



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

PAPEL DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO EN LA FORMACIÓN Y ESTABILIZACIÓN DE LOS SUPERCOMPLEJOS RESPIRATORIOS EN CORAZÓN

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

JAZMÍN IXCHEL RAMÍREZ CAMACHO

DIRECTOR DE TESIS

DRA. ANA CECILIA ZAZUETA MENDIZABAL

FACULTAD DE MEDICINA

COMITÉ TUTOR

DR. OSCAR FLORES HERRERA

FACULTAD DE MEDICINA

DR. SALVADOR URIBE CARVAJAL

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

CIUDAD DE MÉXICO, JULIO, 2019



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.

INDICE

INDICE	2
GLOSARIO.....	4
RESUMEN	7
ABSTRACT.....	8
1. INTRODUCCIÓN	9
1.1 ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES.....	9
1.2 INFARTO AGUDO AL MIOCARDIO.....	9
1.3 DAÑO POR REPERFUSIÓN.....	10
1.4. GENERACIÓN DE ENERGÍA AERÓBICA EN EL CORAZÓN.....	10
1.5 ORGANIZACIÓN DE LOS COMPLEJOS RESPIRATORIOS MITOCONDRIALES.....	11
1.6 TÉCNICAS PARA DETECTAR SUPERCOMPLEJOS RESPIRATORIO.....	14
1.7 FACTORES INVOLUCRADOS EN LA FORMACIÓN DE SUPERCOMPLEJOS	
1.7.1 CARDIOLIPINA.....	16
1.7.2 FOSFATIDILETANOLAMINA.....	16
1.7.3 FOSFATIDILCOLINA.....	16
1.7.4 Rcf1.....	17
1.7.5 SCAFI.....	17
1.8 ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO COMO SUBPRODUCTOS DE LA RESPIRACIÓN MITOCONDRIAL.....	18
1.9 LOS SUPERCOMPLEJOS Y SU PAPEL FISIOLÓGICO.....	19
1.10 CAMBIOS EN LA ORGANIZACIÓN DE LOS SUPERCOMPLEJOS DE LA CADENA RESPIRATORIA MITOCONDRIAL EN CONDICIONES PATOLÓGICAS.....	19
1.11 ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS.....	20
1.12 ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES.....	22

1.12.1 SÍNDROME DE BARTH.....	22
1.12.2 FALLA CARDÍACA.....	23
1.12.3 ISQUEMIA Y REPERFUSIÓN.....	23
2. JUSTIFICACIÓN.....	24
3. OBJETIVOS	
3.1 OBJETIVO GENERAL.....	24
3.2 OBJETIVOS PARTICULARES.....	25
4. HIPÓTESIS.....	25
5. METODOS.....	25
5.1 ISQUEMIA-REPERFUSIÓN EN CORAZONES DE RATA UTILIZANDO EL SISTEMA AISLADO LANGENDORFF.....	26
5.1.2 GRUPOS EXPERIMENTALES.....	26
5.2 TAMAÑO DEL INFARTO.....	26
5.3 OBTENCIÓN DE MITOCONDRIAS.....	27
5.3.1. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA.....	27
5.4. PRODUCCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXIGENO Y MARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO EN MITOCONDRIAS.....	27
5.4.1 PRODUCCIÓN DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO	28
5.4.2 LIPOPEROXIDACIÓN.....	28
5.4.3 CARBONILACION DE PROTEÍNAS.....	28
5.4.4 RELACIÓN GLUTATIÓN (GSH/GSSG).....	29
5.5 CONSUMO DE OXÍGENO.....	29
5.6 ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS DE LOS COMPLEJOS RESPIRATORIOS POR ESPECTROFOTOMETRÍA.....	30
5.7 SOLUBILIZACIÓN DE PROTEÍNAS CON DIGITONINA.....	32
5.8 GELES AZULES NATIVOS (1D) BN-PAGE.....	33
5.9 ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS EN BN-PAGE.....	33

5.10 INMUNODETECCIONES DE LOS COMPLEJOS RESPIRATORIOS EN CONDICIONES NATIVAS Y EN 2D.....	34
5.11 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	35
6. RESULTADOS.....	35
6.1 La N-acetilcisteína y el postcondicionamiento mantienen la función cardíaca y reducen el tamaño del infarto en corazones reperfundidos.....	36
6.2 La cardioprotección conferida por el NAC y el PostC se relaciona con la disminución en la producción de H ₂ O ₂ , de la lipoperoxidación, de la carbonilación de proteínas y con el incremento en la relación GSH/GSSG en mitocondrias de corazones reperfundidos.....	37
6.3 Efecto de la NAC y del PostC sobre el consumo de oxígeno en mitocondrias aisladas de corazones isquémicos-reperfundidos.....	41
6.4 Organización de los SC respiratorios en mitocondrias de corazones isquémicos reperfundidos.....	46
6.5 Contenido de complejos y supercomplejos en corazones isquémicos reperfundidos tratados con NAC y PostC.....	49
7. DISCUSIÓN.....	52
8. CONCLUSIÓN.....	55
9. REFERENCIAS.....	56

GLOSARIO

AA antimicina A

ADN Ácido desoxirribonucleico

ADP Adenosina Difosfato

ATP Adenosina trifosfato

BN-PAGE Blue Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis

BSA Bovine Serum Albumin

CCCP m-clorocarbonilcianuro fenilhidrazona

CI Complejo I

CII Complejo II

CIII Complejo III

CIV Complejo IV

CL Cardiolipina

CN-PAGE Colorless Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis

CoQ coenzima Q

CR control respiratorio

CTE cadena de transporte de electrones

CV Complejo V

DCPIP 2,6 diclorofenolindofenol

DDM n-dodecil-B-maltósido

DNPH 2,4-dinitrofenilhidracina

EDTA ácido etilendiaminotetraacético

EGTA Ethylene Glycol Tetraacetic Acid

ERO especies reactivas de oxígeno

FADH flavín-adenín-dinucleótido

FMN flavín-mononucleótido
GSH glutatión reducido
GSSG glutatión Oxidado
HD Enfermedad de Hungtinton
HF Falla cardíaca
HR frecuencia cardíaca
IAM El infarto agudo al miocardio
IR Isquemia reperfusión
Ldh lactato deshidrogenasa
LVDP left ventricular blood pressure
MDA malondialdehído
MTT bromuro de tiazolil azul tetrazolio
NAC N-acetil-L-cisteína
NADH nicotina adenin dinucleotido
NEM N-etilmaleimida
OMS Organización mundial de la Salud
PE fosfatidiletanolamina
PEP fosfoenolpiruvato
Pk piruvato cinasa
PMS metosulfato de fenacina
PostC Post-acondicionamiento
PTPm poro de la transición de la permeabilidad mitocondrial
PVDF difluoruro de polivinilidina
RAAS sistema renina-angiotensina-aldosterona
RET Reverse electron transfer
Rot Rotenona

SC Supercomplejos

SDH succinato deshidrogenasa

SDS-PAGE sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

SDS-PAGE sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis,

SNS sistema nervioso Simpático

TMPO tetrametoxipropano

Triton X-100 p-isooctilfenoxipoli-etoxietanol

RESUMEN

La fuga de electrones de la cadena respiratoria conduce a la formación de superóxido induciendo daño mitocondrial y celular durante la isquemia y la reperfusión (IR). En este trabajo evaluamos si el ensamblaje supramolecular de los complejos respiratorios en supercomplejos (SC) está asociado con la eficiencia energética preservada y el estrés oxidativo disminuido en los corazones post-isquémicos tratados con el antioxidante N-acetilcisteína (NAC) y la maniobra mecánica cardioprotectora de postcondicionamiento (PostC). Las variables hemodinámicas, el tamaño del infarto, los marcadores de estrés oxidativo, el consumo de oxígeno y la actividad/estabilidad de los SC se compararon entre los grupos. Encontramos que el consumo de oxígeno mitocondrial y la actividad de los complejos respiratorios se conservan en las mitocondrias de los corazones reperfundidos tratados con NAC y PostC. Ambos tratamientos contribuyen a recuperar la actividad de complejos individuales. El NAC redujo el estrés oxidativo y mantiene los SC que contienen el complejo I, complejo III, complejo IV y la proteína adaptadora SCAFI más eficazmente que PostC. Las actividades de CI, CIII y CIV asociadas a los ensamblajes de SC se conservaron con esta maniobra, lo que sugiere que la activación de otros mecanismos cardioprotectores además de la contención del estrés oxidativo podría participar en el mantenimiento de la actividad de los complejos respiratorios mitocondriales en tales superestructuras.

Concluimos que tanto el conjunto monomérico como el conjunto de SC de la cadena respiratoria contribuyen a la funcionalidad in vivo de las mitocondrias. Sin embargo, aunque el daño inducido por ERO y el consiguiente aumento de la producción de estrés afectan el ensamblaje de SC, otros niveles de regulación como los inducidos por PostC, podrían participar en el mantenimiento de la actividad de los complejos respiratorios mitocondriales en dichas superestructuras.

ABSTRACT

Electron leakage from dysfunctional respiratory chain and consequent superoxide formation leads to mitochondrial and cell injury during ischemia and reperfusion (IR). In this work we evaluate if the supramolecular assembly of the respiratory complexes into supercomplexes (SCs) is associated with preserved energy efficiency and diminished oxidative stress in post-ischemic hearts treated with the antioxidant N-acetylcysteine (NAC) and the cardioprotective maneuver of Postconditioning (PostC). Hemodynamic variables, infarct size, oxidative stress markers, oxygen consumption and the activity/stability of SCs were compared between groups. We found that mitochondrial oxygen consumption and the activity of respiratory complexes are preserved in mitochondria from reperfused hearts treated with both NAC and PostC. Both treatments contribute to recover the activity of single complexes. NAC reduced oxidative stress and maintains SCs assemblies containing Complex I, Complex III, Complex IV and the adapter protein SCAFI more effectively than PostC. The activities of CI, CIII and CIV associated to SCs assemblies were preserved by this maneuver, suggesting that the activation of other cardioprotective mechanisms besides oxidative stress contention might participate in maintaining the activity of the mitochondrial respiratory complexes in such superstructures. We conclude that both the monomeric and the SCs assembly of the respiratory chain contribute to the *in vivo* functionality of the mitochondria. However, although the ROS-induced damage and the consequent increased production of ROS affect the assembly of SCs, other levels of regulation as those induced by PostC, might participate in maintaining the activity of the mitochondrial respiratory complexes in such superstructures.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES

Las enfermedades cardiovasculares han sido la principal causa de muerte a nivel mundial durante los últimos 15 años. Estos desórdenes del corazón y de los vasos sanguíneos incluyen la cardiopatía coronaria, las enfermedades cerebrovasculares, arteriopatías periféricas, las cardiopatías congénitas y las enfermedades isquémicas. Los ataques al corazón y los accidentes vasculares cerebrales suelen ser fenómenos agudos que se deben a obstrucciones que impiden que la sangre fluya hacia una parte del corazón o del cerebro. Su incidencia aumenta cuando se suman factores de riesgo, tales como el tabaquismo, las dietas malsanas y la obesidad, la inactividad física, el consumo nocivo de alcohol, la hipertensión arterial, la diabetes y la hiperlipidemia. De los 56,4 millones de defunciones registradas a nivel mundial en 2016, las principales causas de mortalidad en el mundo fueron la cardiopatía isquémica y el accidente cerebrovascular, que ocasionaron alrededor de 15,2 millones de defunciones en ese año (Organización mundial de la Salud OMS 2016).

1.2 INFARTO AGUDO AL MIOCARDIO

El infarto agudo al miocardio (IAM) está relacionado con la isquemia debido a un evento coronario primario o bien por: erosión, ruptura, fisura o disección de la placa aterosclerótica.

La oclusión coronaria impide el paso de oxígeno y nutrientes al tejido, por lo que éste sólo puede obtener energía a expensas del glucógeno almacenado en los cardiomiocitos con la consecuente producción de ácido láctico y de hidrogeniones que producen un pH ácido en el interior de la célula. Sin embargo, la energía producida no es suficiente para mantener la función cardíaca, por lo que es indispensable rescatar la

mayor cantidad de tejido reintroduciendo el flujo sanguíneo en la zona ocluida. A este procedimiento se le denomina "reperfusión" y paradójicamente puede causar daño estructural y funcional adicional al que sufre el miocardio durante el periodo isquémico.

1.3 DAÑO POR REPERFUSIÓN

Este fenómeno, fue descrito por primera vez en los años 70's por Jennings et al. (1974). En modelos animales se ha demostrado que como consecuencia del daño por perfusión, se incrementa hasta en un 50% el tamaño final de la zona infartada. El daño por perfusión es consecuencia de múltiples mecanismos que se activan tanto en el interior como en el exterior de la célula. Fisiológicamente, el daño se traduce en disfunciones del endotelio, del sistema vascular, del metabolismo, de la contracción, en la descompensación en el flujo de sangre y en fenómenos de muerte celular, como la necrosis y la apoptosis. La disfunción mitocondrial, que ocurre como consecuencia de la sobrecarga de calcio y del incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO), es considerada el "punto sin retorno" en la muerte celular del miocardio isquémico/reperfundido (Jennings et, al., 1974).

1.4 GENERACIÓN DE ENERGÍA AERÓBICA EN EL CORAZÓN

El corazón es un órgano de alta demanda energética, por lo tanto en condiciones fisiológicas la actividad de bombeo permanente requiere del aporte energético constante que se deriva principalmente del catabolismo de los ácidos grasos para la generación de acetil CoA y de equivalentes reductores que son oxidados por la cadena de transporte de electrones (CTE) para la generación de moléculas de adenosina trifosfato (ATP) en la mitocondria.

El proceso de oxidación-reducción de las coenzimas se lleva a cabo en la membrana mitocondrial interna mediante los complejos respiratorios y proteínas accesorias que resultan en la reducción de O_2 a H_2O y en el establecimiento de un gradiente electroquímico de protones que impulsa la síntesis de ATP por la ATP sintasa (Mitchell P, 1968). Los centros redox en tales proteínas consisten de centros hierro-azufre,

citocromos, grupos hemo/Cu y flavinas (Schägger et al., 2001, Schäfer et al., 1996). La cadena respiratoria en los mamíferos está compuesta por cinco complejos: el complejo I (NADH: ubiquinona oxidoreductasa) que contiene un grupo prostético de flavín-mononucleótido (FMN) junto a 8 grupos hierro-azufre que acopla la transferencia de electrones del NADH a la coenzima Q (CoQ) con la translocación de cuatro protones hacia el espacio intermembranal. Este complejo tiene un peso molecular de alrededor de 1000 kDa con 45 subunidades polipeptídicas, de las cuales siete están codificadas por el genoma mitocondrial (Gnandt et al., 2016). El complejo II: succinato-coenzima Q oxidoreductasa o succinato deshidrogenasa (SDH) es una proteína heterotetramérica embebida en la membrana interna mitocondrial que tiene como grupo prostético al cofactor flavín-adenín-dinucleótido (FADH), que posee una cabeza hidrofílica expuesta hacia la matriz mitocondrial en donde se cataliza la oxidación de succinato a fumarato en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (Vives- Bauza et al., 2010). El complejo III: ubiquinol-citocromo c oxidoreductasa, es el tercer complejo de la cadena de transporte de electrones y forma un dímero estable. Este complejo es una proteína multimérica transmembranal codificada por los genomas nuclear y mitocondrial y contiene 11 subunidades, y una masa de 248 kDa por monomero. El complejo IV (citocromo c oxidasa) es una proteína integral de membrana que incluye varios grupos prostéticos y 13 subunidades, diez subunidades codificadas por el genoma nuclear y tres por el genoma mitocondrial. Este complejo contiene hemo a y hemo a₃, así como dos átomos de Cu. El complejo V (ATP sintasa o F₁F₀) es una enzima transmembranal que cataliza la conversión de ADP y Pi a ATP utilizando el gradiente electroquímico generado por el bombeo de protones de los complejos I, III y IV. Se compone de dos partes: una región soluble y catalítica de cara a la matriz mitocondrial (F₁) y un segmento transmembranal (F₀) con actividad de hemicanal, el complejo tiene una masa total de 750 kDa (Wittig et al., 2010 y Jonckheere et al., 2012).

1.5 ORGANIZACIÓN DE LOS COMPLEJOS RESPIRATORIOS MITOCONDRIALES

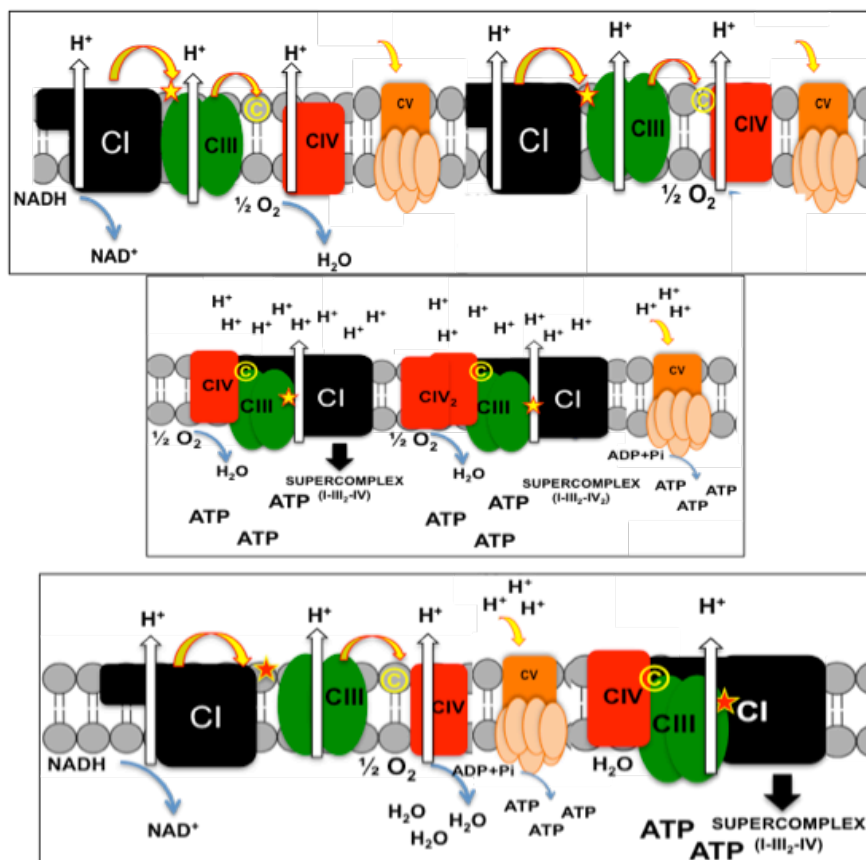
Como se describe en la figura 1, se han propuesto tres modelos para describir las asociaciones entre los complejos respiratorios: 1) El modelo de estado fluído en el que

se representa a los complejos respiratorios físicamente dispersos en la membrana interna mitocondrial, conectados por grupos de acarreadores móviles de electrones (citocromo c y CoQ). Este modelo se estableció después de determinar los coeficientes de difusión de todos los componentes redox y comparar las frecuencias calculadas de colisión/difusión con las velocidades de transporte de los electrones (Gupte et al., 1984). La transferencia máxima de electrones fue más lenta que el límite establecido por la difusión lateral, por lo tanto, se concluyó que no eran necesarias cadenas, conjuntos o agregados de los componentes redox para el transporte de electrones. 2) El modelo de estado sólido, que aunque fue propuesto por primera vez por Chance y Williams (1955), quedó plenamente establecido por Schägger y Pfeiffer en el año 2000. Estos investigadores, mediante el uso de electroforesis nativa azul (BN-PAGE), mostraron evidencias estructurales de que los complejos respiratorios en mitocondrias de levadura no solo se distribuyen aleatoriamente en la membrana interna mitocondrial y se conectan a través de citocromo c y CoQ, sino que están organizados en estructuras supramoleculares. 3) Actualmente, ambos modelos han sido fusionados y transformados en un tercer modelo, llamado modelo de plasticidad, en el cual coexisten formas de difusión libre y asociadas en supercomplejos de la cadena respiratoria mitocondrial en un equilibrio dinámico (Acín Pérez et al., 2014).

