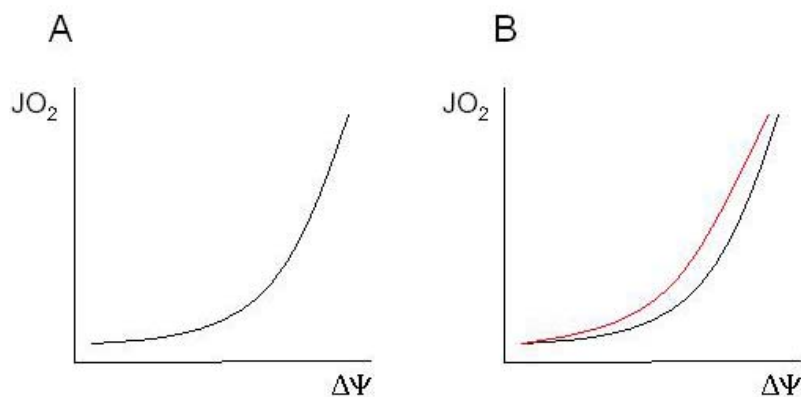


FIGURA 4: **A.** Relación entre la tasa de consumo de oxígeno y el potencial de membrana mitocondrial **B:** la línea roja representa el aceleramiento en el consumo de oxígeno que supondría un desacoplamiento (adaptado de Nedergaard et al (Nedergaard and Cannon, 2003)).

En las curvas JO_2 - $\Delta\Psi$, el desacoplamiento se evidencia por una desviación hacia la izquierda y una mayor linealización (Figura 4B). Es decir, cuanto mayor sea el desacoplamiento, es necesaria una mayor JO_2 para lograr un determinado $\Delta\Psi$.

El desacoplamiento supone un déficit en la eficiencia de la síntesis de ATP, sin embargo, podría constituir un sistema de adaptación rápida a los cambios ambientales, permitiendo una mejor regulación de procesos como la producción de calor, radicales libres o la propia síntesis de ATP. De hecho, el desacoplamiento explica un 20-25% del gasto energético asociado a la tasa metabólica basal (Rolfe et al., 1999b).

La importancia del desacoplamiento se manifiesta en diferentes situaciones fisiopatológicas. Por ejemplo, el estado tiroideo puede afectar a la relación P:O. Se ha observado que en una situación de hipotiroidismo, la velocidad de consumo de oxígeno es inferior (Harper and Brand, 1993).

Los ácidos grasos pueden provocar un desacoplamiento mitocondrial de diferentes formas que conducen a un incremento de la permeabilidad de la membrana mitocondrial interna o a un descenso en la eficiencia de la síntesis de ATP (Wojtczak, 1976). De

hecho, los ácidos grasos pueden actuar como agentes protonofóricos atravesando la membrana en forma protonada y disipando de este modo el gradiente electroquímico (Wojtczak et al., 1998a).

Finalmente, la existencia de la familia de proteínas desacopladoras mitocondriales o *uncoupling proteins* (UCPs) es un indicativo más de la importancia del desacoplamiento en la regulación de la fisiología celular (ver apartado III).

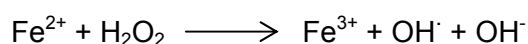
I.2 MITOCONDRIA Y PRODUCCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ROS)

Las Especies Reactivas de Oxígeno (**ROS**) comprenden todas las moléculas derivadas del oxígeno. Aquellas ROS que pueden existir de forma independiente y que contienen uno o más electrones desapareados en sus orbitales, son además radicales libres (Bergamini et al., 2004).

La primera especie reactiva de oxígeno generada en los sistemas biológicos es el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), un radical libre formado por la reducción directa e incompleta del oxígeno, por un único electrón. El $O_2^{\cdot-}$ tiene una vida media corta y es poco reactivo. Su inestabilidad se debe a que la reacción de dismutación del $O_2^{\cdot-}$ a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) es muy favorable (Thannickal and Fanburg, 2000a). Esta dismutación puede ser espontánea o catalizada por el enzima superóxido dismutasa.

Aunque la mayoría del peróxido de hidrógeno producido en células eucariotas proviene de la reacción de dismutación, éste también puede formarse a partir de la reducción directa del oxígeno con dos electrones, un mecanismo de reacción compartido por muchas oxidasas de flavoproteínas (Massey, 1994).

Al contrario del $O_2^{\cdot-}$, el H_2O_2 no es un radical libre tratándose es una molécula mucho más estable. Así como las membranas biológicas resultan impermeables al $O_2^{\cdot-}$, el H_2O_2 puede difundir a través de ellas. A pesar de que el H_2O_2 es un agente con una capacidad oxidativa mucho menor que el $O_2^{\cdot-}$, en presencia de metales de transición puede dar lugar al radical hidroxilo (OH^{\cdot}) a través de la reacción de Fenton:



El radical hidroxilo es una molécula extremadamente reactiva y tóxica. Puede reaccionar con ácidos grasos poliinsaturados produciendo los radicales alcoxil (RO^\cdot) y peroxil (ROO^\cdot).

Las especies reactivas del nitrógeno (**RNS**), como el óxido nítrico (NO^\cdot), el dióxido de nitrógeno (NO_2^\cdot) y el altamente reactivo peroxinitrito (ONOO^\cdot), constituyen otra familia de moléculas reactivas en los sistemas biológicos. Dentro de esta familia también se encuentran algunos radicales libres.

La elevada reactividad y la relativa inestabilidad de los ROS y RNS, complica mucho su detección en los sistemas biológicos. Así, las determinaciones de la producción de estas moléculas se realizan a menudo de forma indirecta, valorando la generación de productos finales de la reacción de los ROS/RNS con componentes celulares, como los lípidos, proteínas o DNA (Freeman and Crapo, 1982; Pryor and Godber, 1991). La mayoría de métodos de determinación de ROS se basan en reacciones con varias moléculas “detectoras” que son modificadas por oxidación para generar luminiscencia o señales fluorescentes (Thannickal and Fanburg, 2000b).

I.2.1 MITOCONDRIA: LA PRINCIPAL FUENTE DE ROS

Los ROS pueden generarse en la célula, a través de procesos enzimáticos y no enzimáticos. Cualquier proteína o sistema enzimático con la capacidad de transferir electrones puede generar ROS como subproductos de la reacción de transferencia electrónica. Este es el caso del citocromo p450 (en el retículo endoplasmático), los peroxisomas, la xantina oxidasa o la NADPH oxidasa. No obstante, la principal fuente de ROS en células no fagocíticas es la mitocondria. Datos cuantitativos, obtenidos de mitocondrias aisladas, sugieren que alrededor del 2-6% del consumo de oxígeno se debe a la producción de O_2^\cdot , y el 80% de éste se genera en la mitocondria a nivel de la cadena respiratoria. El oxígeno molecular (O_2) actúa como aceptor final de los electrones en la citocromo oxidasa (complejo IV), que cataliza la oxidación del oxígeno a agua. Sin embargo, en condiciones fisiológicas, la reducción incompleta del oxígeno puede darse a nivel de los diferentes complejos, que pueden catalizar transferencias de uno o dos electrones, con la consiguiente generación de ROS.

Entre los diferentes complejos, el complejo I y III son los máximos productores de ROS en la mitocondria (Chance et al., 1979; Forman and Boveris, 1982). La generación de O_2^\cdot es elevada en estado 4 y en ausencia de inhibidores de la cadena respiratoria

cuando el sustrato utilizado es el succinato, que dona sus electrones a nivel del complejo II. Sin embargo, esta producción de $O_2^{\cdot-}$ se reprime con la adición de rotenona, inhibidor específico del complejo I. Este hecho indica que la mayoría del $O_2^{\cdot-}$ generado se debe al transporte reverso de electrones hacia el **complejo I** (de succinato a NAD^+) (Liu et al., 2002b; Turrens and Boveris, 1980). El transporte reverso parece ocurrir únicamente ante $\Delta\Psi$ elevados (es inhibido por la adición de ADP o desacoplantes químicos), impulsado por la elevada fuerza protomotriz generada por la actividad de los complejos III y IV (Liu et al., 2002a). Así, cuando la cadena respiratoria funciona normalmente y el $\Delta\Psi$ es débil, los electrones se transfieren del complejo II al III. El lugar exacto de producción de ROS en el complejo I es fruto de controversia, pero parece que la generación de $O_2^{\cdot-}$ se da principalmente en el lado matricial de la membrana mitocondrial interna (Miwa et al., 2003; St Pierre et al., 2002c).

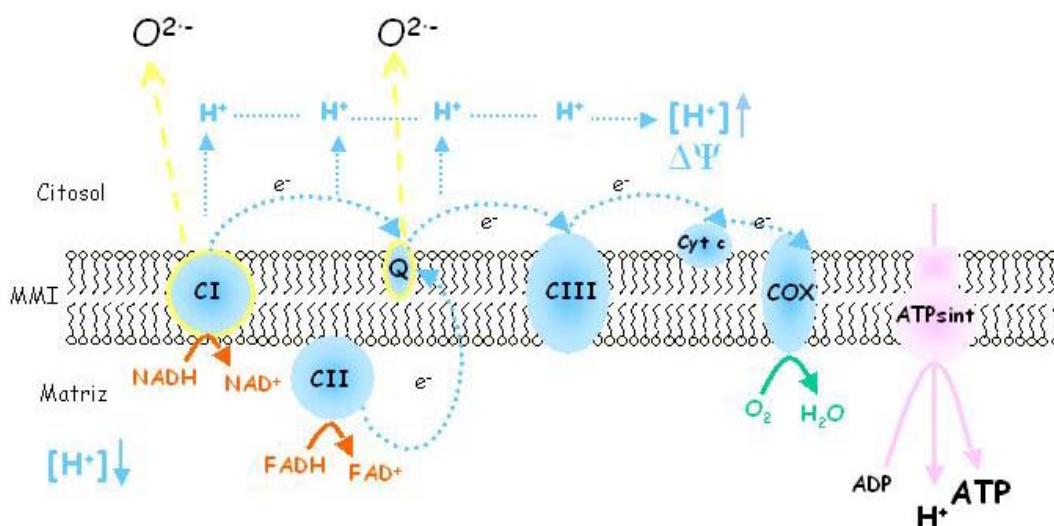


FIGURA 5: Esquema de los principales puntos de producción de ROS en la cadena respiratoria

En el **complejo III** la generación de $O_2^{\cdot-}$ se debe a la generación de la **ubisemiquinona**, un radical libre intermedio (QH^{\cdot}) formado durante el ciclo de quinonas (Q) en el sitio Q_o del complejo III (Muller et al., 2003; St Pierre et al., 2002b; Turrens, 1997). La generación de ROS se acelera por inhibidores del complejo III que actúan sobre puntos diferentes del Q_o , como por ejemplo la antimicina, debido al estancamiento de los electrones en el ciclo de quinonas. Como en el complejo I, la mayor parte del $O_2^{\cdot-}$ producido en el complejo III se produce hacia la matriz mitocondrial (St Pierre et al., 2002a). El $O_2^{\cdot-}$ generado puede liberarse al espacio intermembrana a través de poros en la membrana ya que no es capaz de atravesar las membranas biológicas. La localización

de la Cu-Zn superóxido dismutasa (SOD2) en la matriz mitocondrial y espacio intermembrana, permite la conversión del O_2^- a H_2O_2 que sí es capaz de atravesar las membranas biológicas alejándose de su lugar de producción.

La generación de ROS por la mitocondria depende exponencialmente del $\Delta\Psi$. Cuando éste es elevado, se produce un enlentecimiento del flujo electrónico a través de la cadena respiratoria, lo que favorece las reducciones incompletas del oxígeno, y la consiguiente formación de ROS. Así, aquellos factores que disminuyen el $\Delta\Psi$, como los desacoplantes químicos (Okuda et al., 1992a) o las UCPs parecen tener la capacidad de disminuir la producción mitocondrial de ROS (Arsenijevic et al., 2000a; Negre-Salvayre et al., 1997c; Vidal-Puig et al., 2000e) (apartado III.3.4).

I.2.2 ESTRÉS OXIDATIVO Y SISTEMAS ANTIOXIDANTES CELULARES

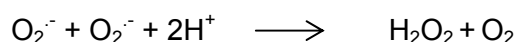
El nivel celular de ROS dependerá del balance entre la producción y la capacidad antioxidante de la célula. En condiciones fisiológicas, los efectos perjudiciales de los ROS son contrarrestados por los sistemas antioxidantes. Una producción excesiva de ROS o una disminución en la capacidad antioxidante, provoca una situación de **estrés oxidativo**. En este caso, los ROS inducen modificaciones irreversibles en las moléculas biológicas que resultan en el daño del tejido. Los ROS pueden alterar por ejemplo, la estructura y función proteica (Abate et al., 1990; Barrett et al., 1999), el DNA, causando peroxidación lipídica y la consiguiente formación de productos secundarios tóxicos, como el pentano, malondialdehído, hidroperóxidos lipídicos... (Urso and Clarkson, 2003).

Los ROS están también relacionados con la regulación del proceso de apoptosis o muerte celular programada. Aunque tradicionalmente se consideró a los ROS como a inductores de la muerte celular programada, actualmente se sabe que también pueden jugar un importante papel como mensajeros secundarios, iniciando vías de señalización encaminadas a la supervivencia celular (ver más adelante).

En la célula existen diferentes sistemas que contrarrestan la generación de ROS, ya sean los constituidos por moléculas capaces de eliminar directamente los ROS, como los basados en sistemas enzimáticos que actúan en cascada para eliminar rápidamente el O_2^- y sus metabolitos.

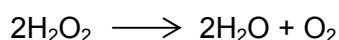
Los sistemas antioxidantes pueden clasificarse en dos tipos: los sistemas de defensa primarios y secundarios. Entre los sistemas antioxidantes primarios se

encuentran aquéllos capaces de interceptar los ROS evitando la producción de nuevos radicales libres y el daño consiguiente a estructuras celulares. Entre ellos se encuentra la superóxido dismutasa (SOD), la glutatión peroxidasa (Gpx), la catalasa y la tioredoxina reductasa. Existen cuatro formas de la **superóxido dismutasa**, Mn-SOD (SOD2), Cu,Zn-SOD (SOD1), Ni-SOD, y la SOD extracelular. Todas las superóxido dismutasas catalizan la reacción de conversión del $O_2^{\cdot -}$ a H_2O_2 :

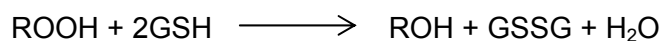


La SOD1 se localiza en el citoplasma celular, mientras que la SOD2 se encuentra en la matriz mitocondrial (Kinnula and Crapo, 2004).

Entre los sistemas antioxidantes primarios, los hay especializados en la conversión del peróxido de hidrógeno, muy reactivo, a agua. Entre ellos, se encuentran la glutatión peroxidasa y la catalasa. La **catalasa**, que se localiza en el peroxisoma, es uno de los enzimas conocidos más eficientes ya que no se satura a ninguna concentración de H_2O_2 , y cataliza la reacción de conversión de el peróxido de hidrógeno a agua:



El sistema **GSH** (Glutatión reducido) es probablemente el mecanismo de defensa celular más importante. El tripéptido GSH (γ -Glu-Cys-Gly), no solamente actúa como un *scavenger* de ROS, sino que regula el estado redox intracelular. El sistema consiste en el GSH, la glutatión peroxidasa y la glutatión reductasa. La glutatión peroxidasa cataliza la reducción del H_2O_2 y otros peróxidos convirtiendo el GSH a su forma oxidada (GSSG):



El GSSG es posteriormente reducido de nuevo a GSH por la glutatión reductasa. En condiciones normales, más del 95% del GSH celular está en forma reducida, así que el ambiente intracelular es primordialmente reductor. Una depleción en los niveles de glutatión se ha relacionado en numerosas ocasiones con el proceso de apoptosis (Higuchi, 2004; Xu and Thornalley, 2001) aunque la muerte celular no siempre va acompañada de dicha depleción.

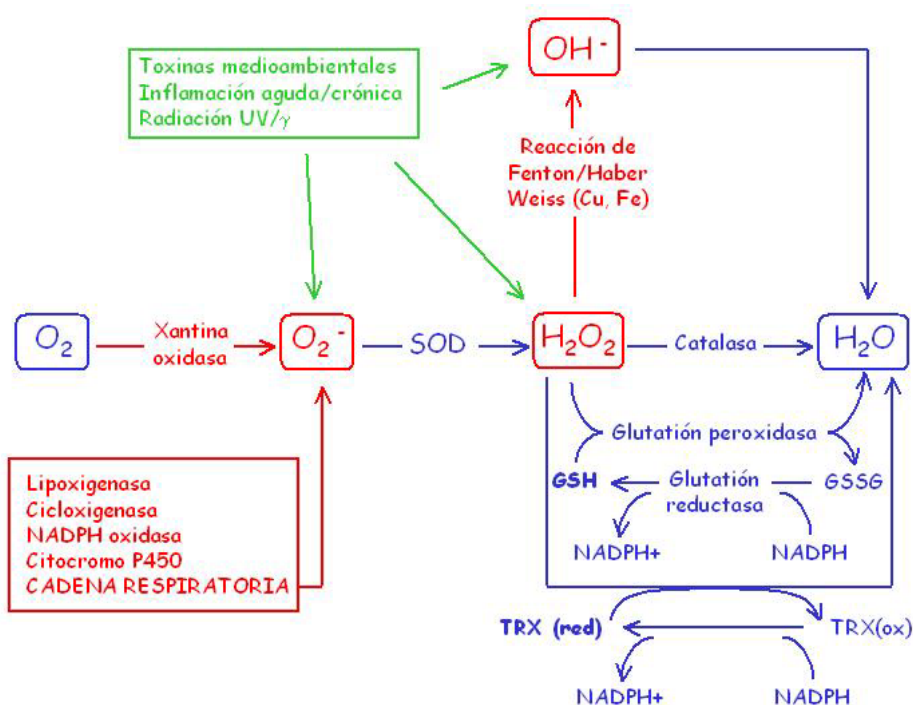


FIGURA 6: Representación esquemática de los mecanismos de generación de ROS y los sistemas antioxidantes celulares (adaptado de Mercurio and Manning, 1999). SOD: superóxido dismutasa; GSH: Glutatión reducido; GSSG: *Glutathione disulfide*; TRX: Tioredoxina.

Los sistemas antioxidantes secundarios son moléculas que actúan atrapando radicales libres evitando así, que éstos inicien reacciones en cadena que podrían dañar estructuras celulares. Algunos ejemplos son la vitamina E, vitamin C, beta-carotenos, ácido úrico, bilirrubina, y albúmina (Jacob et al., 1995).

Históricamente, se ha considerado a los ROS como subproductos tóxicos del metabolismo relacionados con numerosos procesos patológicos y con elevada capacidad para dañar proteínas, DNA y lípidos celulares. Sin embargo, cada vez más datos apuntan, a que los ROS podrían tener un papel como mensajeros secundarios implicados en regulación génica y cascadas de transducción de señal con finalidades fisiológicas (Allen and Tresini, 2000a; Sastre et al., 2000). Se sabe que cambios en los niveles celulares de ROS afectan a la actividad de MAP kinasas, vías de señalización activadas por $TNF\alpha$ o dependientes de la activación de $NF-\kappa B$ (Allen and Tresini, 2000b).

