

Proteínas Rac1 y NADPH oxidasa en mitocondrias de ratas hipertensas

*J.E. Hernández-Salmerón, A. Abarca-Liera, M. Clemente-Guerrero,
A. Saavedra-Molina, S. Manzo-Avalos*

Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Resumen

Las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte en el mundo, ocasionando alrededor de un millón de muertes anuales; resultan de varios desórdenes, entre los que se incluye la hipertensión arterial, la cual se define como la pérdida del tono vascular del sistema circulatorio. Existen evidencias de que los niveles de especies reactivas de oxígeno (ERO) se incrementan y que el estrés oxidativo está involucrado en la hipertensión. Las mitocondrias se consideran el principal orgánulo para la respiración y producción de radicales libres. Otra fuente importante de ERO es la enzima NADPH oxidasa, la cual está formada por varias proteínas entre las que se incluyen las proteínas Rac. Se ha demostrado que Rac1 induce la producción de ERO en la célula mediante la regulación de la actividad de la NADPH oxidasa. El objetivo del presente trabajo fue determinar la presencia de las proteínas NADPH oxidasa y Rac en mitocondrias aisladas de diferentes órganos de ratas hipertensas (SHR) y determinar los niveles de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD) y catalasa. Mediante el análisis de Western blot, se determinó la presencia de las proteínas Rac1, NADPH oxidasa, SOD-2 y catalasa en las mitocondrias de los diferentes órganos y se encontró que sus niveles varían en la hipertensión. Los resultados obtenidos representan el primer reporte sobre la presencia en las mitocondrias de las proteínas Rac1 y NADPH oxidasa, las cuales podrían tener un papel importante en la regulación del metabolismo a nivel mitocondrial. Además, estas proteínas podrían funcionar como posibles blancos terapéuticos en la hipertensión.

Palabras clave: Hipertensión, Mitocondria, Rac1, NADPH oxidasa, Superóxido dismutasa (SOD), catalasa.

Abstract

Rac1 and NADPH oxidase proteins in mitochondria from hypertensive rats.

Cardiovascular disease is the leading cause of death worldwide, causing about one million deaths annually. It results from several disorders, including hypertension, which is defined as the loss of vascular tone of the circulatory system. There is evidence that levels of reactive oxygen species (ROS) are increased and that the oxidative stress generated is involved in hypertension. Mitochondria are considered the main organelle for respiration and the principal site of free-radicals production. Another important source of ROS is the NADPH oxidase enzyme (NOX), which consists of several proteins, including Rac proteins. Rac1 has been shown to induce ROS production in the cell by regulating the activity of NOX. The aim of this study was to determine the presence of NADPH oxidase and Rac proteins in mitochondria isolated from different organs of hypertensive rats (SHR) and to determine the levels of antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD) and catalase. By Western blot analysis, we identified the presence of Rac1, NADPH oxidase, SOD-2 and catalase proteins in mitochondria from different organs and found that their levels varied in hypertension. These data represent the first report about the presence in mitochondria of Rac1 and NADPH oxidase proteins, which could play an important role in energetic metabolism regulation. In addition, these proteins could be used as potential therapeutic targets in hypertension.

Key words: Hypertension, Mitochondria, Rac1, NADPH oxidase, Superoxide dismutase (SOD), catalase.

Introducción

Las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte en el mundo, ocasionando alrededor de un millón de muertes anuales (Poulter, 2003). Resultan de varios desórdenes, entre los que se incluyen: la diabetes, la hipertensión, el alcoholismo, la obesidad y el síndrome metabólico. La enfermedad cardiovascular se define como cualquier desorden que disminuye la función vascular normal del corazón (Wold *et al.*, 2005). Una de las principales causas de estas enfermedades es la hipertensión arterial, que se define como la pérdida del tono vascular del sistema circulatorio (Cruz, 2001) y se detecta por la presencia de cifras de presión arterial superiores a 140/90 mm de Hg. En México en el año 2000 la prevalencia de la hipertensión arterial sistémica entre los 20 y 69 años de edad fue de 15 millones de mexicanos (Velázquez-Monroy *et al.*, 2003). Este número va en ascenso ya que la ENSANUT en el 2006 estimó para el 2007 alrededor de 17 millones de adultos mayores de 20 años (Olaiz-Fernández *et al.*, 2006).

Muchas enfermedades son el resultado de un desbalance entre la producción y reducción de radicales libres (de Champlain *et al.*, 2004). Las células de los organismos aerobios producen continuamente especies reactivas de oxígeno (ERO), dentro de las cuales se incluyen: el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo ($OH^{\cdot}$). Un desbalance entre la producción de ERO y los sistemas antioxidantes con que cuenta el organismo puede conducir al estrés oxidativo, el cual ocasiona daño celular y tisular mediante la lipoperoxidación de las membranas, la oxidación y nitración de proteínas y el daño al DNA (Halliwell, 1987). Varios estudios han demostrado que el estrés oxidativo está involucrado en la hipertensión (Lacy *et al.*, 1998). En ratas espontáneamente hipertensas (SHR) se incrementan los niveles del $O_2^{\cdot-}$ (Schnackenberg *et al.*, 1999), el cual puede reaccionar con el óxido nítrico (NO), disminuyendo su biodisponibilidad y, por lo tanto, su poder de vasorrelajación, lo que a su vez contribuye al mantenimiento de la hipertensión (Vaziri *et al.*, 1999).

Las mitocondrias se consideran los centros bioenergéticos de las células eucariontes ya que generan del 80 al 90% del ATP mediante la fosforilación oxidativa (Szewczyk y Wojtczak, 2002). Son altamente dinámicas, al ser consideradas como el principal orgánulo para la respiración y el mayor sitio de producción de radicales libres (Dhanasekaran *et al.*, 2004; Dudley *et al.*, 2006; Kil *et al.*, 2006). Además, las mitocondrias son el principal blanco de las ERO, creándose un ciclo vicioso donde la generación de ERO pueden dañarlas y, como consecuencia, incrementar la generación de ERO (Lenaz *et al.*, 2000).