Todos los complejos mitocondriales, excepto la succinato deshidrogenasa (complejo II) se organizan en supercomplejos en los mamíferos (Eubel et al., 2004). El complejo I, se asocia con el complejo III en una relación 1:2 (I_1-III_2) y con una o más copias del complejo IV ($I_1-III_2-IV_n$) (Schägger y Pfeiffer, 2000). Las superestructuras conformadas por $I_1-III_2-IV_1$ se denominan "respirosomas", porque esta unidad básica permite la transferencia de electrones del NADH al oxígeno (Acín-Pérez et al., 2008); estos autores también demostraron que el respirosoma contiene CoQ y citocromo c y que el consumo de oxígeno se inhibe en presencia de inhibidores específicos clásicos, como la rotenona, la antimicina y el cianuro. En 2007, se obtuvo el primer mapa tridimensional de un supercomplejo de bovino ($I_1-III_2-IV_1$) mediante análisis de microscopía electrónica. Con este mapa tridimensional, se determinaron las posiciones y orientaciones de todos los complejos individuales en el supercomplejo, se localizaron los sitios de ubiquinona y citocromo c y también se mostró que el sitio de unión del transportador de electrones de

cada complejo es proximal al sitio de unión del complejo sucesivo en la cadena respiratoria, proporcionando evidencia estructural de que las distancias de difusión para los portadores de electrones móviles podrían facilitar su interacción con los complejos respiratorios (Schäfer et al. al., 2007), sumando evidencias a la hipótesis de la canalización directa de los sustratos dentro del supercomplejo. Además del respirosoma (I_1 -III₂-IV_n), se ha propuesto que la ATP sintasa también puede dimerizarse proporcionando un marco estructural para la formación de las crestas mitocondriales (Wittig et al., 2006).

Por otro lado, se ha propuesto que los supercomplejos pueden organizarse en un nivel estructural mayor. Esta hipótesis deriva de los estudios de Allen et al., quienes en 1989 describieron proyecciones más grandes (13 × 22-nm) que las correspondientes a las proyecciones de 9 nm de la F₁-ATPasa en la membrana mitocondrial interna. Un análisis posterior de tales proyecciones llevó a la idea de que tales estructuras podrían corresponder a respirosomas que forman ensamblajes más grandes. Wittig et al. (2006) propusieron un modelo en mitocondrias de *Paramecium multimicronucleated* en el que la asociación de los supercomplejos (I_1 -III₂-IV₄) genera "cadenas respiratorias" (conjuntos lineales de supercomplejos respiratorios), (Figura 1).



Modelo de estado líquido

Modelo de estado Sólido

Modelo de plasticidad

Figura 1: Modelos de la cadena respiratoria mitocondrial en complejos y supercomplejos. A) modelo de estado líquido, B) modelo de estado Sólido y C) modelo de plasticidad CI= complejo I, CII= complejo II, CIII= complejo III, CIV= complejo IV, CV=complejo V, EIM= espacio intermembranal.

1.6 TÉCNICAS PARA DETECTAR SUPERCOMPLEJOS RESPIRATORIOS

El estudio de estas estructuras supramoleculares se lleva a cabo comúnmente en geles nativos con o sin la adición del azul brillante de coomassie G-250, BN-PAGE (electroforesis nativa en geles azules de poliacrilamida, por sus siglas en inglés) o CN-PAGE (electroforesis nativa en geles claros de poliacrilamida, también por sus siglas en inglés). Estas técnicas proporcionan una plataforma de separación que permite el análisis de complejos proteicos a una escala proteómica en un solo experimento (Krause et al., 2006), superando la desafiante tarea de desentrañar las interacciones proteína-proteína *in vivo*. BN-PAGE es un método en el que la disociación de las subunidades o la pérdida de actividades enzimáticas se previene fijando el pH a 7,5 y añadiendo el colorante aniónico Coomassie blue G-250 a la muestra y al amortiguador de corrida. El azul de coomassie se une a las proteínas de membrana y a algunas proteínas solubles, preservando la asociación entre proteínas y confiriendo una carga neta negativa a los complejos. La unión del colorante disminuye la agregación de proteínas solubilizadas con detergente y hace innecesario incluir más detergente en el gel, las proteínas migran al ánodo y se separan de acuerdo con su tamaño (Krause et al., 2006). Las proteínas de membrana deben extraerse del ambiente lipídico con detergentes de naturaleza no iónica que no interrumpen las interacciones proteína-proteína antes de BN-PAGE o CN-PAGE. Los detergentes que proporcionan una extracción eficiente y particularmente suave de complejos proteicos de membranas mitocondriales de mamíferos son el n-dodecil-B-maltósido (DDM) (Schägger y Pfeiffer, 2000; Choksi et al., 2004), el p-isooctilfenoxipolietoxietanol (Triton X-100) (Tomasetig et al., 2002) y la digitonina (Saeki et al., 2000; Shinzawa-Itoh et al., 2016).

Por otro lado, el uso de la CN-PAGE está restringida a especies de proteínas con carga negativa neta intrínseca, ya que no se incluye en el ensayo el colorante azul de Commassie G-250. Sin embargo, existen informes de que hay rendimientos mayores de los complejos de la fosforilación oxidativa obtenidos por CN-PAGE que por BN-PAGE, lo que indica que la detección exitosa de las interacciones proteína-proteína depende de proteínas específicas y de una solubilización eficiente por el detergente (Krause et al., 2005). Las ventajas de usar este método son que las interacciones proteína-proteína no se ven afectadas por el colorante aniónico, por lo que los complejos proteicos son menos susceptibles de disociarse y los geles incoloros son más adecuados para detectar actividades enzimáticas en el gel.

La electroforesis nativa en geles azules de poliacrilamida se puede combinar con geles de segunda dimensión, técnica mejor conocida como sistema 2D-BN / dodecilsulfato de sodio SDS-PAGE, que permite la separación de los supercomplejos y de las subunidades que constituyen cada complejo y SC. La base de este sistema 2D es un paso de desnaturalización y la separación de las subunidades de cada complejo/ supercomplejo (Sunderhaus et al., 2007).

Una técnica menos utilizada, pero muy conveniente para el estudio de estas estructuras es la centrifugación en gradiente de sacarosa, que separa los complejos de proteínas mitocondriales por tamaño, después de ser solubilizados con digitonina (Hanson et al., 2001). Las fracciones obtenidas se separan posteriormente en BN-PAGE y la composición de complejos específicos se evalúa mediante inmunodetección. Con ayuda de esta técnica se pueden realizar ensayos funcionales, así como otras determinaciones (por ejemplo, contenido de fosfolípidos y/o de acarreadores móviles) (Shinzawa-Itoh et al., 2016).

1.7 FACTORES INVOLUCRADOS EN LA FORMACIÓN DE SUPERCOMPLEJOS

Existen dos hipótesis sobre cómo se forman los supercomplejos: la primera es que se forman por la asociación ordenada de complejos pre-ensamblados (Acín-Perez et al., 2008) y la segunda, que los SC conforman las unidades estructurales para el "respirosoma", pero que también se requieren para que se complete el ensamblaje del

CI (Marques et al., 2007). Las evidencias a favor de la segunda propuesta fueron proporcionadas por Moreno-Lastres, et al. (2012), quienes tras evaluar la incorporación temporal de subunidades codificadas por el DNAm_t en SC, descubrieron que el complejo I se ensambla en una entidad de 830 kDa, pero que las subunidades faltantes, NDSUFS4 y NDUFV1, sólo se incorporan después de la asociación del complejo de 830 kDa con subunidades del Complejo III y del Complejo IV.

1.7.1 CARDIOLIPINA

La cardiolipina (CL) es un fosfolípido ácido que se encuentra casi exclusivamente en la membrana mitocondrial interna y que representa del 10 al 15% del contenido total de lípidos en tales organelos (Hotch, 1992). La cardiolipina no sólo estabiliza la estructura y función de los componentes individuales de la cadena de transporte de electrones mitocondrial, sino también a los supercomplejos respiratorios en diferentes organismos (Mårtensson et al., 2017). Se ha demostrado que en levaduras, la CL es necesaria para la reconstitución de los complejos III y IV de los SC la eliminación del gen que codifica para la proteína requerida para la remodelación de cardiolipina conduce a defectos de crecimiento en fuentes de carbono no fermentables y promueve la liberación selectiva de un monómero del complejo IV del supercomplejo III₂-IV₂ (Gonzalvez F et al 2013; McKenzie M et al., 2006). Además, la alteración en la remodelación de la CL se asocia con la inestabilidad de los SC en pacientes con síndrome de Barth (McKenzie et al., 2006).

1.7.2 FOSFATIDILETANOLAMINA

La fosfatidiletanolamina (PE) es un fosfolípido zwitteriónico que no forma bicapas, es el fosfolípido más abundante en la membrana interna mitocondrial (Speelmans et al., 1997). Los experimentos en levadura muestran que la estabilidad de los supercomplejos respiratorios no se ve comprometida cuando disminuyen los niveles de PE y, por el contrario, que se promueve la formación de estructuras más grandes compuestas por el complejo III y el complejo IV (Böttinger et al., 2012).

1.7.3 FOSFATIDILCOLINA

Por otro lado, el papel de la fosfatidilcolina (PC) en el ensamblaje de los SC no está claro. Schuler et al. (2016) informaron que la disminución de PC no afecta la estabilidad y la actividad de los supercomplejos respiratorios en levaduras; mientras que otro grupo encontró en levadura que la reducción de PC se acompaña con crestas desorganizadas y con disminución de los SC I-III₂-IV_n (Horibata et al., 2016). Estos resultados controversiales podrían sugerir que se requiere de una cantidad umbral de PC para la formación y estabilidad de los supercomplejos.

1.7.4 Rcf1

Las subunidades estructurales de la citocromo oxidasa, Rcf1 y Rcf2 (Supercomplejo respiratorio 1/2) se describieron por primera vez en levaduras (Vukotic et al., 2012). Estos autores demostraron que los SC III₂-IV₂ disminuyen drásticamente en las mitocondrias mutantes que carecen de Rcf1 (Rcf1Δ). De acuerdo con estos datos, García-Villegas et al. (2017) encontraron el mismo fenotipo en la levadura al eliminar el carbono terminal de la subunidad Cox1 de la citocromo c oxidasa (Cox1ΔC15), lo que sugiere que Cox1 podría interactuar con Rcf1. Además, en las líneas celulares híbridas obtenidas después de la fusión de plaquetas de pacientes con osteosarcoma y células p⁰, se relacionó el aumento en las formas truncadas de la proteína Cox1 con la reducción y/o desestabilización de los CI y CIII de supercomplejo I₁-III₂-IV₁ (Horning-Do et al. , 2012). Otros estudios en levadura muestran a Rcf1 asociado con supercomplejos que contienen citocromo bc1-Cox, mientras que en las cepas que expresan bajos niveles de Rcf1, el supercomplejo que contiene citocromo oxidasa-bc1 fue más lábil al tratamiento con detergente y realizó menos asociaciones en SC (Strogolova et al., 2016). Es relevante tener en cuenta que Rcf1 tiene homólogos en otros eucariontes, incluidas las variantes humanas, que interactúan con el complejo bc1 y median la formación de SC.

1.7.5 PROTEÍNA FACTOR 1 DE ASOCIACIÓN EN SUPERCOMPLEJOS

Los experimentos realizados en dos cepas de ratones, cada una de las cuales expresa una isoforma del factor I de asociación en supercomplejos (SCAFI), también conocido como COX7A2L o Cox7rp, llevaron a la propuesta de que esta proteína favorece la interacción entre los complejos III y IV. Al comparar la organización de supercomplejos

en mitocondrias de diferentes tejidos en ratones CD1 y C57BL/6JB57, se encontró que la isoforma larga de la cepa CD1 (113 aminoácidos) estaba presente en todos los supercomplejos que contenían CIII y CIV; mientras que la cepa C57BL / 6JB57 que contiene la isoforma más corta (111 aminoácidos) tiene niveles más bajos de SCAFI y menos supercomplejos III_2IV_1 y $I_1III_2IV_1$. Se concluyó que SCAFI funciona como puente entre CIII y CIV, que la conformación de la isoforma corta se modifica de manera que interactúa con CIII pero no con CIV y que la subunidad COX7A2 de CIV se reemplaza por SCAFI en supercomplejos que contienen CIII y CIV y por COX7A1 en los dímeros del CIV (Cogliati et al., 2016). En líneas celulares humanas, se requiere SCAFI para la estabilidad de los SC formados por III_2-IV , pero su eliminación no afecta los niveles de complejos libres III, IV o de los respirasomas, ni tiene impacto en la respiración mitocondrial, lo que sugiere la coexistencia de mecanismos reguladores independientes para la biogénesis y recambio de los supercomplejos que contienen III_2-IV y de los respirasomas (Pérez-Pérez et al., 2016).

También se ha propuesto que SCAFI regula la generación de energía y contribuye a la homeostasis metabólica. El ratón KO para *Cox7rp* muestra una disminución de la actividad muscular en el frío asociada con una menor actividad de la Cox y una disminución en la producción de ATP (Ikeda et al., 2013). Los diferentes acervos genéticos de SCAFI (largo / corto) afectan la formación de SC en ratones con hepatopatía. Los roedores que expresan el alelo largo de SCAFI forman supercomplejos III_2-IV y por $I-III_2-IV$ y aunque los niveles de SCAFI fueron menores en los ratones homocigotos para el alelo corto, la función de la cadena respiratoria no se vio afectada (Davoudi et al., 2016). Por lo tanto, aunque la SCAFI compromete el ensamblaje de los SC, no parece ser crucial para que los complejos respiratorios funcionen al menos en las mitocondrias hepáticas.

1.8 ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO COMO SUBPRODUCTOS DE LA RESPIRACIÓN MITOCONDRIAL

Las ERO son derivados del oxígeno que presentan una alta reactividad con los lípidos, las proteínas y los ácidos nucleicos. Dependiendo de su concentración, localización y el

contexto molecular en que se produzcan, pueden ser benéficos o perjudiciales para la célula. Se ha demostrado que a niveles fisiológicos, las ERO pueden regular procesos celulares como la activación de cinasas/fosfatasa y la expresión génica. Por el contrario, la generación excesiva de ERO contribuye a la muerte celular por necrosis y apoptosis, así como al desarrollo de diferentes patologías.

Las ERO se producen principalmente como subproductos de la respiración mitocondrial al fugarse los electrones de la cadena transportadora de electrones y reaccionar con el oxígeno. Los iones superóxido ($O_2^{\cdot-}$), son las especies primarias generadas por la CTE que pueden convertirse en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) mediante la acción de la superóxido dismutasa. En presencia de metales de transición, el H_2O_2 se transforma en radicales hidroxilo ($\cdot OH$), que son considerados las ERO más reactivas y dañinas.

Las mitocondrias son fuente, pero también blanco del daño por ERO; se sabe por ejemplo, que el daño al DNA mitocondrial induce alteraciones de las subunidades de los complejos respiratorios codificadas en el genoma mitocondrial, lo que trae consigo la disminución en la transferencia de los electrones y la generación de mayores niveles de ERO, estableciéndose un círculo vicioso al aumentar el estrés oxidante y disminuir la capacidad energética de la célula.

1.9 LOS SUPERCOMPLEJOS Y SU PAPEL FISIOLÓGICO

Se ha sugerido que algunos supercomplejos podrían servir como precursores para el ensamblaje de complejos individuales completos (Marques et al. 2007). Incluso se ha propuesto que el respirasoma podría aumentar potencialmente la eficiencia del transporte de electrones al reducir la distancia de difusión de los portadores móviles entre complejos respiratorios o al promover la canalización de sustratos (aunque sigue siendo una hipótesis) (Bianchi et al., 2004), evitar la generación de ERO manteniendo una alta tasa de transporte de electrones (Maranzana et al. al., 2013) e incluso desempeñar funciones adicionales, como lo sugieren las interacciones observadas de los respirasomas con los componentes de la maquinaria de importación de proteínas y con el translocador de ADP / ATP (Nübel et al., 2009).

1.10 CAMBIOS EN LA ORGANIZACIÓN DE LOS SUPERCOMPLEJOS DE LA CADENA RESPIRATORIA MITOCONDRIAL EN CONDICIONES PATOLÓGICAS.

Se ha propuesto que los ensamblajes en SC previenen la producción de ERO, por lo que el mantener estas estructuras evitaría la disfunción mitocondrial y el establecimiento de un círculo vicioso de generación de ERO en condiciones patológicas. La asociación entre la producción de ERO y la formación de SC ha sido poco explorada, el vínculo más obvio es con el síndrome de Barth, caracterizado por la disminución de los niveles de cardiolipina. Otros escenarios patológicos incluyen enfermedades neurológicas y cardiovasculares (Figura 2).

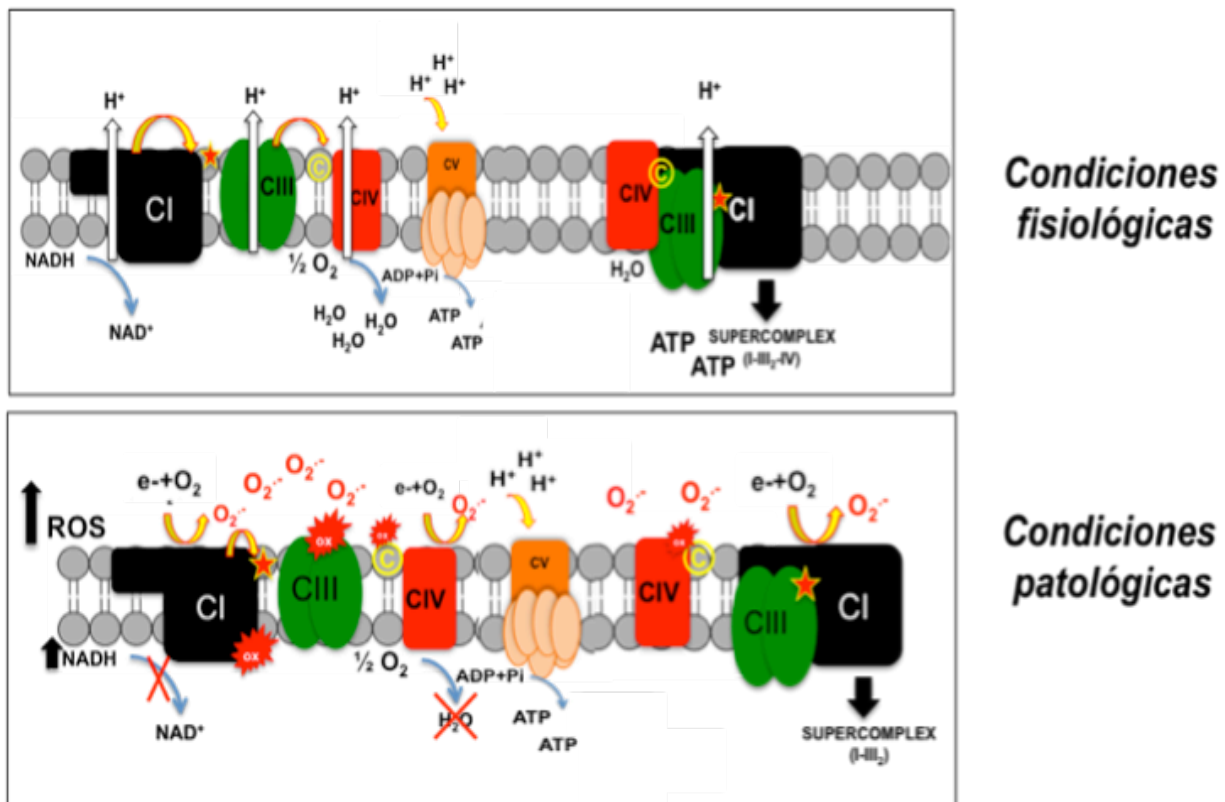


Figura 2: Cambios propuestos en el ensamblaje de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial en supercomplejos. A) condiciones fisiológicas y B) condiciones patológicas.

condiciones patológicas, CI= complejo I, CII= complejo II, CIII= complejo III, CIV= complejo IV, CV=complejo V, EIM= espacio intermembranal.

1.11 ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS

El cerebro también es un órgano con alta demanda de energía y en consecuencia, la disfunción mitocondrial está implicada en la etiología y la patogenia de las enfermedades neurodegenerativas (Coskun et al. 2012; Finsterer 2006; Orth & Schapira 2002; Zeviani & Carelli 2003; Lessing & Bonini 2009) .

La eficiencia energética mitocondrial y la producción de ERO se ha evaluado tanto en astrocitos como en neuronas, para saber el papel de los supercomplejos I-III₂ y I-III₂-IV. Al utilizar diferentes especies/cepas de roedores que tienen (o no) la capacidad de ensamblar CIV en SC, se encontró que la actividad del CI es mayor en los astrocitos que en las neuronas obtenidas de los animales en los que se pueden formar I-III₂-IV. Por otro lado, el Complejo I se ensambla predominantemente en SC (I-III₂) en neuronas de la cepa de ratones C57BL/6, mientras que en los astrocitos el complejo se organizó principalmente en su forma libre. Se determinó además que el aumento del Complejo I libre correlaciona con una mayor producción de ERO. Además, la subunidad NDUFS1 del CI fue más abundante en las neuronas que en los astrocitos y cuando se sobreexpresó en los astrocitos, promovió la incorporación del complejo I en supercomplejos, disminuyendo las ERO. Por lo tanto, los autores concluyeron que el ensamblaje del complejo I en supercomplejo I-III-IV regula la producción de ERO y puede explicar las diferencias bioenergéticas observadas entre neuronas y astrocitos (López Fabuel et al., 2016). Otros grupos también proponen un vínculo causal entre los supercomplejos que contienen CI y CIV y la enfermedad de Parkinson, debido a que la deficiencia del CI se ha relacionado con esta patología (Schapira et al., 1989).

