



---

---

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**Caracterización de la transición de la morfología  
mitocondrial en *Arabidopsis thaliana***

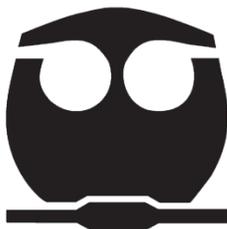
**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**P R E S E N T A:**

**BRYAN OCAMPO HERNÁNDEZ**



**Ciudad Universitaria, CDMX, 2024**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**JURADO ASIGNADO:**

PRESIDENTE: Dr. Francisco Javier Plasencia de la Parra

VOCAL: Dr. José Pedraza Chaverri

SECRETARIO: Dr. Manuel Gutiérrez Aguilar

1er. SUPLENTE: Dr. Euclides Ávila Chávez

2do. SUPLENTE: Dr. Samuel Canizales Quinteros

Asesor: Dr. Manuel Gutiérrez Aguilar

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

Laboratorio 115, Departamento de Bioquímica

Edificio E, Facultad de Química

Universidad Nacional Autónoma de México,

Coyoacán, CDMX. C.P. 04510

México

---

Bryan Ocampo Hernández  
(Sustentante)

---

Dr. Manuel Gutiérrez Aguilar  
(Asesor)

## **Definiciones de abreviaturas del presente texto**

ABRC: Arabidopsis Biological Resource Center

ADP: Adenosín difosfato

AMP: Adenosín monofosfato

ANT: Transportador de nucleótidos de adenina

ATP: Adenosín trifosfato

BBA: Biochimica et Biophysica Acta

Col-0: Columbia-0

CsA: Ciclosporina A

CTE: Cadena de transporte de electrones

CypD: Ciclofilina D

DNA: Ácido desoxirribonucleico

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

GDP: Guanosín difosfato

GFP: Proteína verde fluorescente

GTP: Guanosín trifosfato

mGFP Proteína verde fluorescente mitocondrial

MME: Membrana mitocondrial externa

MMI: Membrana mitocondrial interna

mPTP: Poro de transición de la permeabilidad mitocondrial

MS: Murashige y Skoog

NADH: Nicotinamida adenina dinucleótido

ORF: Marco abierto de lectura

OSCP: Oligomycin sensitivity conferring protein

PCD: Muerte celular programada

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PiC: Transportador de fosfato mitocondrial

PTP: Poro de transición de la permeabilidad

PVDF: Polifluoruro de vinilideno

ROS: Especies reactivas de oxígeno

TAIR: The Arabidopsis Information Resource

TBE: Tris-Borato-EDTA

TBS: Solución salina tamponada con Tris

TBST: Solución salina tamponada con Tris con Tween-20

TMM: Transición de la morfología mitocondrial

UCP: Proteínas desacoplantes

VDAC: Canal aniónico dependiente de voltaje

WT: Wild type (tipo silvestre)

## Agradecimientos

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Química por las instalaciones y recursos brindados que permitieron mi formación profesional y personal.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) por el financiamiento para llevar a cabo la presente tesis mediante el proyecto UNAM-DGAPA-PAPIIT IN217624 “Estudios de la transición de la morfología mitocondrial y cloroplástica en *Arabidopsis thaliana* en respuesta a estrés abiótico”.

A los miembros del honorable jurado: Dr. Francisco Javier Plasencia de la Parra, Dr. José Pedraza Chaverri y Dr. Manuel Gutiérrez Aguilar por su tiempo y sus valiosas observaciones y sugerencias en la culminación de la presente tesis.

# ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS.....	4
RESUMEN.....	7
1. INTRODUCCIÓN .....	8
1.1 La mitocondria .....	8
1.1.1 Morfología y estructura mitocondrial.....	9
1.1.2 Funciones mitocondriales en plantas.....	13
1.2 El poro de transición de la permeabilidad mitocondrial (mPTP) .....	17
1.2.1 Composición del PTP mitocondrial .....	19
1.2.2 Consecuencias de la apertura del PTP.....	23
1.2.3 Moduladores del PTP .....	25
1.3 La transición de la morfología mitocondrial en plantas .....	27
1.4 <i>Arabidopsis thaliana</i> : un organismo modelo .....	29
1.4.1 Expresión de la proteína verde fluorescente en <i>A. thaliana</i> .....	30
1.4.2 Microscopía confocal de fluorescencia .....	33
2. HIPÓTESIS.....	35
3. OBJETIVOS.....	35
3.1 OBJETIVO GENERAL .....	35
3.2 OBJETIVOS PARTICULARES .....	35
4. METODOLOGÍA Y PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL .....	36
4.1 Materiales, equipo y reactivos .....	36
4.1.1 Materiales .....	36
4.1.2 Equipo.....	36
4.1.3 Material biológico .....	37
4.1.3.1 <i>Arabidopsis thaliana</i> transgénica mGFP .....	37
4.1.3.2 Anticuerpo anti-GFP .....	38
4.1.4 Reactivos .....	38
4.2 Metodología experimental.....	39
4.2.1 Desinfección y cultivo <i>in vitro</i> de semillas .....	39
4.2.2 Cultivo de plántulas en sustrato sólido.....	40
4.2.3 Aislamiento de DNA.....	40

4.2.4	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....	41
4.2.5	Electroforesis de DNA.....	43
4.2.6	Aislamiento de proteínas totales .....	44
4.2.7	Western blot.....	44
4.2.7.1	Electroforesis de proteínas .....	44
4.2.7.2	Electrotransferencia a membrana de PVDF .....	46
4.2.7.3	Inmunodetección.....	46
4.2.8	Estrés químico mitocondrial en hojas de <i>A. thaliana</i> mGFP .....	48
4.2.8.1	Estrés mitocondrial con CaCl <sub>2</sub> .....	48
4.2.8.2	Inhibición del estrés mitocondrial con CsA .....	49
4.2.9	Revisión de la TMM en hojas de <i>A. thaliana</i> mGFP por microscopía confocal .....	49
4.2.9.1	Preparación de las muestras para observación microscópica .....	49
4.2.9.2	Visualización microscópica de la TMM en hojas de <i>A. thaliana</i> mGFP..	50
4.2.10	Evaluación de la TMM de hojas de <i>A. thaliana</i> mGFP .....	51
4.2.10.1	Análisis cualitativo de la TMM de hojas de <i>A. thaliana</i> mGFP .....	51
4.2.10.2	Análisis cuantitativo de la TMM de hojas de <i>A. thaliana</i> mGFP .....	51
5.	RESULTADOS .....	54
5.1	Genotipificación de una línea de <i>A.thaliana</i> mGFP.....	54
5.2	Western blot de proteína total aislada de hojas de <i>A. thaliana</i> mGFP .....	55
5.3	Expresión funcional de la GFP.....	56
5.4	Evaluación cualitativa de la TMM de hojas de <i>A. thaliana</i> mGFP.....	57
5.4.1	Efecto de los iones Ca <sup>2+</sup> en el hinchamiento mitocondrial .....	57
5.4.2	Efectos cualitativos de la CsA en el hinchamiento mitocondrial mediado por iones Ca <sup>2+</sup> .....	59
5.4.3	Análisis cualitativo de la TMM de hojas de <i>A. thaliana</i> mGFP .....	60
5.4.4	Análisis cuantitativo de la TMM de hojas de <i>A. thaliana</i> mGFP .....	61
6.	DISCUSIÓN .....	63
7.	CONCLUSIONES .....	69
8.	PERSPECTIVAS.....	69
9.	BIBLIOGRAFÍA.....	70
	ANEXO .....	80

Western blot de proteína total aislada de hojas de <i>A. thaliana</i> mGFP .....	80
Mapa completo de la inserción cromosomal en la línea mGFP del ABRC .....	81
Artículo publicado en BBA durante el desarrollo del presente trabajo .....	82

## ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura/Tabla	Título	Página
Figura 1	Diversidad morfológica mitocondrial.	10
Figura 2	Cadena de transporte de electrones mitocondrial en plantas.	14
Figura 3	Poro de transición de la permeabilidad mitocondrial en mamíferos.	22
Figura 4	Mapa de la inserción cromosomal en la línea mGFP obtenida del ABRC.	37
Figura 5	Inducción de estrés mitocondrial <i>in vivo</i> en hojas de <i>A. thaliana</i> mGFP.	48
Figura 6	Preparación de muestras de hojas para visualización en un microscopio confocal.	50
Figura 7	Ejemplo de selección del valor de umbral para la determinación de volumen mediante FIJI	52
Figura 8	Genotipificación de <i>Arabidopsis thaliana</i> mGFP.	54
Figura 9	Western blot de proteína total aislada de hojas de <i>A. thaliana</i> mGFP.	55

Figura 10	Micrografía confocal de una hoja de <i>A. thaliana</i> mGFP en condiciones normales.	56
Figura 11	Micrografía confocal de una hoja de <i>A. thaliana</i> mGFP tratada con H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> .	57
Figura 12	Micrografía confocal de una hoja de <i>A. thaliana</i> mGFP estresada con CaCl <sub>2</sub> .	58
Figura 13	Micrografía confocal de una hoja de <i>A. thaliana</i> mGFP tratada con CsA y CaCl <sub>2</sub> .	59
Figura 14	Comparación cualitativa del volumen mitocondrial de hojas de <i>A. thaliana</i> mGFP sometidas a distintos tratamientos de estrés.	60
Figura 15	Evaluación cuantitativa del volumen mitocondrial de plantas mGFP para los tratamientos con CaCl <sub>2</sub> y CsA/CaCl <sub>2</sub> .	62
Figura 16	Direccionamiento mitocondrial de la GFP mediada por un péptido señal.	66
Tabla 1	Componentes de la solución maestra de reacción para PCR.	41

Tabla 2	Secuencias de los oligonucleótidos usados en el presente trabajo.	42
Tabla 3	Condiciones experimentales empleadas para PCR.	43
Tabla 4	Componentes del gel de poliacrilamida para electroforesis de proteína.	45
Tabla 5	Mezcla de reacción de las muestras para electroforesis de proteína.	45

## RESUMEN

Las mitocondrias son orgánulos esenciales para la vida y la muerte de las células. Sus funciones principales son mediar la fosforilación oxidativa, el metabolismo de esqueletos de carbono y de compuestos nitrogenados. En los últimos años, se ha documentado el papel de la mitocondria en la muerte celular. En algunos casos, la muerte celular puede ocurrir como consecuencia de la apertura de un poro de transición de la permeabilidad (PTP) en la membrana mitocondrial interna (MMI). En plantas poco se sabe sobre la presencia, regulación y función del PTP *in vivo*. No obstante, se ha documentado una transición de la morfología mitocondrial (TMM) que podría ser la manifestación óptica del PTP. El presente trabajo de tesis estudia la posible relación entre el PTP y la TMM a través de ensayos de estrés por iones calcio en hojas de una línea de *A. thaliana* transgénica con expresión de una proteína verde fluorescente mitocondrial (mGFP, por sus siglas en inglés). Los resultados experimentales sugieren que tanto el PTP como la TMM presentan regulación por iones calcio.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 La mitocondria

Las mitocondrias son orgánulos presentes en las células de todos los organismos eucariontes. La palabra mitocondria proviene del griego *μίτος* «hilos» y *χονδρίον* «gránulos» o «gránulos en forma de hilos», debido a la morfología de estos agregados intracelulares determinada mediante microscopía (Muñoz et al., 2024; Embley y Martin, 2006; Nicholls, 2013). Estos orgánulos son considerados reactores bioenergéticos por excelencia, pues su principal característica es su alta producción de adenosín trifosfato (ATP), sintetizando más del 80 % del ATP requerido por la célula para desempeñar múltiples reacciones metabólicas vitales (Muñoz et al., 2024; Tuena de Gómez Puyou y García Trejo, 2015; Nicholls, 2013).

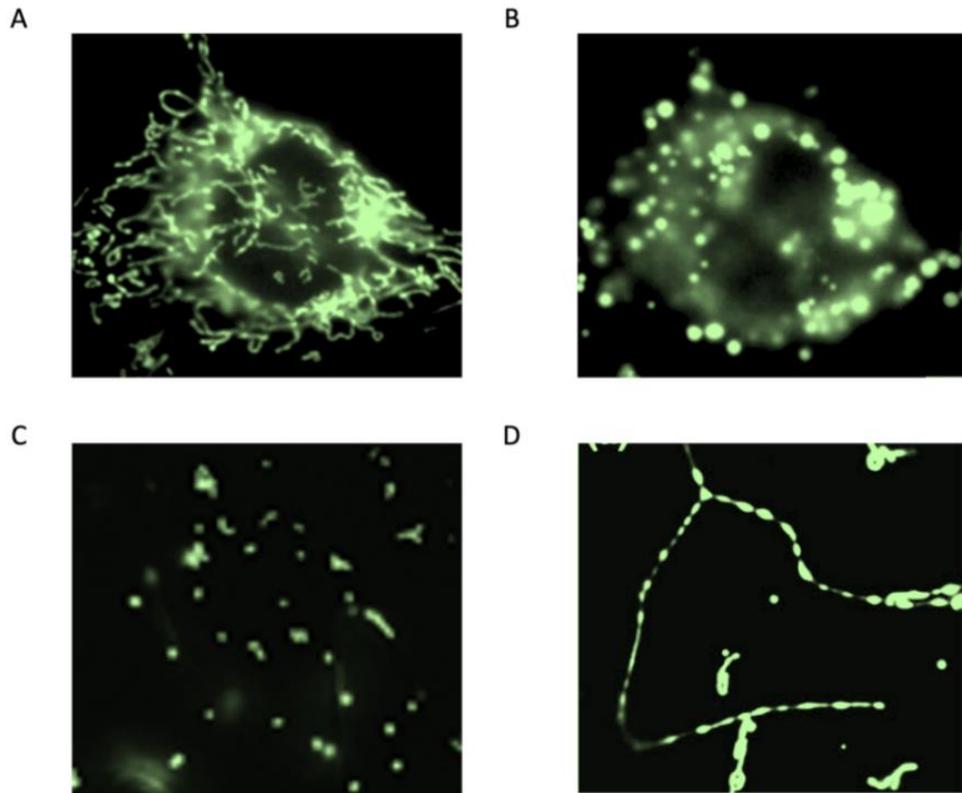
En este sentido, la mitocondria cobra una gran importancia en el suministro energético de la célula. Sin embargo, su función vital no se limita de forma única a la producción de energía, pues estos orgánulos también participan en la regulación de múltiples procesos vitales para la célula como el balance osmótico, la modulación del estado redox, la homeostasis y almacenamiento de iones  $\text{Ca}^{2+}$ , la regulación de diversos procesos metabólicos y en procesos de muerte celular (Pan y Hu, 2015; Jacoby et al., 2012).

La manutención de estos procesos en conjunto hace necesaria la homeostasis mitocondrial (tanto a nivel morfológico como metabólico) necesaria para la supervivencia de las células (Muñoz et al., 2024).

### **1.1.1 Morfología y estructura mitocondrial**

Generalmente, las mitocondrias cuentan con una estructura cilíndrica y una forma alargada, la cual es capaz de cambiar en función de su actividad. Su diámetro puede variar entre 0.5 y 1  $\mu\text{m}$  y hasta 5  $\mu\text{m}$  de longitud (Falagán et al., 2012). Se hallan al interior del citoplasma de la célula, localizadas en las regiones celulares donde la demanda energética es mayor o donde existe una mayor concentración de calcio, desplazándose desde unas partes de la célula a otras (Falagán et al., 2012). Los desplazamientos de larga distancia están mediados por microtúbulos, mientras que los de corta distancia están mediados por los filamentos de actina (Megías et al., 2019; Oikawa et al., 2021).

La cantidad y la morfología de mitocondrias presentes en una célula varían en función de la especie, del tipo celular y de sus necesidades metabólicas (Fig. 1), por lo que una sola célula puede contener desde unas pocas hasta decenas de estos orgánulos (Gao et al., 2001; Falagán et al., 2012). Estos no sólo se pueden agrupar en gránulos en forma de hilos, ya que también se encuentran dispersos, por lo que su morfología suele variar desde largas estructuras ramificadas formando redes mitocondriales dinámicas hasta pequeños elipsoides individuales (Megías et al., 2019). En mitocondrias de organismos vegetales, la forma dispersa es la predominante, pero existen mutantes que inducen la apariencia reticulada (Scott y Logan, 2008). En cuanto a su tamaño en plantas, estas miden entre 1 a 3  $\mu\text{m}$  de longitud y aproximadamente 0,5  $\mu\text{m}$  de diámetro, mientras que su forma oscila entre esférica y alargada o de bastoncillo, similar a la forma de un bacilo (Oikawa et al., 2021; Møller et al., 2021).



**Figura 1. Diversidad morfológica mitocondrial.** Variación de la morfología mitocondrial en función del organismo, genotipo y a distintas condiciones ambientales. (A) Mitocondrias de células humanas HeLa (línea celular inmortal) cultivada en condiciones estándar. (B) Mitocondrias de células humanas HeLa sometidas a shock hipo osmótico. (C) Mitocondrias de hojas de *A. thaliana* tipo silvestre (WT). (D) Mitocondrias de una línea de *Arabidopsis nmt* “network”. Imágenes modificadas de Gao et al., 2001 (A y B) y de Scott y Logan, 2008 (C y D).

La estructura mitocondrial de animales y plantas se divide en dos compartimentos: la matriz mitocondrial y el espacio intermembranal. Estos compartimentos están delimitados por una membrana interna y una membrana externa, con características morfológicas, funcionales y de permeabilidad diferentes, pero esenciales para mantener el correcto funcionamiento celular (Muñoz et al., 2024; Møller et al., 2021; Nicholls y Ferguson, 2013).

La membrana mitocondrial interna (MMI) tiene como principal característica morfológica la presencia de numerosos pliegues hacia el interior denominados crestas mitocondriales (Muñoz et al., 2024; Frey y Manella, 2000). En estas crestas mitocondriales residen diversos complejos enzimáticos y una gran cantidad de proteínas que regulan el paso de iones y metabolitos al interior de la célula a través de la MMI. Es a través de las regiones de la membrana interna próximas y paralelas a la membrana externa, denominadas regiones limitantes, que las crestas se mantienen conectadas entre sí (Nicholls y Ferguson, 2013; Megías et al., 2019). Estas regiones sirven como centros de intercambio de lípidos, importación de proteínas y poseen proteínas para la fusión y fisión de las mitocondrias (Fuente y Álvarez, 2022; Arimura, 2018). Adicionalmente, es en las crestas mitocondriales donde se encuentran los complejos respiratorios funcionales y la ATP sintasa, y, por lo tanto, donde se produce el ensamblaje de los complejos de la cadena respiratoria, además de las proteínas necesarias para el ensamblaje de los grupos hierro-azufre (Wydro et al., 2013).

Una característica particular de la MMI es que requiere fluidez e hidrofobicidad simultánea. Esto es proporcionado por un componente de la MMI característico de las mitocondrias conocido como cardiolipina (difosfatidilglicerol), un fosfolípido aniónico altamente insaturado capaz de incrementar su hidrofobicidad y a su vez, evita reducir su fluidez. Adicionalmente, este componente mitocondrial promueve la curvatura de la membrana y desempeña un papel estructural en la fisión y fusión de la membrana (Pan y Hu, 2015). El alto contenido de este fosfolípido y la gran cantidad de bombas y transportadores específicos, como el transportador de nucleótidos de adenina (ANT), hacen que esta membrana sea especialmente impermeable al paso de iones y

moléculas pequeñas, característica esencial que crea una barrera suficientemente impermeable como para permitir un gradiente de protones estable al interior de la mitocondria (Nicholls y Ferguson, 2013; Megías et al., 2019).

A diferencia de la MMI, la membrana mitocondrial externa (MME) destaca por ser altamente permeable. Esta membrana carece de crestas mitocondriales, por lo que en condiciones fisiológicas su permeabilidad es menos selectiva gracias a la presencia de una porina de 30 a 35 kDa, generalmente denominada canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC, por sus siglas en inglés), que permite el paso de iones y metabolitos únicamente con pesos moleculares inferiores a 6,000 Da, incluyendo proteínas pequeñas. Esencialmente, la MME permite el paso de nucleótidos y metabolitos de adenina desde el citoplasma y a su vez, impide la fuga de proteínas del espacio intermembrana (Luna-Ortiz et al., 2013; Nicholls y Ferguson, 2013; Megías et al., 2019).

La matriz mitocondrial es la región central del orgánulo. Se encuentra delimitada por la MMI. Su contenido es muy diferenciado del citosol, ya que contiene sólo aquellas moléculas que puedan ser transportadas selectivamente por la MMI y la MME. En su interior se encuentra el ácido desoxirribonucleico (DNA) mitocondrial, los ribosomas y múltiples enzimas y factores necesarios que le permiten a las plantas llevar a cabo la producción energética y diversos procesos metabólicos (Muñoz et al., 2024; Millar et al., 2008).

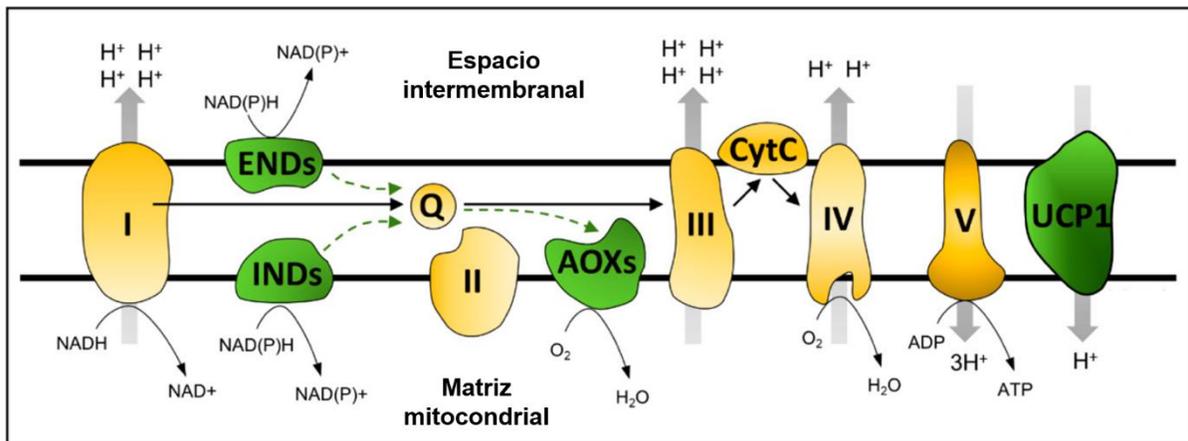
En cuanto al espacio intermembranal, este separa la MME de la MMI. Además, es una de las zonas de mayor importancia para la regulación del flujo de moléculas como iones y metabolitos, entre la mitocondria y el citosol (Muñoz et al., 2024).

### 1.1.2 Funciones mitocondriales en plantas

Las mitocondrias desempeñan funciones importantes en el metabolismo energético de las células. Como se mencionó anteriormente, una de sus funciones principales es la de proveer el ATP que la célula requiere para múltiples procesos celulares, el cual se logra mediante la fosforilación oxidativa y la cadena de transporte de electrones (CTE) de la respiración celular. La CTE es una serie de reacciones bioquímicas sucesivas que conllevan a la generación de protones y de un gradiente electroquímico capaz de impulsar la síntesis de ATP a través de la ATP sintasa (Muñoz et al., 2024; Møller et al., 2021; Luna-Ortiz et al., 2013).