Las enzimas antioxidantes cumplen con el papel principal en la línea de defensa contra el exceso de radicales libres (Ghio *et al.*, 2004). Son las encargadas de regular la producción y reducción de las ERO y neutralizar los productos de la peroxidación. Dentro de los sistemas de defensa enzimáticos, están la superóxido dismutasa (SOD), la glutatión peroxidasa y la catalasa (Augustin *et al.*, 1997). La SOD es la primera enzima del proceso antioxidante, ya que cataliza la conversión del $O_2^{\cdot-}$ en O_2 y peróxido de hidrógeno (H_2O_2), mientras que la catalasa convierte el H_2O_2 en O_2 y agua. La catalasa se encuentra en casi todas las células eucariontes, dentro de los peroxisomas (Mueller *et al.*, 2002).

Se ha reportado que los pacientes hipertensos se encuentran en un estado de estrés oxidativo, debido a una sobreproducción de productos oxidados, o al hecho de que el sistema de defensa antioxidante se ha sobrecargado (Labiós *et al.*, 2009).

Las proteínas Rho forman parte de la superfamilia Ras que agrupa en total cinco familias de proteínas, incluyendo a Rho, todas ellas conocidas como proteínas G monoméricas por su característica de unir nucleótidos de guanina (Kaziro *et al.*, 1989). La familia de las proteínas Rho en mamíferos consiste de varias proteínas, entre las que se incluyen: Rho (A, B y C), Rac (1 y 2), Cdc42 (Cdc42Hs y G25K), Rho D, Rho G, Rho E y TC10. Estas proteínas son activas cuando tienen unido GTP, y se inactivan cuando hay un recambio del GTP por GDP (Van Aelst *et al.*, 1997).

Las proteínas Rac funcionan como interruptores moleculares integrando diversos estímulos en el sistema cardiovascular, entre los que se incluyen la estimulación de la activi-

dad de la NADPH oxidasa durante la producción del anión superóxido (Abo *et al.*, 1991), la organización del citoesqueleto de actina, y la expresión génica (Ridley, 2001). El $O_2^{\cdot-}$ se considera un mediador central en la fisiología cardiovascular, la reactividad vascular y la regulación de la presión sanguínea (Nowicki *et al.*, 2001). Rac1 es el miembro mejor caracterizado de la familia de Rac y se conoce por su importante papel en la regulación del citoesqueleto de actina, así como en la adhesión y migración celular (Van Aelst *et al.*, 1997). Se ha demostrado además que Rac1 induce la producción de ERO en neutrófilos (Diebold *et al.*, 2004).

La enzima NADPH oxidasa es un complejo enzimático que cataliza la transferencia de un electrón desde el NADPH hacia el O_2 , formando así el radical superóxido, el cual constituye un mecanismo fundamental de defensa en algunas células (Casado *et al.*, 1996). Aun cuando su principal función es de defensa, la producción en exceso del $O_2^{\cdot-}$ puede ser dañino para las células.

El papel de Rac como regulador de la NADPH oxidasa se describió por primera vez en fagocitos, donde las isoformas Rac1 y Rac2 controlan la respiración oxidativa (Gregg *et al.*, 2003). Recientemente, un complejo de NADPH oxidasa regulado por Rac1 ha sido caracterizado en células no fagocíticas, tales como células de músculo liso vascular, cardiomiocitos y células endoteliales (Griendling *et al.*, 2000). Rac es un componente esencial para el ensamblaje del complejo NADPH oxidasa tanto en células fagocíticas como no fagocíticas (Bokoch y Zhao, 2006).

Existen evidencias de que la sobreproducción del $O_2^{\cdot-}$ derivado de la NADPH oxidasa tiene un papel central en las enfermedades cardiovasculares, y que la actividad de esta enzima es bloqueada por el NO a través de la inhibición de la translocación de la proteína Rac1 (Muzaffar *et al.*, 2008).

Se ha propuesto que el estrés oxidativo está involucrado en el daño cardiopulmonar ocasionado por la exposición a contaminantes (Roberts *et al.*, 2003). Se ha demostrado que los metales causan estrés oxidativo al pulmón y al corazón *in vivo* (Ghio *et al.*, 2004). En hígado no existen evidencias de la participación de las proteínas Rac durante la hipertensión. Por otro lado, Boivin y Béliveau (1995) determinaron la presencia de Rac1 en las mitocondrias de riñón.

De acuerdo a lo reportado sobre la importancia de la participación de las proteínas Rac y NADPH oxidasa durante la hipertensión, es importante estudiar los niveles de dichas proteínas en los distintos órganos que pueden resultar alterados por efectos del estrés oxidativo. Por otro lado, no existe información de la presencia y niveles de las proteínas Rac1, NADPH oxidasa y de las enzimas antioxidantes en mitocondrias durante la hipertensión. Por lo anteriormente planteado, el objetivo del presente trabajo fue estudiar los niveles de Rac y NADPH oxidasa presentes en las mitocondrias de hígado, riñón, y pulmón de ratas hipertensas, así como los niveles de las enzimas antioxidantes SOD-2 y catalasa.

Materiales y métodos

Material biológico

Se emplearon ratas macho espontáneamente hipertensas (SHR) y normotensas Wistar Kyoto (WKY) de 3 meses de edad, las cuales fueron proporcionadas por la Unidad de Biomedicina de la Facultad de Estudios Superiores-Iztacala, UNAM.

Aislamiento de las mitocondrias

Se sacrificaron las ratas y se les extrajo el hígado, los riñones y los pulmones. El aislamiento de las mitocondrias de hígado y riñón se realizó por centrifugación diferencial, empleando el protocolo modificado por Saavedra-Molina y Devlin (1997). Los riñones y el hígado se colocaron en el medio 1 que contenía: 220 mM de manitol, 70 mM de sacarosa, 1 mM de EGTA (ácido etilén glicol-bis (beta-aminoetil éter N, N', N'-tetraacético) y 2 mM de MOPS (ácido 3-[N-morfolino] propano sulfónico), pH 7.4. Los órganos se cortaron en trozos pequeños y se homogenizaron mediante el empleo de un tubo de vidrio con un vástago de teflón. Posteriormente, utilizando una centrífuga Avanti-JE (Beckman Coulter), se centrifugó a 2,000 rpm por 10 min a 4°C para remover restos celulares. Se tomó el sobrenadante y se centrifugó a 7,500 rpm por 10 min a 4°C. La pastilla se resuspendió en el medio 2 que contenía: 220 mM de manitol, 70 mM de sacarosa y 2 mM de MOPS (pH 7.4) y se centrifugó a 9,000 rpm por 10 min. Se desechó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 1 ml de medio 2 para la determinación de la proteína. Las mitocondrias se mantuvieron a 4°C hasta el momento de su utilización.

