



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**Caracterización bioenergética de mitocondrias de
Arabidopsis thaliana.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA EN ALIMENTOS

P R E S E N T A:

GABRIELA MACARIA MORELOS ALBOR



CDMX, 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado

Presidente: **Dr. Jesús Fernando Montiel Aguirre**

Vocal: **Dr. Samuel Canizales Quinteros**

Secretario: **Dr. Manuel Gutiérrez Aguilar**

1er suplente: **Dr. Alfonso Rafael Salgado Aguayo**

2do suplente: **Q.A. Javier Axosco Marín**

Tutor: Dr. Manuel Gutiérrez Aguilar
Laboratorio 115 Departamento de Bioquímica
Edificio E, Facultad de Química
Universidad Nacional Autónoma de México,
Coyoacán, CDMX. C.P. 04510
México

Gabriela Macaria Morelos Albor

Sustentante

Dr. Manuel Gutiérrez Aguilar

Asesor

Agradecimientos

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

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) por el financiamiento para llevar a cabo la presente tesis mediante el proyecto UNAM-DGAPA-PAPIIT IA208121 “Caracterización del transporte de calcio mitocondrial en la fisiología de *Arabidopsis thaliana*”.

A los miembros del honorable jurado: Dr. Jesús Fernando Montiel Aguirre, Dr. Samuel Canizales Quinteros, Dr. Alfonso Rafael Salgado Aguayo, Q.A. Javier Axosco Marín y al Dr. Manuel Gutiérrez Aguilar por sus valiosas observaciones y sugerencias en la culminación del presente trabajo.

Dedicatoria

*Este trabajo está dedicado a
mi mamá por su apoyo y amor incondicional.*

DEFINICIONES DE ABREVIATURAS DEL PRESENTE TEXTO

°C: grados Celsius

µl: microlitro

µm: micrómetro

µM: micromolar, unidad de concentración (10^{-6} mol/L)

ANT: Translocador de nucleótidos de adenina (ADP-ATP)

AtCyp21: Ciclofilina mitocondrial

ATP sintasa OSCP: ATP sintasa sensible a oligomicina

ATP: Adenosín trifosfato

ATR: Atractilósido

BKA: Ácido bongkrékico

Ca²⁺: Ion calcio

CaCl₂: Cloruro de Calcio

cm: centímetro

CN: Cianuro

CRC: Capacidad de Retención de Calcio

CsA: Ciclosporina A

CypD: Ciclofilina D mitocondrial

DNA: Ácido desoxirribonucleico

dUb: Decilubiquinona

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

h: hora

H₂O: agua

IMM: Membrana mitocondrial interna

IMS: Espacio intermembranal

KCl: Cloruro de potasio

kDa: kilo Dalton

M: molar, unidad de concentración (mol/L)

MCU: Uniportador de calcio mitocondrial

Medio MS: Medio Murashige-Skoog para germinación de semillas.

MES: Ácido morfolino etano sulfónico

Mg²⁺: Magnesio

min: minuto

ml: mililitro

MM: Matriz mitocondrial

mm: milímetro

mM: milimolar, unidad de concentración (10^{-3} mol/L)

MPT: Transición de la permeabilidad mitocondrial

MUC: Canal no selectivo mitocondrial

N₂: Nitrógeno

NaCl: Cloruro de sodio

O₂: Oxígeno

OMM: Membrana mitocondrial externa

pb: pares de bases

PCD: Muerte celular programada

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

PG: Propil galato

pH: Potencial de hidrógeno

Pi: Fosfato

PiC: Portador de fosfato mitocondrial

PTP: Poro de transición de la permeabilidad mitocondrial

qPCR: PCR en tiempo real

RNA: Ácido ribonucleico

ROS: Especies reactivas de Oxígeno

rpm: revoluciones por minuto

RT-PCR: PCR con transcriptasa inversa

s: segundo

SDS: Dodecilsulfato sódico

TBE: Tris, borato y EDTA

TDNA: ADN de transferencia

TRIS HCl: Clorhidrato de TRIS

UV: ultravioleta

VDAC: Canal aniónico dependiente de voltaje

$\Delta\psi$: Potencial transmembranal mitocondrial

ÍNDICE

Resumen	13
1. Introducción.....	14
1.1 <i>Arabidopsis thaliana</i> como modelo de estudio.....	14
1.2 El estrés abiótico y la muerte celular en plantas.....	17
1.3 Las mitocondrias de plantas	18
1.4 El poro de transición de la permeabilidad.....	20
1.5 Estructura del PTP	21
1.6 Presencia del PTP en plantas	23
2. Hipótesis	27
3. Objetivo general.....	27
3.1 Objetivos particulares.....	27
4. Metodología y Procedimiento Experimental	28
4.1 Material vegetal.....	28
4.2 Soluciones de aislamiento, de medición y reactivos.....	28
4.2.1 Solución enzimática	29
4.2.2 Solución W5	29
4.2.3 Amortiguador de lavado de Protoplastos.....	29
4.2.4 Amortiguador CRC	30
4.2.5 Inhibidores de respiración mitocondrial	30

4.2.6 Buffer de extracción de DNA.....	30
4.3 Metodologías.....	31
4.3.1 Genotipificación de la cepa silvestre y AtCyp21	31
4.3.2 Germinación de semillas en medio MS adicionado con decilubiquinona (dUb)	33
4.3.3 Aislamiento de Protoplastos de Mesófilo.....	34
4.3.4 Medición del consumo de oxígeno por respirometría de alta resolución.	36
4.3.5 Tinción por Mitotracker	36
4.3.6 Análisis Estadístico	37
5. Resultados	38
6. Discusión.....	43
7. Conclusiones	47
8. Perspectivas	48
9. Bibliografía.....	49

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura	Contenido	Página
1	Micrografía electrónica de dos mitocondrias de célula de protección estomática de la hoja de <i>H. albosriatum</i> .	20
2	Complejos proteícos propuestos que influyen en el PTP	23
3	Numeración de hojas en una planta adulta de <i>A. thaliana</i>	28
4	Genotipificación de las plantas ecotipo Col-0 y mutantes isogénicas AtCyp21.	33
5	Raíces de <i>Arabidopsis thaliana</i> germinadas en medio MS con y sin dUb.	38
6	Medición de raíces de <i>Arabidopsis thaliana</i> germinadas en Medio MS sin y con dUb de los dos ecotipos empleados.	39
7	Crecimiento de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> Col-0 y AtCyp21 en macetas con germinación previa en Medio MS con y sin dUb.	39
8	Evaluación de consumo de oxígeno del ecotipo Col-0 en condiciones basales (estado 3) e inhibición de la respiración con mezcla de propil galato y cianuro.	40

9	Tinción con Mitotracker de protoplastos sometidos a estrés térmico en ausencia o presencia de dUb.	41
Tabla 1	Presencia de un probable PTP en mitocondrias de diversas especies de plantas	24
Tabla 2	Lista de oligonucleótidos para el proceso de genotipificación de las cepas Col-0 y AtCyp21 por PCR	32

Resumen

En la presente tesis se evaluó el efecto que tiene la decilubiquinona en el crecimiento y bioenergética mitocondrial de una cepa de *Arabidopsis thaliana* silvestre y una mutante carente de la ciclofilina mitocondrial AtCyp21. Para ello, se realizaron experimentos de consumo de oxígeno y microscopía con protoplastos aislados a partir de hojas, con el fin de determinar la integridad de estos al ser sometidos a estrés abiótico. Los resultados sugieren que la adición de decilubiquinona les confiere resistencia a los protoplastos debido a probables efectos sobre el poro de transición de la permeabilidad mitocondrial. Esto a su vez ocasionaría que las mitocondrias de *Arabidopsis thaliana* se mantengan funcionales aun después de la exposición a estrés abiótico.

1. Introducción

1.1 *Arabidopsis thaliana* como modelo de estudio

La planta con flores *Arabidopsis thaliana* es un organismo ampliamente utilizado por los investigadores de modelos vegetales. Varias características hacen a esta planta un candidato ideal para los estudios genéticos y moleculares: tiene un genoma diploide relativamente pequeño con sólo cinco cromosomas (*Nicotiana tabacum* presenta 24 cromosomas) y su genoma fue completamente secuenciado [The Arabidopsis Genome Initiative, 2000]. El ciclo de crecimiento de *A. thaliana* es lo suficientemente rápido como para hacer experimentos en los diversos estados de crecimiento vegetal en pocas semanas. Las plantas pueden crecer en placas de agar o en sustratos específicos. La planta *A. thaliana* pertenece a la familia Brassicaceae y se ha usado ampliamente en estudios de genética molecular y de bioquímica por su rápido crecimiento y por ser de relativa fácil manipulación genética [Koncz y cols.,1992]. En la actualidad existen miles de líneas mutantes carentes o con sobreexpresión de diversos genes, así como mutantes con sobreexpresión de proteínas de fusión y transgenes [para más información, visitar <https://abrc.osu.edu/resources>].