Aunque el proceso de generación de energía de plantas y animales a través de la respiración celular es bastante similar, se ha descrito la posibilidad de que estos no sean procesos idénticos (Møller et al., 2021). Las mitocondrias de plantas cuentan con un sistema respiratorio formado por cinco complejos enzimáticos multiméricos (I-V) localizados en la MMI. Los primeros cuatro complejos respiratorios (I-IV) forman la CTE con ayuda de dos intermediarios conocidos como ubiquinona (Q) y la proteína citocromo c (CytC), los cuales movilizan los protones ubicados en el interior del espacio intermembrana. No obstante, son los complejos I, III y IV los que se encargan de bombear protones entre el espacio de la MMI y la matriz mitocondrial a través de reacciones de oxidación y reducción de compuestos orgánicos específicos como el NADH (nicotinamida adenina dinucleótido), generando así un gradiente electroquímico que propicia un aumento del potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) (Barreto et al., 2022; Møller et al., 2021). La fuerza protón-motriz que paralelamente genera la cadena respiratoria, es empleada por el complejo V conocido como ATP sintasa, el cual devuelve los protones del interior del espacio

intermembrana a la matriz mitocondrial para producir la energía química requerida por la célula o ATP a partir de ADP (adenosín difosfato) y Pi (Fig. 2) (Barreto et al., 2022; Møller et al., 2021; Romero y Almazán, 2018).



**Figura 2. Cadena de transporte de electrones mitocondrial en plantas.** Los complejos respiratorios I y II, así como las NADH deshidrogenasas externas e internas (ENDs e INDs) generan una poza de ubiquinol (Q) requerido para alimentar de electrones al complejo III y este a su vez al citocromo c (CytC) y al complejo IV. Las oxidasas alternativas (AOXs) actúan como sustitutos funcionales de los Complejos III y IV transfiriendo electrones de un pool de ubiquinol directamente al oxígeno. Los complejos I, III y IV bombean  $H^+$  al espacio intermembranal para el gradiente electroquímico necesario para la síntesis de ATP por el complejo V (ATP sintasa), mientras que una proteína desacopladora devuelve protones a la matriz mitocondrial. Imagen modificada de Barreto y colaboradores, 2022.

Los complejos de la cadena respiratoria (I-IV) acoplados al complejo V (ATP sintasa) se mantienen en equilibrio formando supercomplejos (Eubel et al., 2004). Sin embargo, existe la posibilidad de que se presenten fluctuaciones en la estructura de estos complejos como respuesta a una actividad fisiológica normal o en respuesta a condiciones ambientales cambiantes (p. ej. temperaturas bajo  $0^{\circ}C$ ) (Ukolova y Borovskii, 2023). Por otro lado, la existencia de elevados gradientes electroquímicos

de protones se asocia a la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y a la disfunción mitocondrial. (Barreto et al., 2022). Un mecanismo mitocondrial que previene estas alteraciones es la eliminación del exceso de reductores para restaurar el potencial de membrana mitocondrial, a través de transportadores de iones divalentes como  $\text{Ca}^{+2}$  o proteínas de “derivación energética” conocidas como proteínas desacoplantes (UCP) (Barreto et al., 2022). Las UCP son componentes mitocondriales ubicados de igual forma en la MMI que confieren flexibilidad metabólica a la respiración disipando el potencial de membrana mitocondrial de una manera dependiente de los ácidos grasos, desacoplando la respiración mitocondrial de la síntesis de ATP (Lima et al., 2024). Una de las UCP estudiadas extensamente en plantas es la UCP1, la cual se piensa que actúa como un transportador de  $\text{H}^+$  desacoplando la síntesis de ATP y generando calor (Nicolls y Ferguson, 2013). Un estudio reciente sugiere que esta proteína funciona como un transportador de metabolitos en lugar de actuar como un desacoplador de la respiración; no obstante, este es un tema de constante debate ya que la función de la UCP1 depende del contexto intracelular, fisiológico y ambiental (Barreto et al., 2022).

Hasta hace poco tiempo se consideraba que la principal función de las mitocondrias en plantas estaba limitada a la producción energética para el mantenimiento y crecimiento de la célula. No obstante, los amplios estudios de este orgánulo multifuncional han permitido conocer su participación en la regulación de múltiples procesos celulares importantes. Las mitocondrias de plantas desempeñan procesos fisiológicos vitales asociados con la modulación del estado redox, el balance osmótico, el metabolismo primario del carbono, nitrógeno, fósforo, azufre, aminoácidos y la biosíntesis de lípidos y vitaminas (Pan y Hu, 2015; Jacoby et al., 2012). Participan

también en la regulación y homeostasis del calcio intracelular actuando como almacén de este (Pan y Hu, 2015), el cual actúa como un transductor de señalización versátil en células eucariotas (Pirayesh et al., 2021; Meng et al., 2020). De igual forma, se ha hecho evidente que las mitocondrias son esenciales en la respuesta de las plantas frente a diversas condiciones de estrés, especialmente en condiciones de oxígeno limitado, y participan en las cascadas de señalización para ajustar la función celular y mitigar el daño potencial, involucrándose en los procesos de aclimatación frente a diversos tipos de estrés bióticos y abióticos (Meng et al., 2020; Shingaki-Wells et al., 2014). Se ha evidenciado un aumento del calcio intracelular mitocondrial cuando la planta se enfrenta a ciertas condiciones de estrés ambiental, por lo que se ha asociado esta capacidad de respuesta con la relación fisiológica entre la mitocondria y los iones  $Ca^{2+}$  (Pirayesh et al., 2021). Adicionalmente, las mitocondrias logran realizar funciones coordinadas con otros orgánulos celulares, brindando apoyo incluso en procesos fotosintéticos. De este modo, se ha descubierto que las funciones mitocondriales son indispensables para la función de peroxisomas y cloroplastos en la captura, conversión, almacenamiento y/o metabolismo de energía (Pan y Hu, 2015; Jacoby et al., 2012).

En la actualidad se ha descrito un nuevo papel para este orgánulo dentro del proceso de la muerte celular programada (PCD, por sus siglas en inglés), demostrando su participación en los procesos de destrucción celular (Pan y Hu, 2015). La eliminación de células de forma controlada es un proceso necesario para el desarrollo y la supervivencia de organismos animales y vegetales. En mamíferos, la PCD es un proceso estrechamente asociado a una pérdida del potencial transmembrana mitocondrial y a un aumento en la permeabilidad de la MMI, conocido como transición

de la permeabilidad mitocondrial. Dicho aumento en la permeabilidad resulta en la liberación de moléculas apoptóticas que promueven la destrucción celular como el citocromo *c*, el factor de inducción de apoptosis (FIA) y las procaspasas, (Luna-Ortiz et al., 2013, Lopategui y Herrera, 2010). En la última década, se ha evidenciado que la mitocondria también se encuentra implicada en la PCD de plantas, aunque esta última presenta rasgos morfológicos distintos a los de mamíferos (Møller et al., 2021). Actualmente se desconocen los mecanismos precisos que conllevan a la muerte celular en plantas. Sin embargo, se ha propuesto que la PCD en plantas se encuentra mediada por la presencia de proteínas en la MME, las cuales son capaces de desencadenar cambios en la morfología mitocondrial durante la PCD, provocando la hinchazón y agregación mitocondrial, lo que sugiere la manifestación de una transición similar a la de mamíferos de permeabilidad mitocondrial asociada a la PCD de plantas. El mecanismo más claro por el cual las mitocondrias de las plantas contribuyen a la PCD y a la destrucción celular es el aumento de ROS por parte de la CTE ante diversos factores de estrés (Møller et al., 2021). De forma natural, las ROS y el  $\text{Ca}^{2+}$  almacenados en la mitocondria se encuentran en niveles regulados, esto debido a su importancia que tienen en la transducción de señales, sin embargo, niveles descontrolados de estos factores pueden ser tóxicos para la célula, llevándola a procesos de muerte celular (Murphy y Steenbergen, 2007; Fernández, 2009).

## **1.2 El poro de transición de la permeabilidad mitocondrial (mPTP)**

En 1965, Chappell y Crofts evidenciaron el hinchamiento masivo de preparaciones de mitocondrias aisladas al ser expuestas a altas concentraciones de iones  $\text{Ca}^{2+}$ . Este fenómeno fue evidenciado mediante mediciones en los cambios en la dispersión de la

luz en muestras de suspensiones de organelos aislados (Chappell y Crofts, 1965). Inicialmente, se sugirió que el hinchamiento podría representar una permeabilización no específica de la MMI mediante la activación de fosfolipasas sensibles al calcio que conducen a la acumulación de ácidos grasos y lisofosfolípidos en la membrana. Sin embargo, fueron las investigaciones de los grupos de Crompton y las de Haworth y Hunter (Tanveer et al., 1996; Hunter y Haworth, 1979), las que permitieron establecer que el aumento de la permeabilidad mitocondrial era el resultado de la apertura de un canal no específico en la membrana (Halestrap, 2009).

En mamíferos se ha demostrado que el daño mitocondrial provocado por periodos de isquemia y posterior reperfusión induce una transición de la permeabilidad mitocondrial: un estado donde la mitocondria cesa sus funciones como proveedor de energía y se convierte en un potente factor de muerte celular debido a un aumento de la permeabilidad de la MMI (Azzolin et al., 2010; Gutiérrez-Aguilar y de la Peña, 2013). Además, investigaciones evidenciaron que la activación de los procesos de apoptosis y necrosis pueden desencadenarse por daños causados por diversos factores ambientales de estrés mitocondrial. Entre estos figuran: sobrecarga de iones  $\text{Ca}^{2+}$  en la matriz mitocondrial, especialmente cuando se acompaña de estrés oxidante, concentraciones elevadas de aniones fosfato y el agotamiento de nucleótidos de adenina (D'Angelo et al., 2023). Es así como se piensa que la transición de la permeabilidad mitocondrial es inducida por la apertura de un poro de transición de la permeabilidad (PTP) (Azzolin et al., 2010; Gutiérrez-Aguilar y de la Peña, 2013).

El PTP es un megacanal inespecífico no selectivo, formado en la MMI y que conecta directamente la matriz mitocondrial con el espacio intermembranal. Cuenta con un corte molecular de alrededor de 1.5 kDa, permitiendo el paso de moléculas con pesos

moleculares inferiores a este, siendo su activación, la responsable de disipar la  $\Delta p$  utilizada para la síntesis de ATP, así como el transporte de iones, solutos y macromoléculas (Azzolin et al., 2010).

### 1.2.1 Composición del PTP mitocondrial

Funcionalmente, el PTP ha sido muy bien caracterizado, siendo su modulación un tema ampliamente abordado, no obstante, su composición molecular continúa siendo incierta y constantemente debatida (Azzolin et al., 2010; Gutiérrez-Aguilar y Baines, 2015). Ciertos modelos han permitido dilucidar la conformación del PTP, proponiendo algunas proteínas responsables de su formación (Fig. 3). Entre ellas figuran el VDAC de la MME, el ANT localizado en la MMI, el transportador de fosfato mitocondrial (PiC), la F-ATP sintasa y la proteína de matriz mitocondrial conocida como ciclofilina D (CypD) (Murphy y Steenbergen, 2007; Bernardi et al., 2023).

- ❖ **Canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC):** es la proteína de mayor abundancia en la MME. Se caracteriza por presentar distintos estados conformacionales, cada uno con diferente permeabilidad y selectividad. Esta proteína es sensible al potencial de la membrana, pero no es selectivo al paso de iones. Puede transportar nucleótidos de adenina, iones calcio, entre otros metabolitos (Murphy y Steenbergen, 2007; Pezoa, 2012).
- ❖ **Transportador de nucleótidos de adenina (ANT):** es una proteína de la MMI con peso molecular de 32 kDa. Su función es intercambiar ATP de la matriz por ADP citosólico (Armstrong, 2006; Pezoa, 2012; Carraro et al., 2020). El ANT es uno de los principales candidatos propuestos para la formación del PTP mitocondrial, ya que la apertura de los poros está relacionada con un cambio conformacional dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  de esta proteína, el cual puede verse

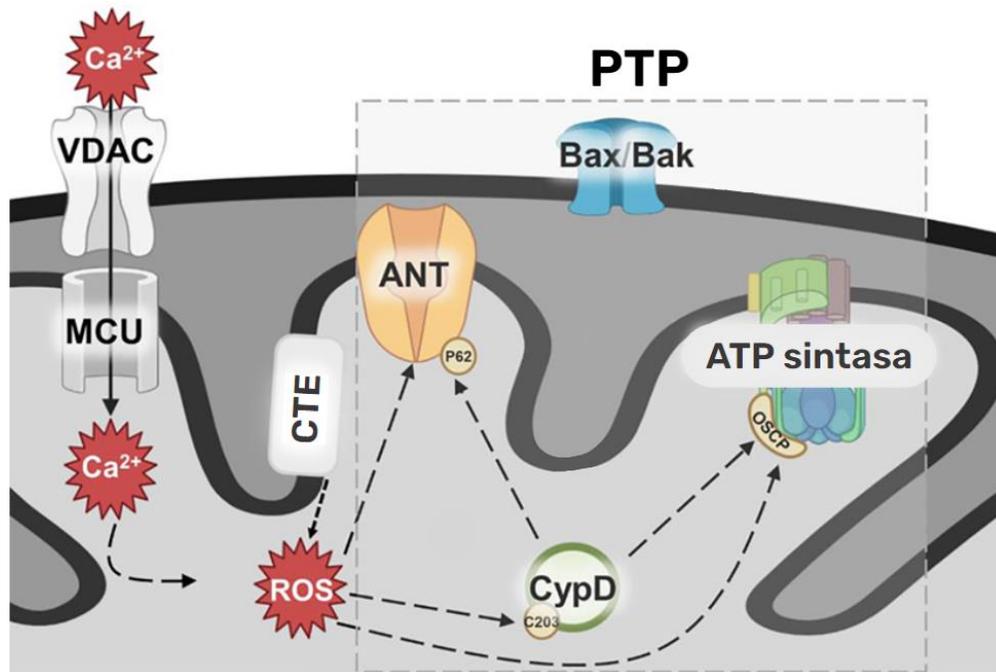
favorecido tras su unión con la CypD (Carraro et al., 2020). En forma adicional, la ausencia de este transportador inhibe sustancialmente al PTP (Karch et al., 2019). Se ha demostrado que los agentes desacoplantes activan a este transportador, lo cual podría explicar por qué la adición de desacoplantes inducen al PTP (Bertholet et al., 2022).

- ❖ **Ciclofilina D (CypD):** su peso molecular corresponde a 17 kDa y se encuentra localizada en la matriz mitocondrial. Posee una actividad peptidil-prolil-cis/trans-isomerasa codificada por el gen nuclear *ppif* y sintetizada con una secuencia de tránsito que es escindida tras su translocación a la matriz mitocondrial. La CypD fue propuesta como una proteína clave en la formación del PTP luego de ser evidenciada la pérdida de su función mediante su inhibición farmacológica con ciclosporina A (CsA) (Armstrong, 2006; Pezoa, 2012). Además, en diversos estudios se ha demostrado que la ausencia de CypD desensibiliza significativamente el poro al  $\text{Ca}^{2+}$ , lo cual resulta en inhibición (Baines et al., 2005). Por otro lado, la sobreexpresión de CypD protege de la muerte celular inducida por el estrés oxidante. Lo anterior revela que la CypD actúa como un modulador positivo del PTP (Carraro et al., 2020). La evidencia ha observado que, si bien la pérdida de CypD no previene la apertura del PTP, sí incrementa significativamente la carga de  $\text{Ca}^{2+}$  requerida antes de que dicho evento ocurra (Pezoa, 2012).
- ❖ **F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP sintasa:** es un supercomplejo de membrana que forma filas dinámicas de dímeros de F-ATP sintasa (cada dímero con un peso molecular >1.2 mDa y aproximadamente 56 subunidades) que dan forma a la MMI al inducir una fuerte curvatura positiva de la membrana (Bernardi et al., 2023). El

complejo  $F_0F_1$  de mamíferos se compone por dos segmentos:  $F_0$  (hidrofóbico) integrado a la membrana y  $F_1$  (hidrofílico) (Cano-Estrada y González-Halphen, 2011; Domínguez-Ramírez y Gómez-Puyou, 2005). Además, la F-ATP sintasa cuenta con dos subunidades relevantes en la modulación del PTP. Entre ellas destaca la subunidad OSCP (Oligomycin sensitivity conferring protein) que ha demostrado ser un sitio de unión a CypD, y la subunidad c que forma un anillo en el complejo (Carraro et al., 2020; Cano-Estrada y González-Halphen, 2011). La función enzimática clásica de la F-ATP sintasa se centra en dos reacciones acopladas. Por un lado,  $F_0$  realiza el transporte de protones a través de la MMI, mientras que  $F_1$  une el ADP y el fosfato para la síntesis de ATP o fosforilación oxidativa en la respiración celular (Cano-Estrada y González-Halphen, 2011; Domínguez-Ramírez y Gómez-Puyou, 2005). Se piensa que, junto con el ANT, la F-ATP sintasa origina canales de alta conductancia que presenta las características biofísicas del PTP dependientes de  $Ca^{2+}$ , por lo que es probable que este poro pueda estar mediado principalmente por estas dos especies moleculares (Carraro et al., 2020; Bernardi et al., 2023). Sin embargo, es importante mencionar que existe evidencia en contra de que este complejo es parte del PTP (Carroll et al., 2019).

- ❖ **Transportador de fosfato mitocondrial (PiC):** estudios previos indican la probable participación del PiC en la formación del PTP, debido a la detección de una interacción entre CypD y PiC (Leung et al., 2008; Leung y Halestrap, 2008; Fernández, 2009; Pezoa, 2012). Sin embargo, estudios posteriores demostraron que esta proteína solamente presenta un probable papel

regulatorio, ya que su eliminación genética no ocasiona cambios sustanciales en la actividad del PTP (Gutiérrez-Aguilar et al., 2014).



**Figura 3. Poro de transición de la permeabilidad mitocondrial en mamíferos.**

Propuesta reciente de los principales componentes proteicos mitocondriales que conforman el PTP en mamíferos. ANT: transportador de nucleótidos de adenina, CypD: ciclofilina D y el complejo ATP sintasa junto con su subunidad OSCP (oligomycin sensitivity conferring protein). Además, se incluye Bax/Bak: una oligomerización de proteínas tipo BCL-2 (B cell lymphoma) mediadoras de la permeabilización de la membrana mitocondrial durante la apoptosis. Se presentan también, algunos de los principales desencadenantes de la apertura del poro:  $\text{Ca}^{2+}$  proveniente del citosol a través del VDAC (canal aniónico dependiente de voltaje) y MCU (uniportador de calcio mitocondrial) y especies reactivas de oxígeno (ROS) derivadas de la cadena de transporte de electrones (CTE). Imagen modificada de Robichaux y colaboradores (2023).

### **1.2.2 Consecuencias de la apertura del PTP**

La apertura del PTP es un tema de interés ampliamente estudiado, debido a que su activación se asocia a severos daños en la mitocondria, y a la muerte celular. Una de las principales consecuencias de la apertura de este poro es la pérdida del potencial transmembrana mitocondrial, agotando los gradientes de iones a través de la MMI (Karch et al., 2019). La explicación a esto es que la activación del PTP incrementa la permeabilidad mitocondrial, lo que impide que la MMI continúe actuando como una barrera de protones, provocando así, que la fuerza otorgada por el gradiente protónico sea disipada (Halestrap, 2009; Gutiérrez-Aguilar y Baines, 2015; Scott y Logan, 2008). El desacoplamiento resultante de la fosforilación oxidativa suspende la producción de ATP mitocondrial, al mismo tiempo que es invertida la ATPasa translocadora de protones, conllevando no sólo al cese de la producción energética, sino también a la hidrólisis del ATP mitocondrial generado por la glucólisis. Lo anterior conduce al agotamiento del ATP y al fallo bioenergético de la célula (Halestrap, 2009; Gutiérrez-Aguilar y Baines, 2015).

Por otro lado, se ha demostrado que la apertura del PTP produce cambios en la morfología de la mitocondria, induciendo la transición mitocondrial al estado hinchado de la misma. Se ha descrito que el aumento en el volumen mitocondrial puede evidenciarse por la disminución en la dispersión de la luz en estudios con suspensiones de mitocondrias (Pezoa, 2012). La activación del PTP aumenta no sólo la permeabilidad mitocondrial a los protones, sino también a las moléculas de bajo peso molecular, incluidos los cofactores y iones como el  $\text{Ca}^{2+}$  acumulado, interrumpiendo los gradientes metabólicos entre la mitocondria y el citosol y equilibrando las concentraciones mitocondriales de estos osmolitos a través de la

MMI, mientras las proteínas dentro de sus respectivos compartimentos son retenidas. La diferencia en la concentración proteica de la matriz respecto a la del citosol y el espacio intermembrana termina siendo significativamente más alta, por lo que se ejerce una presión osmótica coloidal que conduce a la hinchazón del compartimento de la matriz, lo que finalmente incrementa el volumen mitocondrial (Gutiérrez-Aguilar y Baines, 2015; Pezoa, 2012). Cuando la capacidad de la mitocondria para reponer estos gradientes se ve superada por la actividad de desacoplamiento del PTP, la célula acaba por desarrollar un fenotipo pronecrótico (Gutiérrez-Aguilar y Baines, 2015).

El hinchamiento mitocondrial puede ocurrir sin que se rompa la MMI porque las crestas se despliegan. Sin embargo, a medida que la matriz se expande, ejerce presión sobre la MME (la cual cuenta con una menor área de superficie), conduciendo finalmente al rompimiento de esta (Gutiérrez-Aguilar y Baines, 2015). Esta ruptura libera el contenido del espacio intermembranoso al citosol, el cual incluye proteínas proapoptóticas almacenadas al interior de la mitocondria como el citocromo c, que tienen el potencial de iniciar varios procesos (como la activación de las proteasas caspasa que degradan las células) que culminan en la muerte celular. Lo anterior provoca un aumento del volumen celular, ruptura de la membrana plasmática y muerte celular por necrosis (Gutiérrez-Aguilar y Baines, 2015; Pezoa, 2012; Scott y Logan, 2008). Sólo si los poros se vuelven a cerrar lo suficiente como para mantener los niveles de ATP, la muerte apoptótica predominará sobre la muerte celular necrótica (Gutiérrez-Aguilar y Baines, 2015).

### 1.2.3 Moduladores del PTP

Debido a las consecuencias catastróficas para la célula generadas por la activación del PTP mitocondrial, la modulación de este poro se ha estudiado ampliamente. Diversos investigadores han determinado que su apertura puede ser desencadenada por ciertos factores específicos, dentro de los cuales figuran el aumento de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en la matriz mitocondrial, cambios en el pH y los niveles de  $\text{Mg}^{2+}$  así como el estrés oxidante (Bernardi et al., 2023; Halestrap, 2009). Estas condiciones son críticas para generar la apertura del PTP, ya que promueven aperturas transitorias y prolongadas. Las aperturas transitorias buscan liberar el exceso del  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial. Por otro lado, las aperturas prolongadas aumentan la permeabilización de las mitocondrias provocando la liberación de factores proapoptóticos que conducen a la célula a la PCD (Halestrap, 2009).

Son diversos los estudios que han demostrado, a través de modelos biológicos *in vivo*, los efectos del  $\text{Ca}^{2+}$  sobre el PTP. Por un lado, existe evidencia de que la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  propicia la activación del PTP de mitocondrias, mientras que la administración de agentes quelantes de  $\text{Ca}^{2+}$  conlleva al restablecimiento del estado cerrado de este poro (Pezoa, 2012). De esta forma se conoce que la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  tiene un papel principal como inductor del PTP; no obstante, se ha demostrado que esta resulta ser altamente dependiente de las condiciones prevalentes para lograr generar la apertura del poro, de modo que el aumento en  $[\text{Ca}^{2+}]$  en la matriz puede ser insuficiente por sí solo para desencadenar la apertura del PTP, pues son necesarios factores inductores adicionales del canal como lo son el estrés oxidante, la depleción de nucleótidos de adenina, las concentraciones elevadas de fosfato y la despolarización mitocondrial. Estos últimos han resultado ser críticos en algunas

ocasiones (incluso más importantes que el incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  en un contexto de isquemia-reperfusión cardiaca), ya que son capaces de sensibilizar el poro potenciando el efecto producido por la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  de la matriz mitocondrial en reposo (Pezoa, 2012).