La enfermedad de Huntington (HD) causada por la expansión de una secuencia de trinucleótidos CAG en la proteína huntingtina, se ha relacionado con una función mitocondrial alterada. Un estudio reciente en linfoblastos humanos con la HD mostró que el consumo de oxígeno, la respiración basal (Edo 2), la eficiencia de acoplamiento y la disminución de la actividad del complejo I, se asocia con la preservación del

ensamblaje de supercomplejos mitocondriales (Mejia et al., 2016). Por otro lado, se describió que una variante sin sentido del factor de ensamblaje NDUFAF4 del complejo I en un paciente con síndrome de Leigh, promueve la disminución del complejo I, así como la alteración en la estequiometría de los supercomplejos I-III₂ y I-III₂-IV_n (Baertling et al., 2017); ambas alteraciones contribuyen al entendimiento del fenotipo neuronal de esta enfermedad.

1.12 ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES

1.12.1 SÍNDROME DE BARTH

Las mutaciones en el gen TAZ están asociadas con el síndrome de Barth, un trastorno frecuentemente mortal relacionado con el cromosoma X. Los pacientes con el síndrome desarrollan miocardiopatía, debilidad en los músculos y neutropenia. El gen TAZ codifica a Tafazzina, una fosfolípido aciltransferasa necesaria para la remodelación de cardiolipina. En pacientes con síndrome de Barth, se observan concentraciones anormalmente bajas de cardiolipina, modificaciones de la cadena del acilo y acumulación de la forma precursora monolisocardiolipina (McKenzie M et al., 2006). El síndrome de Barth está relacionado con la pérdida de especies maduras de cardiolipina y se ha relacionado con una biogénesis deficiente del complejo I, actividades respiratorias disminuidas y con supercomplejos de la cadena respiratoria inestables. Las mutaciones de este gen están asociadas a la disociación del respirosoma I-III₂-IV₁. Se ha observado, por ejemplo, que el complejo I se disocia más fácilmente de los SC y que la interacción entre los complejos I y III₂ disminuye (McKenzie et al., 2006). Otros autores informaron que la deficiencia de cardiolipina en los linfoblastos de pacientes con síndrome de Barth se relaciona con inestabilidad del SC I-III₂-IV_n y que el complejo IV se disocia fácilmente. En los linfoblastos inmortalizados de estos pacientes, la producción anormal de cardiolipina se relacionó con alteraciones mitocondriales y con desestabilización del respirosoma y de SCs conformados por I-III₂ y III₂-IV, mientras que no se detectaron cambios en los niveles de los complejos monoméricos II y III. Como también se encontró un aumento en la masa mitocondrial, se propuso que un aumento compensatorio en el contenido mitocondrial podría mitigar la disminución en la

respiración mitocondrial y la síntesis de ATP en pacientes con síndrome de Barth (Gonzalvez et al., 2013).

1.12.2 FALLA CARDÍACA

La falla cardíaca (HF) es una condición en la que existe un desequilibrio entre la función cardíaca y la energía necesaria para sostener esta tarea. Los factores que predisponen a la insuficiencia cardíaca incluyen el infarto agudo de miocardio, el inicio gradual de la hipertensión sistémica, la inflamación del miocardio, la insuficiencia valvular, la cardiopatía coronaria y/o la cardiomiopatía. La disfunción cardíaca activa tanto el sistema nervioso adrenérgico o simpático (SNS) como el sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAAS), que aumenta la retención de agua y promueve la carga de trabajo cardíaco en un esfuerzo por preservar la presión arterial. Si se mantiene esta condición, la respuesta neurohormonal puede activar el programa genético fetal, lo que produce una remodelación estructural del corazón y la dilatación de la cámara. Aunque el aumento en la demanda de energía en esta condición se ha relacionado con la disminución de los valores de control respiratorio y con niveles más bajos de complejos respiratorios, pocos grupos han analizado los cambios en la organización de SC en la insuficiencia cardíaca. Scolletta et al., (2010) y Rosca et al. (2008) detectaron variaciones en la cantidad de SC de mitocondrias tanto subsarcolemales como interfibrilares en un modelo canino de insuficiencia cardíaca. Posteriormente, se informó que la disminución de los SC productivos (I₁-III₂-IV) es independiente de la oxidación de CL (Rosca et al., 2011) y que las alteraciones oxidativas en los complejos respiratorios junto con la interrupción de los SC coinciden con la activación adrenérgica inicial en HF (Rosca et al., 2013). Recientemente, se demostró que la actividad del complejo I asociada con SC es menor en ratas con insuficiencia cardíaca (HF) que en ratas control (Wüst et al., 2016).

1.12.3 ISQUEMIA Y REPERFUSIÓN.

Existen evidencias experimentales que indican que los complejos de la CTE y los fosfolípidos de las membranas mitocondriales, son blanco del ataque de las ERO en esta condición patológica. A la fecha sólo existe un informe que aborda los cambios en

la organización de los SC durante la isquemia reperfusión (IR). Jang et al. (2017) propusieron que las ERO producidas tras la apertura del poro de la transición de la permeabilidad mitocondrial PTPm desempeñan un papel causal en el desensamblaje de los SC en corazones reperfundidos de rata, ya que la inhibición del PTPm evitó la disminución en el contenido de SC y el aumento en la producción de ERO.

2. JUSTIFICACIÓN:

La disfunción mitocondrial no sólo está relacionada con trastornos monogénicos raros, sino que está estrechamente ligada con la progresión de enfermedades metabólicas, cardiovasculares y neurodegenerativas. La evidencia experimental sugiere que las estructuras de los SC se pierden en diferentes patologías o trastornos celulares y aunque no son concluyentes, algunas de ellas establecen un vínculo causal con la producción de ERO.

Para determinar si existe una relación entre la disociación de los SC, el estrés oxidante y la disfunción mitocondrial en mitocondrias de corazones isquémicos-reperfundidos, en este trabajo utilizamos el antioxidante N-acetil-L-cisteína (NAC) y la maniobra mecánica del Post-acondicionamiento. Esta estrategia mecánica, que se usó por vez primera en un modelo canino (Zhao et al., 2003) y que consiste en la aplicación de episodios breves de isquemia y reperfusión antes de establecer la reperfusión continua, activa diferentes mecanismos endógenos de protección que incluyen la disminución en la producción de ERO durante la reperfusión (Arreguín et al., 2012).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Analizar la relación entre el daño por isquemia-reperfusión y el estrés oxidante mitocondrial con los posibles cambios en la actividad y estabilización de los supercomplejos respiratorios mitocondriales de corazón.

3.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar la función cardíaca en los corazones sometidos a isquemia y reperfusión en presencia de diferentes concentraciones del antioxidante (N-acetil-L-cisteína; NAC) y tras la aplicación de la maniobra de Post-acondicionamiento en el sistema aislado tipo Langendorff.
- Evaluar la muerte celular en los corazones sometidos a los diferentes protocolos experimentales.
- Evaluar el efecto del NAC y del PostC sobre el estrés oxidante inducido por la isquemia reperfusión, en todos los grupos experimentales.
- Evaluar la función mitocondrial expresada como: estado 3, estado 4, control respiratorio (CR), ADP/O y respiración desacoplada (m-clorocarbonilcianuro fenilhidrazona CCCP), utilizando sustratos e inhibidores específicos de los complejos de la cadena respiratoria.
- Evaluar las actividades enzimáticas de los complejos respiratorios mitocondriales en los diferentes grupos experimentales por espectrofotometría.
- Identificar los posibles cambios en la organización de los supercomplejos determinando la actividad enzimática de los complejos respiratorios tanto en monómeros como en SC en geles BN-PAGE.
- Comprobar la identidad de los supercomplejos respiratorios por inmunodetección.

4. HIPÓTESIS

La disminución del estrés oxidante en corazones IR mantendrá la función cardíaca y mitocondrial al favorecer la estabilización y actividad de los supercomplejos respiratorios.

5. METODOS

5.1 ISQUEMIA-REPERFUSIÓN EN CORAZONES DE RATA UTILIZANDO EL SISTEMA AISLADO LANGENDORFF

Se utilizaron ratas Wistar machos de 300 a 350 gramos que fueron anestesiadas con pentobarbital sódico (60 mg/kg) en presencia de heparina sódica (1000 U/kg). Cinco minutos después se hizo una toracotomía y el corazón se extrajo y se montó en el sistema de corazón aislado Langendorff. Los corazones fueron perfundidos vía aorta, en modo retrógrado con un flujo constante de 12 mL/min con medio Krebs-Henseleit a pH 7.4.

5.1.2 GRUPOS EXPERIMENTALES

Grupo control: corazones sometidos a 110 min de perfusión continua; grupo isquémico-reperfundido (IR): corazones sometidos a 10 min de estabilización, 30 min de isquemia y 60 min de reperfundición; grupo isquémico-reperfundido + post-acondicionamiento (IR + PostC): corazones con el mismo protocolo que los IR, a los que justo antes de la reperfundición se les aplicaron 5 ciclos de 30 segundos de reperfundición y 30 segundos de isquemia; y grupo isquémico-reperfundido + N-acetil-L-cisteína (IR + NAC): corazones con el mismo protocolo de los IR, a los que justo antes de la reperfundición se les administró el antioxidante (0.5 mM) en el amortiguador de perfusión durante los primeros 15 minutos de la reperfundición (Figura 3).

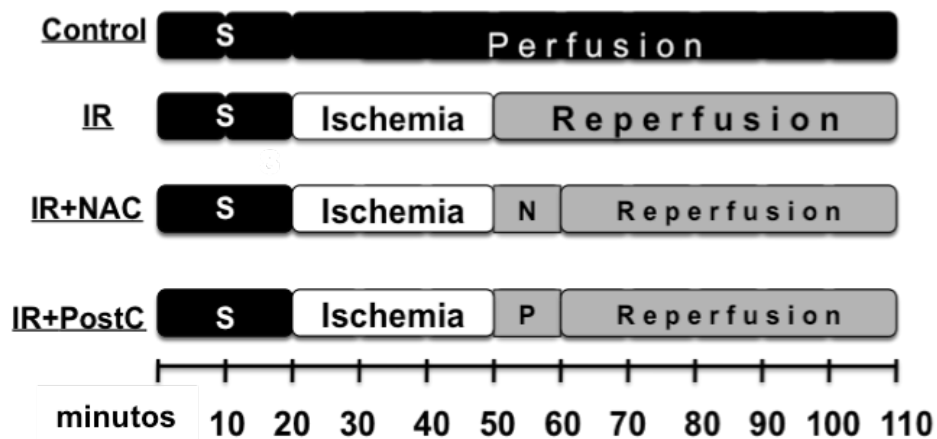


Figura 3: Grupos Experimentales: Control; Isquémico-reperfundido, IR; Isquémico-reperfundido+ N-acetil-L-cisteína, IR+NAC e Isquémico-reperfundido + post-acondicionamiento, IR+PostC.

5.2 TAMAÑO DEL INFARTO

Al finalizar cada uno de los protocolos, algunos de los corazones fueron extraídos y congelados a -20°C durante 30 minutos antes de ser cortados en 5 rebanadas de aproximadamente 3 mm. Las rebanadas se incubaron en una solución de 2,3,5-cloruro de trifetil tetrazolio al 1% en amortiguador de fosfatos (pH 7.4) a 37°C por 30 minutos. Posteriormente se analizaron las zonas necróticas que adquieren una coloración pálida, mientras que las zonas viables se tiñen de color rojo (Ertracht et al., 2014; Buelna-Chontal et al., 2011). La extensión del daño se registró mediante densitometría y el área del infarto se reportó como porcentaje, se analizaron todas las rebanadas del corazón usando el programa Image J y en la imagen se muestran solo las representativas. (NIH, Bethesda, MD, USA).

5.3 OBTENCIÓN DE MITOCONDRIAS

Al final de los experimentos se aislaron mitocondrias de los corazones por centrifugación diferencial. El corazón se colocó en solución amortiguadora que contenía sacarosa 250 mM, Hepes 9 mM, EGTA 1mM (SHE), pH 7.3 y se cortó en pequeños trozos. Se lavaron, homogeneizaron y se centrifugaron a 700 g durante 10 minutos para descartar núcleos y membranas celulares. Posteriormente, el sobrenadante se centrifugó a 8000 g durante 10 minutos. La nueva pastilla que contiene principalmente mitocondrias intactas, se lavó y resuspendió en 50 μL de la misma solución amortiguadora. Las centrifugaciones se realizaron a 4°C .

5.3.1 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA

La concentración de proteína se determinó por el método de Biuret, utilizando 100 μL de sulfato de cobre 1%, 2 mL de NaOH 8%, 100 μL desoxicolato de sodio 0.4% y 40 μL de muestras mitocondriales. Como estándar se utilizó albumina sérica de bovino (BSA, 100 μg). Todos los tubos, incluido el blanco, se llevaron a 3 mL finales con agua y se determinó la absorbencia a 540 nm.

5.4 PRODUCCIÓN DE ERO Y MARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO EN MITOCONDRIA

5.4.1 PRODUCCIÓN DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO

La producción de peróxido de hidrógeno se evaluó como un indicador de la generación de ERO. Las mitocondrias (0,250 mg/mL) se incubaron en un amortiguador de reacción que contenía sacarosa 100 mM, KCl 75 mM, Tris 5 mM, MgCl₂ 3 mM, EGTA 10 μM y KH₂PO₄ 1 mM, pH 7,4, más dihidroclorofluoresceína (DCF) 0,1 μM y 1 U/mL de peroxidasa de rábano. La fluorescencia de la DCF oxidada se amplifica por la transferencia de electrones desde la peroxidasa a DCF durante la reducción del H₂O₂, tras la dismutación del anión superóxido. Las mitocondrias se energizaron con malato/glutamato (5:3 mM) o con succinato (10 mM). Se utilizó antimicina A (AA; 5 μM) o rotenona (1 μM) para incrementar la producción de ERO. La oxidación de DCF se monitorizó a $\lambda_{ex} = 475$ nm (slit 4 nm) y $\lambda_{em} = 525$ nm (slit 4 nm) en un espectrofluorómetro Perkin-Elmer LS50B a 30°C. Las pendientes de los trazos obtenidos después de la adición del sustrato y/o inhibidor se compararon contra una curva estándar generada al agregar cantidades conocidas de H₂O₂ al amortiguador de reacción que contiene DCF, peroxidasa de rábano y mitocondrias, como se describió anteriormente (Ruíz-Ramírez et al., 2011).

5.4.2 LIPOPEROXIDACIÓN

La oxidación de lípidos se cuantificó por medio de la concentración de malondialdehído (MDA) de acuerdo con Guerrero-Beltrán et al., 2009. Se añadió 1 mg de proteína mitocondrial a un medio que contenía 1-metil-2-fenilindol 15.4 mM en una solución de acetonitrilo:metanol (3:1). La reacción se inició agregando 150 μL de HCl al 37% y se incubó durante 40 minutos a 45°C con un volumen final de 1 mL. Luego las muestras se centrifugaron a 3000 g durante 5 min y se midió la densidad óptica del sobrenadante. El método se basa en la formación de un cromóforo estable con una intensidad máxima de absorbencia a 586 nm. Los resultados se expresan en nmol de MDA por miligramo de proteína vs. una curva estándar de tetrametoxipropano (TMPO).

5.4.3 CARBONILACIÓN DE PROTEÍNAS

La oxidación de proteínas se determinó con el ensayo de detección de oxidación de proteínas OxyBlot™ (Merck-Millipore, Darmstadt, Alemania). En resumen, dos alícuotas de cada muestra mitocondrial (20 ~ 40 µg) y se desnaturalizaron agregando una concentración final de SDS al 10%. Una alícuota se derivatizó a 2,4-dinitrofenilhidrazona (DNP) con 2,4-dinitrofenilhidracina (DNPH), mientras que la alícuota utilizada como control negativo se incubó con 10 µL de solución de control. Luego, las muestras se neutralizaron y se separaron mediante SDS-PAGE, se transfirieron a membranas de PDVF y se incubaron con anticuerpos de conejo anti-DNP (dilución 1: 150) en PBS-Tween 0.01% (PBS-T) que contenía 1% de albúmina de suero bovino. Se utilizaron anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano (dilución 1: 300) y un reactivo quimioluminiscente para la detección de la señal.

5.4.4 RELACIÓN GLUTATIÓN REDUCIDO/GLUTATIÓN OXIDADO (GSH/GSSG)

Como marcador del estado redox en las mitocondrias se determinó la relación GSH/GSSG. El glutatión reducido (GSH) se evaluó fluorométricamente según lo descrito por Galván-Arzate et al., 2005. Brevemente, se derivatizaron mitocondrias frescas (15 µg) con 100 µL de o-ftalaldehído (OPA, 1 mg/mL) y se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente en un volumen final de 2 mL. La fluorescencia se midió a $\lambda_{ex} = 350$ y $\lambda_{em} = 420$ nm en un espectrofotómetro de luminiscencia LS50B (Perkin Elmer, Waltham, MA). Se utilizaron muestras gemelas en paralelo para evaluar el glutatión oxidado (GSSG). Las mitocondrias de una de las alícuotas se incubaron durante 30 minutos con 100 µL de N-etilmaleimida 40 mM (NEM) para evitar que el grupo -SH libre de glutatión reaccionara con OPA. Luego, las muestras se mezclaron con 4,3 mL de NaOH 0,1 N (pH 12) para inducir la reducción de GSSG. Finalmente ambas muestras se incubaron con 50 µg de OPA durante 20 minutos y se determinó la fluorescencia (Hissin PJ et al., 1976). Al segundo valor (GSH + GSSG) se le restó el valor obtenido en la primer alícuota (GSSG) para obtener los niveles de GSH. Los resultados se normalizaron por mg de proteína y se expresaron como GSH / GSSG.

5.5 CONSUMO DE OXÍGENO EN MITOCONDRIAS AISLADAS

El consumo de oxígeno en las mitocondrias aisladas se cuantificó usando un electrodo de oxígeno tipo Clark en presencia de los siguientes sustratos: a) glutamato + malato y b) succinato + rotenona. Se adicionaron 2 mg de proteína mitocondrial a 1.7 mL del medio KME: KCl 12 mM, HEPES 10 mM, fosfato inorgánico 3 mM con malato de sodio 10 mM y glutamato de sodio 10 mM a pH 7.3. Para iniciar el consumo de oxígeno a partir del CII, se reemplazó el glutamato-malato por succinato 10 mM + 1 $\mu\text{g/mL}$ de rotenona. El estado 4 se registró en condiciones basales, mientras que el estado 3 se registró tras estimular la respiración con ADP (200 μM).

El control respiratorio (CR) es la relación entre el consumo de oxígeno en estado 3 y el estado 4; la velocidad máxima del consumo de oxígeno se obtuvo al adicionar 1 μM del desacoplante CCCP y la eficiencia de acoplamiento (ADP/O) se obtuvo calculando el número de moléculas de ADP que se convierten en ATP por el número de moléculas de oxígeno consumidas durante el estado 3.

5.6 DETERMINACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LOS COMPLEJOS RESPIRATORIOS MITOCONDRIALES

Complejo I: La actividad de la NADH:ubiquinona oxidoreductasa se determinó en 1 mL de amortiguador Tris 10 mM, pH 7.4. Se añadieron 50 μg de proteína mitocondrial, 10 μL de NADH 10 mM y 15 μL de DCPIP 6.3 mM, como aceptor de electrones al complejo enzimático. Como blanco se utilizó la misma mezcla con excepción de NADH y se leyó a 600 nm de absorbencia durante 10 minutos. Se comenzó cada reacción con NADH. Los valores fueron expresados como nmol DCPIP reducido/mg proteína/min.

Complejo II: La actividad de la succinato deshidrogenasa se determinó en 1 mL de amortiguador de fosfato de sodio 10 mM, pH 7.4. Se añadieron 50 μg de proteína mitocondrial, 10 μL de succinato 1 mM, 60 μL de PMS 5 mM y se incubó durante 10 minutos

a 25°C. La reacción se inició agregando 15 μ L de DCPIP 6.3 mM como aceptor de electrones. Se determinó el cambio de absorbencia a 600 nm durante 10 minutos. El blanco contenía todo excepto DCPIP. Los valores fueron expresados como nmol DCPIP reducido/mg proteína/min.

