



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**Caracterización de la reversibilidad de la transición de la permeabilidad
mitocondrial en mamíferos**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
CAROLINA RICARDEZ GARCÍA

Dr. SALVADOR URIBE CARVAJAL
[Instituto de Fisiología Celular, UNAM.](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
Dra. Xóchitl Pérez Martínez
[Instituto de Fisiología Celular, UNAM.](#)
Dr. Manuel Gutiérrez Aguilar
[Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, UNAM.](#)

Ciudad de México. Febrero, 2022.



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.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México y al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas.

Al Dr. Salvador Uribe Carvajal, por su apoyo, paciencia y amistad.

A la técnica académico Dra. Natalia Chiquete Félix, por su colaboración en la realización de experimentos.

A los miembros de mi comité tutor, conformado por el Dra. Xóchitl Pérez Martínez y al Dr. Manuel Gutiérrez Aguilar, por sus consejos y comentarios que enriquecieron este proyecto.

A los miembros del jurado de examen: Dr. Antonio Peña Díaz (IFC, UNAM), Dra. Marina Gavilanes Ruiz (FQ, UNAM), Dr. Leonardo Peraza Reyes (IFC, UNAM), Dra. Bertha María Josefina González Pedrajo (IFC, UNAM) y Dr. José de Jesús García Trejo (FQ, UNAM), por la revisión y comentarios para mejorar este trabajo.

Se agradece el apoyo al laboratorio 306 oriente del Instituto por permitirme el uso de equipos y reactivos de su laboratorio, sobre todo a la Dra. Norma Silvia Sánchez y a Francisco Garfias por sus comentarios y pláticas enriquecedoras y motivadoras.

Agradezco a los integrantes del laboratorio 305 oriente: Lili, Paulina, Ofelia y Ulrik por todo el apoyo que me han brindado, las tardes de comida y risas y por nunca abandonarnos.

Al Instituto de Fisiología Celular y a la Unidad del bioterio.

Durante los estudios de maestría, la sustentante, Carolina Ricardez García recibió una beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con CVU 966402.

El trabajo fue apoyado parcialmente por un donativo de la DGAPA-PAPIIT IN208821.

*“membranes that form the boundary between the
organism and its environment”.*

(Mitchell, 1957).

mamá, Raúl, Wán, Papá.

Nunca creí llegar tan lejos, todo esto es gracias a ustedes.

ÍNDICE

1	ÍNDICE DE FIGURAS	7
2	LISTA DE ABREVIATURAS	8
3	RESUMEN	9
4	ABSTRACT	10
5	INTRODUCCIÓN	11
5.1	LA MITOCONDRIA	11
5.2	LA FOSFORILACIÓN OXIDATIVA Y LA TEORÍA QUIMIOSMÓTICA	12
5.3	PRODUCCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO	21
5.4	LA CONCENTRACIÓN DE O ₂ EN DIFERENTES TEJIDOS	25
5.5	MECANISMOS DE DESACOPLAMIENTO	26
5.6	EI PORO DE TRANSICIÓN DE LA PERMEABILIDAD	26
5.7	EFACTORES DE APERTURA Y CIERRE DEL mPTP	29
5.8	CONSECUENCIAS DE LA APERTURA DEL mPTP	32
5.9	REVERSIBILIDAD DE LA APERTURA DEL mPTP	32
6	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	36
7	HIPÓTESIS	36
8	OBJETIVOS	37
9	MATERIALES Y MÉTODOS	37
9.1	MATERIAL BIOLÓGICO Y REACTIVOS QUÍMICOS.	37
9.2	AISLAMIENTO DE MITOCONDRIAS	38
9.3	CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA.....	39
9.4	CONSUMO DE OXÍGENO.....	39
9.5	POTENCIAL TRANSMEMBRANAL ($\Delta\Psi$)	39
9.6	HINCHAMIENTO MITOCONDRIAL.....	40
10	RESULTADOS	40
10.1	LA ADICIÓN DE Ca ²⁺ Y EGTA MODULAN EL CONSUMO DE OXÍGENO.	41
10.2	EL CAMBIO DEL $\Delta\Psi$ EN LAS MITOCONDRIAS DEPENDE DE LA [Ca ²⁺] AÑADIDA.....	42
10.3	EL DY ES ESTABILIZADO AL SER QUELADO EL Ca ²⁺	44
10.4	UNA SEGUNDA ADICIÓN DE Ca ²⁺ PROVOCA UNA SEGUNDA DISMINUCIÓN DEL $\Delta\Psi$	45

10.4	EL TIEMPO DE APERTURA DEL mPTP AFECTA LA REVERSIBILIDAD.....	46
10.5	EL HINCHAMIENTO MITOCONDRIAL SE INDUCE CON Ca²⁺ Y SE DETIENE CON EGTA.....	48
11	DISCUSIÓN.....	49
12	CONCLUSIONES.....	55
13	PERSPECTIVAS.....	55
14	REFERENCIAS.....	56

1 ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Fosforilación Oxidativa.....	¡Error! Marcador no definido.
Figura 2 Valores de E° para los componentes de la cadena respiratoria mitocondrial.....	¡Error! Marcador no definido.
Figura 3. Transporte de solutos.....	16
Figura 4 Mecanismo de catálisis rotacional de Boyer..	¡Error! Marcador no definido.
Figura 5 Modelos propuestos de las proteínas que forman al mPTP..	¡Error! Marcador no definido.
Figura 6 Modos de apertura propuestos para el mPTP.....	¡Error! Marcador no definido.
Figura 7 El Ca ²⁺ y el EGTA modulan el consumo de oxígeno..	¡Error! Marcador no definido.
Figura 8 Efecto de diferentes concentraciones de Ca ²⁺ sobre el ΔΨ en las mitocondrias de hígado de rata.	¡Error! Marcador no definido.
Figura 9 Recuperación del ΔΨ de las mitocondrias de hígado de rata al adicionar EGTA..	¡Error! Marcador no definido.
Figura 10 Reapertura del mPTP con diferentes concentraciones de Ca ²⁺	¡Error! Marcador no definido.
Figura 11 El tiempo de apertura del poro afecta la reversibilidad..	¡Error! Marcador no definido.
Figura 12 Hinchamiento mitocondrial con adiciones de Ca ²⁺ y EGTA.....	¡Error! Marcador no definido.
Figura 13 Modelo propuesto para las aperturas transitorias del mPTP con Ca ²⁺	¡Error! Marcador no definido.

2 LISTA DE ABREVIATURAS

ANT: Translocador de adenín nucleótidos

AOX: Oxidasa alterna

CCCP: p-clorocarbonilcianurofenilhidrazona

CyPD: Ciclofilina D

CR: Control respiratorio

CTE: Cadena transportadora de electrones

EGTA: "etilen glicol bis(2-aminoetil eter)-N,N,N',N'-ácido tetraacético"

MUC: Canal inespecifico mitocondrial

O₂⁻: Anión superóxido

Pi: Fosfato inorgánico

PiC: Acarreador de fosfatos

PTP: Poro de transición de la permeabilidad.

VDAC: Canal aniónico dependiente de voltaje.

$\Delta\Psi$: Potencial transmembranal mitocondrial.

3 RESUMEN

La transición de la permeabilidad mitocondrial (TP) es el cambio súbito de la permeabilidad de la membrana interna mitocondrial como respuesta a distintos factores (aumento en la concentración de calcio, estrés, depleción de nucleótidos de adenina, fosfato, entre otros). La TP está determinada por la apertura de un canal inespecífico ubicado en la membrana interna mitocondrial conocido como Poro de Transición de la Permeabilidad (PTP), cuya identidad molecular aún es controversial. Sin embargo, se han propuesto como componentes del PTP distintas proteínas, como la translocasa de adenín nucleótidos (ANT), el acarreador de fosfatos (PiC), la porina mitocondrial (VDAC), la ciclofilina D (CyPD) y subunidades de la ATP sintasa. Este poro se encuentra en distintos organismos, desde levaduras hasta mamíferos.

Las consecuencias de la apertura del PTP son la entrada de H^+ , la disipación de la fuerza protón-motriz y el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa; así como la entrada de moléculas de bajo peso molecular que aumentan el volumen mitocondrial (hinchamiento mitocondrial). En mamíferos, se ha propuesto que la apertura transitoria del PTP (mPTP) ayuda a mantener niveles fisiológicos de cationes y el control de la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs). Sin embargo, no se conoce el tiempo que puede permanecer abierto el poro para que se pueda dar la reversibilidad. En este trabajo se determinó el efecto del Ca^{2+} en el mPTP de mitocondrias de hígado de rata, evaluando sus efectos en el consumo de oxígeno, el potencial transmembranal y el hinchamiento mitocondrial, utilizando succinato como sustrato respiratorio. Los resultados sugieren que es posible la modulación de la apertura del mPTP al utilizar Ca^{2+} como efector de apertura, misma que dependerá de la concentración del catión. Además, el tiempo de apertura

máximo es de 1 minuto para que se pueda dar la reversibilidad de la apertura, mejor conocida como apertura transitoria.

4 ABSTRACT

The mitochondrial permeability transition (PT) is the sudden change in the permeability of the inner mitochondrial membrane in response to different factors (calcium, oxidative stress, depletion of adenine nucleotides, phosphate, and others). PT is determined by an unspecific channel opening located in the inner mitochondrial membrane known as the Permeability Transition Pore (PTP), whose molecular identity still is in debate. However, different proteins have been proposed as components of PTP, such as adenine nucleotide translocase (ANT), phosphate carrier (PiC), mitochondrial porin (VDAC), cyclophilin D (CyPD) and subunits of ATP synthase. This pore has been detected in different organisms, from yeasts to mammals.

The opening consequences of the PTP are the intake of H^+ , the proton-motive force dissipation and the oxidative phosphorylation uncoupling; as well as the intake of low molecular weight molecules that increase mitochondrial volume (mitochondrial swelling). It has been proposed that the transient PTP opening helps maintaining physiological cation levels and controls reactive oxygen species (ROS) production. However, it is yet unknown how long the pore can remain open so that reversibility can occur. In this work, the effect of Ca^{2+} in rat liver mitochondria PT was evaluated using succinate as respiratory substrate, following its effects on oxygen consumption, transmembrane potential, and mitochondrial swelling. The results suggest that PTP opening modulation is possible by using Ca^{2+} as an opening effector, and that this depends on the cation concentration used. In addition, it was found that the maximum opening time is 1 minute so that the opening reversibility, better known as transitory opening, can be seen.

5 INTRODUCCIÓN

5.1 LA MITOCONDRIA

La mitocondria es un organelo dinámico, considerado “la fuente de energía celular” por su gran capacidad de producir energía (Brand et al. 2013). Al igual que sus ancestros bacterianos, las mitocondrias tienen una membrana externa (MEM) y una interna (MIM). Entre ambas membranas se delimita el espacio intermembranal (EIM) y en el interior de la membrana interna se encuentra la matriz mitocondrial (Kühlbrandt, 2015). La membrana externa es permeable a iones y moléculas pequeñas por difusión o por transporte pasivo a través de la bicapa o del canal aniónico dependiente de voltaje (Porina) y tiene una proporción de proteína:fosfolípido aproximada de 1:1 (Schenkel y Bakovic, 2014 y Lemeshko, 2018). La membrana interna forma invaginaciones (crestas mitocondriales) y contiene 70% de proteínas. En la MIM los iones y moléculas se transportan mediante transportadores específicos siendo más selectiva (Distler et al. 2008; Kühlbrandt, 2015).

Los organismos aerobios sintetizan ATP principalmente por dos vías: por la glucólisis en el citosol y por la fosforilación oxidativa (OxPhos) en la membrana plasmática de las bacterias, o en la membrana interna mitocondrial de los organismos eucariontes (Nelson, 2021). Con glucosa como sustrato, la OxPhos produce aproximadamente 17 veces más ATP que la glucólisis anaerobia. Por lo que en organismos aerobios la OxPhos es la principal fuente de ATP (Goetzman y Prochownik, 2018). Sin embargo, las funciones de las mitocondrias se extienden más allá de la biosíntesis de ATP celular, pues participan en múltiples vías de

señalización reguladoras en respuesta a estímulos fisiológicos y fisiopatológicos (Mattson et al. 2008).

5.2 LA FOSFORILACIÓN OXIDATIVA Y LA TEORÍA QUIMIOSMÓTICA

La teoría quimiosmótica propuesta por Peter Mitchell (Mitchell, 1961) establece que la transferencia de electrones derivados de la oxidación de sustratos y la síntesis de ATP se acoplan cuando la cadena transportadora de electrones (CTE) genera un gradiente de protones, que se equilibra con diferentes iones y al que se le denomina fuerza protón-motriz (Δp). La fuerza protón-motriz es aprovechada por la ATP sintasa para fosforilar ADP produciendo ATP (Figura 1).

La fosforilación oxidativa comprende dos sistemas enzimáticos acoplados entre sí: CTE, donde los electrones fluyen desde el NADH + H⁺ o del succinato hasta su receptor final, el oxígeno; está conformada por: la NADH deshidrogenasa (complejo I), succinato deshidrogenasa (complejo II) citocromo c reductasa o complejo citocromo bc1 (complejo III) y citocromo c oxidasa (complejo IV) que paralelamente al transporte de electrones, translocan protones de la matriz al espacio intermembranal (el complejo II no transloca H⁺). El segundo sistema es el complejo V o ATP sintasa donde los H⁺ acumulados en el espacio intermembranal forman el Δp , que impulsa el reingreso de los protones hacia la matriz mitocondrial a través del complejo V sintetizando ATP a partir de ADP y Pi (Morelli et al. 2019) (Figura 1).

La energía almacenada en el gradiente de H⁺, denominado Δp tiene dos componentes 1) La energía química potencial debido a la diferencia de concentración de las especies químicas (H⁺) entre las dos regiones separadas por la membrana y 2) la energía eléctrica potencial que se origina con la separación de cargas cuando un protón atraviesa la membrana sin un contraión. Cuando los

protones fluyen espontáneamente a favor de su gradiente electroquímico, hay energía disponible para producir trabajo. La Teoría Quimiosmótica explica la dependencia de la síntesis de ATP de la transferencia eléctrica. La fuerza protón motriz va aumentando hasta que la energía libre del bombeo de H^+ fuera de la matriz y en contra del gradiente es igual o superior a la energía liberada por la transferencia de electrones desde el NADH al H_2O . Llegando a este punto, el flujo de electrones es muy lento, la energía libre del proceso global del flujo de electrones acoplado al bombeo es cero y se alcanza el equilibrio (Nelson, 2021).