La especificidad del sitio de unión para el calcio tiene la característica de ser altamente elevada, ya que otros cationes divalentes como  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  ejercen un efecto inhibitor del PTP. Así también, la inhibición sobre la apertura del PTP puede ser generada a pH bajos, debido a que el aumento en la concentración de protones ( $\text{H}^+$ ) interfiere con la unión del  $\text{Ca}^{2+}$  a su sitio de unión (Bernardi, 1999; Pezoa, 2012).

Otro de los componentes con efecto inhibitor de la apertura del PTP son los nucleótidos de adenina. Estos reducen la sensibilidad propiciada por la elevación de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  de la matriz mitocondrial. La evidencia científica ha sugerido que el efecto inhibitor es propiciado por nucleótidos de adenina transportados por ANT, como el ATP y el ADP, gracias a su adhesión a sitios de unión específicos en la misma; no obstante, sus complejos con  $\text{Mg}^{2+}$  o nucleótidos no transportados por ANT como el AMP (adenosín monofosfato), GDP (guanosín difosfato) o GTP (guanosín trifosfato) carecen de este efecto inhibitorio (Bernardi, 1999).

Dentro de los moduladores con propiedades inhibitorias del PTP, una de las moléculas más notables es la CsA. (Baines et al., 2005). La CsA es un inmunosupresor del grupo de los inhibidores de la calcineurina usado en enfermedades autoinmunes y en profilaxis de rechazo de trasplantes. Actualmente la CsA destaca por ser considerada el modulador de elección para evaluar el comportamiento del PTP (Gutiérrez-Aguilar y Baines, 2015). Fournier y colaboradores observaron que las mitocondrias tratadas

con CsA son capaces de acumular cantidades sustancialmente grandes de  $\text{Ca}^{2+}$ , (Fournier et al., 1987), mientras que posteriormente se describió que dicha acumulación era consecuencia del potente efecto inhibitorio de la CsA sobre el PTP inducido por  $\text{Ca}^{2+}$  (Tanveer et al., 1996).

### **1.3 La transición de la morfología mitocondrial en plantas**

La alta relación de las mitocondrias con la PCD ha generado que sus funciones fisiológicas sean temas de gran interés en los últimos años. La evidencia sobre los eventos catastróficos generados tras la apertura del PTP continúan siendo un fenómeno ampliamente estudiado en mamíferos (Bernardi et al., 2023); no obstante, la evidencia sobre la ocurrencia de un posible PTP mitocondrial en plantas es escasa (Gutiérrez-Aguilar, 2020). En cuanto a los procesos de PCD en plantas, se ha observado que comparten varias características morfológicas y bioquímicas con los procesos análogos en mamíferos, incluida la contracción del citoplasma, la condensación nuclear, la degradación “escalonada” del DNA, la expresión de actividad proteolítica similar a la caspasa y la liberación de citocromo *c* de las mitocondrias (Zancani et al., 2015). Al igual que en mamíferos, las plantas emplean un conjunto de vías reguladoras para programar la destrucción de células. La PCD es responsable de la eliminación de múltiples células redundantes, fuera de lugar o dañadas y, por lo tanto, contribuye significativamente al desarrollo y al mantenimiento de organismos multicelulares vegetales (Dickman et al., 2017; Vacca et al., 2004); sin embargo, a diferencia de los mamíferos, la activación de los procesos de PCD en plantas continúa sin ser comprendida en su totalidad (Vacca et al., 2004). A pesar de esto, las observaciones preliminares sugirieron que las ROS tienen la capacidad de alterar la

morfología mitocondrial en las plantas (Scott y Logan, 2008). Adicionalmente se ha demostrado que las ROS pueden tener una función importante en la activación de los procesos de muerte de células vegetales, pues Vacca y colaboradores (2004) observaron que la muerte celular inducida por temperaturas altas en plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*), conduce a fuertes aumentos de ROS intracelulares, describiendo que dichos cambios se encuentran estrechamente relacionados con una pérdida de la función mitocondrial y con la consecuente PCD (Scott y Logan, 2008; Vacca et al., 2004). Las investigaciones científicas de Scott y Logan permitieron determinar que la inducción de leves choques térmicos, o un tratamiento previo con agentes químicos con fuertes características oxidantes, provocan una transición rápida en la morfología mitocondrial de células vegetales en *Arabidopsis thaliana*, que concluye con la muerte celular de las mismas (Scott y Logan, 2008). En este sentido, sus estudios evidenciaron la ocurrencia de un fenómeno conocido como transición de la morfología mitocondrial (TMM) durante los procesos de muerte celular en plantas (Logan, 2010). Considerando los factores moduladores del PTP mitocondrial en mamíferos, se probó que la interrupción del flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  celular y la inhibición del poro que conllevaba a la transición de la permeabilidad mitocondrial, detuvo la TMM y la muerte celular, indicando la influencia de ambos en estos procesos (Scott y Logan, 2008). Así también, la relación entre los cambios observados en la morfología mitocondrial y la muerte celular con la transición de permeabilidad mitocondrial fue comprobada tras notar que la incubación de protoplastos con CsA, previo al tratamiento de choque térmico, redujo la muerte celular, descubriendo así que dicho inhibidor químico del PTP reducía la TMM observada después de la inducción de la muerte celular (Scott y Logan, 2008).

## **1.4 *Arabidopsis thaliana*: un organismo modelo**

Dentro de los organismos vegetales, uno de los modelos de estudio que sobresale en el ámbito de investigación científica por sus características físicas y genéticas es *Arabidopsis thaliana*, una angiosperma dicotiledónea perteneciente a la familia *Brassicaceae* que incluye especies de cultivos comerciales como coliflor, brócoli y mostaza (Chua et al., 1992). *A. thaliana* tiene un genoma nuclear relativamente pequeño de aproximadamente 125 Mb, y se caracteriza por presentar un ciclo de vida corto. El empleo de este organismo como modelo para el estudio de la biología molecular, la fisiología y la genética de plantas ha destacado en los últimos años, ya que muestra ventajas muy importantes para la investigación básica. Entre ellas destaca su sencilla manipulación genética debida a la posibilidad de generar inserciones y deleciones cromosómicas mediante procesos de infección con *Agrobacterium tumefaciens*, aunado a su ciclo de vida corto que reduce los tiempos de experimentación (de 5 a 6 semanas desde la germinación de las semillas hasta la producción de una nueva cosecha de semillas). *A. thaliana* es una planta de rápido y sencillo cultivo en espacios pequeños y en condiciones de laboratorio. Se han generado múltiples recursos genéticos como líneas mutantes y de sobreexpresión que han permitido avanzar en la genética funcional de este organismo modelo y extenderlo a otras especies (Sivasubramanian et al., 2015; Chua et al., 1992). Finalmente, en el año 2000 se logró secuenciar el genoma de esta planta, lo que permite profundizar e impulsar la investigación genómica a través de este modelo biológico, desarrollando un gran número de técnicas moleculares (Arabidopsis Genome Initiative, 2000). Además, *A. thaliana* ha permitido ampliar los conocimientos relacionados con los mecanismos de tolerancia al estrés en plantas para la mejora de cultivos vegetales.

Es así como la investigación científica empleando modelos de *A. thaliana* ha proporcionado información valiosa para la biología moderna de plantas (Raza et al., 2020).

Actualmente existen varias plataformas de información fundamental y bases de datos online referentes al empleo de *A. thaliana* como modelo de estudio. Uno de los sitios destacables es *The Arabidopsis Information Resource* (TAIR, <http://www.arabidopsis.org>), el cual incluye la secuencia y anotación del genoma completo e información de estructuras de genes y productos génicos, metabolismo, expresión génica, DNA, stocks de semillas disponibles, mapas genómicos, marcadores genéticos y físicos, así como publicaciones e información acerca de la comunidad científica de *Arabidopsis*.

#### **1.4.1 Expresión de la proteína verde fluorescente en *A. thaliana***

Se entiende por fluorescencia a la emisión de radiación electromagnética en la región visible (comprendida entre 390 a 780 nm) por parte de una molécula o átomo posterior a la absorción de energía en forma de partículas de luz (fotones) (Franco y Longart, 2009).

Para estudios de biología celular, se han empleado proteínas con capacidad fluorescente nativas de organismos acuáticos con propiedades bioluminiscentes. A través del empleo de estas proteínas, es posible obtener información sobre la localización, dinámica y redes de interacción molecular con otras proteínas de gran resolución temporal y espacial. Es por ello por lo que las proteínas fluorescentes son consideradas marcadores de localización (genes reporteros) que permiten el monitoreo de los cambios bioquímicos dentro y entre las células, o de cualquier otro

fenómeno dinámico que se desee observar sin necesidad de tinción o fijación de la célula. De esta forma, uno de los principales usos de las proteínas fluorescentes es su uso como marcadores fusionados a polipéptidos o como indicadores de estados químicos-fisiológicos intracelulares en todo tipo de células, subcompartimentos celulares y organismos, siendo un excelente bioindicador ya que típicamente no presenta interferencias con mecanismos fisiológicos de los organismos transgénicos generados (Franco y Longart, 2009).

Existen proteínas fluorescentes con capacidad de emisión de fluorescencia en rangos de distintos colores. La proteína fluorescente con más impacto en la investigación científica es la proveniente de la medusa *Aequorea victoria*, nombrada por primera vez en 1969 por Morin y Hastings como proteína verde fluorescente (GFP, por sus siglas en inglés) nativa debido a sus características luminiscentes emitidas en el rango verde del espectro electromagnético (Franco y Longart, 2009). La GFP se encuentra conformada por 238 aminoácidos, secuencia descifrada por el investigador Prasher (Prasher, 1995). Consta de una estructura terciaria que incluye un barril beta de 40 Å, formado por once hojas  $\beta$  antiparalelas, acompañadas de una hélice  $\alpha$  con el cromóforo p-hidroxibenzilideneimidazolinona al centro de dicha estructura sujeto a la hélice dentro del barril. El cromóforo p-hidroxibenzilideneimidazolinona se forma por la ciclación espontánea y la oxidación de los residuos 65 – 67, correspondientes a los aminoácidos Ser 65– Tyr 66 – Gly 67 de la GFP y es el responsable de la emisión de luz verde. La excitación de la proteína con energía luminosa capta mayor luz fuera del espectro visible y la convierte en luz visible verdosa (a 530 nm). La emisión de luz verde es posible gracias a que la GFP presenta dos picos de emisión y excitación. El primer pico de excitación se encuentra cerca de los 395 nm; mientras que el segundo

se encuentra cercano a los 475 nm. En cuanto a los picos de emisión, el primero se muestra a los 508 nm cuando es excitada a los 395 nm y si, por el contrario, es excitada a 475 nm, la emisión ocurre a los 503 nm. No obstante, es importante considerar que la cantidad de GFP correctamente plegadas necesarias para que la proteína pueda emitir luz corresponde a la concentración de 1  $\mu\text{M}$  (aproximadamente 105 copias en un volumen celular de 1-2 pL) (Franco y Longart, 2009). A través de sus investigaciones, Chalfie (2009) descubrió que la fluorescencia emitida por esta proteína no requería sustratos exógenos ni cofactores para generar la emisión de luz. De modo que una particularidad de la GFP es que el gen codificante para la misma por sí solo contiene toda la información necesaria para sintetizar el cromóforo postraduccionalmente y no requiere la acción de enzimas específicas de la medusa *Aequorea victoria*. Además, la GFP no muestra indicios de toxicidad para la célula y permite su observación con una mínima alteración del sistema *in vivo*, siendo posible su observación a través de otras técnicas, como lo es la microscopía de fluorescencia, para el estudio en células vivas (Chalfie, 2009).

En 1997, Köhler y colaboradores evaluaron modelos vegetales transgénicos con expresión de la GFP a través de técnicas de microscopía confocal para su uso como marcadores para la localización subcelular y como etiquetas mitocondriales de plantas *in vivo*. Sus investigaciones demostraron que el uso de la GFP como marcador celular no solo permite la examinación directa de mitocondrias de plantas, sino que además permite observar los movimientos de las mitocondrias en células vivas (Köhler et al., 1997). Es así como a lo largo de los años se han desarrollado una gran cantidad de marcadores de orgánulos a través de proteínas fluorescentes para estudios en plantas (Nelson et al., 2007; Dhanoa et al., 2006; Scott y Logan, 2008).

### **1.4.2 Microscopía confocal de fluorescencia**

La microscopía de fluorescencia convencional utiliza una fuente de luz, generada por lo general por lámparas de mercurio, xenón o diodos emisores de luz (LEDs), con la finalidad de excitar los electrones de las moléculas fluorescentes presentes en una muestra determinada. La absorción de la energía proporcionada por la luz genera como respuesta la emisión de fotones que se filtran en un rango específico de longitud de onda específica para ser captados por el observador. Lo anterior permite la visualización de estructuras microscópicas, naturalmente fluorescentes o premarcadas con diversos fluorocromos, como lo es a través de la expresión de proteínas fluorescentes, en muestras biológicas como células y tejidos de plantas o animales. No obstante, una desventaja observada en los equipos de fluorescencia convencionales es que las muestras biológicas, como tejidos animales o de plantas, generalmente cuentan un grosor amplio, ocasionando la superposición de los elementos del tejido que están fuera del plano enfocado, tanto por encima como por debajo del mismo. Por lo anterior, la región enfocada de interés contiene la luz proveniente del plano focal, pero también de los planos que están fuera de foco, impidiendo la obtención de imágenes claras (López-Macay et al., 2016; Samaniego, 2009).

Dentro de las distintas técnicas de microscopía de luz fluorescente existentes se encuentra la microscopía confocal. A diferencia de los microscopios de fluorescencia convencionales, los microscopios confocales no emplean lámparas como fuentes de luz, sino que hacen uso de rayos láser para irradiar la muestra. De esta forma, la microscopía confocal emplea la fluorescencia convencional para la observación de las muestras; no obstante, implementa el principio de confocalidad, entendido como la

colimación de un punto de luz en un plano particular de una muestra, logrando que el eje óptico del lente coincida con el rayo central del sistema de forma paralela y concentrar así el haz de rayos (López-Macay et al., 2016; Samaniego, 2009). El rayo de luz proveniente del láser pasa por un diafragma o *pinhole*, orificio pequeño en el filtro detector de la luz que tiene como finalidad impedir el paso de la luz procedente de los planos de la muestra que están fuera de foco, eliminando el resto de luz para permitir al observador recibir sólo la proveniente de una región de sólo 500 nanómetros de profundidad contenida en un corte de tejido cuyo grosor amplio se encuentre en el rango de las decenas de micras, siendo esta una gran ventaja en contraste con las imágenes obtenidas en los microscopios de fluorescencia convencional (López-Macay et al., 2016; Samaniego, 2009).

Una de las grandes ventajas de la microscopía confocal es que permite realizar varios cortes ópticos finos (imágenes con información de una zona de grosor menor al de la muestra) en muestras gruesas y efectuar reconstrucciones tridimensionales a partir de varios cortes ópticos continuos. Es de esta forma que la microscopía confocal es capaz de generar imágenes de alta resolución espacial distinguiendo dos puntos a una distancia de 200  $\mu\text{m}$  micras en los planos  $x$ ,  $y$ , y de 500  $\mu\text{m}$  en el plano  $z$  (López-Macay et al., 2016; Samaniego, 2009).

Otra de las ventajas de los equipos de microscopía confocal deriva del uso de detectores o fotomultiplicadores, componente esencial que multiplica la corriente producida por la luz emitida, facilitando la detección de fotones individuales provenientes de la muestra y moléculas fluorescentes de interés, incluso si estas se encuentran en concentraciones bajas (López-Macay et al., 2016; Samaniego, 2009).

## 2. HIPÓTESIS

Si la TMM es la manifestación directa de la activación del PTP en *Arabidopsis thaliana*, entonces este proceso debería ser regulado por moduladores de este canal inespecífico.

## 3. OBJETIVOS

### 3.1 OBJETIVO GENERAL

- Determinar si la activación del PTP y la TMM reportada en plantas son fenómenos relacionados entre sí, usando un modelo de *Arabidopsis thaliana* transgénica con expresión de una mGFP.

### 3.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Detectar la expresión de la GFP en la planta *A. thaliana* mGFP mediante técnicas bioquímicas.
- Evaluar la TMM en hojas de *A. thaliana* mGFP en respuesta a estrés por sobrecarga de iones  $\text{Ca}^{2+}$ .
- Evaluar el efecto de moduladores clásicos del PTP y su efecto sobre la TMM en hojas de *A. thaliana* mGFP.
- Establecer un método cuantitativo para la evaluación de la TMM de hojas de *A. thaliana* mGFP.

## **4. METODOLOGÍA Y PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL**

### **4.1 Materiales, equipo y reactivos**

#### **4.1.1 Materiales**

- Cajas Petri
- Frascos de vidrio
- Pinzas de disección sin dientes
- Tijeras
- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Micropipetas
- Puntas para micropipeta estériles y no estériles
- Pistilo de plástico
- Tubos Eppendorf de 1.5 mL
- Tubos para PCR de 0.2 mL
- Tubos cónicos para centrifuga de 15 y 50 mL
- Membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF) para transferencia

#### **4.1.2 Equipo**

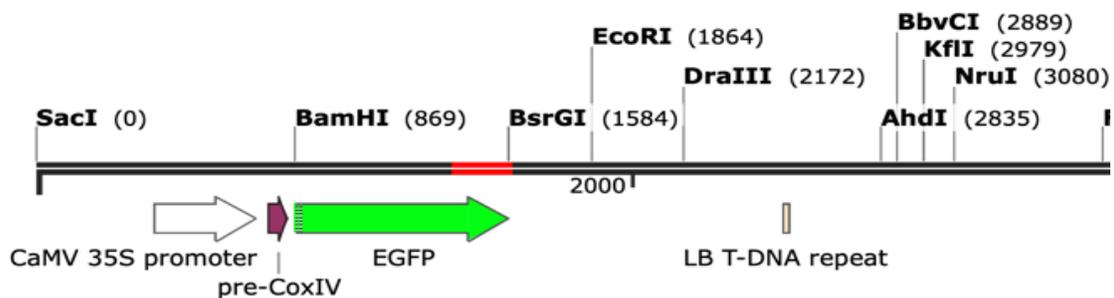
- Autoclave
- Microcentrífuga
- Centrífuga refrigerada para tubos Eppendorf
- Agitador de órbita
- Cámara de electroforesis vertical
- Cámara de electrotransferencia para Western blot

- Cámara de electroforesis horizontal
- Termociclador
- Sistema de imágenes ChemiDoc
- Microscopio confocal de fluorescencia

### 4.1.3 Material biológico

#### 4.1.3.1 *Arabidopsis thaliana* transgénica mGFP

La caracterización de la TMM fue llevada a cabo usando una planta transgénica en el fondo genético (ecotipo) Columbia-0 (Col-0) con expresión de una mGFP. Esto fue posible mediante la fusión en el marco abierto de lectura (ORF, por sus siglas en inglés) de la GFP en el extremo 5' de una secuencia que codifica para la presecuencia de tránsito mitocondrial de la subunidad IV del citocromo oxidasa de *Saccharomyces cerevisiae* (Nelson et al., 2007). El mapa de la inserción se describe con mayor detalle en la Fig. 4. Las semillas de la línea mGFP fueron obtenidas del Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC) de la Universidad Estatal de Ohio con número de germoplasma CS16263. Tras su adquisición, las semillas se conservaron en un desecador a temperatura de refrigeración.



**Figura 4. Mapa de la inserción cromosomal en la línea mGFP obtenida del ABRC.** El sitio «pre-CoxIV» denota la secuencia codificante de la presecuencia de tránsito mitocondrial de *Saccharomyces cerevisiae* en el ORF. EGFP indica el inicio de la secuencia codificante para

la GFP. Imagen generada con SnapGene® a partir de la planta descrita en el trabajo de Nelson y colaboradores (2007) y modificada para ampliar la sección con la inserción genómica.

#### **4.1.3.2 Anticuerpo anti-GFP**

La inmunodetección de la GFP requirió el empleo de un anticuerpo monoclonal anti-GFP generado en ratones, obtenido de Santa Cruz Biotechnology (SC-9996).

#### **4.1.4 Reactivos**

##### **4.1.4.1 Amortiguador Tris-Borato-EDTA (TBE) 5X**

Se disolvieron 54 g de Tris base, 27.5 g de ácido bórico, 20 mL de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 0.5 M (pH 8.0) en una cama de H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>, para finalmente llevar a volumen de 1 L con el mismo disolvente.

##### **4.1.4.2 Amortiguador de corrida**

Para una solución de 50 mL se adicionaron 10 mL de amortiguador TBE 5X en 40 mL de H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>. La solución obtenida se agitó y se mezcló mecánicamente.

##### **4.1.4.3 Solución salina tamponada con Tris con Tween-20 (TBST)**

Se preparó a partir de una solución salina tamponada con Tris (TBS, por sus siglas en inglés) 10X, la cual fue preparada de la siguiente forma: se disolvieron 24 g de Tris base y 88 g de NaCl en 900 mL de H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>. Posteriormente se ajustó el pH de la solución a 7.6 con HCl concentrado. Finalmente se llevó a un volumen final de 1 L, se agitó y mezcló mecánicamente.

Para la solución TBST se adicionaron 100 mL de la solución TBS 10X y 1 mL de Tween-20 al 0.1% en 900 mL de H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>. La solución obtenida se agitó y mezcló mecánicamente.

#### **4.1.4.4 Solución de bloqueo para Western blot**

En un tubo cónico para centrifuga de 15 mL se disolvieron 0.5 g de leche en polvo Svelty® en 10 mL de volumen final de solución TBST.

#### **4.1.4.5 Amortiguador de transferencia 1X**

Fue preparado a partir de una solución de amortiguador de transferencia 10X. Para la solución concentrada 10X se disolvieron poco a poco 288 g de glicina y 60.4 g de Tris base en 1.8 L de H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> con ayuda de una parrilla de agitación magnética. Una vez disuelto se llevó a volumen final de 2 L y se mezcló mecánicamente.

Para el amortiguador de transferencia 1X se tomaron 100 mL del amortiguador de transferencia 10X y 100 mL de metanol y se adicionaron en 800 mL de H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>. La solución obtenida se agitó y mezcló mecánicamente.

## **4.2 Metodología experimental**

### **4.2.1 Desinfección y cultivo *in vitro* de semillas**

Previo a la siembra de las semillas se realizó la desinfección de estas procurando mantener las condiciones de esterilidad, por lo que el método descrito a continuación fue realizado en una campana de flujo laminar. Para realizar la desinfección, las semillas fueron sumergidas durante un tiempo de 20 minutos en una solución de hipoclorito de sodio al 5% y Tween-20 al 0.1%, agitando y resuspendiendo las semillas del fondo del tubo de forma mecánica y constante en intervalos de 3 minutos aproximadamente. Transcurrido el tiempo se retiró el sobrenadante por decantación y posteriormente se efectuaron tres lavados con 1 mL de H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> estéril, agitando y resuspendiendo las semillas del fondo del tubo en cada lavado.

Para el cultivo *in vitro* y germinación de las semillas se emplearon placas estériles con medio Murashige y Skoog (MS), agar al 2% y 2% de sacarosa. La siembra de las semillas en las placas fue realizada en condiciones estériles en una campana de flujo laminar (para evitar contaminación con hongos), procurando mantener una distancia considerable entre cada semilla. Las placas con las semillas sembradas se conservaron en una cámara de crecimiento a  $22 \pm 0.5^\circ\text{C}$  con fotoperiodo de 8 h de luz y 16 h de oscuridad hasta el crecimiento de las plántulas.