Complejo III: La actividad del complejo III:decil-ubiquinol citocromo c oxidoreductasa se cuantificó en una cubeta de 1 mL a la que se adicionaron 500 μ L de amortiguador de fosfato de potasio 0.5 M pH 7.5, 75 μ L de citocromo c oxidado 1mM, 50 μ L de KCN 10 mM , 20 μ L de EDTA 5 mM, pH 7.5, 10 μ L de Tween-20 y 30 μ g de proteína mitocondrial y se llevó el volumen a 1 mL con agua destilada.

La reacción se inició con 10 μ L de decilubiquinol 10 mM e inmediatamente se registró el incremento en la absorbencia a 550 nm y se continuó con la lectura durante 2 minutos. Los valores fueron expresados como nmol cit c reducido/mg proteína/min.

Complejo IV: La actividad de la citocromo c oxidasa, se determinó en una cubeta de 1 mL donde se adicionaron 50 μ l de amortiguador de fosfato de potasio 0.5 M, pH 7.5 y 1 mM de citocromo c reducido, se llevó a 1 mL de volumen final y se leyó la actividad basal durante 2 minutos a 550 nm. Se inició la reacción con 30 μ g de proteína mitocondrial y se continuó a 550 nm por 3 minutos más. Se comprobó la especificidad de la actividad del complejo IV adicionando 10 μ L de KCN 10 mM. Los valores fueron expresados como nmol cit c oxidado /mg proteína/min.

- **Preparación de 1 mM de citocromo c reducido** Se disuelven 110 mg de ácido ascórbico en 1 mL de amortiguador de fosfato de potasio 10 mM (pH 7.0) y luego se agregan algunos granos de Tris en polvo para obtener un pH de 6.5 a 6.8. El pH de la solución de ácido ascórbico no debe ser superior a 6.8. Se disuelven 250 mg de citocromo c en 1,2 mL de amortiguador de fosfato de potasio 10 mM (pH 7,0) y luego se agregan 0,3 mL de ácido ascórbico, la solución se incuba con agitación constante durante 1 hora a 4°C. La reducción del citocromo c dará lugar a un cambio de color de marrón a rosa-naranja. Se elimina el exceso de ácido ascórbico en solución usando una columna desaladora desechable PD10 previamente equilibrada con 50 mL de 10 mM de amortiguador de fosfato de potasio (pH

7,0). Se desechan las tres primeras gotas y luego se recoge la solución eluida del citocromo c reducido en varios tubos eppendorff de 1,5 mL (aproximadamente siete gotas en cada vial). Los viales se guardan en hielo.

Para verificar la eficacia de la reducción del citocromo c y evaluar la ausencia de ácido ascórbico residual en la solución, se determinó la absorbencia de una solución de citocromo c 50 μ M en una cubeta de 1 mL a 550 nm durante 2 minutos. La disminución de la absorbencia no debe exceder 0.005 por minuto. Se añade a la cubeta 1 μ L de una solución de ferricianuro de potasio diluida obtenida mediante la disolución de unos pocos cristales de ferricianuro en 10 mL de agua, esto resultará en la completa oxidación del citocromo c, y se siguió el cambio de absorbencia a 550 nm por 3 min.

Los valores de absorbencia deben ser estables. Cualquier incremento indica la presencia de ácido ascórbico residual en solución.

- Las alícuotas de esta solución se pueden almacenar bajo nitrógeno líquido durante varios años. Antes de usar, se diluye con agua destilada una parte de la alícuota de citocromo reducido a una concentración de 1 mM. La reducción efectiva del citocromo c debe verificarse calculando la relación de los valores de absorbencia a 550 nm versus 565 nm de esta solución a una concentración final de 20 μ M. Una relación mayor a 6 indicará que el citocromo c no se ha reoxidado y que está listo para ser utilizado (Spinazzi M. et al., 2012).

Complejo V: Para cuantificar la hidrólisis de Mg-ATP por espectrofotometría, se adicionaron 50 μ g de proteína mitocondrial, 200 μ L de HEPES 30 mM, 15 μ L de sulfato de magnesio ($MgSO_4$) 200 mM, 100 μ L de fosfoenolpiruvato (PEP) 50 mM, piruvato cinasa (PK) 0.1 μ M, 6 μ L de lactato deshidrogenasa (LDH) de 800-1000 Unidades/mg, 30 μ L de KCl 90 mM y 20 μ L de NADH 10 mM a 1 mL de agua desionizada. La reacción se inició con 10 mM de ATP. Los valores fueron expresados como nmol NADH oxidado/mg proteína/min.

5.7 SOLUBILIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS MITOCONDRIALES CON DIGITONINA

La preparación de la muestra con detergente se realizó con un stock de digitonina de 500 mg/mL. 8 µL de este stock (equivalentes a 4mg) en 2mg de proteína mitocondrial para obtener una relación final de (2:1) en un amortiguador 1 mM de succinato, 1mM de ATP, 4mM de bis-tris-ácido aminocaproico, las muestras fueron incubadas por 30 minutos en hielo para posteriormente ser ultracentrifugadas a 33,000g x 35 minutos a 4°C. Se probaron diferentes relaciones de proteína: digitonina hasta obtener la mejor extracción de los supercomplejos.

5.8 GELES NATIVOS AZULES (BN-PAGE)

Se separaron 100 µg de proteína mitocondrial mediante electroforesis en geles nativos azules de poliacrilamida (Schägger and Pfeiffer 2000; Eubel et al. 2003). Se utilizó una solución de acrilamida 30% (w/v) bisacrilamida 0.9% (w/v), para preparar geles en gradiente (3.5-10%) en presencia de ácido aminocaproico 1.5 M y Bis-Tris 150 mM, pH 7.0. El amortiguador de muestra contenía 75 mM de ácido aminocaproico y 0.3% azul Serva G-250 (w/v). La electroforesis se realizó a 4°C durante 16 horas a 30V.

El amortiguador del cátodo contenía 15 mM Bis-TRIS y 50 mM de tricina pH 7.0; el amortiguador del ánodo contenía 50 mM Bis-Tris, pH 7.0. Al finalizar la electroforesis se evaluó la separación de los complejos, tanto en forma monomérica como en supercomplejos tiñendo con azul brillante de Coomassie y se evaluaron las actividades enzimáticas en el gel de cada complejo respiratorio.

5.9 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LOS COMPLEJOS RESPIRATORIOS EN GELES NATIVOS AZULES

Complejo I: El gel se incubó en 20 mL de amortiguador de fosfato de potasio 10 mM pH 7.4, que contenía 10 mg de MTT (bromuro de tiazolil azul tetrazolio) y 7.5 mg de NADH, las bandas con actividad se observaron con claridad como precipitados violetas tras 10 minutos de incubación en agitación orbital y en la oscuridad.

Complejo II: El gel se incubó en 20 mL de amortiguador de fosfato de potasio 10 mM pH 7.4, que contenía 10 mM de succinato, 1.2 mg de PMS (P), 40 mg de MTT (bromuro de tiazolil azul tetrazolio) y 100 mM de EDTA, las bandas con actividad se observaron con claridad como depósitos violeta tras 20 minutos de incubación orbital en la oscuridad.

Complejo III (citocromo peróxidasa): El gel se incubó con 20 ml de amortiguador de acetato de sodio 20mM pH 5.0, 30 mM de peróxido de hidrógeno, mas 20mM de 3,3',5,5', tetrametilbencidina en metanol al70%, las bandas con actividad se observaron con claridad como depósitos azul claro tras 20 minutos de incubación orbital en la oscuridad.

Complejo IV: El gel se incubó en 20 mL de amortiguador de fosfato de potasio 10 mM pH 7.4, que contenía 1 mg/mL DAB (diaminobencidina), 4 mg de citocromo c y 2 unidades de catalasa, las bandas con actividad se observaron con claridad tras 10 minutos de incubación orbital, como depósitos pardos.

Complejo V: El gel se incubó en una solución de 20 mL de amortiguador de glicerol 10 mM más cloruro de magnesio 1mM, con 30 mg de perclorato de plomo y 500 µL de ATP 100 mM, todo se ajustó a pH 8.0 con trietanolamina para evitar la precipitación inespecífica del plomo. Las bandas con actividad se observaron como precipitados blancos tras 24 horas de incubación.

5.10 INMUNODETECCIÓN DE LOS COMPLEJOS RESPIRATORIOS EN CONDICIONES NATIVAS Y EN SEGUNDAS DIMENSIONES (2-D).

Los geles nativos se incubaron en 20 ml de glicina 0.192 M, Tris 0.025 M y SDS al 1% durante 60 min con agitación orbital constante y se transfirieron a membranas de difluoruro de polivinilidina (PVDF) durante 50 min a 25V. Posteriormente, las membranas se bloquearon con 5% de leche desgrasada en TBS-Tween 0.01% y se incubaron durante toda la noche con la anti- Ndufs4 (NADH deshidrogenasa; ab55540, Abcam, Cambridge, MA, USA; 1: 1000); proteína anti-UQCRFS1 (ubiquinol-citocromo c reductasa (ab14746, Abcam, Cambridge, MA, EE. UU; 1: 1000); anti-subunidad II de la citocromo c oxidasa (sc-514489,

Santa Cruz Biotechnology, EE. UU.; 1: 1000), anti-subunidad beta de la ATP sintasa (Abcam, Cambridge, MA, EE. UU., 1: 1000) y subunidad anti-COX7A2L de la citocromo c oxidasa (Proteintech, Rosemont, IL, EE. UU., 1: 1000). Se utilizaron anticuerpos secundarios a una dilución de 1: 25,000. También se evaluó el contenido de los complejos respiratorios en segunda dimensión (2-D), después de cortar los carriles de geles nativos evaluados para la actividad del complejo I por cada grupo experimental. Se incubaron en amortiguador de carga (Tris 50 mM, pH 8,8, DTT 50 mM, SDS al 2% y azul de bromofenol al 0,01%) por 5 minutos. Los carriles se colocaron horizontalmente sobre el gel de SDS-PAGE al 12% y se corrieron a 100-120 V por 2 horas en frío. Las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF durante 55 minutos a 15 V. Se bloqueó y se realizó la inmunodetección del complejo III con anti-UQCRCF1. Las señales se visualizaron con Gel Imaging System y se analizaron con ImageJ (NIH).

5.12 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se analizaron mediante la prueba ANOVA de una vía, seguida de análisis post-hoc por comparaciones múltiples usando la prueba de Tukey (GraphPad Prism versión 5.03, $p < 0.05$).

6. RESULTADOS

6.1 La N-acetilcisteína y el postcondicionamiento mantienen la función cardíaca y reducen el tamaño del infarto en corazones reperfundidos.

La función cardíaca se midió por la colocación de 2 electrodos conectados en la aorta del corazón y un balón de látex que se introdujo en el ventrículo izquierdo expresada como frecuencia cardíaca (HR), presión ventricular (LVDP) y como el doble producto (HR*LVDP) después de un periodo de 30 minutos de isquemia y 1 hora de reperfusión (grupo IR) se perdió por completo en comparación con el grupo control, el cual mantuvo el trabajo cardiaco constante hasta el final del protocolo. Los grupos tratados con 0.25 mM de NAC, al igual que el grupo PostC, recuperaron el trabajo cardiaco a niveles de un grupo control al finalizar la reperfusión (Figura 4).

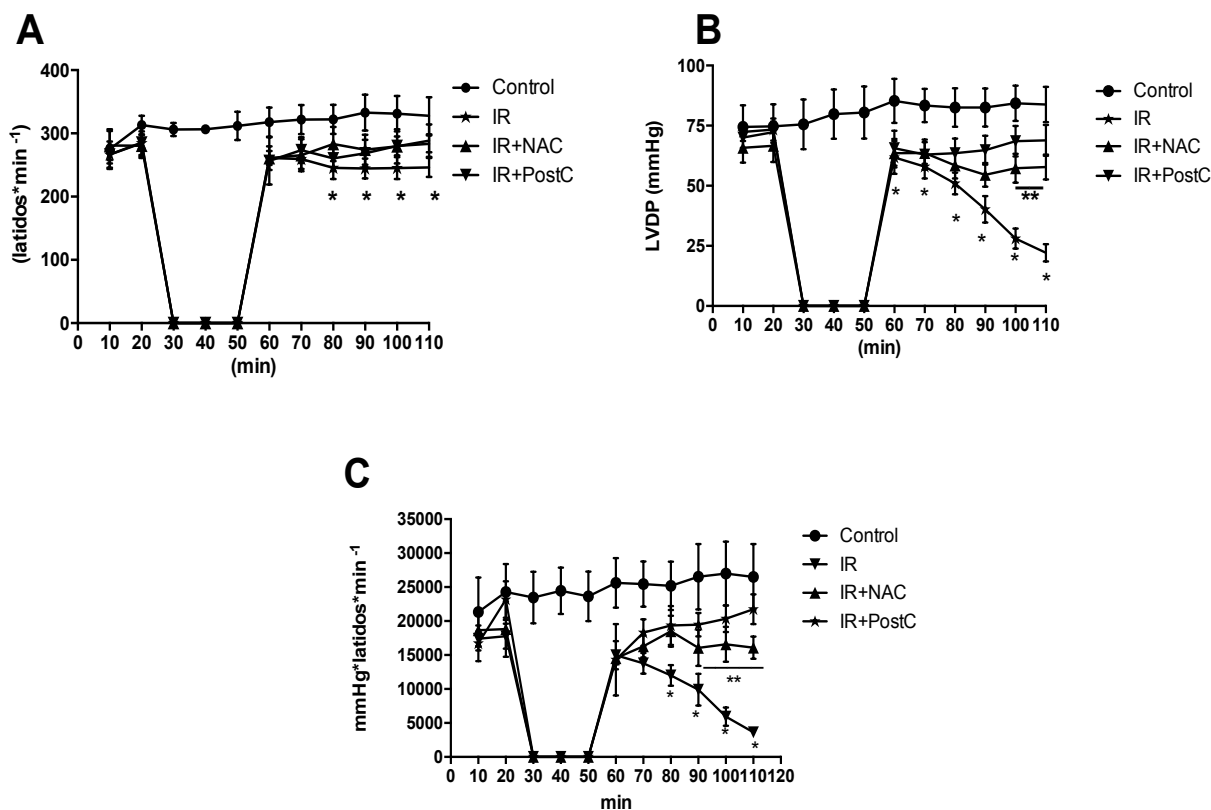


Figura 4. Función cardíaca de todos los grupos experimentales; A) Frecuencia cardíaca (latidos*min⁻¹), B) Presión ventricular (mmHg) y C) doble producto (mmHg*latidos*min⁻¹). Los resultados son la media \pm DE de 5 experimentos diferentes. * $P < 0.05$ vs. Control and ** $P < 0.05$ vs. IR, 20 minutos de estabilización, 30 minutos de isquemia y 60 minutos de perfusión.

Ya que la muerte celular está íntimamente ligada al daño por perfusión y por lo tanto a la pérdida del trabajo cardíaco, se midió el tamaño del infarto en los corazones de los diferentes grupos experimentales. La identificación del tejido vivo se realizó evaluando la actividad de deshidrogenasas, que convierten el cloruro de trifeniltetrazolio en el pigmento formazán de color rojo. El tejido muerto, expresado como tamaño del infarto no se tiñe. Los corazones IR tuvieron un incremento significativo del 59% en el tamaño del infarto, mientras que en los grupos tratados con NAC redujo al 26% y con el PostC un 18% la muerte celular significativamente al final de la perfusión, $P < 0.05$ (Figura 5).

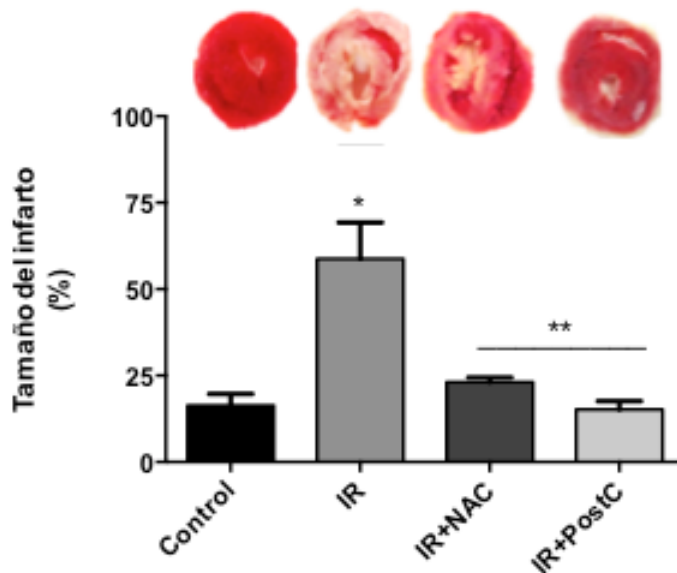


Figura 5: Determinación del tamaño del infarto con 2,3,5-cloruro de trifeniltetrazolio. Los resultados muestran la media \pm DE de 5 experimentos diferentes. * $P < 0.05$ vs. Control y ** $P < 0.05$ vs. IR. Se muestra imagen representativa de los corazones.

6.2 La cardioprotección conferida por el NAC y el PostC se relaciona con la disminución en la producción de H_2O_2 , de la lipoperoxidación, de carbonilación de proteínas y con el incremento en la relación GSH/GSSG en mitocondrias de corazones reperfundidos.

Las mitocondrias son fuente, pero también blanco del daño por ERO, por lo que cuantificamos la producción de H_2O_2 y algunos marcadores de estrés oxidante como lipoperoxidación, niveles de malondialdehido (MDA), la carbonilación proteica y la relación GSH/GSSG, en mitocondrias de todos los grupos experimentales.

Los niveles de H_2O_2 aumentaron en mitocondrias de corazones IR que oxidan succinato en presencia de antimicina A (AA) y rotenona (Rot) en comparación con mitocondrias control (10 ± 3.5 y 10.1 ± 1.3 pmol H_2O_2 /mg/min vs. 4.7 ± 1.7 y 1.8 ± 2.3 pmol H_2O_2 /mg/min respectivamente). Ambos tratamientos (NAC y PostC) disminuyeron en diferente grado la producción de H_2O_2 , aunque el PostC fue más eficiente que el NAC aún sin inhibidores.

Por otro lado las mitocondrias de corazones IR alimentadas con glutamato malato, mostraron un incremento en la producción de H_2O_2 en comparación con las mitocondrias control, que

aumentó aún más en presencia de AA, confirmando la participación del complejo III en la producción de ERO (Figura 6).

La combinación de glutamato-malato más rotenona también incrementó la producción de H₂O₂ en mitocondrias IR comparadas con el grupo control.