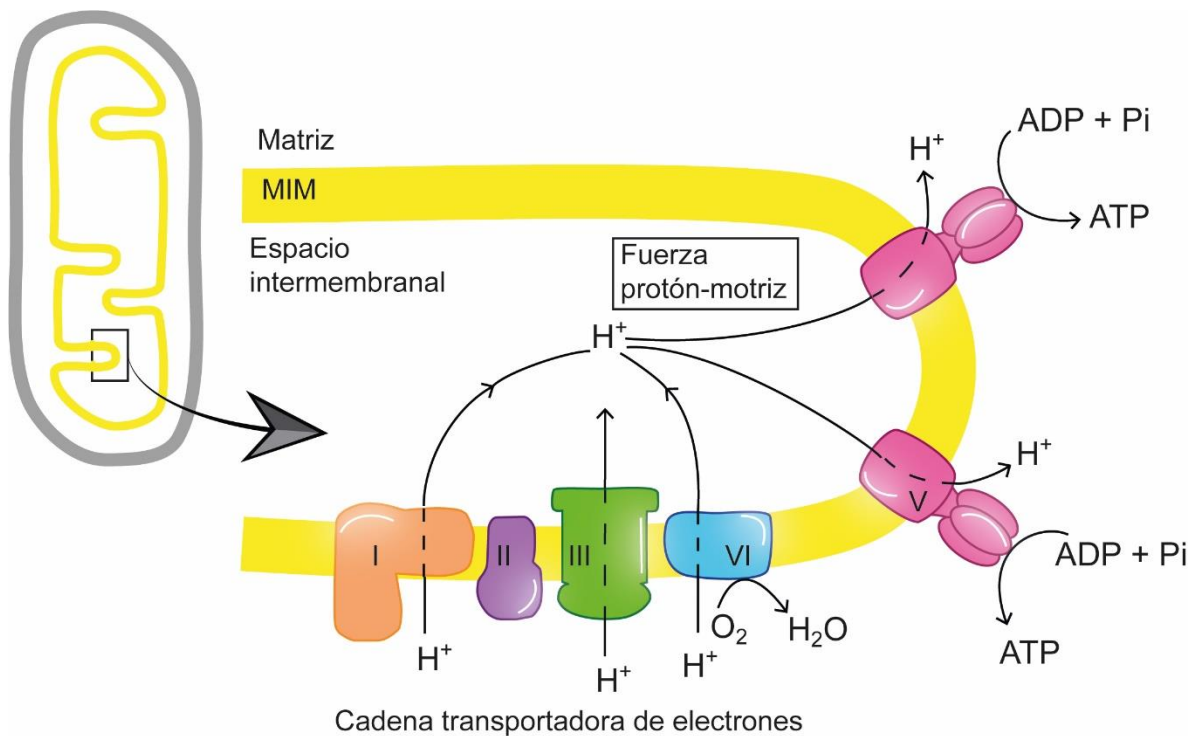


Figura 1 Fosforilación Oxidativa. Los complejos respiratorios (I-V) se encuentran ubicados en la membrana interna mitocondrial (MIM). Los complejos I, III y IV bombean H^+ al espacio intermembranal, generando un gradiente electroquímico conocido como "fuerza protón-motriz (Δp)". Esta fuerza es utilizada por la F₁F₀-ATP sintasa (complejo V) en la fosforilación de la molécula de ADP. También se puede observar que estos dos fenómenos se encuentran acoplados. Imagen modificada de (Tymoczko et al. 2015)

Cada complejo acepta o dona electrones a acarreadores o transportadores móviles como la coenzima Q y el citocromo c. Cada acarreador de la cadena de transporte de electrones puede recibir electrones de un donador y subsecuentemente puede donarlos al siguiente acarreador de la cadena de acuerdo

con su potencial redox (E°); los electrones tenderán a fluir espontáneamente desde un transportador con un valor de E° más negativo hacia otro con E° más positivo. Finalmente se combinan con el oxígeno y protones formando agua (Figura 2).

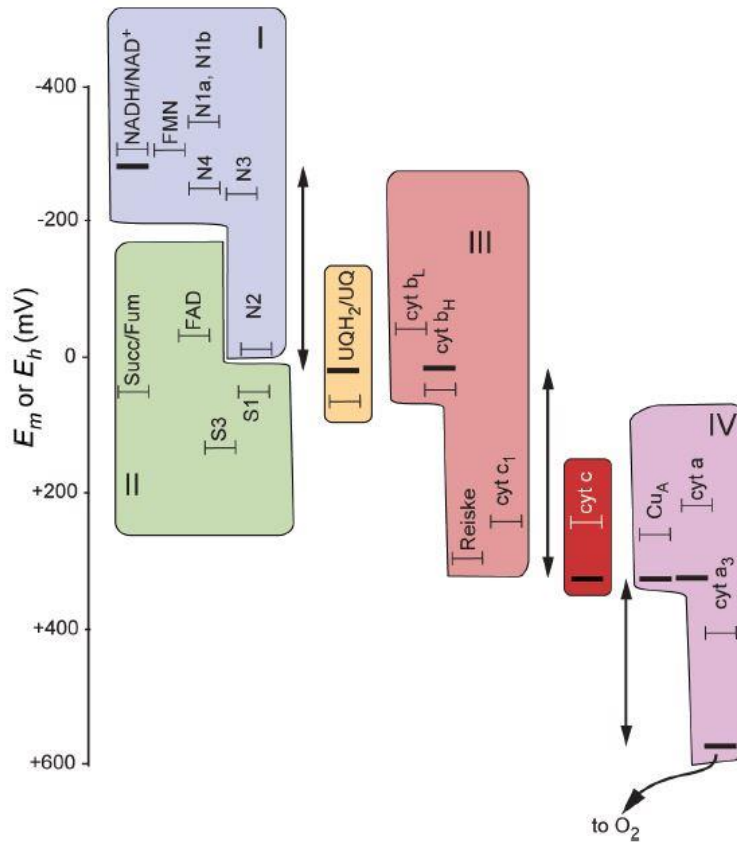


Figura 2 Valores de E° para los componentes de la cadena respiratoria mitocondrial. Los valores son valores consenso para las mitocondrias de mamíferos. (Nicholls y Ferguson, 2013).

El cambio en la energía libre, ΔG , en una transición reversible a presión y temperatura constantes es equivalente al trabajo hecho exclusivamente por cambios presión y volumen. Otros tipos de trabajo comúnmente encontrados en bioquímica y biofísica son químico, eléctrico y electroquímico (Cramer and Soriano, 2002).

El trabajo eléctrico es llevado a cabo por el movimiento de cargas (unidades, coulombs, "C") a través de un potencial. ΔE o $\Delta\Psi$, expresado en volts. La carga es igual a la constante de Faraday (es decir, el valor molar de la carga electrónica), multiplicado por la valencia de la carga, z , el signo de la carga, e (± 1), y el número de moles transferidas, n .

$$\Delta G_{elec} = \Delta W_{elec} = n_i z e F \cdot \Delta E$$

La otra forma común de almacenar energía eléctrica es manteniendo la diferencia del potencial eléctrico a través de una membrana, $\Delta\Psi$, el cual tiene un valor típico aproximado de 100 mV. Entonces, para el trabajo eléctrico, la energía libre, G_{elec} , correspondiente al potencial E o Ψ , es:

$$G_{elec} = n_i z e F \cdot E \text{ (a través de un potencial eléctrico)}$$

Y

$$G_{elec} = n_i z e F \cdot \Psi \text{ (a través de un potencial de membrana)}$$

Cuando el soluto es acumulado en contra de su gradiente de concentración, se habla de transporte activo debido a que este proceso requiere de energía. El potencial químico, μ , es un parámetro importante para el transporte debido a que este representa el ΔG por mol del componente transportado hacia dentro o hacia afuera de un sistema limitado por una membrana.

Considerando un sistema de dos componentes [fuera, O; interior (p. ej., citoplasma), I]. Entonces, la energía libre, $G = G^I + G^O$. Si dn_i , dn_j , dn_k moles de los componentes i , j y k se transfieren desde el exterior de la solución, O, al interior de la célula, I (Figura 3).

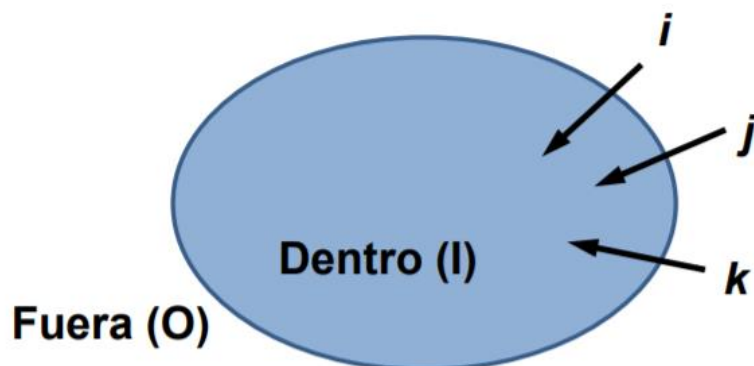


Figura 3. Transporte de solutos. Representación del movimiento de solutos (i, j y K) cargados desde fuera (o) hacia dentro (i) de la célula. Modificado de Cramer y Soriano, 2002.

La dependencia del potencial químico, μ , respecto a la concentración tiene la misma forma que la energía libre, G. Entonces, de la ecuación, $dG_i = dn_i zeF \cdot E + \mu_i dn_i$, la expresión completa para el potencial electroquímico de un soluto cargado es:

$$\tilde{\mu} = \mu^o + RT \ln \frac{\{c\}}{\{c^o\}} + zeF \cdot (E - E^o)$$

Como la diferencia en el potencial químico es una medida de la tendencia a escapar de una molécula sin carga debido a su gradiente de concentración, el potencial electroquímico describe esta tendencia para una molécula cargada debido tanto al gradiente de concentración como al potencial eléctrico. Cuando se aplica al gradiente de H^+ o Na^+ a través de la membrana transdutora de energía, se tiene la base de la teoría quimiosmótica (Mitchell, 1966).

Considerando la aplicación del potencial electroquímico a la translocación de un protón (H^+) dirigida por el potencial de membrana, donde la carga $ze = +1$: Si omitimos la concentración estándar, y el potencial estándar o de referencia, tenemos que:

$$\tilde{\mu} = \mu^o + 2.3RT \cdot \log_{10}\{H^+\} + F \cdot \Psi$$

$$\tilde{\mu} = \mu^o - 2.3RT \cdot \text{pH} + F \cdot \Psi$$

debido a que $-\log_{10}\{H^+\} = \text{pH}$

La energía es almacenada en (i) el gradiente de pH que es generado por el transporte de electrones o la hidrólisis de ATP, acoplado al bombeo de protones a través de la membrana, y (ii) el potencial eléctrico transmembranal generado por la transferencia de electrones o protones no compensada eléctricamente a través de la membrana. Algunos organismos utilizan sodio para generar su potencial electroquímico a través de la membrana. Por analogía, el gradiente electroquímico que involucra la translocación de Na^+ desde su estado inicial. “I”, a su estado final. “F” quedaría:

$$\Delta\tilde{\mu}_{\text{Na}^+} = F \cdot \Delta\psi + 2.3RT \cdot \log_{10} \frac{(\text{Na}^+)_F}{(\text{Na}^+)_I},$$

Si se conoce la relación entre la carga eléctrica que se movió a través de la membrana por unidad de área y el potencial eléctrico así generado, se puede conocer el número de protones, iones, o electrones que se tienen que mover por unidad de área para generar un potencial de membrana de interés biológico. La relación entre la carga (Q) que se mueve y el potencial $\Delta\Psi$ es una constante de proporcionalidad llamada Capacitancia (C). Es decir, $Q = C \cdot \Delta\Psi$, o $\Delta\Psi = Q/C$. Así, mientras mayor sea la capacitancia, más cargas habrá que mover a través de una membrana para generar un valor determinado de $\Delta\Psi$. La habilidad de las membranas para mantener un significativo $\Delta\Psi$ como el resultado del movimiento de un pequeño número electrones o iones a través de la membrana es una consecuencia del gran valor de la capacitancia específica de las membranas biológicas (Cramer y Soriano, 2002).

En 1964 Paul Boyer formuló la hipótesis del acoplamiento conformacional, que propone que el transporte de electrones permite cambios conformacionales en la ATP sintasa y conduce a la síntesis de ATP (Boyer, 1997). Más tarde, en los 70's, Racker y colaboradores lograron aislar a la ATPasa de partículas submitocondriales demostrando que se encuentra conformada por dos subunidades capaces de llevar a cabo la fosforilación oxidativa en partículas que carecían de ella (Racker y Stoeckenius, 1974).

La ATP-sintasa es un complejo enzimático formada por dos componentes principales llamados fracción F_1 y fracción F_0 (por su sensibilidad a oligomicina). La fracción 1 es una proteína periférica de membrana que se encuentra dirigida hacia la matriz mitocondrial, está constituida por nueve subunidades: tres subunidades α y tres subunidades β que se encuentran sobre un tallo central constituido por las subunidades, δ , γ y ϵ . Este complejo se encuentra anclado mediante la subunidad γ a la fracción F_0 , que es una proteína integral de membrana formada por distintos tipos de subunidades que forman un canal a través del cual pasan los protones. El mecanismo de catálisis rotacional, propuesto por Boyer (Boyer, 1997), predice que los tres dímeros $\alpha \beta$ del complejo F_1 forman un hexámero y que las subunidades β son las subunidades catalíticas, mientras que las subunidades γ y ϵ están unidas al anillo c y giran con él (Figura 3). Cada rotación de 120° de la subunidad induce cambios conformacionales en los centros catalíticos de la subunidad β , que se van alternando entre tres estados que difieren por su asociación a la subunidad γ .

Los cambios conformacionales de la porción F_1 pueden clasificarse de la siguiente manera:

- Conformación L: Laxa con sitios de unión para ADP y Pi.
- Conformación T. Unión tensa, permite la formación de enlace fosfodiéster entre el ADP y Pi, formándose ATP. Tiene mayor afinidad para ATP.
- Conformación O. Abierto. Deja libre al ATP.

Los dímeros $\alpha\beta$ adoptan una conformación diferente en cada estado gracias a la interacción con la subunidad central γ . Las tres subunidades β interactúan de tal modo con la subunidad γ que cuando una adopta la conformación O, otra adopta la conformación L y la otra la conformación T. Una rotación completa de la subunidad γ permite la síntesis de tres moléculas de ATP. La subunidad γ gira con todo el rotor gracias al transporte de protones a través del hemicanal de las subunidades c del rotor y la subunidad a del estator.

Una característica sorprendente del mecanismo de síntesis de ATP es que no se requiere energía para sintetizar el ATP unido a la enzima a partir de ADP y Pi unidos. Esto no contradice las leyes de la termodinámica, porque el ATP está muy unido y se requiere energía para cambiar la conformación de este sitio de unión permitiendo que se libere el nucleótido. Por lo tanto, los tres sitios catalíticos para el nucleótido existen en las conformaciones O (abierto), L (suelto) y T (apretado), y el cambio conformacional inducido por el Δp hace que un sitio T con ATP unido se convierta en un sitio O y, por lo tanto, libera su ATP unido, mientras que al mismo tiempo hace que un segundo sitio cambie de un sitio L, con ADP y Pi débilmente unidos, a un sitio T, donde los sustratos están fuertemente unidos, lo que permite que se forme ATP unido. (Figura 4). Por tanto, cada uno de estos sitios catalíticos tiene en cualquier instante una conformación distinta, pero todos los sitios pasan secuencialmente a través del mismo conjunto de al menos tres conformaciones y permite una producción continua de ATP (Nicholls, 2013).

Estos dos planteamientos, la Teoría Quimiosmótica y el mecanismo de catálisis rotacional, se complementan y explican el mecanismo de la fosforilación oxidativa.

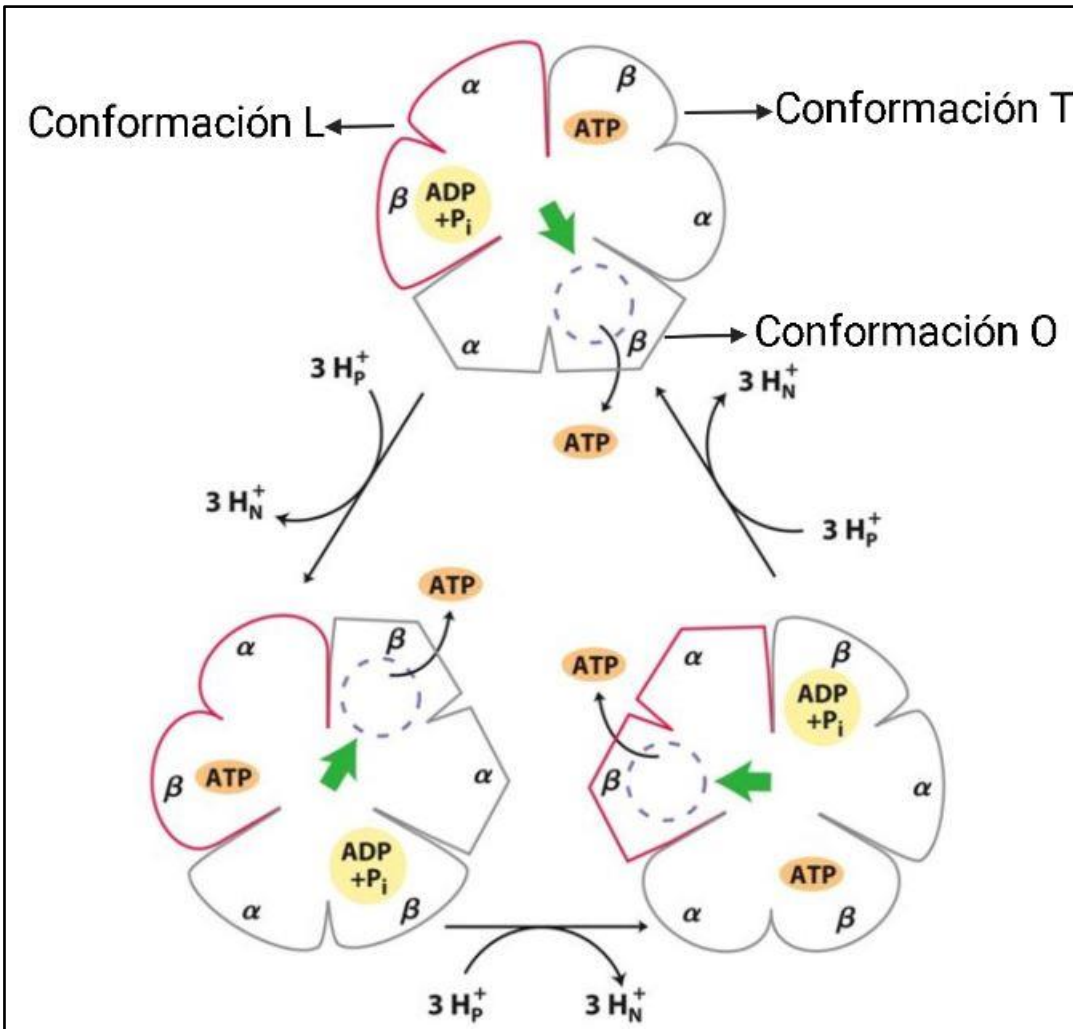


Figura 4 **Mecanismo de catálisis rotacional en la ATP sintasa propuesto por Boyer.** El complejo F1 tiene tres sitios distintos de unión de nucleótidos de adenina, uno por cada par de subunidades α y β . En un momento determinado, uno de ellos está en la conformación β -ATP (conformación T), un segundo está en la conformación β -ADP (conformación L) y un tercero está en la conformación β -vacía (conformación O). La fuerza protón-motriz hace que la subunidad γ (eje central, flecha verde) gire, produciendo un cambio conformacional en el que los tres sitios alternan su conformación (Nelson y Cox, 2008).