#### **4.2.2 Cultivo de plántulas en sustrato sólido**

Tras la obtención de las plántulas de *A. thaliana* transgénica, estas fueron transferidas a macetas una vez que presentaron sus primeras hojas verdaderas, empleando como sustrato y medio de cultivo una mezcla de Sunshine<sup>®</sup> mix #3:agrolita:vermiculita (3:1:1) (Pedroza-García et al., 2015; Relichová, 1998). El trasplante se realizó con ayuda de unas pinzas de disección, cuidando de no dañar las raíces. El desarrollo de las plántulas transgénicas trasplantadas fue monitoreado en la cámara de crecimiento descrita en el punto 4.2.1 “Desinfección y cultivo *in vitro* de las semillas de *A. thaliana* transgénica”. A partir de este momento, las plantas transgénicas fueron regadas cada tercer día con una solución Hoagland a una concentración de 1.6 mg/mL en H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>.

#### **4.2.3 Aislamiento de DNA**

La metodología descrita a continuación fue realizada en una campana de flujo laminar, haciendo uso de guantes de látex, empleando puntas para micropipeta estériles, en una zona de trabajo limpiada con etanol al 70% y con material limpiado con la solución anterior o esterilizado con calor. Inicialmente fueron depositadas 4 hojas verdaderas de *A. thaliana* en un tubo Eppendorf frío de 1.5 mL. Se adicionaron 100  $\mu\text{L}$  de solución

de extracción (Sigma<sup>®</sup>, No. E7526) y se homogeneizó mezclando por agitación en vortex durante un tiempo aproximado de 1 minuto, procurando mantener suspendidas las hojas del fondo del tubo. La solución obtenida se incubó a 95°C durante un tiempo de 10 minutos. Se dejó enfriar a temperatura ambiente, se añadieron 100 µL de la solución de disolución (Sigma<sup>®</sup>, No. D5688) y se homogeneizó nuevamente mezclando por agitación en vortex durante 1 minuto. El tubo Eppendorf con el extracto de DNA aislado fue almacenado a temperatura de congelación a -20°C hasta su uso.

#### **4.2.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

La metodología descrita a continuación fue realizada en una campana de flujo laminar, haciendo uso de guantes de látex, empleando puntas para micropipeta estériles, en una zona de trabajo limpiada con etanol al 70% y con material limpiado con la solución anterior. La prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó empleando una mezcla de reacción de 20 µL con muestra de DNA del ecotipo de *A. thaliana* Col-0 y tres mezclas de reacción individuales de 20 µL cada una con muestras de DNA extraído de distintas plantas de *A. thaliana* de la línea mGFP. Adicionalmente, se preparó una muestra control con agua grado PCR. Para lo anterior, se preparó una solución maestra de reacción para 5 muestras, considerando la posible pérdida de solución tras cada transferencia a su posterior tubo individual de reacción (n-1). Los componentes y cantidades de la solución maestra de reacción para PCR se presentan en la Tabla 1.

**Tabla 1. Componentes de la solución maestra de reacción para PCR.** El componente Extract-N-Amp proporciona los reactivos necesarios para la extracción de DNA (ácido desoxirribonucleico) y para la amplificación de los objetivos de interés mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa) directa. La solución maestra fue preparada considerando 1 y 5

tubos individuales de reacción (Rx) de 20  $\mu$ L cada uno (n-1). La connotación cbp (cuanto baste para) refiere la cantidad necesaria de H<sub>2</sub>O grado PCR para completar el volumen final.

Componente	1 Rx ( $\mu$ L)	5 Rx ( $\mu$ L)
Extract-N-Amp PCR ReadyMix (Sigma-Aldrich <sup>®</sup> , No. E3004)	10	50
Oligonucleótido forward	1.5	7.5
Oligonucleótido reverse	1.5	7.5
Muestra DNA*	0.5	2.5
H <sub>2</sub> O grado PCR	cbp	cbp
Volumen final	20	100

*\*El volumen de DNA para cada muestra se añadió en su tubo de reacción para PCR y no en la solución maestra de reacción. El volumen propuesto para este componente fue típicamente de 1  $\mu$ L.*

De la solución maestra se efectuaron 4 extracciones de 19.5  $\mu$ L y cada una fue transferida de forma independiente a tubos de reacción para PCR de 0.2 mL. Posteriormente se adicionó a cada tubo 0.5  $\mu$ L de muestra de DNA y 0.5  $\mu$ L de agua grado PCR a un tubo (control) para llevar el volumen final a 20  $\mu$ L. Las secuencias de los oligonucleótidos usados en el presente trabajo se describen en la Tabla 2.

**Tabla 2. Secuencias de los oligonucleótidos usados en el presente trabajo.** El oligonucleótido directo corresponde a fw (forward), mientras que rv (reverse) refiere al oligonucleótido reverso. Los oligonucleótidos usados fueron obtenidos de la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

Oligonucleótido	Secuencia (5' – 3')	Concentración final ( $\mu$ M)
mtgk2 fw	acggcagcgtgcagctcgc	0.5
mtgk2 rv	ttactgtacagctcgtcca	0.5

Finalmente, los tubos con las mezclas de reacción fueron transferidos a un termociclador miniPCR® de punto final a condiciones específicas (Tabla 3), para llevar a cabo la amplificación del transgén GFP.

**Tabla 3. Condiciones experimentales empleadas para PCR.**

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo (s)	Ciclos
Desnaturalización inicial	94.0	120	30
Desnaturalización	94.0	30	
Alineación	64.0	30	
Extensión	72.0	50	
Extensión final	72.0	100	

#### 4.2.5 Electroforesis de DNA

La corrida electroforética requirió gel de agarosa y tres marcadores distintos: Mid Range DNA Ladder (100 – 3,000 pb, Jena Bioscience, No. M-203), 123 bp DNA Ladder (123 – 4,182 pb, Sigma-Aldrich®, No. D5042) y DirectLoad 50 bp DNA Step Ladder (50 – 3,000 bp, Sigma-Aldrich®, No. D3812). Para la preparación del gel se emplearon tabletas de agarosa de la marca miniPCR®. Se disolvió 1 tableta de agarosa en 40 mL de H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> y se tomaron 20 mL de la solución anterior para la preparación del gel. Los productos de PCR se corrieron en una cámara horizontal de electroforesis con amortiguador TBE 1X durante 40 minutos a 48 V en el siguiente orden: Mid Range DNA Ladder, 123 bp DNA Ladder, DirectLoad 50 bp DNA Step Ladder, muestra de H<sub>2</sub>O grado PCR (control -), muestra de *A. thaliana* ecotipo Col-0, (control +) y tres muestras distintas de *A. thaliana* de la línea mGFP. El DNA genómico se cuantificó con un equipo Biodrop®.

#### **4.2.6 Aislamiento de proteínas totales**

Para el desarrollo de esta metodología experimental fue necesario mantener la cadena de frío de las muestras de *A. thaliana*, por lo que se procuró mantener a las mismas a una temperatura inferior a 5°C, realizando un preenfriamiento del material a emplear (tubos Eppendorf y pistilos) y de la centrifugadora, además de mantener los tubos Eppendorf con las muestras en recipientes con hielo. Para el aislamiento de proteína inicialmente se cortaron 5 hojas verdaderas de *A. thaliana* y se transfirieron a un tubo Eppendorf frío de 1.5 mL. Se adicionaron 200 µL de amortiguador RIPA (Sigma-Aldrich®, No. R0278) y se trituró de forma rápida cada hoja con ayuda de un pistilo previamente enfriado en hielo, evitando el sobrecalentamiento de la muestra. La solución obtenida fue sonicada con 2 pulsos de 20 segundos cada uno. Se esperó un tiempo de incubación de 10 minutos en hielo, para posteriormente centrifugar el tubo con muestra (en una centrífuga previamente enfriada a 4°C) a 720,000 rps a una temperatura de 4°C durante 10 minutos. El sobrenadante obtenido fue transferido por decantación a un nuevo tubo Eppendorf frío de 1.5 mL. Cada tubo con muestra de proteínas totales aisladas de *A. thaliana* fue almacenado en congelación a una temperatura de -20°C.

#### **4.2.7 Western blot**

##### **4.2.7.1 Electroforesis de proteínas**

Inicialmente se realizó una electroforesis de los extractos de proteínas aisladas de *A. thaliana* mGFP empleando un gel concentrador/separador de poliacrilamida al 12%. Los componentes del gel y las cantidades de cada uno se presentan en la Tabla 4.

**Tabla 4. Componentes del gel de poliacrilamida para electroforesis de proteína.** Se describen las cantidades correspondientes para la preparación del gel separador y concentrador para electroforesis. SDS: dodecilsulfato sódico, TEMED: tetrametilendiamina, PSA: persulfato de amonio.

Componente	Separador	Concentrador
Acrilamida 30 % Bisacrilamida 0.8 %	4 mL	0.6 mL
Tris 2 M (pH 8.8)	1.86 mL	-
Tris 2 M (pH 6.8)	-	291.2 $\mu$ L
SDS 20 %	-	46.6 $\mu$ L
SDS 10 %	100 $\mu$ L	-
PSA 10 %	20 $\mu$ L	46.6 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	4 mL	3.68 mL
TEMED	10 $\mu$ L	6 $\mu$ L

La mezcla de reacción de cada muestra de proteína fue preparada de forma independiente en tubos Eppendorf previo a la inyección en los carriles del gel, ajustando las cantidades a la capacidad máxima de cada carril de 44  $\mu$ L. Los componentes de la mezcla de reacción de cada muestra se describen en la Tabla 5.

**Tabla 5. Mezcla de reacción de las muestras para electroforesis de proteína.** Las mezclas de reacción de las muestras se identifican como mGFP1 y mGFP2. El amortiguador LaemmLi 2X contiene 10% de 2-mercaptoetanol, 4% de detergente SDS (dodecilsulfato sódico), 0,004% de azul de bromofenol y 20% de glicerol, componentes necesarios para la electroforesis.

Componente	mGFP1	mGFP2
Amortiguador LaemmLi 2X (Sigma-Aldrich®, No. S3401)	11 µL	11 µL
Agua milliQ	0 µL	6.3 µL
Muestra de proteína	33 µL	26.7 µL

Las mezclas de reacción se corrieron en una cámara vertical de electroforesis con amortiguador de corrida 1X en el siguiente orden: marcador BLUeye Prestained (Sigma-Aldrich®, No. 94964), mGFP1 y mGFP2. El voltaje inicial de corrida se ajustó a 75 V hasta alcanzar el gel separador, posteriormente la corriente se aumentó a 100 V hasta concluir la corrida electroforética.

#### 4.2.7.2 Electrotransferencia a membrana de PVDF

Posterior a la electroforesis, se transfirió el material proteico del gel a una membrana PVDF activada con metanol. Lo anterior se realizó mediante una cámara de electrotransferencia horizontal empleando amortiguador de transferencia 1X enfriado con hielo, durante un tiempo aproximado de 1 hora a 40 miliA.

#### 4.2.7.3 Inmunodetección

La membrana obtenida de la electrotransferencia fue incubada con solución de bloqueo en un cuarto frío y con agitación constante durante 24 horas (condiciones de incubación). Tras realizar el bloqueo de la membrana se efectuaron tres lavados de 5 minutos cada uno con solución TBST y posteriormente se volvió a incubar la membrana bajo las mismas condiciones de incubación con 10 mL de una solución TBST con un anticuerpo primario anti-GFP (Santa Cruz Biotechnology, No. SC-9996, 1:500). Transcurrido el tiempo de incubación se lavó la membrana como se describió

anteriormente y se realizó una segunda incubación empleando 10 mL de una solución TSBT con un anticuerpo secundario de fosfatasa alcalina de ratón (1:3,000) a condiciones de incubación y una vez transcurridas 24 horas se lavó la membrana con TBST. Las membranas fueron reveladas con 1 mL de sustrato BCIP<sup>®</sup>/NBT-Purple Liquid Substrate System for Membranes (Sigma Aldrich<sup>®</sup>, No. B3679) y las bandas obtenidas se visualizaron en un transiluminador. La fosfatasa alcalina funciona como una enzima catalizadora de la hidrólisis del enlace éster fosfórico del reactivo BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato), que junto al NBT (nitro azul de tetrazolio), permite la detección colorimétrica de la actividad de la fosfatasa alcalina en aquellas bandas de proteínas unidas de forma exitosa a los anticuerpos primarios derivado a la formación de productos coloreados insolubles (Bárcena et al., 2014).

Debido a la dificultad presentada para lograr detectar las bandas inmunorreactivas correspondientes a la GFP en las muestras, se implementó un control positivo para corroborar la viabilidad de la técnica de extracción proteica y la inmunodetección, por lo que el procedimiento anteriormente descrito fue repetido empleando ahora como anticuerpo primario anti-actina de ratón (1:5,000) y como anticuerpo secundario fosfatasa alcalina de ratón (1:3,000), esto con la finalidad de identificar a la actina, proteína citosólica en forma de microfilamentos presente en células eucariotas. De esta forma se esperó obtener membranas con bandas inmunorreactivas para GFP (según el caso) y el control de carga inmunorreactiva contra actina para la misma muestra de proteínas.

## 4.2.8 Estrés químico mitocondrial en hojas de *A. thaliana* mGFP

### 4.2.8.1 Estrés mitocondrial con CaCl<sub>2</sub>

Se consideraron 3 hojas verdaderas para la evaluación del estrés mitocondrial en hojas de *A. thaliana* de la línea mGFP de 3 a 4 semanas de estratificación en maceta. El ensayo de estrés se realizó por duplicado; empleando dos plantas distintas para un mismo tratamiento. Las soluciones empleadas por hoja fueron las siguientes:

- 1) H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> (control).
- 2) CaCl<sub>2</sub> 100 μM en H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>.
- 3) CaCl<sub>2</sub> 500 μM en H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>.

Cada solución anteriormente descrita fue preparada con 10 μL de ETH 129 10 μM (Sigma-Aldrich®, No. 21193), un ionóforo de calcio que facilita su ingreso a la matriz mitocondrial. El tratamiento consistió en la aplicación de 3 μL de la solución en evaluación en el extremo superior e inferior de cada hoja evaluada (Fig. 5).



**Figura 5. Inducción de estrés mitocondrial *in vivo* en hojas de *A. thaliana* mGFP.** La aplicación de las soluciones de estrés se realizó en la zona superior e inferior de cada hoja tratada. El tiempo de exposición corresponde a 2 horas.

Luego de la aplicación de las soluciones a cada hoja, las plantas sometidas a estrés mitocondrial fueron conservadas en una cámara de crecimiento a 22°C por un tiempo total de estrés de 2 horas.

#### **4.2.8.2 Inhibición del estrés mitocondrial con CsA**

El efecto de inhibición requirió la adición previa de 3  $\mu$ L de una solución de CsA 5  $\mu$ M en el extremo superior e inferior de una de las hojas de *A. thaliana* mGFP 20 minutos antes de la inducción del estrés mitocondrial. Posteriormente se procedió de la misma forma descrita en el numeral 4.2.8.1 *Estrés mitocondrial con CaCl<sub>2</sub>*. Las soluciones empleadas por hoja fueron las siguientes:

- 1) H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> (control).
- 2) CaCl<sub>2</sub> 500  $\mu$ M en H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>.
- 3) CsA 5  $\mu$ M en H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> / CaCl<sub>2</sub> 500  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>.

Luego de la aplicación de las soluciones a cada hoja, las plantas sometidas a estrés mitocondrial fueron conservadas en una cámara de crecimiento a 22°C por un tiempo total de estrés de 2 horas.

#### **4.2.9 Revisión de la TMM en hojas de *A. thaliana* mGFP por microscopía confocal**

##### **4.2.9.1 Preparación de las muestras para observación microscópica**

Para el análisis de los efectos de los diversos tipos de estrés mitocondrial, se utilizó un protocolo desarrollado en el laboratorio con ligeras modificaciones (Flores-Herrera et al., 2021). Se colocaron las hojas de las plántulas tratadas sobre portaobjetos limpios y se realizaron pequeños cuadrados con silicón del tamaño de una hoja *A. thaliana*, a manera de formar una especie de contenedor pequeño (uno por cada hoja en evaluación). Con ayuda de una hoja de afeitar se cortaron las hojas de *A. thaliana* mGFP previamente sometidas a estrés mitocondrial y se pasaron al centro de los contenedores formados sobre los portaobjetos. Posteriormente se adicionaron 200  $\mu$ L de perfluorodecalina 95% (Sigma-Aldrich®, No. P9900), se colocó sobre cada

contenedor un cubreobjetos y se selló cada uno presionando ligeramente el cubreobjetos y aplicando barniz transparente sobre los bordes (Fig. 6). Las muestras preparadas se resguardaron en oscuridad en un contenedor cubierto con papel aluminio hasta su observación microscópica.



**Figura 6. Preparación de muestras de hojas para visualización en un microscopio confocal.** Las hojas de *A. thaliana* mGFP se encuentran inmersas en una solución de perfluorodecalina 95% para mantener su viabilidad celular y mejorar ópticamente la obtención de imágenes por microscopía confocal.

La perfluorodecalina actúa como un medio de imagen infiltrativa que mejora ópticamente las imágenes de microscopía confocal, siendo capaz de mostrar imágenes en profundidad sin necesidad de recurrir a un aumento perjudicial. Además, tiene una gran capacidad de disolución de CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub> que mantiene el intercambio gaseoso en la muestra, minimizando así el impacto fisiológico (Littlejohn y Love, 2012).

#### **4.2.9.2 Visualización microscópica de la TMM en hojas de *A. thaliana* mGFP**

Cada hoja fue observada en un microscopio confocal en el canal de fluorescencia correspondiente a la GFP a una longitud de onda de excitación de 473 nm y emisión de 527 nm a 40X. Para ello se utilizó un microscopio Olympus FV1000 disponible en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y a la Industria (USAII). Las imágenes fueron guardadas en archivos con extensión \*.oib usando el software de Olympus FV10-ASW Ver. 01.07c y se analizaron con el software FIJI.

#### **4.2.10 Evaluación de la TMM de hojas de *A. thaliana* mGFP**

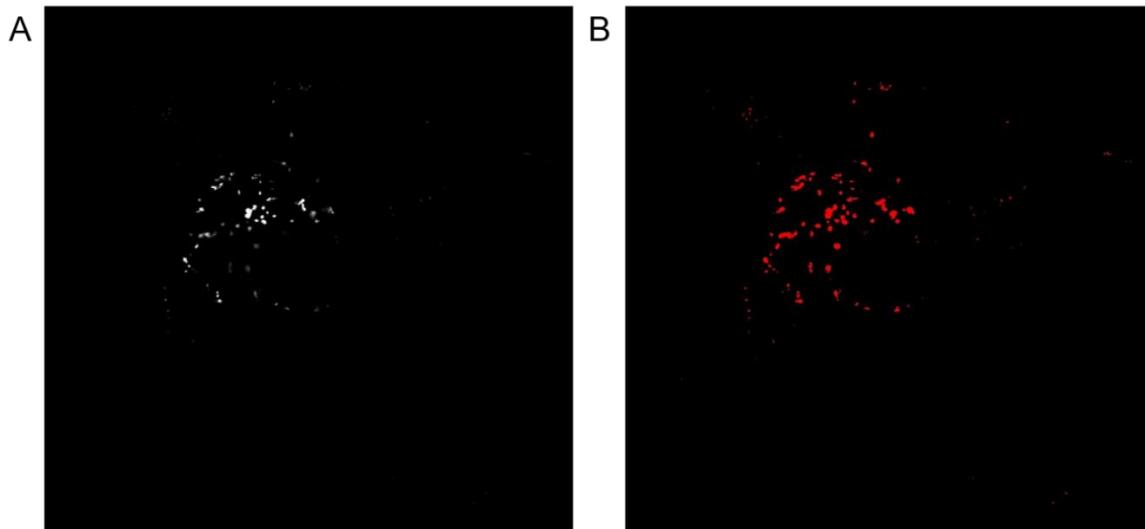
##### **4.2.10.1 Análisis cualitativo de la TMM de hojas de *A. thaliana* mGFP**

La evaluación cualitativa de la manifestación de la TMM consistió en comparar visualmente las áreas planas mitocondriales, mostradas como señales fluorescentes entre los tratamientos de estrés planteados. Como atributos visuales primordiales para su comparación se tomaron en cuenta la morfología y estructura mitocondrial y la intensidad de las señales fluorescentes observadas.

##### **4.2.10.2 Análisis cuantitativo de la TMM de hojas de *A. thaliana* mGFP**

Para evaluar la TMM en forma cuantitativa, se determinó el volumen mitocondrial directamente de cortes específicos de las micrografías con la extensión \*.oib obtenidas para cada uno de los tratamientos de estrés mitocondrial. Se decidió utilizar el complemento de análisis 3D Objects Counter, una herramienta digital del software de análisis de imágenes FIJI que permite determinar el volumen de objetos en campos de microscopía confocal siempre y cuando exista una debida calibración de cada campo micrográfico (Bolte y Cordelières, 2006). Principalmente fue necesario establecer la medición de volumen seleccionando de forma única este parámetro de medición en la sección: *Analyze > 3D OC Options*. Posteriormente, se seleccionó el corte de interés de la pila de imágenes de cada archivo que contara con la mejor visualización posible de las mitocondrias. Específicamente se seleccionaron aquellos cortes que mostraran separación y expresión clara de la GFP. Para evitar sesgos en la medición se emplearon valores de umbral generados de forma automática por el software FIJI en la sección de análisis: *Image > Adjust > Auto Threshold*. El software genera diversos valores automáticos de umbral; no obstante, fueron seleccionados

aquellos valores que mostraran la mayor cobertura de las áreas de interés evidenciadas como fluorescencia en escala de grises (Fig.7). Los valores de umbral así establecidos fueron empleados para el análisis de volumen en la ruta: *Analyze > 3D Objects Counter* para los objetos presentes en los cortes de interés. Los valores de volumen en  $\mu\text{m}^3$  determinados para cada una de las muestras fueron transferidos a una hoja de cálculo. Estos datos fueron depurados mediante un filtro de selección de valores entre  $1 - 10 \mu\text{m}^3$  para mantener las mediciones correspondientes a las mitocondrias y excluir aquellos volúmenes asociados a otros componentes celulares o señales inespecíficas. Los valores depurados se agruparon por tratamiento y se evaluó su media aritmética y su desviación estándar correspondiente a cada grupo de datos. Los datos del volumen mitocondrial fueron graficados y analizados mediante una prueba estadística t de Student, comparando los valores obtenidos en los distintos tratamientos respecto al tratamiento control, considerando un nivel de significancia (P) inferior a 0.05.