Los protoplastos de hojas del mesófilo de *A. thaliana* constituyen un modelo celular ampliamente utilizado en estudios de metabolismo vegetal. Estas células permiten llevar a cabo estudios de bioquímica, genética y biología celular en condiciones fácilmente controladas, añadiendo que los protoplastos de tipo silvestre mantienen la mayoría de las características y respuestas de las hojas, que a menudo se pierden en células de cultivo en suspensión no diferenciadas. Los protoplastos de las cepas mutantes son de igual

forma un modelo valioso y que usualmente poseen características similares de las plantas mutantes originales [Scott y Logan, 2008; Wu y cols., 2009; Yoo y cols., 2007]. Adicionalmente, es posible transformar estas células con plásmidos para estudiar el papel de determinados genes en la función celular [Sang y cols., 2011]. Para la obtención de protoplastos de *A. thaliana* existen varios métodos. Sin embargo, la gran mayoría de éstos convergen en el punto de degradación de la pared celular con enzimas hidrolíticas que permiten digerir la celulosa y amilopectina en condiciones controladas [Yoo y cols., 2007; Wu y cols., 2009].

Aunque *A. thaliana* carece de valor económico como cosecha, esta pequeña planta presenta varias ventajas que son utilizadas por diversos laboratorios de investigación en el mundo [Wilson, 2000]. Un ejemplo es que *A. thaliana* presenta varios “ecotipos” o plantas con ligeras variaciones genéticas las cuales son endémicas de diversos puntos en el planeta. Estos ecotipos están sometidos a diferentes condiciones ambientales y por lo tanto son muy valiosos en los estudios donde se busca reproducibilidad de un mismo fenómeno en dos o más fondos genéticos. Los ecotipos de Columbia y Landsberg son los dos más utilizados para estudios genéticos y moleculares [Meinke y cols., 1998].

Posterior a la secuenciación del genoma de *Arabidopsis thaliana*, la comunidad científica se enfrentó al nuevo desafío de asignar funciones biológicas a todos los genes en este genoma. Esto ha conllevado a tener información útil sobre diferentes aspectos de la fisiología y bioquímica de vegetales que se resolvieron a través del análisis genético y molecular de diversas mutantes de *A. thaliana*. Por ejemplo, la identificación inequívoca de un receptor hormonal en plantas, debido a la aclaración de las vías de transducción de señales de etileno en *Arabidopsis* [Wilson, 2000]. También en el área de percepción

de la luz, el análisis de diversas mutantes de *Arabidopsis* ha llevado a la identificación de receptores de plantas y componentes de la transducción de señales de fototropismo y ritmos circadianos. Además, se han identificado varios genes que regulan la transición a la floración y se han construido modelos para entender el control genético del desarrollo floral. Sin duda los avances en bioquímica y biología celular han cubierto temas que van desde el transporte de iones y la biosíntesis de ácidos grasos hasta la formación de la pared celular y el mantenimiento del cloroplasto [Meinke y cols., 1998]. Para el estudio de muchos de estos procesos fisiológicos, se han desarrollado distintos métodos para generar mutaciones en el genoma de *A. thaliana*. Los diferentes mutágenos (agentes químicos, físicos y biológicos) producen tipos específicos de lesiones y varían en su eficiencia y grado de aleatoriedad de mutaciones. La relativa facilidad por la cual los transposones y el ADN-T introducido por bacterias del género *Agrobacterium* pueden usarse para crear mutaciones de inserción etiquetadas en secuencia en los genomas de plantas, ha hecho de estos los mutágenos elegidos entre las estrategias genéticas inversas. Sin embargo, la mutagénesis insercional tiene limitaciones claras, y las metodologías complementarias de mutagénesis dirigida a genes a menudo se usan en paralelo [Alonso y cols., 2006].

Entre las aplicaciones producto de la investigación básica con *Arabidopsis* se encuentra el poder identificar problemas a nivel de genes discretos que ayudan a resolver necesidades prácticas como aquellas relacionados con la agricultura, energía y el medio ambiente mediante técnicas como clonación molecular de genes de resistencia a enfermedades, ingeniería de plantas resistentes a temperaturas extremas, estimulación de la floración prematura en árboles, así como la generación de plantas con ciclos de

vida extendidos, entre otras [Meinke y cols., 1998].

1.2 El estrés abiótico y la muerte celular en plantas

Las plantas requieren energía (luz), agua, carbono y nutrientes minerales para crecer. El estrés abiótico se define como aquellas condiciones ambientales que reducen el crecimiento y el rendimiento por debajo de los niveles óptimos o deseables. Las respuestas de las plantas al estrés abiótico pueden ser dinámicas y complejas. Otra definición de estrés se puede referir a uno o varios factores ambientales desfavorables para un organismo mermando así su capacidad para sobrevivir [Levitt, 1980]. Cuando se someten a tensiones abióticas, las plantas reprograman activamente su crecimiento modulando tanto la división celular como la expansión celular. El crecimiento disminuye rápidamente al inicio del estrés, pero se recupera y se adapta una vez que las condiciones previas al estrés se restituyen. Este tipo de condiciones ambientales incluyen sequía, calor, frío, deficiencia de nutrientes y exceso de sal o metales tóxicos como aluminio, arsénico y cadmio en el suelo. La sequía, la sal y los cambios abruptos en la temperatura son factores importantes que afectan la distribución geográfica de las plantas en la naturaleza y limitan la productividad de las plantas en la agricultura [Zhu, 2016].

La muerte de conjuntos específicos de células es una parte esencial del crecimiento y desarrollo de muchos organismos eucariontes, tanto animales como vegetales.

Además de su papel en el desarrollo, la muerte celular puede ser un componente de las respuestas al estrés biótico y abiótico. Dado que los organismos controlan la iniciación y ejecución de los procesos de muerte celular. Estos tipos de muerte celular son denominados “muerte celular programada”. En otras palabras, se denomina muerte

celular programada al proceso que requiere energía y es regulado por distintos conjuntos de genes, el cual está involucrado en la eliminación selectiva de células no deseadas.

En plantas, la muerte celular ocupa varias funciones en el desarrollo: a) la senescencia remueve células reciclando mucho de su carbono, fósforo y nitrógeno; b) la muerte celular es importante al esculpir tejidos como en la formación de aerénquima, formación de primordios florales y capas de la aleurona durante la germinación; c) las células invadidas por patógenos pueden auto-eliminarse como parte de una respuesta hipersensitiva contra el patógeno; d) la muerte celular también sucede durante la diferenciación terminal, y el ejemplo clásico es la formación de vasos y traqueidas; y e) la muerte celular programada cuando el metabolismo de las células es perturbado por un estrés abiótico o por bioingeniería. Por lo tanto, el proceso de la muerte celular programada es esencial para asegurar el desarrollo propio de la planta [Camarena-Gutiérrez, 2006]. Cabe mencionar que las mitocondrias son los organelos que se encuentran en el centro de la respuesta celular al estrés y el control de la muerte celular [Jonas y cols., 2015]. Por lo anterior, se considera que las mitocondrias son organelos que operan al límite de su diseño y que pequeños cambios en las condiciones celulares o ambientales pueden ocasionar cambios sustanciales en su fisiología y que se transformen de organelos generadores en organelos consumidores de ATP [Gutiérrez-Aguilar y Baines, 2013].

1.3 Las mitocondrias de plantas

Las mitocondrias son organelos celulares de gran relevancia, debido a que, su objetivo principal es obtener energía en forma de ATP, mediante el proceso de respiración celular. [Ratajczak y cols., 2019]. Para producir la energía en forma de ATP, las mitocondrias

utilizan sustratos producidos en el citosol por vías metabólicas de carbohidratos, lípidos y proteínas [Jonas y cols., 2015].

Las mitocondrias presentan cuatro subcompartimentos diferentes: la membrana mitocondrial externa (OMM), el espacio intermembranal (IMS), la membrana mitocondrial interna (IMM) y la matriz mitocondrial (MM). La OMM es permisiva al paso de iones y pequeñas moléculas (<5 kDa), a través de proteínas de membrana (porinas) formadoras de poros, como el canal aniónico dependiente de voltaje. Mientras que la IMM es altamente impermeable por lo que es necesario establecer un gradiente electroquímico, a través, de las actividades de los complejos proteicos de la membrana de fosforilación oxidativa para la biosíntesis de ATP [Toleco y cols., 2020].

En plantas, las mitocondrias además de la respiración y suministro de energía celular están involucradas en otras tareas metabólicas como la asimilación de nitrógeno, la fotorrespiración y utilización de depósitos de almacenamiento de carbono y nitrógeno durante la germinación de semillas [Douce, 1985].

La forma más común en la que son asumidas las mitocondrias en plantas es con extremos hemisféricos (Fig. 1) de aproximadamente 0.5 μm de diámetro y hasta 2 μm de longitud [Douce, 1985].

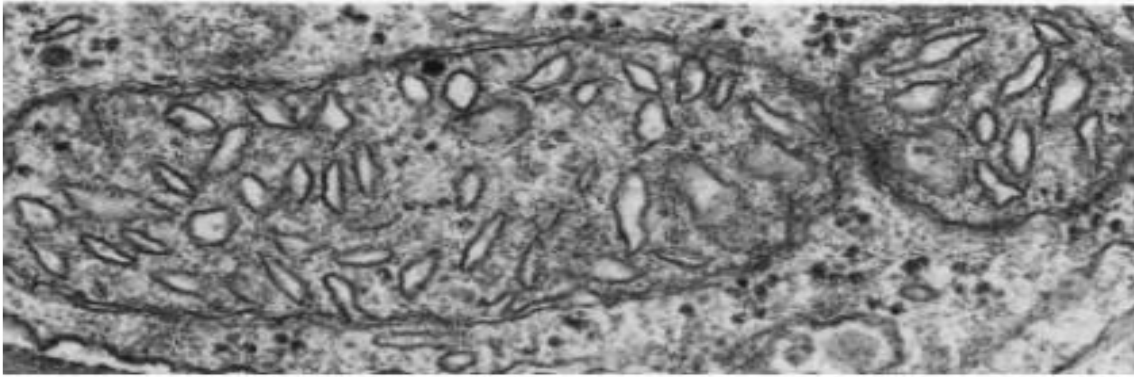


Figura 1. Micrografía electrónica de dos mitocondrias de célula de protección estomática de la hoja de *H. albobstriatum*.