5.3 PRODUCCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO

La fosforilación oxidativa requiere que la membrana mitocondrial interna esté íntegra, pues cuando se rompen las mitocondrias intactas mediante tratamiento con detergente o corte mecánico, los fragmentos membranosos resultantes aún pueden catalizar la transferencia de electrones desde el NADH o succinato al O₂ pero no hay síntesis de ATP acoplada a la respiración (Hinkle, 2005); los compuestos que aumentan su permeabilidad disipan el gradiente electroquímico y permiten que el transporte de electrones continúe, pero inhiben la síntesis de ATP, es decir “desacoplan” el transporte de electrones de la reacción mediada por la ATP sintasa para fosforilar el ADP (Kadenbach, 2003). Este desacoplamiento puede explicarse por una fuga de protones o una fuga de electrones que disipan parte de la energía del gradiente de H⁺ en forma de calor (Kadenbach, 2003).

La fuga de protones representa una parte significativa de la tasa metabólica en reposo de un animal. Representa un mecanismo para la disipación de energía o la producción de calor y afecta significativamente la eficiencia de la fosforilación oxidativa, definida por la cantidad de fosfato inorgánico (Pi) incorporado en el ATP por cantidad de oxígeno consumido, es decir, la relación P/O (Hinkle, 2005; Demine et al. 2019) En la fuga de H⁺, éstos pueden escapar directamente del espacio mitocondrial interno por difusión a través de la membrana mitocondrial interna, un proceso denominado fuga basal de protones, el cual es pequeño en una membrana intacta. Este proceso depende esencialmente de la composición de la membrana mitocondrial interna y podría representar hasta el 30-50% de la tasa metabólica celular en reposo (Jastroch et al. 2010). En segundo lugar, en ciertos tejidos, como el tejido adiposo café, este proceso también puede ser regulado/inducido por un conjunto específico de proteínas: proteínas desacopladoras de (UCP) o ANT (translocasas de nucleótidos de adenina). Por otro lado, los electrones, aunque se transfieren a un oxígeno para formar agua, también pueden escaparse de la cadena de transferencia de electrones y dar lugar a la producción de anión superóxido (O₂^{•-}) o radical hidroperoxilo (HO₂[•]) (Demine et al. 2019). El deslizamiento de electrones

consiste en la transferencia de electrones a través de los complejos respiratorios sin bombeo de protones (Kadenbach, 2003; Jastroch et al. 2010; Cadenas, 2018).

El desacoplamiento ocurre en todas las células eucariotas y puede representar una alta proporción de tasas metabólicas celulares (hasta el 25% de la tasa metabólica basal en la rata) (Stuart et al. 2001). Este aprovechamiento incompleto de energía redox aumenta la termogénesis o alternatively puede llevar a la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs). Esto ocurre porque las mitocondrias pueden producir EROs, incluido el anión superóxido de un ERO primario ($O_2^{\bullet-}$), que se dismuta en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y podría generar peroxinitrito ($ONOO^-$) (Quinlan et al. 2013). La liberación de oxígeno reactivo puede representar del 0,1 al 0,2 % del O_2 consumido, medido en diferentes tejidos de rata (Tahara et al. 2009). Aunque la producción de ROS a menudo se ve como resultado de la interrupción potencial de la membrana mitocondrial, muchos otros parámetros también afectan la tasa de producción de EROs, que incluyen (1) la diferencia de pH mitocondrial/citosol o cualquier alteración del pH que conduzca a la producción de EROs (Barja, 2007), (2) el estado celular redox (el estado reducido favorece la producción de EROs mitocondrial) (Barja, 2007), o (3) la disponibilidad local de O_2 (la hiperoxia aumenta la producción de ROS mitocondrial) (Turrens et al. 1982).

Las EROs son altamente reactivas y generalmente son moléculas consideradas subproductos tóxicos del metabolismo aerobio y cuando aumenta su concentración, son la principal causa de daño en macromoléculas como proteínas, lípidos y DNA (Rowe et al. 2008; Ezraty et al. 2017; Su et al. 2019) Sin embargo, cuando son producidas de manera controlada, las EROs juegan un papel importante en vías de señalización, proliferación y diferenciación celular (Paulsen y Carroll, 2010).

Las EROs se pueden producir en diferentes organelos como las mitocondrias, los peroxisomas y el retículo endoplásmico. Sin embargo, la mayoría de las EROs provienen de las mitocondrias, siendo la CTE la mayor productora de

éstas (Phaniendra et al. 2015). Por ejemplo, los radicales superóxido ($O_2^{\bullet-}$) se producen en dos sitios principales de la cadena de transporte de electrones: en el complejo I y el complejo III.

Se han identificado dos sitios de generación de $O_2^{\bullet-}$ en el Complejo I:

- 1) El cofactor FMN que acepta electrones del NADH y
- 2) el sitio de unión de Q, en el que se transfieren dos electrones del terminal Fe–S a Q.

Con el transporte de electrones directo, los electrones del NADH reducen por completo el centro FMN, que reacciona con el oxígeno para generar $O_2^{\bullet-}$. Así, la producción de $O_2^{\bullet-}$ en este centro está regulada por la relación de NADH/NAD⁺ y en condiciones fisiológicas es relativamente baja. Sin embargo, las condiciones que conducen a la acumulación de NADH, como una demanda baja de ATP que provoca una disminución de la respiración o daños en la CTE provocan una mayor reducción de la FMN y un aumento de la producción de $O_2^{\bullet-}$ en este sitio (Nolfi-Donagan et al. 2020).

En particular, el inhibidor del Complejo I, la rotenona, que se une al sitio de unión Q, estimula la producción de $O_2^{\bullet-}$ al potenciar la acumulación de electrones y la reducción del sitio FMN (Mazat et al. 2020). Un segundo mecanismo por el cual el Complejo I genera $O_2^{\bullet-}$ depende del transporte de electrones inverso (RET) (Phaniendra et al. 2015). El RET ocurre cuando el pool de quinonas (Q) está muy reducido y el Δp es alto. En estas condiciones, la energía es lo suficientemente alta como para impulsar el transporte de electrones desde el quinol (QH₂) al Complejo I (Scialò et al. 2017).

El complejo III, específicamente el sitio de oxidación del QH₂, también es un generador de $O_2^{\bullet-}$ dentro de la CTE (Mazat et al. 2020). Cuando los dos electrones transportados por el QH₂ y unirse al Complejo III, se transfieren del QH₂ al centro

Fe–S de Rieske y luego al citocromo c en secuencia. La transferencia de un electrón (quedando el otro en Q) favorece la formación de especies inestables $Q\bullet^-$, que pueden reaccionar con el oxígeno para producir $O_2\bullet^-$. La tasa de producción de EROs en este sitio es fisiológicamente baja y se ve favorecida cuando el sitio se reduce solo parcialmente, lo que ocurre cuando el sustrato está en niveles máximos o con la inhibición del complejo (Cortassa et al. 2014).

Existen enzimas que contribuyen a la regulación de la concentración de las especies redox. Uno de ellos es donde el $O_2\bullet^-$, se dismuta rápidamente a H_2O_2 por la superóxido dismutasa de manganeso (MnSOD) localizada en la matriz mitocondrial y por la SOD de cobre/zinc ubicada en el espacio intermembrana (Wong et al. 2017). El H_2O_2 que sale de la mitocondria está regulada por los sistemas de glutatión y tiorredoxina/peroxirredoxina. El glutatión (GSH) es oxidado por el H_2O_2 para formar el disulfuro de glutatión (GSSG), una reacción catalizada por la glutatión peroxidasa (GPx). Luego, el GSSG se reduce nuevamente a GSH por la glutatión reductasa (GR). Por otro lado, el H_2O_2 oxida un residuo de cisteína en el sitio catalítico de la peroxirredoxina (PRx), que forma un puente disulfuro con una cisteína vecina. El poder reductor de la tiorredoxina (TRx) reduce la PRx a través de una reacción de intercambio de disulfuro y luego la tiorredoxina reductasa (TR) reduce la TRx (Cadenas, 2018)

Al haber una sobreproducción de EROs, estos sistemas se pueden ver superados (Gnaiger, 2020). En estos casos es importante que haya mecanismos de desacoplamiento que eviten dicha sobreproducción. Donde se facilita la fuga de protones desde el espacio intermembranal hacia la matriz, sin la participación de la ATP sintasa.

5.4 LA CONCENTRACIÓN DE O₂ EN DIFERENTES TEJIDOS

El oxígeno puede tener cambios en la concentración disponible (ya sea atmosférica o en solución), lo que conlleva a que los organismos desarrollen respuestas metabólicas para asimilar estos cambios (Van Dijk et al. 1999; Verberk et al. 2011; Verberk y Bilton 2013; Horne et al. 2015). Debido a ello, los seres vivos pueden clasificarse como oxirreguladores u oxiconformadores dependiendo de su capacidad para excluir el oxígeno (Prosser 1955). Los organismos oxirreguladores, poseen un epitelio impermeable al O₂, y desarrollaron sistemas altamente especializados que controlan la concentración en los tejidos y mantienen constante sus niveles de oxígeno internos a pesar de haber cambios en la concentración a su alrededor (Rosas-Lemus et al. 2016 y Leiva et al. 2018). Por otro lado, el oxígeno intracelular en los oxiconformadores depende del nivel de oxígeno ambiental pues se encuentran expuestos a cambios en la concentración del O₂; debido a ello implementan diversas estrategias para hacer frente al cambio de O₂ (van Winkle y Mangum 1975; Herreid 1980; Pörtner y Grieshaber 1993; Marshall et al. 2013).

En mamíferos, a pesar de ser organismos oxireguladores, puede haber diferentes escenarios en la disponibilidad del oxígeno (Macintyre, 2014). Por ejemplo, el corazón de los mamíferos es un órgano aeróbico obligado. A una frecuencia de pulso en reposo, el corazón consume aproximadamente 8-15 ml de O₂/min/100 g de tejido y puede aumentar a más de 70 ml de O₂/min/100 g de tejido miocárdico durante el ejercicio vigoroso (Jafri et al. 2001). El músculo cardíaco de los mamíferos no puede producir suficiente energía en condiciones anaeróbicas para mantener los procesos celulares esenciales; por lo tanto, un suministro constante de oxígeno es indispensable para mantener la función y la viabilidad cardíacas. Sin embargo, la demanda energética puede resultar en la producción de EROs y resultar en un proceso dañino para el tejido (Knaapen et al. 2007).

Por otro lado, cuando la concentración de oxígeno disminuye en hepatocitos, no presenta la versatilidad de los cardiomiocitos para hacerle frente a este cambio, derivando principalmente en patologías (Abelmann et al. 1961; Guo et al. 2017).

5.5 MECANISMOS DE DESACOPLAMIENTO

En la naturaleza, tanto oxiconformadores y como oxiorreguladores tienen estrategias para controlar la toxicidad de las EROs donde a altas tasas de consumo de oxígeno, la producción de EROs disminuye (Cortassa et al. 2014). En ausencia de síntesis de ATP, dicho aumento en la respiración puede lograrse mediante mecanismos de desacoplamiento fisiológico (Kadenbach, 2003).

Existen dos tipos de sistemas fisiológicos de desacoplamiento: el primero a través de tarjas de H^+ , que pueden ser canales o transportadores específicos como el Poro de Transición de la Permeabilidad (PTP) y las proteínas de desacoplamiento (UCP). El segundo mecanismo es enzimas redox que no bombean H^+ como son las óxido-reductasas alternas y el “deslizamiento de las bombas de protones” (Guerrero-Castillo et al. 2011; Uribe-Carvajal et al. 2011) En todos los casos, el desacoplamiento debe controlarse estrictamente mediante la expresión diferencial y/o la regulación de la actividad de los componentes moleculares involucrados (Fillingame, 1997).

5.6 EL PORO DE TRANSICIÓN DE LA PERMEABILIDAD

La transición de la permeabilidad (PT) se identificó por primera vez en mamíferos (mPTP) (Haworth y Hunter, 1979) y ha sido estudiada en otros clados del dominio Eukarya, identificándose efectores que modulan la regulación del poro dependiendo del organismo estudiado (Nasirudeen y Tan, 2005; Vianello et al. 2012;

Bustos et al. 2017 y Scarpelli et al. 2021). Se sabe que la apertura del Poro de Transición de la Permeabilidad (PTP) aumenta el paso de iones y metabolitos a través de la MIM, lo que produce una despolarización mitocondrial rápida, permite el paso de moléculas de hasta 1500 Da y se ha asociado a la muerte celular Azzolin et al. 2010; Uribe-Carvajal et al. 2011 y Hurst et al. 2017).

La identificación de las proteínas responsables de la formación del poro es un tema de debate. En un momento, se pensó que el mPTP incluía múltiples componentes de la MIM y de la membrana externa mitocondrial (MEM) que se ensamblaban para producir el mPTP. Un conjunto de componentes candidatos incluía tres elementos: canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC) ubicado en la membrana externa, translocador de adenín nucleótidos (ANT) que se encuentra en la membrana interna y ciclofilina D (CyPD) ubicada en la matriz mitocondrial (Gutiérrez-Aguilar et al. 2014; Hurst et al. 2017), junto con otras proteínas mitocondriales que interactúan con ellas, como el acarreador de fosfato (PiC) y proteínas asociadas como BH3, p53, Hexocinasa y TSPO (Elrod y Molkenin, 2013; Hurst et al. 2017) Estudios de knockout e inhibición de la CyPD, han establecido que ésta es parte estructural del mPTP y se considera responsable de su activación (Elrod y Molkenin, 2013; Karch et al. 2019). Por otro lado, se ha estudiado el papel del ANT en la formación y/o regulación del poro. En modelos de ratón que carecen de ANT, las mitocondrias contenían dos veces más calcio que las mitocondrias silvestres; sugiriendo que el ANT tiene un papel regulador del mPTP, pero no en su estructura (Kokoszka et al. 2004). Por otro lado, se ha observado, que la ausencia de una o más isoformas del ANT, aumentan la capacidad de las mitocondrias en la captación de Ca^{2+} , sin inducir hinchamiento mitocondrial y pérdida del potencial, proponiendo ser parte estructural del poro (Karch et al. 2019). En el caso de la proteína VDAC, se sabe que en ausencia de sus isoformas, a pesar de incrementar la capacidad de la retención de Ca^{2+} , se observa una pérdida en el potencial membranal, aunada al hinchamiento mitocondrial (Baines et al. 2007).