En el caso de las mitocondrias de pulmón, el aislamiento se realizó de acuerdo al protocolo descrito por Pecqueur *et al.* (2001). Brevemente, el tejido extraído se cortó en trozos pequeños, se lavó en una solución salina al 0.9% para quitar el exceso de sangre y luego se pasó al medio TES, que contenía: 10 mM de Tris, 1 mM de EDTA (ácido etilendiaminotetraacético), 250 mM de sacarosa (pH 7.5). Posteriormente, se homogenizó y se filtró sobre una tela de nylon. Para remover los restos celulares y ácidos nucleicos, la muestra se centrifugó a 3,100 rpm por 10 min a 4°C. Se tomó el sobrenadante y se centrifugó a 11,300 rpm por 10 min a 4°C y posteriormente, la pastilla mitocondrial se resuspendió en 1 ml de Percoll al 15% depositándola en la superficie de un gradiente previamente preparado con Percoll al 40% y 23%. Se centrifugó a 19,250 rpm por 15 min a 4°C. De las tres bandas obtenidas, se tomó la banda inferior que corresponde a la fracción mitocondrial y se resuspendió en medio de aislamiento para su posterior centrifugación a 11,300 rpm por 10 min a 4°C. Se desechó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla mitocondrial en el medio de aislamiento. La concentración de proteína se determinó por el método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951) y se realizaron los cálculos correspondientes para ajustar el volumen a una concentración de 30 µg/ml, la cual fue empleada para todos los experimentos.

Inmunodetección de las proteínas Rac, NADPH oxidasa, SOD-2 y catalasa.

La inmunodetección de las proteínas se realizó de acuerdo al protocolo de Laemmli *et al.* (1970) y Towbin *et al.* (1979). Se tomaron 30 µg del homogenado total y de la fracción mitocondrial de hígado, riñón o pulmón proveniente de ratas WKY y SHR. Las muestras se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) al 13% durante 90 min a 100 V. Posteriormente, las proteínas fueron transferidas a membranas PVDF (fluoruro de polivinildieno Hybond-P de Amersham), empleando un equipo de transferencia húmedo durante 60 min a 100 V, empleando la solución de transferencia (25 mM de Tris, 192 mM de glicina, 20% de metanol). Una vez transferidas las proteínas, se mantuvieron las membranas con una solución TBS-T (10 mM de Tris/HCl, 150 mM de NaCl, 0.05% de Tween20), con leche al 5% toda la noche para bloquear sitios inespecíficos. Las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios anti-Rac1 (dilución 1:1,000), anti-NADPH oxidasa (1:2,000), anti-SOD-2 (1:2,000) y anti-catalasa (1:1,000), durante 90 min a temperatura ambiente en agitación moderada. Se lavaron 3 veces con solución TBS-T durante 10 min y se incubaron con el anticuerpo secundario IgG acoplado a peroxidasa (1:4,000) durante 60 min. Posteriormente, se realizaron lavados con la solución TBS-T para remover el anticuerpo unido inespecíficamente. Para determinar que la fracción mitocondrial se encuentra enriquecida y libre de contaminantes citosólicos, se empleó como marcador el anticuerpo específico anti-actina. La interacción antígeno-anticuerpo se determinó mediante quimioluminiscencia.

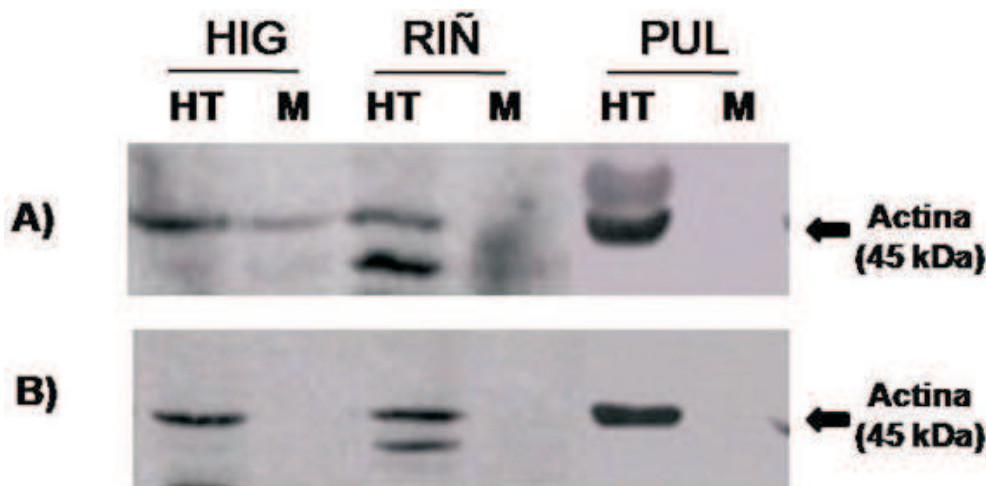


Figura 1. Pureza de las mitocondrias aisladas. Las muestras (30 µg) del homogenado total (HT) y de la fracción mitocondrial (M) de hígado (HÍG), riñón (RIÑ) y pulmón (PUL) tanto de ratas Wistar Kyoto (WKY) (A) y espontáneamente hipertensas (SHR) (B) se sometieron a electroforesis (SDS-PAGE 13%). Las proteínas fueron transferidas a membranas PVDF para su posterior inmunodetección con el anticuerpo específico anti-actina (1:2,000). La reacción antígeno-anticuerpo se determinó mediante quimioluminiscencia. kDa: kilodaltones.

Resultados

Mitocondrias libres de contaminantes citosólicos

Para demostrar que la fracción mitocondrial se encuentra enriquecida y libre de contaminantes citosólicos se utilizó como marcador la actina, la cual es una proteína citosólica. Los resultados de la inmunodetección de la actina tanto en el homogenado total como en la fracción mitocondrial de hígado, riñón y pulmón de muestras provenientes de ratas WKY y SHR se muestran en la figura 1. Se aprecia una banda de 45 kDa sólo en los homogenados totales de los diferentes órganos, la cual está ausente en las diferentes fracciones mitocondriales, tanto en ratas WKY como en SHR. Estos datos indican que las fracciones mitocondriales están libres de contaminantes citosólicos.