Imagen tomada de Douce, 1985

1.4 El poro de transición de la permeabilidad

El poro de transición de la permeabilidad mitocondrial (PTP) es una estructura proteica ubicada en la membrana interna mitocondrial de identidad debatida [Baines y Gutiérrez-Aguilar, 2018]. Inicialmente se describió por Hunter y Haworth como un canal de liberación de calcio inducido por calcio y más tarde se demostró que se podía inhibir con el bloqueador de canales de calcio rojo de rutenio y con cantidades nanomolares del undecapéptido extraído del hongo *Topocladium inflatum*, ciclosporina A (CsA) [Hunter y Haworth, 1979; Gutiérrez-Aguilar y Baines, 2015].

Con estos fenotipos se propuso la participación del uniportador mitocondrial de calcio (MCU) y la isoforma mitocondrial de una ciclofilina (CypD) en la regulación del PTP. La actividad del PTP es susceptible a ser regulada. Estudios que se realizaron con mitocondrias aisladas usando inhibidores de MCU -lo que bloquea la entrada de calcio a la mitocondria- sugieren que los iones calcio deben entrar a la mitocondria para activar el PTP [Baines y Gutiérrez-Aguilar, 2018].

La CypD es el único modulador universalmente aceptado del PTP. Aunque aún no están del todo claras sus funciones fisiológicas, se presume su implicación en el plegamiento de proteínas, ya que con anterioridad se mencionó su relación [Gutiérrez-Aguilar y Baines, 2015]. Se ha descrito la CypD en *Arabidopsis thaliana*, donde están presentes dos ciclofilinas mitocondriales de dominio único, AtCyp21-3 y AtCyp21-4 [Romano y cols., 2004].

Por otro lado, se ha visto que la cadena de transporte de electrones aumenta la polarización de la membrana mitocondrial y por lo tanto inhibe el PTP. Mientras que al haber una depolarización de la membrana (caída en su potencial) activa al PTP. Estos datos sugieren que tanto el transporte mitocondrial de electrones, el uso mitocondrial de sustratos y el ANT gobiernan la apertura del PTP [Mnatsakanyan y cols., 2017].

Por otro lado, se ha visto que la apertura del PTP se facilita mediante la unión de CypD a la IMM gracias a su extremo N-terminal, en un proceso modulado por Ca^{2+} , Pi y ROS. Sin embargo, existen inhibidores para que no se concrete esta unión [Nicolli y cols., 1993; Scorrano y cols., 1997]. Estudios genéticos demuestran que la propensión a abrir el PTP se reduce en mitocondrias desprovistas de CypD, mientras que la susceptibilidad a la apertura del PTP y a la muerte celular aumenta cuando se sobreexpresa CypD [Basso y cols., 2005, Baines y cols., 2005; Nakagawa y cols., 2005; Schinzel y cols., 2005].

1.5 Estructura del PTP

Los componentes formadores del PTP han sido y son objeto de debates constantes. Desde su descubrimiento por Hunter y Haworth en 1979 [Hunter y Haworth, 1979], se pensó que el translocador de ADP-ATP (ANT) formaba parte de esta estructura. Lo

anterior es debido a que el PTP es inhibido con ácido bongkrékico (BKA) y sensibilizado por atractilósido (ATR). Ambas moléculas son potentes ligandos del ANT y su efecto divergente se piensa que es debido a que estabilizan al ANT en una conformación opuesta. Específicamente, se sabe que ATR bloquea al ANT en la conformación “C” la cual tiene forma de cesta con la apertura en dirección hacia el espacio intermembranal. En forma inversa, BKA bloquea al ANT en la conformación “M”, la cual tiene forma de cesta con la apertura en dirección hacia la matriz mitocondrial [Baines y Gutiérrez-Aguilar, 2018].

A lo largo de los años han surgido diferentes hipótesis sobre la estructura del PTP. Una de ellas propone la unión de la ciclofilina al translocador de nucleótidos de adenina (ANT) o al canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC). Sin embargo, esta hipótesis fue cuestionada por otro grupo debido a que se realizaron estudios con ratones deficientes de ANT O VDAC y aun mostraban una respuesta al PTP. Posterior a esta cuestión, se planteó una nueva hipótesis en la que se mencionaba que la CypD se une al acarreador de fosfato mitocondrial (PiC) en lugar del ANT. No obstante, también fue desafiada en estudios que demostraron la ocurrencia del PTP líneas celulares con niveles alterados de [Gutiérrez-Aguilar y cols., 2014].

Modelos recientes sugieren que CypD se une a la subunidad ATP sintasa OSCP para modular el poro MPT [Giorgio y cols., 2013]. Con base en estudios disponibles que abordan los mecanismos potenciales para el poro MPT dependiente de CypD, es posible inferir un modelo de trabajo actualizado mediante el cual CypD se une a PiC, ANT o ATP sintasa para regular la apertura de poro (Fig. 2). De acuerdo con lo mencionado, el Ca^{2+} y el estrés oxidativo, pueden activar el MPT al inducir el aflojamiento de la subunidad c y

aumentar la conductancia del canal, siendo facilitado por ANT en la conformación “c”. Por el contrario, el bloqueo del poro MPT por los nucleótidos de adenina podría atacar tanto a la ATP sintasa como al ANT para cerrar el poro. Este efecto también puede recapitularse en presencia de BKA, que bloquea al ANT en la conformación “m” [Baines y Gutiérrez Aguilar, 2018].

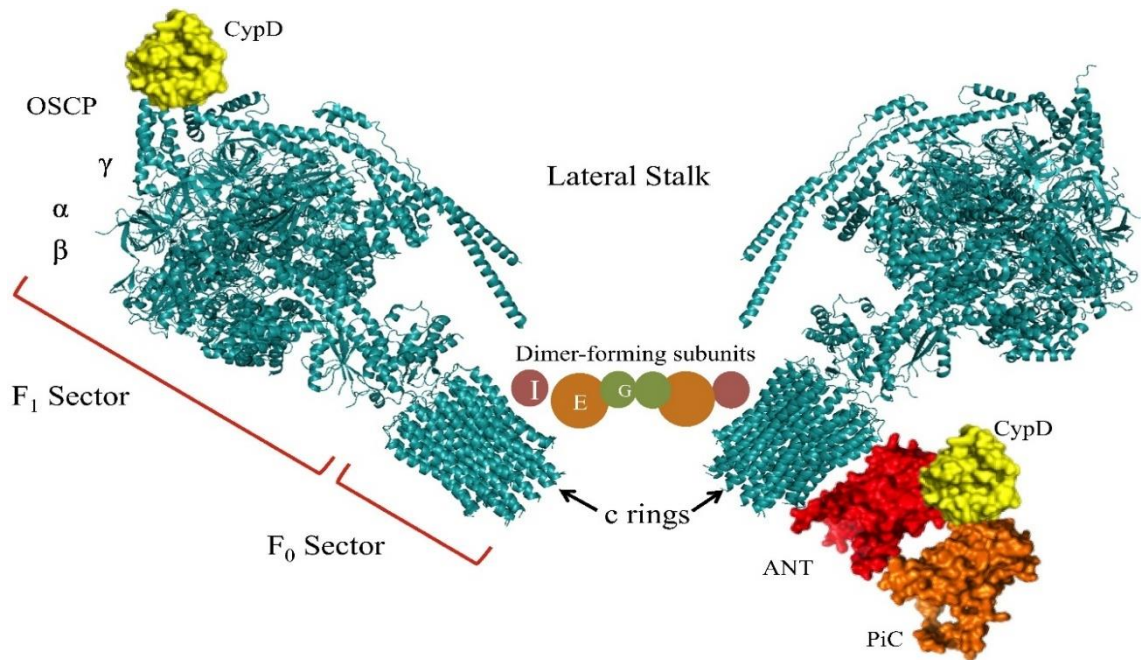


Figura 2. Complejos proteicos propuestos que influyen en el PTP

Imagen tomada de Gutiérrez-Aguilar y Baines 2015

1.6 Presencia del PTP en plantas

El PTP está presente en diferentes especies y cepas eucariotas, lo que provoca que su regulación sea distinta por la adaptación de cada organismo. En particular, en este apartado hablamos acerca de su presencia en plantas, y particularmente en *Arabidopsis thaliana*. De acuerdo con la tabla 1, se muestra que dentro del Reino Plantae se encuentra un canal no selectivo mitocondrial de *A. thaliana* [Uribe-Carvajal y cols., 2011].

Tabla 1. Detección de un probable PTP en mitocondrias de diversas especies de plantas.