Varios trabajos han sugerido que subunidades o inclusive los dímeros de la ATP sintasa forman el componente principal del mPTP (Bernardi et al. 2015; Carraro et al. 2020). En ellos se ha propuesto que la estructura del anillo formada por las subunidades c, genera una conductancia similar a la del mPTP (Giorgio et al. 2013). Sin embargo, esta conclusión sigue siendo controversial (Walker et al. 2020) y se requieren más estudios para dilucidar los componentes moleculares que forman el mPTP (Figura 4).

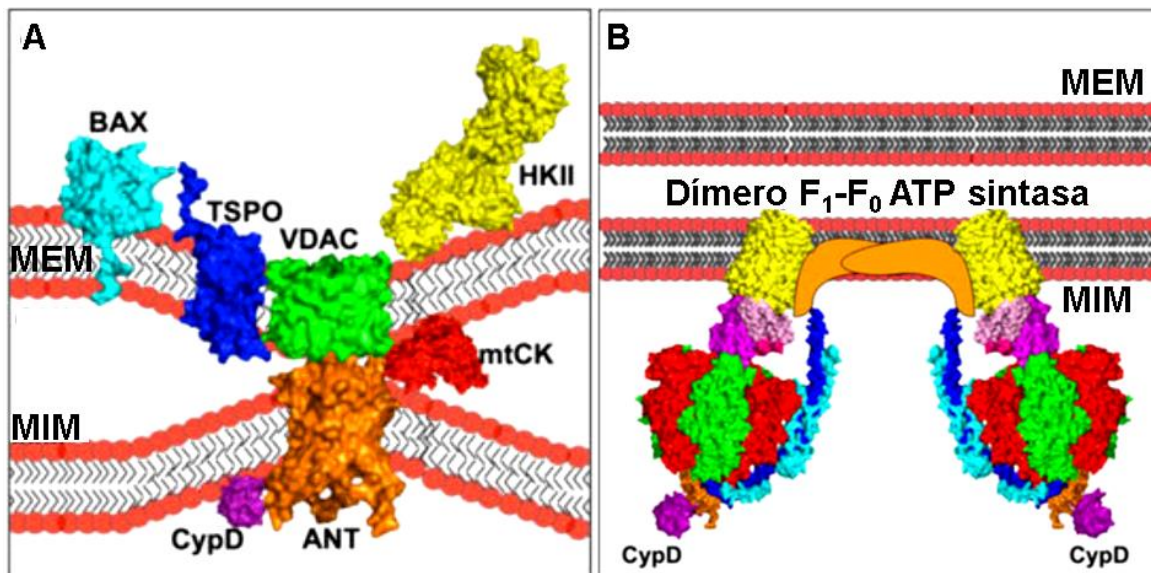


Figura 5 **Modelos propuestos de las proteínas que forman al mPTP.** A) Modelo clásico compuesto de la proteína X asociada a BCL-2 (BAX), canal aniónico dependiente del voltaje (VDAC), receptor periférico de benzodiazepina (TSPO), hexoquinasa II (HKII) en la membrana mitocondrial externa (OMM), creatina quinasa mitocondrial (mtCK) en el espacio intermembranal, el transportador de nucleótidos de adenina (ANT) en la membrana mitocondrial interna (IMM) y la ciclofilina D mitocondrial (CypD) unida a ANT en la matriz. B) Dímeros de la ATP sintasa. Imagen modificada de (Hurst et al. 2017).

5.7 EFECTORES DE APERTURA Y CIERRE DEL mPTP

Hasta ahora se han identificado diversos moduladores de la apertura del mPTP. Estos pueden clasificarse según su naturaleza molecular: (1) reguladores iónicos como Ca^{2+} (Haworth y Hunter, 1979), fosfatos inorgánicos (Pi) (Cortés et al. 2000), ion magnesio (Mg^{2+}) (Pilchova et al. 2017) y la concentración de H^+ (Petronilli et al. 1993); (2) especies reactivas de oxígeno (EROs) (X. Wang et al. 2012) tales como superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radicales hidroxilo (OH^-); (3) nucleótidos y derivados de nucleósidos que incluyen ADP, ATP y NADH (Azzi y Azzone, 1965; Guérin et al. 1994) y (4) fármacos o inhibidores de algún componente molecular candidato al mPTP (Halestrap y Davidson, 1990). Sin embargo, es importante resaltar que estos son específicos para cada organismo.

El aumento en la concentración de Ca^{2+} en la matriz mitocondrial, es el mecanismo principal de la apertura del poro de mPTP, la concentración requerida varía dependiendo el órgano y organismo que se esté estudiando (Carafoli, 1987; Zoratti y Szabò, 1995; Vianello et al. 2012). Se ha observado que la apertura del mPTP por este catión, puede ser revertida por un quelante de calcio (Haworth y Hunter, 1979; Vay et al. 2009).

Aunque se sabe que el Pi puede contribuir a la apertura del poro, si se adiciona con Ca^{2+} , resultan en un sinergismo en la inducción de la permeabilidad (Manon et al. 1998; Crompton, 1999). La concentración del Pi es determinante: a altas concentraciones de Pi se induce y a bajas concentraciones de Pi se inhibe la apertura (Ong et al. 2010; Uribe-Carvajal et al. 2011 y Hurst et al. 2017).

Las EROs son otro regulador crítico del mPTP. Se sabe que el mPTP participa en el mecanismo llamado “liberación de EROs inducida por EROs (RIRR)” (Penna et al. 2013), donde el exceso de EROs facilita la apertura de mPTP, lo que a su vez favorece la formación de ROS al inhibir la cadena respiratoria debido a la

pérdida de nucleótidos, del Cyt c y nucleótidos de piridina (Halestrap y Pasdois, 2009; Saotome et al. 2009; Bauer y Murphy, 2020).

También existen fármacos que favorecen la oxidación de grupos tioles modulando la apertura del poro, por ejemplo: el ter-butil-hidroperóxido (TBH), óxido de fenilarsina (PhAsO), diamida y peroxinitrito (ONOO^-) (Halestrap, 2010). Las EROs y ERNs pueden potenciar la apertura de mPTP indirectamente modulando la cadena de transporte de electrones o modificando directamente el poro. Por ejemplo, se sabe que la ANT tiene tres residuos de cisteína que muestran una reactividad diferencial hacia varios reactivos de tiol y agentes oxidantes de una manera dependiente de la conformación como la eosina maleimida, que ataca específicamente a la cisteína 159 de la ANT dentro del sitio de unión del nucleótido de adenina, suprimiendo la capacidad del ADP para inhibir la apertura del mPTP (Lisa y Bernardi, 2015).

Entre de los efectores que inhiben la apertura del mPTP se encuentra el compuesto inmunosupresor Ciclosporina A (CsA) que inhibe la actividad de la peptidilprolil cis-trans isomerasa mitocondrial lo que impide el cierre del mPTP, se sabe que la unión de CsA a CyP-D desenmascara un sitio inhibitor para Pi impidiendo la apertura del mPTP (di Lisa et al. 2011; Gutiérrez-Aguilar y Baines, 2015). También se encuentra el Mg^{2+} que aumenta la $[\text{Ca}^{2+}]$ para que el mPTP se abra (Vainio et al. 1970). El efecto del Ca^{2+} es contrarrestado por otros iones Me^{2+} que son transportados por el uniportador de Ca^{2+} (como Sr^{2+} y Mn^{2+}), pero los sitios de unión del Me^{2+} del lado de la matriz mitocondrial permanecen sin definir (Bernardi et al. 1992).

El ácido bongkreico (BKA) es un inhibidor del ANT, que bloquea el intercambio de nucleótidos de adenina en las mitocondrias bloqueándola en la conformación "m" (orientada a matriz). Mientras que el ácido atractilósido (ATR), otro inhibidor del ANT, bloquea el movimiento de nucleótidos entre el interior y el exterior de la membrana mitocondrial. específicamente a la conformación "c"

(orientado al citosol). Estos 2 moduladores actúan en el ANT bloqueando la proteína transportadora en diferentes conformaciones. Se demostró que cualquier fármaco que estabilice la conformación del ANT en la que se enfrenta al citosol (la conformación c) mejoró la apertura de la PTP, mientras que la estabilización de la ANT en la conformación de matriz (m) inhibe la apertura de PTP (Halestrap y Pasdois, 2009 ; Ruprecht y Kunji, 2019). Actualmente existe una amplia lista con de efectores de apertura y de cierre (tabla 1).

Tabla 1. Efectores que promueven o inhiben la apertura del poro de transición de la permeabilidad mitocondrial

<i>Inhibidores del mPTP</i>	<i>Inductores del mPTP</i>
↑ Mg^{2+}	↓ Ca^{2+}
↑ pH	↓ pH
↑ $\Delta\Psi_{mt}$	↓ $\Delta\Psi_{mt}$
ADP	↑ Pi
ATP	Estrés oxidante: O_2^-
Ácido bongkrékico	Atractilósido
Ciclosporina A y análogos	Ácidos grasos de cadena larga: Palmitato
$NADH$	
$NADP$	

- $\Delta\Psi_{mt}$: Potencial transmembranal mitocondrial; ATP: Adenosín trifosfato; ADP: Adenosín difosfato.
- Las flechas hacia arriba indican aumento de la magnitud de los efectores y las flechas hacia abajo indican disminución.

Modificada de Cui et al. (2021).

5.8 CONSECUENCIAS DE LA APERTURA DEL mPTP

El mPTP se ha relacionado por mucho tiempo con la disfunción mitocondrial. La apertura prolongada de mPTP da como resultado la despolarización de la membrana mitocondrial, el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa y la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno por la depleción del glutatión reducido y del NADPH. Además, la entrada descontrolada de pequeños osmolitos moleculares y agua en las mitocondrias a través de mPTP causa estrés mecánico en la MEM debido al hinchamiento, lo que lleva a su ruptura (Hüser y Blatter, 1999). Además, el aumento de la permeabilidad mitocondrial favorece la muerte celular apoptótica y necrótica por un rápido agotamiento de ATP (Azzi y Azzone, 1965). En la ruptura de la MEM, se fugan factores inductores de muerte celular como el citocromo cyt C y el factor inductor de apoptosis (AIF) del espacio intermembranal desencadenando la señal de apoptosis. La apertura del mPTP se ha asociado con varias condiciones patológicas como enfermedades neurodegenerativas, incluida la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) (Sun et al. 2019), la enfermedad de Parkinson (Iravanpour et al. 2021), la encefalopatía hipóxico-isquémica (Chen et al. 2021) y la enfermedad de Alzheimer (Du et al. 2008), el daño en el corazón por isquemia-reperfusión (Zhong et al. 2008; Halestrap, 2010), daño hepático por hígado graso (Li et al. 2021), daño por toxicidad por acetaminofen (Ramachandran et al. 2020), por mencionar algunos ejemplos.

5.9 REVERSIBILIDAD DE LA APERTURA DEL mPTP

A pesar de los efectos deletéreos de la apertura del mPTP sobre la función mitocondrial y la integridad estructural, la función fisiológica del mPTP se reconoce cada vez más. La apertura del mPTP presenta dos posibilidades: una apertura irreversible o permanente y una apertura transitoria o parpadeante a corto plazo. El estado abierto permanente conduce a la apoptosis y muerte celular, mientras que

el estado abierto transitorio a corto plazo probablemente tenga un papel fisiológico (Pérez y Quintanilla, 2017). Este estado ha sido propuesto como un mecanismo de liberación de calcio y disminución de la producción de ERO, necesarios para una regulación metabólica adecuada, así como también en la diferenciación celular (Hom et al. 2011; Folmes et al. 2012; Vega-Naredo et al. 2014) (Figura 5).

La aplicación de métodos electrofisiológicos a las membranas mitocondriales ha proporcionado un nuevo y ventajoso punto de vista sobre el PTP donde los enfoques electrofisiológicos pueden proporcionar información sobre la presencia de subestados, la cinética de operación del poro (por ejemplo, los tiempos medios abiertos o cerrados), los efectos cooperativos, el comportamiento del poro en rangos de voltaje no fisiológicos, la densidad de poros activos en la membrana, etc. (Giorgio et al. 2009; Pérez y Quintanilla, 2017). El PTP puede considerarse operativamente como un canal desde un punto de vista electrofisiológico, porque muestra frecuentes transiciones de apertura o cierre de tamaño completo, que son incompatibles con la presencia de dos o más canales independientes, como consecuencia, los niveles de conductancia inferiores a los máximos se consideran subestados. El PTP es impulsado a residir en estados cerrados de larga duración por voltajes negativos (es decir, fisiológicos). Sin embargo, siempre que esté abierto, en el rango de voltaje negativo, el canal muestra una fuerte preferencia por el estado de conductancia más alto. Sin embargo, el poro también puede presentar aperturas moderadas y transitorias (Hurst et al. 2017; Mnatsakanyan et al. 2017). (Figura 5).

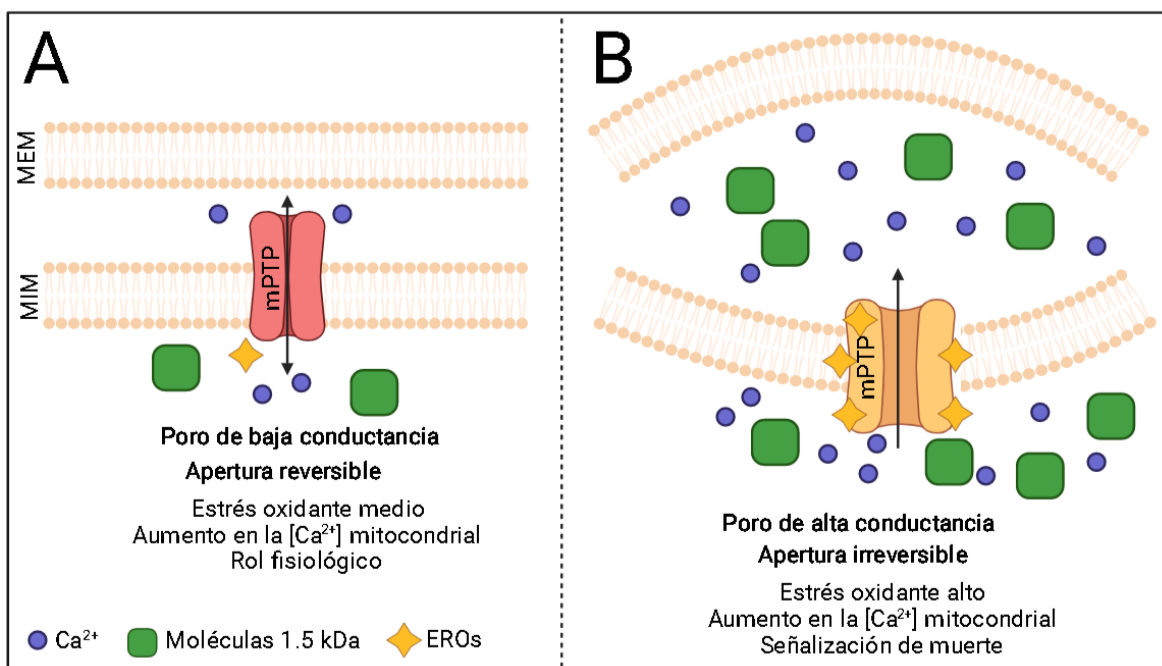


Figura 6 **Modos de apertura propuestos para el mPTP.** A) Modelo de apertura transitoria del poro, en este estado es posible la reversibilidad. Los eventos de apertura son moderados y evitan la sobrecarga de Ca^{2+} en la matriz mitocondrial. B) Modelo de apertura permanente. Los eventos de apertura aumentan duración, permitiendo la salida de los metabolitos, provocando un decremento del potencial de membrana y promoviendo el hinchamiento mitocondrial, lo que ocasiona la muerte celular. Imagen modificada de (Morciano et al. 2021).

Hay evidencia de la apertura fisiológica del mPTP en diversos modelos (Crompton, 1999; Hausenloy et al. 2004, 2010; Korge et al. 2011). Se ha observado una asociación entre la apertura transitoria de mPTP y los "destellos de superóxido" en las mitocondrias del músculo estriado (Wang y Sheu, 2020), donde el decaimiento del potencial transmembranal se da a la par de una producción elevada de O_2^- . Además, se ha propuesto que la apertura transitoria del mPTP puede liberar Ca^{2+} de la matriz mitocondrial para mantener la homeostasis mitocondrial (Altschuld et al. 1992; Hurst et al. 1992; Takeuchi et al. 2015; Biasutto et al. 2016; Hurst et al. 2016).