Niveles de las proteínas Rac1 y NADPH oxidasa

La inmunodetección de Rac1 en los diferentes órganos de ratas se muestra en la figura 2. Se aprecia una banda de 21 kDa correspondiente al peso molecular esperado para la proteína Rac1. En las mitocondrias de riñón y pulmón de ratas WKY, así como en el homogenado total de riñón se aprecia la presencia de Rac1, mientras que en el homogenado de pulmón, los niveles son despreciables. Resultados similares se obtuvieron en el homogenado total y en la fracción mitocondrial de hígado. En todas las muestras de ratas hipertensas se

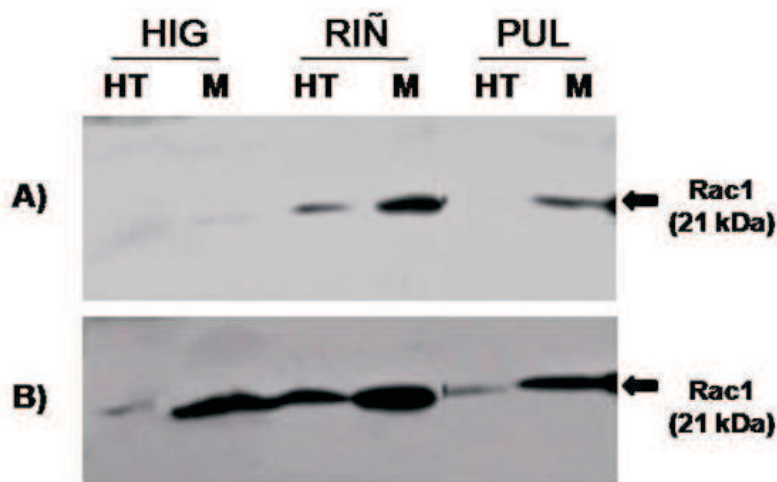


Figura 2. Inmunodetección de Rac1 en el homogenado total (HT) y la fracción mitocondrial (M) de hígado, riñón y pulmón de ratas normotensas (WKY) (A) y espontáneamente hipertensas (SHR) (B). Se cargaron 30 µg de proteína, se sometieron a electroforesis (SDS-PAGE 13%) y las proteínas transferidas a membranas PVDF se inmunodetectaron con el anticuerpo específico anti-Rac1 (1:2,000). La reacción antígeno-anticuerpo se determinó mediante quimioluminiscencia. HIG: hígado; RIÑ: riñón; PUL: pulmón. kDa: kilodaltones.

observó la presencia de Rac 1, tanto en homogenado total como en la fracción mitocondrial, siendo mayores los niveles de esta proteínas, comparado con las muestras de ratas normotensas. Además, sus niveles fueron mayores comparados con los de los homogenados totales. Estos resultados sugieren fuertemente la presencia de la proteína Rac1 en las mitocondrias y que sus niveles se incrementan durante la hipertensión.

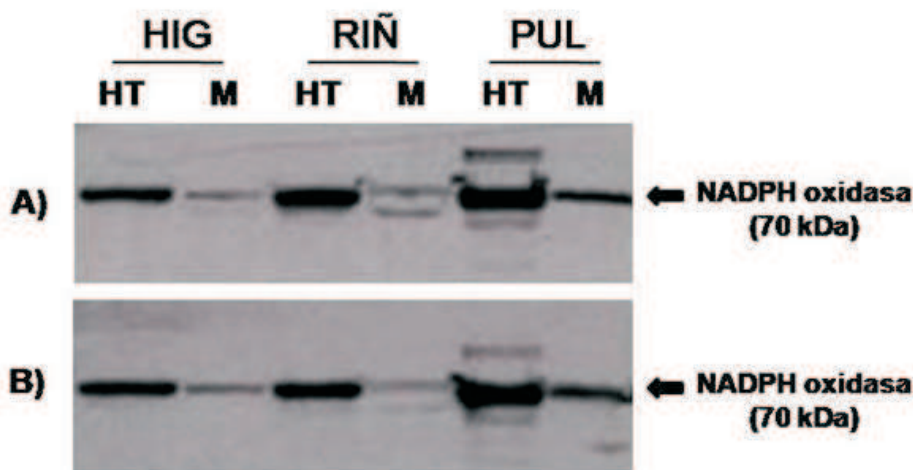


Figura 3. Inmunodetección de la NADPH oxidasa en el homogenado total (HT) y la fracción mitocondrial (M) de hígado, riñón y pulmón de ratas normotensas (WKY) (A) y espontáneamente hipertensas (SHR) (B). Se cargaron 30 µg de proteína, se sometieron a electroforesis (SDS-PAGE 13%) y las proteínas transferidas a membranas PVDF se inmunodetectaron con el anticuerpo específico anti-NOX4 (1:2,000). La reacción antígeno-anticuerpo se determinó mediante quimioluminiscencia. HIG: hígado; RIÑ: riñón; PUL: pulmón. kDa: kilodaltones.

Se determinaron los niveles de la NADPH oxidasa en los diferentes órganos durante la hipertensión. En la figura 3 se observa una banda de 70 kDa, la cual corresponde al peso molecular esperado para la NADPH oxidasa. Se aprecia la presencia de la proteína en las mitocondrias de hígado, riñón y pulmón, siendo mayores los niveles en mitocondrias de pulmón. Este resultado es novedoso ya que no existen reportes acerca de la presencia de la NADPH oxidasa en las mitocondrias de este órgano. Además, no se observaron diferencias significativas en los niveles de esta proteína en las muestras de ratas hipertensas. Es importante resaltar que la presencia de este complejo enzimático en las mitocondrias de hígado, riñón y pulmón, sugiere su participación en la producción del radical superóxido desde la mitocondria mediante esta vía enzimática.