Existe también una relación entre el metabolismo energético y la producción de ROS. Elevados niveles de sustratos metabólicos (ácidos grasos, glucosa...) pueden inducir un aumento en el flujo de metabolitos hacia la mitocondria y la liberación de ROS al citoplasma (Nemoto et al., 2000; Nishikawa et al., 2000). Se cree que en este caso, los

ROS podrían ejercer un papel de señalización mediando el cambio del metabolismo oxidativo hacia uno de almacenaje. Así, los ROS podrían ser sensores metabólicos actuando como moléculas de señalización que facilitasen la comunicación entre mitocondria y citosol.

I.2.3 PATOLOGÍAS ASOCIADAS A LOS ROS

El estrés oxidativo está asociado a diversos procesos patológicos. En muchas patologías, es evidente la implicación de los ROS de origen mitocondrial, mientras que en otros muchos casos la implicación mitocondrial no está clara. A menudo, el conocer la etiopatología de uno de estos procesos, se complica por la relativa poca información existente sobre la intervención de la mitocondria en la regulación de vías apoptóticas o necróticas inducidas por estrés oxidativo.

En aquellas patologías mitocondriales causadas por alteraciones en el material genético mitocondrial, una excesiva producción de ROS y un descenso en los niveles de ATP, pueden dar lugar a alteraciones en la función mitocondrial (Wallace D.C., 1997). Una afectación de la fosforilación oxidativa puede conllevar un aumento en la producción de ROS, y por tanto, suponer un fenómeno de retroalimentación positiva hacia una situación de estrés oxidativo.

El daño oxidativo es también un fenómeno común en las enfermedades neurodegenerativas. Existen numerosas evidencias de la implicación de ROS en enfermedades como el Parkinson (Cassarino et al., 1997; Smith and Bennett, Jr., 1997), Alzheimer (Mecocci et al., 1997b; Mecocci et al., 1997a), esclerosis lateral amiotrófica (Warita et al., 2001; Wiedau-Pazos et al., 1996) Huntington (Browne et al., 1997) y ataxia de Friedrich (Pandolfo, 1998; Rotig et al., 1997), aunque el papel de los ROS y las disfunciones mitocondriales en la etiopatogénesis de estas enfermedades no está clara. En numerosas ocasiones, las deficiencias mitocondriales observadas en estas enfermedades son probablemente consecuencia, y no causa, del proceso patológico (Kirkinezos and Moraes, 2001).

El estrés oxidativo está también implicado en el origen de la aterosclerosis y las alteraciones cardiovasculares resultantes. La aterosclerosis está asociada a la oxidación de proteínas y lípidos. Por ejemplo, se considera que la oxidación de LDL es un evento temprano en la aterogénesis (Stocker and Keaney, Jr., 2004). El origen de los ROS implicados en este proceso es como en el caso de las enfermedades

neurodegenerativas, fruto de controversia (Barry-Lane et al., 2001; Cyrus et al., 1999; Mehrabian et al., 2002; Sorescu et al., 2002), pero datos recientes implican a la mitocondria en la oxidación de la LDL (Oliveira et al., 2005).

Finalmente, la capacidad de los ROS de provocar alteraciones en el material genético, sugieren una posible implicación de éstos en el origen y/o evolución de la carcinogénesis. La generación de ROS no sólo tiene capacidad de mutar el DNA sino que también puede afectar a la expresión de genes sensibles a estrés oxidativo (típicamente bajo el control de factores como NF- κ B o AP-1) (Klaunig and Kamendulis, 2004).

I.3 APOPTOSIS, UN FENÓMENO REGULADO POR LA MITOCONDRIA

La muerte celular es un proceso más de los que tienen lugar en un tejido vivo, y puede darse tanto por **necrosis** como por **apoptosis**. Aunque ambos procesos pueden coexistir en un mismo tejido, la apoptosis responde a un programa genético, y difiere en morfología, regulación e incluso significado biológico de la necrosis. Mientras los dos tipos de muerte celular suponen numerosos efectos destructivos sobre la célula que pueden estar asociados a situaciones patológicas, la apoptosis es también necesaria para garantizar el correcto desarrollo y la homeostasis tisular. De hecho, un desajuste en el control del proceso apoptótico puede conllevar defectos graves debidos bien a un exceso o a una carencia de muerte celular (Thompson, 1995). Existen unas características morfológicas típicas de la célula que sigue un programa apoptótico como son la evaginación de la membrana plasmática, la condensación de citoplasma y núcleo, la contracción celular y la fragmentación del DNA. Las evaginaciones de la membrana celular comportan la formación de los cuerpos apoptóticos, porciones de citoplasma completamente envueltos por membrana plasmática que contienen orgánulos intactos. Dichos cuerpos apoptóticos pueden ser procesados por fagocitos evitando una reacción inflamatoria (Danial and Korsmeyer, 2004).

La apoptosis puede desencadenarse en respuesta a estímulos de diferente naturaleza y procedentes del exterior o el propio interior celular. Existen dos vías principales de activación de la cascada de señalización apoptótica según dónde ésta se inicie. La vía conocida como exógena se inicia a través de la unión de ligandos a receptores de muerte celular específicos situados en la membrana plasmática, mientras que la vía endógena se origina en el interior de la mitocondria.

I.3.1 VÍA EXÓGENA DE INICIALIZACIÓN DE LA CASCADA APOPTÓTICA

El programa de muerte celular puede activarse a través de la unión de ligandos a uno o más de los **receptores** extracelulares pertenecientes a la superfamilia del receptor de factor de necrosis tumoral. Los ligandos más importantes son la citoquina $TNF\alpha$ y el ligando de Fas (FasL), presentes en las células del sistema inmune.

La unión de los ligandos a su receptor provoca la activación de las **caspasas**. Las caspasas son un grupo de cisteín-proteasas que permanecen inactivas como zimógenos, hasta que son activadas por proteólisis. Una vez activas, tienen la propiedad de activar a otras caspasas en cascada, lo que comporta la amplificación de la señal de muerte celular. Las caspasas reconocen tetrapéptidos y cortan sus substratos en la parte carboxil de un residuo aspartato. Se han caracterizado muchas caspasas que pueden clasificarse como iniciadoras o efectoras, según participen en las primeras fases de respuesta a un estímulo o en la fase final de la apoptosis, en la que se activan los mecanismos necesarios para inducir la destrucción de dianas citosólicas y nucleares, permitiendo la adquisición de las características típicas de la apoptosis (Cryns and Yuan, 1998; Hengartner, 2000a; Thornberry and Lazebnik, 1998).

La unión de FasL a su receptor secuestra la pro-caspasa-8 a la membrana celular mediante una proteína adaptadora, FADD (*Fas Associated Death Domain*) que está unida al receptor Fas. El reclutamiento de la pro-caspasa-8 forma un complejo denominado DISC (*death-inducing signalling complex*) en la membrana plasmática que resulta en la activación de la caspasa-8. Esta caspasa puede activar la caspasa-3 directamente. La caspasa-3 es considerada como un efector del proceso apoptótico ya que es capaz de romper proteínas estructurales clave, y de promover la fragmentación del DNA resultando en la muerte de la célula. Por otro lado, la caspasa-8 puede también promover la apoptosis mediante su interacción con miembros de la familia Bcl-2 que son un grupo de proteínas reguladoras del proceso apoptótico. La caspasa-8 puede truncar la proteína Bid generando un pequeño fragmento pro-apoptótico denominado tBid (*truncated Bid*). Este fragmento activo puede translocarse a la mitocondria desencadenando la liberación del citocromo c mediante su interacción con Bax, otro miembro de la familia Bcl-2 (ver más adelante) (Adams and Cory, 2002b; Gross et al., 1999; Korsmeyer et al., 2000; Lawen, 2003).

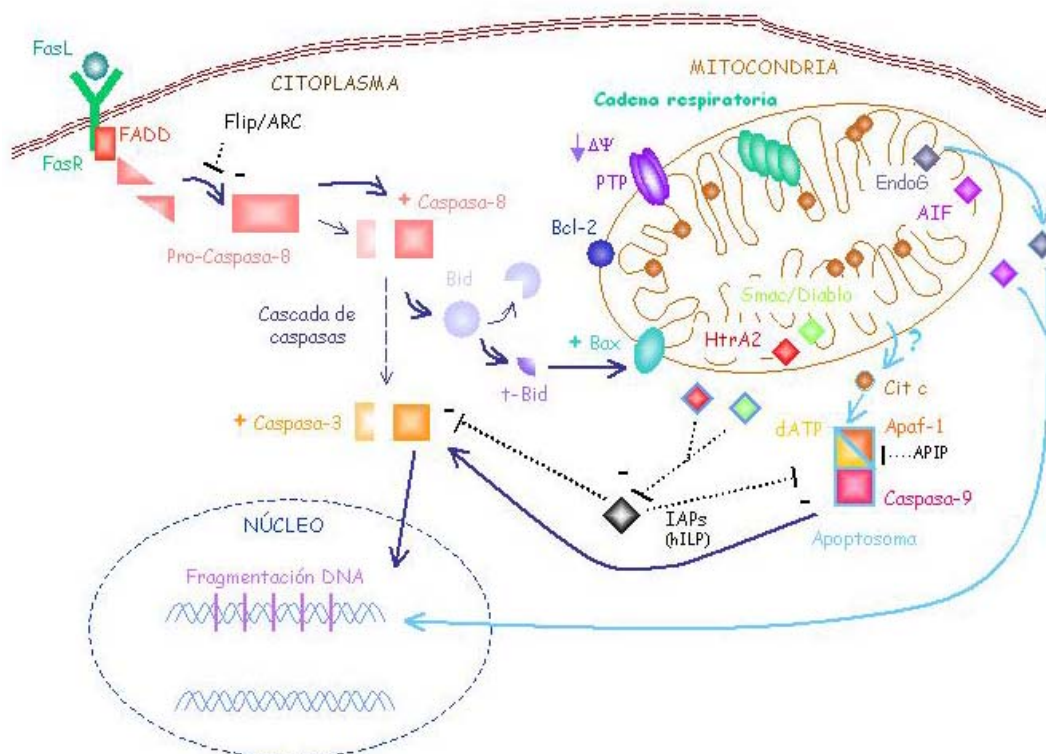


FIGURA 7: Esquema de las principales vías de apoptosis y alguno de sus inhibidores

I.3.2 VÍA ENDÓGENA DE INICIALIZACIÓN DE LA CASCADA APOPTÓTICA: LA MITOCONDRIA COMO CENTRO REGULADOR

Un evento crucial en la activación de la vía endógena de inducción de apoptosis es la **permeabilización de la membrana mitocondrial externa**. La permeabilización ocurre repentinamente en el proceso apoptótico, y conlleva la liberación de proteínas que normalmente se localizan en el espacio intermembrana mitocondrial. A menudo, la permeabilización está asociada a la disipación del potencial de membrana ($\Delta\Psi$) lo que puede tener lugar antes, durante o como consecuencia de la propia permeabilización.

La permeabilización de la membrana mitocondrial externa induce la muerte celular por tres mecanismos generales: la liberación de proteínas activadoras de caspasas, la liberación de moléculas involucradas en muerte celular independiente de caspasas, y la pérdida de funciones mitocondriales esenciales para la supervivencia celular (Green and Kroemer, 2004).

Existe controversia sobre qué señales iniciarían el proceso que desencadena la permeabilización de la membrana mitocondrial externa, pero dos mecanismos generales

han sido propuestos, uno incluyendo la participación de la membrana interna y el otro involucrando únicamente a la externa.

El primer mecanismo se basa en la formación de un poro en la membrana mitocondrial, conocido como el **poro de transición en la permeabilidad mitocondrial (MPTP, mitochondrial permeability transition pore)**, que permite el paso de agua y solutos de peso molecular de hasta 1,5 kDa. Este permite la transición de una baja permeabilidad de la membrana, a una conductancia elevada e inespecífica. Se trata de un complejo multiproteico que se situaría en la membrana mitocondrial, estableciendo puntos de contacto entre la membrana interna y externa. Sin embargo, aún hoy la naturaleza de sus componentes e incluso el hecho de que el poro esté permanentemente formado o se constituya como tal tan sólo ante determinados estímulos, es fruto de controversia.

El modelo hipotético clásico para la formación del MPTP otorga un papel principal a la Adenina Nucleótido Translocasa (**ANT, adenine nucleotide translocator**) en la membrana mitocondrial interna, y al canal aniónico dependiente de voltaje (**VDAC, voltage dependent anion channel**) o porina, en la membrana mitocondrial externa. Otras proteínas que se han considerado parte de este complejo son la hexoquinasa (**HKII**) (citoplásmica), la ciclofilina D (**Cyp-D**) (matricial), la creatina kinasa (**mtCK**) (espacio intermembrana) y el receptor periférico de benzodiazepinas (**PBR**) (membrana mitocondrial externa) (Zamzami and Kroemer, 2001).

No obstante, los verdaderos constituyentes del poro continúan siendo debatidos dado que recientemente se ha descrito la formación del poro, en mitocondrias procedentes de ratones *knock-out* para ANT (Kokoszka et al., 2004).

El Ca^{2+} favorece la apertura del MPTP y las transiciones de permeabilidad (cierre-apertura) están reguladas por factores como el potencial de membrana mitocondrial, el pH de la matriz mitocondrial, el potencial redox, nucleótidos de adenina, e iones metálicos divalentes. Finalmente, la apertura del MPTP puede ser inducida o inhibida por diversos fármacos (Zoratti and Szabo, 1995) (ver Tabla 1). La ciclosporina A (**CsA**) es un fármaco inmunosupresor que inhibe específicamente y a bajas concentraciones (por debajo del micromolar) la apertura del MPTP, a través de su interacción con la ciclofilina D (Crompton et al., 1988).

La apertura del MPTP conlleva la disipación del potencial de membrana mitocondrial lo que puede ser suficiente para provocar el hinchamiento o *swelling* de la matriz

mitocondrial y finalmente, la rotura de la membrana mitocondrial externa. Sin embargo, la apertura del MPTP puede ser transitoria (Huser and Blatter, 1999), no tratándose necesariamente de un proceso irreversible.

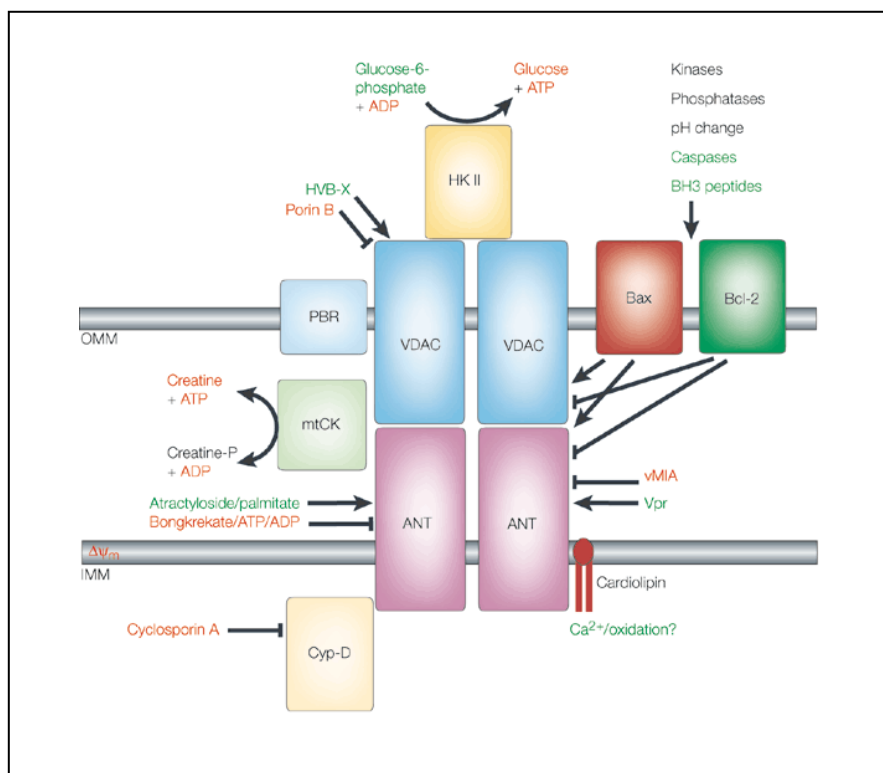


FIGURA 8: Esquema clásico de la constitución del MPTP y algunos de los moduladores de su actividad (Zamzami and Kroemer, 2001)

En muchos casos, una pérdida de $\Delta\Psi$ es un evento temprano en la cadena de acontecimientos apoptóticos, no obstante, datos recientes apuntan a que dicho descenso puede ser más una consecuencia que una causa del propio proceso de muerte celular. Así, el requerimiento del descenso de potencial, parece depender del tipo celular (Ly et al., 2003).

De hecho, el segundo mecanismo propuesto para el proceso de apoptosis dependiente de mitocondria está mediado por los miembros de la **familia Bcl-2 de proteínas reguladoras de apoptosis**, que actúan directamente sobre la membrana mitocondrial externa. Esta familia incluye miembros con actividad pro-apoptótica y anti-apoptótica que promueven o bloquean la permeabilización de la membrana mitocondrial

externa, respectivamente. Los miembros anti-apoptóticos (Bcl-2, Bcl-X_L, etc.) contienen de 3 a 4 dominios BH (regiones de homología a Bcl-2: BH1, BH2, BH3, y BH4). Entre los pro-apoptóticos, los hay que contienen de 2 a 3 regiones BH (Bax, Bak, Bcl-Xs, etc.) y otros que contienen un único dominio BH3 (Bid, Bad, Bmf, etc.), siendo estos últimos aquéllos con mayor potencial pro-apoptótico (Adams and Cory, 2002a; Hengartner, 2000b; Martinou and Green, 2001a).

Estas proteínas pueden constituir heterodímeros, modulando así sus actividades individuales. De hecho, la proporción relativa de proteínas pro- y anti- apoptóticas, parece ser relevante para determinar el destino final de una célula expuesta a un estímulo pro-apoptótico. Así, la relación Bax/Bcl-2 es habitualmente utilizada como indicativo de la sensibilidad celular a la apoptosis (Javelaud and Besancon, 2002). La actividad de estas proteínas también depende de modificaciones post-traduccionales.

Las proteínas de la familia Bcl-2 se encuentran en diversas localizaciones subcelulares que van desde la propia mitocondria hasta el retículo endoplasmático, el citoplasma, y la superficie de la membrana nuclear (Park and Hockenbery, 1996). Algunas de estas localizaciones son fijas, pero en otros casos la movilidad de estas proteínas de una a otra localización es determinante en su actividad. Muchos miembros pro-apoptóticos, como por ejemplo Bax, se encuentran en estado basal en el citoplasma, pero se translocan a la membrana mitocondrial externa ante una señal de muerte celular. Una vez en la membrana, estas proteínas oligomerizarían para constituir canales, gracias a su capacidad para interactuar con lípidos proclives a adquirir curvatura negativa en las membranas (Antonsson et al., 2001; Basanez et al., 2002), permitiendo la permeabilización de la membrana mitocondrial externa. Los miembros anti-apoptóticos de la familia, pueden interactuar con Bax, Bak, etc. impidiendo los cambios conformacionales que les permiten constituir estos canales.

Aunque inicialmente la permeabilización de la membrana sea independiente de la acción del MPTP, éste puede abrirse secundariamente (Chang et al., 2003). En estudios realizados con proteoliposomas, se ha observado que los miembros de la familia Bcl-2 pueden interactuar física o funcionalmente con posibles constituyentes del MPTP (VDAC, ANT...) modulando su actividad. Así, los miembros anti-apoptóticos como el propio Bcl-2, inhiben la conductancia a través del MPTP, mientras que Bax puede inducirla (Marzo et al., 1998; Shimizu et al., 1999). Además, interactúan con constituyentes que juegan un importante papel en el metabolismo intermediario, como por ejemplo la hexoquinasa (Harris and Thompson, 2000). Estas interacciones establecen

probablemente un nexo entre metabolismo y apoptosis, ligando el control del proceso de muerte celular a demandas metabólicas específicas.