Estudios recientes también han destacado un papel crucial del mPTP en el desarrollo cardíaco y cerebral, como un mecanismo de activación que subyace a la diferenciación, lo que implicaría una interrelación entre la señalización genética y metabólica (Folmes et al. 2012; Folmes et al. 2012; Pérez y Quintanilla, 2017). La apertura transitoria del mPTP regula directamente el metabolismo energético celular y posiblemente promueve la diferenciación de cardiomiocitos (Folmes et al. 2012). Se demostró que la apertura del mPTP en el desarrollo del corazón en etapas embrionarias es crucial, pues los miocitos exhiben alta producción de EROs y eventos de apertura del mPTP. La inhibición de la apertura de mPTP con ciclosporina A condujo a la disminución de los niveles de EROs intracelulares lo que aceleró la diferenciación de miocitos (Hom et al. 2011). El parpadeo del TPP también ha sido relacionado con la activación de neutrófilos y la liberación de EROs (Vorobjeva et al. 2020).

La mayoría de los experimentos que abordan el papel del mPTP en la homeostasis del Ca^{2+} utilizan ciclosporina A, que presenta problemas inherentes a su especificidad. En particular, el efecto inhibitorio de la ciclosporina A depende del nivel de expresión de CypD (Bernardi et al. 2015). La capacidad inhibitoria de la ciclosporina A puede variar significativamente, con diferencias conocidas en la sensibilidad a la ciclosporina A en diferentes tejidos; por ejemplo, los fibroblastos NIH3T3 y las células HL60 no son sensibles a este inhibidor (Li et al. 2012). Por lo tanto, el papel de las funciones mPTP medidas exclusivamente con ciclosporina A, no son adecuadas y es necesario el estudio con otros efectores.

Aunque el mecanismo exacto responsable de las aperturas transitorias aún no está claro, las funciones fisiológicas de la PT se han asociado con el metabolismo, el envejecimiento, la cicatrización de heridas y un papel esencial en la diferenciación celular (Dumas et al. 2009; Korge et al. 2011; Lu et al. 2016; Mnatsakanyan et al. 2017; Agarwal et al. 2017; Boyman et al. 2019).

6 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La reversibilidad del mPTP ha sido estudiada principalmente en tejido cardiaco y tejido muscular (Lu et al. 2016; Boyman et al. 2019). Estos estudios se han llevado a cabo con Ca^{2+} , EGTA y CsA (Crompton et al. 1987; Racay, 2008; Vay et al. 2009). Sin embargo, no se sabe si otros tejidos que son más vulnerables a la isquemia presentan aperturas transitorias (Zoratti y Szabò, 1995). Por lo anterior, decidimos analizar el efecto de efectores de apertura y cierre como el Ca^{2+} y el EGTA en mitocondrias de hígado y medir el tiempo máximo que puede permanecer abierto el mPTP sin perder su reversibilidad.

7 HIPÓTESIS

Si la mitocondria del hígado tiene un poro de transición similar a otros tejidos murinos, entonces su apertura debe ser promovida por calcio y su reversibilidad se perderá conforme avance el tiempo de incubación.

8 OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Estudiar la transición de la permeabilidad en mitocondrias de hígado y compararla con lo reportado en otros tejidos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ En hígado de rata, evaluar los efectos del Ca^{2+} y del EGTA sobre el consumo de oxígeno mitocondrial y su relación con la apertura del mPTP.
- ❖ Evaluar la apertura y cierre del mPTP mediante el potencial de membrana mitocondrial.
- ❖ Determinar si el hinchamiento mitocondrial se modula por la apertura y cierre del mPTP.
- ❖ Evaluar si el tiempo de incubación del mPTP tiene efectos sobre la reversibilidad de su apertura.

9 MATERIALES Y MÉTODOS

9.1 MATERIAL BIOLÓGICO Y REACTIVOS QUÍMICOS.

Se utilizaron ratas Wistar macho de 200 g provenientes del bioterio del Instituto de Fisiología Celular (IFC, UNAM). Los animales recibieron cuidado humanitario y fueron utilizados de acuerdo con los lineamientos institucionales, el protocolo fue aprobado por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del Instituto de Fisiología Celular (SUV124-19) y la Norma Oficial Mexicana (NORM-062- ZOO-1999). Los animales fueron alimentados *ad libitum* y alojados en condiciones controladas ($22 \pm 2^\circ\text{C}$, 50-60% de humedad relativa y ciclos de luz-oscuridad de 12 h).

Los reactivos utilizados fueron de grado analítico. Manitol, MES hidratado, D- Galactosa, TEA (trietanolamina), ADP, ATP, safranina-O, fueron de Sigma Chem Co. Albúmina de Suero bovino de Probulmin TM. H_3PO_4 , KCl fueron de J.T. Baker.

9.2 AISLAMIENTO DE MITOCONDRIAS

La rata se sometió a ayuno de 12 h. Se sacrificó y se extrajo el hígado que se introdujo en un vaso de precipitados con un buffer de sacarosa 250 mM, Tris 10 mM, EDTA 1 mM a pH 7.4 a 4°C . El hígado se cortó en pequeños fragmentos que se homogeneizaron en un homogeneizador de teflón Potter-Elvehjem. De aquí, las mitocondrias fueron aisladas por centrifugación diferencial. El homogeneizado se centrifugó a 1000 xg durante 5 min a 4°C para sedimentar restos celulares y células integras. El sobrenadante fue centrifugado nuevamente a 10,000 xg durante 10 min a 4°C para sedimentar las mitocondrias (este paso fue repetido 2 veces) utilizando el buffer de sacarosa 250 mM, Tris 10 mM, EDTA 20 mM a pH 7.4 (Gutiérrez-Aguilar et al. 2014). Posteriormente se realizó una cuantificación proteica por el método de Biuret (Gornall et al. 1949). Se utilizó una concentración final de 1 mg de proteína mitocondrial /mL.

9.3 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA

Se determinó la concentración de proteína por el método de Biuret (Gornall et al. 1949) en un espectrofotómetro Beckman DU-50 a 540 nm. A 2 mL del reactivo de biuret se le adicionaron 125 μ L de desoxicolato de sodio (DAO) 5%, 350 μ L de agua destilada y 25 μ L de la muestra.

9.4 CONSUMO DE OXÍGENO

Para evaluar la calidad de la preparación de mitocondrias se determinó su control respiratorio (CR). Este parámetro es el cociente entre la velocidad del consumo mitocondrial de oxígeno en estado fosforilante (estado III) y la velocidad del consumo de oxígeno en reposo (estado IV). Una preparación de mitocondrias se consideró adecuada si el valor del CR era superior a 5. El consumo de oxígeno se determinó usando un electrodo tipo Clark conectado a un oxímetro (Strathkelvin Instruments 782) acoplado a una computadora para la adquisición de datos. La cámara de reacción (1 mL) se mantuvo a 30°C y en agitación constante con una barra magnética. Se utilizó como medio de respiración buffer de sacarosa 250 mM, Tris 10 mM, pH 7.4, fosfato inorgánico 0.1 mM y succinato 10 mM. La concentración de mitocondrias empleadas fue de 0.5 mg/mL.

9.5 POTENCIAL TRANSMEMBRANAL ($\Delta\Psi$)

El potencial transmembranal se determinó con el colorante catiónico naranja de safranina (Safranina-O) (Akerman y Wikström, 1976). Los cambios de absorbancia se siguieron en un espectrofotómetro de doble haz (Aminco/Olis DW

2000) en modo dual a 511-533 nm a temperatura ambiente. Al generar el potencial transmembranal la diferencia de absorbancia se incrementa. Se utilizó el buffer KCl 125 mM, HEPES 10 mM, Succinato 10 mM, Fosfato 5 mM, Safranina-O 10 μ M y 1 mg/mL de mitocondrias, en un volumen final de 2 mL. En esta condición se adicionaron los dos efectores de apertura y cierre del mPTP: Ca^{2+} y EGTA en diferentes concentraciones y tiempos (indicado en cada figura). Al final de cada trazo, el colapso en $\Delta\Psi$ fue inducido por la adición de CCCP 6 μ M.

9.6 HINCHAMIENTO MITOCONDRIAL

El hinchamiento mitocondrial “activo” mediado por KCl (Pérez-Vázquez et al. 2003) se evaluó mediante el cambio de absorbancia a 540 nm en un espectrofotómetro Aminco DW2000 en modo split a temperatura ambiente y equipado con un agitador magnético. La mezcla de reacción fue KCl 125 mM, HEPES 10 mM, Succinato 10 mM, Fosfato 5 mM y 1 mg/mL de mitocondrias; volumen final 2 mL. Una vez que las mitocondrias se estabilizaron, se promovió el hinchamiento mitocondrial añadiendo KCl 20 mM a la mezcla de reacción. Se adicionaron los dos efectores de apertura y cierre del mPTP: Ca^{2+} y EGTA en diferentes concentraciones y tiempos indicado en cada figura.

10 RESULTADOS

El Ca^{2+} modula la transición de la permeabilidad en mitocondrias de mamífero. El aumento de las concentraciones de Ca^{2+} en la matriz mitocondrial promueve la apertura del poro (Bauer y Murphy, 2020) por lo que el mPTP se cierra

tras la adición de un quelante de Ca^{2+} . (Crompton et al. 1987). Basándose en lo anterior, se determinó el tiempo que puede permanecer abierto el mPTP sin perder reversibilidad, midiendo el consumo de oxígeno, el potencial transmembranal y el hinchamiento mitocondrial.

10.1 LA ADICIÓN DE Ca^{2+} Y EGTA MODULAN EL CONSUMO DE OXÍGENO.

Se sabe que la apertura del mPTP aumenta el consumo de oxígeno, debido a que es un tipo de desacoplamiento fisiológico (Demine et al. 2019). Es por eso por lo que se midió el consumo de oxígeno en mitocondrias aisladas de hígado de rata, se utilizó succinato como sustrato y oligomicina para inhibir la fosforilación del ADP; se evaluaron los efectos del Ca^{2+} como efector de apertura y del EGTA como quelador del catión. En la figura 6 se muestra un trazo representativo del consumo de oxígeno en estado 4 (la tasa de consumo de oxígeno en ausencia de ADP). Como se puede observar, el consumo de oxígeno de las mitocondrias fue constante (Figura 6 línea negra). Después de 30 seg se adicionó un pulso de 30 μM de Ca^{2+} al medio de reacción (figura 6 línea roja) y se observó aumento del consumo de oxígeno, indicando que el mPTP se abrió. Esto concuerda con estudios anteriores donde al abrirse el mPTP, se pierde el ΔpH^+ , y se fugan moléculas pequeñas, hasta de 1.5 kDa (Jung et al. 1997; Briston et al. 2017), la CTE aumenta su actividad en respuesta a la caída del $\Delta\Psi$ (Dumas et al. 2009; Kharechkina et al. 2021). Una vez abierto el poro, pasados 30 seg se adicionó un pulso de EGTA 30 μM (Figura 6 línea azul), que es un quelante de Ca^{2+} , y se observó que este eliminó la aceleración del consumo de oxígeno. Este resultado sugiere que el EGTA cerró el mPTP.

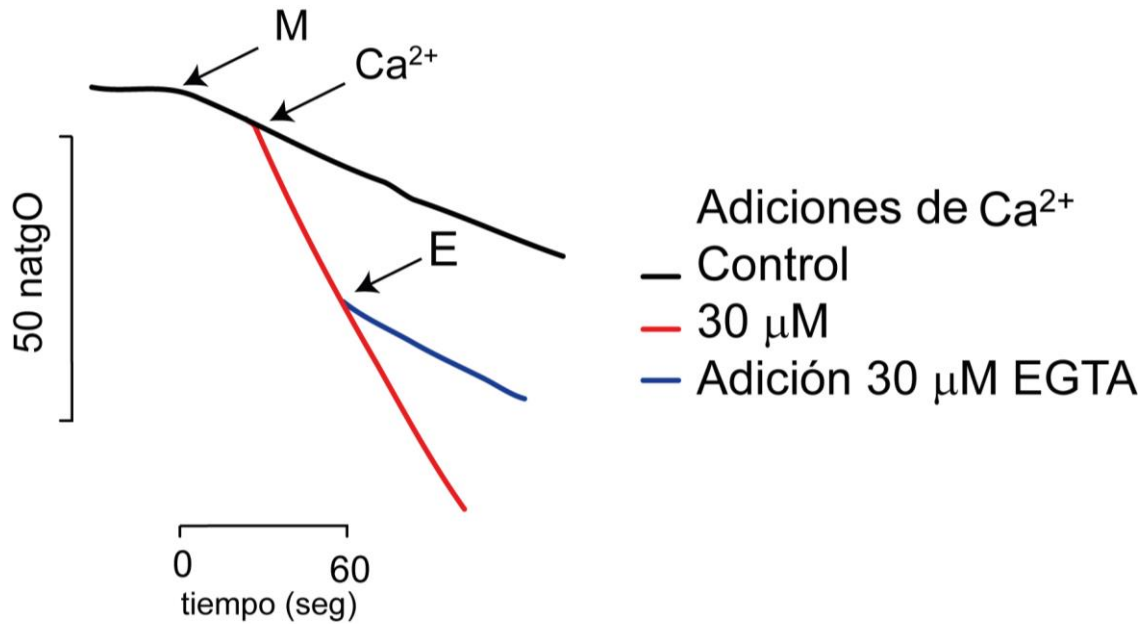


Figura 7 **El Ca²⁺ y el EGTA modulan el consumo de oxígeno**. Al adicionar las mitocondrias (M) en el estado 4 (línea negra) se adicionó Ca²⁺ (línea roja). A esta misma condición se adicionó EGTA y se monitoreó el consumo de oxígeno basal (línea azul) en un oxímetro tipo Clark (Strathkelvin Instruments 782). Condiciones experimentales: Sacarosa 250 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 7.4, succinato 20 mM, Pi 5 mM, oligomicina 4 µg/mg, volumen final 1 mL. Línea negra: 0 Ca²⁺, línea roja: 30 µM de Ca²⁺, línea azul: 30 µM EGTA. Trazo representativo. n=3

10.2 EL CAMBIO DEL $\Delta\Psi$ EN LAS MITOCONDRIAS DEPENDE DE LA [Ca²⁺] AÑADIDA

Otro ensayo utilizado para evaluar la TP es el potencial transmembranal ($\Delta\Psi$), donde un potencial de membrana estable indica que el mPTP se encuentra cerrado y su caída indica la apertura del poro (Hüser y Blatter, 1999). En la figura 7, se muestra un trazo representativo del $\Delta\Psi$. Sin adicionar Ca²⁺, el $\Delta\Psi$ se mantuvo estable hasta que se abatió con el desacoplante CCCP (Figura 7 línea negra continua). Para probar el efecto del Ca²⁺ sobre el $\Delta\Psi$ se añadieron diferentes concentraciones del catión en el medio de reacción. A bajas concentraciones de

Ca²⁺: 10, 20 y 30 μM (líneas lila, verde y rojo respectivamente), la caída del ΔΨ fue lenta, por el contrario, la caída del ΔΨ se aceleró con 50 y 100 μM de Ca²⁺ (líneas amarilla y gris respectivamente), indicando que el poro se abrió. Este resultado confirma lo publicado por otros autores en el sentido de que el mPTP es sensible a diferentes concentraciones de Ca²⁺ (Bernardi et al. 1992; Kim et al. 2003; Bernardi, 2020).