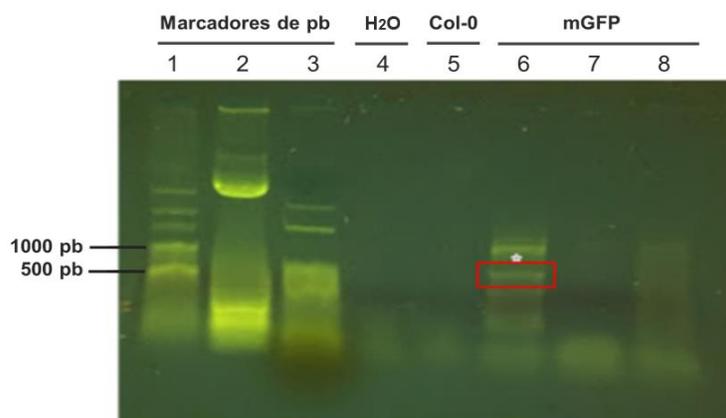
**Figura 7. Ejemplo de selección del valor de umbral para la determinación de volumen mediante FIJI.** La muestra corresponde al corte confocal de una hoja de *A. thaliana* de la

línea mGFP tratada con  $\text{CaCl}_2$  500  $\mu\text{M}$  con un tiempo total de exposición de 2 horas. (A) Las señales emitidas corresponden a la fluorescencia asociada a la GFP mitocondrial en escala de grises. (B) En color rojo se presenta la cobertura asociada al valor de umbral automático seleccionado (Huang2: 352) para la determinación del volumen mediante FIJI. El valor de umbral fue generado de forma automática por el software de análisis FIJI mediante la función *Auto Threshold*.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Genotipificación de una línea de *A. thaliana* mGFP

Los resultados obtenidos para la electroforesis permitieron detectar un producto de PCR menor a 500 pb (Fig. 8, carril 6). De acuerdo con los tres diferentes marcadores de DNA empleados (carril 1, 2 y 3), el amplicón podría estar posicionado aproximadamente entre los 200 pb, tamaño coincidente con el esperado para el transgén de la GFP para el set de oligonucleótidos diseñados. Los carriles 7 y 8 no manifiestan señales claras; sin embargo, en el carril 8 se detecta un barrido de DNA que pareciera mostrar un patrón similar al obtenido en el carril 6, en el cual posiblemente podría estar integrado el amplicón de DNA correspondiente al transgén de la GFP. No obstante, la poca claridad y visibilidad de la señal limitaron su correcta identificación. Es importante observar que los carriles para los controles de la corrida electroforética con H<sub>2</sub>O grado PCR y la línea WT de *A. thaliana* no presentan bandas o barridos de DNA.

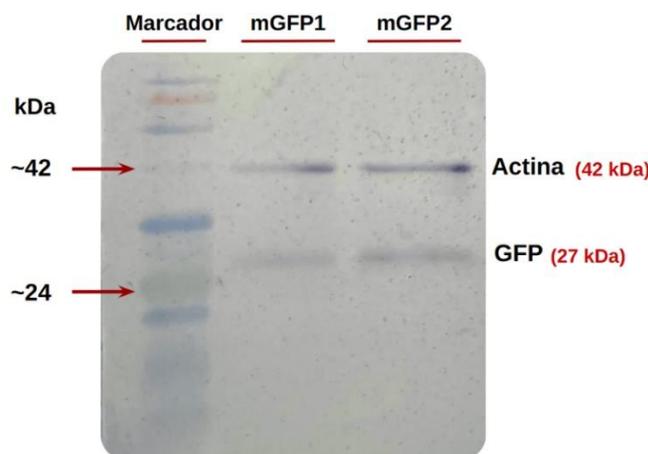


**Figura 8. Genotipificación de *Arabidopsis thaliana* mGFP.** 1,2,3) Marcadores de pb, 4) H<sub>2</sub>O grado PCR (control), 5) Control con gDNA de *A. thaliana* Col-0 (Columbia-0), 6,7 y 8) gDNA de hojas de tres plantas distintas de *A. thaliana* de la línea mGFP (proteína verde fluorescente mitocondrial). La banda bajo el asterisco (carril 6) denota el amplicón esperado

(~ 200 bp) para el transgén de la proteína verde fluorescente (GFP). La ausencia de bandas en los carriles 7 y 8 podría estar correlacionado a la expresión celular limitada de la GFP observada tras la examinación microscópica en hojas de *A. thaliana* mGFP.

## 5.2 Western blot de proteína total aislada de hojas de *A. thaliana* mGFP

Los resultados anteriormente descritos permitieron detectar el gen *gfp*. Sin embargo, es posible que este no sea expresado. Para determinar si las plantas transgénicas presentan expresión de la GFP, se decidió someter muestras de proteínas totales aisladas de hojas de la línea *A. thaliana* mGFP a inmunodetección mediante Western blot (Fig. 9). Los resultados demuestran la presencia de bandas inmunorreactivas ligeramente mayores a la banda correspondiente al marcador de pesos moleculares de 24 kDa, mientras que el peso molecular informado para la GFP corresponde a un valor aproximado de 27 kDa, lo que indica que podría tratarse de esta última. A manera de establecer un control de la técnica de extracción proteica e inmunodetección, se detectaron bandas inmunorreactivas cercanas a 42 kDa, peso molecular correspondiente al teórico para la actina.

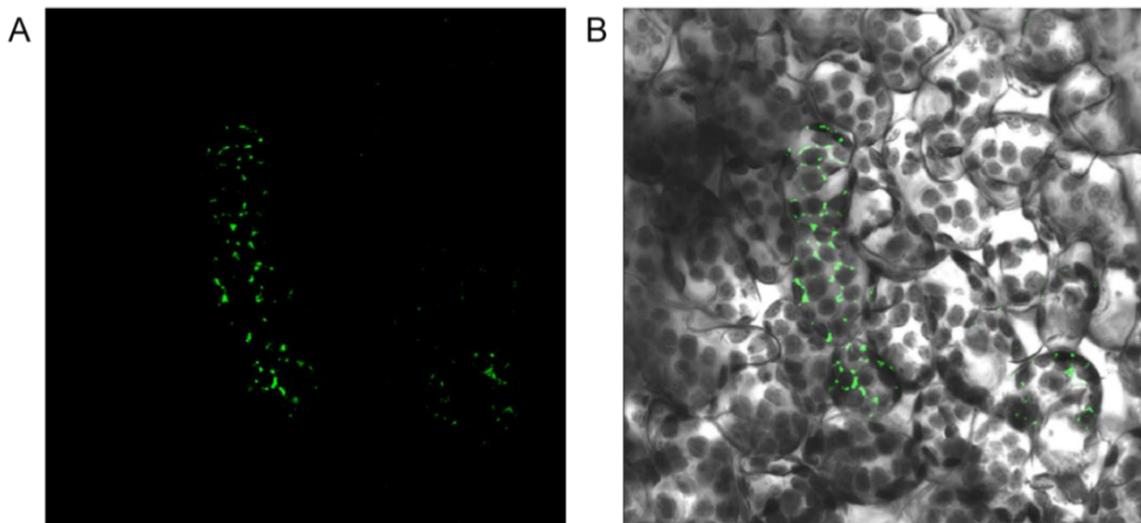


**Figura 9. Western blot de proteína total aislada de hojas de *A. thaliana* mGFP.** Membrana de Western blot de muestras de proteína total de 5 hojas de dos plantas de *A. thaliana* distintas (mGFP1 y mGFP2), ambas de la línea mGFP (proteína verde fluorescente mitocondrial). Se

emplearon anticuerpos primarios de ratón anti-actina (1:5,000) y anti-GFP (1:500) y fosfatasa alcalina de ratón (1:3,000) como anticuerpo secundario. Las bandas obtenidas corresponden a actina (~42 kDa) y GFP (proteína verde fluorescente, ~27 kDa). Experimento representativo.

### 5.3 Expresión funcional de la GFP

Se decidió someter hojas intactas de la planta mGFP a observación bajo microscopía confocal como último criterio para evaluar la correcta expresión de la GFP (Fig. 10). Las hojas de *thaliana* mGFP denotaron señales fluorescentes en el canal GFP al interior de las células vegetales, las cuales presentan características morfológicas compatibles con mitocondrias (Fig. 10). En este sentido, cada señal de fluorescencia manifestada podría correlacionar con una mitocondria. Lo anterior permite reafirmar la expresión de la GFP a nivel mitocondrial en la línea transgénica adquirida, lo que es posible gracias al péptido señal incorporado en su secuencia de DNA. Es importante mencionar que no fue posible detectar señal de fluorescencia en todas las células de cada hoja estudiada. La causa de este fenotipo “mosaico” es desconocida.



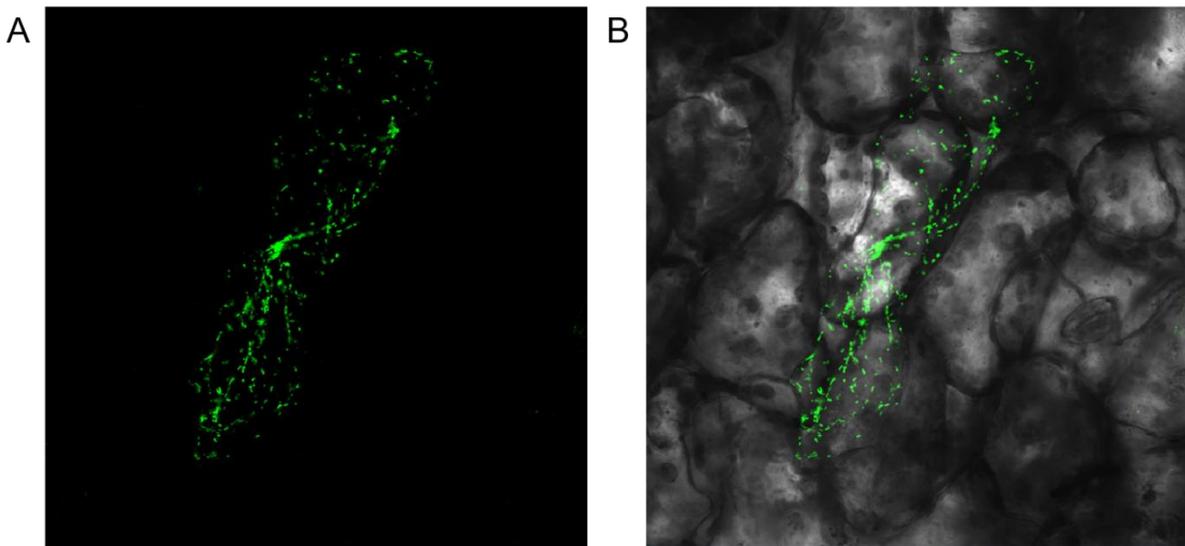
**Figura 10. Micrografía confocal de una hoja de *A. thaliana* mGFP en condiciones normales.** Imágenes obtenidas mediante un microscopio confocal de fluorescencia tras la examinación de una hoja de *A. thaliana* de la línea mGFP. (A) Señales de fluorescencia

detectadas en el canal GFP con fondo oscuro, probablemente correspondientes a mitocondrias. (B) Superposición del campo claro con el canal GFP manifestando las señales de fluorescencia de la proteína verde fluorescente (posiblemente correspondientes a mitocondrias) y los cloroplastos de las células vegetales. Se observa un fenotipo “mosaico”, donde las señales de fluorescencia son manifestadas únicamente en ciertas células  $n > 4$ .

## 5.4 Evaluación cualitativa de la TMM de hojas de *A. thaliana* mGFP

### 5.4.1 Efecto de los iones $\text{Ca}^{2+}$ en el hinchamiento mitocondrial

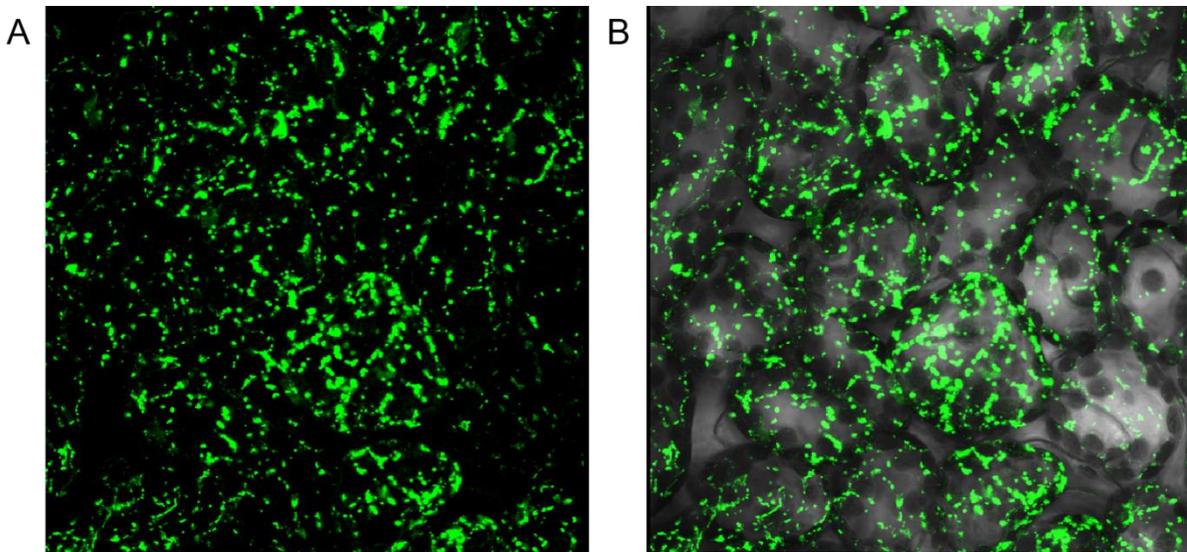
Al cabo de 2 horas, las hojas control de *A. thaliana* mGFP tratadas con  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$  mostraron señales de fluorescencia móviles de baja intensidad en el canal GFP al interior de las células vegetales. Las señales obtenidas manifiestan características estructurales similares a las mitocondriales con formas pequeñas, estrechas y alargadas, además de presentar movimiento intracelular, correlacionando cada una de las señales de fluorescencia con mitocondrias (Fig. 11).



**Figura 11. Micrografía confocal de una hoja de *A. thaliana* mGFP tratada con  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ .** Imágenes obtenidas mediante un microscopio confocal de fluorescencia tras la examinación de una hoja de *A. thaliana* de la línea mGFP tratada con  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$  y ETH 129  $10 \mu\text{M}$  (control). El

tiempo de exposición corresponde a 2 horas. (A) Enfoque de un campo en el canal GFP con fondo oscuro con manifestación de pequeñas señales fluorescentes con formas estrechas y alargadas, posiblemente correspondientes a mitocondrias. (B) Mismo enfoque de campo anterior con la superposición del canal GFP en un campo claro. Imagen representativa n>4.

Las mitocondrias de las hojas de *A. thaliana* mGFP tratadas con  $\text{CaCl}_2$  500  $\mu\text{M}$  (en presencia de ETH 129, ionóforo de  $\text{Ca}^{2+}$ ) manifestaron señales fluorescentes de mayor área superficial aparente en el canal GFP después de 2 horas (Fig. 12), presentando un aumento de sus áreas planas respecto al control tratado sólo con  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$  (Fig. 11). Además, a diferencia de este último, las señales fluorescentes del tratamiento con  $\text{CaCl}_2$  presentan en su mayoría una forma esférica. Dicho aumento podría correlacionar al hinchamiento mitocondrial propiciado por los iones  $\text{Ca}^{2+}$  y a la manifestación directa de la TMM.

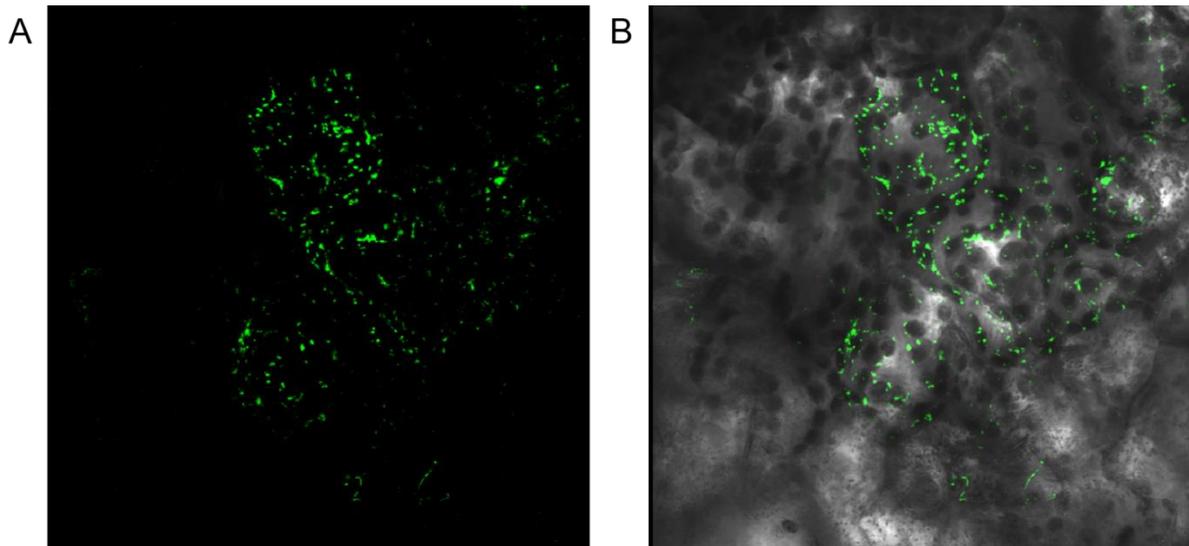


**Figura 12. Micrografía confocal de una hoja de *A. thaliana* mGFP estresada con  $\text{CaCl}_2$ .** Imágenes obtenidas mediante un microscopio confocal de fluorescencia tras la examinación de una hoja de *A. thaliana* de la línea mGFP tratada con  $\text{CaCl}_2$  500  $\mu\text{M}$  y ETH 129 10  $\mu\text{M}$  (2 horas). (A) Enfoque de un campo en el canal GFP con fondo oscuro con manifestación de

señales fluorescentes con formas esféricas en su mayoría, posiblemente correspondientes a mitocondrias. (B) Mismo enfoque de campo anterior con la superposición del canal GFP en un campo claro. Imagen representativa n>4.

#### 5.4.2 Efectos cualitativos de la CsA en el hinchamiento mitocondrial mediado por iones $\text{Ca}^{2+}$

Previo al estrés mitocondrial generado con  $\text{CaCl}_2$ , se decidió pretratar a las hojas con el inhibidor del PTP mitocondrial de mamíferos CsA 5  $\mu\text{M}$ . Bajo estas condiciones, la CsA pareciera mitigar de forma parcial el efecto generado por los iones  $\text{Ca}^{2+}$ , ya que las señales asociadas a las mitocondrias exhiben un probable aumento localizado en algunas áreas planas mitocondriales respecto al control tratado únicamente con  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$  (Fig. 13).

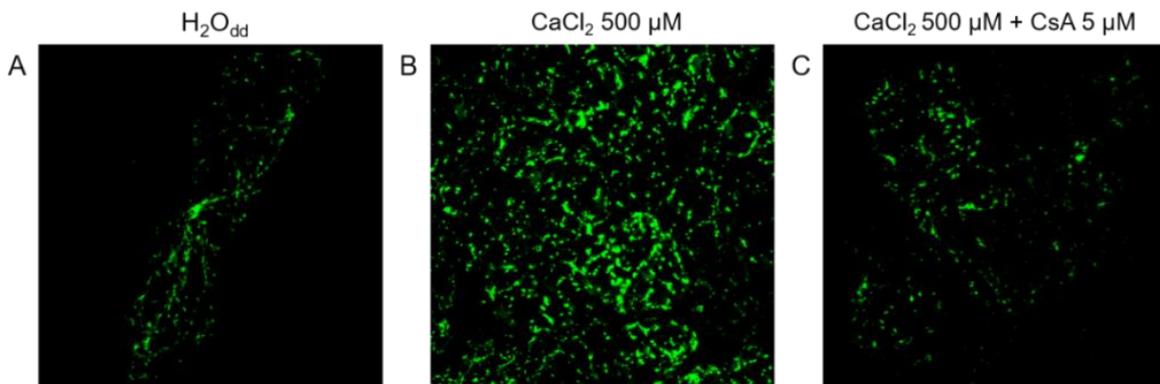


**Figura 13. Micrografía confocal de una hoja de *A. thaliana* mGFP tratada con CsA y  $\text{CaCl}_2$ .** Imágenes obtenidas mediante un microscopio confocal de fluorescencia tras la examinación de una hoja de *A. thaliana* de la línea mGFP tratada previamente con CsA 5  $\mu\text{M}$  (20 minutos) y posteriormente con  $\text{CaCl}_2$  500  $\mu\text{M}$  y ETH 129 10  $\mu\text{M}$  (2 horas). (A) Enfoque de un campo en el canal GFP con fondo oscuro con manifestación de pequeñas señales

fluorescentes aparentemente esféricas, posiblemente correspondientes a mitocondrias. (B) Mismo enfoque de campo anterior con la superposición del canal GFP en un campo claro. Imagen representativa n>4.

### 5.4.3 Análisis cualitativo de la TMM de hojas de *A. thaliana* mGFP

El tratamiento con estrés por sobrecarga de  $\text{CaCl}_2$ , manifiesta un aumento en las áreas planas respecto al control con  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ . Esto debido a que no sólo se observan señales con mayor intensidad fluorescente aparente, sino que en contraste con la estructura mitocondrial alargada y estrecha del tratamiento control, la exposición con  $\text{CaCl}_2$  presenta señales que se asemejan más a una estructura esférica en su mayoría (Fig. 14). Por otro lado, la micrografía mostrada tras la adición de CsA, muestra señales esféricas de menor intensidad fluorescente y área de superficie aparente respecto a las tratadas con  $\text{CaCl}_2$ ; no obstante, a su vez muestran un aumento localizado en algunas áreas planas mitocondriales respecto al control tratado únicamente con  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ , por lo que la CsA pareciera mitigar de forma parcial el efecto generado por los iones  $\text{Ca}^{2+}$ .



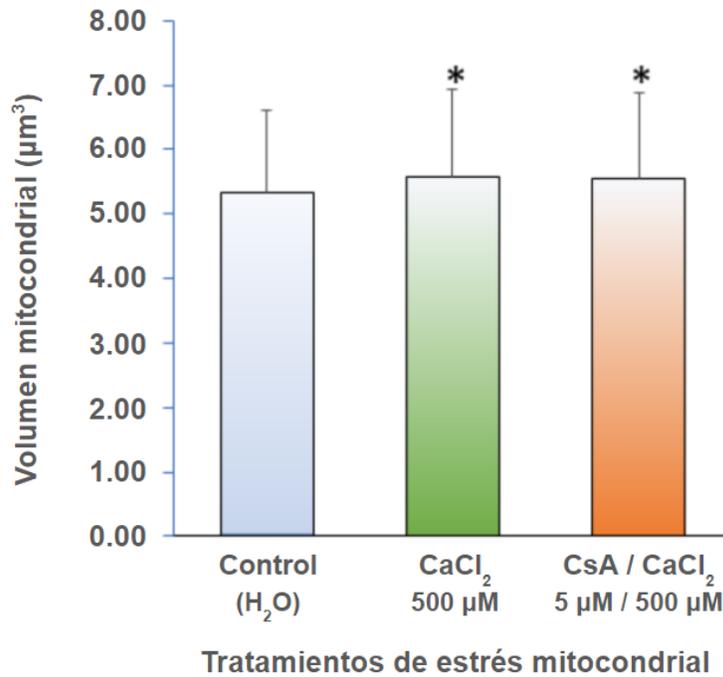
**Figura 14. Comparación cualitativa del volumen mitocondrial de hojas de *A. thaliana* mGFP sometidas a distintos tratamientos de estrés.** Imágenes obtenidas mediante un microscopio confocal de fluorescencia tras la examinación de hojas de distintas plantas de *A. thaliana* de la línea mGFP expuestas a distintos tratamientos: (A)  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$  con ETH 129 10  $\mu\text{M}$

(control), (B)  $\text{CaCl}_2$  500  $\mu\text{M}$  con ETH 129 10  $\mu\text{M}$ , (C) CsA 5  $\mu\text{M}$  (20 minutos) y  $\text{CaCl}_2$  500  $\mu\text{M}$  con ETH 129 10  $\mu\text{M}$ . El tiempo de exposición a cada tratamiento (excepto con CsA) corresponde a un tiempo de 2 horas. El tratamiento B manifiesta la mayor cantidad de señales fluorescentes con forma esférica y de gran área aparente respecto al C y A.