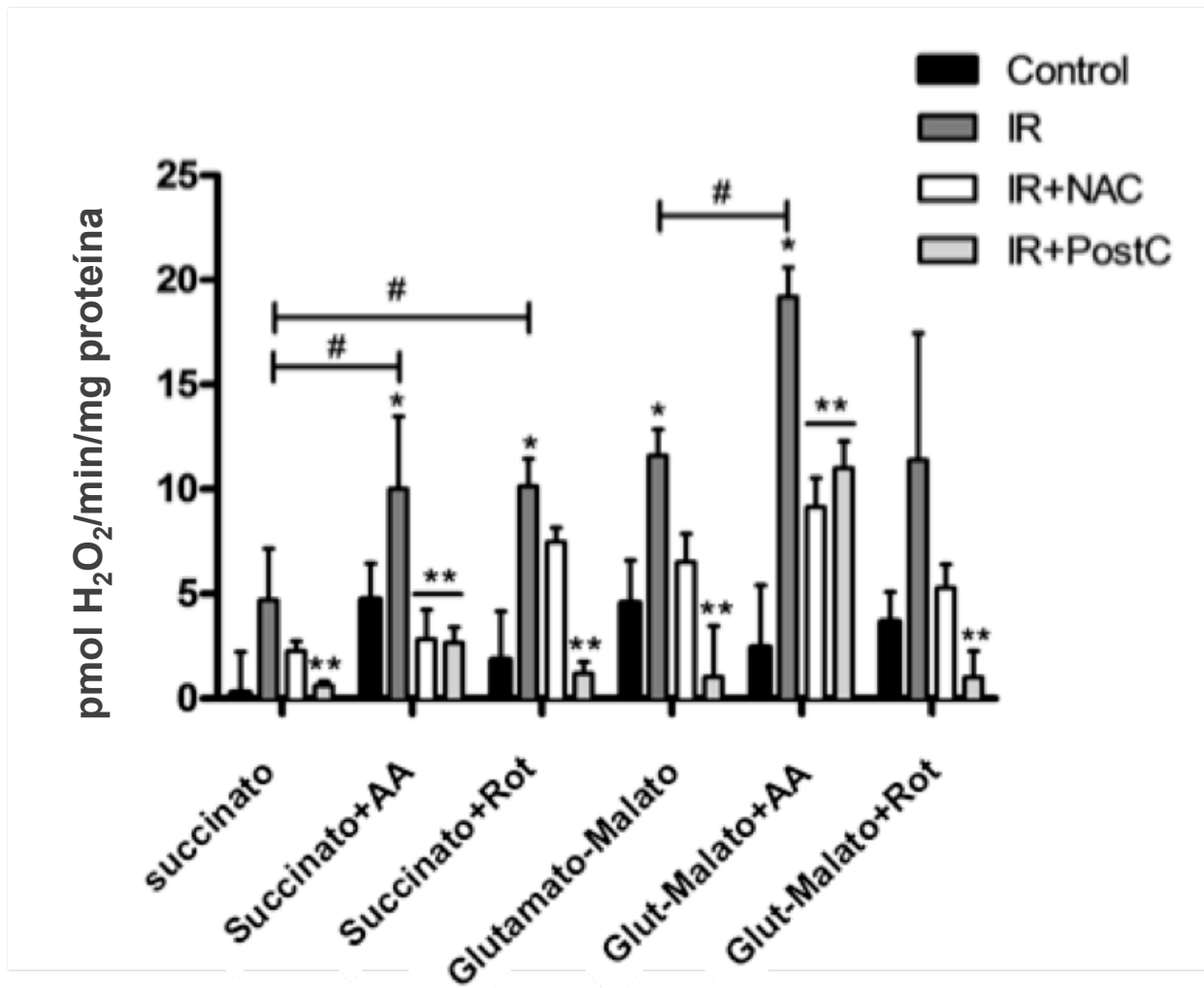
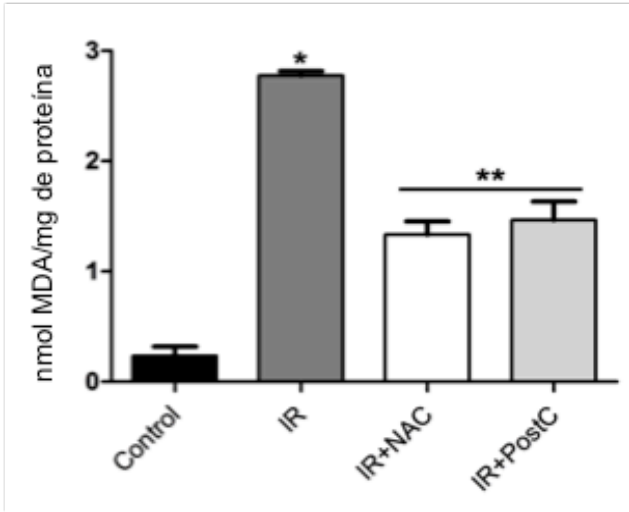


Figura 6: Efecto del NAC y PostC sobre la producción de H₂O₂ en mitocondrias de corazones isquémicos reperfundidos. El contenido de H₂O₂ se determinó la oxidación de la DCF catalizada por HRP en mitocondrias suplementadas con succinato y glutamato-malato en presencia de Antimicina A (AA) y/o Rotenona (Rot) . Los resultados muestran la media ± DE de 3 experimentos diferentes por grupo. *P < 0.05 vs. Control y **P < 0.05 vs. IR. #P < 0.05 vs. Mitocondrias sin inhibidores.

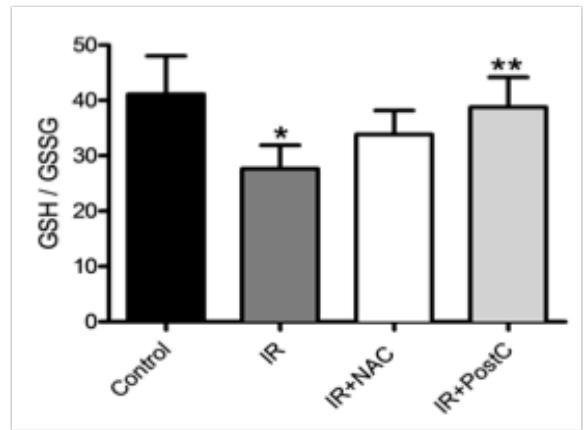
La lipoperoxidación y la carbonilación de proteínas incrementaron en correlación con la disminución del estado redox (GSH/GSSG) en mitocondrias de corazones IR en comparación con el grupo control $P < 0.05$ (Figura 7). El tratamiento con NAC y PostC redujó los niveles de MDA en un 51% (de 2.7 ± 0.8 vs. 1.3 ± 0.5 nmol de MDA/mg proteína mitocondrial en IR) y la maniobra del PostC a un 48% (2.7 ± 0.8 vs. 1.6 ± 0.2 nmol de MDA/mg Proteína mitocondrial en IR); $P < 0.05$ (Figura 7A).

La relación GSH/GSSH incrementó significativamente en mitocondrias con IR+PostC en comparación con mitocondrias IR, $P < 0.05$ (Figura 7B) y la carbonilación proteica mostró el mismo comportamiento entre los grupos que el observado en la lipoperoxidación: en el grupo IR incrementó la oxidación con respecto al grupo control, mientras que ambos tratamientos disminuyeron la carbonilación a niveles basales (Figura 7C).

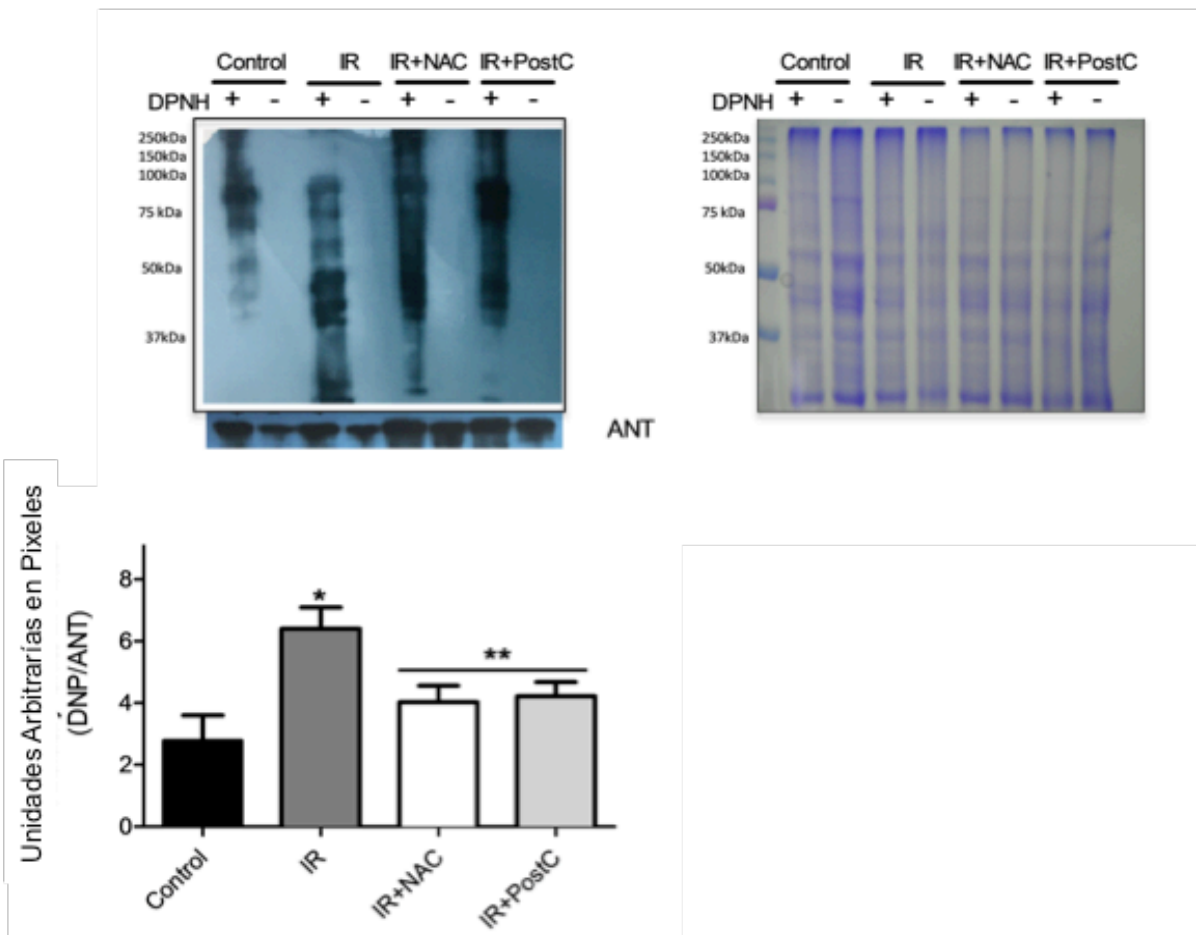
A)



B)



C)



*Figura 7: Marcadores de estrés oxidante en mitocondrias aisladas de corazones isquémicos reperfundidos tratados con NAC y PostC. A) niveles de malondialdehído, MDA; B) GSH/GSSG; C) Inmunoblot representativo de carbonilación de proteínas de todos los grupos experimentales y la densitometría obtenida entre el contenido de dinitrofenil hidrazina (DPN) y el translocador de adenín nucleótidos (ANT). También se muestra un gel teñido con azul de Coomassie. Los resultados muestran la media \pm DE de 5 experimentos diferentes. *P < 0.05 vs. Control y **P < 0.05 vs. IR.*

6.3. Efecto de la NAC y del PostC sobre el consumo de oxígeno en mitocondrias aisladas de corazones isquémicos-reperfundidos.

Los resultados anteriores indican que tanto los fosfolípidos como las proteínas de las membranas mitocondriales son blanco del ataque de las ERO que se generan durante la IR, por lo que a continuación evaluamos el impacto del daño sobre la capacidad respiratoria de las mitocondrias cuantificando el consumo de oxígeno estimulado con glutamato/malato y con succinato+rotenona en cada grupo experimental.

El consumo de oxígeno en estado 4, utilizando glutamato-malato, fue similar entre los cuatro grupos experimentales; aunque hubo una disminución en los grupos postacondicionados, mientras que el consumo de oxígeno en estado 3 disminuyó en las mitocondrias del grupo IR (Figura 8A) y se preservó en los grupos IR+NAC e IR+ PostC a niveles del grupo control.

El control respiratorio (CR) representa la relación entre el consumo de oxígeno en condiciones de fosforilación (estado 3) y en condiciones basales (estado 4). En el grupo control, el CR con glutamato-malato fue de 2.89 ± 0.43 y disminuyó a 1.6 ± 0.19 en el grupo IR, mientras que la capacidad fosforilante de las mitocondrias se recuperó con ambos tratamientos. El ADP/O, que representa la cantidad máxima de moléculas de ATP formadas con un par de electrones desde el sustrato hasta el último aceptor, el oxígeno, disminuyó significativamente en el grupo IR vs. el grupo control. Sólo observamos recuperación del ADP/O con el tratamiento de NAC (Figura 8B).

La tendencia a la disminución en la respiración desacoplada en el grupo IR sugiere la inhibición en la oxidación a nivel de sustratos, pero no descarta daño a nivel del sistema fosforilante (Figuras 8A y 8C).

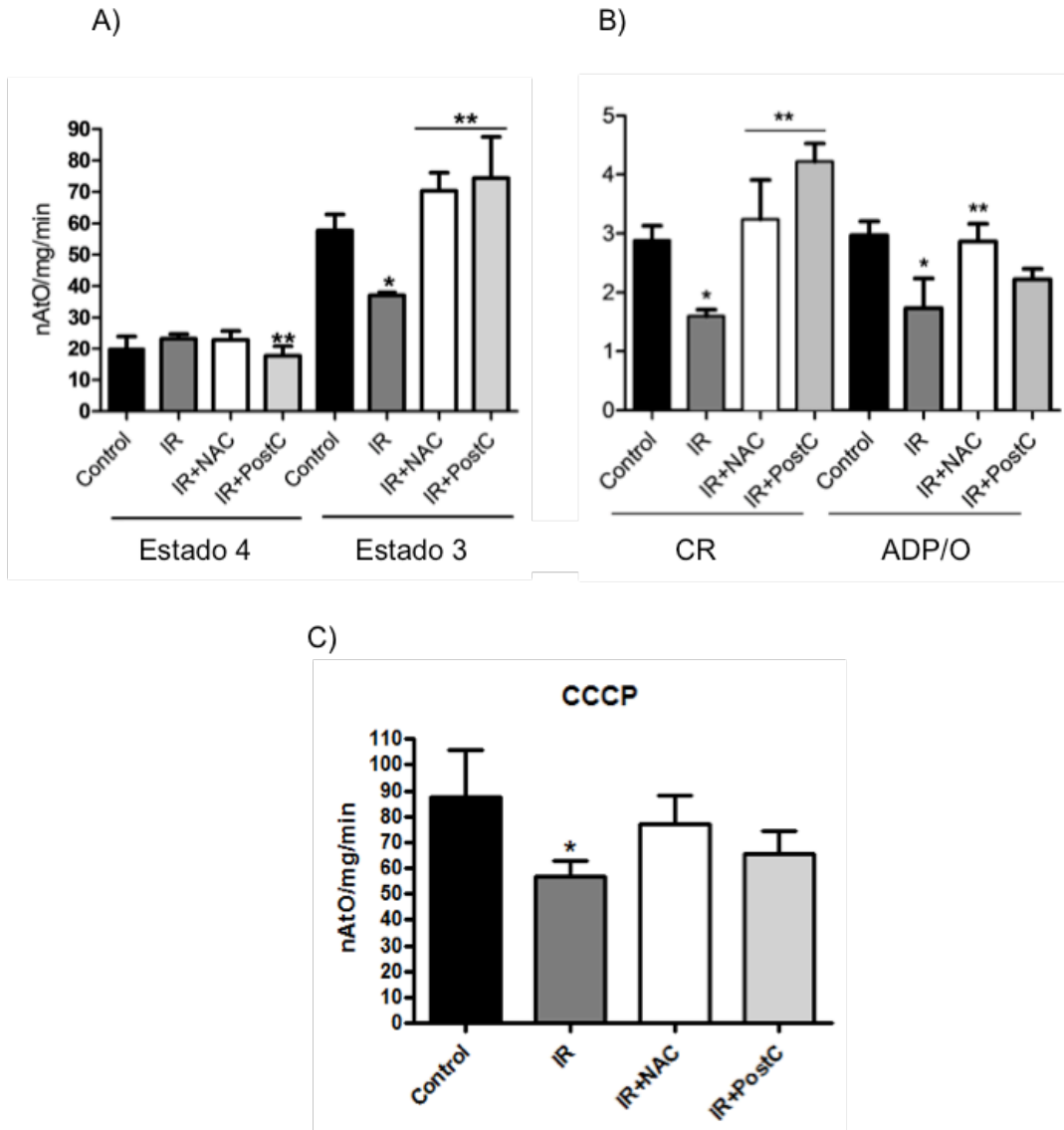


Figura 8. Consumo de oxígeno en mitocondrias aisladas con glutamato-malato. A) Estado 4 y estado 3, B) CR y ADP/O, C) respiración desacoplada (CCCP). Los resultados muestran la media \pm DE de por lo menos 3 experimentos diferentes. * $P < 0.05$ vs. Control y ** $P < 0.05$ vs. IR.

Al utilizar succinato+rotenona como sustrato observamos que en el estado 4 no hay cambios significativos, mientras que para el estado 3 se observó una disminución significativa entre el grupo IR y el grupo control; con ambas estrategias cardioprotectoras se incrementó el consumo de oxígeno, siendo significativo solo en el grupo IR+PostC (Figura 9A). La recuperación del CR en mitocondrias de corazones reperfundidos con ambos tratamientos indica que éstas mantienen su eficiencia para oxidar sustratos y para sintetizar ATP (Figura 9B); con respecto a la respiración desacoplada no se observaron cambios significativos entre los grupos (Figura 9C).

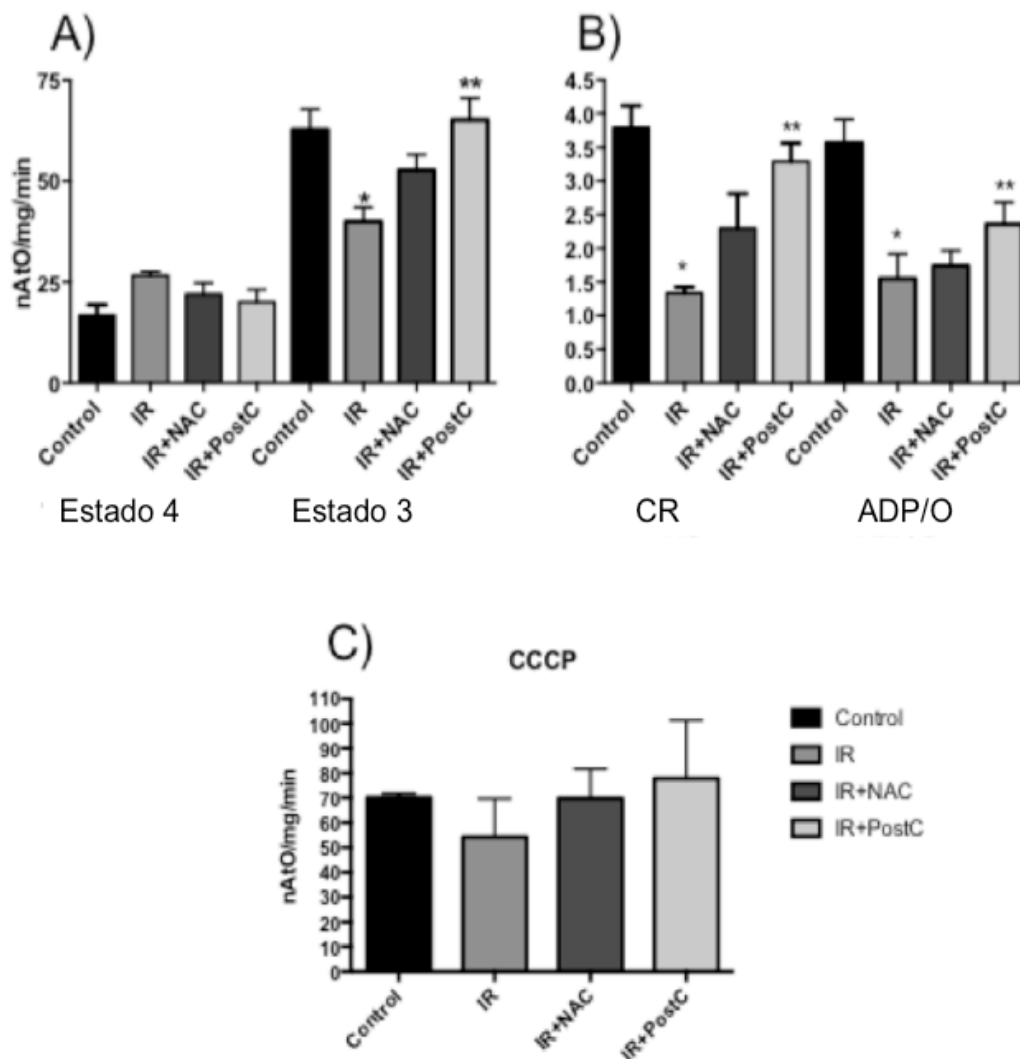


Figura 9. Consumo de oxígeno en mitocondrias aisladas en presencia de Succinato+rotenona. A) Estado 4 y estado 3, B) CR y ADP/O, C) respiración desacoplada

(CCCP). Los resultados muestran la media \pm DE de por lo menos 3 experimentos diferentes. * $P < 0.05$ vs. Control y ** $P < 0.05$ vs. IR.

A continuación buscamos relacionar los resultados obtenidos por oximetría, con posibles cambios en la actividad de cada uno de los componentes de la cadena transportadora de electrones y con la asociación que estos complejos forman entre sí.

Se observó que la actividad de los complejos I (NADH:ubiquinona oxidoreductasa), II (succinato deshidrogenasa), III (decil-ubiquinol citocromo c oxidoreductasa) y V (ATP sintasa) disminuyó en las mitocondrias del grupo IR. Las actividades de los CI, CIII y CV se restablecieron en las mitocondrias de los corazones IR+PostC, mientras que el tratamiento con NAC sólo recuperó parcialmente la actividad del CI y CII, lo que sugiere que otros mecanismos, además de la reducción del estrés oxidante, podrían intervenir en el mantenimiento de la actividad de estos complejos durante el PostC. La actividad del complejo IV no cambió en ninguno de los grupos experimentales, aunque hay una tendencia a disminuir en el grupo IR (Figura 10). En cuanto al CV, los resultados por espectrofotometría muestran que en el grupo IR hay una disminución de su actividad, mientras que en los grupos con el antioxidante y con post-acondicionamiento hay una recuperación total de la actividad de la enzima.