Niveles de las enzimas antioxidantes SOD-2 y catalasa

A continuación se realizó la inmunodetección de las enzimas superóxido dismutasa y catalasa empleando anticuerpos específicos. En la figura 4A se muestran los resultados de

la inmunodetección de la SOD-2, donde se observa una banda de 27 kDa, que corresponde al peso molecular esperado. La proteína se encuentra presente tanto en el homogenado total como en la fracción mitocondrial de hígado, riñón y pulmón. Los niveles de la proteína son mayores en la fracción mitocondrial, comparados con el homogenado total; además, se aprecia que los niveles disminuyen en las muestras de ratas hipertensas comparados con los niveles de las muestras de ratas normotensas. En la figura 4B se muestran los resultados de la inmunodetección de la catalasa, donde se aprecia una banda de 60 kDa, correspondiente a su peso molecular. Los niveles de la catalasa son mayores en el homogenado total comparado con las fracciones mitocondriales, donde se observa que los niveles son bajos o despreciables. Además, se observó una disminución en los niveles de esta enzima en las muestras de ratas SHR comparados con los niveles de las muestras de ratas WKY. Estos datos sugieren que los niveles de las enzimas SOD-2 y catalasa están disminuidos en la hipertensión, lo cual probablemente favorece el aumento de las ERO reportado durante la hipertensión.

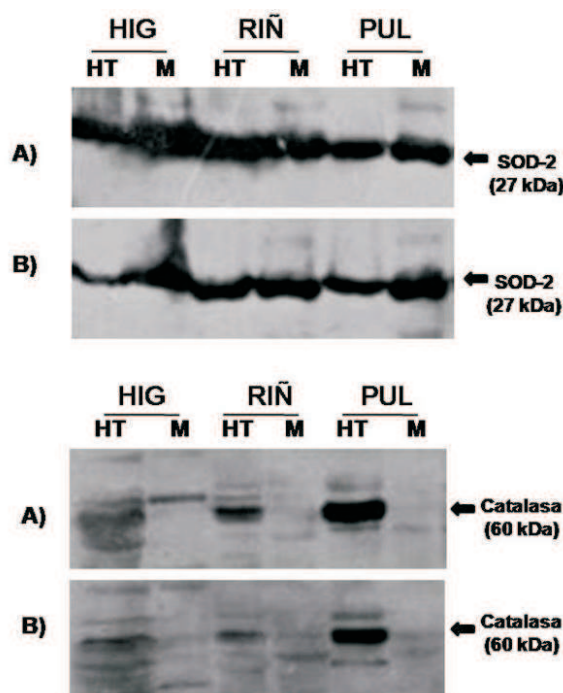


Figura 4. Inmunodetección de la superóxido dismutasa (SOD-2) y la catalasa en el homogenado total (HT) y la fracción mitocondrial (M) de hígado, riñón y pulmón de ratas normotensas (WKY) (A) y espontáneamente hipertensas (SHR) (B). Se cargaron 30 µg de proteína, se sometieron a electroforesis (SDS-PAGE 13%) y las proteínas transferidas a membranas PVDF se inmunodetectaron con el anticuerpo específico anti-SOD-2 (1:2,000) y anti-catalasa (1:2,000). La reacción antígeno-anticuerpo se determinó mediante quimioluminiscencia. HIG: hígado; RIÑ: riñón; PUL: pulmón. kDa: kilodaltones.

Discusión

Las proteínas G monoméricas de la familia de Rho tienen un papel importante en la regulación de varios procesos celulares mediados por el citoesqueleto de actina. Juegan un papel importante en las cascadas de señalización involucradas en la contracción del músculo liso vascular, el cual tiene un papel relevante durante la hipertensión (Seasholtz y Brown, 2004). En el presente trabajo se determinó la presencia de las proteínas Rac1 en las mitocondrias de hígado, riñón y pulmón y se observó que sus niveles de expresión se incrementan durante la hipertensión. Aun cuando existen reportes sobre la presencia de Rac1 en la fracción mitocondrial de las células beta TC3 (Kowluru *et al.*, 2003) y en mitocondrias de la corteza de riñón de rata (Boivin y Béliveau, 1995), estos datos son novedosos, ya que no existen reportes sobre la presencia de estas proteínas en mitocondrias de hígado y de pulmón de rata, así como del incremento de sus niveles en los homogenados totales y en las fracciones mitocondriales de los diferentes órganos estudiados durante la hipertensión. Recientemente, las proteínas Rac1 han cobrado gran importancia debido al papel relevante que tienen en la regulación de varios procesos biológicos. Park y Feltri (2011) reportaron que la reorganización del citoesqueleto dependiente de la proteína Rac también juega un papel importante en el proceso de mielinización durante el desarrollo de los nervios periféricos, así como en los cambios dinámicos de actina en la capa de mielina no compacta, los cuales son esenciales para el inicio de la desmielinización después del daño que sufren los nervios periféricos (Jung *et al.*, 2011).

La presencia de Rac en las mitocondrias sugiere que estas proteínas pueden tener un papel importante en la regulación del funcionamiento normal de la mitocondria. Yin *et al.* (2011) encontraron que la proteína Rac protege a las células Jurkat de la apoptosis en la leucemia humana, ya que promueve la transcripción de Bcl-2. Existen evidencias de que tanto la toxina B de *Clostridium difficile*, la cual inactiva a Rac, así como la forma constitutivamente inactiva N17Rac1, estimulan la apoptosis de las neuronas granulares mediante la liberación del citocromo c y la activación de las caspasas 9 y 3. Además, la toxina B estimula la translocación y la activación conformacional mitocondrial de Bax (Le *et al.*, 2005). En células de epitelio de la retina, la exposición a una dosis letal de H₂O₂ estimula la translocación de Bax a la mitocondria vía la proteína Rac (Ho *et al.*, 2006).