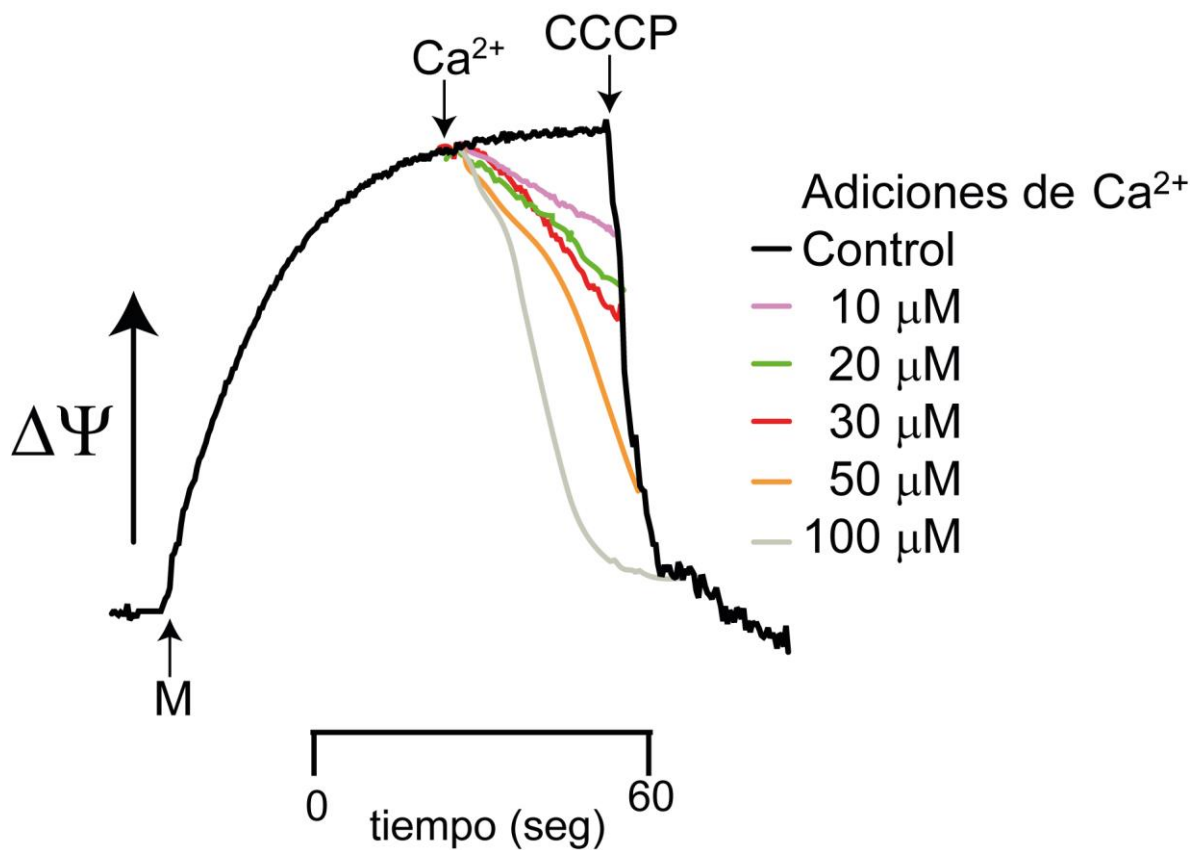


Figura 8 **Efecto de diferentes concentraciones de Ca²⁺ sobre el ΔΨ en las mitocondrias de hígado de rata.** Se adicionaron diferentes concentraciones de Ca²⁺ (0 a 100 μM) y se observó el efecto sobre el ΔΨ en un espectrofotómetro de doble haz (Aminco/Olis DW 2000). Condiciones experimentales: Sacarosa 250 mM, Pi 5 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 7.4, succinato 20 mM, KCl 20 mM, Safranina-O 50 μM, volumen final 2 mL. Para cada trazo: Línea negra: 0 Ca²⁺, línea lila: Ca²⁺ 10 μM, línea verde: Ca²⁺ 20 μM, línea roja: Ca²⁺ 30 μM, línea amarilla: Ca²⁺ 50 μM y línea gris: Ca²⁺ 100 μM. Trazo representativo. n=3

10.3 EL $\Delta\Psi$ ES ESTABILIZADO AL QUELAR EL Ca^{2+} .

Una vez establecido que el Ca^{2+} promueve la apertura del poro de mitocondrias de hígado de rata acelerando el consumo de oxígeno y abatió el $\Delta\Psi$, se evaluó el efecto del quelante de Ca^{2+} , EGTA sobre el $\Delta\Psi$ (Figura 8). El potencial de membrana se mantuvo estable en ausencia de Ca^{2+} , indicando que el mPTP estaba cerrado (Figura 8 línea negra). Al adicionar 30 μM Ca^{2+} , disminuyó el $\Delta\Psi$ (Figura 8 línea gris) indicando que la apertura del mPTP. Para revertir la apertura del poro, se adicionó EGTA: 30, 60 y 90 μM (líneas azul, verde y rojo respectivamente), observando una caída proporcional del $\Delta\Psi$. que se abatió por completo con CCCP. Estos resultados sugirieren que la apertura del mPTP es reversible pues se cerró por segunda vez.

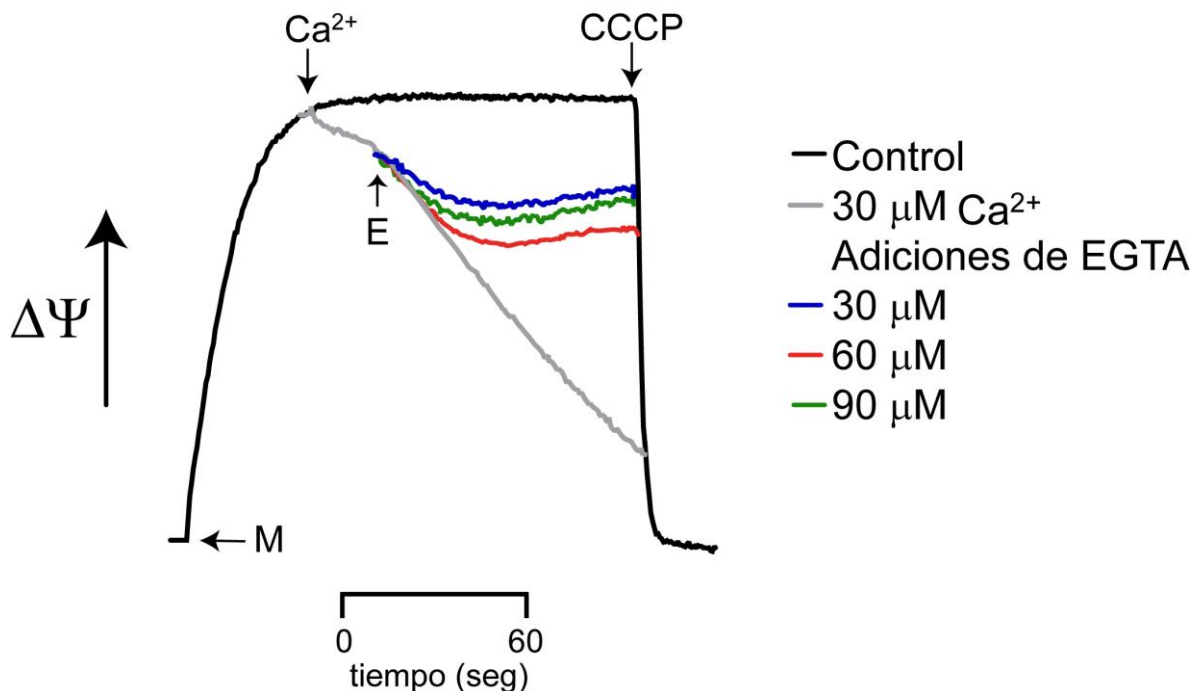


Figura 9 **Recuperación del $\Delta\Psi$ de las mitocondrias de hígado de rata al adicionar EGTA.** Se adicionaron diferentes concentraciones de EGTA (E) y se midió su efecto sobre el $\Delta\Psi$. Condiciones experimentales: Sacarosa 250 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 7.4, succinato 20 mM, KCl 20 mM, Safranina-O 50 μM , Pi 5 mM, volumen final 2 mL. Los experimentos fueron: Línea negra: 0 Ca^{2+} sin

EGTA, línea gris: 30 μM Ca^{2+} sin EGTA, línea azul: 30 μM Ca^{2+} y 30 μM EGTA, línea roja: 30 μM Ca^{2+} y 60 μM EGTA y línea verde: 30 μM Ca^{2+} y 90 μM EGTA. Trazo representativo. n=3.

10.4 UNA SEGUNDA ADICIÓN DE Ca^{2+} PROVOCA UNA SEGUNDA DISMINUCIÓN DEL $\Delta\Psi$

Los estudios sobre reversibilidad de la apertura del mPTP en mitocondrias aisladas se han enfocado en evaluar la apertura/cierre de éste, habiéndose prestado muy poca atención a la posible reversibilidad de apertura y cierre del mPTP (Lu et al. 2016; Boyman et al. 2019). Nos interesó por ello, saber si el mPTP puede abrirse y cerrarse alternativamente. Con diferentes concentraciones de Ca^{2+} se monitoreó el $\Delta\Psi$ mitocondrial; sin Ca^{2+} en el medio, se mantuvo un $\Delta\Psi$ estable (Figura 9 línea negra) hasta que se abatió con CCCP, esto indicó que el mPTP se encuentra cerrado. Al adicionar un pulso de Ca^{2+} 30 μM , disminuyó el $\Delta\Psi$ (Figura 9 línea gris), indicando que se abrió el poro. A los 30 seg, se adicionó EGTA 30 μM (Figura 9 línea azul) y se observó que se detuvo la caída del $\Delta\Psi$, indicando que el mPTP se cerró. Recordando que el aumento de Ca^{2+} permite la apertura del poro (Figura 7), se adicionó un segundo pulso con diferentes concentraciones de Ca^{2+} . El decaimiento de $\Delta\Psi$ observado fue proporcional a la $[\text{Ca}^{2+}]$, pues a 30 μM fue más lenta la caída del potencial que la obtenida con las concentraciones altas (50 y 70 μM , Figura 9 líneas amarilla y fucsia respectivamente), donde el decaimiento del $\Delta\Psi$ fue más rápido. Este resultado sugiere que el mPTP puede abrir y cerrarse alternativamente al adicionar en secuencia Ca^{2+} y EGTA, además de indicar una apertura transitoria y no permanente en mitocondrias de hígado de rata.

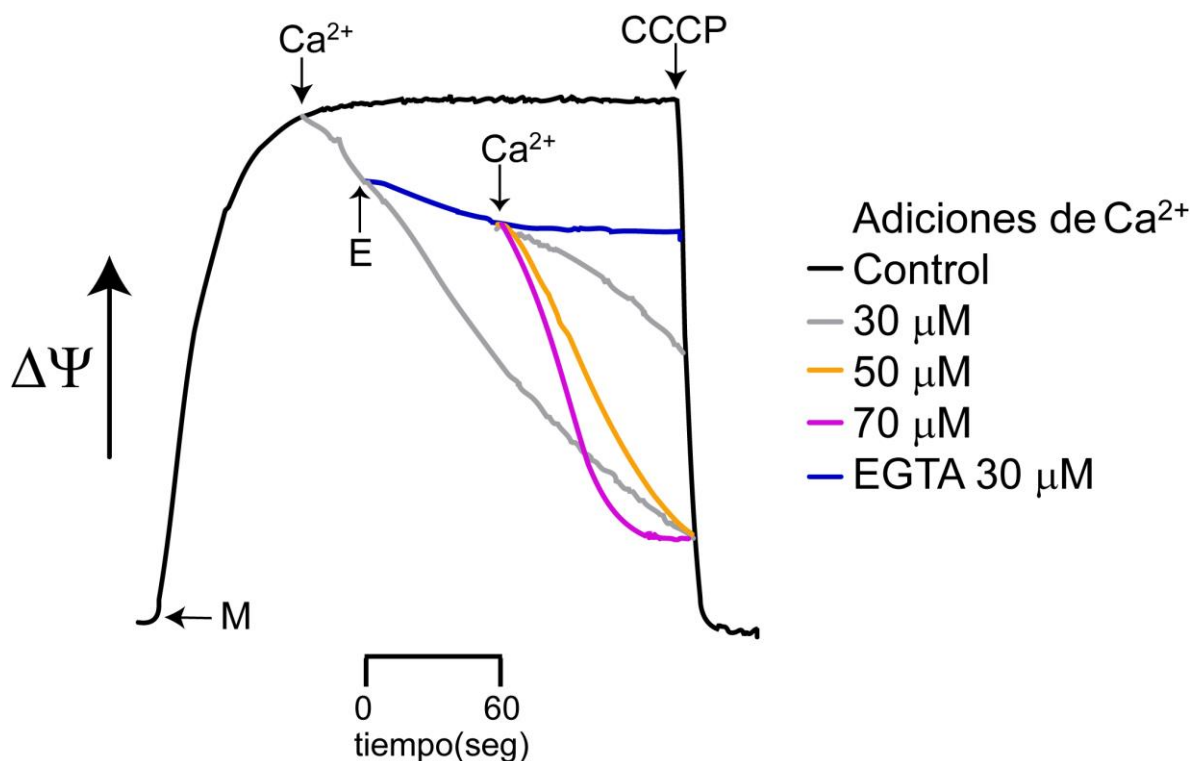


Figura 10 **Reapertura del mPTP con diferentes concentraciones de Ca²⁺**. Se llevó a cabo una segunda adición de Ca²⁺ y se midió su efecto sobre el $\Delta\Psi$. Condiciones experimentales: Sacarosa 250 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 7.4, succinato 20 mM, KCl 20 mM, Safranina-O 50 μ M, Pi 5 mM, volumen final 2mL. Para cada trazo: Línea negra: 0 Ca²⁺ sin EGTA, línea gris: 30 μ M Ca²⁺, línea azul fuerte: 30 μ M Ca²⁺ y 30 μ M EGTA; segunda adición de Ca²⁺: línea gris: Ca²⁺ 30 μ M, línea naranja: Ca²⁺ 50 μ M, línea fucsia: Ca²⁺ 70 μ M. Trazo representativo. n=3

10.4 EL TIEMPO DE APERTURA DEL mPTP AFECTA LA REVERSIBILIDAD DEL PROCESO.

En mitocondrias de hígado de rata hay reversibilidad en la apertura del mPTP (Becker et al. 1980; Akopova, 2001), no obstante, no se conoce el tiempo máximo que puede permanecer abierto el poro sin perder la reversibilidad. Lu et al. (2016) realizaron una estimación en cardiomiocitos de ratón, donde plantearon el tiempo probable para que se puedan dar las aperturas transitorias y propusieron que éste

debe permanecer abierto más de 60 segundos (Lu et al. 2016). Monitoreando el $\Delta\Psi$ con los cambios de absorbancia de la safranina-O, en ausencia de Ca^{2+} (Figura 10 línea negra) el potencial se mantuvo estable, hasta que se abatió con CCCP. Al adicionar un pulso de Ca^{2+} 30 μM a los 50 seg, el $\Delta\Psi$ comenzó a disminuir (Figura 10 línea gris) hasta que se abatió por completo sin adicionar CCCP, lo que indicó un estado de apertura permanente del poro. En la misma condición de poro abierto (30 μM Ca^{2+}), se adicionó un pulso de EGTA 30 μM a diferentes tiempos: 15, 30 segundos, 2, y 4 min (Figura 10 líneas verde, rojo, azul y morado respectivamente). Se encontró que el tiempo que dura el mPTP abierto es de vital importancia; con la adición de EGTA a los 15 y 30 segundos, se detuvo la caída del $\Delta\Psi$ indicando que el mPTP se cerró. Sin embargo, cuando el poro permaneció abierto por más tiempo (>2min), la adición de 30 μM de EGTA no detuvo la caída del $\Delta\Psi$, indicando que el mPTP se encontraba irreversiblemente abierto. Esto sugiere que el tiempo de apertura del mPTP es determinante para que ocurra una apertura transitoria.