Para evitar posibles sesgos de la comparativa visual del tamaño mitocondrial entre los distintos tratamientos para la evaluación de la TMM, se recurrió a la evaluación cuantitativa del volumen mitocondrial. Esto fue posible debido a que el microscopio confocal cuenta con opciones de calibración, las cuales fueron activadas antes de cada observación.

#### **5.4.4 Análisis cuantitativo de la TMM de hojas de *A. thaliana* mGFP**

El valor promedio obtenido para las muestras del tratamiento control con  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$  corresponde a  $5.33 \pm 1.28 \mu\text{m}^3$ , el cual representa el volumen de las mitocondrias de las plantas evaluadas en condiciones normales. El tratamiento de las hojas con  $\text{CaCl}_2$  500  $\mu\text{M}$  mostró un ligero aumento en el promedio del volumen mitocondrial respecto al control, siendo este de  $5.59 \pm 1.35 \mu\text{m}^3$ . El análisis estadístico (t de Student) evidenció una diferencia significativa entre los valores de volumen obtenidos para el tratamiento con  $\text{CaCl}_2$  500  $\mu\text{M}$  respecto al control ( $P < 0.05$ ) (Fig. 15). En cuanto al volumen promedio del tratamiento con CsA 5  $\mu\text{M}$ , su valor de  $5.55 \pm 1.32 \mu\text{m}^3$  muestra ser mayor al obtenido para el tratamiento control con  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ , pero inferior al asociado al tratamiento con  $\text{CaCl}_2$ . El promedio del volumen mitocondrial para el tratamiento con CsA 5  $\mu\text{M}$  también fue significativamente diferente al obtenido para el tratamiento con  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$  ( $P < 0.05$ ).



**Figura 15. Evaluación cuantitativa del volumen mitocondrial de plantas mGFP para los tratamientos con CaCl<sub>2</sub> y CsA/CaCl<sub>2</sub>.** Las barras representan el volumen promedio mitocondrial de hojas de *A. thaliana* mGFP con diferentes tratamientos de estrés (tiempo de exposición de 2 horas). H<sub>2</sub>O: agua destilada, CaCl<sub>2</sub>: cloruro de calcio, CsA: ciclosporina A. Los volúmenes mitocondriales se obtuvieron de imágenes de micrografía confocal a través del software FIJI. Las líneas sobre las barras corresponden a la desviación estándar asociada a cada media aritmética. Los valores de volumen fueron analizados con una prueba estadística t de Student. Los asteriscos (\*) denotan la existencia de un aumento significativo de los valores obtenidos respecto al control (P<0.05) con n=3. Las medias muestran ser mínimamente superiores al control; no obstante, esto podría estar asociado a la gran cantidad de valores de volumen mitocondrial analizados (aprox. 500 a 1,000).

## 6. DISCUSIÓN

En el presente trabajo de tesis, fue posible detectar un amplicón en uno de los carriles (carril 6) con muestra de la línea mGFP con un par de oligonucleótidos diseñados específicamente (Fig. 8). Por otro lado, en el carril con H<sub>2</sub>O destilada y con DNA de *A. thaliana* WT no fue posible detectar DNA amplificado. Los resultados permiten detectar una secuencia correspondiente a la GFP en los extractos de DNA total de la línea transgénica adquirida. Es importante observar que en los carriles 7 y 8 no se observaron bandas definidas para el transgén de la GFP, lo cual resulta bastante interesante ya que el DNA de las muestras corresponden a distintas plantas de *A. thaliana* mGFP del mismo germoplasma adquirido; sin embargo, únicamente fue posible la detección en una de las tres muestras corridas. Se desconoce el motivo que podría ocasionar lo mencionado, pero se piensa que quizá las semillas que no dieron positivo para GFP contaran con otro germoplasma diferente. También es importante mencionar que el empleo de un set de oligonucleótidos para otra secuencia de la GFP posiblemente podría mejorar los resultados obtenidos.

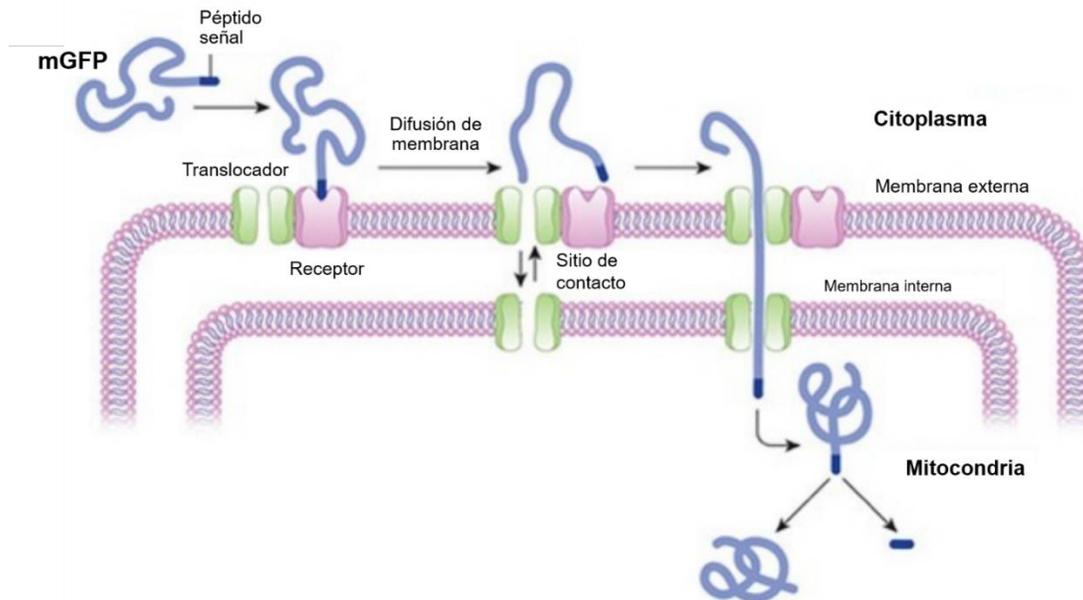
La separación por pesos moleculares e identificación inmunológica del pool de proteínas, mediante la unión específica y covalente de los anticuerpos primarios anti-actina y anti-GFP, y un anticuerpo secundario anti-ratón marcado con fosfatasa alcalina (Fig. 9), resultó en la detección de bandas correspondientes a los pesos moleculares de la actina (~42 kDa) y de la GFP (~27 kDa). En plantas, la actina constituye una de las proteínas celulares más abundantes, pues esta proteína se encuentra formando filamentos que dan estructura al citoesqueleto en células vegetales. Por otro lado, los filamentos de actina adquieren relevancia ya que son

responsables de la mayor parte del movimiento intracelular (Megías et al., 2019). Es por ello por lo que la propuesta en la identificación inmunoquímica de esta proteína forma parte de un control en la identificación inmunoquímica. Es importante destacar que la técnica de Western blot ha sido consolidada para la inmunodetección de proteínas post-electroforesis, las cuales pueden expresarse en alta o baja medida; no obstante, durante el desarrollo de esta metodología se presentaron dificultades para lograr evidenciar las bandas correspondientes a la GFP, de modo que fueron probadas distintas condiciones experimentales modificando la metodología de extracción proteica, la cantidad de muestra cargada en los carriles de la electroforesis, el empleo de distintos anticuerpos y diluciones de los mismos e intentando revelar las bandas con anticuerpos secundarios acoplados a la peroxidasa de rábano picante. A pesar de que no fue posible determinar una sola variable asociada al problema en su identificación, se cree que estas complicaciones podrían estar asociadas a la técnica de extracción empleada, ya que el proceso de sonicación de las muestras presentó mejoras en los resultados. Así mismo, las bandas coloreadas correspondientes a la GFP manifiestan una tonalidad reducida comparadas con las obtenidas para la actina, como si se tratase de una baja expresión proteica. Lo anterior podría ser corroborado realizando ensayos de inmunodetección empleando diferentes métodos de extracción proteica para el germoplasma adquirido.

Por otro lado, la examinación de las hojas de la *A. thaliana* mGFP mediante microscopía confocal demostró la expresión de la GFP en las mismas (Fig. 10). A través de la técnica experimental implementada se logró detectar la presencia de esta proteína en ciertas células vegetales de la planta transgénica, evidenciada como señales de fluorescencia. La información obtenida del *Arabidopsis Resource TAIR*

detalla que la línea adquirida expresa la GFP a nivel mitocondrial. Las señales fluorescentes de las imágenes obtenidas en el presente trabajo podrían ser perfectamente correlacionadas con los atributos físicos de una mitocondria pues, aunque estas se aprecian con distintas conformaciones morfológicas, la gran mayoría presenta una estructura similar, principalmente como pequeños objetos bien delimitados de aproximadamente 0.5  $\mu\text{m}$  de diámetro, redondos y en un gran número de copias en determinadas células. Si bien no todas las señales coinciden con estas características, Scott y Logan (2008) especularon que la variación en su morfología puede ser resultado de la fusión y fisión de estos orgánulos, mostrando así señales mitocondriales de pocos micrómetros de largo, estructuras en forma de gusano o como cuentas en un hilo (Scott y Logan, 2008; Nelson et al., 2007; Logan, 2006). Además, en casos raros, se pueden observar extensiones tubulares delgadas llamadas “matrices” (Nelson et al., 2007). La correspondencia de estos atributos con las características de las mitocondrias no solo permite corroborar la expresión proteica de la GFP en la línea transgénica de *A. thaliana* mGFP, sino que además esta podría estar siendo dirigida de forma específica hacia el interior de las mitocondrias vegetales. La localización subcelular de la GFP en las mitocondrias es teóricamente posible debido a que en el extremo 5' de su secuencia contiene incorporados los codones codificantes para los primeros 29 aa de la subunidad IV del citocromo C oxidasa de *S. cerevisiae* (ScCOX4). Esta secuencia es corta, y experimentalmente definida como un eficiente péptido señal para el direccionamiento mitocondrial de proteínas, permitiendo así el marcaje subcelular sin la introducción de actividades enzimáticas nuevas que alteren el comportamiento celular (Nelson et al., 2007). De esta forma, tras la codificación de la proteína, la señal fusionada dirige a la proteína

quimérica a los compartimentos mitocondriales blanco (Fig. 16) que, al ser irradiadas con una luz fluorescente a 488 nm, emiten señales que denotan la morfología de la mitocondria al interior de cada célula.



**Figura 16. Direccionamiento mitocondrial de la GFP mediada por un péptido señal.**

Propuesta del posible mecanismo de direccionamiento de la proteína verde fluorescente (GFP) hacia el interior de la mitocondria mediado por la inserción de un péptido señal en su extremo 5'. Imagen ilustrativa, modificada de Nature Education, 2014.

No se descarta la posibilidad de que la sobreexpresión de la proteína marcadora altere diversas funciones en las mitocondrias, aunque tras la germinación de estas semillas no se observaron efectos evidentes en el crecimiento y desarrollo de las plantas después de varias generaciones (Nelson et al., 2007). Sin embargo, resulta interesante el fenotipo “mosaico” en la expresión de la GFP manifestada en la mayoría de las hojas evaluadas, pues inicialmente se esperaba que esta fuera expresada en la mayor parte de las células vegetales y no solo en algunas de ellas. Además, se evidenció de forma clara una variación en la cantidad de células con expresión de la

GFP por hoja evaluada (Fig. 10-13), incluso descubriendo células de hojas de *A. thaliana* mGFP con expresión nula de esta proteína. Estos hallazgos podrían dar explicación a las complicaciones surgidas para la identificación proteica de la GFP y del transgén codificante de esta proteína del Western blot y de la genotipificación, respectivamente.

En cuanto a la evaluación de la TMM en plantas, la exposición de hojas de la *A. thaliana* transgénica con  $\text{CaCl}_2$  resultó en un aumento en el área plana de las mitocondrias individuales observada como un fenómeno de hinchamiento. La evaluación estadística demuestra que este aumento del volumen mitocondrial es significativo, por lo que es posible que este fenómeno sea la manifestación directa de la TMM en las plantas estudiadas. Reportes previos en mitocondrias de mamíferos han evidenciado cambios en su morfología observados como hinchazón de la matriz mitocondrial, los cuales se presentan durante el inicio de un aumento en su permeabilidad selectiva iones calcio, el cual es propiciado tras la activación del PTP (Scott y Logan, 2008). Por la similitud de la respuesta mitocondrial al exponer hojas a  $\text{CaCl}_2$ , es probable que la manifestación de la TMM aquí mostrada demuestre la presencia de un componente mitocondrial presente en plantas análogo al PTP de mamíferos con una respuesta similar a  $\text{Ca}^{2+}$ . En contraste, aunque la diferencia significativa de los volúmenes obtenidos respecto al control para la CsA demuestra la manifestación de la TMM inducida posiblemente por el  $\text{CaCl}_2$ , fue posible observar que la media aritmética de este tratamiento comparada con el obtenido con la exposición a  $\text{CaCl}_2$  fue menor, lo que pudiera ser una respuesta a la CsA y su efecto inhibitor. Esto podría disminuir la TMM manifestada como respuesta al estrés mitocondrial inducido por  $\text{CaCl}_2$ , efecto que correlacionaría bastante bien con lo

reportado por Scott y Logan en sus experimentos (2008), ya que la CsA actúa como un inhibidor del PTP al unirse a CypD, componente esencial para propiciar la conformación y sensibilización del poro (Armstrong, 2006; Pezoa, 2012). Por otro lado, se ha demostrado que la participación de la CypD ayuda a la sensibilización del PTP reduciendo el umbral de  $\text{Ca}^{2+}$  necesario para su apertura, por lo que este componente no previene totalmente su apertura (Pezoa, 2012, Carrer et al., 2021). Esto podría explicar el hecho de que los resultados obtenidos no evidenciaran una diferencia significativa entre los volúmenes registrados en los tratamientos con  $\text{CaCl}_2$  y CsA.

Finalmente, los efectos reportados en la literatura propiciados por  $\text{CaCl}_2$  en la respuesta mitocondrial y en el PTP de mamíferos correlacionan con los efectos observados en el presente trabajo, por lo que es posible inferir la existencia de un componente análogo al PTP de mamíferos en mitocondrias de *A. thaliana* el cual es capaz de responder a este modulador. En cuanto a la CsA, los resultados aquí mostrados no evidenciaron un claro efecto inhibidor de la TMM como se ha observado en la respuesta del PTP de mamíferos; no obstante, no se descarta la posibilidad de que participe en los procesos de la TMM de plantas.

## 7. CONCLUSIONES

- ❖ Se desarrolló un método cuantitativo para la evaluación del volumen mitocondrial y la TMM de hojas de *A. thaliana* mGFP.
- ❖ En *A. thaliana* mGFP, la adición de  $\text{CaCl}_2$  induce la TMM en hojas intactas.
- ❖ La adición de CsA no ocasiona un efecto inhibitor de la TMM *in vivo* en hojas de la *A. thaliana* mGFP tratadas con  $\text{Ca}^{2+}$ .
- ❖ La TMM de hojas de *A. thaliana* mGFP podría estar relacionada a la respuesta de un componente mitocondrial análogo al PTP de mamíferos.
- ❖ Es posible la existencia de un PTP en plantas análogo al de mamíferos, el cual correlaciona con la TMM.

## 8. PERSPECTIVAS

- ❖ Demostrar el efecto que tienen otros moduladores clásicos del PTP de mamíferos en mitocondrias de plantas.
- ❖ Evaluar el efecto desencadenado por distintas condiciones de estrés abiótico sobre las mitocondrias vegetales.
- ❖ Determinar el cambio en la morfología mitocondrial en células vegetales mutantes de *A. thaliana* carentes de probables componentes del PTP.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

- Arabidopsis Genome Initiative (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 408(6814), 796-815. <https://doi.org/10.1038/35048692>
- Arimura, S. I. (2018). Fission and fusion of plant mitochondria, and genome maintenance. *Plant physiology*, 176(1), 152-161. <https://doi.org/10.1104/pp.17.01025>
- Armstrong, J. S. (2006). Mitochondrial membrane permeabilization: the sine qua non for cell death. *Bioessays*, 28(3), 253-260. <https://doi.org/10.1002/bies.20370>
- Azzolin, L., von Stockum, S., Basso, E., Petronilli, V., Forte, M. A., y Bernardi, P. (2010). The mitochondrial permeability transition from yeast to mammals. *FEBS letters*, 584(12), 2504–2509. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.04.023>
- Baines, C. P., Kaiser, R. A., Purcell, N. H., Blair, N. S., Osinska, H., Hambleton, M. A., Brunskill E. W., Sayen M. R., Gottlieb R. A., Dorn G. W., Robbins J., y Molkentin, J. D. (2005). Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. *Nature*, 434(7033), 658-662. <https://doi.org/10.1038/nature03434>
- Bárcena, J., García, C., Padilla, C., Martínez, E., y Díez, J. (2014). Caracterización cinética de la fosfatasa alcalina. *Revista UCO Bioquímica y Biología molecular*.
- Barreto, P., Koltun, A., Nonato, J., Yassitepe, J., Maia, I. D. G., y Arruda, P. (2022). Metabolism and signaling of plant mitochondria in adaptation to environmental stresses. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(19), 11176. doi: [10.3390/ijms231911176](https://doi.org/10.3390/ijms231911176)
- Bernardi, P. (1999). Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition. *Physiological reviews*, 79(4), 1127-1155. <https://doi.org/10.1152/physrev.1999.79.4.1127>

- Bernardi, P., Gerle, C., Halestrap, A. P., Jonas, E. A., Karch, J., Mnatsakanyan, N., Pavlov, E., Sheu, S., y Soukas, A. A. (2023). Identity, structure, and function of the mitochondrial permeability transition pore: controversies, consensus, recent advances, and future directions. *Cell Death y Differentiation*, 30(8), 1869-1885. <https://doi.org/10.1038/s41418-023-01187-0>
- Bertholet, A. M., Natale, A. M., Bisignano, P., Suzuki, J., Fedorenko, A., Hamilton, J., ... y Kirichok, Y. (2022). Mitochondrial uncouplers induce proton leak by activating AAC and UCP1. *Nature*, 606(7912), 180-187. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04747-5>
- Bolte, S., y Cordelières, F. P. (2006). A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *Journal of microscopy*, 224(3), 213-232. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.2006.01706.x>
- Cano-Estrada, A., y González-Halphen, D. (2011). F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP Sintasa y sus diferencias estructurales. *Revista de Educación Bioquímica*, 30(3), 98-108.
- Carraro, M., Jones, K., Sartori, G., Schiavone, M., Antonucci, S., Kucharczyk, R., ... y Bernardi, P. (2020). The unique cysteine of F-ATP synthase OSCP subunit participates in modulation of the permeability transition pore. *Cell Reports*, 32(9). <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108095>
- Carrer, A., Laquatra, C., Tommasin, L., y Carraro, M. (2021). Modulation and pharmacology of the mitochondrial permeability transition: a journey from F-ATP synthase to ANT. *Molecules*, 26(21), 6463. <https://doi.org/10.3390/molecules26216463>
- Carroll, J., He, J., Ding, S., Fearnley, I. M., y Walker, J. E. (2019). Persistence of the permeability transition pore in human mitochondria devoid of an assembled ATP synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(26), 12816-12821. <https://doi.org/10.1073/pnas.1904005116>
- Chalfie, M. (2009). GFP: Lighting up life. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(25), 10073-10080. <https://doi.org/10.1073/pnas.0904061106>

- Chappell, J. B., y Crofts, A. R. (1965). Calcium ion accumulation and volume changes of isolated liver mitochondria. Calcium ion-induced swelling. *Biochemical Journal*, 95(2), 378. <https://doi.org/10.1042/bj0950378>
- Chua, N. H., Koncz, C., y Schell, J. (Eds.). (1992). *Methods in Arabidopsis research*. World Scientific Publishing Company.
- D'Angelo, D., Reane, D. V., y Raffaello, A. (2023). Neither too much nor too little: mitochondrial calcium concentration as a balance between physiological and pathological conditions. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 10, 1336416. <https://doi.org/10.3389%2Ffmolb.2023.1336416>
- Dhanao, P. K., Sinclair, A. M., Mullen, R. T., y Mathur, J. (2006). Illuminating subcellular structures and dynamics in plants: a fluorescent protein toolbox. *Botany*, 84(4), 515-522. <https://doi.org/10.1139/b06-060>
- Dickman, M., Williams, B., Li, Y., de Figueiredo, P., y Wolpert, T. (2017). Reassessing apoptosis in plants. *Nature plants*, 3(10), 773-779. <https://doi.org/10.1038/s41477-017-0020-x>
- Domínguez-Ramírez, L. y Gómez-Puyou, M. (2005). La F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATP sintasa: un complejo proteico con gran versatilidad estructural y funcional. *TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas*, 8(1), 18-27. Disponible en: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1405-888X2005000100018&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-888X2005000100018&lng=es&tlng=es)
- Embley, T. M., y Martin, W. (2006). Eukaryotic evolution, changes and challenges. *Nature*, 440(7084), 623-630. <https://doi.org/10.1038/nature04546>
- Eubel, H., Heinemeyer, J., Sunderhaus, S., y Braun, H. P. (2004). Respiratory chain supercomplexes in plant mitochondria. *Plant Physiology and Biochemistry*, 42(12), 937-942. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2004.09.010>
- Falagán, A. A., Cadet, G. V., Guerra, O. R., y Delgado, E. Y. R. (2012). Bases moleculares de las enfermedades mitocondriales. *Medisan*, 16(05). Disponible

en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1029-30192012000500016&lng=es&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1029-30192012000500016&lng=es&tlng=es)

Fernández, C. I. (2009). Participación del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (mPTP) en preconditionamiento por taquicardia. Disponible en: <https://repositorio.uchile.cl/handle/2250/111640>

Flores-Herrera, C., Gutiérrez-Mireles, E. R., y Gutiérrez-Aguilar, M. (2021). Leaf mesophyll mitochondrial polarization assessment in *Arabidopsis thaliana*. *Methods and Protocols*, 4(4), 84. <https://doi.org/10.3390/mps4040084>

Fournier, N., Ducet, G., y Crevat, A. (1987). Action of cyclosporine on mitochondrial calcium fluxes. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 19, 297-303. <https://doi.org/10.1007/BF00762419>

Franco, A. Y., y Longart, M. (2009). Aplicaciones de la proteína verde fluorescente (GFP) en la biología celular y en la visualización del sistema nervioso. *RET. Revista de estudios transdisciplinarios*, 1(2), 84-96.