<i>Inductores MPTP</i>
P _i y A _s _i
Agentes oxidantes
- Hidroperóxidos
- especies generadoras de radicales
Moléculas reactivas con los grupos SH
- Cd ²⁺ , Cu ²⁺ , Zn ²⁺
- Ligandos de la adenina nucleótido translocasa (carboxiatractilato, atractilato)
Agentes causantes de la depleción de nucleótidos de adenina de la matriz
- PP _i
- PEP
Agentes reductores del potencial de membrana mitocondrial
- Desacoplantes
- Lisofosfolípidos
Fatty acids
<i>Inhibidores MPTP</i>
Inhibidores de la cadena respiratoria y anaerobiosis
Substratos respiratorios
Desacoplantes
Nucleótidos de adenina (ADP,ATP)
Ligandos de la adenina nucleótido translocasa (ácido bongkrékiko)
Oligomicina
Protones
Cationes divalentes (Mg ²⁺ , Sr ²⁺ , Mn ²⁺ , Ba ²⁺) y trivalentes (La ³⁺)
Competidores de la unión por el Ca ²⁺
Secuestradores de radicales
Poliaminas (espermina y espermidina)
Carnitina y acilcarnitina
Agentes reductores de SH (DTT)
BSA
CsA

TABLA 1: Principales inductores e inhibidores de la apertura del MPTP (adaptado de Zoratti and Szabo, 1995)

La liberación de proteínas desde el espacio intermembrana, así como la pérdida de funciones mitocondriales asociada a la permeabilización de la membrana externa, promueve la activación de eventos *downstream* que finalmente conducen a la muerte celular. Cabe destacar que no está claro si todas las proteínas son liberadas al mismo tiempo (Ott et al., 2002).

También es fruto de controversia el modo en que el **citocromo c** alcanza el citoplasma. Algunos modelos proponen que dicha liberación se haría a través de los poros constituidos por miembros de la familia Bcl-2. Otros han propuesto que la liberación sería consecuencia del *swelling* y posterior ruptura de la membrana mitocondrial externa causada por la apertura del MPTP. Y un tercer modelo sugiere que la proteína se liberaría a través del propio poro de transición, posiblemente debido a cambios en su conformación en los que estarían involucrados miembros de la familia Bcl-2. (Martinou and Green, 2001b). Estos mecanismos no son mutuamente excluyentes y podrían ocurrir simultáneamente o secuencialmente en determinadas vías apoptóticas.

Una vez en el citoplasma, el citocromo c induce la muerte celular a través de la cascada de caspasas, sin embargo, otras proteínas liberadas pueden actuar como efectores de apoptosis independientes de caspasas. El citocromo c que normalmente participa en la transferencia de electrones a través de la cadena respiratoria, interacciona en el citosol con las proteínas Apaf-1 y caspasa-9 en presencia de ATP, constituyendo el **apoptosoma**, un complejo catalítico que inicia la activación en cascada de caspasas.

Con la permeabilización, también se liberan efectores de muerte celular independiente de caspasas, que son proteínas mitocondriales capaces de translocarse al núcleo y promover directamente la fragmentación del DNA (p.ej. **AIF** o *apoptosis inducing factor*, y **Endo G**) (van Gurp et al., 2003b).

La muerte celular programada es un proceso complejo altamente regulado no sólo por los miembros de la familia Bcl-2, sino también por diferentes proteínas que actúan como represores del proceso. Estos **represores de apoptosis** pueden considerarse “puntos de control” que deciden el destino celular frente a un estímulo pro-apoptótico. Existen inhibidores responsables de bloquear principalmente la apoptosis mediada por receptores, a través de su interacción con caspasas iniciadoras (p.ej. **ARC** y **FLIP**). Pero también, proteínas inhibidoras de apoptosis (**IAPs** o *inhibitors of apoptosis proteins*) que tienen dianas de inhibición tanto iniciadoras (caspasa-9) como efectoras (caspasa-3), y

pueden por tanto bloquear el proceso de muerte independiente o dependiente de regulación mitocondrial (Liston et al., 2003). Algunos factores pro-apoptóticos liberados de la mitocondria durante la permeabilización de la membrana externa actúan inhibiendo diversos IAPs (p.ej. Smac/Diablo, Omi/HtrA2) (van Gurp et al., 2003a).

I.3.3 ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO Y CONTROL MITOCONDRIAL DE LA APOPTOSIS

La apoptosis es un proceso activo de auto-destrucción que depende de la disponibilidad de ATP. De hecho, cuando los niveles de ATP son insuficientes, una célula que inicialmente estaba muriendo por apoptosis, puede finalmente morir a través de un proceso necrótico. La susceptibilidad de las células a morir por apoptosis o necrosis está fuertemente influenciada por el grado de estrés oxidativo, que como se mencionó previamente resulta de un desequilibrio entre la producción de ROS y la capacidad antioxidante. La cadena respiratoria es el principal lugar de producción de ROS en las células no fagocíticas. Otras fuentes de ROS pueden ser la radiación, sustancias químicas citotóxicas y fármacos.

Aumentos en la producción de ROS están asociados tanto a fases tempranas como tardías del proceso apoptótico, produciéndose frecuentemente como consecuencia indirecta de otros cambios que ocurren durante el proceso. Los principales aumentos en los niveles de ROS pueden detectarse en las fases iniciales de la apoptosis cuando ésta es causada por la activación de p53, ceramidas o por la acción de staurosporina o TNF α . Asimismo, los radicales libres como el peróxido de hidrógeno o el superóxido, así como amplificadores de radicales libres como el paraquat, pueden actuar como inductores de apoptosis (Raha and Robinson, 2001; Thirunavukkarasu et al., 2004). Así, se ha observado como los antioxidantes son capaces de frenar el programa de muerte celular en diferentes sistemas celulares (Fiordaliso et al., 2004; McCarthy et al., 2004; Sanvicens et al., 2004). Igualmente, un déficit en la capacidad antioxidante celular puede conducir o sensibilizar a la muerte celular programada (de Bernardo et al., 2004; Zhao et al., 2002).

El estrés oxidativo provoca un colapso global de la función mitocondrial, disminuyendo el aporte de energía a la célula y contribuyendo por tanto, a la muerte celular. Privaciones transitorias y limitadas de ATP correlacionan con apoptosis, mientras que depleciones dramáticas de ATP están más relacionadas con procesos necróticos. Sin embargo, mientras que inhibidores de la cadena respiratoria, la ATP sintasa o desacoplantes químicos, no afectan necesariamente a la viabilidad celular, es posible

inducir apoptosis en células HeLa combinando la acción de inhibidores de la respiración y desacoplantes, una situación en la que se producen gran cantidad de ROS, sugiriendo una posible acción pro-apoptótica para los ROS generados en la mitocondria (Lyamzaev et al., 2004).

La máxima producción de ROS está asociada a situaciones en que el potencial de membrana mitocondrial es elevado y por tanto el flujo a través de la cadena respiratoria es lento. La rotenona, un inhibidor del Complejo I de la cadena respiratoria, puede inducir apoptosis mediante un aumento en la producción de ROS (Li et al., 2003). Además, recientemente se ha probado como la inhibición del Complejo II de la cadena respiratoria puede inducir la liberación del Ca^{2+} intramitocondrial a través de la apertura del MPTP, probablemente debido a un aumento en la producción de ROS, conduciendo a las alteraciones motoras observadas en algunas patologías neurodegenerativas (Rosenstock et al., 2004).

Además de su conocida actividad bioenergética, la mitocondria es relevante en la homeostasis del Ca^{2+} . El Ca^{2+} a su vez, juega un importante papel en la relación de los ROS con la apoptosis dependiente de señalización mitocondrial. El Ca^{2+} intramitocondrial promueve la producción de ROS (Kanno et al., 2004), que a su vez podrían estar implicados en la apertura del MPTP inducida por Ca^{2+} (Zhao et al., 2004). Un mecanismo propuesto para explicar la apertura del MPTP inducida por Ca^{2+} está relacionado con la oxidación de la cardiolipina. La cardiolipina es un fosfolípido localizado en la membrana mitocondrial interna y que mantiene al citocromo c asociado a la cara externa de esta membrana durante la respiración. Una producción elevada de ROS podría causar un daño oxidativo sobre la cardiolipina, con las consiguientes alteraciones en la solubilidad de la membrana, la apertura del MPTP y la posterior liberación de citocromo c (Petrosillo et al., 2004).

Igualmente hay que destacar que el mantenimiento de la integridad de la membrana mitocondrial es un proceso dinámico y un estrés oxidativo severo puede comportar la apertura del MPTP. Agentes pro-oxidantes que actúan directamente sobre componentes del MPTP, sobre miembros de la familia Bcl-2, o mediante la peroxidación de proteínas o lípidos, modifican la constitución de la membrana plasmática pudiendo inducir la permeabilización de la membrana mitocondrial externa. La permeabilización conduce al hinchamiento o swelling mitocondrial y a la liberación de factores pro-apoptóticos (Le Bras et al., 2005). Además, los ROS derivados de la propia transición en la permeabilidad

mitocondrial pueden influir en eventos apoptóticos posteriores, p.ej. formación del apoptosoma durante apoptosis mediada por Fas (Sato et al., 2004).

Las especies reactivas de oxígeno están también involucradas en la modulación de la apoptosis que ejercen los miembros de la familia Bcl-2. De hecho, los ROS regulan la fosforilación y ubiquitinización de proteínas de la familia Bcl-2, resultando en niveles aumentados de proteínas pro-apoptóticas (Li et al., 2004). Además, Bcl-2 (o Bcl-xL) puede actuar como un agente antioxidante bloqueando un evento dependiente de ROS en la cascada de señalización apoptótica ya sea afectando a la producción de ROS (Gottlieb et al., 2000; Kane et al., 1993) o previniendo el daño oxidativo de constituyentes celulares (Hockenbery et al., 1993) mediante la inducción de antioxidantes celulares endógenos (Steinman, 1995).

Finalmente, los ROS pueden promover la apoptosis de forma independiente mediante su interacción con macromoléculas biológicas (p.ej. lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y carbohidratos), como hemos descrito anteriormente para la cardiolipina. Las interacciones de los ROS con estas moléculas genera radicales secundarios nuevos, iniciando una cadena continua de reacciones que puede conducir a la peroxidación lipídica, el daño del DNA, la inhibición del crecimiento o la muerte celular, como ya hemos indicado (Kannan and Jain, 2000). El daño del DNA puede ser particularmente relevante para el DNA mitocondrial. El genoma mitocondrial es más susceptible al daño oxidativo que el genoma nuclear debido a la carencia de proteínas protectoras, a la baja eficiencia de los mecanismos de reparación del DNA mitocondrial, y la proximidad de la cadena respiratoria (Fosslie, 2001). Las alteraciones en el DNA mitocondrial pueden disminuir progresivamente la función mitocondrial.

Es importante remarcar que los ROS no deben ser considerados únicamente promotores de la muerte celular. De hecho, los ROS pueden tener efectos beneficiosos para la supervivencia celular cuando no exceden su capacidad detoxificante. Estas propiedades beneficiosas de los ROS para la supervivencia celular están esencialmente relacionadas con su capacidad para actuar como segundos mensajeros en el interior celular (Fleury et al., 2002; Herrlich and Bohmer, 2000). Una importante prueba que sugiere un papel de los ROS como segundos mensajeros, es su capacidad para activar a NF- κ B. Este factor de transcripción regula la expresión inducible de varios genes involucrados en la supervivencia celular. NF κ B regula genes tanto anti-apoptóticos como Bcl-2, como factores pro-apoptóticos como Bax y p53 (Karin and Lin, 2002c). Recientemente, se ha observado como la eliminación de ROS promueve la muerte

celular en diferentes situaciones, sugiriendo que el estrés oxidativo podría promover mecanismos de señalización esenciales para la supervivencia celular (Haendeler et al., 2004; Kim et al., 2005; Vaquero et al., 2004). De hecho, la exposición del corazón a ROS mediante isquemias intermitentes, un proceso conocido como pre-condicionamiento, inicia diferentes vías de señalización (p.ej. NF- κ B, cascadas de MAP kinasas...) que pueden convertir una señal inicial de muerte celular en una señal de supervivencia, disminuyendo el daño subsiguiente a la isquemia/reperfusión (Das and Maulik, 2004; Ravati et al., 2001). Asimismo, los ROS inducen la expresión de defensas antioxidantes como la tioredoxina (Prieto-Alamo et al., 2000) que se sabe puede proteger las células del miocardio contra el daño causado por la hipoxia-reoxigenación (Isowa et al., 2000).

I.3.4 EL FACTOR NF- κ B. UN NEXO ENTRE ESTRÉS CELULAR Y NÚCLEO

La familia de factores de transcripción NF- κ B (*nuclear factor kappa B*) controla la expresión de genes implicados en la respuesta inflamatoria, la inmunidad adaptativa, la supervivencia y proliferación celulares, la angiogénesis, y la carcinogénesis. Esta familia de factores comparte un dominio denominado de homología Rel, que contiene la secuencia de localización nuclear y está relacionado con la unión al DNA. Los miembros de esta familia actúan como dímeros que se translocan al núcleo en respuesta a un estímulo, activando la expresión de genes que incluyen secuencias de unión NF- κ B en sus promotores. Los mamíferos expresan cinco proteínas Rel que se subdividen en dos clases. En el primer grupo se encuentran RelA (p65), c-Rel y RelB, que se sintetizan como proteínas maduras. El segundo está codificado por los genes Nfkb1 y Nfkb2 que se sintetizan como precursores de gran tamaño, pero inactivos (p105 y p100), y cuya proteólisis da lugar a las formas maduras y activas que son p50 y p52.

Pueden formarse muchas combinaciones de dímeros entre los distintos miembros de la familia, pero el heterodímero formado por p50-p65 constituye el factor de transcripción NF- κ B prototípico y se encuentra en un gran número de tipos celulares (Baeuerle and Baltimore, 1996).

La actividad de transcripción NF- κ B (de los dímeros que contienen RelA o c-Rel), está regulada mediante otras familias de proteínas. Estos dímeros se mantienen inactivos en el citoplasma a través de su interacción con inhibidores específicos denominados I κ Bs. Estos inhibidores sufren una rápida degradación proteosómica una vez fosforilados por la kinasa I κ B (complejo IKK) que se activa ante variedad de estímulos. El complejo

IKK está constituido por dos subunidades catalíticas (IKK α y IKK β) que fosforilan a I κ B, y una reguladora (IKK γ o NEMO). Una vez degradada I κ B, el dímero NF- κ B es libre de translocarse al núcleo. Allí, pueden sufrir otras modificaciones, principalmente fosforilaciones, que pueden modular su actividad transactivadora (Aggarwal, 2004; Karin and Lin, 2002b).

Son diversos los estímulos que pueden activar la cascada de señalización dependiente de NF- κ B, algunos vía receptor específico (por ejemplo TNF α), y otros como los ROS que actúan independientemente de receptor (Soares et al., 1998).

El hecho de que la ausencia de NF- κ B sensibilice a la apoptosis inducida por TNF α , puso en evidencia el relevante papel de este factor en la inhibición de la muerte celular. Este factor de transcripción ejerce su actividad anti-apoptótica induciendo la expresión de diversos genes implicados en la supervivencia celular, como inhibidores celulares de apoptosis (c-IAPs), inhibidores de la activación de caspasas (c-FLIP), miembros de la familia Bcl-2 (A1, Bcl-X_L), TRAF1 y TRAF2, inhibidores de la activación de Jnk (XIAP, GADD45 β), MnSOD (Karin and Lin, 2002a; Wong et al., 1989).

Si los genes inducidos por NF- κ B van encaminados hacia la supervivencia celular, han de existir mecanismos que limiten su inducción o actividad ante un estímulo pro-apoptótico. A menudo, las proteínas implicadas en la activación de NF- κ B, o los productos génicos resultado de su acción en el núcleo, son substratos de las caspasas, y son por tanto proteolizados e inactivados durante la cascada apoptótica (Karin and Lin, 2002d; Kucharczak et al., 2003). Es posible incluso que NF- κ B conserve su capacidad de unión al DNA pero sea incapaz de transactivar como resultado de dicha proteólisis (Levkau et al., 1999).

A pesar de que la mayoría de datos sugieren un papel primordialmente anti-apoptótico de NF- κ B, cada vez más datos evidencian que en ciertos tipos celulares y condiciones, NF- κ B podría contribuir a la inducción de factores pro-apoptóticos (Kasof et al., 2001; Ravi et al., 2001; Zheng et al., 2001).

Clásicamente, se ha considerado que uno de los estímulos capaces de modular la actividad del factor NF- κ B es el estrés oxidativo. El H₂O₂ es capaz de inducir la activación del factor, mientras que los antioxidantes pueden inhibirlo. Sin embargo, estos efectos dependen de forma crítica del tipo celular y el estímulo que origina la respuesta. De

hecho, se ha comprobado que algunos antioxidantes ejercen su acción inhibitoria sobre NF- κ B de forma indirecta, actuando sobre otras dianas y de forma independiente de un efecto antioxidante directo (Bowie and O'Neill, 2000; Mercurio and Manning, 1999).

I.3.5 LIPOAPOTOSIS: PAPEL DE LOS ROS EN EL EFECTO DE LOS ÁCIDOS GRASOS SOBRE LA APOPTOSIS

Los ácidos grasos de cadena larga, particularmente el palmitato, se comportan como importantes activadores de la apoptosis en diferentes tipos celulares, que van desde las células β -pancreáticas hasta los cardiomiocitos. El término "lipoapoptosis" se acuñó para describir el proceso apoptótico inducido por ácidos grasos (Listenberger and Schaffer, 2002; Unger and Orci, 2002). Se cree que, cuando la entrada de un ácido graso a una célula excede su capacidad oxidativa, éste entra en otras vías metabólicas, principalmente la esterificación a triglicéridos. Los triglicéridos en baja cantidad no son particularmente perjudiciales para la mayoría de tipos celulares, pero son una fuente de ácidos grasos a través de la lipólisis. Los ácidos grasos intracelulares promueven vías que sí pueden resultar deletéreas, como la apoptosis. La ceramida es un importante mediador intracelular de la acción de los ácidos grasos en la apoptosis. Ésta también media la respuesta a otros estímulos pro-apoptóticos como el TNF α o la staurosporina. La interacción del palmitoil-CoA con la serina activa la síntesis *de novo* de ceramida, lo que a su vez activa la producción de especies reactivas de nitrógeno y probablemente de ROS, ya que este tipo de moléculas puede estar directamente relacionado con el proceso de apoptosis. No obstante, el palmitato puede inducir la producción de ROS por mecanismos independientes de la síntesis de ceramida. Así, incrementos en los ROS pueden ser resultado directo de los efectos de los ácidos grasos a través de alteraciones en la cadena respiratoria mitocondrial y el desacoplamiento (Carlsson et al., 1999) o a través de vías extramitocondriales como las actividades NADPH oxidasa (Inoguchi et al., 2000).