La enzima NADPH oxidasa se considera una fuente principal en la producción de las ERO, además de la mitocondria. En este estudio se inmunodetectó una isoforma de la subunidad gp91phox, denominada NOX4, la cual ha mostrado ser la mayor fuente de producción de radical superóxido en las células renales de animales diabéticos (Gorin *et al.*, 2005). La presencia de NOX4 en las mitocondrias ha sido recientemente determinada en cultivos de células mesangiales y en la corteza del riñón (Block *et al.*, 2009), donde se observó que la expresión de la NOX4 mitocondrial se incrementa durante la diabetes. Aun cuando no existen antecedentes acerca de los niveles de la NOX4 en la hipertensión, se observó el mismo patrón en los niveles de expresión que en la diabetes. Van Buul *et al.* (2005) determinaron que la forma activa de Rac promueve un incremento de 100 veces en los niveles de NOX4, comparado con NOX2, en células endoteliales de la vena umbilical de humano (HUVEC's),

así como un aumento en la producción de ERO, las cuales controlan la integridad del endotelio vascular. Por otro lado, Werner (2004) sugirió que las proteínas Rac, al controlar el estado redox de la célula vía la regulación de la actividad de la NADPH oxidasa, modifican la expresión de genes, la proliferación y la adhesión celular. Existen evidencias de que el $O_2^{\cdot-}$ generado por la NADPH oxidasa en la médula ventrolateral rostral (RVLM), donde se localizan las neuronas premotoras simpáticas para el mantenimiento de la presión arterial, participa principalmente en la fase temprana, mientras que el $O_2^{\cdot-}$ generado por la depresión en la actividad de las enzimas respiratorias mitocondriales median la fase tardía o la depresión cardiovascular inducida por el lipopolisacárido (LPS), el cual estimula indirectamente a las proteínas Rac (Sheh *et al.*, 2007). Estos resultados sugieren, por un lado, una tendencia en el incremento en la actividad de la NADPH oxidasa en condiciones patológicas, como la hipertensión y, por otro lado, que el aumento en los niveles de la NOX mitocondrial puede conllevar a un daño celular debido al aumento en la producción del anión superóxido reportado en la hipertensión (Lacy *et al.*, 1998).

Normalmente, la célula cuenta con mecanismos antioxidantes, tanto enzimáticos como no enzimáticos. Para ello, en este trabajo se analizó la presencia del sistema antioxidante enzimático en los diferentes órganos estudiados. La señal de SOD-2 en los órganos hipertensos mostró una ligera disminución, tanto en las mitocondrias como en el homogenado total de hígado, riñón y pulmón. Estos resultados difieren de los reportados por Vaziri *et al.* (2003), quienes trabajaron sólo con homogenado total de hígado, cerebro y corazón de ratas y la hipertensión se indujo con acetato. Sus resultados no mostraron cambios significativos en cuanto a los niveles de la SOD-2. Los resultados obtenidos en este trabajo indican una tendencia a la deficiencia en la dismutación del superóxido mediante esta vía enzimática, lo cual conlleva a un aumento en la producción de este radical y, por lo tanto, se favorece la prevalencia del estrés oxidativo durante la enfermedad.

La dismutación del $O_2^{\cdot-}$ produce el H_2O_2 , el cual es también dañino para la célula. Para ello, la célula cuenta con la catalasa y la glutatión peroxidasa, las cuales convierten el H_2O_2 en H_2O y O_2 (Singh *et al.*, 2010). Los bajos niveles de la catalasa pueden atribuirse a que la proteína esté dañada o degradada. La catalasa es una enzima compleja, formada por cuatro subunidades, cada una con ocho residuos de metionina y cinco residuos de triptófano, los cuales son lábiles a la oxidación por las ERO, especialmente por el singulete de oxígeno, lo que conduce a alteraciones estructurales y a la inactivación de la proteína (Schallreuter, 2005).

La baja señal observada en la inmunodetección de la catalasa, puede deberse a que la proteína se esté degradando debido al ataque de las ERO, como se mencionó anteriormente, siendo el daño más marcado en las muestras de los órganos de ratas hipertensas. En los homogenados totales de hígado, riñón y pulmón se nota la presencia de catalasa, pero notablemente disminuida en la hipertensión. Estos resultados difieren de los obtenidos por Vaziri *et al.* (2003) quienes no observaron cambios significativos en los niveles de la catalasa en el riñón durante la hipertensión inducida.

Existen evidencias acerca de la presencia de la catalasa en mitocondrias de *Saccharomyces cerevisiae* (Yankova *et al.*, 2002), en *Nicotiana silvestris* (Scandalios *et al.*, 1980), en mitocondrias de corazón (Radi *et al.*, 1991) y de hígado (Salvi *et al.*, 2007) de rata; sin embargo, en el presente trabajo observamos una ligera señal alrededor del peso molecular esperado para la catalasa, la cual difiere de los niveles reportados con anterioridad. Por lo tanto, son necesarios más ensayos para demostrar si realmente existen diferencias en los niveles o si nuestro resultado es producto de la degradación de la enzima. Adicionalmente, se sabe que los valores de la SOD en células cerebrales de diversos primates presentan una proporción directa con la edad. Los valores elevados, tanto de la SOD como de la catalasa pueden considerarse, al menos en parte, responsables de que se retrase la senilidad que precede a la muerte. Asimismo, en ensayos realizados con ratones, se afirma que la supervivencia también depende de los valores de la catalasa mitocondrial, ya que se comprobó que la vida media de los animales se prolonga un 40% sobre-expresando la enzima (Schriener *et al.*, 2005). Los datos obtenidos en el presente trabajo son novedosos debido a que la variación en los niveles de las enzimas antioxidantes durante la hipertensión proporciona nueva información para que se utilicen posibles precursores de blancos terapéuticos para un mejor control de dicha enfermedad.

Conclusión

Las proteínas Rac1 y NADPH oxidasa están presentes en las mitocondrias de rata y existe una expresión diferencial en la hipertensión, donde se incrementan sus niveles, mientras que disminuyen los niveles de las enzimas antioxidantes SOD-2 y catalasa.

Agradecimientos: Los autores agradecen el apoyo económico parcial proporcionado por Fondos Mixtos-CONACYT (MICH-2006-04-64308) y por la CIC-UMSNH 2.16, ASM; 2.33, SMA).