Reino	Especie	Nombre común	Inhibidor	Referencia
<i>Plantae</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Arabidopsis</i>	Ciclosporina A	Scott y Logan (2008) y Tiwari y cols., (2002)
	<i>Nicotiana tabacum</i>	Tabaco	Ciclosporina A	Lin y cols., (2006)
	<i>Solanum tuberosum</i>	Papa	Mg ²⁺	Fortes y cols., (2001)
	<i>Triticum aestivum</i>	Trigo	Ca ²⁺	Virolainen y cols., (2002)

Tabla tomada de Uribe-Carvajal y cols., 2011

Se ha informado la presencia de un PTP en plantas de diversas especies. Tanto el Ca²⁺ y el fosfato parecen ser los únicos requisitos para inducir un aumento en la permeabilidad mitocondrial producida por la apertura del PTP en plantas, ya que CsA actúa en el PTP de *Arabidopsis thaliana* como un inhibidor, evitando anomalías en la morfología mitocondrial que pudieran resultar de la apertura del MUC [Scott y Logan, 2008, Tiwari y cols., 2002].

El papel fisiológico del MPT, está relacionado con procesos de desarrollo y tensiones ambientales leves, que en algunos casos lleva a la muerte celular programada (PCD), como, por ejemplo, en los protoplastos de *Arabidopsis thaliana*, al ser sometidos a un estrés abiótico (calor), se induce hinchazón mitocondrial y pérdida de $\Delta\psi$, sin embargo, se ha visto que existe un factor para contrarrestar este daño [Zancani y cols., 2015].

El PTP, se estudió primeramente en animales y a continuación se realizaron experimentos para identificar si existían similitudes en su estructura. Se llevo a cabo un estudio con mitocondrias aisladas de *Solanum tuberosum* (papa), se encontró que tienen una capacidad mayor de Ca^{2+} en comparación con la de animales, debido a que, presentan una alta eficiencia en el bombeo de este ion que funciona como blindaje [Arpagaus y cols., 2002]. Todo esto relacionado con las primeras investigaciones acerca del PTP, en las que se indica que el PTP es un canal el cual es de liberación de calcio y es inducido por el mismo [Hunter y Haworth, 1979].

De igual forma, se ha detectado un PTP en mitocondrias aisladas de *Pisum sativum* (chícharo o guisante), el cual presenta diferencias entre otros tipos de plantas como son la avena, el trigo, los cuales pueden ser inhibidos por uno u otro compuesto. No obstante, presenta una característica en común con insectos, levadura y mamíferos y otras plantas, la cual es la salida del citocromo *c*, lo que conlleva a PCD [De Col y cols., 2018].

Se ha observado que en las mitocondrias aisladas de *Pisum sativum*, su MPT, fue inducido por Ca^{2+} e inducida por diamida y que puede haber una desensibilización por sustratos de CsA, la cual interacciona con CypD mitocondrial. Cabe mencionar que la inducción del Ca^{2+} se dio solamente en presencia del ionóforo de Ca^{2+} ETH129 [De Col y cols., 2018].

El propósito del presente trabajo de tesis es demostrar si *A. thaliana* presenta un PTP similar al detectado en mamíferos utilizando enfoques genéticos, farmacológicos y bioenergéticos. Lo anterior es de especial relevancia ya que la inhibición de un probable

PTP en plantas podría conllevar al desarrollo de estrategias para minimizar la pérdida de plantas en cultivos en un contexto de diversos tipos de estrés como aquellos asociados a plagas o al cambio climático. Por ello se sometieron las dos cepas de estudio (Col-0 y AtCyp21) a diversos experimentos tanto en semillas, plántulas y protoplastos para observar sus comportamientos.

2. Hipótesis

Si las mitocondrias de *Arabidopsis thaliana* presentan un PTP asociado a muerte celular, su inhibición le conferirá a la planta resistencia a estrés abiótico.

3. Objetivo general

Determinar la participación de la proteína AtCyp21 como componente del PTP mitocondrial en respuesta a estrés abiótico en *Arabidopsis thaliana*.

3.1 Objetivos particulares

- Establecer la participación del PTP en el crecimiento de plantas y morfología mitocondriales en hojas y raíces de los ecotipos silvestre y mutante de *A. thaliana*.
- Determinar la participación del PTP en parámetros asociados a la muerte celular en protoplastos de *A. thaliana*.

4. Metodología y Procedimiento Experimental

4.1 Material vegetal

Los ecotipos de *A. thaliana* utilizados para los estudios presentados son Col-0 y AtCyp21, la primera respectivamente fue proporcionada de manera gentil por la Dra. Sobeida Sánchez Nieto y la segunda, fue obtenida del Arabidopsis Biological Resource Center de la Ohio State University. El número código de germoplasma es SALK_142397. Las semillas de ambos genotipos se germinaron en macetas con sustrato compuesto (Sunshine Mix #3) adicionado con vermiculita y agrolita en la proporción 3:1:1 [Pedroza-García y cols., 2015], como en placas con 2% de agar, 2% de sacarosa y medio MS durante 1-2 semanas. Se recolectaron las hojas de *Arabidopsis thaliana* de 2 a 4 semanas de desarrollo, preferentemente se deben cortar aquellas en los estadios 5-7 (Fig. 3) a las que se les conoce como hojas verdaderas.



Figura 3. Numeración de hojas en una planta adulta de *A. thaliana*.

Imagen tomada de Merchant y Pajerowska-Mukhtar, 2015

4.2 Soluciones de aislamiento, de medición y reactivos

En el presente proyecto de tesis se utilizaron las siguientes soluciones.

4.2.1 Solución enzimática (15 a 20 ml para cada 20-30 hojas) *

Se prepara antes de cada aislamiento en un tubo Falcon de 50 ml

- Celulasa C0615-1G-SIGMA al 1.5% (0.15 g/10 ml)
- Macerozima P2401-1KU-SIGMA al 0.4% (0.04 g/10 ml)
- Manitol 0.4 M (stock 0.8 M), precalentar a 55°C
- KCl 20 mM (stock 2 M)
- MES 20 mM, pH 5.7 (stock 0.2 M), precalentar a 55°C.
- CaCl₂ 10 mM (Stock 1 M)

*Al estar lista la solución enzimática, se procede a pasarla a través de un filtro de jeringa de poro de 0.45µm, esto con el fin de evitar el paso de partículas extrañas.

4.2.2 Solución W5

- NaCl 154 mM (stock 4M)
- CaCl₂ 125 mM (stock 1 M)
- KCl 5 mM (stock 2 M)
- MES 2 mM, pH 5.7 (stock 0.2 M)

4.2.3 Amortiguador de lavado de Protoplastos.

- EDTA 0.1 mM (stock 100 mM)
- Manitol 0.4 M (stock 0.8 M)
- Pi 1 mM (stock 1M)
- MES 10 mM, pH 5.7 (stock 0.2 M),

4.2.4 Amortiguador CRC

- Amortiguador de lavado de protoplastos
- Digitonina (20 mg/ml)
- ADP (200 μ M)
- Succinato (10mM)

4.2.5 Inhibidores de respiración mitocondrial

- Propil galato (PG) (400 μ M)
- CN (96 μ M)

4.2.6 Buffer de extracción de DNA

- Tris-HCl, pH 7.5 (200 μ M)
- NaCl (250mM)
- EDTA pH 8.0 (25mM)
- SDS (0.5%)

Además de la solución enzimática, para el aislamiento mecánico de protoplastos se ocuparon los siguientes materiales:

- Hojas verdaderas de *A. thaliana* ecotipo col-0 (2-4 semanas de crecimiento).
- Filtro de jeringa estéril de 28 mm de diámetro y poro de 0.45 μ m marca Corning Incorporated.
- Caja Petri de vidrio.

- Pinzas de disección.
- Tijeras.
- Cuchilla para afeitar marca Dorco.

4.3 Metodologías

Para el presente proyecto de tesis se ocuparon las siguientes metodologías.

4.3.1 Genotipificación de la cepa silvestre y AtCyp21

Para determinar el genotipo de las cepas silvestre y mutante AtCyp21, se aisló DNA total de hojas crecidas en Medio MS más sacarosa, mediante el procedimiento descrito a continuación.

Se cortaron hojas pequeñas (2-3 hojas por cada planta). Estas se colocaron en un tubo Eppendorf de 1.5 ml, se congelaron con N₂ líquido y se trituraron con un pistilo de plástico hasta que se obtuvo un polvo muy fino. En segundo lugar, se agregaron 400 µl de buffer de extracción de DNA al tubo Eppendorf y se homogenizó con ayuda del pistilo y se pasó por el vórtex por 5 s. Enseguida, se centrifugo por 5 min a 13,000 rpm. A continuación, se transfirió el sobrenadante a un Eppendorf limpio y se volvió a centrifugar, esto con el fin de eliminar los residuos restantes de la centrifugación previa. Luego, se transfirieron 300 µl del sobrenadante a un tubo nuevo, al cual se le agregaron 300 µl de isopropanol, agitando en el vórtex y se mantuvo a -20°C por aproximadamente 12 h. Pasadas estas horas, se centrifugó por 5 min a 13,000 rpm y se eliminó el sobrenadante. Después, se obtuvo un pellet el cual se lavó con 1 ml de etanol al 70% y se centrifugo por 5 min. Por consiguiente, se

eliminó el etanol residual y se secó el pellet obtenido a 29°C por 5 min. Por último, se resuspendió el pellet en 100 µl de H₂O estéril desionizada.