Frey, T. G., y Mannella, C. A. (2000). The internal structure of mitochondria. *Trends in biochemical sciences*, 25(7), 319-324. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(00\)01609-1](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(00)01609-1)

Fuente, C. E., y Álvarez, C. A. (2022). Mitocondrias en el cerebro y sus alteraciones en la Enfermedad de Alzheimer. *Educación química*, 33(2), 18-36. <https://doi.org/10.22201/fq.18708404e.2022.2.80086>

Gao, W., Pu, Y., Luo, K. Q., y Chang, D. C. (2001). Temporal relationship between cytochrome c release and mitochondrial swelling during UV-induced apoptosis in living HeLa cells. *Journal of cell science*, 114(15), 2855-2862. <https://doi.org/10.1242/jcs.114.15.2855>

Gutiérrez-Aguilar, M. (2020). Mitochondrial calcium transport and permeability transition as rational targets for plant protection. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1861(12), 148288. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2020.148288>

- Gutiérrez-Aguilar, M., y Baines, C. P. (2015). Structural mechanisms of cyclophilin D-dependent control of the mitochondrial permeability transition pore. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1850(10), 2041-2047. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.11.009>
- Gutiérrez-Aguilar, M., y de la Peña, N. C. (2013). La levadura del pan como modelo para el estudio del poro de transición de la permeabilidad mitocondrial. *REB. Revista de Educación Bioquímica*, 32(3), 91-96. Disponible en: [https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttextpid=S1665-19952013000300002](https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttextpid=S1665-19952013000300002)
- Gutiérrez-Aguilar, M., Douglas, D. L., Gibson, A. K., Domeier, T. L., Molkentin, J. D., y Baines, C. P. (2014). Genetic manipulation of the cardiac mitochondrial phosphate carrier does not affect permeability transition. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 72, 316-325. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2014.04.008>
- Halestrap, A. P. (2009). What is the mitochondrial permeability transition pore?. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 46(6), 821-831. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2009.02.021>
- Hunter, D. R., y Haworth, R. A. (1979). The Ca<sup>2+</sup>-induced membrane transition in mitochondria: I. The protective mechanisms. *Archives of biochemistry and biophysics*, 195(2), 453-459. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(79\)90371-0](https://doi.org/10.1016/0003-9861(79)90371-0)
- Jacoby, R. P., Li, L., Huang, S., Pong Lee, C., Millar, A. H., y Taylor, N. L. (2012). Mitochondrial composition, function and stress response in plants F. *Journal of integrative plant biology*, 54(11), 887-906. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2012.01177.x>
- Karch, J., Bround, M. J., Khalil, H., Sargent, M. A., Latchman, N., Terada, N., Peixoto P. M., y Molkentin, J. D. (2019). Inhibition of mitochondrial permeability transition by deletion of the ANT family and CypD. *Science advances*, 5(8), eaaw4597. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aaw4597>

- Köhler, R. H., Zipfel, W. R., Webb, W. W., y Hanson, M. R. (1997). The green fluorescent protein as a marker to visualize plant mitochondria in vivo. *The plant journal*, 11(3), 613-621. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.1997.11030613.x>
- Leung, A. W., y Halestrap, A. P. (2008). Recent progress in elucidating the molecular mechanism of the mitochondrial permeability transition pore. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1777(7-8), 946-952. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2008.03.009>
- Leung, A. W., Varanyuwatana, P., y Halestrap, A. P. (2008). The mitochondrial phosphate carrier interacts with cyclophilin D and may play a key role in the permeability transition. *Journal of Biological Chemistry*, 283(39), 26312-26323. <https://doi.org/10.1074/jbc.M805235200>
- Lima, R. P. M., Oliveira, J. S., do Nascimento, L. C., Labate, M. T. V., Labate, C. A., Barreto, P., y de Godoy Maia, I. (2024). High-throughput analysis reveals disturbances throughout the cell caused by Arabidopsis UCP1 and UCP3 double knockdown. *Plant Physiology and Biochemistry*, 207, 108324. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2023.108324>
- Littlejohn, G. R., y Love, J. (2012). A simple method for imaging Arabidopsis leaves using perfluorodecalin as an infiltrative imaging medium. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (59), e3394. <https://dx.doi.org/10.3791/3394>
- Logan, D. C. (2010). Mitochondrial fusion, division and positioning in plants. *Biochemical Society Transactions*, 38(3), 789-795. <https://doi.org/10.1042/BST0380789>
- Logan, D. C. (2006). Plant mitochondrial dynamics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1763(5-6), 430-441. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.01.003>
- Lopategui, L., y Herrera, A. (2010). Papel crucial de la mitocondria en la muerte celular programada. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 29(2), 294-301.

Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0864-03002010000200011&lng=es&nrm=iso](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03002010000200011&lng=es&nrm=iso)

- López-Macay, A., Fernández-Torres, J., y Zepeda, A. (2016). Principios y aplicaciones de la microscopía láser confocal en la investigación biomédica. *Investigación en discapacidad*, 5(3), 156-164.
- Luna-Ortiz, P., El-hafidi, M., y Martínez-Rosas, M. (2013). La función mitocondrial y la cardioprotección. *Revista Mexicana de Anestesiología*, 36(4).
- Megías, M., Molist, P., y Pombal, M. A. (2019). Atlas de histología vegetal y animal. La célula. *Citoesqueleto. Departamento de Biología Funcional y Ciencias de la Salud. Facultad de Biología. Universidad de Vigo*.
- Meng, X., Li, L., Narsai, R., De Clercq, I., Whelan, J., y Berkowitz, O. (2020). Mitochondrial signalling is critical for acclimation and adaptation to flooding in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 103(1), 227-247. <https://doi.org/10.1111/tpj.14724>
- Millar, A. H., Small, I. D., Day, D. A., y Whelan, J. (2008). Mitochondrial biogenesis and function in *Arabidopsis*. *The Arabidopsis Book/American Society of Plant Biologists*, 6. <https://doi.org/10.1199%2Ftab.0111>
- Muñoz, A. C., Parra, J. A. G., Parra, J. J. G., y Cercado, D. R. C. (2024). Funciones de la mitocondria y su papel en patologías asociadas. *Journal of Science and Research*, 9(1), 183-196. <https://doi.org/10.5281/zenodo.10694916>
- Murphy, E., y Steenbergen, C. (2007). Preconditioning: the mitochondrial connection. *Annual review of physiology*, 69, 51–67. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.69.031905.163645>
- Nature Education. (2014). Mitochondria. Recuperado el 23 de noviembre de 2023 de: <https://www.nature.com/scitable/topicpage/mitochondria-14053590/#>

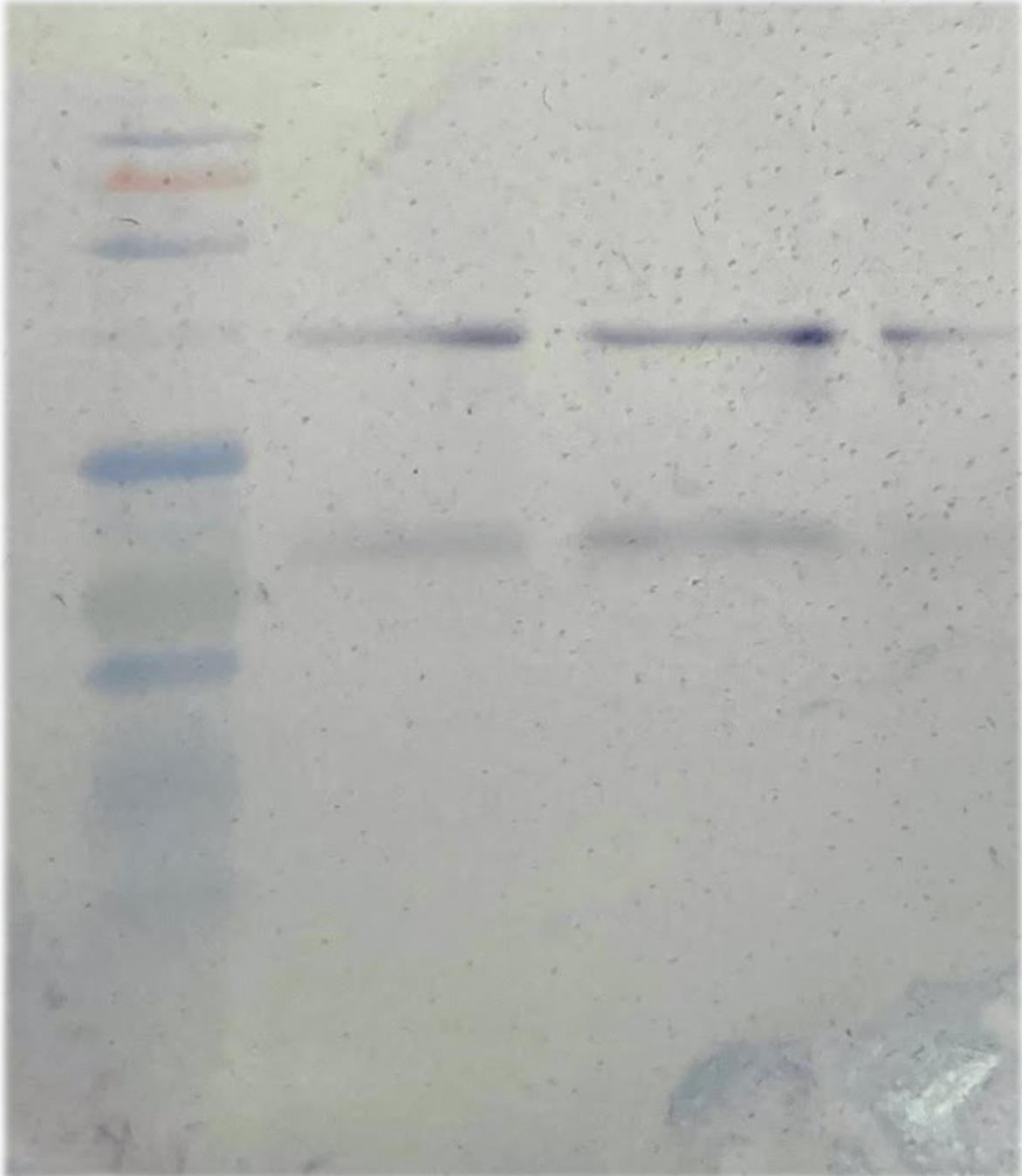
- Nelson, B. K., Cai, X., y Nebenführ, A. (2007). A multicolored set of in vivo organelle markers for co-localization studies in *Arabidopsis* and other plants. *The Plant Journal*, 51(6), 1126-1136. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03212.x>
- Nicholls, D. G. (2013). Bioenergetics: General Definition of Principles. Encyclopedia of Biological Chemistry (Second Edition), Edited by: William J. Lennarz, M. Daniel Lane, Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-378630-2.00213-9>.
- Nicholls, D. G., y Ferguson, S. J. (2013). 10-The cell biology of mitochondrion. *Bioenergetics*, 4, 303-325. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-388425-1.00010-5>
- Oikawa, K., Imai, T., Thagun, C., Toyooka, K., Yoshizumi, T., Ishikawa, K., Kodama y Numata, K. (2021). Mitochondrial movement during its association with chloroplasts in *Arabidopsis thaliana*. *Communications Biology*, 4(1), 292. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-01833-8>
- Pan, R., y Hu, J. (2015). Plant mitochondrial dynamics and the role of membrane lipids. *Plant signaling y behavior*, 10(10), e1050573. <https://doi.org/10.1080/15592324.2015.1050573>
- Pedroza-García, J. A., Nájera-Martínez, M., de la Paz Sanchez, M., y Plasencia, J.\* (2015). *Arabidopsis thaliana* thymidine kinase 1a is ubiquitously expressed during development and contributes to confer tolerance to genotoxic stress. *Plant Molecular Biology*, 87(3), 303-315. <https://doi.org/10.1007/s11103-014-0277-7>
- Pezoa, J. (2012). El poro de transición de permeabilidad mitocondrial (PTPm) como blanco de estrategias cardioprotectoras en daño por isquemia-reperfusión miocárdica: rol de los anestésicos inhalatorios. *Revista Chilena de Anestesia*, 41, 128-134.
- Pirayesh, N., Giridhar, M., Khedher, A. B., Vothknecht, U. C., y Chigri, F. (2021). Organellar calcium signaling in plants: An update. *Biochimica et Biophysica*

- Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1868(4), 118948.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2021.118948>
- Prasher, D. C. (1995). Using GFP to see the light. *Trends in Genetics*, 11(8), 320-323.  
[https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(00\)89090-3](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(00)89090-3)
- Raza, A., Charagh, S., Sadaqat, N., y Jin, W. (2020). Arabidopsis thaliana: Model plant for the study of abiotic stress responses. *The Plant Family Brassicaceae: Biology and Physiological Responses to Environmental Stresses*, 129-180.  
[https://doi.org/10.1007/978-981-15-6345-4\\_3](https://doi.org/10.1007/978-981-15-6345-4_3)
- Relichová, J. (1998). Martínez-Zapater, J. M., Salinas, J. (ed.): *Arabidopsis* Protocols. *Biología plantarum*, 41(1), 110. <https://doi.org/10.1023/A:1001766012263>
- Robichaux, D. J., Harata, M., Murphy, E., y Karch, J. (2023). Mitochondrial permeability transition pore-dependent necrosis. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 174, 47-55. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2022.11.003>
- Romero, O. A. M., y Almazán, A. T. M. (2018). Mitocondrias—El “ying-yang” de la vida. *Recursos Naturales y Sociedad*, 4(1), 12-21.  
<https://doi.org/10.18846/renaysoc.2018.04.04.01.0001>
- Samaniego, R. (2009). Aplicaciones de la microscopía confocal. *Gastroenterología y Hepatología Continuada*, 8(2), 115-119. [https://doi.org/10.1016/S1578-1550\(09\)71093-9](https://doi.org/10.1016/S1578-1550(09)71093-9)
- Scott, I., y Logan, D. C. (2008). Mitochondrial morphology transition is an early indicator of subsequent cell death in *Arabidopsis*. *The New Phytologist*, 177(1), 90-101. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02255.x>
- Shingaki-Wells, R. A. C. H. E. L., Millar, A. H., Whelan, J., y Narsai, R. (2014). What happens to plant mitochondria under low oxygen? An omics review of the responses to low oxygen and reoxygenation. *Plant, Cell & Environment*, 37(10), 2260-2277. <https://doi.org/10.1111/pce.12312>

- Sivasubramanian, R., Mukhi, N., y Kaur, J. (2015). *Arabidopsis thaliana*: a model for plant research. *Plant Biology and Biotechnology: Plant Genomics and Biotechnology*, 2, 1-26. [https://doi.org/10.1007/978-81-322-2283-5\\_1](https://doi.org/10.1007/978-81-322-2283-5_1)
- Tanveer, A., Virji, S., Andreeva, L., Totty, N. F., Hsuan, J. J., Ward, J. M., y Crompton, M. (1996). Involvement of cyclophilin D in the activation of a mitochondrial pore by Ca<sup>2+</sup> and oxidant stress. *European journal of biochemistry*, 238(1), 166-172. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1996.0166q.x>
- Tuena de Gómez Puyou, M., y García-Trejo, J. de J. (2015). La bioenergética, las mitocondrias y la fosforilación oxidativa. *Revista digital universitaria*, 16(1). Disponible en: <https://www.revista.unam.mx/ojs/index.php/rdu/issue/view/6>
- Ukolova, I. V., y Borovskii, G. B. (2023). OXPHOS Organization and Activity in Mitochondria of Plants with Different Life Strategies. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(20), 15229. <https://doi.org/10.3390/ijms242015229>
- Wydro, M. M., Sharma, P., Foster, J. M., Bych, K., Meyer, E. H., y Balk, J. (2013). The evolutionarily conserved iron-sulfur protein INDH is required for complex I assembly and mitochondrial translation in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 25(10), 4014-4027. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.117283>
- Vacca, R. A., de Pinto, M. C., Valenti, D., Passarella, S., Marra, E., y De Gara, L. (2004). Production of reactive oxygen species, alteration of cytosolic ascorbate peroxidase, and impairment of mitochondrial metabolism are early events in heat shock-induced programmed cell death in tobacco Bright-Yellow 2 cells. *Plant physiology*, 134(3), 1100-1112. <https://doi.org/10.1104/pp.103.035956>
- Zancani, M., Casolo, V., Petrusa, E., Peresson, C., Patui, S., Bertolini, A., ... y Vianello, A. (2015). The permeability transition in plant mitochondria: the missing link. *Frontiers in Plant Science*, 6, 1120. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01120>

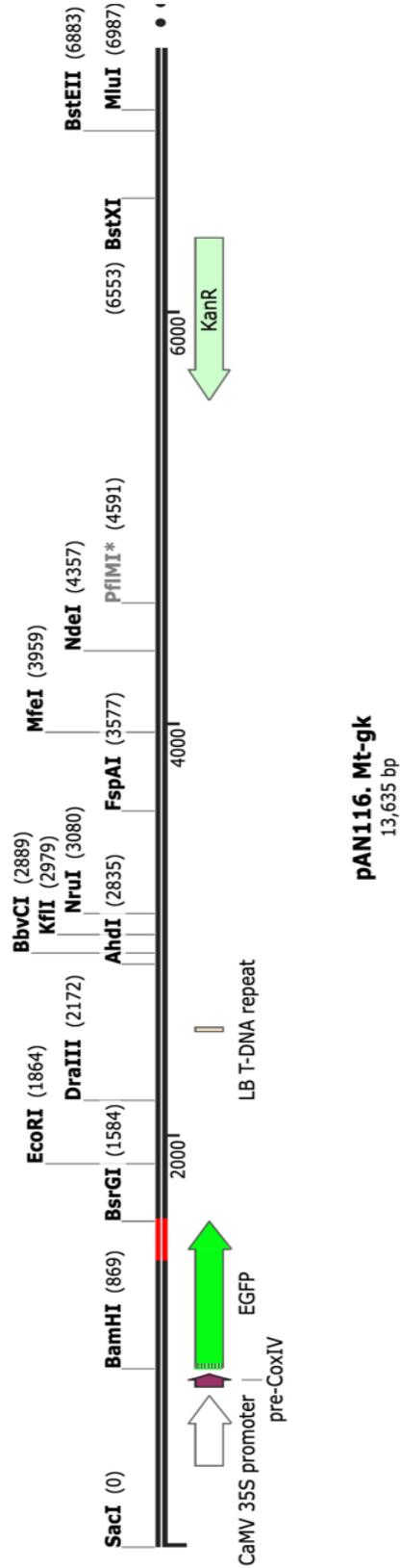
## ANEXO

Western blot de proteína total aislada de hojas de *A. thaliana* mGFP



# ANEXO

## Mapa completo de la inserción cromosomal en la línea mGFP del ABRC



# ANEXO

## Artículo publicado en BBA durante el desarrollo del presente trabajo

BBA - Bioenergetics 1863 (2022) 148586



Contents lists available at ScienceDirect

BBA - Bioenergetics

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/bbabio](http://www.elsevier.com/locate/bbabio)



### Morphology and permeability transitions in plant mitochondria: Different aspects of the same event?

Bryan Ocampo-Hernández, Emilia R. Gutiérrez Mireles, Manuel Gutiérrez-Aguilar\*

Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, 04510 México City, México

#### ARTICLE INFO

##### Keywords:

Plant mitochondria  
Calcium overload  
Mitochondrial permeability transition  
Mitochondrial morphology transition

#### ABSTRACT

Plant mitochondria are sensitive organelles affected by changing environmental stressors. Upon heat shock or the presence of reactive oxygen species, plant mitochondria undergo in vivo morphological derangements associated with the extensively characterized opening of the mitochondrial permeability transition pore. Nevertheless, the classic mitochondrial permeability transition is known to be triggered by calcium overload causing mitochondrial swelling and dysfunction. Here we review evidence concerning calcium handling, permeability transition and mitochondrial impairments in plants, supporting the notion that the mitochondrial morphology transition is an in vivo indicator of the permeability transition.

#### 1. Introduction

In plants, mitochondria constantly supply and transform metabolites required for efficient growth. These organelles exhibit vectorial and stochastic movements (wiggling) and present discrete morphology under normal circumstances [1]. Such motility has been associated with the formation of social networks facilitating the exchange of chemicals and cellular cues [2]. Organellar social networks are wired partly by filamentous actin since they disrupt rapidly in the presence of cytochalasin [1,3–5]. Moreover, under conditions of excessive UV light exposure, oxidative stress and heat shock, mitochondria can display distorted features and behavior [6–10]. Specifically, mitochondria tend to form aggregates in the presence of UV light [7] and display increased plan area, potentially linked to mitochondrial swelling [11]. Such changes may be closely associated with the induction of programmed cell death (PCD) and mitochondrial permeability transition (MPT) in plant cell death models [9,10,12]. In plantation fields, PCD is an important factor involved in crop losses [13,14]. Thus, understanding the mechanisms by which plant cells undergo MPT-dependent PCD may result in the development of strategies to ameliorate crop losses in a context of climate change. It is the purpose of this mini-review to address previous and recent evidence linking plant mitochondrial conditions

associated with MPT and PCD.

#### 2. The mitochondrial permeability transition

In the eukarya domain, mitochondria constitute an efficient source of molecules required to sustain life. However, these organelles often function at their physiological limits and do constitute an important source of ROS [15]. Under conditions of stress, mitochondria from several species undergo MPT derived from the opening of a proteinaceous channel known as the MPT pore. Due to the highly divergent regulation of this process in several organisms, it has been difficult to ascertain its protein identity. However, recent developments point towards the involvement of adenine nucleotide translocators alongside the ATP synthase as key molecular players during pore opening [16,17]. The mitochondrial calcium uniporter complex (MCUc) is not a component of this pore but regulates its activity by controlling calcium flux across inner mitochondrial membranes [18]. MCUc-dependent MPT has been considerably less studied in plant as compared to its mammalian counterparts. However, MCUc-dependent calcium transport has been assessed in *A. thaliana* [19–21]. In this model plant, six channel-forming MCU isoforms are involved in calcium transport across mitochondrial inner membranes [20] and even chloroplast envelope membranes [22].

**Abbreviations:**  $\Delta\Psi$ , mitochondrial transmembrane potential; AtMCU, *Arabidopsis thaliana* MCU; CsA, cyclosporin A; CRC, calcium retention capacity; EMRE, essential MCU regulator; mitoGFP, mitochondrial green fluorescent protein; HS, heat shock; MCU, mitochondrial calcium uniporter; MCUc, mitochondrial calcium uniporter complex; MMT, mitochondrial morphology transition; MPT, mitochondrial permeability transition; *nmt*, chondriome network mutant; PCD, programmed cell death; ROS, reactive oxygen species.

\* Corresponding author at: Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad # 3000, Ciudad de México 04510, México.

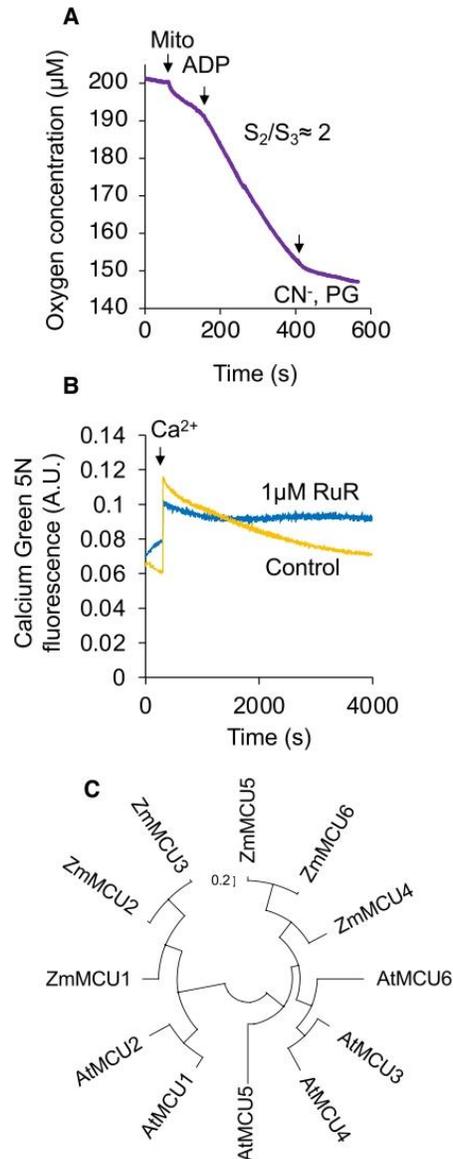
E-mail address: [manu@unam.mx](mailto:manu@unam.mx) (M. Gutiérrez-Aguilar).