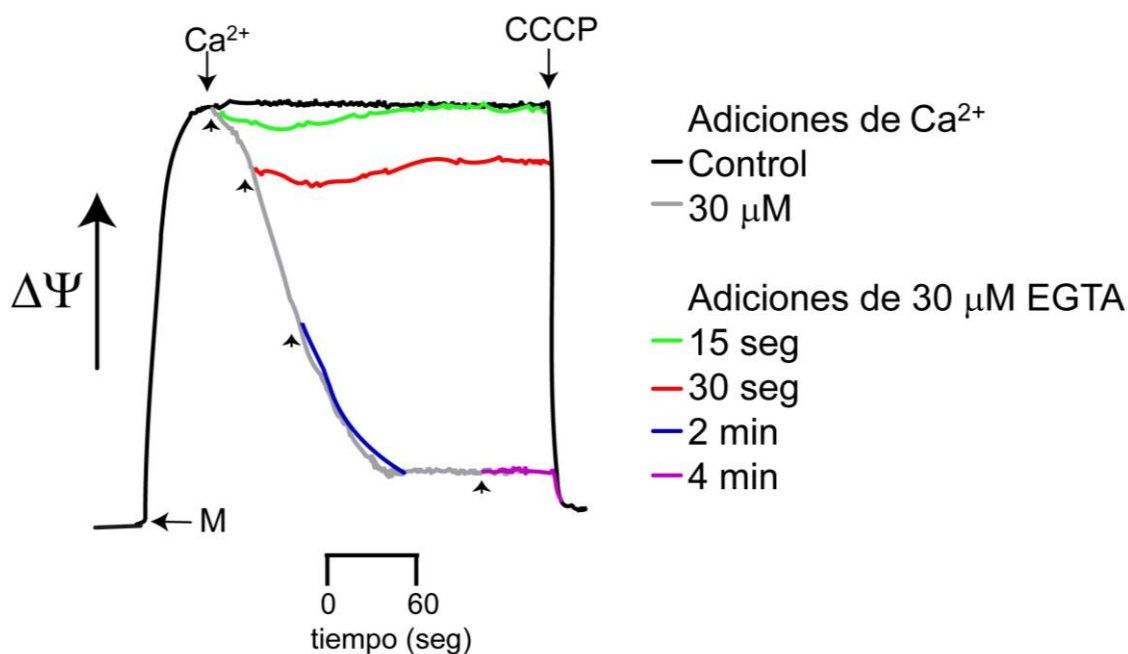


Figura 11 **El tiempo de apertura del poro afecta la reversibilidad.** Se realizó una adición de EGTA (E) en diferentes tiempos y se midió su efecto sobre el $\Delta\Psi$. Condiciones experimentales: Sacarosa 250 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 7.4, succinato 20, KCl 20 mM, Safranina-O 50 μM , Pi 5 mM, volumen final 2 mL. Los experimentos fueron: Línea negra: 0 Ca^{2+} , línea gris, verde, roja, azul y morada: 30

$\mu\text{M Ca}^{2+}$. Posteriormente, a diferentes tiempos; adiciones de $30 \mu\text{M EGTA}$: línea verde (15 segundos), línea roja (30 segundos), línea azul (2 min) y línea morada (4 min). Trazo representativo. $n=3$.

10.5 EL HINCHAMIENTO MITOCONDRIAL SE INDUCE CON Ca^{2+} Y SE DETIENE CON EGTA

Las mitocondrias se comportan como osmómetros, es decir, cuando aumenta la concentración de solutos en su interior captan agua para compensar el aumento en la presión osmótica y viceversa, si pierden osmolitos, exportan agua y se contraen (Halestrap y Davidson, 1990). El hinchamiento-deshinchamiento mitocondrial pueden seguirse espectrofotométricamente, porque la mitocondria hinchada se vuelve transparente y la turbidez de la suspensión decrece y la apertura del mPTP provoca hinchamiento mitocondrial (Pérez-Vázquez et al. 2003). Para obtener mayor evidencia sobre la apertura transitoria del mPTP por Ca^{2+} , se llevó a cabo el ensayo de hinchamiento de las mitocondrias energizadas inducido por la adición de $\text{KCl } 20 \text{ mM}$ al medio de reacción (Fig. 11). En ausencia de Ca^{2+} , las mitocondrias mostraron hinchamiento mínimo (Figura 11 línea negra). Por otra parte, la adición de Ca^{2+} , indujo el hinchamiento mitocondrial (Figura 11 línea gris) lo que sugirió la apertura del mPTP. Posteriormente, la adición de EGTA a los 30 segundos detuvo el hinchamiento (Figura 11 línea azul), lo que corroboró el cierre del poro. Este resultado apoya la existencia de apertura reversible del mPTP en mitocondrias de hígado de rata.

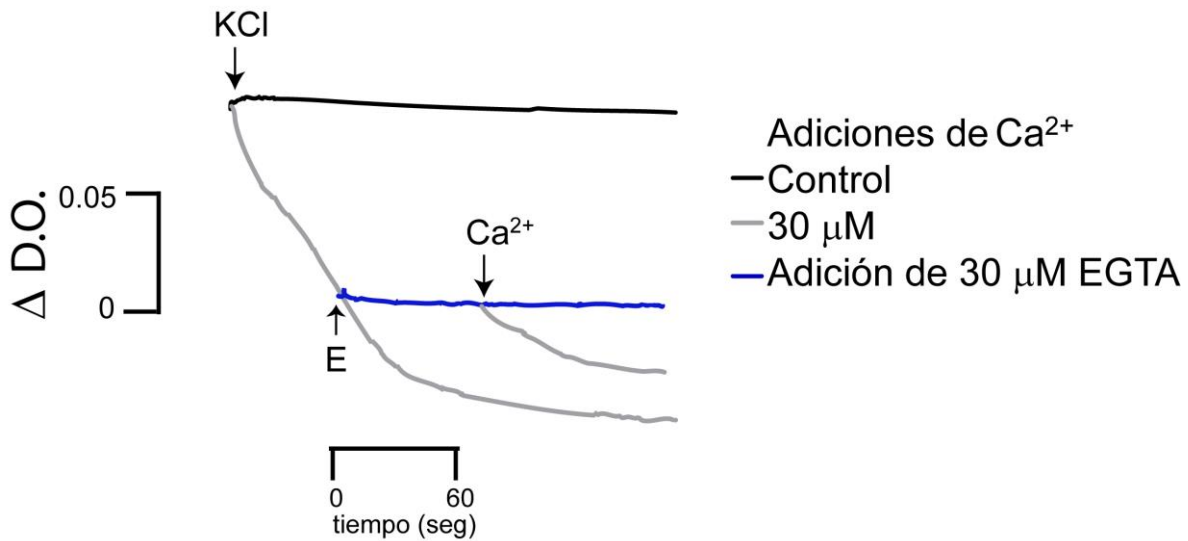


Figura 12 **Hinchamiento mitocondrial con adiciones de Ca²⁺ y EGTA.** Donde se indica, se llevaron a cabo adiciones de Ca²⁺ o de EGTA (E) (línea azul). Condiciones experimentales: Sacarosa 250 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 7.4, succinato 20 mM, KCl 20 mM, Pi 5 mM, volumen final 2 mL. Los experimentos fueron: Línea negra 0 Ca²⁺, línea gris: 30 μM Ca²⁺, Línea azul: 30 μM Ca²⁺, 30 μM EGTA. Trazo representativo. n=3.

11 DISCUSIÓN

La apertura del mPTP es un factor clave en la función fisiológica mitocondrial y en la muerte celular (Bonora et al. 2016; Carraro y Bernardi, 2016). Se ha propuesto que el mPTP posee dos modos de estado abierto: uno permanente y otro transitorio, en los que las aperturas transitorias de mPTP funcionan para la liberación de Ca²⁺ de la matriz mitocondrial, evitando la sobrecarga de este catión (Kim et al. 2003; Izzo et al. 2016; Kruglov et al. 2021). En contraste, la apertura permanente del mPTP conduce a la muerte celular, debida a la depleción de ATP y ruptura de la MEM, que permite la salida del Cyt c que a su vez constituye una señal de apoptosis.

A altas concentraciones de Ca²⁺ (el principal inductor de apertura del mPTP), ocurre la transición de la permeabilidad mitocondrial, llevando al hinchamiento mitocondrial y al colapso del gradiente electroquímico (Bernardi, 2020; Elrod y

Molkentin, 2013). En estas condiciones, se desacopla la fosforilación oxidativa, abatiéndose la síntesis de ATP y aumentando la producción de EROs (Kroemer et al. 2007; Izzo et al. 2016;).

El mantenimiento del Ca^{2+} extracelular dentro de un rango de concentración, asegura una fuente constante de Ca^{2+} para las células. La concentración extracelular es más alta (mM) de Ca^{2+} libre en comparación con la del medio intracelular (sub μM), estas variaciones en la concentración son convenientes para su función como molécula de señalización y de regulación en la célula ya que pequeños cambios en la permeabilidad de la membrana plasmática al Ca^{2+} inducidos por estímulos fisiológicos producirán fluctuaciones significativas en su concentración citosólica (Carafoli, 1987). La concentración intracelular de Ca^{2+} libre varía dependiendo del tejido y compartimento celular estudiado; por ejemplo, los eritrocitos contienen sólo 20 μM de Ca^{2+} total, los axones contienen 200-400 μM , las células del corazón 4 mM, las células del hígado 1.6 mM y las células del cerebro 1.5 mM. (Carafoli, 1987; Zoratti y Szabò, 1995; Azzolin et al. 2010; Bagur y Hajnóczky, 2017). Este cambio de concentración podría influir en la cantidad de Ca^{2+} que captan las mitocondrias y posiblemente, en la sensibilidad de apertura del mPTP.

En mitocondrias de corazón y músculo se ha podido observar que las $[\text{Ca}^{2+}]$ que inducen TP va desde 10 μM a 300 μM , concentraciones con un orden de magnitud de diferencia (Azzolin et al. 2010; Bagur y Hajnóczky, 2017). Estos tejidos están sujetos a variaciones en concentración de oxígeno frecuentes y amplias, debido al ejercicio aeróbico (Jafri et al. 2001; Giordano y Giordano, 2005;), por lo que la reversibilidad del PTP debe ser resistente y durable. Lo anterior vuelve complicado el estudio de la regulación del mPTP en estos tejidos. En cambio, en un tejido que rara vez ve cambios en el suministro de oxígeno, como el hígado, probablemente tenga una habilidad para revertir la transición de permeabilidad limitada, pues se ha demostrado que al tener cambios en la concentración de oxígeno se aumenta la producción de EROs, aumenta la $[\text{Ca}^{2+}]$ en las mitocondrias

y disminuye el $\Delta\Psi$, y se relaciona con enfermedades hepáticas (Abelmann, 1961; Becker et al. 1980; Burgess et al. 1984; Akopova, 2001; Zhong et al. 2008). Por lo que decidimos estudiar el comportamiento del mPTP en mitocondrias aisladas de hígado de rata y observamos que la reversibilidad de la apertura del PTP se pierde antes de lo reportado en la literatura para tejido cardíaco y muscular (Batandier et al. 2004; Halestrap y Pasdois, 2009; Saotome et al. 2009; Assaly et al. 2012; Lisa y Bernardi, 2015).

El aumento en el consumo de oxígeno en el estado 4, el hinchamiento mitocondrial y el abatimiento del potencial transmembranal han sido utilizados como indicadores de la apertura del poro de transición de la permeabilidad (Palmeira y Rolo, 2012). En este trabajo se demostró que una concentración de 30 μM de Ca^{2+} promueve la apertura del poro y con ello, aumentó el consumo de oxígeno en estado 4 (Figura 6). Asimismo, indujo hinchamiento mitocondrial y abatió el $\Delta\Psi$ (Fig. 7 y 11). Estos resultados son comparables con los obtenidos en otros linajes celulares como el cardíaco y muscular (Cui et al. 2009; Halestrap, 2010; Mnatsakanyan et al. 2017). Aunque esto ya se conocía, es importante resaltar que en hepatocitos de ratas la concentración de Ca^{2+} es ~ 400 nM (Coll et al. 1982) por ello, no es necesario adicionar $[\text{Ca}^{2+}]$ como en mitocondrias de cardiomiocitos, donde llega a adicionarse hasta 500 μM de calcio (Halestrap y Davidson, 1990; Vay et al. 2009).

Al aumentar la concentración de Ca^{2+} citoplásmica, las mitocondrias acumulan el calcio a favor de su gradiente electroquímico, pero deben evitar la sobrecarga de Ca^{2+} en la matriz. Se ha propuesto que en esos casos se lleva a cabo la apertura transitoria del mPTP que despolariza a la mitocondria por unos momentos con lo que el calcio es expulsado de la matriz mitocondrial (Korge et al. 2011; Izzo et al. 2016; Mnatsakanyan et al. 2017). En mitocondrias de cardiomiocitos, la apertura transitoria del mPTP ha sido mayormente estudiada (Korge et al. 2011; Mnatsakanyan et al. 2017). Sin embargo, en mitocondrias de hígado no se había explorado esta posibilidad de apertura del poro. En las figuras

9 y 11 se observó que los modos de aperturas y cierres alternativos se pueden detectar mediante la caída del $\Delta\Psi$ (Figura 9), así como como al hinchamiento mitocondrial (Figura 11). Lo anterior podría sugerir que, como se había descrito en otros tejidos, en mitocondrias de hígado de rata, el mPTP también presenta un modo de apertura transitoria (Oster et al. 2011; Wacquier et al. 2020).

Otro aspecto fundamental en el estudio del mPTP es el tiempo que puede permanecer abierto sin perder su capacidad de volver a cerrarse. Tanto en tejido cardíaco como muscular, la salida de Ca^{2+} mitocondrial va a la par de la caída del $\Delta\Psi$, indicando la apertura del mPTP; pasados 60 seg, el $\Delta\Psi$ y la homeostasis de Ca^{2+} se recupera (Crompton et al. 1987; Lu et al. 2016; Boyman et al. 2019; Wei-LaPierre et al. 2019) . Sin embargo, estos trabajos no hacen un seguimiento en el tiempo para determinar el tiempo exacto que el mPTP puede permanecer abierto y si puede tener aperturas reversibles (Lu et al. 2016). En la Figura 10, se monitoreó el $\Delta\Psi$ con el mPTP abierto y se adicionó EGTA a diferentes tiempos, se observó que se detuvo la caída del $\Delta\Psi$ hasta 1 min (Figura 10), corroborando que el mPTP presenta aperturas transitorias en mitocondrias de hígado y que el tiempo es fundamental para permanecer en este modo, pues a los 2 y 4 min, no fue posible revertir la caída del $\Delta\Psi$. Queda por investigar cuál es el motivo de la temprana irreversibilidad del mPTP de mitocondrias de hígado.

Con los resultados obtenidos en este trabajo podemos concluir que en las mitocondrias de hígado como en otros tejidos, diferentes concentraciones de Ca^{2+} modulan la apertura del mPTP y que esta apertura se puede revertir por hasta un minuto al quelar el Ca^{2+} . Por otro lado, se propone que en hígado de rata el mPTP pierde su reversibilidad antes que en tejidos como el corazón y el músculo (Figura 12).

Con los resultados obtenidos en este trabajo podemos concluir que, en las mitocondrias de hígado, como en otros tejidos, diferentes concentraciones de Ca^{2+} modulan la apertura del mPTP (Zoratti y Szabò, 1995; Assaly et al. 2012; McBride et al. 2019), sin embargo, la concentración requerida para modular la apertura es

menor (30 μM) a la utilizada con respecto al corazón y músculo (50-500 μM) (Lu et al. 2016; Boyman et al. 2019). La apertura del PTP en hígado se puede revertir por hasta un minuto al quelar el Ca^{2+} , esto es importante porque en el hígado no hay cambios de oxigenación, como los otros tejidos anteriormente mencionados (Abelmann, 1961; Zhong et al. 2008), donde pueden permanecer hasta 3 min abiertos y permanecer en un estado de apertura transitoria (Saotome et al. 2009; Turrens et al. 1982) lo que vuelve más sensible al hígado a estos cambios y se ve reflejado en la capacidad de desacoplamiento del PTP al perder su reversibilidad antes que en tejidos como el corazón y el músculo (Figura 12).