Posteriormente, se incubaron alícuotas del DNA aislado de cada cepa en una reacción de PCR con tres oligonucleótidos específicos que se observan en la tabla 2, para amplificar un fragmento teórico de 1,185pb correspondiente al gen AtCyp21 en una cepa silvestre y otro correspondiente al TDNA interrumpiendo la secuencia del gen At2g47320 y generando un amplicón teórico de 845pb.

Tabla 2. Lista de oligonucleótidos para el proceso de genotipificación de las cepas Col-0 y AtCyp21 por PCR.

Nombre del Oligonucleótido	Tm	Secuencia 5´-3´
LBb1.3 (TDNA pROK2)	63.6	ATTTTGCCGATTTTCGGAAC
AtCyp21 LP FW3	59.9	AGACCAAAGAGGTTAGTCTTTGCTT
AtCyp21 RP Rev3	59	ATTACCTCAAGAACTGATCTACCATTG

Los productos de la PCR fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 0.5% usando el amortiguador TBE. Se puede observar que en la reacción con DNA de la planta Col-0 hay un amplicón mayor a 1000pb lo cual correlaciona con el amplicón teórico. Por otra parte, la reacción con el DNA de la planta SALK_142397c obtenida del TAIR a través del SALK Confirmed T-DNA Project del Dr. Joseph Ecker generó un amplicón de ~800pb, el cual fue similar al obtenido con el DNA de la planta M5. Interesantemente, el DNA de

la planta M2 no produjo un amplicón robusto por lo cual no se consideró para ser analizada en el presente estudio (Fig. 4).

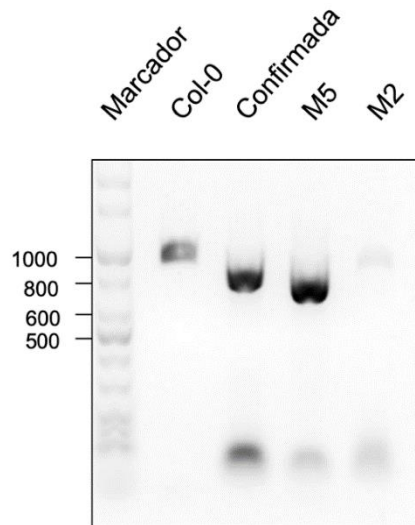


Figura 4. Genotipificación de las plantas ecotipo Col-0 y mutantes isogénicas AtCyp21.

La mutante confirmada fue obtenida de Joseph Ecker a través de TAIR y el SALK Confirmed T-DNA Project con número de germoplasma SALK_142397c.

Es importante mencionar que en el laboratorio se está aislando RNA para verificar de la ausencia del transcrito del gen At2g47320. De igual forma, será necesario obtener anticuerpos inmunoreactivos con la proteína AtCyp21 para poder confirmar la ausencia de la proteína.

4.3.2 Germinación de semillas en medio MS adicionado con decilubiquinona (dUb)

Para poder germinar semillas de las diferentes cepas de *A. thaliana*, se preparó Medio MS (Sigma Aldrich), el cual se esterilizó en autoclave vertical (121°C/20 min), después, se le adicionó dUb (50µM) y sacarosa al 2% mediante filtración (0.45 µm) y vertido en caja Petri de vidrio.

En paralelo, se realizó el esterilizado de semillas con una mezcla de clorox (50%) y tween 20 (0.02%), en el cual, se trataron semillas de cepa silvestre (Col-0) y mutante (AtCyp21) por separado durante 20 minutos.

Posteriormente, se realizaron dos lavados con agua estéril. Se dispersaron las semillas de forma homogénea con un capilar para su germinación en cajas Petri de vidrio con Medio MS.

Una vez germinadas las semillas, se colocaron dentro de una cámara de incubación a 22°C en condiciones normales de fotoperíodo.

Se monitorearon diariamente para registrar su tiempo de germinación y después de 2 semanas de crecimiento se realizó la medición de raíces (cm) de las cepas silvestre (Col-0) y mutante (AtCyp21). Pasado este tiempo, se procedió a su traspaso a maceta con mezcla de sustrato (sunshine, vermiculita y agrolita) y se realizaron las observaciones para ver tiempos de crecimiento de las hojas, del tallo, la aparición de flores y vainas de semillas.

4.3.3 Aislamiento de Protoplastos de Mesófilo

Este aislamiento es extensamente empleado por investigadores de esta área y a pesar de requerir condiciones de vacío y un mayor tiempo de incubación, se ha encontrado que los protoplastos obtenidos por este método son susceptibles de ser transformados con plásmidos y sometidos a manipulaciones sin afectar la viabilidad de estos [Yoo y cols., 2007].

Se preparó la solución enzimática en el siguiente orden. Primero, se adicionó Manitol, KCl, MES, celulasa y maceroenzima en un tubo Falcón, el cual es calentado a baño de agua a 55°C/10 min, con la finalidad de desactivar

proteasas, nucleasas e incrementar la solubilidad de las enzimas adicionadas. Transcurrido este tiempo, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se adiciono el último reactivo (CaCl_2). Ya preparada la solución enzimática se realizó un filtrado ($0.45 \mu\text{m}$) y se vertió en una caja Petri de vidrio. Con la solución enzimática en la caja Petri, se procedió, al corte de tiras de hojas (0.5-1 mm) de la cepa silvestre (Col-0) con la ayuda de una navaja de afeitar con precaución de no aplastar el tejido en el punto de corte. Las hojas seccionadas se depositaron en la solución enzimática sin aplastar. Terminado el corte se llevó a cabo una infiltración al vacío en oscuridad de la caja Petri durante 30 minutos con un desecador. Para continuar con la digestión, se sometió a una agitación suave (40 rpm, 25°C , oscuridad), por 90 minutos más. A continuación, se observó que la solución se torna verde (indicativo de la liberación de protoplastos), la cual se vertió en un tubo Falcón mediante filtración rápida con un trozo de Millipore previamente humedecida con agua desionizada y solución W5. Después, se realizó el filtrado y una dilución con W5 en proporción 1:1 que el volumen obtenido. Por último, se realizó una centrifugación (1,130rpm/2 min/ 4°C) y se eliminó la mayoría del sobrenadante dejando aproximadamente de 2 a 3 ml para resuspender el botón.

Para determinar la calidad y cantidad de células obtenidas mediante esta metodología se utilizó un hematocitómetro.

4.3.4 Medición del consumo de oxígeno por respirometría de alta resolución.

Para poder medir el consumo de oxígeno de los protoplastos, se calibro el Sistema Hansatech Oxygraph Plus fase líquida de acuerdo con especificaciones del fabricante. Brevemente, se adicionó ditionita sódica en solución dentro de la cámara de reacción y se calibra el punto como 0% de oxígeno. Después se lavó la cámara con agua milliQ cinco veces y se adiciono 1 ml de agua milliQ. A los pocos minutos se calibro la lectura de voltaje como 100% de oxígeno.

A continuación, se agregó Amortiguador CRC a la cámara del oxímetro. Después, se agregaron 2×10^5 protoplastos, los cuales se dejaron sedimentar y resuspendieron en 250 μ l de Amortiguador CRC. Ya teniendo todo esto, se procedió a cerrar la cámara del oxímetro, observando que no se formará ninguna burbuja en el interior. Se realizó la medición del consumo del oxígeno ($\text{nmol O}_2/\text{min } 10^6$ células). Transcurrido ese período, se realizó la inyección de la siguiente mezcla (2 μ l de propil galato y CN) y se tomó la medición por otros 2 minutos. Esto con el fin de observar la inhibición de la respiración mitocondrial [Ortiz-Jiménez, 2019].

4.3.5 Tinción por Mitotracker

La tinción de mitocondrias dentro de una célula se llevó a cabo mediante la incubación de éstas en un medio indicador Mitotracker Green, el cual, es acumulado por las mitocondrias en función de su potencial de membrana. Si las mitocondrias carecen de un potencial, entonces no será posible que el colorante se acumule en estos organelos.

A 500,000 células tanto del grupo control como de los experimentales de la cepa silvestre se le adicionaron los siguientes reactivos: Mitotracker Green (2 μ l de un stock 1mM) y amortiguador de lavado de protoplastos en un volumen final de 1ml. Los protoplastos se dejaron en reposo durante 20 minutos a oscuridad. Posteriormente, se realizaron dos lavados con amortiguador de lavado de protoplastos con centrifugación (3000rpm/20s) y se retiró el sobrenadante.

Por último, se resuspendieron en 20 μ l, los cuales se colocaron en un portaobjetos, se cubrieron con un cubreobjetos y se observaron con un microscopio de fluorescencia.

4.3.6 Análisis Estadístico

Se llevaron a cabo pruebas t de Student pareadas para el análisis de diferencias estadísticas entre grupos de interés.

5. Resultados

Para determinar el papel del PTP y de la ciclofilina AtCyp21 en el proceso de germinación, se llevaron a cabo experimentos de germinación de semillas de la cepa silvestre (Col-0) y mutante (AtCyp21) en Medio MS suplementado con decilubiquinona (dUb), el cual es un potente inhibidor del PTP [Uribe-Carvajal y cols., 2011]. Posterior a 2 semanas de germinación, se observó que las raíces de las plántulas germinadas en presencia de decilubiquinona tenían un menor tamaño en comparación con las cajas control (Fig. 5).