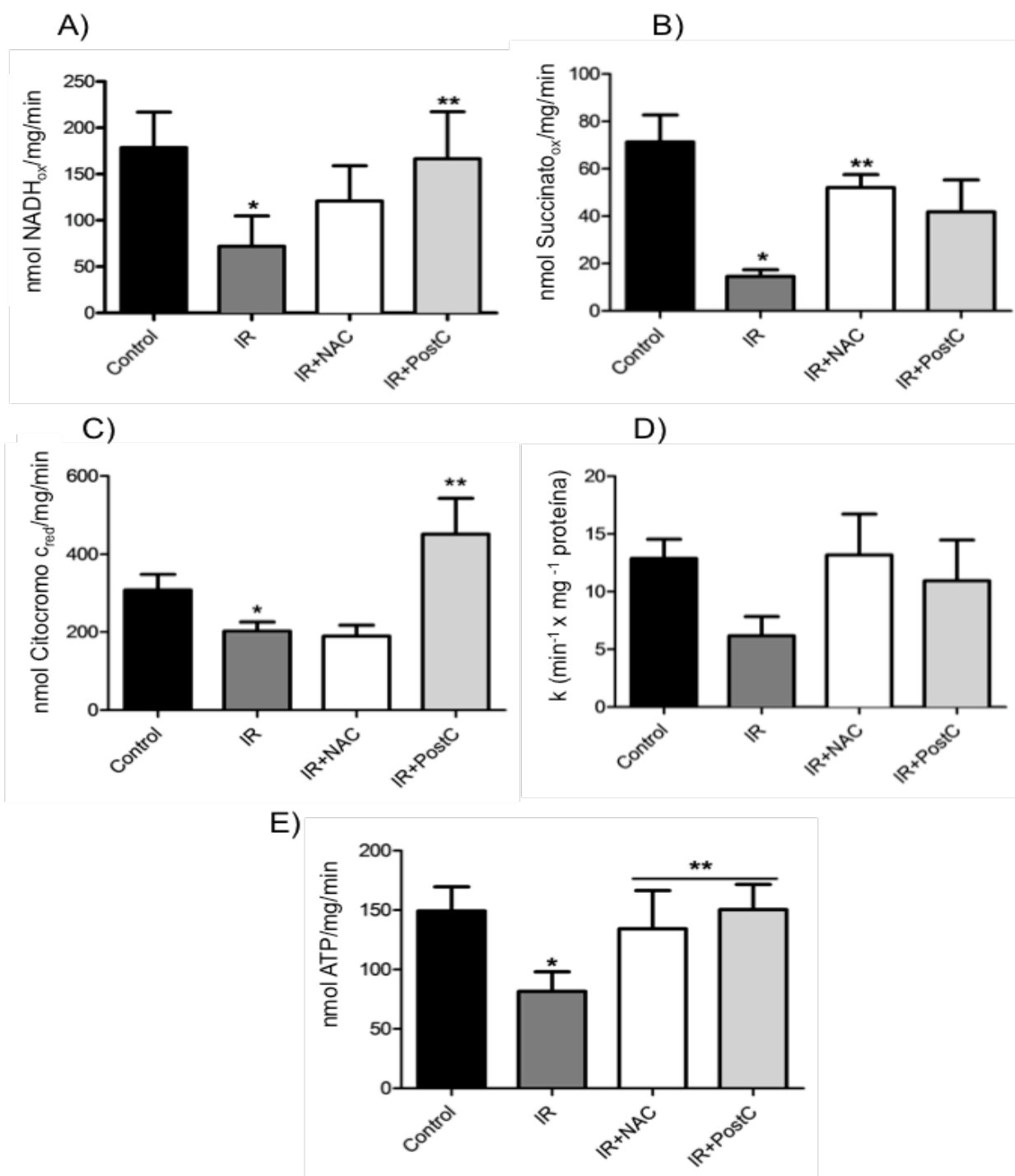


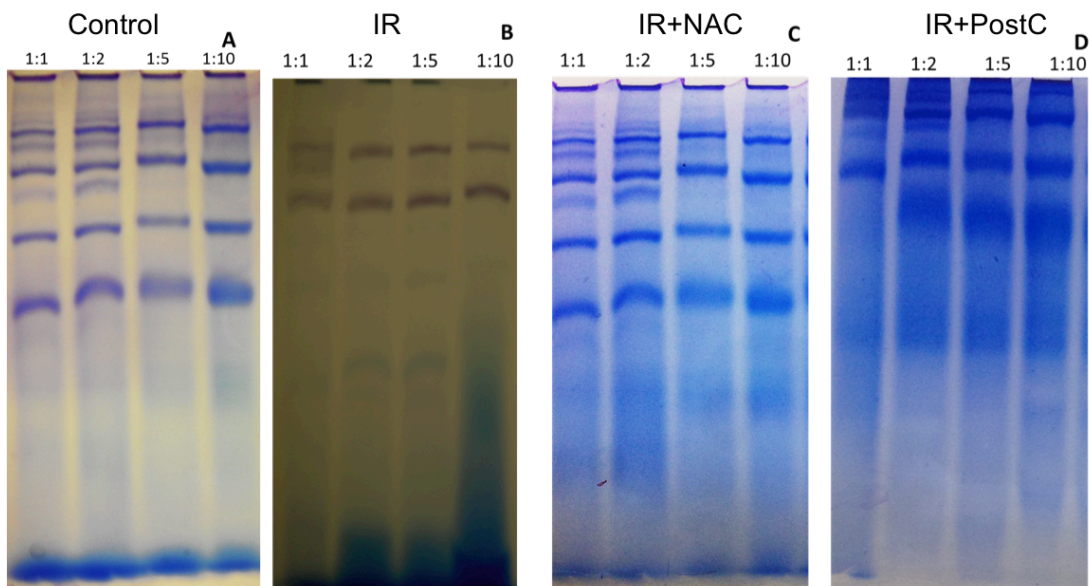
Figura 10: Análisis espectrofotométrico de las actividades enzimáticas de los complejos respiratorios mitocondriales. A) Complejo I (nmol NADH_{ox}/mg/min), B) Complejo II (nmol Succinato ox/mg/min), C) Complejo III (nmol citocromo c red/mg/min), D) Complejo IV (k (min⁻¹ x mg⁻¹ proteina)

¹ x mg⁻¹ proteína) y E) Complejo V (nmol ATP/mg/min). Los resultados muestran la media ± DE de al menos 3 experimentos diferentes. *P < 0.05 vs. Control y **P < 0.05 vs. IR.

Estos resultados confirman observaciones previas de que el CI y el CIII son blancos principales en el daño por IR (Musatov A et al., 2012). Sin embargo, estos datos no nos permiten analizar la contribución de las actividades de las formas monómericas o diméricas (en el caso del Complejo III) y de los SCs. Los siguientes análisis se realizaron en geles BN-PAGE y se relacionaron con la reducción de las ERO con los tratamientos en las mitocondrias IR. A continuación analizamos si existe relación entre la producción de ERO con los cambios en la estructura de los supercomplejos, lo que podría explicar la pérdida de la función de la CTE en corazones isquémicos-reperfundidos.

6.4 Organización de los SC respiratorios en mitocondrias de corazones isquémicos reperfundidos.

Se utilizaron diferentes relaciones de digitonina/proteína (mg/mg) para lograr la mejor extracción y resolución de los SC en la electroforesis nativa. El patrón de bandas correspondientes a los SC en el grupo IR, fue diferente al de los grupos Control, IR+NAC e IR+ PostC en presencia de diferentes concentraciones de digitonina, lo que sugiere que en las mitocondrias del grupo IR hay menos de estas estructuras o que son más lábiles en presencia del detergente (Figura 11).



1:1, 1:2, 1:5, 1:10 mg de proteína/ mg de Digitonina

Figura 11: Curvas de digitonina con relacion a mg de proteína en geles nativos azules. Imágenes representativas de las tinciones con azul de Coomassie de los diferentes grupos experimentales.

Se identificaron los complejos por su actividad enzimática en gel en condiciones control y se hicieron las comparaciones entre los diferentes grupos experimentales. En estos experimentos se utilizó la relación (1:2) de proteína/digitonina, que fue con la que observamos el mayor número de bandas correspondientes a SC en el grupo control (Figura 11).

Se corrieron los geles que fueron preparados en paralelo en las mismas condiciones y se determinaron las actividades enzimáticas específicas de cada uno de los complejos. Tras una cuidadosa alineación, se consideraron las bandas con actividad positiva para CI, CIII y CIV, que migraron por arriba de la actividad del CI monomérico como supercomplejos I-III₂-IV_n.

Observamos que la actividad de CI monomérico disminuyó en IR y se mantuvo en IR+PostC, este tratamiento también preservó la actividad de CI en supercomplejos a niveles del grupo control. La actividad del CIII₂ disminuyó en mitocondrias IR y se recuperó en ambos tratamientos, mientras que la actividad asociada a supercomplejos incrementó de manera significativa en los grupos IR+PostC.

La actividad del CIV tanto en su forma monomérica como en supercomplejos disminuyó en mitocondrias IR y se incrementó con el PostC (Figura 12).

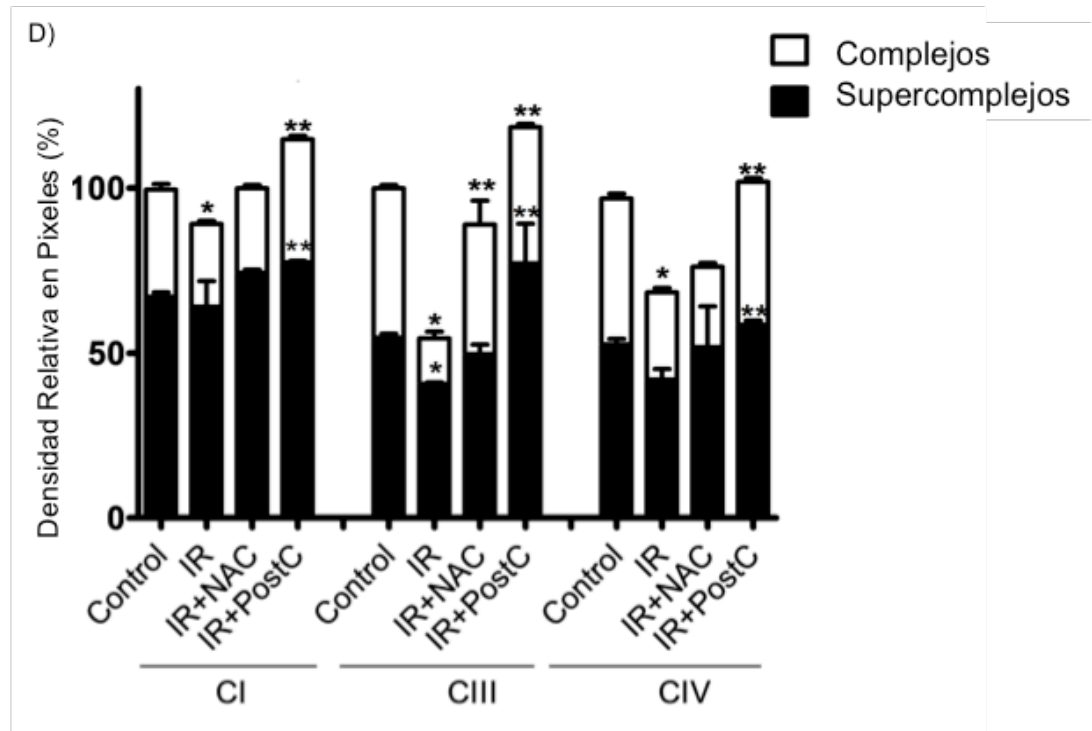
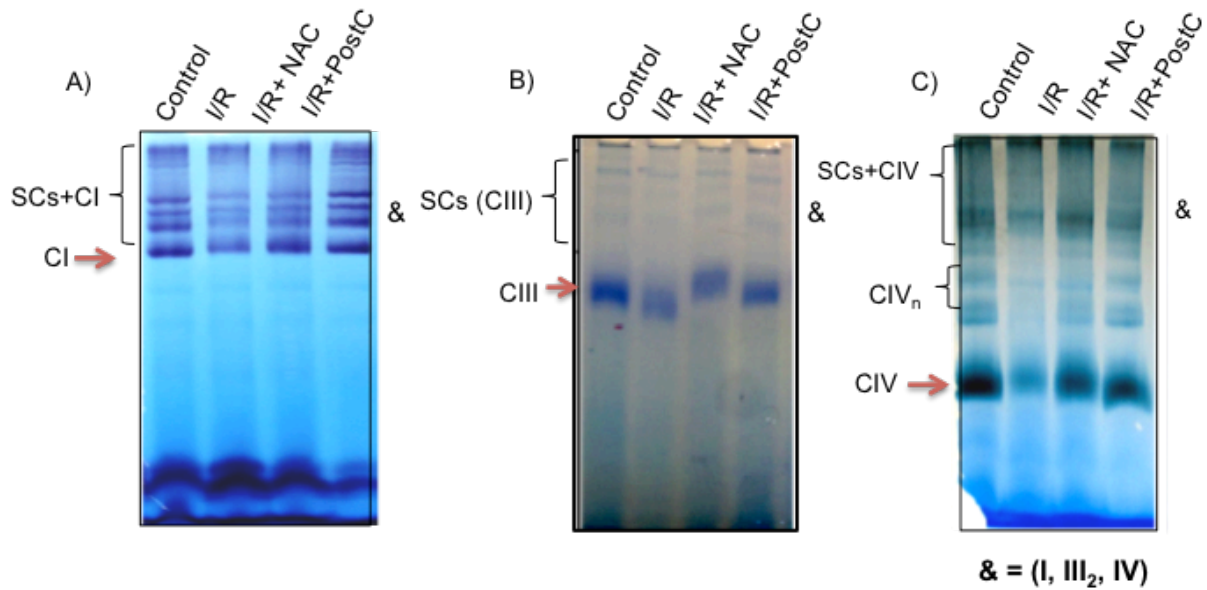


Figura 12. Actividad enzimática de los complejos y supercomplejos respiratorios en geles azules nativos correspondientes a I-III₂-IV_n. A) Imagen representativa de la actividad enzimática de complejo I, B) Imagen representativa de la actividad enzimática del complejo III, C) Imagen representativa de la actividad enzimática del complejo IV y D) Análisis densitométrico de la actividad asociada a monómeros y supercomplejos. Los resultados muestran la media ± DE de al menos 3 experimentos diferentes. *P < 0.05 vs. Control y **P < 0.05 vs. IR.

Se evaluó la actividad de los complejos II y V, aunque no hacen asociaciones en supercomplejos y no encontramos cambios significativos en sus actividades en gel (Figura 13).

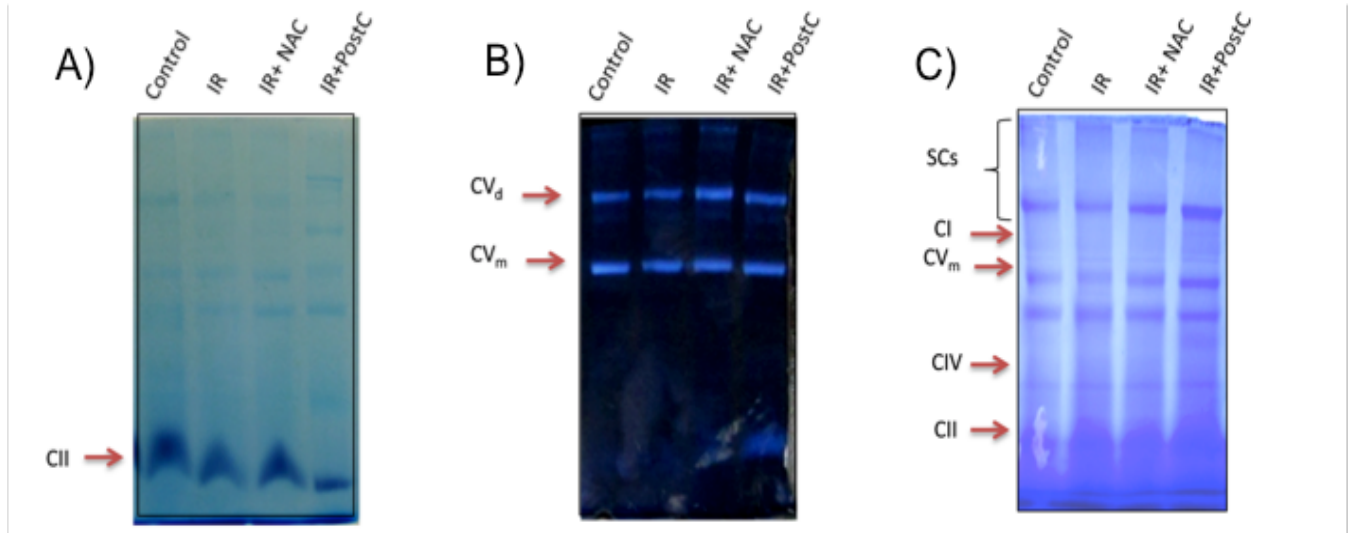


Figura 13. Actividad enzimática en geles azules nativos del complejo II y V. A) Imagen representativa de la actividad enzimática del complejo II, B) Imagen representativa de la actividad enzimática del complejo V, C) Imagen representativa de la tinción con azul de Coomassie de un gel corrido en las mismas condiciones.

6.5. Contenido de complejos y supercomplejos en corazones isquémicos reperfundidos tratados con NAC y PostC.

De igual manera se examinó si la reducción de ERO con los tratamientos afecta el contenido y el ensamblaje de supercomplejos en mitocondrias.

En la figura 14 se observa la inmunodetección de los diferentes complejos respiratorios en sus formas monoméricas y en supercomplejos. Tras la BN-PAGE, inmunodetectamos supercomplejos formados por I-III₂-IV_n en mitocondrias del grupo control, el cual también contenía a la proteína adaptadora SCAFI, que es una proteína accesoria de supercomplejos, importante en la asociación CIII₂-CIV.

Encontramos que la subunidad NDFS4 del complejo I (14A), la subunidad UQCRFS1 del complejo III (14B), la subunidad IV (COXIV) del complejo CIV (14C) y SCAFI disminuyeron claramente en las mitocondrias de los corazones con IR (14D) mientras que se preservaron

aunque diferencialmente en los grupos tratados con NAC y PostC. La tinción con azul de Coomassie no muestra diferencias importantes en el contenido de proteína entre los grupos experimentales y fue utilizado como control de carga en este experimento.

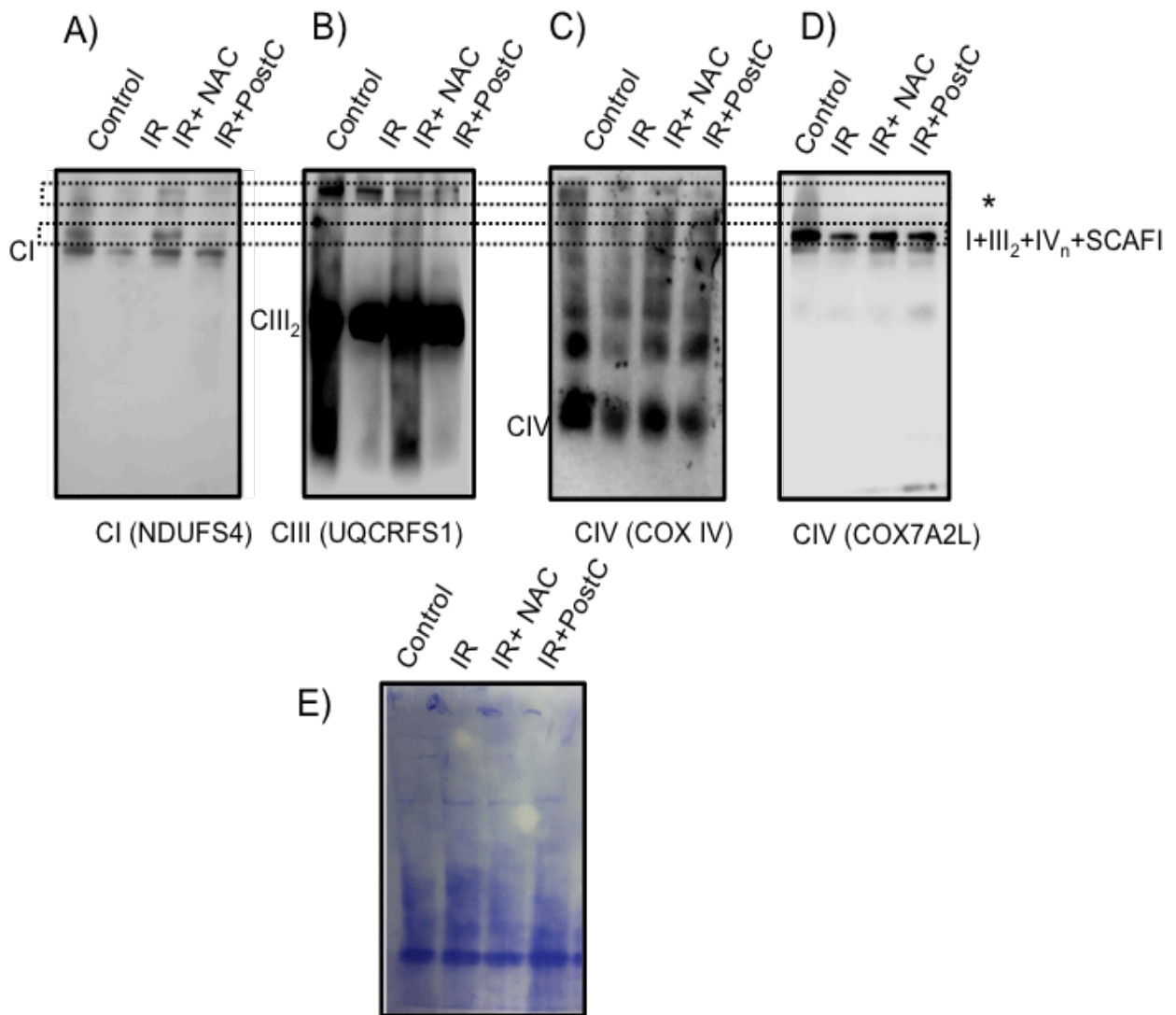


Figure 14. Ensamblaje de los complejos y supercomplejos respiratorios en los diferentes grupos experimentales A) Inmunodetección del complejo I usando anticuerpos contra la subunidad NDufs4 de la NADH deshidrogenasa; B) Inmunodetección del complejo III usando anticuerpos contra la subunidad UQCRFS1 de la ubiquinol citocromo c reductasa; C) Inmunodetección del complejo IV usando anticuerpos contra la subunidad IV de la citocromo c oxidasa; D) Inmunodetección de subunidad accesoria Scaf1, usando anticuerpos contra COX7A2L E) Imagen representativa de la tinción con azul de Coomassie de un gel nativo azul corrido en las mismas condiciones.