Sin embargo, la acción del palmitato sobre la apoptosis no es siempre dependiente de ROS (Hickson-Bick et al., 2002). Otro mecanismo propuesto para explicar los efectos de los ácidos grasos sobre la apoptosis se basa en la posible interacción directa de estas moléculas con componentes de la mitocondria. Los ácidos grasos se unen a membranas y tienen la capacidad de alterar su permeabilidad, lo que podría favorecer el desacoplamiento, e inducir la apertura del MPTP, activando así toda la cascada de eventos apoptóticos (Kong and Rabkin, 2000; Penzo et al., 2002b). La capacidad e intensidad con la que los ácidos grasos desencadenan estos efectos parece estar

determinada por la naturaleza del ácido graso en concreto (longitud, grado de saturación,...) y por el resto de mecanismos involucrados en el proceso. Así, tanto el ácido araquidónico como el ácido palmítico abren el MPTP, pero la acción del primero es más directa. De hecho, el ácido araquidónico que se origina en el citosol como resultado de la actividad fosfolipasa A(2), se ha sugerido como mediador de la apertura del MPTP en respuesta al $TNF\alpha$ (Penzo et al., 2004).

Los procesos lipoapoptóticos constituyen un ejemplo de interacción entre el metabolismo de los ROS y la apoptosis, y son especialmente relevantes en enfermedades como la diabetes, lipoatrofia del tejido adiposo o cardiomiopatías, que suponen alteraciones en el metabolismo y disponibilidad de lípidos. No obstante, el potencial apoptótico de los ácidos grasos no es siempre deletéreo, y de hecho pueden resultar beneficiosos a largo plazo. Datos epidemiológicos establecen que la ingestión de ácidos grasos de larga cadena poliinsaturados omega-3, como el ácido docosahexaenoico o eicosapentanoico, abundantes en aceites de pescado, tiene efectos positivos sobre algunas alteraciones y patologías humanas, incluyendo enfermedades cardiovasculares y cáncer (Tapiero et al., 2002). Aunque la acción de los ácidos grasos omega-3 es compleja y en ella intervienen numerosas vías de señalización integradas, estudios recientes en células cancerosas sugieren que el ácido docosahexaenoico induce el paro del ciclo celular y la apoptosis a través de mecanismos que involucran a Bcl-2 y a la regulación de la salida del citocromo c de la mitocondria (Siddiqui et al., 2004).

II. EL MÚSCULO ESQUELÉTICO

La formación del músculo esquelético durante la embriogénesis recibe el nombre de **miogénesis**. Durante la miogénesis se producen dos acontecimientos clave: determinación y diferenciación. La **determinación** es el proceso mediante el cual, las células pluripotentes embrionarias se determinan a linaje miogénico. Las células mesodérmicas del somita reciben señales específicas de los tejidos que las envuelven para determinar diferentes linajes celulares, entre ellos, las células precursoras del músculo o **mioblastos**. Mediante la **diferenciación**, los mioblastos adquieren un fenotipo específico de músculo. Los mioblastos proliferan, en algunos casos migran, y se alinean, deteniendo la proliferación e induciendo la expresión de genes necesarios para el desarrollo y funciones musculares, al mismo tiempo que se fusionan formando sincitios, y dando lugar a los **miotubos** diferenciados.

Determinación y diferenciación son procesos complejos influenciados por múltiples vías, que regulan positiva o negativamente la expresión de genes reguladores y estructurales que confieren al músculo esquelético su fenotipo. Entre los factores activadores de la miogénesis se encuentran los miembros de la familia Mef-2 (*myocyte enhancer factor-2*) y los de la familia MRF (*muscle regulatory factors*) y entre los represores, proteínas como Id, Zeb, Mist1, etc. (Arnold and Winter, 1998; Molkenin and Olson, 1996; Yun and Wold, 1996).

II.1 LOS ROS EN LA FISIOLÓGÍA DEL MÚSCULO ESQUELÉTICO

II.1.1 PAPEL DE LOS ROS EN LA FISIOLÓGÍA MUSCULAR

Los ROS juegan un papel modulador en la fisiología del músculo esquelético. En el músculo de un individuo sano, los ROS se generan permanentemente interviniendo en la regulación de procesos que van desde el desarrollo hasta el metabolismo, y desde el riego sanguíneo hasta la función contráctil.

El músculo en reposo produce O_2^- y esta producción aumenta drásticamente ante la **contracción**. Los diferentes sistemas antioxidantes presentes en la célula se encargan de la protección del músculo frente al daño oxidativo que podría seguir a esta elevada producción. Entre los sistemas antioxidantes no enzimáticos que intervienen en dicha protección parece tener un importante papel el glutatión reducido que se encuentra en una elevada concentración en el músculo esquelético (0.5 - 3 mM).

Los ROS tienen un efecto bifásico sobre la actividad contráctil del músculo esquelético. Los bajos niveles de ROS que se dan durante el reposo son esenciales para la producción normal de fuerza. De hecho, la depleción de ROS provoca un descenso en la fuerza, mientras que un suplemento modesto de ROS induce un aumento en la fuerza de contracción. Sin embargo, a dosis elevadas, el efecto beneficioso se revierte y la fuerza de contracción decae con la producción de ROS de forma tiempo- y dosis-dependiente. Los efectos perjudiciales derivados del estrés oxidativo pueden inhibirse con un pre-tratamiento con antioxidantes o revertirse por la administración de agentes reductores *post-hoc* (Reid, 2001a). El aumento en la generación de ROS que ocurre durante el ejercicio extenuante contribuye al desarrollo de la fatiga aguda muscular. Los ROS derivados del músculo se generan tan rápido que sobrepasan la capacidad antioxidante de la fibra muscular, y con el acúmulo de ROS se da la inhibición consiguiente de la fuerza de contracción.

No es esperable que un único aporte de ROS sea responsable de toda la producción generada por el músculo durante el ejercicio (Stofan et al., 2000). El aumento en el nivel de ROS intracelulares durante la contracción repetitiva, parece estar mediada por la isoforma de 14 kDa de la fosfolipasa A2, PLA₂ (Nethery et al., 1999c) y depende de la afluencia de calcio intracelular (Supinski et al., 1999). El ejercicio físico incrementa la demanda, y con ello el flujo, de oxígeno al músculo activo. Como la producción de O₂⁻ en la mitocondria depende de la tensión de oxígeno, se supone que es un punto clave en el aumento de ROS durante el ejercicio. Además, se ha observado que las mitocondrias de músculo liberan peróxido de hidrógeno. El calcio y la disminución en inhibidores de la PLA₂ estimulan la producción de ROS en las mitocondrias (Nethery et al., 1999b). Igualmente, otros datos indican que la mitocondria es la principal fuente de ROS en el músculo estimulado por TNF α . Así, parece que la mitocondria es la principal fuente de ROS en el músculo esquelético y que la PLA₂ juega un importante papel en la regulación de la producción de ROS (Li et al., 1999).

Un mecanismo alternativo mediante el cuál el ejercicio puede inducir la producción de ROS son los procesos de isquemia-reperfusión. El ejercicio intenso está relacionado con periodos de hipoxia tisular transitoria en diversos órganos cuando la sangre se desvía para cubrir las necesidades del músculo activo y la piel. Las fibras musculares pueden también padecer de una hipoxia relativa, cuando el aporte de oxígeno es insuficiente para cubrir las demandas energéticas del músculo (Koyama et al., 1999c). La posterior re-oxigenación de estos tejidos ocurre tras finalizar el ejercicio y está asociada a una inducción de la producción de ROS (Koyama et al., 1999b; Packer, 1997a). Existen varios mecanismos para explicar dicha producción de ROS. Una de ellos es la conversión del enzima xantina deshidrogenasa a xantina oxidasa. Ambas enzimas son formas diferentes de un mismo producto génico y difieren en la presencia de un lugar de unión a NAD⁺ exclusivamente en la forma deshidrogenasa. Estas enzimas catalizan la degradación de la hipoxantina a xantina, y consecuentemente a ácido úrico, sólo la xantina oxidasa produce O₂⁻ en el último paso de esta reacción, porque el NAD⁺ estabiliza la flavin-semiquinona que interviene en la reacción. Ambas formas enzimáticas pueden interconvertirse por la oxido-reducción de determinados residuos de cisteína (Hille and Nishino, 1995). Dicho mecanismo produce ROS varias horas después del ejercicio, y no está restringido al músculo esquelético (Koyama et al., 1999a).

Entre las adaptaciones fisiológicas del músculo al ejercicio está la regulación de la expresión génica (Packer, 1997b; Sen and Packer, 1996). El músculo incrementa la

expresión de enzimas antioxidantes como la glutatión peroxidasa, la superóxido dismutasa y la catalasa (Powers et al., 1999). Esta respuesta génica es bloqueada por antioxidantes, por lo que los propios ROS parecen mediar la señalización (Jackson et al., 1999; Khassaf et al., 2005). Además, se ha propuesto que los ROS podrían estimular la biogénesis mitocondrial (Davies et al., 1982).

II.1.2 LOS ROS EN LA PATOLOGÍA DEL MÚSCULO ESQUELÉTICO

La producción de ROS por el músculo esquelético puede estar alterada por múltiples factores distintos a la contracción o el ejercicio, y una situación de estrés oxidativo puede a su vez desencadenar un proceso patológico. Por ejemplo, el envejecimiento parece aumentar la cantidad de ROS a la que está expuesto el músculo esquelético (Fulle et al., 2004). El daño muscular debido a la reperusión o a un exceso de fuerza, también resulta en estrés oxidativo y puede estar asociado a una pérdida de función. De hecho, tras un daño o carga mecánica, las células musculares se convierten en una fuente importante de factores solubles que influyen tanto la quimiotaxis de neutrófilos como su producción de ROS (Tsivitse et al., 2005).

El músculo puede también experimentar estrés oxidativo en procesos inflamatorios como la miopatía hipertiroidea, sepsis, paro cardíaco y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (Reid, 2001b). La generación de ROS está muy estimulada durante la contracción del diafragma en animales con sepsis tratados con endotoxinas (Nethery et al., 1999a). En los pacientes de paro cardíaco se suelen observar anomalías metabólicas e intolerancia al ejercicio. Esto podría explicarse por un exceso en la generación de ROS en estas circunstancias. De hecho, los músculos de extremidades pertenecientes a animales que han sufrido una crisis cardíaca e infarto muestran un incremento en la producción de ROS sin modificación de la actividad de los sistemas enzimáticos antioxidantes (Tsutsui et al., 2001). Del mismo modo, los pacientes con distrofias (Rodríguez and Tarnopolsky, 2003) o miopatía alcohólica crónica (Preedy et al., 2002) también muestran estrés oxidativo en sus fibras musculares, y el tratamiento con antioxidantes resulta efectivo en la prevención de alguna de las alteraciones musculares esperables para estas patologías (Mansouri et al., 2001).

II.2 EL PROCESO DE APOPTOSIS EN EL MÚSCULO ESQUELÉTICO

II.2.1 PARTICULARIDADES DEL MÚSCULO ESQUELÉTICO EN CUANTO A LA APOPTOSIS

El músculo esquelético plenamente diferenciado puede desencadenar el programa de muerte celular ya sea en respuesta a un estímulo fisiológico concreto o como parte de un proceso patológico. Aunque los estudios sobre las vías apoptóticas y su regulación en células musculares diferenciadas son escasos, algunos mecanismos descritos son similares a los encontrados para otros tipos celulares (McArdle et al., 1999).

Los miotubos diferenciados poseen unas particularidades que convierten al músculo esquelético en un tejido único en cuanto al desarrollo y regulación del proceso apoptótico:

- Las células musculares son plurinucleares y los mionúcleos pueden desencadenar apoptosis de forma individual, afectando a una región limitada del sarcoplasma y manteniendo la función e integridad celulares. Es probable que la apoptosis de mionúcleos individuales y la degradación de la región sarcoplasmática bajo su control, contribuya al desarrollo de atrofia en las fibras musculares (Borisov and Carlson, 2000b; Tews et al., 1997).
- El contenido en mitocondrias presente en los miotubos varía en función del tipo de fibra muscular y del nivel de entrenamiento.

Además, el músculo esquelético contiene dos subpoblaciones mitocondriales diferenciables tanto bioquímica como morfológicamente, las mitocondrias intermiofibrilares y las subsarcolémicas, localizadas entre las miofibrillas y bajo el sarcolemma respectivamente. Estos dos tipos mitocondriales presentan características diferenciales como un mayor contenido en cardiolipina y una tasa de respiración en estado 3 superior en las mitocondrias intermiofibrilares (Cogswell et al., 1993). Por ello, podrían tener un comportamiento diferencial ante a un estímulo pro-apoptótico común.

II.2.2 PROCESO DE APOPTOSIS EN LA DIFERENCIACIÓN MUSCULAR, Y ADQUISICIÓN DE RESISTENCIA A LA MUERTE CELULAR

La adquisición de la resistencia a apoptosis característica de las células musculares diferenciadas, forma parte del propio proceso de miogénesis. Los mioblastos son células madre que se reincorporan al ciclo celular. Ante un determinado estímulo puede desencadenarse un proceso apoptótico, mediante el cuál aquellas células no dañadas son seleccionadas para iniciar el programa de diferenciación muscular (Sandri and Carraro, 1999). En las primeras fases del proceso de diferenciación, las células musculares abandonan de forma irreversible el ciclo celular. De hecho, la retirada del ciclo celular es un prerrequisito para que los factores de transcripción miogénicos promuevan la adquisición del fenotipo contráctil, y confiere a las células musculares maduras, resistencia a la apoptosis.

Como hemos mencionado previamente, la miogénesis es promovida por factores de transcripción pertenecientes a la familia de los MRF (*muscle regulatory factors*) como MyoD y miogenina, cuya inducción comporta la determinación de las células a seguir el programa de diferenciación muscular. Estos factores miogénicos activan la expresión de proteínas como p21, un inhibidor de diferentes ciclinas dependientes de kinasa (cdk), induciendo de este modo la salida del ciclo celular (Walsh and Perlman, 1997).

La inhibición de la actividad cdk resulta en la defosforilación de la proteína de retinoblastoma (pRb) (Wang et al., 1997) lo que conlleva la represión de los factores de transcripción E2F. La actividad cdk garantizaba el progreso en el ciclo celular y la sensibilización a la apoptosis (Nahle et al., 2002). Así, una vez establecido el estado post-mitótico, las células menos susceptibles a la apoptosis pueden adquirir un fenotipo diferenciado caracterizado por la expresión de la cadena pesada de miosina (*myosin heavy chain*, MHC). Finalmente, las células pueden fusionarse para constituir miotubos multinucleados. Esta estrecha coordinación entre proliferación celular y apoptosis, proporcionaría al organismo adulto un mecanismo para limitar la proliferación de los precursores miogénicos durante la embriogénesis.

Durante la diferenciación se produce una activación de la serin-treonin kinasa, Akt dependiente de la acción de PI3K (fosfatidilinositol-3-kinasa) (Fujio et al., 1999). Esta proteína fosforila, e inhibe, a proteínas implicadas en la apoptosis, como Bad y Procaspasa-9, promoviendo así la supervivencia celular (Cardone et al., 1998; Datta et al., 1997; del Peso et al., 1997). Por otro lado, Bcl-2, con actividad anti-apoptótica, se

expresa preferencialmente en las células no-diferenciadas, promoviendo la expansión clonal de mioblastos (Dominov et al., 1998).

Así, las fibras del músculo esquelético muestran una gran resistencia a la apoptosis. Ésta podría deberse a la presencia de represores apoptóticos en elevadas concentraciones. Es el caso, por ejemplo, de la proteína **FLIP** (*Fas-associated death domain-like IL-1-converting enzyme-inhibitory protein*), que se expresa de forma muy importante en músculo esquelético, siendo responsable de la resistencia de este tejido a la apoptosis mediada por Fas durante la miositis (Nagaraju et al., 2000). De igual modo, el músculo expresa elevados niveles de **ARC** (*apoptosis repressor with caspase recruitment domain*) que interacciona selectivamente con la caspasa-8 impidiendo su actividad. En humanos, la expresión de ARC se limita a músculo esquelético y cardíaco (Koseki et al., 1998) dónde actúa como un inhibidor de apoptosis. ARC inhibe, no solamente los procesos apoptóticos dependientes de caspasa, sino que también puede bloquear vías apoptóticas independientes de estas enzimas. Además, ARC puede impedir la necrosis preservando la función mitocondrial (Neuss et al., 2001) e interaccionando con Bax (miembro pro-apoptótico de la familia Bcl-2 (Gustafsson et al., 2004a). Recientemente, un nuevo represor de apoptosis, **APIP** (*Apaf-1-interacting protein*) ha sido implicado en la regulación de los primeros estadios de la apoptosis muscular. Concretamente, APIP compete con la procaspasa-9 por la unión a Apaf-1, inhibiendo de este modo, los procesos que siguen a la liberación del citocromo c de la mitocondria. Esta proteína se expresa de forma importante en músculo esquelético y cardíaco, dónde es capaz de inhibir la muerte celular inducida por isquemia (Cho et al., 2004). El músculo esquelético también muestra elevados niveles de otro represor de apoptosis como es el **hILP** (*human IAP-like protein*, también llamada XIAP), capaz de bloquear la apoptosis en un punto previo o posterior a la activación de caspasas. Pese a que la muerte celular programada ha sido relacionada con diversas miopatías y otros procesos patológicos (ver más adelante), existe consenso al considerar que las fibras musculares no muestran signos de apoptosis en las miopatías inflamatorias (Schneider et al., 1996; Tews and Goebel, 1998). Se considera que los elevados niveles de expresión de la proteína hILP podrían ser la razón que explique la rara incidencia de apoptosis en las miopatías inflamatorias de células T (Li and Dalakas, 2000).

II.2.3 PATOLOGÍAS DEL MÚSCULO ESQUELÉTICO RELACIONADAS CON APOPTOSIS

En el músculo esquelético, y a pesar de su resistencia a la apoptosis, existen evidencias de apoptosis en numerosas miopatías (Dalla et al., 2001; Fernandez-Sola et al., 2003; Lee et al., 2001) y en procesos fisiológicos como el envejecimiento o incluso el ejercicio.

La suspensión de las extremidades, la microgravedad, y la inmovilización del músculo esquelético son modelos animales establecidos para la inducción de atrofia muscular. Un ejemplo son los modelos en los que se induce una hipertrofia o atrofia muscular sometiendo al músculo a la carga o descarga, respectivamente, de un peso. La pérdida de masa muscular asociada a los modelos de descarga o **inmovilización** del músculo, coincide tanto con una reducción de mionúcleos por miofibra, como con un aumento en la incidencia de la fragmentación de DNA. Sin embargo, estos mecanismos apoptóticos parecen afectar a mionúcleos individuales y no tanto a la fibra muscular completa (Allen et al., 1997; Smith et al., 2000). Un estudio reciente muestra como la expresión de la proteína inhibidora de la diferenciación-2, un regulador negativo de la familia de factores de transcripción miogénicos, correlaciona con la retirada de peso en los modelos de descarga muscular, sugiriendo una implicación de esta proteína en la apoptosis (Alway et al., 2003). Por otro lado, se cree que tanto el ejercicio como el tratamiento con IGF-1/GH , juegan un papel en la mediación de la supervivencia celular dentro del músculo esquelético, ya que atenúan la presencia de mionúcleos apoptóticos (Lawlor and Rotwein, 2000).

Igualmente, la **microgravedad** induce la expresión de p53 que a su vez incrementa la expresión de Bax. Este aumento está posiblemente relacionado con el desarrollo de apoptosis y la consecuente atrofia muscular (Ohnishi et al., 1999).