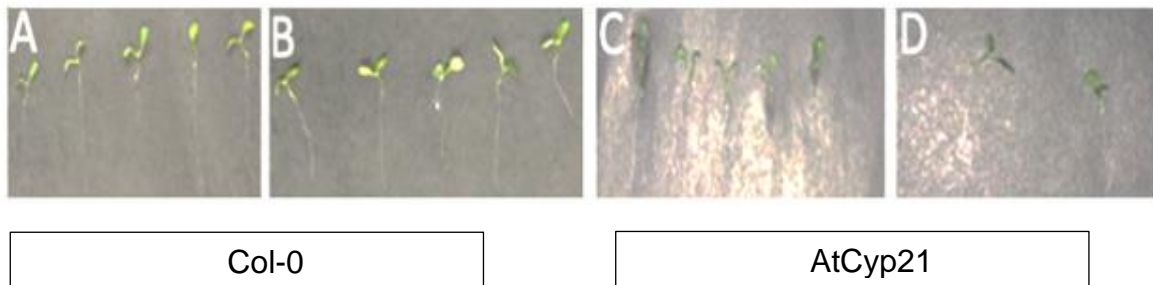


Figura 5. Raíces de *Arabidopsis thaliana* germinadas en medio MS s/dUb (A) y (C) y c/dUb (B) y (D) Imágenes representativas. n=5 (A, B, C) y n=2 (D).

Con la finalidad de estimar cuantitativamente los efectos de la decilubiquinona en ambos genotipos de plantas, se midieron las raíces y se precisó que existen diferencias significativas entre los grupos con y sin dUb (figura 6). Además, las plantas carentes de AtCyp21 presentaron mayor tamaño sin dUb, pero al adicionar la decilubiquinona hubo una disminución en la longitud de las raíces.

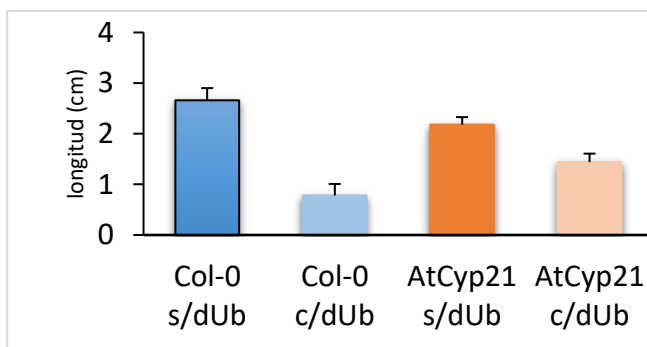


Figura 6. Medición de raíces de *Arabidopsis thaliana* germinadas en Medio MS sin y con dUb de los dos ecotipos empleados (Col-0 y AtCyp21) n=5. * p <0.05 versus Col-0 s/dUb. ** p <0.05 versus AtCyp21 s/dUb.

Posterior a estas mediciones, las plántulas fueron transferidas a macetas con mezcla de sustrato (sunshine, vermiculita y agrolita) y se monitoreó su crecimiento. En general, se observó que la presencia de dUb en la cepa carente de ciclofilina (AtCyp21) originó plantas con hojas en mayor abundancia y de mayor tamaño, mientras que la morfología de estas permaneció inalterada, como se puede apreciar (Fig. 7).

Figura 7. Crecimiento de plantas de *Arabidopsis thaliana* Col-0 (A y B) y AtCyp21 (C y D) en macetas con germinación previa en Medio MS s/dUb (A, C) y c/dUb (B, D). Imágenes representativas n=3



Posteriormente, se evaluaron los efectos del estrés térmico y el papel de la dUb a nivel celular. Se aislaron protoplastos de la cepa silvestre y se sometieron a las siguientes condiciones: control (22°C), experimental 1 (37°C/1 h) sin dUb y experimental 2 (37°C/1 h) con dUb. Esto con el fin, de evaluar si los efectos de la decilubiquinona son apreciables a nivel subcelular

en términos de la respiración mitocondrial y de la distribución y morfología mitocondrial en un contexto de estrés abiótico. Una vez que se sometieron a los tres tratamientos, los protoplastos fueron sometidos a dos lavados con buffer de protoplastos y se dejaron sedimentar. A continuación, los protoplastos se colocaron en un oxímetro Hansatech Oxygraph Plus y se registraron los valores de respiración máxima (Estado 3) seguido de la adición de un cóctel de inhibidores (propil galato y cianuro) para suprimir la respiración mitocondrial. Los resultados mostraron una ligera disminución en la respiración mitocondrial en los protoplastos sometidos a estrés térmico (Fig. 8). Sin embargo, la presencia de dUb no incremento la respiración en forma significativa. La adición del cóctel de inhibidores suprimió en forma significativa la respiración registrada en todos los tratamientos.

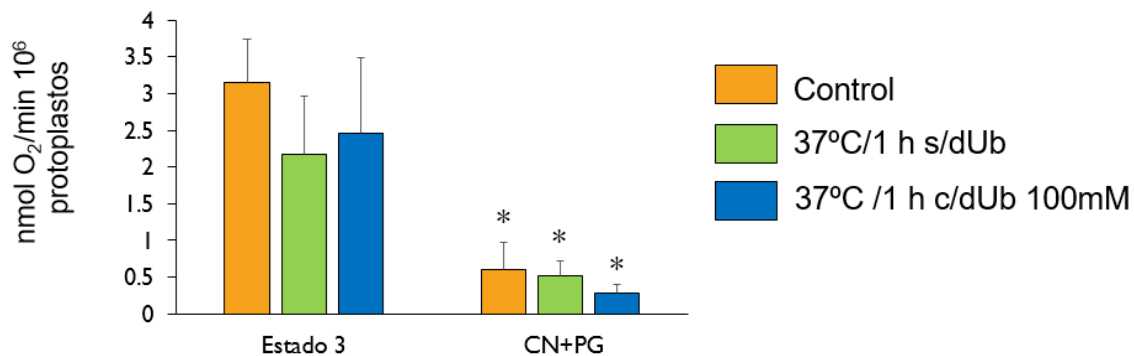


Figura 8. Evaluación de consumo de oxígeno del ecotipo Col-0 en condiciones basales (estado 3) e inhibición de la respiración con mezcla de propil galato y cianuro (CN + PG), 3 mediciones. * $p < 0.05$, $n = 3$.

Con la finalidad de evaluar el efecto de las mitocondrias, se llevó a cabo una tinción con Mitotracker Green en los 3 grupos de estudio para evaluar de una manera visual el daño causado a las mitocondrias por el estrés térmico

(Fig. 9). En los protoplastos control, se aprecian estructuras de señal verde adyacentes a los cloroplastos marcados en rojo. Sin embargo, en el grupo experimental 1 sometido a 37°C/1h sin decilubiquinona, la señal asociada a la presencia de mitocondrias no era detectada, por lo que se asume que ya no eran funcionales y por lo tanto no absorbieron el Mitotracker. Por otra parte, los cloroplastos se apreciaron con alteraciones morfológicas propias de una disfunción. Finalmente, en el grupo experimental 2 sometidos a 37°C/1h en presencia de decilubiquinona si se pudieron apreciar estructuras punteadas adyacentes a los cloroplastos con características similares a las mitocondrias.

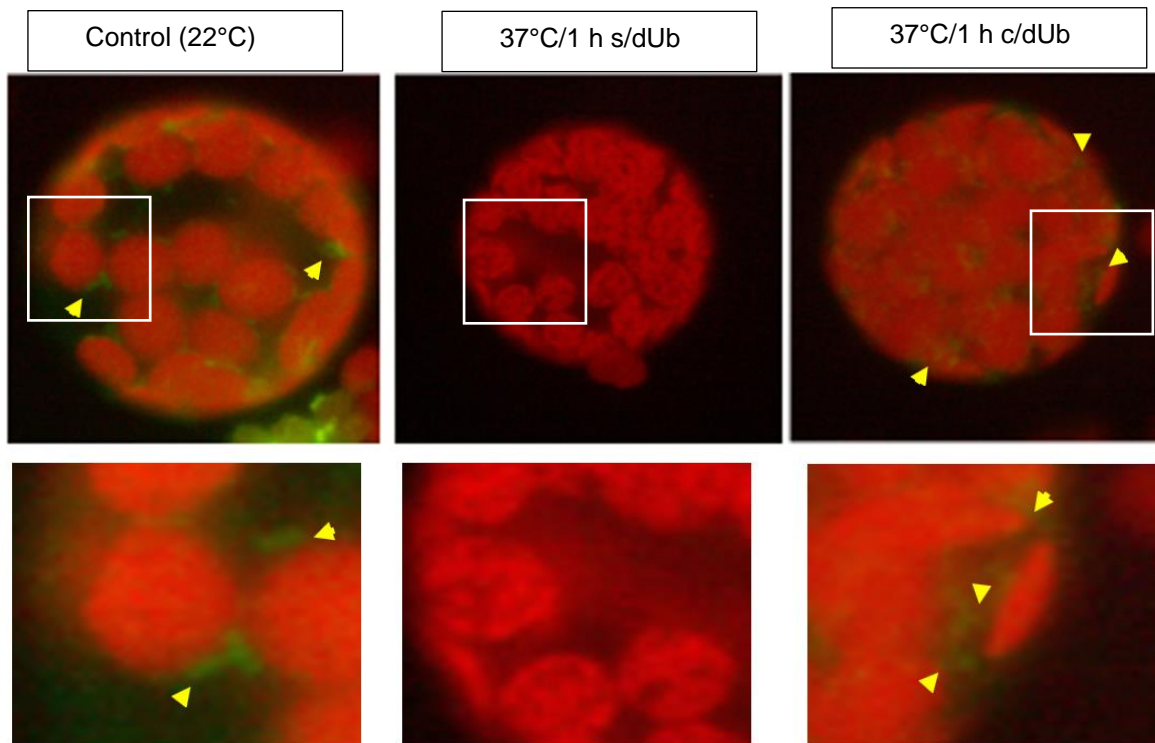


Figura 9. Tinción con Mitotracker de protoplastos sometidos a estrés térmico en ausencia o presencia de dUb. Color rojo: cloroplastos. Color verde: mitocondrias. Imagen representativa n=5. Los recuadros en blanco denotan las zonas amplificadas bajo cada condición.