Ya que la actividad de CIII que se detecta en BN-PAGE puede ser inespecífica, se realizaron geles en 2D y se inmunodetectó la subunidad UQRFS1 de este complejo para confirmar los cambios observados. (Figura 15).

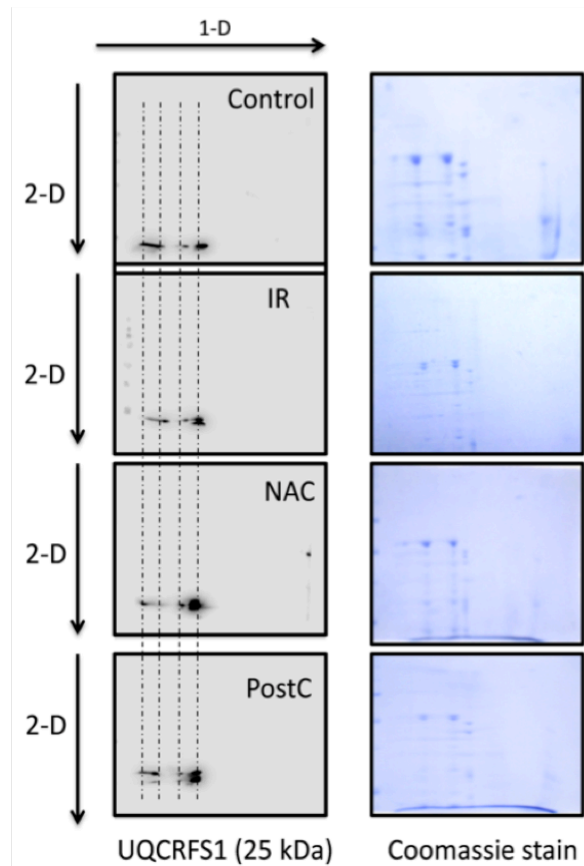


Figura 15: Inmunodetección del ensamblaje en supercomplejos que contienen el complejo III en mitocondrias de corazones isquémicos-reperfundidos tratados con NAC y PostC. El complejo III se inmunodetectó con anti-UQCRFS1 en muestras de proteínas mitocondriales separadas en 1D en geles nativos azules y posteriormente sometidas a una segunda dimensión 2D SDS-PAGE. Los resultados son imágenes representativas de al menos 3 experimentos diferentes.

7. DISCUSIÓN

En este trabajo demostramos que la contención contra el estrés oxidante promueve la función cardíaca, disminuye el tamaño del infarto, preserva la función mitocondrial y mantiene el ensamblaje y actividades de los complejos respiratorios, tanto en su forma monomérica como en supercomplejos de la cadena respiratoria mitocondrial.

Estos resultados refuerzan paradigmas bien conocidos de que las mitocondrias son fuente, pero también blanco de las especies reactivas de oxígeno y que esto está ligado a la estabilidad de los supercomplejos respiratorios constituyendo un elemento fundamental en la función mitocondrial.

La asociación entre el ensamblaje de los SC y la disminución en la generación de ERO ha sido observada en diferentes condiciones. Por ejemplo, fibroblastos expuestos a inhibidores de la cadena transportadora de electrones, incrementan la producción de ERO en relación con la disminución en los niveles de los SC (Díaz et al., 2012).

Por otro lado, animales knockdown de la subunidad NDUFS1 muestran menor integración de complejo I en SC en correlación con el aumento de los niveles de ERO en neuronas (López-Fabuel et al., 2016); Mientras que en un análisis de proteínas de membrana interna mitocondrial en ratas envejecidas que tenían alteraciones en la oligomerización de la ATP sintasa y la disminución del ensamblaje de los supercomplejos (I-III₂-IV₀₋₄) mostró que esto está relacionado con la disminución de la arquitectura de los SC y una producción incrementada de ERO (Dencher N.A et al., 2007).

Tal asociación podría ser consecuencia de una mayor eficiencia en la transferencia de electrones en supercomplejos que en complejos individuales (Panov et al., 2007), ya que las distancias entre los sitios de unión de la coenzima Q entre el complejo I y el complejo III y las del citocromo c entre el complejo III y complejo IV es más corto en estos arreglos supramoleculares (Althoff et al., 2011), que la difusión calculada mediante mecanismos de colisión aleatoria por los complejos individuales (Chazotte et al., 1988).

Nuestros resultados mostraron que el daño por isquemia reperusión contribuye al incremento de ERO y a la disminución de las actividades de los complejos respiratorios mitocondriales tanto por espectrofotometría como por geles nativos.

Durante la oxidación de succinato, las ERO son producidas a partir del complejo III por la transferencia de electrones en reversa (RET) hacia el complejo I (Kwong LK et al., 1998).

Además se ha reportado que durante la isquemia el succinato es acumulado y que es el metabolito principal junto con las ERO, del estrés oxidante a partir de complejo I por la RET, durante la reperfusión temprana in vivo (Chouchani et al., 2014)

Aunque esto nos dio herramientas para especular que la disminución observada en la actividad de la succinato deshidrogenasa podría conducir a la acumulación de succinato, nuestros resultados demuestran que la producción de peróxido de hidrógeno no fue sensible a rotenona, por lo tanto la generación de ERO por medio de RET, vía el complejo II no es el principal mecanismo en nuestros experimentos.

Nuestras observaciones sobre el contenido y actividad de los complejos I y III podrían explicar el incremento en el estrés oxidante en corazones IR, ya que se ha reportado que el daño a complejo I durante la IR induce la pérdida de las interacciones proteína-proteína entre estos complejos, incrementando la producción de ERO por el complejo III (Lee HL et al., 2012).

Nuestros resultados muestran que ambos tratamientos son efectivos para recuperar la función de los corazones isquémicos-reperfundidos; aunque resulta más evidente esta recuperación en los corazones postcondicionados que en los tratados con el antioxidante. Esto indica que existen otros mecanismos que contribuyen a mantener la función cardíaca durante la IR, además de la disminución del estrés oxidante. Se sabe que la maniobra mecánica del postcondicionamiento, además de reducir el estrés oxidante, mantiene el pH bajo durante los primeros minutos de la reperfusión, lo que previene la apertura del poro de la transición de la permeabilidad mitocondrial (Hausenloy et al., 2009).

Resultados de nuestro grupo de trabajo y de otros demuestran que la activación de señales extracelulares de proteínas cinasas como ERK 1/2 correlacionan con el incremento de proteínas fosforiladas en mitocondrias de corazones postcondicionados (Hernández-Resendíz et al., 2014). Los grupos fosfato se unen a residuos de la subunidad IVa y IVb del complejo IV en mitocondrias aisladas de corazones precondicionados, sugiriendo un posible papel de la fosforilación en la estabilidad de estas proteínas, que podrían fomentar su asociación en supercomplejos (Wong et al., 2010).

Recientemente se reportó en un modelo de ratones envejecidos con isquemia reperusión que diferentes subunidades de la ATPasa se oxidan durante estos 2 procesos, lo que se relaciona con la disminución de la actividad de la enzima, este hallazgo también se relacionó con una sobre carga de calcio mitocondrial en los ratones sometidos a IR que mostraron una mayor sensibilidad a la apertura del poro de la transición de la permeabilidad mitocondrial (mPTP) (Fernández-Sanz et al., 2015).

En este trabajo no solo la actividad, sino la concentración de algunos complejos, tanto en SC como en monómeros, se comprometió como consecuencia de la IR.

La pérdida de la integridad de subunidades particulares de los complejos después del daño oxidativo podría explicar estos resultados, ya que se ha reportado que durante la isquemia, disminuye la cantidad de subunidad NDUFA9 de Complejo I, en asociación con el aumento en la oxidación de la cardiolípina (Gardichela et al., 2012).

La idea que la disociación de SC tiene implicaciones patofisiológicas fue sugerida por vez primera por Lenaz y Genova en 2007. Ellos especularon que las ERO reducen el "chanelling" de electrones, disminuyendo la transferencia de electrones y/o la translocación de protones provocando el incremento de ERO, lo que podría encajar con el círculo vicioso que se establece entre el estrés oxidativo y el decline energético observado en el daño por reperusión.

Sin embargo, la importancia del cambio en el ensamblaje de los supercomplejos no es contundente en el marco de las enfermedades cardiovasculares. Se han detectado niveles bajos del supercomplejo I-III₂-IV₁ sin cambios en las actividades individuales de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial en un modelo canino de falla cardíaca (Rosca MG et al., 2008). En el contexto de daño por reperusión, Wong et al., reportaron que los niveles de supercomplejos es similar en mitocondrias aisladas de corazones IR y de corazones preacondicionados, mientras que los efectos cardioprotectores del isoflurano se han relacionado con el mantenimiento de las actividades de los CIII y CIV en SC's (Lotz et al., 2015). Por otro lado se ha descrito que los SC se desensamblan después de 60 min de reperusión y que su estructura se mantiene al utilizar un inhibidor del poro de la transición de la permeabilidad mitocondrial PTPm (Jang et al., 2017), lo que sugiere que el hinchamiento mitocondrial y la producción de ERO secundaria a la apertura del poro podría contribuir a la disociación de los supercomplejos. Nuestros resultados demuestran que la disminución del

estrés oxidante preserva la función mitocondrial y que la cardioprotección está relacionada con el mantenimiento de la actividad y el contenido de CI, CIII y CIV en supercomplejos.

8. CONCLUSIÓN

Tanto las formas monoméricas como los SC de la cadena respiratoria mitocondrial contribuyen a la funcionalidad *in vivo* de la mitocondria; sin embargo, aunque el daño induce ERO y su consecuente producción de ERO afecta el ensamblaje de los supercomplejos, nosotros pensamos que otros niveles de regulación inducidos por el PostC participan en el mantenimiento de la actividad de los complejos respiratorios mitocondriales en tales superestructuras.

REFERENCIAS

1. Acín-Perez R and Enriquez JA. The function of the respiratory supercomplexes: The plasticity model. *Biochim. Biophys. Acta.* 2014, 1837, pp. 444–450. doi: 10.1016/j.bbabi.2013.12.009
2. Acín-Pérez R, Fernández-Silva P, Peleato ML, Pérez-Martos A, Enriquez JA. Respiratory active mitochondrial supercomplexes. *Mol. Cell.* 2008, 32, pp. 529–39. doi: 10.1016/j.molcel.2008.10.021.
3. Allen RD, Schroeder CC, Fok AK. An investigation of mitochondrial inner membranes by rapid-freeze deep-etch techniques. *J. Cell Biol.* 1989, 108, pp. 2233–40.
4. Althoff T, Mills DJ, Popot JL, Kühlbrandt W. Arrangement of electron transport chain components in bovine mitochondrial supercomplex I1III2IV1. *EMBO J.* 2011;30(22):4652–64
5. Arreguín F, Noemi García, Sauri Hernandez-Resendiz, Mabel Buelna-Chontal, Francisco Correa, Viridiana Olín-Sandoval, Omar Noel Medina-Campos³, José Pedraza-Chaverria and Cecilia Zazueta Attenuation of oxidant damage in the postconditioned heart involves non-enzymatic response and partial catalytic protection *Exp Physiol* 97.10 (2012) pp 1119–1130.
6. Baertling F, Sánchez-Caballero L, van den Brand MAM, Wintjes LT, Brink M, van den Brandt FA, Wilson C, Rodenburg RJT, Nijtmans LGJ. NDUFAF4 variants are associated with Leigh syndrome and cause a specific mitochondrial complex I assembly defect. *Eur J Hum Genet.* 2017 Nov;25(11):1273–1277. doi: 10.1038/ejhg.2017.133. Epub 2017 Aug 30.
7. Beck SJ¹, Guo L¹, Phensy A², Tian J¹, Wang L^{1,3}, Tandon N¹, Gauba E¹, Lu L^{1,3}, Pascual JM⁴, Kroener S², Du H. Deregulation of mitochondrial F1FO-ATP synthase via OSCP in Alzheimer's disease. *Nat Commun.* 2016 May 6;7:11483. doi: 10.1038/ncomms11483.
8. Bianchi C, Genova ML, Parenti-Castelli G, Lenaz G. The mitochondrial respiratory chain is partially organized in a supercomplex assembly: kinetic evidence using flux control analysis, *J. Biol. Chem.* 2004, 279, pp. 562–569. doi: 10.1074/jbc.M405135200
9. Blaza JN, Serreli R, Jones J.Y.A, Khairunnisa M, and Hirst J. Kinetic evidence against partitioning of the ubiquinone pool and the catalytic relevance of respiratory-chain supercomplexes. 2014. *PNAS.* 111: 15735–15740. doi/10.1073/pnas.1413855111.

10. Böttlinger L, Horvath SE, Kleinschroth T, Hunte C, Daum G, Pfanner N, Becker T. Phosphatidylethanolamine and cardiolipin differentially affect the stability of mitochondrial respiratory chain supercomplexes. *J Mol Biol.* 2012 Nov 9;423(5):677-86. doi: 10.1016/j.jmb.2012.09.001. Epub 2012 Sep 10.
11. Brandner, K., Mick, D.U., Frazier, A.E., Taylor, R.D., Meisinger, C., Rehling, P., 2005. Taz1, an outer mitochondrial membrane protein, affects stability and assembly of inner membrane protein complexes: implications for Barth Syndrome. *Mol. Biol. Cell* 16, 5202–5214.
12. Buelna-Chontal M, Correa F, Hernández-Reséndiz S, Zazueta C, Pedraza-Chaverri J. Protective effect of α -mangostin on cardiac reperfusion damage by attenuation of oxidative stress. *J Med Food.* 2011 Nov;14(11):1370-4. doi: 10.1089/jmf.2010.0238. Epub 2011 Sep 23. PMID: 21942497
13. Casademont J1, Miró O. Electron transport chain defects in heart failure. *Heart Fail Rev.* 2002 Apr;7(2):131-9.
14. Chance B, Williams GR. A method for the localization of sites for oxidative phosphorylation. *Nature.* 1955, 176, pp. 250–254.
15. Chen YR, Chen CL, Pfeiffer DR, Zweier JL. Mitochondrial complex II in the post-ischemic heart: oxidative injury and the role of protein S-glutathionylation. *J Biol Chem.* 2007 Nov 9;282(45):32640-54. Epub 2007 Sep 11.
16. Choksi KB, Boylston WH, Rabek JP, Widger WR, Papaconstantinou J. Oxidatively damaged proteins of heart mitochondrial electron transport complexes. *Biochim. Biophys. Acta.* 2004, 1688, pp. 95-101. doi:10.1016/j.bbadis.2003.11.007.
17. Cogliati S, Calvo E, Loureiro M, Guaras AM, Nieto-Arellano R, Garcia-Poyatos C, Ezkurdia I, Mercader N, Vázquez J, Enriquez JA. Mechanism of superassembly of respiratory complexes III and IV. *Nature* 2016, 539, pp. 579-582. doi: 10.1038/nature20157.
18. Coskun P, Wyrembak J, Schriener SE, Chen H-W, Marciniak C, Laferla F, Wallace DC. A mitochondrial etiology of Alzheimer and Parkinson disease. *Biochim. Biophys. Acta* 2012, 1820, pp. 553–64.
19. Davoudi M, Kotarsky H, Hansson E, Kallijärvi J, Fellman V. COX7A2L/SCAF1 and Pre-Complex III Modify Respiratory Chain Supercomplex Formation in Different Mouse Strains with a Bcs1l Mutation. *PLoS One* 2016, 11, pp. 1-11 doi: 10.1371/journal.pone.0168774. eCollection 2016.

20. De Kruijff, B. Lipid polymorphism and biomembrane function. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 1997, 1, pp. 564–569.
21. Dencher NA, Frenzel M, Reifschneider NH, Sugawa M, Krause F. Proteome alterations in rat mitochondria caused by aging. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2007, 1100, pp. 291-298. doi: 10.1196/annals.1395.030.
22. Eubel H, Heinemeyer J, Sunderhaus S, Braun HP. Respiratory chain supercomplexes in plant mitochondria. *Plant Physiol. Biochem.* 2004, 42, pp. 937-42. doi: 10.1016/j.plaphy.2004.09.010.
23. Ertracht O, Malka A, Atar S, Binah O. The mitochondria as a target for cardioprotection in acute myocardial ischemia. *Pharmacol Ther.* 2014 Apr;142(1):33-40. doi: 10.1016/j.pharmthera.2013.11.003. Epub 2013 Nov 22.
24. Ferguson-Miller J, Hochman, Schindler M. Aggregation and diffusion in the mitochondrial electron-transfer chain: role in electron flow and energy transfer. *Biochem. Soc. Trans.* 1986, 14, pp. 822–824.
25. Fernandez-Sanz C, Ruiz-Meana M, Castellano J, Miro-Casas E, Nuñez E, Inserte J, Vázquez J, Garcia-Dorado D. Altered FoF1 ATP synthase and susceptibility to mitochondrial permeability transition pore during ischaemia and reperfusion in aging cardiomyocytes. *Thromb Haemost.* 2015 Mar;113(3):441-51. doi: 10.1160/TH14-10-0901. Epub 2015 Jan 29. PMID: 25631625
26. Finsterer J. Central nervous system manifestations of mitochondrial disorders. *Acta Neurol. Scand.* 2006, 114, pp. 217–238. doi: 10.1111/j.1600- 0404.2006.00671.x
27. Fischer F, Filippis C, Osiewacz HD. RCF1-dependent respiratory supercomplexes are integral for lifespan-maintenance in a fungal ageing model. *Sci. Rep.* 2015, 29, pp. 12595:12697. doi: 10.1038/srep12697.
28. Frenzel M, Rommelspacher H, Sugawa MD, Dencher NA. Ageing alters the supramolecular architecture of OxPhos complexes in rat brain cortex. *Exp. Gerontol.* 2010, 45, pp. 563-72. doi: 10.1016/j.exger.2010.02.003.