La **denervación** del músculo esquelético resulta en una atrofia progresiva similar a la descrita para los casos de descarga muscular. De hecho, la atrofia observada durante la denervación presenta las manifestaciones clásicas de la apoptosis, aunque los miocitos pierden la viabilidad mucho tiempo después de ser interrumpida cualquier influencia del nervio sobre el tejido muscular, y de que no se observa fragmentación de DNA a gran escala (Borisov and Carlson, 2000a).

Incluso las quemaduras musculares pueden mostrar signos de apoptosis (Yasuhara et al., 2000), por lo que la muerte celular programada parece ser un mecanismo generalizado en la pérdida de fibras musculares, a pesar de que existan trastornos neuromusculares para los que no se han hallado evidencias de apoptosis, (como por ejemplo en la miopatía miofibrilar (Amato et al., 1999).

En el músculo esquelético, el **envejecimiento** conlleva una pérdida de masa muscular (sarcopenia) conjuntamente a una serie de anomalías bioquímicas y morfológicas. Algunos han sugerido que la afectación de macromoléculas por ROS acumulada durante toda la vida del organismo, podría estar relacionada con el proceso del envejecimiento, posiblemente a través de la inducción de apoptosis. De hecho, se sabe que la apoptosis incrementa con la edad en el músculo esquelético de rata por una vía dependiente de la actividad caspasa-9, indicando un control mitocondrial del proceso (Dirks and Leeuwenburgh, 2002).

El daño muscular puede tener su origen en un proceso de isquemia seguido de reperfusión. Mientras que las pruebas de apoptosis en los procesos de **isquemia/reperfusión** que tienen lugar en músculo cardíaco son numerosas, los datos en músculo esquelético son contradictorios. No obstante, el mecanismo que interviene en el proceso de daño, parece estar directamente relacionado con la producción de ROS durante la reperfusión. El tejido que sufre un aporte de oxígeno deficiente durante la fase de isquemia, recibe con la reperfusión un incremento repentino en la concentración de oxígeno, lo que provoca un aumento súbito y transitorio en la producción de ROS (Adhihetty P.J. and Hood D.A., 2003).

Un nivel de **ejercicio excesivo** o superior al que el músculo está sometido habitualmente, puede inducir un aumento en la fragmentación del DNA (Podhorska-Okolow et al., 1998). De hecho, el ejercicio intenso puede provocar alteraciones en el metabolismo muscular que influyen a la función mitocondrial. Durante el ejercicio, la producción de ROS se eleva debido a la aceleración de la fosforilación oxidativa, el descenso del pH a causa de la acumulación de protones y lactato, y al aumento de la concentración de Ca^{2+} . Todos estos factores pueden afectar a la actividad del poro de transición en la permeabilidad mitocondrial (*MPTP*), lo que puede conducir a la permeabilización de la membrana mitocondrial externa con la consecuente liberación de factores pro-apoptóticos al citoplasma (Rasmussen et al., 2001).

Por otro lado, el ejercicio puede inducir la expresión de la proteína hsp70 (*heat shock protein 70 kDa*) tanto en músculo cardíaco como en esquelético (Ornatsky et al., 1995). Esta proteína es capaz de inhibir vías apoptóticas tanto dependientes como independientes de caspasas, actuando como un mecanismo protector frente a la inducción de muerte celular. Por ello, un entrenamiento a fin de mejorar la resistencia, podría inducir la activación de mecanismos anti-apoptóticos que impedirían la consecución del proceso apoptótico iniciado.

Las distrofias musculares se consideran ejemplos de pérdida de fibras musculares por necrosis. No obstante, un estudio sugiere que la apoptosis precede a la necrosis en el músculo de los ratones *mdx*, deficientes en distrofina (Sandri et al., 1995; Sandri et al., 1997; Tidball et al., 1995). El daño muscular debido al ejercicio se cree que podría jugar un importante papel en las distrofias ya que en estas patologías, las fibras musculares están sometidas a una tensión contráctil sostenida. Defectos en proteínas del sarcolemma provocan inestabilidad de la membrana y un desequilibrio en la concentración del Ca^{2+} citosólico. Estos factores, junto con el estrés oxidativo, son los posibles mediadores de la apoptosis observada en los primeros estadios de la evolución de las distrofias musculares (Tews, 2002).

Una importante característica de muchos tipos de cáncer es la **caquexia**. Este síndrome se caracteriza por pérdida de peso y desgaste muscular, y parece estar mediado por productos tumorales y citoquinas como el $\text{TNF}\alpha$ (Sharma and Anker, 2002). Aunque diversas vías podrían estar involucradas en dicha pérdida muscular, se sabe que las caspasas participan en procesos catabólicos relacionados con la caquexia (Belizario et al., 2001).

Por otro lado, un acúmulo de lípidos puede desencadenar procesos **lipotóxicos** en el músculo esquelético, tal y como se ha descrito para patologías como la diabetes tipo II (Unger and Orci, 2000). No obstante, pese a que existen numerosos estudios sobre el papel de los ácidos grasos en la inducción de apoptosis en tipos celulares relacionados como el músculo liso y cardíaco, se carece de información sobre la relación entre lipotoxicidad y apoptosis en el músculo esquelético.

II.2.4 PAPEL DE LA MITOCONDRIA EN LA APOPTOSIS DEL MÚSCULO ESQUELÉTICO

Como hemos mencionado previamente, la mitocondria juega un papel relevante en el control de la muerte celular programada, aunque existen pocos datos sobre dicho papel a nivel del músculo esquelético. De forma similar a lo que ocurre en otros tipos celulares, en el músculo esquelético, la absorción de Ca^{2+} por la mitocondria, puede desencadenar el fenómeno de permeabilidad transitoria. Se cree que en los miotubos, la permeabilización de la membrana debido a la apertura del MPTP es fundamental en la apoptosis dirigida por la mitocondria. No obstante, la apertura de dicho poro puede ser transitoria, y en estas condiciones de baja conductancia, el fenómeno podría dotar a las células de un canal de liberación rápida del Ca^{2+} intramitocondrial, contribuyendo así a la homeostasis celular del Ca^{2+} (Bernardi and Petronilli, 1996). Por otro lado, la sensibilidad del MPTP hacia el Ca^{2+} depende en el músculo esquelético de la velocidad del flujo de electrones a través del Complejo I de la cadena respiratoria (Fontaine et al., 1998).

A pesar de que las proteínas liberadas desde la mitocondria durante la permeabilización de su membrana externa están relacionadas con la regulación de la apoptosis, son escasos los datos referentes a dichas proteínas en el contexto del músculo esquelético. *In vivo*, En el músculo esquelético en desarrollo se expresan miembros de la familia de proteínas Bcl-2, importantes reguladoras de la apoptosis a nivel mitocondrial. Se ha descrito la presencia de miembros con un papel anti-apoptótico (Bcl-W, Bcl-XL) así como pro-apoptótico (Bad, Bax). Estas proteínas también se expresan en células madre musculares embriónicas, fetales o neonatales, mioblastos, y miotubos *in vitro*. Además, Bcl-2 parece ser esencial en ciertos estadios de la miogénesis fetal y postnatal, ya que los ratones que carecen de esta proteína, muestran un desarrollo muscular alterado (Dominov et al., 2001).

Estímulos externos pueden iniciar el programa de muerte celular a partir de vías de señalización dependientes de la mitocondria. No obstante, alteraciones internas en la propia mitocondria pueden también desencadenar un proceso de apoptosis. Los defectos genéticos que suponen una afectación de la fosforilación oxidativa tienen como consecuencia una disminución en la producción de energía mitocondrial y un aumento del estrés oxidativo. Ello puede afectar a la actividad del MPTP y promover el inicio del programa apoptótico (Wallace, 2001). En el músculo esquelético de pacientes que sufren enfermedades debidas a defectos en el DNA mitocondrial se observa liberación de citocromo c al citoplasma y actividad DNasa I en los núcleos, lo que sugiere la inducción

de apoptosis (Umaki et al., 2002). Esto ocurre principalmente en las fibras rojo-rasgadas presentes en el tejido de estos pacientes, que muestran acúmulos de mitocondrias anormales. En los pacientes que padecen de encefalomiopatías, se ha observado activación de caspasa-3 en fibras rojo-rasgadas, pero la apoptosis raramente se completa en estos músculos, posiblemente debido al elevado nivel de expresión del represor de apoptosis XIAP en el sarcoplasma (Ikezoe et al., 2002).

En ocasiones, la apoptosis muscular tiene su origen en disfunciones mitocondriales latentes. Este es el caso, por ejemplo, de la apoptosis que se da en los ratones con miopatía causada por una deficiencia en el colágeno VI (Irwin et al., 2003). La disfunción mitocondrial debida a la deficiencia en colágeno VI es reversible con ciclosporina A, un inhibidor específico del MPTP. Así, la transición en la permeabilidad mitocondrial es probablemente el mecanismo que origina en humanos la miopatía de Bethlem y la distrofia de Ullrich, ambas causadas por mutaciones en el gen del colágeno VI.

III. LAS PROTEÍNA DESACOPLADORA MITOCONDRIAL UCP3

III.1 LA PROTEÍNA DESACOPLADORA UCP1, UN FACTOR ESENCIAL EN LA TERMOGÉNESIS ADAPTATIVA

Las **proteínas desacopladoras mitocondriales (UCPs)** pertenecen a la súper-familia de transportadores de aniones localizados en la membrana mitocondrial interna. En esta súper-familia también se incluyen otros transportadores como la Adenina nucleótido translocasa (ANT), el transportador de fosfato inorgánico, el de citrato y el de 2-oxoglutarato/malato. La proteína desacopladora **UCP1** o **termogenina** fue la primera proteína desacopladora en ser identificada. Ésta se expresa exclusivamente en tejido adiposo marrón donde juega un importante papel en la termogénesis adaptativa. UCP1 desacopla la respiración de la fosforilación oxidativa disipando el gradiente de protones generado por el transporte de electrones a través de la cadena respiratoria. La pérdida de fuerza protomotriz conlleva una aceleración del flujo electrónico a través de la cadena respiratoria con la consiguiente generación de calor (Nicholls and Locke, 1984b).

El tejido adiposo marrón (TAM) se encuentra en mamíferos de pequeño tamaño, como los roedores, así como en neonatos de grandes mamíferos, como los humanos. La presencia de TAM y por tanto, la importancia de la actividad UCP1 en humanos adultos, es fruto de controversia. El TAM aparece en depósitos dispersos en áreas específicas del

cuerpo, siendo los principales depósitos el interescapular, axilar, perirenal, torácico, y entre los músculos del cuello. El TAM es un tejido muy irrigado especializado en la producción de calor. Los adipocitos marrones, a diferencia de los blancos, contienen un núcleo central, numerosas vacuolas lipídicas y abundantes mitocondrias con un elevado contenido en UCP1. En la respuesta fisiológica al frío, el sistema nervioso simpático activa la vía adrenérgica que promueve la lipólisis en el TAM. Los ácidos grasos liberados durante la lipólisis son responsables de la activación del transporte de protones a través de UCP1 (Nicholls and Locke, 1984a).

Se carece de información cristalográfica de las UCPs, pero la secuencia de aminoácidos sugiere una estructura próxima a la observada para la ANT (Pebay-Peyroula et al., 2003). Así, todos los transportadores de aniones mitocondriales están formados por unos 300 aminoácidos (31-34 kDa) y comparten una estructura triplicada. Cada tercio de proteína está constituido por dos regiones hidrofóbicas que forman hélices α , unidas por *loops* hidrofílicos orientados hacia la matriz mitocondrial. Datos obtenidos en ensayos de mutagénesis dirigida y marcaje por fotoafinidad, sugieren que el conjunto de hélices α constituirían un canal hidrofílico en el núcleo de las UCPs, y que ese centro estaría regulado por unas compuertas formadas por los *loops* (Arechaga et al., 2001). Se piensa que la unidad activa de las UCPs estaría constituida por dos subunidades unidas por un puente disulfuro, formando un homodímero (Klingenberg and Appel, 1989).

UCP1 transporta H^+ a través de la membrana mitocondrial interna provocando un desacoplamiento, pero esta actividad está regulada por la presencia de **ácidos grasos** (Klingenberg et al., 2001b; Nicholls and Rial, 1999). Existen dos modelos que tratan de explicar el mecanismo mediante el cuál los ácidos grasos activan el desacoplamiento mediado por UCP1. Un modelo considera que los ácidos grasos actúan como grupos prostéticos de la proteína. El canal proteico permitiría el paso de H^+ gracias a la presencia de aminoácidos tamponadores que aceptarían y donarían los H^+ secuencialmente, conduciéndolos a través de la membrana. Los ácidos grasos actuarían como donadores de protones a dichos aminoácidos tamponadores (Klingenberg and Huang, 1999a). En el segundo modelo, UCP1 transportaría a los propios ácidos grasos al exterior de la matriz. Los ácidos grasos pueden difundir a través de la membrana en su forma protonada mediante un proceso de *flip-flop*. Una vez en la matriz, y dado el elevado pH intramitocondrial, el H^+ es liberado, disipando el gradiente electroquímico. La forma aniónica del ácido graso no puede atravesar la membrana libremente, pero lo haría a través de UCP1. Una vez fuera de la matriz, podría unirse de nuevo a un protón volviendo a iniciar el ciclo (Garlid et al., 1998). Existen datos a favor y en contra de ambos modelos,

por lo que el mecanismo exacto de transporte a través de UCP1, así como el hecho de si los ácidos grasos son indispensables para la actividad de la proteína, es todavía hoy motivo de debate (Echtay et al., 2000a; Gonzalez-Barroso et al., 1998; Klingenberg and Huang, 1999b; Rial et al., 2004b; Skulachev, 1991). En numerosos modelos se ha observado la capacidad de UCP1 de translocar ácidos grasos a través de la membrana (Garlid et al., 1996; Jezek and Garlid, 1990). Sin embargo, recientemente se ha observado que los alquinosulfatos, ácidos grasos modificados que son incapaces de difundir a través de la membrana, pueden activar el desacoplamiento mediado por UCP1 (Rial et al., 2004a). UCP1 podría también tener un comportamiento dual según la concentración de H^+ , teniendo una actividad de transporte protónico basal, y comportándose como transportador de ácidos grasos, únicamente cuando éstos se encuentren en elevadas concentraciones (Ricquier and Bouillaud, 2000e). El determinar con exactitud cuál es la relación de los ácidos grasos con la actividad de UCP1 se complica además *in vivo* por el hecho de que éstos sean capaces de inducir un transporte de protones a través de otros transportadores de la familia como la ANT y el transportador de aspartato/glutamato (Brustovetsky and Klingenberg, 1994; Samartsev et al., 1997; Wojtczak et al., 1998b).

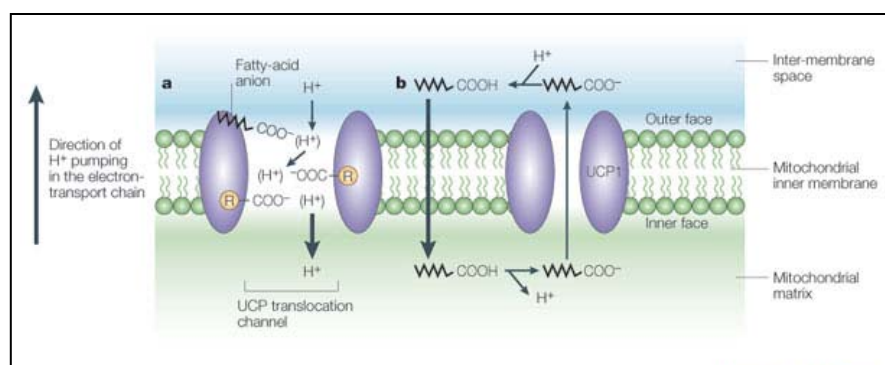


FIGURA 9: Dos modelos para explicar el transporte de H^+ dependiente de ácidos grasos mediado por UCP1; **a.** Los ácidos grasos actúan como tamponadores de los aminoácidos que constituyen el canal; **b.** Los ácidos grasos actúan como agentes protonofóricos que difunden a través de la membrana en forma protonada, y son translocados a través de UCP1 hacia la matriz, donde puede iniciarse de nuevo el ciclo (Krauss et al., 2005b).

Además de los ácidos grasos, otros factores estarían regulando la actividad de UCP1. Así, los **nucleósidos de purina di- y trifosfato** (GDP, ADP, GTP y ATP), especialmente el GDP, se unen con elevada afinidad a la cara citosólica de UCP1 (Nicholls, 1976) inhibiendo su actividad (Hagen et al., 2000; Klingenberg et al., 2001a; Nicholls and Locke, 1984c). Por otro lado, en experimentos de reconstitución en

liposomas se ha observado que el **coenzima Q (ubiquinona)** es capaz de activar a UCP1, principalmente en su forma oxidada, comportándose como un cofactor indispensable para el desacoplamiento sensible a ácidos grasos y mediado por UCP1 (Echtay et al., 2000b). Sin embargo, la necesidad de coenzima Q es todavía controvertida (Castella et al., 2001; Esteves et al., 2004; Jaburek and Garlid, 2003c).

III.2 LA PROTEÍNA DESACOPLADORA UCP3

Los análisis de homología de secuencia permitieron identificar nuevas proteínas de la familia. Entre ellas se encuentran UCP2 y UCP3 que comparten con UCP1 un 59% y un 57% de identidad en la secuencia de aminoácidos respectivamente, y entre sí un 72% de identidad. Estas nuevas UCPs tienen un patrón de expresión diferencial. Mientras que UCP2 se expresa de forma ubicua⁴, UCP3 lo hace preferencialmente en músculo esquelético. La elevada identidad respecto a UCP1 ha llevado a considerar que estas nuevas UCPs deberían también compartir con UCP1 sus propiedades bioquímicas, es decir, mediarían el transporte de H⁺ produciendo un desacoplamiento de respiración y fosforilación oxidativa, y serían reguladas potencialmente por ácidos grasos y nucleótidos de purina.

UCP	Identidad secuencia aminoácidos respecto UCP1 (%)	Distribución tisular
UCP1	-	Tejido Adiposo marrón (TAM)
UCP2	59	Ubicua
UCP3	57	Músculo esquelético, TAM (Tejido adiposo blanco, corazón y neuronas DRG)
BMCP1	34	Cerebro y tejido neuronal
UCP4	29	Cerebro y tejido neuronal

TABLA 2: Familia de proteínas desacopladoras mitocondriales en mamífero. UCP: *uncoupling protein*; BMCP1: *Brain mitochondrial carrier protein* (Adaptado de Ricquier and Bouillaud, 2000).

⁴ En el caso de UCP2, es importante considerar que los niveles de mRNA no predicen necesariamente los de proteína, debido a modificaciones post-transcripcionales, y que muchos estudios sobre su expresión se han basado únicamente en observar las variaciones de expresión a nivel de mRNA (Pecqueur et al., 2001a; Sivitz et al., 1999).

Así, en 1997, se caracterizaron dos formas de la proteína **UCP3** fruto de una maduración del RNA diferencial en el último intrón. La isoforma larga (L, *long*) consta de 312 aminoácidos (34 kDa), mientras que la corta (S, *short*) consta únicamente de 275 aminoácidos ya que carece del último dominio transmembrana (Solanes et al., 1997c). Ambas formas se localizan en la membrana mitocondrial interna (Renold et al., 2000). En ratón, UCP3 se expresa preferencialmente en músculo esquelético, TAM, y en menor grado también en tejido adiposo blanco y corazón. En humanos la expresión de UCP3 se restringe a músculo esquelético y el TAM de neonatos (Krauss et al., 2005c; Ricquier and Bouillaud, 2000b).