En resumen, los experimentos en el presente trabajo de tesis demuestran en su conjunto que la dUb presenta efectos diversos en el desarrollo de *A. thaliana* y en mecanismos de resistencia a estrés.

6. Discusión

Hasta el momento, la estructura del PTP es un tema de constantes debates debido a que diversas células mutantes carentes de los componentes candidatos a formarlo siguen presentando actividades similares al PTP [Baines y Gutiérrez-Aguilar, 2018]. Sin embargo, la CypD es universalmente aceptada como un potente regulador de este poro [Gutiérrez-Aguilar y Baines, 2015]. En forma adicional, existen otros reguladores del PTP no dependientes de CypD como la decilubiquinona. Esta molécula se ha propuesto que inhibe el PTP a nivel del complejo mitocondrial I [Fontaine y Bernardi, 1999].

Por lo anterior, en el presente trabajo de tesis se evaluó el efecto de la decilubiquinona sobre nuestras cepas de estudio (Col-0 y AtCyp21) en diversas condiciones. En primer lugar, se evaluó el papel de AtCyp21 en la regulación de la germinación. Esto porque la germinación es una etapa crítica en el ciclo vital de una planta. Observaciones preliminares en el laboratorio sugieren que las semillas germinadas en medio MS adicionado con dUb presentan una germinación acelerada en comparación con el grupo control, lo que nos indica que la adición de este compuesto probablemente brinda a la semilla condiciones mitocondriales de polarización favorables en cuestión de utilización de nutrientes para la síntesis de esqueletos de carbono [Pérez, 2003]. En tales condiciones sean probablemente las idóneas para dar lugar a una nueva plántula. Específicamente, es posible que al inhibir la apertura del PTP por dos vías (ausencia de AtCyp21 y presencia de dUb), las mitocondrias de las raíces de las plantas tratadas presentan un mayor acoplamiento y un potencial de membrana ($\Delta\psi$) [Gutiérrez-Aguilar y cols., 2014], contribuyendo así al crecimiento acelerado.

En segundo lugar, se pudo notar que las plántulas crecidas en medio MS con dUb presentaron un menor crecimiento, lo cual podría ser interpretado como un probable efecto de la dUb sobre la función del PTP en el desarrollo de las raíces. De hecho, se sabe que la apertura transitoria del PTP en mamíferos tiene importantes funciones fisiológicas como la detoxificación de especies reactivas de oxígeno y el recambio de esqueletos de carbono no asociado a la síntesis de ATP [Mnatsakanyan y cols., 2017]. Considerando los efectos del PTP sobre el metabolismo mitocondrial, es probable que la dUb pueda inhibir al PTP y con ello regular -en forma análoga- procesos de desarrollo de raíces y hojas en *A. thaliana*. En el presente estudio se decidió continuar con el monitoreo de los efectos a largo plazo de la inhibición del PTP con dUb. Por lo anterior, se llevó a cabo el transplante de las plántulas a mezcla de sustrato (sunshine, vermiculita y agrolita). Las plantas procedentes de la germinación en Medio MS con dUb, presentaron un mayor desarrollo en sus hojas, por lo que se sospecha que el efecto de este compuesto altamente hidrofóbico sigue siendo benéfico para la planta a largo plazo. Adicionalmente, en presencia de dUb y ausencia de AtCyp21 se observaron probables efectos aditivos producto de la inhibición del PTP por dos vías lo cual redundó en plantas con aún más hojas y de mayor tamaño.

Por otro lado, para realizar el estudio del efecto de la decilubiquinona a nivel celular, se realizó el aislamiento de protoplastos de nuestra cepa estándar (Col-0) mediante un método estandarizado en el laboratorio tomando en cuenta estudios previos [Yoo y cols., 2007; Wu y cols., 2009]. Los protoplastos aislados se sometieron a estrés térmico -el cual es un conocido estrés abiótico- para identificar si la presencia de dUb brinda una resistencia contra la muerte celular y si existen cambios en la función mitocondrial medida

por respirometría. Los resultados obtenidos en las tres condiciones de estudio sugieren que no existen diferencias significativas en el consumo de oxígeno. Por lo anterior, podría ser que la dUb no confiere beneficios a las células a nivel de la respiración mitocondrial bajo las condiciones estudiadas. Al respecto, Walter y colaboradores comprobaron que la dUb no tiene efectos sobre la respiración en estado desacoplado (respiración máxima) pero sí sobre el PTP [Walter y cols., 2000]. Para validar estos datos, se decidió estudiar la morfología y distribución mitocondrial mediante una tinción con Mitotracker green, con el fin de verificar si las mitocondrias presentaban un $\Delta\Psi$ inicial para permitir la tinción y si estos organelos se mantenían funcionales o si se habían depolarizado.

Al realizar la tinción con Mitotracker Green se observó que las mitocondrias del grupo control y experimental con dUb se tiñeron con una señal color verde fluorescente en estructuras adyacentes a los cloroplastos, lo que sugiere que las mitocondrias no se encontraban inicialmente depolarizadas, y por ende se mantienen funcionales. Por el contrario, en el grupo experimental sin dUb no se observaron estructuras con señal verde asociadas a las mitocondrias. Es probable que estas se encontraban depolarizadas ya que el mitotracker requiere que los organelos estén polarizados para acumularse en la matriz mitocondrial. Además, los cloroplastos se observaron con gránulos. Esto sugiere que los estromas se encontraban alterados (discontinuos) y era posible incluso apreciar a los tilacoides. Lo anterior podría estar en línea con los estudios de Scott y Logan en el 2008 documentando una transición en la morfología mitocondrial en condiciones de choque térmico. Este proceso es considerado un estímulo inductor de la muerte celular [Scott y Logan, 2008]. Dicho lo anterior, el presente trabajo de tesis indica que la dUb y la delección de AtCyp21 les confiere a las mitocondrias de *A. thaliana* resistencia ante

estímulos de estrés abiótico (temperatura), inhibiendo o retardando la muerte celular al incidir sobre el PTP por diversas vías. Los resultados presentados en este trabajo podrían llevar a desarrollar estrategias para mitigar los efectos nocivos del estrés térmico en plantas en un contexto de constantes cambios climáticos.

7. Conclusiones

- La dUb modifica el desarrollo de las semillas de *A. thaliana* favoreciendo su crecimiento.
- La dUb y la delección de AtCyp21 favorecen el desarrollo de las hojas de *A. thaliana*.
- La dUb no afecta a la respiración mitocondrial en las condiciones estudiadas.
- La inhibición del PTP con dUb inhibe parcialmente los efectos del estrés térmico al mantener la morfología de las mitocondrias y cloroplastos.

8. Perspectivas

- Aislar mitocondrias de la cepa Col-0 y AtCyp21 para determinar los efectos de la radiación UV y estrés térmico sobre el $\Delta\Psi$.
- Determinar la ausencia del transcrito de AtCyp21 mediante rtPCR y posterior qPCR.
- Validar la ausencia de la proteína AtCyp21 mediante un procedimiento de Western Blot.

9. Bibliografía

- Alonso, J. M., & Ecker, J. R. (2006). Moving forward in reverse: genetic technologies to enable genome-wide phenomic screens in Arabidopsis. *Nature Reviews Genetics*, 7(7), 524-536.
- Arabidopsis Genome Initiative. (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *nature*, 408(6814), 796.
- Arpagaus, S., Rawyler, A., & Braendle, R. (2002). Occurrence and characteristics of the mitochondrial permeability transition in plants. *Journal of Biological Chemistry*, 277(3), 1780-1787.
- Baines, C. P., & Gutiérrez-Aguilar, M. (2018). The still uncertain identity of the channel-forming unit (s) of the mitochondrial permeability transition pore. *Cell Calcium*, 73, 121-130.
- Baines, C. P., Kaiser, R. A., Purcell, N. H., Blair, N. S., Osinska, H., Hambleton, M. A., ... & Robbins, J. (2005). Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. *Nature*, 434(7033), 658-662.
- Basso, E., Fante, L., Fowlkes, J., Petronilli, V., Forte, M. A., & Bernardi, P. (2005). Properties of the permeability transition pore in mitochondria devoid of Cyclophilin D. *Journal of Biological Chemistry*, 280(19), 18558-18561.
- Camarena-Gutiérrez, G. (2006). Muerte celular programada como respuesta al estrés ambiental. *Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 12(2), 93-99.