Literatura citada

- Abo A., Pick E., Hall A., Totti N., Teahan C.G., Segal A.W. 1991. Activation of the NADPH oxidase involves the small GTP-binding protein p21rac1. *Nature* **353**: 668-670.
- Augustin W., Wiswedel I., Noack H., Reinheckel T., Reichelt O. 1997. Role of endogenous and exogenous antioxidants in the defence against functional damage and lipid peroxidation in rat liver. mitochondria. *Mol Cell Biochem.* **174**: 199–205.
- Block K., Gorin Y., Abboud H.E. 2009. Subcellular localization of NOX4 and regulation in diabetes. *Proc Natl Acad Sci. USA.* **106**: 14385-14390.
- Boivin D., Béliveau R. 1995. Subcellular distribution and membrane association of Rho-related small GTP-binding proteins in kidney cortex. *Am J Physiol Renal Physiol.* **269**: 180-189.

- Bokoch G.M, Zhao T. 2006. Regulation of the phagocyte NADPH oxidase by Rac GTPase. *Antioxid Redox Signal*. **8**:1533-1548.
- Casado J.A., Merino J., Cid J., Subirá M.L., Sánchez-Ibarrola A. 1996. Antioxidantes y radicales libres en la Biomedicina. *Rev Med Univ Navarra*. **34**: 165-174.
- Cruz C.M. 2001. Panorama epidemiológico de la hipertensión arterial en México. *Arch Inst Cardiol Mex*. **71**:192-197.
- de Champlain J., Wu R., Girouard H., Karas M., El Midaoui A., Laplante M.A., Wu L. 2004. Oxidative stress in hypertension. *Clin Exp Hypertens*. **26**: 593–601.
- Dhanasekaran A., Kotamraju S., Kalivendi S.V., Matsunaga T., Shang T., Keszler A., Joseph J., Kalyanaraman B. 2004. Supplementation of endothelial cells with mitochondria-targeted antioxidants inhibit peroxide induced mitochondrial iron uptake, oxidative damage, and apoptosis. *J Biol Chem*. **279**: 37575-37587.
- Diebold B.A., Fowler B., Lu J., Dinauer M.C., Bokoch G.M. 2004. Antagonistic cross-talk between Rac and Cdc42 GTPase regulates generation of reactive oxygen species. *J Biol Chem*. **279**: 28136-28142.
- Dudley R.W., Khairallah M., Mohammed S., Lands L., Des Rosiers C., Petrof B.J. 2006. Dynamic responses of the glutathione system to acute oxidative stress in dystrophic mouse (mdx) muscles. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. **291**: R704–710.
- Ghio A.J., Churg A., Roggli V.L. 2004. Ferruginous bodies: Implications in the mechanism of fiber and particle toxicity. *Toxicol Pathol*. **32**: 643–649.
- Gorin Y., Block K., Hernández J., Bhandari B., Wagner B., Barnes J.L., Abboud H.E. 2005. Nox4 NAD(P)H oxidase mediates hypertrophy and fibronectin expression in the diabetic kidney. *J Biol Chem*. **280**: 39616-39626.
- Gregg D., Rauscher F.M., Goldschmidt-Clermont P.J. 2003. Rac regulates cardiovascular superoxide through diverse molecular interactions: more than a binary GTP switch. *Am J Physiol Cell Physiol*. **285**:723-734.
- Griendling K.K., Sorescu D., Ushio-Fukai M. 2000. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res*. **86**: 494-501.
- Halliwell B. 1987. Oxidants and human disease: some new concepts. *FASEB J*. **1**: 358-364.
- Ho T.C., Yang Y.C., Cheng H.C., Wu A.C., Chen S.L., Chen H.K., Tsao Y.P. 2006. Activation of mitogen-activated protein kinases is essential for hydrogen peroxide-induced apoptosis in retinal pigment epithelial cells. *Apoptosis* **11**: 1899-1908.
- Jung J., Cai W., Lee H.K., Pellegatta M., Shin Y.K., Jang S.Y., Suh D.J., Wrabetz L., Feltri M.L., Park H.T. 2011. Actin polymerization is essential for myelin sheath fragmentation during Wallerian degeneration. *J Neurosci*. **31**: 2009-2015.
- Kaziro Y., Itoh H., Kozasa T., Nakafuku M., Satoh T. 1991. Structure and function of signal-transducing GTP-binding proteins. *Annu Rev Biochem*. **60**: 349-400.

- Kil I.S., Huh T.L., Lee Y.S., Lee Y.M., Park J.W. 2006. Regulation of replicative senescence by NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase. *Free Radic Biol Med.* **40**: 110-119.
- Kowluru A., Chen H.Q., Tannous M. 2003. Novel roles for the rho subfamily of GTP-binding proteins in succinate-induced insulin secretion from betaTC3 cells: further evidence in support of the succinate mechanism of insulin release. *Endocr Res.* **29**: 363-376.
- Labiós M., Martínez M., Gabriel F., Guiral V., Dasi F., Beltrán B., Muñoz A. 2009. Superoxide dismutase and catalase anti-oxidant activity in leucocyte lysates from hypertensive patients: effects of eprosartan treatment. *J Renin-Angiotensin Aldosterone System.* **10**: 24-30.
- Lacy F., O'Connor D.T., Schmid-Schonbein G.W. 1998. Plasma hydrogen peroxide production in hypertensive and normotensive subjects at genetic risk of hypertension. *J Hypertens.* **16**: 291-303.
- Laemmli U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Le S.S., Loucks F.A., Udo H., Richardson-Burns S., Phelps R.A., Bouchard R.J., Barth H., Aktories K., Tyler K.L., Kandel E.R., Heidenreich K.A., Linseman D.A. 2005. Inhibition of Rac GTPase triggers a c-Jun- and Bim-dependent mitochondrial apoptotic cascade in cerebellar granule neurons. *J Neurochem.* **94**: 1025-1039.
- Lenaz G., D'Aurelio M., Merlo Pich M., Genova M.L., Ventura B., Bovina C., Formiggini G., Parenti Castelli G. 2000. Mitochondrial bioenergetics in aging. *Biochim Biophys Acta* **1459**: 397-404.
- Lowry O., Rosebrough N., Farr A., Randall R. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* **193**: 265-275.
- Mueller S., Weber A., Fritz R., Mütze S., Rost D., Walczak H., Völkl A., Stremmel W. 2002. Sensitive and real-time determination of H₂O₂ release from intact peroxisomes. *Biochem J.* **363**: 483-491.
- Muzaffar S., Shukla N., Bond M., Sala-Newby G., Angelini G.D., Newby A.C., Jeremy J.Y. 2008. Acute inhibition of superoxide formation and Rac1 activation by nitric oxide and iloprost in human vascular smooth muscle cells in response to the thromboxane A₂ analogue, U46619. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* **78**: 247-255.
- Nowicki P.T., Flavahan S., Hassanian H., Mitra S., Holland S., Goldschmidt-Clermont P.J., Flavahan N.A. 2001. Redox signaling of the arteriolar myogenic response. *Circ Res.* **89**: 114-116.
- Olaiz-Fernández G., Rivera-Dommarco J., Shammh-Levy T., Rojas R., Villalpando-Hernández S., Hernández-Avila M., Sepulveda-Amor J. 2006. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2006. Instituto Nacional de Salud Pública. Cuernavaca, México.
- Park HT, Feltri ML. 2011. Rac1 GTPase controls myelination and demyelination. *Bioarchitecture* **1**: 110-113.