A diferencia de lo que ocurre con UCP1, las nuevas UCPs no se encuentran exclusivamente en mamíferos, lo que sugiere que UCP1 sería una proteína especializada que habría evolucionado posteriormente, desarrollando su función termogénica a partir de una UCP originaria (Ricquier and Bouillaud, 2000d).

Así como la función *in vivo* de UCP1 está claramente ligada a la termogénesis adaptativa, el papel fisiológico del resto de UCPs es fruto de controversia. Se han propuesto numerosas posibilidades, pero en la literatura reciente existen numerosos datos contradictorios a cerca del significado biológico que tendría un desacoplamiento mediado por UCP2 o UCP3 (apartado III.3). Aunque su capacidad de transporte de protones se ha probado *in vitro*, las características concretas de su actividad bioquímica están siendo todavía debatidas (apartado III.2).

III.2.1 REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE UCP3

Como hemos visto anteriormente el gen UCP3 se expresa principalmente en tejidos termogénicos. En humanos se expresa preferencialmente en músculo esquelético, aunque también se expresa levemente en tejidos como corazón, glándula tiroidea y médula ósea (Boss et al., 1997b; Ricquier and Bouillaud, 2000a; Vidal-Puig et al., 1997b). En rata y ratón la expresión es elevada en músculo esquelético y también en TAM, tejido muy importante para el control de la temperatura corporal en estos animales. También se encuentra expresado, aunque en menor cantidad, en tejidos como corazón, TAB y riñón (Boss et al., 1997a; Matsuda et al., 1997; Vidal-Puig et al., 1997a; Yoshitomi et al., 1998) (Tabla 2). Recientemente se ha descrito la expresión de UCP3 en cerebro de ratones (Vincent et al., 2004a) y en células humanas de origen neuronal (Gustafsson et al., 2001; Gustafsson et al., 2004b; Gustafsson et al., 2004c; Leininger et al., 2004b).

Aunque puede resultar limitada, una aproximación inicial a la función de una proteína es el estudio de cómo se regula su expresión. Dada la elevada identidad de secuencia de UCP3 con UCP1, los primeros estudios de su expresión se realizaron analizando el comportamiento del gen en situaciones donde ya se había descrito una modulación del gen UCP1.

III.2.1.1 REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL GEN UCP3 EN DIFERENTES SITUACIONES FISIOLÓGICAS

El principal estímulo fisiológico que induce la expresión de UCP1 en el TAM es el **frío**. Por ello, se pensó que UCP3 que se expresa también en tejidos termogénicos, podría estar jugando un papel en el control de la temperatura corporal. No obstante, existen datos contradictorios sobre la expresión de UCP3 en respuesta a bajas temperaturas (Tabla 3), y actualmente se considera que esta proteína no juega un papel decisivo en la termogénesis (ver apartado III.3.1).

El TAM participa también en la termogénesis inducida por la dieta, i por tanto, en la regulación del peso corporal (Rothwell and Stock, 1986). Una **dieta rica en lípidos** sostenida, aumenta los niveles de mRNA de UCP1 en el TAM de roedores (Felipe et al., 2003a), aunque los datos respecto a UCP3 son contradictorios. Sin embargo, en el músculo esquelético, una dieta hiperlipídica conduce a un aumento en la expresión de UCP3 (Tabla 3), siendo mejores activadores los ácidos grasos de cadena larga (Hoeks et al., 2003b).

Durante el **ayuno**, los niveles de UCP1 en el TAM disminuyen a fin de ahorrar energía (Trayhurn and Jennings, 1986), y del mismo modo se comporta el mRNA de UCP3. Sin embargo, en músculo esquelético, el ayuno provoca un aumento en la expresión de UCP3, tanto en roedores como en humanos (Tabla 3). Dado que infusiones de lípidos en sangre, son capaces de inducir la expresión de UCP3 en músculo esquelético (Weigle et al., 1998d), se cree que los ácidos grasos libres son los compuestos responsables de la inducción.

UCP1 se expresa durante la etapa fetal en el TAM, y se induce con el nacimiento tras la exposición al frío (Carmona et al., 1998a). UCP3 es indetectable durante la etapa fetal, y su expresión aumenta en el momento del nacimiento hasta adquirir niveles similares a los que presenta un adulto (Carmona et al., 1998b). En el músculo esquelético, la expresión de UCP3 se induce también en el nacimiento, debido a la

ingesta de lípidos que contiene la leche, tanto en roedores como en humanos (Brauner et al., 2003; Brun et al., 1999b; Brun et al., 1999d). En roedores, los niveles de mRNA de UCP3 se mantienen elevados hasta el momento en que se produce el cambio en la dieta, de una basada en la leche a una rica en carbohidratos (Brun et al., 1999a; Brun et al., 1999e). Durante la lactancia, los roedores utilizan sus reservas lipídicas, aumentan la ingesta y disminuyen la termogénesis en el TAM, a fin de obtener la energía necesaria para la producción de leche. En esta situación, los niveles de UCP1 disminuyen, al igual que lo hacen los de UCP3 tanto en TAM, como en músculo esquelético (Pedraza et al., 2000a; Pedraza et al., 2001; Xiao et al., 2004).

Durante el **ejercicio agudo**, se produce una inducción de la expresión de UCP3 en el músculo esquelético, superior en las fibras glicolíticas que en las oxidativas (Hildebrandt et al., 2003). Sin embargo, tras el ejercicio prolongado que supone un entrenamiento, existen datos contradictorios.

Tanto la región cromosómica humana donde se localizan los genes UCP2 y UCP3, como la sinténica de ratón, corresponde a un QTL asociado a obesidad y diabetes tipo II (Jaberi, 2004; Solanes et al., 1997b), por lo que muchos grupos de investigación han estudiado una posible relación entre UCP3 y el desarrollo de estas patologías. Sin embargo, no existe una correlación clara entre la expresión de UCP3 y estas patologías, ya que los datos al respecto son muy contradictorios.

III.2.1.2 FACTORES REGULADORES DE LA EXPRESIÓN DE UCP3

Como hemos visto, la **vía adrenérgica** media la inducción de la expresión de UCP1 en respuesta al frío. El tratamiento con agonistas β -adrenérgicos también provoca la inducción de la expresión de UCP3 en el TAM (Scarpace et al., 2000c; Scarpace et al., 2000a). En el caso del músculo esquelético, se ha descrito en diferentes modelos, un aumento de la expresión tras el tratamiento con agonistas β -adrenérgicos, aunque no está claro qué isoformas de receptor actuarían en este tejido (Tabla 3). Hay que considerar además, la posibilidad de que la inducción de la expresión se deba a la liberación de ácidos grasos que sigue a la activación de la lipólisis.

Además de los agonistas β -adrenérgicos, se han descrito otros factores que pueden regular la expresión de UCP3, como la leptina, las hormonas tiroideas, el ácido retinoico, la insulina y los ácidos grasos libres.

La **leptina** es una hormona implicada en el mantenimiento del peso corporal y regula la eficiencia metabólica, el gasto energético, la ingesta de alimentos y la adiposidad (Friedman, 2002). La administración de leptina induce la actividad simpática y con ello, la expresión de UCP1 en el TAM y la termogénesis adaptativa (Collins et al., 1996; Haynes et al., 1997). Se ha descrito que la leptina incrementa los niveles de UCP3 en TAM y en músculo esquelético (Cusin et al., 1998; Scarpace et al., 2000b; Villarroya et al., 2001a).

Las **hormonas tiroideas** (TH, *thyroid hormones*) pueden estimular la actividad metabólica de muchos tejidos a través del eje hipotálamo-hipófisis-glándula tiroide. Son esenciales en el desarrollo, crecimiento y metabolismo de los vertebrados. La hormona tiroidea T₃ (3,5,3'-L-triyodotironina) puede afectar a la transcripción de genes a través de su interacción con el receptor nuclear de hormonas tiroideas que pertenece a la familia de receptores nucleares. La T₃ activa la expresión tanto de UCP1 en el TAM (Rabelo et al., 1995), como de UCP3 en TAM (Larkin et al., 1997c) y músculo esquelético (Lanni et al., 1999c; Larkin et al., 1997b; Masaki et al., 2000).

El **ácido retinoico** (RA, *retinoic acid*), un derivado natural de la vitamina A, afecta a muchos procesos biológicos, incluyendo la morfogénesis, el crecimiento celular y la diferenciación, mayoritariamente modificando la transcripción génica. El RA actúa a través de dos tipos de receptores, el receptor del RA (RAR, *retinoic acid receptor*) y el receptor del retinoide X (RXR, *retinoid X receptor*), miembros de la superfamilia de receptores nucleares. El RA activa la expresión de UCP1 en TAM (Alvarez et al., 1995; Rabelo et al., 1996), y puede activar la expresión de UCP3 en músculo (Felipe et al., 2003b; Nagase et al., 1999b; Scarpace et al., 2000d; Solanes et al., 2000b).

La **insulina** disminuye los niveles de mRNA de UCP3, y por ejemplo en ratas STZ (expuestas a la toxina pancreática *streptozotocin*), hipoinsulinémicas, la expresión de UCP3 está aumentada en músculo esquelético (Guillet-Deniau et al., 2002), y la administración de insulina reestablece totalmente la expresión de UCP3 en estos animales (Hidaka et al., 2000).

Los **glucocorticoides** forman parte de los esteroides junto con los mineralocorticoides, esteroides sexuales y progestágenos. Aunque no se conoce mucho del papel que juegan los glucocorticoides en la regulación de la expresión del gen UCP3,

A

<i>Situación</i>		TAM	Corazón	Músculo esquelético
Exposición al frío (roedores)		+1-5 / =6	=27	+2,27-28 / =3,5 / --4,27
Dieta hiperlipídica (roedores)		+7 / =8-10	+14,16-17	+9,7,10-15
Ayuno		--2,18-22	+14,29-30	+3,18,23-26
Obesidad	Rata <i>fa/fa</i>	--64-65		-- 64-65 / +64-65
	Humano			=23,48-51 / --52
Diabetes	Humano con diabetes II			+51,55 / -- 53-54
Ejercicio (rata)	Agudo	=24,31		+31-39
	Crónico	=24,31		=34-35,40-41 / --42-47

B

<i>Regulador</i>	TAM	Músculo esquelético
NEFA		+(16,51,69-75)
Retinoides	--(7,56) / =(7,56)	+(7,70,73,78)
T ₃	+(4)	+(4,76-77,96)
Leptina	+(21,56,60,65-68)	+(21,56,60,65-68)
Agonista β	+(22,56-59)	+(28,61) / =(17,60) / --(57,62)
Glucocorticoides	--(85)	+(18,86-87)
LPS		+(82)
TNFα		+(83-84)
Insulina		--(14,78-81)
Fibratos	+(93)	+(88,94)
Tiazolidindionas	+(63,93)	--(72) / +(89-92,94)

TABLA 3: A. Efecto de diferentes situaciones fisiológicas o fisiopatológicas sobre la expresión de las UCPs en roedores y humanos **B.** Efecto de las hormonas y otros factores sobre la expresión de las UCPs en TAM y músculo esquelético de roedores y humanos. Los datos corresponden a resultados obtenidos sobre los niveles de mRNA. Leyenda: +: aumento de la expresión; -: disminución de la expresión; =: sin alteraciones en la expresión; TAM: tejido adiposo marrón; T₃: 3,5,3'-L-triiodotironina; LPS: lipopolisacárido; TNFα: factor de necrosis tumoral α.

BIBLIOGRAFÍA **TABLA 3:**

1. H. Yamashita, Y. Sato, N. Mori, *FEBS Lett.* 458, 157-161 (1999).
2. T. Masaki, H. Yoshimatsu, S. Chiba, T. Sakata, *Am.J.Physiol Regul.Integr.Comp Physiol* 279, R1305-R1309 (2000).
3. O. Boss et al., *FEBS Lett.* 408, 39-42 (1997).
4. S. Larkin et al., *Biochem Biophys.Res.Commun.* 240, 222-227 (1997).
5. P. B. Jakus, K. Sipos, G. Kispal, A. Sandor, *FEBS Lett.* 519, 210-214 (2002).
6. M. C. Carmona et al., *Biochem Biophys.Res.Commun.* 243, 224-228 (1998).
7. F. Felipe, M. L. Bonet, J. Ribot, A. Palou, *Int.J.Obes.Relat Metab Disord.* 27, 60-69 (2003).
8. R. S. Surwit et al., *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* 95, 4061-4065 (1998).
9. D. W. Gong, Y. He, M. L. Reitman, *Biochem Biophys.Res.Commun.* 256, 27-32 (1999).
10. J. A. Harrold, P. S. Widdowson, J. C. Clapham, G. Williams, *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab* 279, E340-E347 (2000).
11. J. Matsuda et al., *FEBS Lett.* 418, 200-204 (1997).
12. P. Schrauwen, H. Hoppeler, R. Billeter, A. H. Bakker, D. R. Pendergast, *Int.J.Obes.Relat Metab Disord.* 25, 449-456 (2001).
13. C. J. Chou et al., *Obes.Res.* 9, 313-319 (2001).
14. M. E. Young et al., *FASEB J.* 15, 833-845 (2001).
15. S. Iossa et al., *Pflugers Arch.* 445, 431-436 (2002).
16. R. Vettor et al., *Int.J.Obes.Relat Metab Disord.* 26, 838-847 (2002).
17. J. Hoeks et al., *FEBS Lett.* 555, 631-637 (2003).
18. D. W. Gong, Y. He, M. Karas, M. Reitman, *J.Biol Chem.* 272, 24129-24132 (1997).
19. S. Samec, J. Seydoux, A. G. Dulloo, *Diabetes* 47, 1693-1698 (1998).
20. S. Samec, J. Seydoux, A. G. Dulloo, *FASEB J.* 12, 715-724 (1998).
21. W. I. Sivitz, B. D. Fink, P. A. Donohoue, *Endocrinology* 140, 1511-1519 (1999).
22. P. J. Scarpance, M. V. Kumar, H. Li, N. Tumer, *J.Gerontol.A Biol Sci Med Sci* 55, B588-B592 (2000).
23. L. Millet et al., *J.Clin.Invest* 100, 2665-2670 (1997).
24. O. Boss et al., *J.Biol Chem.* 273, 5-8 (1998).
25. R. J. Tunstall et al., *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab* 283, E66-E72 (2002).
26. M. Jimenez et al., *Eur.J.Biochem* 269, 2878-2884 (2002).
27. B. Lin, S. Coughlin, P. F. Pilch, *Am.J.Physiol* 275, E386-E391 (1998).
28. O. Boss et al., *Biochem Biophys.Res.Commun.* 261, 870-876 (1999).
29. K. A. Van der Lee et al., *J.Lipid Res.* 42, 1752-1758 (2001).
30. D. M. Muoio et al., *J.Biol Chem.* 277, 26089-26097 (2002).
31. N. Tsuboyama-Kasaoka et al., *Biochem Biophys.Res.Commun.* 247, 498-503 (1998).
32. H. Pilegaard, G. A. Ordway, B. Saltin, P. D. Neuffer, *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab* 279, E806-E814 (2000).
33. P. Schrauwen et al., *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab* 282, E11-E17 (2002).
34. R. C. Noland et al., *Metabolism* 52, 152-158 (2003).
35. R. N. Cortright et al., *Am.J.Physiol* 276, E217-E221 (1999).
36. M. Zhou, B. Z. Lin, S. Coughlin, G. Vallega, P. F. Pilch, *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab* 279, E622-E629 (2000).
37. D. M. Muoio et al., *Diabetes* 51, 901-909 (2002).
38. T. E. Jones, K. Baar, E. Ojuka, M. Chen, J. O. Holloszy, *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab* 284, E96-101 (2003).
39. A. L. Hildebrandt, H. Pilegaard, P. D. Neuffer, *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab* 285, E1021-E1027 (2003).
40. M. Tonkonogi, A. Krook, B. Walsh, K. Sahlin, *Biochem J.* 351 Pt 3, 805-810 (2000).
41. T. Ookawara et al., *Res.Commun.Mol.Pathol.Pharmacol.* 111, 41-54 (2002).
42. P. Schrauwen, F. J. Troost, J. Xia, E. Ravussin, W. H. Saris, *Int.J.Obes.Relat Metab Disord.* 23, 966-972 (1999).
43. O. Boss et al., *FASEB J.* 12, 335-339 (1998).
44. N. Hjeltne, M. Fernstrom, J. R. Zierath, A. Krook, *Diabetologia* 42, 826-830 (1999).
45. A. Russell et al., *Int.J.Obes.Relat Metab Disord.* 26, 157-164 (2002).
46. A. P. Russell et al., *J.Physiol* 550, 855-861 (2003).
47. A. P. Russell et al., *Pflugers Arch.* 445, 563-569 (2003).
48. L. Millet et al., *Diabetologia* 41, 829-832 (1998).
49. L. Nordfors et al., *Diabetologia* 41, 935-939 (1998).
50. A. Vidal-Puig et al., *Obes.Res.* 7, 133-140 (1999).
51. P. Sbraccia et al., *Clin.Endocrinol.(Oxf)* 57, 199-207 (2002).
52. M. E. Harper et al., *Diabetes* 51, 2459-2466 (2002).
53. A. Krook, J. Digby, S. O'Rahilly, J. R. Zierath, H. Wallberg-Henriksson, *Diabetes* 47, 1528-1531 (1998).
54. P. Schrauwen et al., *Diabetes* 50, 2870-2873 (2001).
55. S. Bao et al., *Diabetes* 47, 1935-1940 (1998).
56. P. J. Scarpance, M. Matheny, R. L. Moore, M. V. Kumar, *J.Endocrinol.* 164, 331-337 (2000).