29. García-Ruiz C, Colell A, Marí M, Morales A, Fernández-Checa JC. Direct effect of ceramide on the mitochondrial electron transport chain leads to generation of reactive oxygen species. Role of mitochondrial glutathione. *J Biol Chem*. 1997 Apr 25;272(17):11369-77.
30. García-Villegas R, Camacho-Villasana Y, Shingú-Vázquez MÁ, Cabrera Orefice A, Uribe-Carvajal S, Fox TD, Pérez-Martínez X. The Cox1 C-terminal domain is a central regulator of cytochrome c oxidase biogenesis in yeast mitochondria. *J. Biol. Chem*. 2017, 292, pp. 10912-10925. doi:10.1074/jbc.M116.773077.
31. Gadicherla AK, Stowe DF, Antholine WE, Yang M, Camara AK. Damage to mitochondrial complex I during cardiac ischemia reperfusion injury is reduced indirectly by anti-anginal drug ranolazine. *Biochim Biophys Acta*. 2012 Mar;1817(3):419-29. doi: 10.1016/j.bbabi.2011.11.021. Epub 2011 Dec 8. PMID: 22178605
32. Gndt E, Dörner K, Strampraad MFJ, de Vries S, Friedrich T. The multitude of iron-sulfur clusters in respiratory complex I. *Biochim. Biophys. Acta* 2016,1857, pp. 1068–1072. doi: 10.1016/j.bbabi.2016.02.018
33. Gómez LA, Monette JS, Chavez JD, Maier CS, Hagen TM. Supercomplexes of the mitochondrial electron transport chain decline in the aging rat heart *Arch. Biochem. Biophys*. 2009, 490, pp. 30-35. doi: 10.1016/j.abb.2009.08.002.
34. Gómez LA, Monette JS, Chavez JD, Maier CS, Hagen TM. Supercomplexes of the mitochondrial electron transport chain decline in the aging rat heart. *Arch Biochem Biophys*. 2009; 490(1):30-5.
35. Gonzalez F, D'Aurelio M, Boutant M, Moustapha A, Puech JP, Landes T, Arnauné-Pelloquin L, Vial G, Taleux N, Slomianny C, Wanders RJ, Houtkooper RH, Bellenguer P, Møller IM, Gottlieb E, Vaz FM, Manfredi G, Petit PX. Barth syndrome: cellular compensation of mitochondrial dysfunction and apoptosis inhibition due to changes in cardiolipin remodeling linked to tafazzin (TAZ) gene mutation. *Biochim. Biophys. Acta* 2013, 1832, pp. 1194-206. doi: 10.1016/j.bbadi.2013.03.005.
36. Guerrero-Beltrán CE, M. Calderón-Oliver, E. Tapia, O.N. Medina-Campos, D.J. Sánchez-González, C.M. Martínez-Martínez, K.M. Ortiz-Vega, M. Franco, J. Pedraza-Chaverri, Sulforaphane protects against cisplatin-induced nephrotoxicity, *ol. Lett.*192(2010) 278-85. doi: 10.1016/j.toxlet.2009.11.007

37. Gu J, Wu M, Guo R, Yan K, Lei J, Gao N, Yang M. The architecture of the mammalian respirasome. *Nature*. 2016, 537, pp. 639-43. doi: 10.1038/nature19359.
38. Gupte SS, Hackenbrock CR. The role of cytochrome c diffusion in mitochondrial electron transport. *J. Biol. Chem.* 1988, 263, pp. 5248–5253. Hanson BJ, Carrozzo R, Piemonte F, Tessa A, Robinson BH, Capaldi RA. Cytochrome c oxidase-deficient patients have distinct subunit assembly profiles. *J. Biol. Chem.* 2001, 276, pp.16296-16301. doi:10.1074/jbc.M011162200.
39. Gupte SS, Wu ES, Hoehli L, Hoehli M, Jacobson K, Sowers AE, Hackenbrock CR. Relationship between lateral diffusion, collision frequency, and electron transfer of mitochondrial inner membrane oxidation-reduction components. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1984, 81, pp. 2606-2610. doi: 10.1074/jbc.M011162200.
40. Hausenloy DJ. Signalling pathways in ischaemic postconditioning. *Thromb Haemost.* 2009 Apr;101(4):626-34.
41. Heusch G Treatment of Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury by Ischemic and Pharmacological Postconditioning *Compr Physiol.* 2015 Jul 1;5(3):1123-45. doi: 10.1002/cphy.c140075.
42. Hernández-Reséndiz, C. Zazueta C, PHO-ERK1/2 interaction with mitochondria regulates the permeability transition pore in cardioprotective signaling, *Life Sci.* 108 (2014) 13-21. doi: 10.1016/j.lfs.2014.04.037
43. Hissin PJ, Hilf R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem.* 1976 Jul;74(1):214-26. No abstract available. PMID: 962076
44. Horibata Y, Ando H, Zhang P, Vergnes L, Aoyama C, Itoh M, Reue K, Sugimoto H. StarD7 Protein Deficiency Adversely Affects the Phosphatidylcholine Composition, Respiratory Activity, and Cristae Structure of Mitochondria. *J. Biol. Chem.* 2016, 291, pp. 24880-24891. doi: 10.1074/jbc.M116.736793
45. Hornig-Do, T. Tatsuta, A. Buckermann, M. Bust, G. Kollberg, A. Rötig, Hellmich M, Nijtmans L, Wiesner RJ. Nonsense mutations in the COX1 subunit impair the stability of respiratory chain complexes rather than their assembly. *EMBO J.* 2012, 31, pp. 1293–1307. doi: 10.1038/emboj.2011.477.

46. Ikeda K, Shiba S, Horie-Inoue K, Shimokata K, Inoue S .A stabilizing factor for mitochondrial respiratory supercomplex assembly regulates energy metabolism in muscle. *Nat. Commun.* 2013, 4, pp. 2144:2147. doi: 10.1038/ncomms3147.
47. INEGI. Estadísticas de Mortalidad, 2011.
48. Jang S, Lewis TS, Powers C, Khuchua Z, Baines CP, Wipf P, Javadov S. Elucidating Mitochondrial Electron Transport Chain Supercomplexes in the Heart During Ischemia-Reperfusion. *Antioxid. Redox Signal.* 2017, 27, pp. 57- 69. doi: 10.1089/ars.2016.6635.
49. Jennings RB, Ganote CE. Structural changes in myocardium during acute ischemia. *Circ Res.* 1974 Sep;35 (Suppl 3):156–172. [PubMed] [Google Scholar]
50. Jonckheere AI, Smeitink JA, Rodenburg RJ. Mitochondrial ATP synthase: architecture, function and pathology. *J. Inherit. Metab. Dis.* 2012, 35, pp. 211- 225. doi: 10.1007/s10545-011-9382-9.
51. Kwong LK1, Sohal RS. Substrate and site specificity of hydrogen peroxide generation in mouse mitochondria. *Arch Biochem Biophys.* 1998 Feb 1;350(1):118-26.
52. Krause F, Reifschneider NH, Goto S, Dencher NA. Active oligomeric ATP synthases in mammalian mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005, 329, pp. 583-590. doi: 10.1016/j.bbrc.2005.02.010
53. Krause F, Scheckhuber CQ, Werner A, Rexroth S, Reifschneider NH, Dencher NA, Osiewacz HD. OXPHOS Supercomplexes: respiration and life-span control in the aging model *Podospora anserina*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2006, 1067, pp. 106-115. doi: 10.1196/annals.1354.013.
54. Krause F. Detection and analysis of protein-protein interactions in organellar and prokaryotic proteomes by native gel electrophoresis: (Membrane) protein complexes and supercomplexes. *Electrophoresis* 2006, 27, pp. 2759-81. doi: 10.1002/elps.200600049.
55. Lopez-Fabuel I, Le Douce J, Logan A, James AM, Bonvento G, Murphy MP, Almeida A, Bolaños JP. Complex I assembly into supercomplexes determines differential mitochondrial ROS production in neurons and astrocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2016, 113, pp. 13063–13068. doi: 13063-13068.
56. Lotz, J. Zhang, C. Fang, D. Liem, P. Ping, Isoflurane protects the myocardium against ischemic injury via the preservation of mitochondrial respiration and its supramolecular organization, *Anesth. Analg.* 120 (2015) 265-74. doi: 10.1213/ANE.0000000000000494

57. Maranzana E, Barbero G, Falasca AI, Lenaz G, Genova ML. Mitochondrial respiratory supercomplex association limits production of reactive oxygen species from complex I. *Antioxid Redox Signal*. 2013 Nov 1;19(13):1469-80. doi: 10.1089/ars.2012.4845. Epub 2013 Jun 28.
58. Maranzana E, Barbero G, Falasca AI, Lenaz G, Genova ML. Mitochondrial respiratory supercomplex association limits production of reactive oxygen species from complex I. *Antioxid. Redox Signal*. 2013, 19, pp. 1469-1480. doi: 10.1089/ars.2012.4845.
59. Marques I, Dencher NA, Videira A, Krause F. Supramolecular organization of the respiratory chain in *Neurospora crassa* mitochondria. *Eukaryot. Cell*. 2007, 6, pp. 2391–2405. doi: 10.1128/EC.00149-07.
60. Mårtensson CU, Doan KN, Becker T. Effects of lipids on mitochondrial functions. *Biochim. Biophys. Acta*. 2017, 1862, pp. 102-113. doi: 10.1016/j.bbaliip.2016.06.015.
61. McKenzie M, Lazarou M, Thorburn DR, Ryan MT. Mitochondrial respiratory chain supercomplexes are destabilized in Barth Syndrome patients. *J. Mol. Biol.* 2006, 18, pp. 462-469. doi: 10.1016/j.jmb.2006.06.057.
62. Mejia EM, Chau S, Sparagna GC, Sipione S, Hatch GM. Reduced Mitochondrial Function in Human Huntington Disease Lymphoblasts is Not Due to Alterations in Cardiolipin Metabolism or Mitochondrial Supercomplex Assembly. *Lipids* 2016, 51, pp. 561-9. doi: 10.1007/s11745-015-4110-0.
63. Moreno Lastres D, Fontanesi F, García-Consuegra I, Martín MA, Arenas J, Barrientos A, Ugalde C. Mitochondrial complex I plays an essential role in human respirasome assembly. *Cell. Metab*. 2012, 15, pp. 324–335. doi: 10.1016/j.cmet.2012.01.015.
64. Musatov a and Robinson NC. Susceptibility of mitochondrial electron-transport complexes to oxidative damage. Focus on cytochrome c oxidase. *Free Radical Research*, November 2012; 46(11): 1313–1326.
65. Nübel E, Wittig I, Kerscher S, Brandt U, Schägger H. Two-dimensional native electrophoretic analysis of respiratory supercomplexes from *Yarrowia lipolytica*. *Proteomics* 2009, 9, pp. 2408-2418. doi: 10.1002/pmic.200800632.
66. Orth M, Schapira AH. Mitochondrial involvement in Parkinson's disease. *Neurochem Int* 2002, 40, pp. 533–541.

67. Organización Mundial de la Salud (OMS)
68. Panov A, Dikalov S, Shalbuyeva N, Hemendinger R, Greenamyre JT, Rosenfeld J. Species- and tissue-specific relationships between mitochondrial permeability transition and generation of ROS in brain and liver mitochondria of rats and mice. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007 Feb;292(2):C708-18.
69. Pérez-Pérez R, Lobo-Jarne T, Milenkovic D, Mourier A, Bratic A, García Bartolomé A, Fernández-Vizarra E, Cadenas S, Delmiro A, García-Consuegra I, Arenas J, Martín MA, Larsson NG, Ugalde C. COX7A2L Is a Mitochondrial Complex III Binding Protein that Stabilizes the III₂+IV Supercomplex without Affecting Respirasome Formation. *Cell Rep.* 2016, 16, pp. 2387-2398. doi: 10.1016/j.celrep.2016.07.081.
70. Ramírez-Camacho I, Flores-Herrera O, Zazueta C. The relevance of the supramolecular arrangements of the respiratory chain complexes in human diseases and aging. *Mitochondrion.* 2019 Jan 18. pii: S1567-7249(17)30317-3. doi: 10.1016/j.mito.2019.01.001. [Epub ahead of print] Review. PMID: 30664953.
71. Ramírez-Camacho I, Correa F, El Hafidi M, Silva-Palacios A, Ostolga-Chavarría M, Esparza-Perusquía M, Olvera-Sánchez S, Flores-Herrera O, Zazueta C. Cardioprotective strategies preserve the stability of respiratory chain supercomplexes and reduce oxidative stress in reperfused ischemic hearts. *Free Radic Biol Med.* 2018 Dec;129:407-417. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.09.047. Epub 2018 Oct 11. PMID: 30316780.
72. Rosca MG, Minkler P, Hoppel CL. Cardiac mitochondria in heart failure: Normal cardiolipin profile and increased threonine phosphorylation of complex IV, *Biochim. Biophys. Acta* 2011, 1807, pp. 1373–1382.
73. Rosca MG, Tandler B, Hoppel CL. Mitochondria in cardiac hypertrophy and heart failure. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2013, 55, pp. 31–41. doi: 10.1016/j.yjmcc.2012.09.002.
74. Rosca MG, Vazquez EJ, Kerner J, Parland W, Chandler MP, Stanley W, Sabbah HN, Hoppel CL. Cardiac mitochondria in heart failure: decrease in respirasomes and oxidative phosphorylation. *Cardiovasc Res.* 2008 Oct 1;80(1):30-9. doi: 10.1093/cvr/cvn184. Epub 2008 Aug 18.
75. Saeki K, Suzuki H, Tsuneoka M, Maeda M, Iwamoto R, Hasuwa H, Shida S, Takahashi T, Sakaguchi M, Endo T, Miura Y, Mekada E, Mihara K. Identification of mammalian TOM22 as

a subunit of the preprotein translocase of the mitochondrial outer membrane. *J. Biol. Chem.* 2000, 275, pp. 1996-2002. doi: 10.1074/jbc.M004794200.

76. Schäfer E, Dencher NA, Vonck J, Parcej DN. Three-dimensional structure of the respiratory chain supercomplex I1III2IV1 from bovine heart mitochondria. *Biochemistry* 2007, 46, pp. 12579-85. doi: 10.1021/bi700983h.

77. Schäfer E, Seelert H, Reifschneider NH, Krause F, Dencher NA, Vonck J. Architecture of active mammalian respiratory chain supercomplexes. *J. Biol. Chem.* 2006, pp. 281, 15370-5. doi: 10.1074/jbc.M513525200.

78. Schäfer G, Purschke W, Schmidt CL. On the origin of respiration: electron transport proteins from archaea to man. *FEMS Microbiol. Rev.* 1996, 18, pp. 173-88.

79. Schäfer E.; et al; Architecture of active mammalian respiratory chain supercomplexes. *Journal of Biological Chemistry.* 2006;281:22.

80. Schägger H, Pfeiffer K. Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *EMBO J.* 2000, 17, pp. 1777-83. doi: 10.1093/emboj/19.8.1777.

81. Schägger H, Pfeiffer K. The ratio of oxidative phosphorylation complexes I-V in bovine heart mitochondria and the composition of respiratory chain supercomplexes. *J. Biol. Chem.* 2001, 276, pp. 37861-37867. Doi: 10.1074/jbc.M106474200

82. Schägger H. Respiratory chain supercomplexes. *IUBMB Life.* 2001, 52, pp. 119-128.

83. Schapira AH, Cooper JM, Dexter D, Jenner P, Clark JB, Marsden CD. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *Lancet* 1987, 1, pp. 1261:1269.

84. Schuler MH, Di Bartolomeo F, Mårtensson CU, Daum G, Becker T. Phosphatidylcholine Affects Inner Membrane Protein Translocases of Mitochondria. *J. Biol. Chem.* 2016, 291, pp. 378-383. doi: 10.1074/jbc.M116.722694.

85. Scolletta S, Biagioli B. Energetic myocardial metabolism and oxidative stress: let's make them our friends in the fight against heart failure. *Biomed. Pharmacother.* 2010, 64, pp. 203-7. doi: 10.1016/j.biopha.2009.10.002.

86. Seelert H, Dani DN, Dante S, Hauss T, Krause F, Schäfer E, Frenzel M, Poetsch A, Rexroth S, Schwassmann HJ, Suhai T, Vonck J, Dencher NA. From protons to OXPHOS supercomplexes and Alzheimer's disease: structure-dynamics-function relationships of energy-transducing membranes. *Biochim Biophys Acta.* 2009 Jun;1787(6):657-71. doi: 10.1016/j.bbabi.2009.02.028.

87. Shägger H. Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *EMBO J.* 2000, 19, pp. 1777-83.
88. Shinzawa-Itoh K, Shimomura H, Yanagisawa S, Shimada S, Takahashi R, Oosaki M, Ogura T, Tsukihara T. Purification of Active Respiratory Supercomplex from Bovine Heart Mitochondria Enables Functional Studies. *J. Biol. Chem.* 2016, 291, pp. 4178-84. doi: 10.1074/jbc.M115.680553.
89. Silva-Palacios A, M Königsberg, C Zazueta. Nrf2 signaling and redox homeostasis in the aging heart: A potential target to prevent cardiovascular diseases?. *Ageing Res. Rev.* 2016, 26, pp. 81-95. doi:10.1016/j.arr.2015.12.005
90. Siskind LJ, Kolesnick RN, Colombini M. Ceramide forms channels in mitochondrial outer membranes at physiologically relevant concentrations. *Mitochondrion* 2006;6(3):118–25.
91. Spinazzi M., et al., assessment of mitochondrial respiratory chain enzymatic activities on tissues and cultured cells nature protocol vol. 7 n^a 6 2012 1235-1246.
92. Speelmans G, Staffhorst RWHM, de Kruijff B. The anionic phospholipid-mediated membrane interaction of the anti-cancer drug doxorubicin is enhanced by phosphatidylethanolamine compared to other zwitterionic phospholipids. *Biochemistry.* 1997 Jul 15;36(28):8657-62. PMID: 9214313.
93. Strogolova V, Hoang NH, Hosler J, Stuart RA. The yeast mitochondrial proteins Rcf1 and Rcf2 support the enzymology of the cytochrome c oxidase complex and generation of the proton motive force. *J Biol Chem.* 2019 Mar 29;294(13):4867-4877. doi: 10.1074/jbc.RA118.006888. Epub 2019 Jan 25.
94. Sunderhaus S, Eubel H, Braun HP Two-dimensional blue native/blue native polyacrylamide gel electrophoresis for the characterization of mitochondrial protein complexes and supercomplexes. *Methods Mol. Biol.* 2007, 372, pp. 315-24. doi: 10.1007/978-1-59745-365-3_23.
95. Tomasetig L, Di Pancrazio F, Harris DA, Mavelli I, Lippe G. Dimerization of F0F1ATP synthase from bovine heart is independent from the binding of the inhibitor protein IF1. *Biochim. Biophys. Acta.* 2002, 1556, pp. 133-41.
96. Trinchera M, Ghidoni R. Precursor product relationship between GM1 and GD1a biosynthesized from exogenous GM2 ganglioside in rat liver. *J Biochem.* 1990 Apr;107(4):619-23

97. Vander Heiden MG, Li XX, Gottlieb E, Hill RB, Thompson CB, Colombini M. Bcl-xL promotes the open configuration of the voltage-dependent anion channel and metabolite passage through the outer mitochondrial membrane. *J Biol Chem* 2001; 276: 19414–19419.
98. Vives-Bauza, Zhou C, Huang Y, Cui M, de Vries RLA, Kim J. PINK1- dependent recruitment of Parkin to mitochondria in mitophagy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2010, 107, pp. 378-83. doi: 10.1073/pnas.0911187107.
99. Vukotic M, Oeljeklaus S, Wiese S, Vögtle FN, Meisinger C, Meyer HE, Zieseniss A, Katschinski DM, Jans DC, Jakobs S, Warscheid B, Rehling P, Deckers M. Rcf1 mediates cytochrome oxidase assembly and respirasome formation, revealing heterogeneity of the enzyme complex. *Cell Metab.* 2012, 15, pp. 336-47. doi: 10.1016/j.cmet.2012.01.016.
100. Wittig I, Carozzo R, Santorelli FM, Schägger H. Supercomplexes and subcomplexes of mitochondrial oxidative phosphorylation. *Biochim. Biophys. Acta.* 2006, 1757, pp. 1066-72. doi: 10.1016/j.bbabi.2006.05.006.
101. Wittig I, Meyer B, Heide H. Assembly and oligomerization of human ATP synthase lacking mitochondrial subunits a and A6L. *Biochim. Biophys. Acta.* 2010, 1797, pp. 1004–1011.
102. Wittig I, Schägger H. Supramolecular organization of ATP synthase and respiratory chain in mitochondrial membranes. *Biochim. Biophys. Acta.* 2009, 1787, pp. 672-80. doi: 10.1016/j.bbabi.2008.12.016.
103. Wong R, A.M. Aponte, C. Steenbergen, E. Murphy, Cardioprotection leads to novel changes in the mitochondrial proteome, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 298 (2010) H75-91. doi: 10.1152/ajpheart.00515.2009
104. Wüst RC, de Vries HJ, Wintjes LT, Rodenburg RJ, Niessen HW, Stienen GJ. Mitochondrial complex I dysfunction and altered NAD(P)H kinetics in rat myocardium in cardiac right ventricular hypertrophy and failure. *Cardiovasc. Res.* 2016, 111, pp. 362-72. doi: 10.1093/cvr/cvw176.
105. Zhao H, J. Li, Y. Zhou, Z. Ge, J. Fan, Z. Shao, Y. Zeng, Dose-dependent protective effect of propofol against mitochondrial dysfunction in ischaemic/reperfused rat heart: role of cardiolipin, *Br. J. Pharmacol.* 153 (2008) 1641-49. doi: 10.1038/bjp.2008.45