<https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2022.148586>

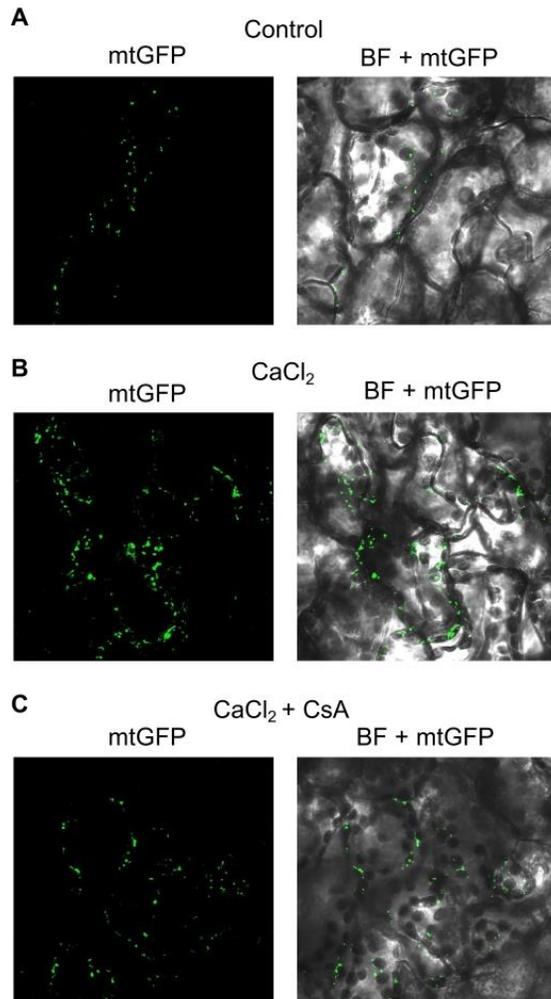
Received 31 March 2022; Received in revised form 22 June 2022; Accepted 23 June 2022

Available online 27 June 2022

0005-2728/© 2022 Elsevier B.V. This article is made available under the Elsevier license (<http://www.elsevier.com/open-access/userlicense/1.0/>).



**Fig. 1.** Mitochondrial calcium transport and oxygen consumption in isolated mitochondria from *Zea mays* seedling. Mitochondria were isolated from roots of 1-week-old ‘Chalqueño’ maize seedlings. Isolation conditions and procedures were as previously described [39]. For each experiment, 0.2 mg of mitochondrial protein was used. (A) Mitochondrial oxygen consumption was assessed in the presence of 10 mM succinate (state 2). Respiratory state 3 was assessed after addition of 200  $\mu\text{M}$  ADP. 1  $\mu\text{M}$  oligomycin and 2  $\mu\text{M}$  propylgalate/cyanide were added to induce pseudo state 4 and inhibit respiration respectively. Typical trace,  $n = 4$ . (B) Mitochondrial calcium uptake was assessed as in [40] after a single 100  $\mu\text{M}$  CaCl<sub>2</sub> control bolus (yellow trace). Calcium transport was also assessed in the presence of 1  $\mu\text{M}$  RuR (blue trace). Representative traces,  $n = 4$ . (C) Evolutionary analysis of *Zea mays* MCU homologs compared with AtMCUs using the maximum likelihood method. The tree with the highest log likelihood (-5109.03) is shown. Initial tree(s) for the heuristic search were obtained automatically by applying Neighbor-Join and BioNJ algorithms to a matrix of pairwise distances estimated using the JTT model, and then selecting the topology with superior log likelihood value. This analysis involved 12 amino acid sequences. There were a total of 371 positions in the final dataset [41,42]. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)



**Fig. 2.** Mitochondrial morphology transition assessment in *Arabidopsis thaliana* leaf mesophyll. Plants with mitochondrial GFP expression were acquired from the Arabidopsis Biological Resource Center with stock number CS16263. Seeds were grown in  $\frac{1}{2}$  MS media plates for 3 weeks and transferred to pots with substrate under standard incubator conditions. (A) Control images were obtained by applying 3  $\mu$ L vehicle to leaf mesophylls for 2 h prior imaging in the GFP and bright field (BF) channels. (B) Imaging in the presence of 500  $\mu$ M  $\text{CaCl}_2$  plus 10  $\mu$ M ETH129. (C) 5  $\mu$ M CsA was added 20 min before 500  $\mu$ M  $\text{CaCl}_2$  plus 10  $\mu$ M ETH129. Representative images from a single confocal plane per image with  $n = 4$ .

Upon isoform-specific deletion, MCU-deficient plants display changes in relevant processes including pollen tube germination and growth [19], root development [20] and stomatal pore opening [22]. In plants, calcium signaling is related to environmental changes (i.e. the presence of a predator) [23]. However, less is known on the stress threshold to achieve MPT pore opening in growing plants. In this aspect, perhaps one of the most useful tools allowing one to monitor mitochondrial demise *in planta* is the use of plants expressing fluorescent reporters. These sensors allow the assessment calcium levels, ROS and organellar morphology. For example, Mehler and colleagues previously reported a toolkit for the assessment of intracellular calcium fluctuations using aequorin-

derived calcium sensing [24]. Some of these indicators were useful for monitoring cytoplasmic increases in calcium when decreasing ambient temperature from 22 °C to 10 °C and 0 °C. Under their conditions, calcium levels spiked seconds after temperature challenges and decreased in ‘laddered’ patterns. Other calcium spike inducers include gravitropism and glutamate addition [25,26]. These calcium waves are known to trespass cell membranes and alongside ROS plus electric waves may constitute systemic signals allowing whole plants to adapt to stressors [27]. Now, a key question arises as to whether signaling calcium-ROS waves (if strong enough) can activate MPT in intact tissue. If we consider the studies mentioned above, cytoplasmic calcium levels would spike in the submicromolar range for a few minutes. This would argue against MPT activation under physiological conditions as in diverse plant species, pore opening ensues in the presence of higher calcium levels [28,29]. However, if we consider the potential chronic nanomolar calcium loading of mitochondria under stress conditions, MPT would possibly happen. This hypothesis would be relatively challenging to test in isolated mitochondria, especially if we consider these organelles tend to deteriorate in a relatively short time frame. For example, addition of a single 100  $\mu$ M calcium bolus to reasonably coupled isolated corn root mitochondria results in a slow yet sustained calcium uptake phenotype (Fig. 1). Such transport activity likely depends on an MCU in *Zea mays* since addition of RuR blocks transport activity (Fig. 1B). Indeed, a search for MCU homologs in the maize genome database (<https://www.maizegdb.org/>) yields up to six isoforms with sequence features highly reminiscent of *A. thaliana* (Fig. 1C). Under these conditions, no calcium-induced, calcium release (i.e. MPT) is observed. Conversely, in isolated *Pisum sativum* mitochondria, a calcium-induced calcium release is only observed around 320  $\mu$ M calcium but only in the presence of the calcium ionophore ETH129 (i.e. when a fast electrophoretic calcium uptake is artificially induced) [28]. This implies that although detectable in most plant species, MPT is unlikely to occur due to calcium stress alone. Perhaps more than one stressor is required to decrease the calcium threshold to initiate pore opening. Indeed, the systemic propagation of  $\text{Ca}^{2+}$  plus ROS waves in plants described by Gilroy and colleagues in 2014 can well serve a physiological role for healthy plants [27], but perhaps too much signaling may constitute the perfect ingredient for MPT onset. Under these conditions, a slow calcium transport activity would protect plants during exacerbated signaling. Now, to avoid MPT during systemic signaling, only plants capable of dealing with calcium and ROS overload may have achieved natural selection through different mechanisms. In the case of MCU-bearing plants (i.e. *Z. mays*), a ‘less negative’  $\Delta\Psi$  would considerably modify the  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}/[\text{Ca}^{2+}]_{\text{out}} \approx 1 \times 10^6$  seen in mammalian mitochondria at an estimated  $\Delta\Psi \approx -180$  mV [15,31]. Another mechanism by which MCU-bearing plants may limit calcium overload is through the absence of an essential MCU regulator (EMRE) homolog [32]. In mammalian mitochondria, MCU-driven calcium transport necessitates EMRE [33]. A mouse model lacking whole body EMRE also displays a decreased molecular mass in the MCU supercomplex, suggesting this subunit links higher order complex formation in addition to its enhancer role on calcium transport [34]. The last mechanisms by which plant mitochondria may limit the occurrence of MPT formation is either by limiting calcium uptake by inhibiting glutamate receptor-like channels [35] or through the deficiency -either at the activity level or expression- of an MCU complex [32]. This may be the reason why some species like *P. sativum* can avoid calcium-induced MPT in the absence of calcium ionophores [28]. A similar phenotype has been reported for genetically distant organisms such as *Saccharomyces cerevisiae* (for an excellent review see) [36].

### 3. The mitochondrial morphology transition

In 2007, Scott and Logan reported mitochondrial morphology rearrangements consistent with mitochondrial dysfunction under stress [11]. Such MMT was evident in *A. thaliana* leaves and mesophyll protoplasts constitutively expressing a mito-GFP and further treated with reactive oxygen species inducers including H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, s-triazine, methyl viologen or upon heat shock. The authors monitored a mitochondrial swelling-like phenotype upon stressor application starting 4 h after each treatment. Mitochondria often appeared as forming 'clumps' and with enhanced plan area relative to controls at that timepoint, suggesting MMT (and probably MPT) occurs in plants after chronic exposure to stress. Moreover, the transition was also evident in the chondriome network mutant (*rmt*), exhibiting mammalian-like reticulate distribution of mitochondria. The MMT was also evident in isolated mesophyll protoplasts treated with either ROS or heat shock (45 °C for 10 min). Moreover, the putative relationship between MMT and MPT was explored by blocking overall cellular calcium transport with LaCl<sub>3</sub>. Heat shock treated protoplasts displayed a significant reduction (>20 %) in mitochondrial optical abnormalities and cell death when pretreated with lanthanum ions. This is consistent with findings in isolated *A. thaliana* protoplasts showing mitochondrial clumps when exposed to heat shock conditions [37]. In the presence of the MPT pore desensitizer CsA, a mild -yet significant- decrease in MMT and cell death was detected. These results led the authors to hypothesize 1) that the MMT could be the optical manifestation of the MPT and 2) that the MMT may constitute an indicator of subsequent cell death and likely a pivotal event during the process of cell death [11].

Assessing MMT *in planta* presents several advantages over assessing MPT in isolated mitochondria or even in protoplasts. Specifically, sample manipulations are minimal thus reducing the likelihood of potential artifacts due to defective mitochondrial or protoplast isolation procedures. For example, the calcium dependence of the MMT can be assessed in *A. thaliana* leaves overexpressing mitochondrial GFP with 500 μM calcium in the presence of ETH129 (Fig. 2B). Under these conditions, MMT can be observed as the formation of fluorescent clusters (i.e. clumps) with enhanced planar area within the timeframe reported by Scott and Logan [11]. Mitochondria kept its discrete distribution under control conditions (Fig. 2A). In the presence of calcium plus 5 μM CsA however, mitochondria recovered partially -but not completely- their normal distribution (Fig. 2C). The reasons for this partial phenotype are unclear. Some possibilities may include high expression levels of mitochondrial cyclophilins or the chance that cyclophilins bind the MPT pore with more affinity or CsA with less affinity. Such variations in CsA sensitivity and cyclophilin dependency have also been reported for yeast [38]. Taken together, the findings showing a CsA-dependent, calcium induced-MMT indicate the *in vitro* MPT likely constitute different aspects of the same event.

### 4. Concluding remarks

Plants have developed divergent mechanisms to cope with calcium overload derived from calcium waves during signaling [23]. However, plants may undergo mitochondrial morphology derangements consistent with the presence of a calcium-induced MPT when under stress conditions, regardless of their calcium overload-coping mechanism(s) [11]. Since most assays to monitor MPT require performing experiments in isolated mitochondria or in detached cells, the development of *in vivo* research models to understand the mechanisms by which MPT occurs in plants represents a unique opportunity to understand the pathological scenarios by which permeability transition initiates plant cell death. In this sense, the model organism *A. thaliana* provides several advantages when compared to other plants, being the most evident the remarkable resources available for researchers worldwide.

### Declaration of competing interest

The authors declare no conflict of interest.

### Data availability

Data will be made available on request.

### Acknowledgments

This work was supported by a grant from Universidad Nacional Autónoma de México, Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) IA208121 and UNAM-FQ-PAIP 5000-9171 (to M.G.-A.). Dra. Aurora Lara Nuñez kindly provided *Zea mays* seeds for the experiments shown herein.

### References

- [1] K. Oikawa, T. Imai, C. Thagun, K. Toyooka, T. Yoshizumi, K. Ishikawa, Y. Kodama, K. Numata, Mitochondrial movement during its association with chloroplasts in *Arabidopsis thaliana*, *Commun. Biol.* 4 (2021).
- [2] J.M. Chustecki, D.J. Gibbs, G.W. Bassel, I.G. Johnston, Network analysis of *Arabidopsis* mitochondrial dynamics reveals a resolved tradeoff between physical distribution and social connectivity, *Cell Syst.* 12 (2021) 419–431.e4.
- [3] K. Van Gestel, R.H. Köhler, J.-P. Verbelen, Plant mitochondria move on F-actin, but their positioning in the cortical cytoplasm depends on both F-actin and microtubules, *J. Exp. Bot.* 53 (2002) 659–667.
- [4] D. Avisar, M. Abu-Abied, E. Belausov, E. Sadott, C. Hawes, I.A. Sparkes, A comparative study of the involvement of 17 *Arabidopsis* myosin family members on the motility of golgi and other organelles, *Plant Physiol.* 150 (2009) 700–709.
- [5] P. Wang, P.J. Hussey, Interactions between plant endomembrane systems and the actin cytoskeleton, *Front. Plant Sci.* 6 (2015).
- [6] C. Gao, L. Zhang, F. Wen, D. Xing, Sorting out the role of reactive oxygen species during plant programmed cell death induced by ultraviolet-C overexposure, *Plant Signal. Behav.* 3 (2008) 197–198.
- [7] C. Gao, D. Xing, L. Li, L. Zhang, Implication of reactive oxygen species and mitochondrial dysfunction in the early stages of plant programmed cell death induced by ultraviolet-C overexposure, *Planta* 227 (2008) 755–767.
- [8] K. Apel, H. Hirt, Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction, *Annu. Rev. Plant Biol.* 55 (2004) 373–399.
- [9] R.A. Vacca, D. Valenti, A. Bobba, M.C. de Pinto, R.S. Merafina, L. De Gara, S. Passarella, E. Marra, Proteasome function is required for activation of programmed cell death in heat shocked tobacco bright-yellow 2 cells, *FEBS Lett.* 581 (2007) 917–922.
- [10] R.A. Vacca, D. Valenti, A. Bobba, R.S. Merafina, S. Passarella, E. Marra, Cytochrome c is released in a reactive oxygen species-dependent manner and is degraded via caspase-like proteases in tobacco bright-yellow 2 cells en route to heat shock-induced cell death, *Plant Physiol.* 141 (2006) 208–219.
- [11] I. Scott, D.C. Logan, Mitochondrial morphology transition is an early indicator of subsequent cell death in *Arabidopsis*, *New Phytol.* 177 (2008) 90–101.
- [12] R.A. Vacca, M.C. De Pinto, D. Valenti, S. Passarella, E. Marra, L. De Gara, Production of reactive oxygen species, alteration of cytosolic ascorbate peroxidase, and impairment of mitochondrial metabolism are early events in heat shock-induced programmed cell death in tobacco bright-yellow 2 cells, *Plant Physiol.* 134 (2004) 1100–1112.
- [13] V. Petrov, J. Hille, B. Mueller-Roeber, T.S. Gechev, ROS-mediated abiotic stress-induced programmed cell death in plants, *Front. Plant Sci.* 6 (2015) 69.
- [14] M. Ashraf, M.S.A. Ahmad, M. Öztürk, A. Aksoy, Crop Production for Agricultural Improvement, Springer Netherlands, Dordrecht, 2012.
- [15] D.G. Nicholls, S. Ferguson, in: *Bioenergetics: Fourth Edition*, Bioenerg. Fourth Ed., 2013, pp. 1–419.
- [16] J. Karch, M.J. Bround, H. Khalil, M.A. Sargent, N. Latchman, N. Terada, P. M. Peixoto, J.D. Molkenin, Inhibition of mitochondrial permeability transition by deletion of the ANT family and CypD, *Sci. Adv.* 5 (2019), eaaw4597.
- [17] M. Carraro, V. Checchetto, I. Szabó, P. Bernardi, F-ATP synthase and the permeability transition pore: fewer doubts, more certainties, *FEBS Lett.* 593 (2019) 1542–1553.
- [18] S. Von Stockum, E. Basso, V. Petronilli, P. Sabatelli, M.A. Forte, P. Bernardi, Properties of Ca<sup>2+</sup> transport in mitochondria of *Drosophila melanogaster*, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 41163–41170.
- [19] B. Selles, C. Michaud, T. Xiong, O. Leblanc, M. Ingouff, *Arabidopsis* pollen tube germination and growth depend on the mitochondrial calcium uniporter complex, *New Phytol.* 219 (2018) 58–65.
- [20] E. Teardo, L. Carraretto, S. Wagner, E. Formentin, S. Behera, S. De Bortoli, V. Larosa, P. Fuchs, F. Lo Schiavo, A. Raffaello, R. Rizzuto, A. Costa, M. Schwarzländer, I. Szabó, Physiological characterization of a plant mitochondrial calcium uniporter *in vitro* and *in vivo*, *Plant Physiol.* 173 (2017) 1355–1370.

- [21] S. Wagner, S. Behera, S. De Bortoli, D.C. Logan, P. Fuchs, L. Carraretto, E. Teardo, L. Cendron, T. Nietzel, M. Füll, F.G. Doccula, L. Navazio, M.D. Fricker, O. Van Aken, I. Finkemeier, A.J. Meyer, I. Szabó, A. Costa, M. Schwarzländer, The EF-hand  $Ca^{2+}$  binding protein MICU choreographs mitochondrial  $Ca^{2+}$  dynamics in *Arabidopsis*, *Plant Cell* 27 (2015) 3190–3212.
- [22] E. Teardo, L. Carraretto, R. Moscattello, E. Cortese, M. Vicario, M. Festa, L. Maso, S. De Bortoli, T. Cali, U.C. Vothknecht, E. Formentin, L. Cendron, L. Navazio, I. Szabó, A chloroplast-localized mitochondrial calcium uniporter transduces osmotic stress in *Arabidopsis*, *Nat. Plants* 5 (2019) 581–588.
- [23] T.R. Vincent, J. Canham, M. Toyota, M. Avramova, S.T. Mugford, S. Gilroy, A. J. Miller, S. Hogenhout, D. Sanders, Real-time in vivo recording of *Arabidopsis* calcium signals during insect feeding using a fluorescent biosensor, *J. Vis. Exp.* 2017 (2017).
- [24] N. Mehlmer, N. Parvin, C.H. Hurst, M.R. Knight, M. Teige, U.C. Vothknecht, A toolset of aequorin expression vectors for in planta studies of subcellular calcium concentrations in *Arabidopsis thaliana*, *J. Exp. Bot.* 63 (2012) 1751–1761.
- [25] H. Tatsumi, M. Toyota, T. Furuichi, M. Sokabe, Calcium mobilizations in response to changes in the gravity vector in *Arabidopsis* seedlings: possible cellular mechanisms, *Plant Signal. Behav.* 9 (2014), e29099.
- [26] M. Toyota, D. Spencer, S. Sawai-Toyota, W. Jiaqi, T. Zhang, A.J. Koo, G.A. Howe, S. Gilroy, Glutamate triggers long-distance, calcium-based plant defense signaling, *Science* 361 (2018) 1112–1115.
- [27] S. Gilroy, N. Suzuki, G. Miller, W.-G. Choi, M. Toyota, A.R. Devireddy, R. Mittler, A tidal wave of signals: calcium and ROS at the forefront of rapid systemic signaling, *Trends Plant Sci.* 19 (2014) 623–630.
- [28] V. De Col, E. Petrusa, V. Casolo, E. Braldot, G. Lippe, A. Filippi, C. Peresson, S. Patui, A. Bertolini, V. Giorgio, V. Checchetto, A. Vianello, P. Bernardi, M. Zancani, Properties of the permeability transition of pea stem mitochondria, *Front. Physiol.* 9 (2018) 1626.
- [29] F. Fortes, R.F. Castilho, R. Catisti, E.G.S. Carnieri, A.E. Vercesi,  $Ca^{2+}$  induces a cyclosporin A-insensitive permeability transition pore in isolated potato tuber mitochondria mediated by reactive oxygen species, *J. Bioenerg. Biomembr.* 33 (2001) 43–51.
- [30] A.L. Moore, W.D. Bonner, Measurements of membrane potentials in plant mitochondria with the safranin method, *Plant Physiol.* 70 (1982) 1271–1276.
- [31] P. Mitchell, J. Moyle, Estimation of membrane potential and pH difference across the cristae membrane of rat liver mitochondria, *Eur. J. Biochem.* 7 (1969) 471–484.
- [32] M. Gutiérrez-Aguilar, Mitochondrial calcium transport and permeability transition as rational targets for plant protection, *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1861 (2020), 148288.
- [33] Y. Sancak, A.L. Markhard, T. Kitami, E. Kovács-Bogdán, K.J. Kamer, N.D. Udeshi, S. A. Carr, D. Chaudhuri, D.E. Clapham, A.A. Li, S.E. Calvo, O. Goldberger, V. K. Mootha, EMRE is an essential component of the mitochondrial calcium uniporter complex, *Science* 342 (2013) 1379–1382.
- [34] J.C. Liu, N.C. Syder, N.S. Ghorashi, T.B. Willingham, R.J. Parks, J. Sun, M. M. Fergusson, J. Liu, K.M. Holmström, S. Menazza, D.A. Springer, C. Liu, B. Glancy, T. Finkel, E. Murphy, EMRE is essential for mitochondrial calcium uniporter activity in a mouse model, *JCI Insight* 5 (2020).
- [35] E. Teardo, L. Carraretto, S. De Bortoli, F. Lo Schiavo, E. Formentin, I. Szabó, A. Costa, S. Behera, R. Wagner, Alternative splicing-mediated targeting of the *Arabidopsis* GLUTAMATE RECEPTOR 35 to mitochondria affects organelle morphology, *Plant Physiol.* 167 (2015) 216–227.
- [36] L. Azzolin, S. von Stockum, E. Basso, V. Petronilli, M.A. Forte, P. Bernardi, The mitochondrial permeability transition from yeast to mammals, *FEBS Lett.* 584 (2010) 2504–2509.
- [37] L. Zhang, Y. Li, D. Xing, C. Gao, Characterization of mitochondrial dynamics and subcellular localization of ROS reveal that HsfA2 alleviates oxidative damage caused by heat stress in *Arabidopsis*, *J. Exp. Bot.* 60 (2009) 2073–2091.
- [38] Y. Kamei, M. Koushi, Y. Aoyama, R. Asakai, The yeast mitochondrial permeability transition is regulated by reactive oxygen species, endogenous  $Ca^{2+}$  and Cpr3, mediating cell death, *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 2018 (1859) 1313–1326.
- [39] A. Camacho, R. Moreno-Sanchez, I. Bernal-Lugo, Control of superoxide production in mitochondria from maize mesocotyls, *FEBS Lett.* 570 (2004) 52–56.
- [40] C. Flores-Herrera, G. Preciado-Linares, I. Gonzalez-Vizueth, N. Corona de la Peña, M. Gutiérrez-Aguilar, In situ assessment of mitochondrial calcium transport in tobacco pollen tubes, *Protoplasma* 256 (2019) 503–509.
- [41] D.T. Jones, W.R. Taylor, J.M. Thornton, The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences, *Comput. Appl. Biosci.* 8 (1992) 275–282.
- [42] K. Tamura, G. Stecher, S. Kumar, MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11, *Mol. Biol. Evol.* 38 (2021) 3022–3027.