57. H. Yoshitomi, K. Yamazaki, S. Abe, I. Tanaka, *Biochem Biophys.Res.Commun.* 253, 85-91 (1998).
58. E. Savontaus, J. Rouru, O. Boss, R. Huupponen, M. Koulu, *Biochem Biophys.Res.Commun.* 246, 899-904 (1998).
59. P. Oliver, C. Pico, N. Martinez, M. L. Bonet, A. Palou, *Int.J.Obes.Relat Metab Disord.* 24, 423-428 (2000).
60. J. Gomez-Ambrosi, G. Fruhbeck, J. A. Martinez, *Cell Mol.Life Sci* 55, 992-997 (1999).
61. I. Nagase, T. Yoshida, M. Saito, *FEBS Lett.* 494, 175-180 (2001).
62. Y. Nakamura et al., *J.Vet.Med Sci* 63, 309-314 (2001).
63. J. Matsuda et al., *Diabetes* 47, 1809-1814 (1998).
64. H. Oberkofler et al., *Biochim.Biophys.Acta* 1517, 113-118 (2000).
65. F. Villarroya et al., *Biochem Soc.Trans.* 29, 76-80 (2001).
66. I. Cusin et al., *Diabetes* 47, 1014-1019 (1998).
67. P. J. Scarpace and M. Matheny, *Am.J.Physiol* 275, E259-E264 (1998).
68. J. Rouru, I. Cusin, K. E. Zakrzewska, B. Jeanrenaud, F. Rohner-Jeanrenaud, *Endocrinology* 140, 3688-3692 (1999).
69. D. S. Weigle et al., *Diabetes* 47, 298-302 (1998).
70. I. Nagase et al., *FEBS Lett.* 461, 319-322 (1999).
71. C. S. Hwang and M. D. Lane, *Biochem Biophys.Res.Commun.* 258, 464-469 (1999).
72. A. Cabrero et al., *FEBS Lett.* 484, 37-42 (2000).
73. C. Son et al., *Endocrinology* 142, 4189-4194 (2001).
74. Y. Khalfallah, S. Fages, M. Laville, D. Langin, H. Vidal, *Diabetes* 49, 25-31 (2000).
75. R. Fabris et al., *Diabetes* 50, 601-608 (2001).
76. A. Lanni et al., *FEBS Lett.* 444, 250-254 (1999).
77. T. Masaki, H. Yoshimatsu, T. Sakata, *Int.J.Obes.Relat Metab Disord.* 24 Suppl 2, S162-S164 (2000).
78. I. Guillet-Deniau et al., *Diabetes* 51, 1722-1728 (2002).
79. S. Hidaka et al., *Diabetes* 48, 430-435 (1999).
80. S. Hidaka et al., *Proc.Soc.Exp.Biol Med* 224, 172-177 (2000).
81. S. Hidaka et al., *FASEB J.* 16, 509-518 (2002).
82. X. X. Yu et al., *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab* 279, E433-E446 (2000).
83. T. Masaki et al., *Biochim.Biophys.Acta* 1436, 585-592 (1999).
84. S. Busquets et al., *FEBS Lett.* 440, 348-350 (1998).
85. S. Viengchareun, P. Penfornis, M. C. Zennaro, M. Lombes, *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab* 280, E640-E649 (2001).
86. X. Sun, C. Wray, X. Tian, P. O. Hasselgren, J. Lu, *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab* 285, E512-E520 (2003).
87. K. Weber et al., *Endocrinology* 143, 177-184 (2002).
88. A. Cabrero et al., *Biochem Biophys.Res.Commun.* 260, 547-556 (1999).
89. B. Brunmair et al., *Diabetologia* 47, 1611-1614 (2004).
90. A. Costello, S. Gray, R. Donnelly, *Diabetes Obes.Metab* 5, 136-138 (2003).
91. V. Emilsson et al., *Metabolism* 49, 1610-1615 (2000).
92. H. Oberkofler et al., *Biochim.Biophys.Acta* 1517, 113-118 (2000).
93. T. Teruel, S. A. Smith, J. Peterson, J. C. Clapham, *Biochem Biophys.Res.Commun.* 273, 560-564 (2000).
94. S. Brun et al., *Diabetes* 48, 1217-1222 (1999).
95. G. Solanes et al., *Biochem J.* 386, 505-513 (2005).

recientemente se ha descrito que son capaces de inducir la expresión de UCP3 en músculo esquelético (Sun et al., 2003b).

Existe muy buena correlación entre los niveles expresión de UCP3 y la concentración de ácidos grasos libres o **NEFA** (*nonesterified fatty acids*) en sangre. Así, los niveles de mRNA de UCP3 aumentan en situaciones donde se observa un aumento de los ácidos grasos libres o de la tasa de oxidación, tales como el ayuno (Gong et al., 1997f; Millet et al., 1997c; Weigle et al., 1998c), la dieta (Gong et al., 1999), la administración de lípidos (Weigle et al., 1998b), la estimulación aguda con hormonas tiroideas (Gong et al., 1997e), y el ejercicio agudo (Boss et al., 1998a; Tsuboyama-

Kasaoka et al., 1998a). Igualmente, la expresión disminuye en aquellas situaciones en que también lo hacen los ácidos grasos libres o la oxidación, como el hipotiroidismo (Gong et al., 1997d) o una dieta hipocalórica crónica (Boss et al., 1998d).

El efecto de los ácidos grasos sobre la expresión de UCP3 es directo, tal y como se ha observado en cultivos celulares musculares diferenciados (Cabrero et al., 2000; Hwang and Lane, 1999; Nagase et al., 1999a; Son et al., 2001) o células musculares humanas (Sbraccia et al., 2002). Los ácidos grasos son ligandos de los receptores activados por activadores peroxisomales (**PPAR**, *peroxisome proliferator activated receptor*), factores de transcripción de la familia de receptores nucleares de hormonas. Se cree que la acción de los NEFA sobre la expresión de UCP3 podría estar mediada por PPARs, tal y como demuestran ensayos *in vitro* con ligandos sintéticos específicos de PPAR α y/o PPAR δ (Fibratos y Tiazolidindionas) (Brun et al., 1999c; Pedraza et al., 2000b; Young et al., 2001). Se ha descrito una fuerte dependencia de los promotores humanos y de ratón del gen UCP3, del factor de transcripción miogénico MyoD. Sin éste, el promotor no es sensible a estímulos mediados por PPAR o TR como el ácido retinoico, las hormonas tiroideas o los NEFA (Solanes et al., 2000a; Solanes et al., 2003; Solanes et al., 2005).

III.3 ACTIVIDAD BIOQUÍMICA DE LA PROTEÍNA DESACOPLADORA MITOCONDRIAL UCP3

Dada la elevada identidad de las nuevas UCPs, principalmente UCP2 y UCP3, con UCP1, se ha considerado la actividad bioquímica de UCP1 como paradigma de las del resto de proteínas de la familia. La capacidad de UCP3 de generar un desacoplamiento ha sido demostrada *in vitro* en diversas ocasiones. Los primeros experimentos utilizaron la expresión heteróloga de la proteína en levaduras, donde se ha observado que es capaz de aumentar la conductancia a los protones (Hinz et al., 1999b; Zhang et al., 1999b). Sin embargo, utilizando este sistema de expresión, la conductancia a los protones no era sensible a ácidos grasos ni estaba regulada por nucleótidos de purina, a diferencia de lo que sucedía con la expresión de UCP1 (Rial et al., 1999b). Posteriormente se advirtió que la inserción de UCP3 en la membrana mitocondrial de las levaduras era incorrecta, y que por tanto, la conductancia observada podía ser consecuencia de un *leak* de protones inespecífico y no regulado (Harper et al., 2002a; Heidkaemper et al., 2000; Winkler et al., 2001).

Al reconstituir UCP3 en proteoliposomas, se obtuvieron resultados que estaban de acuerdo con lo observado para UCP1. Es decir, UCP3 inducía un transporte de protones

que requería de la presencia de **ácidos grasos** y aunque con menor sensibilidad que UCP1, era inhibible por **nucleótidos de purina** (Jaburek et al., 1999). No obstante, la sensibilidad de UCP3 a los distintos nucleótidos tenía un comportamiento diferencial respecto a UCP1 no sólo en cuanto a la sensibilidad. Mientras que UCP1 mostraba una afinidad preferente por los nucleótidos di-fosfato (ADP), UCP1 lo hacía por los tri-fosfato (ATP) (Echtay et al., 1999; Echtay et al., 2001b). Esta afinidad diferencial concuerda con el hecho de que UCP1 promueve la termogénesis adaptativa en condiciones en las que la relación ATP/ADP es baja, mientras que en el músculo, UCP3 provocaría un desacoplamiento en situaciones en las que no se da un descenso en los niveles de ATP.

Otros experimentos han puesto en evidencia una posible interacción entre UCP3 y la **ubiquinona** (Echtay et al., 2000c; Echtay et al., 2001a) que parece actuar como un cofactor necesario para la actividad desacoplante mediada por UCP3. Sin embargo, y como en el caso de UCP1, los datos al respecto son muy controvertidos (Jaburek and Garlid, 2003b).

La capacidad de UCP3 para inducir la conductancia de protones *in vitro* ha sido observada en otros modelos experimentales más complejos. Se ha observado por ejemplo, que la sobreexpresión de UCP3 en células musculares de mamífero produce un descenso en el potencial de membrana mitocondrial (Garcia-Martinez et al., 2001a). Igualmente, las mitocondrias aisladas del músculo de ratones *knock-out* para *ucp3* muestran una tasa de consumo de oxígeno en estado 4 inferior a la de las mitocondrias obtenidas de ratones normales (Gong et al., 2000c; Vidal-Puig et al., 2000d). A su vez, las mitocondrias aisladas de ratones transgénicos que sobreexpresan UCP3 específicamente en músculo esquelético, presentan una mayor conductancia que aquéllas aisladas del músculo de ratones no modificados (Clapham et al., 2000a). Sin embargo, posteriormente, se propuso que el desacoplamiento asociado a la expresión de UCP3 en estos ratones era consecuencia de un artefacto provocado posiblemente por un nivel de expresión que excedía en gran medida los niveles de UCP3 que habitualmente presenta la mitocondria del músculo esquelético (inserción o plegamiento incorrectos, pérdida de la integridad de la membrana...) (Cadenas et al., 2002a). Así, el estudio de la actividad desacopladora de UCP3 se complicaría por la posibilidad de provocar una conductancia a los protones artefactual, que se confunde con el efecto esperado para la proteína. De hecho, son diversos los sistemas de sobreexpresión en los que se ha demostrado la existencia de un desacoplamiento inespecífico, no sólo los mencionados anteriormente para levaduras, sino los descritos también en células de mamífero (Guerini et al., 2002). El conocer de qué forma se regula la actividad de la proteína facilitará la

discriminación entre un desacoplamiento inespecífico y uno realmente inducido por la actividad de UCP3. Por el momento, algunos autores han utilizado reiteradamente en la literatura el criterio de considerar tan sólo aquellos desacoplamientos regulables por ácidos grasos y por nucleótidos de purina, como mediados por una UCP, pero ello no es compartido por todos (Fink et al., 2002; Hinz et al., 1999a; Rial et al., 1999a; Zhang et al., 1999a), ya que no existe un consenso global sobre si estos factores son importantes para la regulación de la proteína *in vivo*.

Algunos experimentos indican que UCP3 no contribuiría a la conductancia basal de protones en el músculo esquelético (*proton leak* basal) (Cadenas et al., 1999b; Cadenas et al., 2002c) y sugieren la necesidad de un agente regulador de la actividad desacopladora de las UCPs, que estaría presente en las células. Uno de estos agentes activadores podría ser el **superóxido**. Utilizando la adición de xantina y xantina oxidasa como sistema generador de ROS, y en presencia de ácidos grasos, se ha descrito que el superóxido es capaz de inducir un desacoplamiento mediado por UCPs (regulable por GDP), en mitocondrias aisladas (Echtay et al., 2002c). Estudios posteriores con antioxidantes dirigidos al interior de la mitocondria o favoreciendo la producción de ROS en el complejo I de la cadena respiratoria, demostraron que el desacoplamiento mediado por UCPs estaba siendo inducido por el superóxido intramitochondrial (Echtay et al., 2002a; Talbot et al., 2004). En realidad, el superóxido podría activar a las UCPs mediante una interacción directa o a través de un producto intermediario como un peróxido lipídico. De hecho, posteriormente se observó que el 4-hidroxinonanal y otros compuestos derivados de la peroxidación lipídica, podían inducir un desacoplamiento a través de UCPs en mitocondrias aisladas y en ausencia de ácidos grasos (Echtay et al., 2003b), sugiriendo que estos compuestos actuarían como sensores de una excesiva producción de ROS, sobre la actividad de las UCPs. Estos datos están de acuerdo con una posible implicación de las proteínas en la modulación de la producción de ROS (ver apartado III.3.3). No obstante, estudios realizados sobre ratones *knock-out* para UCP2, indican que no existe ningún efecto del superóxido sobre la actividad desacopladora de esta proteína (Couplan et al., 2002b). Existen también datos parecidos en relación a UCP3 (Bouillaud, comunicación personal), manteniéndose por tanto, la polémica al respecto.

Muchos de estos experimentos están de acuerdo con una actividad desacopladora de UCP3, pero no demuestran que esta actividad sea la función biológica de la proteína *in vivo*. De hecho, esta pregunta sustenta un intenso debate actualmente que ha dado lugar a diversas y controvertidas hipótesis tratando de conciliar los datos

bioquímicos, fisiológicos y de expresión génica, a fin de encontrar cuál es el papel esencial de la proteína en la mitocondria y en el organismo completo.

III.4 PAPEL FISIOLÓGICO DE LA PROTEÍNA DESACOPLADORA MITOCONDRIAL UCP3

El gen *ucp3* se localiza en una región correspondiente a un QTL de obesidad y diabetes tipo II (Jaberi, 2004; Solanes et al., 1997a), por lo que desde su clonación en 1997, muchos grupos se han interesado en hallar el papel fisiológico de la proteína. Como hemos visto anteriormente, las características bioquímicas de la actividad de la proteína son todavía fruto de controversia, al igual que lo es su función.

III.4.1 UCP3: POSIBLE PAPEL EN LA TERMOGÉNESIS ADAPTATIVA Y CONTRIBUCIÓN A LA TASA METABÓLICA BASAL

UCP1 es determinante en la producción de calor durante la termogénesis en respuesta al frío, de hecho, los ratones *knock-out* para *eucp1* no sobreviven a exposiciones prolongadas al frío (Enerback et al., 1997). Dado a la elevada homología de UCP3 con UCP1 y a que UCP3 se expresa preferencialmente en músculo esquelético, que es un tejido termogénico, inicialmente se consideró que esta proteína podría intervenir también en la termogénesis en respuesta a frío, hormonas tiroideas y aumento de la ingesta.

Aunque existen datos contradictorios, la exposición al frío parece no regular la expresión de UCP3 (Boss et al., 1998c; Larkin et al., 1997a). Además los ratones *knock-out* para UCP3 no muestran ninguna alteración en la temperatura corporal ni en la respuesta al frío (Gong et al., 2000b; Vidal-Puig et al., 2000c), lo que excluye (aunque no pueda descartarse la acción mecanismos compensatorios) una posible implicación de la proteína en la generación de calor en respuesta a bajas temperaturas. Sin embargo, UCP3 podría estar involucrada en la termogénesis en respuesta a estímulos distintos al frío, como son las hormonas tiroideas (Gong et al., 1997c; Jekabsons et al., 1999; Lanni et al., 1999b; Larkin et al., 1997d), la leptina (Gong et al., 1997b; Rouru et al., 1999; Villarroya et al., 2001b), el LPS (lipopolisacárido) (Yu et al., 2000a) y citoquinas como el $TNF\alpha$ (Busquets et al., 1998b; Masaki et al., 1999b) que se sabe, aumentan la expresión de UCP3.

El hecho de que el LPS o citoquinas como el $TNF\alpha$ puedan inducir la expresión de UCP3, sugiere un posible papel de la proteína en la regulación de los mecanismos que

conducen a la fiebre. No obstante, se ha observado que pese a la inducción de UCP3 en músculo, no hay ningún aumento en el *proton leak* mitocondrial tras el tratamiento con LPS (Yu et al., 2000b). Recientemente, se ha descrito que los ratones *konck-out* para UCP3 son resistentes a la hipertermia consecuencia del tratamiento con MDMA (3,4-metilenedioximetamfetamina o éxtasis) (Mills et al., 2003; Mills et al., 2004), lo que parece indicar que el desacoplamiento mediado por UCP3 puede afectar al gasto energético del organismo completo, al menos ante ciertas circunstancias no fisiológicas.

Durante el hipertiroidismo agudo se produce una aceleración del metabolismo, y como hemos mencionado, se ha descrito una inducción de la expresión de UCP3 en respuesta al tratamiento con hormonas tiroideas. Además, el hipertiroidismo provoca un aumento en la conductancia a los protones en el músculo, y se ha propuesto que este efecto estaría mediado por UCP3 (de Lange et al., 2001; Lanni et al., 1999a). No obstante, el aumento de la conductancia tiene lugar también en el hígado, tejido dónde no se expresa ninguna UCP (Harper and Brand, 1994). Además, los ratones *knock-out* para UCP3 muestran una respuesta normal a las hormonas tiroideas (Gong et al., 2000a).

Aunque la proteína manifieste una actividad desacopladora *in vitro*, ésta podría mediar un *proton leak* que no fuera significativo fisiológicamente. De hecho, UCP1 logra su efecto termogénico gracias a alcanzar un nivel de expresión en el TAM muy superior al que presentan las demás UCPs en sus lugares de expresión. Además, el TAM es un tejido especialmente diseñado para la producción de calor, con una expresión relativa de ATPsintasa muy baja, para favorecer la disipación de energía (Krauss et al., 2005a). Otro fuerte argumento en contra de un papel termogénico de las UCPs es el hecho de que su expresión aumente durante el ayuno (Gong et al., 1997a; Millet et al., 1997b). Durante el ayuno, el gasto energético disminuye (Leibel et al., 1995), por lo que resulta paradójico que en esta situación, aumente la expresión de una proteína encaminada a disipar la energía en un ciclo fútil como un desacoplamiento. Así, parece comúnmente aceptado que UCP3 no tiene *in vivo*, una función primordialmente termogénica.

Aunque UCP3 no contribuya a la termogénesis adaptativa, podría contribuir a la regulación de la **tasa metabólica basal** con su actividad desacoplante. La tasa metabólica basal es una importante componente del gasto energético global, así que su modulación puede ser importante en la regulación del peso corporal. El metabolismo del músculo esquelético, es una importante componente del gasto energético y representa más del 20% de la tasa metabólica basal. Además, el *proton leak* mitocondrial supone una disipación de energía que contribuye significativamente a la tasa metabólica basal, y

por ejemplo en el músculo esquelético el *proton leak* representa un 15% de la tasa metabólica (el 34% de la tasa de respiración mitocondrial es independiente de la síntesis de ATP) (Rolfe et al., 1999a). Por ello, se piensa que UCP3, que se expresa preferencialmente en músculo esquelético, podría contribuir a la modulación de la tasa de consumo energético. De hecho, se han descrito polimorfismos del gen *ucp3* ligados a la tasa metabólica basal en humanos (Bouchard et al., 1997) y existe cierta correlación entre los niveles de expresión de UCP3 y la tasa metabólica basal (Harper et al., 2002b; Schrauwen et al., 1999a; Walder et al., 1998). Igualmente, en los indios Pima se ha descrito una correlación inversa entre el índice de masa corporal (BMI o *body mass index*) y la expresión de UCP3 (Schrauwen et al., 1999b), aunque existen datos que muestran una ausencia de correlación entre ambos parámetros (Millet et al., 1997a). A favor de una posible relación de UCP3 con la regulación del peso corporal, se describió también, una reducción en los niveles de UCP3 y del desacoplamiento, en mujeres obesas (Harper et al., 2002c). Por otro lado, los ratones transgénicos que sobreexpresan UCP3 en músculo esquelético son resistentes a desarrollar obesidad en respuesta a la dieta, incluso pese a mostrar una ingesta superior que los animales salvajes (Clapham et al., 2000b). No obstante, se comprobó que los ratones *knock-out* para *ucp3* no tenían ninguna alteración del metabolismo energético ni de la tasa metabólica basal, y por tanto no desarrollaban obesidad (Bezaire et al., 2005b; Cline et al., 2001; Gong et al., 2000d; Vidal-Puig et al., 2000b). Como hemos visto previamente, se demostró que en los ratones transgénicos, el desacoplamiento inducido al sobreexpresar UCP3 es artefactual (Cadenas et al., 2002b), por lo que no se puede descartar que los efectos observados en estos animales sean independientes de la actividad de UCP3, sobretodo teniendo en cuenta que durante años, los desacoplantes químicos como el dinitrofenol, se utilizaron como agentes “adelgazantes” por su capacidad para aumentar la demanda energética (Harper et al., 2001).