- De Col, V., Petruzza, E., Casolo, V., Braidot, E., Lippe, G., Filippi, A., ... & Checchetto, V. (2018). Properties of the permeability transition of pea stem mitochondria. *Frontiers in physiology*, 9, 1626.
- Douce, R. (1985). *Mitochondria in Higher Plants: Structure, Function, and Biogenesis*. Nueva York: Academic Press.
- Fontaine, E., & Bernardi, P. (1999). Progress on the mitochondrial permeability transition pore: regulation by complex I and ubiquinone analogs. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 31(4), 335-345.
- Fortes, F., Castilho, R. F., Catisti, R., Carnieri, E. G., & Vercesi, A. E. (2001). Ca²⁺ induces a cyclosporin A-insensitive permeability transition pore in isolated potato tuber mitochondria mediated by reactive oxygen species. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 33(1), 43-51.
- Giorgio, V., Von Stockum, S., Antoniel, M., Fabbro, A., Fogolari, F., Forte, M., ... & Lippe, G. (2013). Dimers of mitochondrial ATP synthase form the permeability transition pore. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(15), 5887-5892.
- Gutiérrez-Aguilar, M., & Baines, C. P. (2013). Physiological and pathological roles of mitochondrial SLC25 carriers. *Biochemical Journal*, 454(3), 371-386.
- Gutiérrez-Aguilar, M., & Baines, C. P. (2015). Structural mechanisms of cyclophilin D-dependent control of the mitochondrial permeability transition pore. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1850(10), 2041-2047.
- Gutiérrez-Aguilar, M., Douglas, D. L., Gibson, A. K., Domeier, T. L., Molkentin, J. D., & Baines, C. P. (2014). Genetic manipulation of the cardiac mitochondrial

phosphate carrier does not affect permeability transition. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 72, 316-325.

- Gutiérrez-Aguilar, M., López-Carbajal, H. M., Uribe-Álvarez, C., Espinoza-Simón, E., Rosas-Lemus, M., Chiquete-Félix, N., & Uribe-Carvajal, S. (2014). Effects of ubiquinone derivatives on the mitochondrial unselective channel of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 46(6), 519-527.
- Hunter, D. R., & Haworth, R. A. (1979). The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondria: I. The protective mechanisms. *Archives of biochemistry and biophysics*, 195(2), 453-459.
- Jonas, E. A., Porter Jr, G. A., Beutner, G., Mnatsakanyan, N., & Alavian, K. N. (2015). Cell death disguised: the mitochondrial permeability transition pore as the c-subunit of the F1FO ATP synthase. *Pharmacological research*, 99, 382-392.
- Koncz, C., Németh, K., Rédei, G. P., & Schell, J. (1992). T-DNA insertional mutagenesis in *Arabidopsis*. *Plant molecular biology*, 20(5), 963-976.
- Levitt, J. (1980). *Responses of Plants to Environmental Stress, Volume 1: Chilling, Freezing, and High Temperature Stresses*. Academic Press.
- Lin, J., Wang, Y., & Wang, G. (2006). Salt stress-induced programmed cell death in tobacco protoplasts is mediated by reactive oxygen species and mitochondrial permeability transition pore status. *Journal of plant physiology*, 163(7), 731-739.
- Meinke, D. W., Cherry, J. M., Dean, C., Rounsley, S. D., & Koornneef, M. (1998). *Arabidopsis thaliana*: a model plant for genome analysis. *Science*, 282(5389), 662-682.

- Merchant, A. M., Pajerowska-Mukhtar, K. M. (2015). Arabidopsis thaliana dynamic phenotypic Plasticity in Response to Environmental Conditions. *International Journal of Modern Botany*, 5(2), 23-28.
- Mnatsakanyan, N., Beutner, G., Porter, G. A., Alavian, K. N., & Jonas, E. A. (2017). Physiological roles of the mitochondrial permeability transition pore. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 49(1), 13-25.
- Nakagawa, T., Shimizu, S., Watanabe, T., Yamaguchi, O., Otsu, K., Yamagata, H., ... & Tsujimoto, Y. (2005). Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death. *Nature*, 434(7033), 652-658.
- Nicolli, A., Petronilli, V., & Bernardi, P. (1993). Modulation of the mitochondrial cyclosporin A-sensitive permeability transition pore by matrix pH. Evidence that the pore open-closed probability is regulated by reversible histidine protonation. *Biochemistry*, 32(16), 4461-4465.
- Ortiz-Jiménez, D. (2019). Desarrollo de un método para la evaluación de la respiración mitocondrial en tubos polínicos [Tesis de licenciatura] Universidad Nacional Autónoma de México, CDMX.
- Pedroza-García, J. A., Nájera-Martínez, M., de la Paz Sánchez, M., & Plasencia, J. (2015). Arabidopsis thaliana thymidine kinase 1a is ubiquitously expressed during development and contributes to confer tolerance to genotoxic stress. *Plant molecular biology*, 87(3), 303-315.
- Pérez, F. (2003). Material Vegetal de Reproducción: Manejo, Conservación y Tratamiento. Junta de Andalucía. 177-200.

- Ratajczak, E., Małecka, A., Ciereszko, I., & Staszak, A. M. (2019). Mitochondria are important determinants of the aging of seeds. *International journal of molecular sciences*, 20(7), 1568.
- Romano, P. G., Horton, P., & Gray, J. E. (2004). The Arabidopsis cyclophilin gene family. *Plant Physiology*, 134(4), 1268-1282.
- Sang, Y., Locy, R. D., Goertzen, L. R., Rashotte, A. M., Si, Y., Kang, K., & Singh, N. K. (2011). Expression, in vivo localization, and phylogenetic analysis of a pyridoxine 5'-phosphate oxidase in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 49(1), 88-95.
- Schinzel, A. C., Takeuchi, O., Huang, Z., Fisher, J. K., Zhou, Z., Rubens, J., ... & Korsmeyer, S. J. (2005). Cyclophilin D is a component of mitochondrial permeability transition and mediates neuronal cell death after focal cerebral ischemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(34), 12005-12010.
- Scorrano, L., Nicolli, A., Basso, E., & Petronilli, V. P. (1997). Two modes of activation of the permeability transition pore: the role of mitochondrial cyclophilin. *Molecular and cellular biochemistry*, 174(1-2), 181-184.
- Scott, I., & Logan, D. C. (2008). Mitochondria and cell death pathways in plants: Actions speak louder than words. *Plant signaling & behavior*, 3(7), 475-477.
- Scott, I., & Logan, D. C. (2008). Mitochondrial morphology transition is an early indicator of subsequent cell death in *Arabidopsis*. *New Phytologist*, 177(1), 90-101.
- Tiwari, B. S., Belenghi, B., & Levine, A. (2002). Oxidative stress increased respiration and generation of reactive oxygen species, resulting in ATP depletion,

opening of mitochondrial permeability transition, and programmed cell death. *Plant physiology*, 128(4), 1271-1281.

- Toleco, M. R., Naake, T., Zhang, Y., Heazlewood, J. L., & R Fernie, A. (2020). Plant Mitochondrial Carriers: Molecular Gatekeepers That Help to Regulate Plant Central Carbon Metabolism. *Plants*, 9(1), 117.
- Uribe-Carvajal, S., Luévano-Martínez, L. A., Guerrero-Castillo, S., Cabrera-Orefice, A., Corona-de-la-Peña, N. A., & Gutiérrez-Aguilar, M. (2011). Mitochondrial unselective channels throughout the eukaryotic domain. *Mitochondrion*, 11(3), 382-390.
- Virolainen, E., Blokhina, O., & Fagerstedt, K. (2002). Ca²⁺-induced high amplitude swelling and cytochrome c release from wheat (*Triticum aestivum* L.) mitochondria under anoxic stress. *Annals of Botany*, 90(4), 509-516.
- Walter, L., Nogueira, V., Leverage, X., Heitz, M. P., Bernardi, P., & Fontaine, E. (2000). Three classes of ubiquinone analogs regulate the mitochondrial permeability transition pore through a common site. *Journal of Biological Chemistry*, 275(38), 29521-29527.
- Wilson, Z. (Ed.). (2000). *Arabidopsis: a practical approach* (Vol. 223). OUP Oxford.
- Wu, F. H., Shen, S. C., Lee, L. Y., Lee, S. H., Chan, M. T., & Lin, C. S. (2009). Tape-Arabidopsis Sandwich-a simpler Arabidopsis protoplast isolation method. *Plant methods*, 5(1), 16.
- Yoo, S. D., Cho, Y. H., & Sheen, J. (2007). Arabidopsis mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis. *Nature protocols*, 2(7), 1565.

- Zancani, M., Casolo, V., Petrusa, E., Peresson, C., Patui, S., Bertolini, A., ... & Vianello, A. (2015). The permeability transition in plant mitochondria: the missing link. *Frontiers in plant science*, 6, 1120.
- Zhu, J. K. (2016). Abiotic stress signaling and responses in plants. *Cell*, 167(2), 313-324.