- Pecqueur C., Alves-Guerra M.C., Gelly C., Levi-Meyrueis C., Couplan E., Collins S., Ricquier D., Bouillaud F., Miroux B. 2001. Uncoupling protein 2, in vivo distribution, induction upon oxidative stress, and evidence for translational regulation. *J Biol Chem.* **276**: 8705-8712.
- Poulter N. 2003. Global risk of cardiovascular disease. *Heart* **89**: 2-5.
- Radi R., Turrens J.F., Chang L.Y., Bush K.M., Crapo J.D., Freeman B.A. 1991. Detection of catalase in rat heart mitochondria. *J Biol Chem.* **266**: 22028-22034.
- Ridley A.J. 1995. Rho-related proteins: actin cytoskeleton and cell cycle. *Curr Opin Genet Dev.* **5**: 24-30.
- Ridley A.J. 2001. Rho family proteins: coordinating cell responses. *Trends Cell Biol.* **11**: 471-447.
- Roberts E.S., Richards J.H., Jaskot R., Dreher, K.L. 2003. Oxidative stress mediates air pollution particle-induced acute lung injury and molecular pathology. *Inhal Toxicol.* **15**: 1327-1346.
- Saavedra-Molina, A., Devlyn T.M. 1997. Effect of extra- and intramitochondrial calcium on citrulline synthesis. *Amino Acids* **12**: 293-298.
- Salvi M., Battaglia V., Brunati A.M., La Rocca N., Tibaldi E., Pietrangeli P., Marcocci L., Mondovì B., Rossi C.A., Toninello A. 2007. Catalase takes part in rat liver mitochondria oxidative stress defense. *J Biol Chem.* **282**: 24407-24415.
- Scandalios J.G., Tong W.F., Roupakias D.G. 1980. *Cat3l*, a third gene locus coding for a tissue specific catalase in maize: genetics, intracellular location, and some biochemical properties. *Mol Gen Genetics* **179**: 33-41.
- Schallreuter K.M. 2005. Vitiligo. In: Hertl M, ed. Autoimmune diseases of the skin. Pathogenesis, diagnosis, management. 2nd ed. Viena, Springer: 367-384.
- Schnackenberg C.G., Wilcox C.S. 1999. Two-week administration of tempol attenuates both hypertension and renal excretion of 8-isoprostaglandin F2α. *Hypertension* **33**: 424-428.
- Schriner S.E., Linford N.J., Martin G.M., Treuting P., Ogburn C.E., Emond M. 2005. Extension of murine life span by over expression of catalase targeted to mitochondria. *Science* **308**: 1909-1911.
- Seasholtz T.M., Brown J.H. 2004. Rho signaling in vascular diseases. *Mol Interv.* **4**: 348-357.
- Sheh Y.L., Hsu C., Chan S.H., Chan J.Y. 2007. NADPH oxidase- and mitochondrion-derived superoxide at rostral ventrolateral medulla in endotoxin-induced cardiovascular depression. *Free Radic Biol Med.* **42**: 1610-1623.
- Singh P.P., Chandra A., Mahdi F., Roy A., Sharma P. 2010. Reconvene and reconnect the antioxidant hypothesis in human health and disease. *Indian J Clin Biochem.* **25**: 225-243.

- Szewczyk A., Wojtczak L. 2002. Mitochondria as a pharmacological target. *Pharmacol Rev.* **54**: 101-127.
- Towbin H., Staehelin T., Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. *Proc Natl Acad Sci USA.* **76**: 4350-4354.
- Van Aelst L., D'Souza-Schorey C. 1997. Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev.* **11**: 2295-2322.
- Van Buul J.D., Fernandez-Borja M., Anthony E.C., Hordijk P.L. 2005. Expression and localization of NOX2 and NOX4 in primary human endothelial cells. *Antioxid Redox Signal.* **7**: 308-317.
- Vaziri N.D., Ding Y., Ni Z. 1999. Nitric oxide synthase expression in the course of lead-induced hypertension. *Hypertension* **33**: 558-562.
- Vaziri N.D., Lyn C., Farmand F., Sindhu R.K. 2003. Superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and NADPH oxidase in lead induced hypertension. *Kid Inter.* **63**: 186-194.
- Velázquez-Monroy O., Rosas P.M., Lara E.A., Pastelin H. G., Castillo C., Attie F., Tapia C.R. 2003. Prevalence and interrelations of noncommunicable chronic diseases and cardiovascular risk factors in Mexico. *Arch Cardiol Mex.* **73**: 62-77.
- Werner E. 2004. GTPases and reactive oxygen species: switches for killing and signaling. *J Cell Sci.* **117**: 143-153.
- Wold L.E., Ceylan-Isik A.F., Ren J. 2005. Oxidative stress and stress signaling: menace of diabetic cardiomyopathy. *Acta Pharmacol Sin.* **26**: 908-917.
- Yankova V., Vassileva T., Kujumdzieva A.V. 2002. Catalase enzyme in mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. *Electronic J Biotechnol.* **5**: 29-41.
- Yin J., Wan Y.J., Li S.Y., Du M.J., Zhang C.Z., Zhou X.L., Cao Y.J. 2011. The distinct role of guanine nucleotide exchange factor Vav1 in Bcl-2 transcription and apoptosis inhibition in Jurkat leukemia T cells. *Acta Pharmacol Sin.* **32**: 99-107.