III.4.2 UCP3: INDUCTOR DE LA OXIDACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS

Como hemos visto previamente, existe una fuerte correlación entre los niveles de expresión de UCP3 y la concentración de ácidos grasos libres. Además, la proteína se expresa en tipos celulares que participan activamente en el metabolismo de los ácidos grasos, como son el músculo esquelético y el tejido adiposo marrón. Estos datos sugieren que UCP3 podría estar implicada en algún proceso relacionado con la oxidación de ácidos grasos (Dulloo and Samec, 2000). En humanos, una mayor disponibilidad de ácidos grasos circulantes ejerce una inhibición sobre la oxidación de glucosa que conduce a un *shift* o cambio en la utilización de substrato oxidativo, pasando de

carbohidratos a lípidos. UCP3 podría facilitar la oxidación de ácidos grasos mediante su actividad desacoplante (aumentando el flujo de la cadena respiratoria y acelerando el metabolismo), facilitando la entrada de ácidos grasos a la mitocondria y/o actuando sobre algún punto de la β -oxidación. De hecho, la expresión de UCP3 es elevada en situaciones en las que la oxidación de ácidos grasos puede exceder la capacidad oxidativa de la mitocondria como el ayuno (Cadenas et al., 1999a; Millet et al., 1997d), el ejercicio agudo (Tsuboyama-Kasaoka et al., 1998b), una dieta rica en grasas (Hesselink et al., 2003; Weigle et al., 1998a) y en fibras glicolíticas de contracción rápida (Hoeks et al., 2003a). Igualmente, la expresión de UCP3 disminuye cuando la capacidad oxidativa mitocondrial es mayor, como tras un entrenamiento de resistencia (Boss et al., 1998b), pérdida de peso (Vidal-Puig et al., 1999), y en fibras musculares de tipo I (con gran capacidad de oxidar lípidos) (Samec et al., 1998a; Samec et al., 1998b). Existen también estudios genéticos que sugieren una relación de UCP3 con la oxidación de ácidos grasos (Lanouette et al., 2001).

Varios datos experimentales sugieren que UCP3 facilita la oxidación de ácidos grasos. En experimentos dónde se inducía la sobreexpresión de UCP3 en una línea muscular mediante un vector adenovírico, se observó que la proteína favorecía la oxidación de ácidos grasos frente a la de glucosa (Garcia-Martinez et al., 2001b). Recientemente, utilizando ratones transgénicos diseñados para sobreexpresar moderadamente UCP3 (Bezaire et al., 2005a) se ha observado el mismo efecto, por lo que parece corroborarse la hipótesis de que UCP3 facilita la oxidación de ácidos grasos en el músculo esquelético. En el mismo sentido, ratones *knock-out* para *ucp3* mostraron un desajuste en el cambio de utilización de substrato oxidativo durante el ayuno, evidenciando un problema en la regulación de la oxidación/almacenaje de lípidos (Hong et al., 2001a; Muoio et al., 2000). Además, UCP3 puede favorecer la oxidación de ácidos grasos fuera del músculo, como lo demuestran experimentos realizados en células de insulinoma (Hong et al., 2001b).

III.4.3 UCP3 COMO TRANSPORTADOR DE ÁCIDOS GRASOS AL EXTERIOR DE LA MITOCONDRIA. CONTROL DE LA LIPOTOXICIDAD

Basándose en la hipótesis de que la actividad de las UCPs fuera translocar ácidos grasos al exterior de la matriz (ver principio apartado III) se propuso la hipótesis de que la función de la proteína fuera la de evitar el acúmulo de ácidos grasos no-esterificados en el interior de la mitocondria, especialmente en situaciones en las que la disponibilidad de ácidos grasos excede la capacidad oxidativa de la célula. El acúmulo de ácidos grasos

puede desencadenar procesos de lipotoxicidad (peroxidación lipídica etc.) que pueden resultar perjudiciales para la funcionalidad de la mitocondria..

En el citoplasma, la acil-CoA sintasa esterifica los ácidos grasos no-esterificados uniéndoles un grupo acil-CoA. El éster se convierte a acil-carnitina por la actividad CPT I (carnitina palmitoil transferasa I), para poder atravesar la membrana mitocondrial interna, dónde es de nuevo transformado a acil-CoA a través de la acción de la CPT II. Sin embargo, los ácidos grasos no-esterificados pueden difundir a través de la membrana mitocondrial interna en forma neutra (protonados) por un mecanismo de *flip-flop*. Una vez en la matriz, los ácidos grasos no esterificados pierden el protón debido al elevado pH intramitocondrial. Así, son capaces de disipar el gradiente de H⁺ creado durante la respiración. Únicamente los ácidos grasos esterificados pueden entrar en la β-oxidación. Así, el ácido graso no-esterificado, una vez en la matriz, no podrá ser oxidado ya que no existe Acil-CoA sintasa en el interior de la mitocondria. Estos ácidos no-esterificados tampoco pueden atravesar la membrana hacia el exterior (no pueden neutralizarse por la diferencia de pH), por lo que se acumulan en la mitocondria (Schrauwen et al., 2001; Schrauwen et al., 2003).

En otro modelo, la función de UCP3 se relaciona con aumento de la capacidad oxidativa de ácidos grasos. Una vez en la matriz, los ácidos grasos esterificados liberarían sus grupos acil-CoA gracias a la acción de una tioesterasa intramitocondrial, quedando disponible para enzimas que participan en el Ciclo de Krebs y la β-oxidación, lo que favorecería la actividad de estas vías. El consecuente acúmulo de ácidos grasos no esterificados, haría necesaria la acción de un transportador como UCP3 (Himms-Hagen and Harper, 2001).

No obstante, no existen datos experimentales a favor de que UCP3 realice una función de transporte de ácidos grasos, y esta hipótesis está basada principalmente en la correlación existente entre la expresión de UCP3 y aquellas situaciones que se caracterizan por una elevada oxidación de ácidos grasos (ver apartado III.3.1).

III.4.4 CONTROL DE LA PRODUCCIÓN DE ROS

El potencial de membrana mitocondrial, puede condicionar la tasa de producción de ROS a nivel de la cadena respiratoria (Bodrova et al., 1998b; Papa and Skulachev, 1997a). Elevados potenciales de membrana, contribuyen al enlentecimiento de la cadena respiratoria (condiciones correspondientes a un estado 4), y con ello al enlentecimiento

en la recircularización de quinonas reducidas, que favorecen la formación de superóxido (ver apartado I.2). La formación de ROS disminuye cuando la actividad de la cadena respiratoria se acelera, por ejemplo ante un aumento de la demanda de ATP (estado 3) (Votyakova and Reynolds, 2001). Por ello, Skulachev (Bodrova et al., 1998a; Kim-Han et al., 2001; Papa and Skulachev, 1997b; Skulachev, 1998) propuso que las células aeróbicas habrían desarrollado un sistema contra la toxicidad que puede suponer un acúmulo de ROS, basado en un aumento de la conductancia a los H^+ a través de la membrana mitocondrial interna, que provocaría un desacoplamiento suave (*mild uncoupling*) entre respiración y fosforilación oxidativa. De hecho, los desacoplantes químicos aumentan la velocidad de la respiración, disminuyendo la formación de superóxido (Boveris and CHANCE, 1973; Okuda et al., 1992b).

Así, una de las funciones propuestas para las UCPs en general, y para UCP3 en particular, es la de inducir un desacoplamiento suave entre respiración y fosforilación oxidativa, impidiendo que el $\Delta\Psi$ mitocondrial se eleve por encima de un umbral crítico para la formación de ROS. Se ha demostrado que UCP1 es capaz de disminuir la producción de ROS, ya sea en sistemas de expresión heterólogos o en el propio TAM, gracias a su actividad desacoplante (Negre-Salvayre et al., 1997b; Vidal-Puig et al., 2000a).

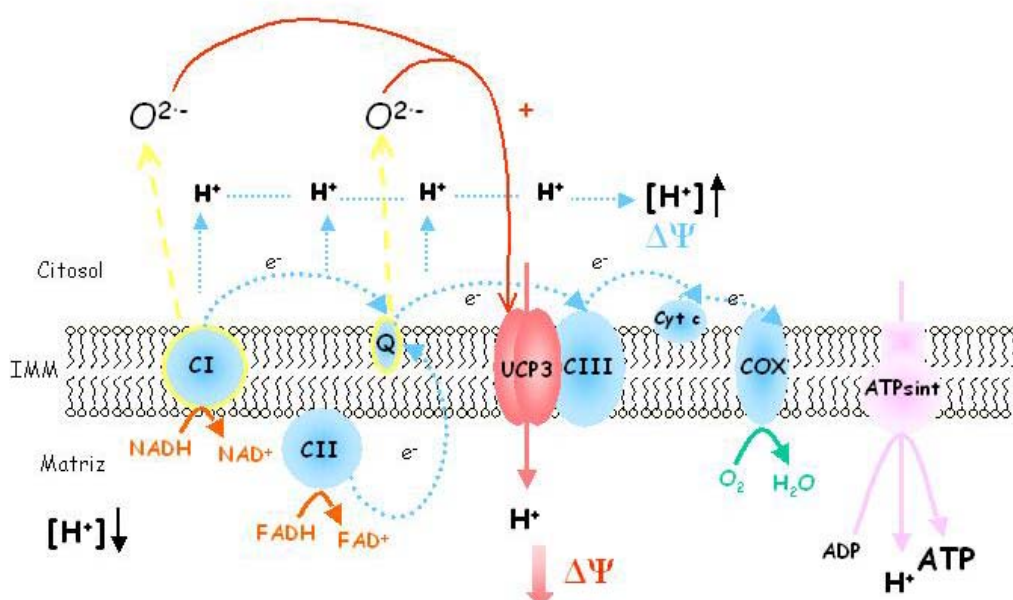


FIGURA 10: Esquema de los principales lugares de producción de ROS en la cadena respiratoria y la posible localización de UCP3. El superóxido producido a nivel del complejo I y III de la cadena respiratoria activaría a UCP3 que induciría a su vez un desacoplamiento con la consiguiente reducción en la producción de ROS. Datos recientes sugieren que la ubiquinona (coenzima Q) sería indispensable para la activación de UCP3 que consecuentemente se localizaría próxima al complejo III (apartado III.2).

Nègre-Salvayre et al. demostraron que la inhibición de UCP2 por GDP estimulaba la producción de H_2O_2 (Negre-Salvayre et al., 1997a) en mitocondrias aisladas. Los trabajos con ratones deficientes para la expresión de UCP2, y también de UCP3, han aportado nuevos datos al respecto de una relación de estas proteínas con el estrés oxidativo. Los ratones *knock-out* para *ucp2* muestran una mayor producción de ROS en macrófagos, lo que confiere a las células de resistencia a infecciones parasitarias (Arsenijevic et al., 2000b). UCP2 podría estar implicado por tanto, en la inmunidad mediada por macrófagos, células dónde se expresa de forma importante (Fleury et al., 1997; Gimeno et al., 1997). El efecto de UCP2 sobre la producción de ROS se ha podido observar también en células endoteliales de origen murino, dónde oligonucleótidos antisentido contra el mRNA de *ucp2*, provocan un aumento en la producción de ROS (Duval et al., 2002). Además, se han publicado varios estudios en los que se demuestra una inducción de la expresión de UCP2 con el estrés oxidativo (Lee et al., 1999; Pecqueur et al., 2001b). Así, existen numerosos datos que relacionan la actividad de UCP2 con la producción de ROS, y esta relación parece ser relevante en el desarrollo de procesos patológicos como la aterosclerosis (Blanc et al., 2003) o la diabetes (Krauss et al., 2005d).

En cuanto a UCP3 también existen ciertos datos que apuntan a una relación entre la actividad de la proteína y el control de la producción de ROS. Los *knock-out* para *ucp3* muestran una actividad aconitasa inferior que los ratones control en sus músculos esqueléticos (Vidal-Puig et al., 2000f). La actividad aconitasa se utiliza como marcador de estrés oxidativo por tratarse de un enzima cuya actividad es extremadamente sensible al anión superóxido. Estos ratones muestran además una serie de marcadores de daño oxidativo alterados (Brand et al., 2002) indicando una mayor producción de ROS.

La hipótesis de una intervención de UCP3 en el metabolismo de los ROS ganó fuerza con la observación de que la ubiquinona, en su forma reducida, era necesaria para la activación de las UCPs (Echtay et al., 2000d). De acuerdo a esta hipótesis, se consideró que UCP3 estaría localizada en algún lugar entre el complejo III y la ubiquinona, facilitando la oxidación de ésta mediante la estimulación del flujo electrónico a través de la cadena respiratoria, y disminuyendo así la probabilidad de una reducción parcial del oxígeno. No obstante, y como se ha mencionado previamente, existe cierta controversia al respecto de la necesidad de la ubiquinona en la función de las UCPs (Jaburek and Garlid, 2003a). Recientemente el grupo de Brand describió que el anión

superóxido era capaz de estimular el desacoplamiento mediado por UCPs (Echtay et al., 2002b), lo que sugiere un mecanismo de feed-back o retroalimentación negativa en el que los propios ROS ejerzan de sensores de un exceso de formación de especies reactivas, activando una proteína que ha de limitar su producción. De hecho, parece que el superóxido no activaría a las UCPs directamente, sino a través de intermediarios como el 4-hidroxi-nonenal, un producto derivado de la peroxidación lipídica (Echtay et al., 2003a). Se establece así un nexo de unión entre dos inductores de la actividad bioquímica de las UCPs, como son los ácidos grasos y el superóxido. Sin embargo, como ya hemos mencionado, recientemente se ha cuestionado la capacidad del superóxido para activar el desacoplamiento mediado por UCP2 (Couplan et al., 2002a).

III.4.5 UCP3 COMO MODULADOR DE LA MUERTE CELULAR PROGRAMADA

Como hemos visto anteriormente, la mitocondria juega un importante papel en la regulación de la muerte celular. Dada la localización y propiedades bioquímicas de UCP3, existen varios motivos que sugieren una implicación de esta proteína en el control de la apoptosis. La apoptosis es un proceso complejo en el que participan múltiples factores y que está influenciado por tanto, por muchos parámetros, algunos de los cuales, podrían tener relación directa con la actividad de la proteína, como son el potencial de membrana mitocondrial, los ROS, la relación ATP/ADP. Como hemos visto, datos recientes sugieren que UCP3 podría limitar la producción de **ROS** mitocondriales gracias a su actividad desacoplante (ver apartado III.3.4). Los ROS pueden afectar al proceso de apoptosis a diferentes niveles, y de hecho su relación con dicho proceso es muy compleja, pero a menudo, los datos que sugieren una relación de alguna UCP con el control de la muerte celular, pasan por la limitación de la producción de estas moléculas reactivas (de Bilbao et al., 2004b; Mattiasson et al., 2003b; Teshima et al., 2003a; Vincent et al., 2004c).

UCP3 también podría tener un efecto sobre la regulación de la muerte celular a través de su **actividad desacoplante**, o mediante su **interacción con otras proteínas** implicadas en la regulación del proceso (ver Discusión Global).

Es importante considerar también, que la expresión de UCP3 incrementa en el músculo esquelético ante **señales de estrés metabólico** como el $\text{TNF}\alpha$ (Busquets et al., 1998a; Masaki et al., 1999a) o los glucocorticoides (Sun et al., 2003a) y en situaciones como la caquexia cancerosa (Bing et al., 2000) o la sepsis (Sun et al., 2003c). Estas señales de estrés pueden conducir a la muerte celular en determinados tipos celulares (Gupta, 2001; Penzo et al., 2002a). Los niveles de mRNA de UCP3 aumentan en

cualquier situación en que también lo hagan los de ácidos grasos libres (ver apartado III.1.1). Éstos pueden suponer un estrés metabólico y causar apoptosis cuando superan la capacidad oxidativa celular, por mecanismos dependientes o independientes de estrés oxidativo (ver apartado I.3:LIPOAPOPTOSIS: PAPEL DE LOS ROS EN EL EFECTO DE LOS ÁCIDOS GRASOS SOBRE LA APOPTOSIS). Además, son conocidos inductores de la actividad desacoplante mediada por UCP3. Así, se han propuesto diversas formas en que la proteína podría estar actuando en contra de los posibles efectos perjudiciales consecuentes a un acúmulo de ácidos grasos, como por ejemplo, facilitar la oxidación de los ácidos grasos limitando la producción de ROS consecuente o extraer ácidos grasos de la matriz mitocondrial evitando su acúmulo (ver apartado III.3.2 y III.3.3).

UCP2 fue el primer miembro de la familia de las UCPs relacionado recientemente con la regulación de la apoptosis. El gen *ucp2* se encontró sobreexpresado en respuesta a la radiación UV, en una línea celular sensible a la apoptosis inducida por este tipo de estímulos (Voehringer et al., 2000). Posteriormente se observó que la sobreexpresión de la proteína en células HeLa inducía un tipo de muerte celular denominado oncosis, caracterizado por la depleción súbita de ATP, así como la pérdida de homeostasis iónica y el *swelling* mitocondrial consecuentes (Mills et al., 2002). Se ha descrito que UCP2 podría favorecer la muerte celular en otros sistemas como en células 3T3-L1, dónde el proceso también está asociado a un descenso abrupto de los niveles de ATP a causa del desacoplamiento inducido por la proteína (Sun and Zemel, 2004).

No obstante, recientemente han aparecido varios datos que sugieren un papel protector de UCP2 frente a la muerte celular inducida por diferentes tipos de estrés y en diferentes tipos celulares (Mattiasson et al., 2003a; Teshima et al., 2003b). Un acúmulo de ácidos grasos parece jugar un importante papel en el desarrollo de la diabetes. La lipotoxicidad puede afectar a la viabilidad de las células β -pancreáticas, y se ha observado que los islotes pancreáticos de ratones *knock-out* para UCP2 resisten los efectos tóxicos del palmitato (Joseph et al., 2004). Por otro lado, las observaciones realizadas sobre el tejido o células neuronales están también a favor de un papel protector de la proteína frente a la muerte celular, y dicha protección parece relacionada con su capacidad para limitar la producción de ROS (Diano et al., 2003; Mattiasson et al., 2003c). Los ratones *knock-out* para UCP2 muestra un resistencia al infarto cerebral ante una isquemia. Sin embargo, la ausencia permanente de UCP2 desencadena mecanismos adaptativos para la inducción de mecanismos antioxidantes como la superóxido dismutasa-2, y se cree que esto es en realidad, lo que confiere a las células una

resistencia fisiológica a los estímulos perjudiciales mediados por ROS (de Bilbao et al., 2004a).

Por el momento, son pocos los estudios sobre la relación de UCP3 con el control de la muerte celular. En un trabajo publicado recientemente, se observa una inducción de la expresión de UCP3, entre los primeros eventos que conducen al daño muscular, durante el desarrollo de la esclerosis lateral amiotrófica (ALS) (Dupuis et al., 2003). En este caso, tampoco está claro si la inducción de UCP3 interviene en el origen de la patología, o si forma parte de los mecanismos que se desencadenan para contrarrestar los estímulos que inician el proceso. Por otro lado, y al igual que sucedía con UCP2, en células neuronales, parece tener un efecto mayoritariamente protector. Así, en tejido neuronal, la expresión de UCP3 protege contra la apoptosis inducida por un exceso de glucosa en células de neuroblastoma (Leininger et al., 2004a) y neuronas ganglionares (Vincent et al., 2004b).

Dada la disparidad de resultados, es probable que al igual que lo que parece suceder para UCP2, la función de UCP3 respecto a la regulación de la apoptosis, sea dependiente del tipo celular y del estímulo o estrés concreto.

A parte de las comentadas, han surgido otras hipótesis para explicar cuál sería su papel en la mitocondria, como la regulación del metabolismo de la glucosa (Huppertz et al., 2001) o la regulación del estado redox celular (Ricquier and Bouillaud, 2000c). El trabajo recogido en esta tesis doctoral se ha centrado en determinar la relación de UCP3 con el control de la producción de ROS y la respuesta celular a los estímulos pro-apoptóticos.