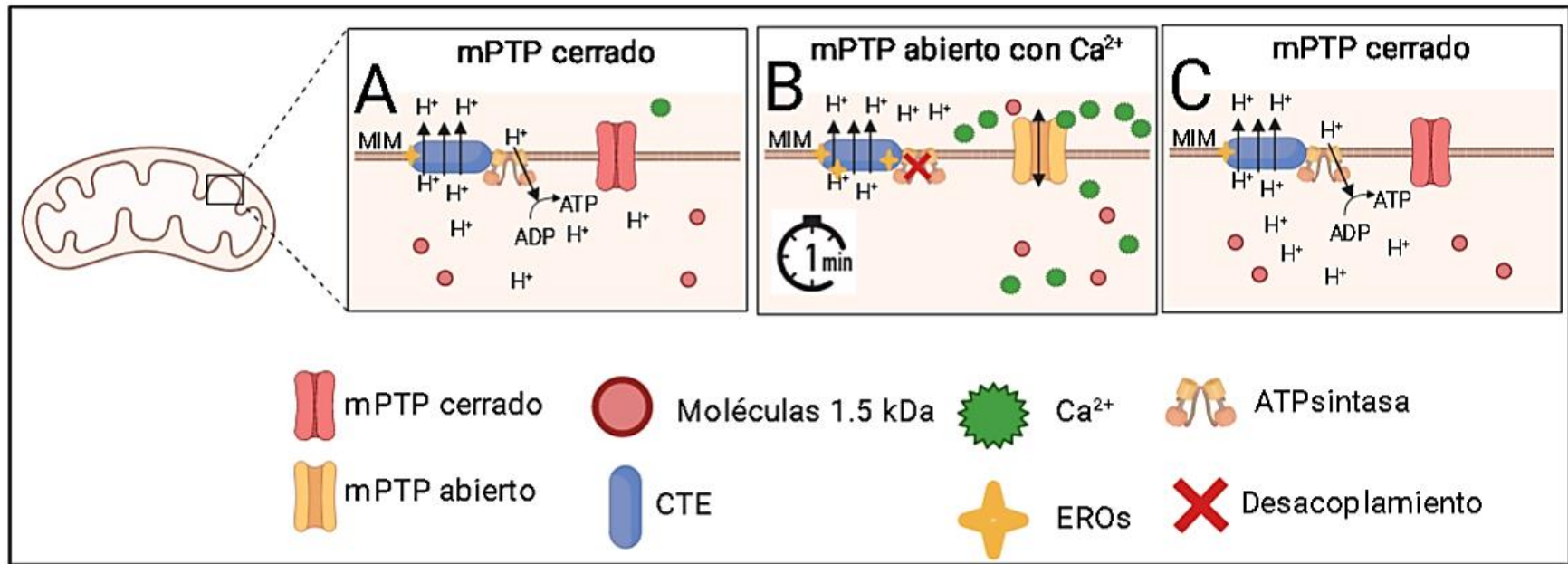


Figura 13 **Modelo propuesto para las aperturas transitorias del mPTP con Ca^{2+}** . La figura muestra un resumen gráfico de los resultados obtenidos en este trabajo. A) La OxPhos y la producción de EROs se mantienen de manera fisiológica, no hay exceso de Ca^{2+} , por lo que el mPTP está cerrado. B) Al haber aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]$ abre el mPTP lo que ocasiona aumento en el consumo de oxígeno, caída del $\Delta\Psi$ e induciendo el hinchamiento mitocondrial; este estado de apertura puede durar hasta un minuto. C) Al cerrarse el mPTP antes de un minuto, las condiciones fisiológicas se retoman, lo que demuestra el papel fisiológico del mPTP.

12 CONCLUSIONES

- ❖ El mPTP se abre y cierra con la adición consecutiva de Ca^{2+} y EGTA respectivamente.
- ❖ El tiempo que permanece abierto el mPTP es crucial para la recuperación del estado funcional de la mitocondria.
- ❖ La reversibilidad del mPTP hepático es más frágil que la reportada en corazón o en músculo.

13 PERSPECTIVAS

Sólo se evaluó el potencial de membrana a tiempos de apertura diferentes del mPTP, por lo que es necesario determinar si también en el ensayo de hinchamiento mitocondrial se obtienen estos resultados.

La concentración de Ca^{2+} requerida para inducir la TP en hígado es corta en comparación con lo reportado en corazón o en músculo. Es posible que el tiempo de apertura cambie también en otros organismos y tejidos.

Evaluar si las aperturas transitorias del mPTP se ven afectadas en estados patológicos de diversos órganos, así como en el envejecimiento o en la diferenciación y crecimiento celular.

14 REFERENCIAS

- Abelmann, W. H. (1961). Cirrhosis of the liver and decreased arterial oxygen saturation. *Archives of Internal Medicine*, 108(1), 34. <https://doi.org/10.1001/archinte.1961.03620070036005>
- Agarwal, A., Wu, P.-H., Hughes, E. G., Fukaya, M., Tischfield, M. A., Langseth, A. J., Wirtz, D., y Bergles, D. E. (2017). Transient opening of the mitochondrial permeability transition pore induces microdomain calcium transients in astrocyte processes. *Neuron*, 93(3), 587-605.e7. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.12.034>
- Åkerman, K.E.O.; Wikström, M.K.F. (1976). Safranin as a Probe of the Mitochondrial Membrane Potential. *FEBS Letters*, 68: 191–197, doi:10.1016/0014-5793(76)80434-6.
- Assaly, R., de Tassigny, A. D. A., Paradis, S., Jacquin, S., Berdeaux, A., y Morin, D. (2012). Oxidative stress, mitochondrial permeability transition pore opening and cell death during hypoxia–reoxygenation in adult cardiomyocytes. *European Journal of Pharmacology*, 675(1–3), 6–14. <https://doi.org/10.1016/J.EJPHAR.2011.11.036>
- Azzi, A., y Azzone, G. F. (1965). Swelling and shrinkage phenomena in liver mitochondria I. Large amplitude swelling induced by inorganic phosphate and by ATP. *Biochimica et Biophysica Acta - Enzymology and Biological Oxidation*, 105(2), 253–264. [https://doi.org/10.1016/S0926-6593\(65\)80150-3](https://doi.org/10.1016/S0926-6593(65)80150-3)
- Azzolin, L., von Stockum, S., Basso, E., Petronilli, V., Forte, M. A., y Bernardi, P. (2010). The mitochondrial permeability transition from yeast to mammals. *FEBS Letters*, 584(12), 2504–2509. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.04.023>
- Bagur, R., y Hajnóczky, G. (2017). Intracellular Ca²⁺ sensing: Its role in calcium homeostasis and signaling. *Molecular Cell*, 66(6), 780–788. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.05.028>
- Baines, C. P., Kaiser, R. A., Sheiko, T., Craigen, W. J., y Molkentin, J. D. (2007). Voltage-dependent anion channels are dispensable for mitochondrial-dependent cell death. *Nature Cell Biology*, 9(5), 550–555. <https://doi.org/10.1038/ncb1575>
- Barja, G. (2007). Mitochondrial oxygen consumption and reactive oxygen species production are independently modulated: Implications for aging studies. *Rejuvenation Res.* 10(2), 215–223. <https://doi.org/10.1089/rej.2006.0516>
- Batandier, C., Leverve, X., y Fontaine, E. (2004). Opening of the mitochondrial permeability transition pore Induces reactive oxygen species production at the level of the respiratory chain complex I. *Journal of Biological Chemistry*, 279(17), 17197–17204. <https://doi.org/10.1074/JBC.M310329200>

- Bauer, T. M., y Murphy, E. (2020). Role of mitochondrial calcium and the permeability transition pore in regulating cell death. *Circulation Research*, 280–293. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.119.316306>
- Becker, G. L., Fiskum, G., y Lehninger, A. L. (1980). Regulation of free Ca²⁺ by liver mitochondria and endoplasmic reticulum. *Journal of Biological Chemistry*, 255(19), 9009–9012. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)70515-8](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)70515-8)
- Bernardi, P. (2020). Mechanisms for Ca²⁺-dependent permeability transition in mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(6), 2743–2744. <https://doi.org/10.1073/pnas.1921035117>
- Bernardi, P., Rasola, A., Forte, M., y Lippe, G. (2015). The mitochondrial permeability transition pore: channel formation by F-ATP synthase, integration in signal transduction, and role in pathophysiology. *Pathophysiology. Physiol Rev*, 95, 1111–1155. <https://doi.org/10.1152/physrev.00001.2015.-The>
- Bernardi P, Vassanelli S, Veronese P, Colonna R, Szabó I, Zoratti M. (1992). Modulation of the mitochondrial permeability transition pore. Effect of protons and divalent cations. *Journal of Biological Chemistry*. 15;267(5):2934-9. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)50676-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)50676-7)
- Bonora, M., Morganti, C., Morciano, G., Giorgi, C., Wieckowski, M. R., y Pinton, P. (2016). Comprehensive analysis of mitochondrial permeability transition pore activity in living cells using fluorescence-imaging-based techniques. *Nature Protocols*, 11(6), 1067–1080. <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.064>
- Boyer, P. D. (1997). The ATP synthase—a splendid molecular machine. *Annual Review of Biochemistry*, 66(1), 717–749. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.66.1.717>
- Boyman, L., Coleman, A. K., Zhao, G., Wescott, A. P., Joca, H. C., Greiser, B. M., Karbowski, M., Ward, C. W., y Lederer, W. J. (2019). Dynamics of the mitochondrial permeability transition pore: Transient and permanent opening events. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 666, 31–39. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2019.03.016>
- Briston, T., Roberts, M., Lewis, S., Powney, B., M. Staddon, J., Szabadkai, G., y Duchen, M. R. (2017). Mitochondrial permeability transition pore: sensitivity to opening and mechanistic dependence on substrate availability. *Scientific Reports*, 7(1), 10492. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10673-8>
- Burgess, G. M., Godfrey, P. P., McKinney, J. S., Berridge, M. J., Irvine, R. F., y Putney, J. W. (1984). The second messenger linking receptor activation to internal Ca release in liver. *Nature* 1984 309:5963, 309(5963), 63–66. <https://doi.org/10.1038/309063a0>
- Bustos, P. L., Perrone, A. E., Milduberger, N. A., y Bua, J. (2017). Mitochondrial permeability transition in protozoan parasites: what we learned from Trypanosoma cruzi. *Cell Death y Disease*, 8(9), e3057. <https://doi.org/10.1038/cddis.2017.431>

- Cadenas, S. (2018). Bioenergetics Mitochondrial uncoupling , ROS generation and cardioprotection. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1859(9), 940–950. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2018.05.019>
- Carafoli, E. (1987). Intracellular Calcium Homeostasis. *Annual Review of Biochemistry*, 56(1), 395–433. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.56.070187.002143>
- Carraro, M., y Bernardi, P. (2016). Calcium and reactive oxygen species in regulation of the mitochondrial permeability transition and of programmed cell death in yeast. *Cell Calcium*, 60(2), 102–107. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2016.03.005>
- Carraro, M., Jones, K., Sartori, G., Schiavone, M., Antonucci, S., Kucharczyk, R., di Rago, J.-P., Franchin, C., Arrigoni, G., Forte, M., y Bernardi, P. (2020). The unique cysteine of F-ATP synthase OSCP subunit participates in modulation of the permeability transition pore. *Cell Reports*, 32(9), 108095. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108095>
- Coll, K. E., Joseph, S. K., Corkey, B. E., y Williamson, J. R. (1982). Determination of the matrix free Ca²⁺ concentration and kinetics of Ca²⁺ efflux in liver and heart mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, 257(15), 8696–8704. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)34184-x](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)34184-x)
- Correa, F., Soto, V., y Zazueta, C. (2007). Mitochondrial permeability transition relevance for apoptotic triggering in the post-ischemic heart. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 39(4), 787–798. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2007.01.013>
- Cortassa, S., O'Rourke, B., y Aon, M. A. (2014). Redox-Optimized ROS Balance and the relationship between mitochondrial respiration and ROS. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1837(2), 287–295. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2013.11.007>
- Cortés, P., Castrejón, V., Sampedro, J. G., y Uribe, S. (2000). Interactions of arsenate, sulfate and phosphate with yeast mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1456(2–3), 67–76. [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(99\)00109-7](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(99)00109-7)
- Crompton, M. (1999). The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochemical Journal*. 341(2), 233–249. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3410233>
- Crompton, M., Costi, A., y Hayat, L. (1987). Evidence for the presence of a reversible Ca²⁺-dependent pore activated by oxidative stress in heart mitochondria. *Biochemical Journal*. 245(3), 915–918. <https://doi.org/10.1042/bj2450915>
- Cui, J., Kaandorp, J. A., Sloot, P. M. A., Lloyd, C. M., y Filatov, M. v. (2009). Calcium homeostasis and signaling in yeast cells and cardiac myocytes. In *FEMS Yeast Research* 9(8):1137-47. doi: 10.1111/j.1567-1364.2009.00552.x

- Cui, Y., Pan, M., Ma, J., Song, X., Cao, W., y Zhang, P. (2021). Recent progress in the use of mitochondrial membrane permeability transition pore in mitochondrial dysfunction-related disease therapies. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 476(1), 493–506. <https://doi.org/10.1007/s11010-020-03926-0>
- David L. Nelson and Michael M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*. 7 Ed., Macmillan learning; New York, 2017, ISBN: 978-1-4641-2611-6.
- Demine, S., Renard, P., y Arnould, T. (2019). Mitochondrial uncoupling: A key controller of biological processes in physiology and diseases. *Cells*, 8(8), 795. <https://doi.org/10.3390/cells8080795>
- di Lisa, F., Carpi, A., Giorgio, V., y Bernardi, P. (2011). The mitochondrial permeability transition pore and cyclophilin D in cardioprotection. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1813(7), 1316–1322. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.01.031>
- Distler, A. M., Kerner, J., y Hoppel, C. L. (2008). Proteomics of mitochondrial inner and outer membranes. *Proteomics*, 8(19), 4066–4082. <https://doi.org/10.1002/pmic.200800102>
- Dumas, J. F., Argaud, L., Cottet-Rousselle, C., Vial. G., Gonzalez, C., Detaille, D., Leverve, X., y Fontaine, E. (2009). Effect of transient and permanent permeability transition pore opening on NAD(P)H localization in intact cells. *Journal of Biological Chemistry*, 284(22), 15117–15125. <https://doi.org/10.1074/jbc.M900926200>
- Elrod, J. W., y Molkentin, J. D. (2013). Physiologic functions of cyclophilin D and the mitochondrial permeability transition pore. In *Circulation Journal* (Vol. 77, Issue 5, pp. 1111–1122). Circ J. <https://doi.org/10.1253/circj.CJ-13-0321>
- Ezraty, B., Gennaris, A., Barras, F., y Collet, J.-F. (2017). Oxidative stress, protein damage and repair in bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 15(7), 385–396. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.26>
- Folmes, C. D. L., Dzeja, P. P., Nelson, T. J., y Terzic, A. (2012). Mitochondria in control of cell fate. *Circulation Research*, 110(4), 526–529. <https://doi.org/10.1161/RES.0b013e31824ae5c1>
- Giordano, F. J., y Giordano, F. J. (2005). failure Find the latest version : Review series Oxygen , oxidative stress , hypoxia , and heart failure. *The Journal of Clinical Investigation*, 115(3), 500–508. <https://doi.org/10.1172/JCI200524408.500>
- Giorgio, V., Bisetto, E., Soriano, M. E., Dabbeni-Sala, F., Basso, E., Petronilli, V., Forte, M. A., Bernardi, P., y Lippe, G. (2009). Cyclophilin D Modulates Mitochondrial F0F1-ATP Synthase by Interacting with the Lateral Stalk of the Complex. *Journal of Biological Chemistry*, 284(49), 33982–33988. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.020115>

- Giorgio, V., von Stockum, S., Antoniel, M., Fabbro, A., Fogolari, F., Forte, M., Glick, G. D., Petronilli, V., Zoratti, M., Szabo, I., Lippe, G., y Bernardi, P. (2013). Dimers of mitochondrial ATP synthase form the permeability transition pore. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(15), 5887–5892. <https://doi.org/10.1073/pnas.1217823110>
- Gnaiger, E. (2020). Mitochondrial pathways and Respiratory control. In *Bioenergetics communications* (5th ed, Vol. 2). <https://doi.org/https://doi.org/10.26124/bec:2020-0002>
- Goetzman, E. S., y Prochownik, E. v. (2018). The role for myc in coordinating glycolysis, oxidative phosphorylation, glutaminolysis, and fatty acid metabolism in normal and neoplastic tissues. *Frontiers in Endocrinology*, 9(APR). <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00129>
- Gornall, A. G., Bardawill, C. J., y David, M. M. (1949). Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *Journal of Biological Chemistry*, 177(2), 751–766. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)57021-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)57021-6)
- Guérin, B., Bunoust, O., Rouqueys, V., y Rigoulet, M. (1994). ATP-induced unspecific channel in yeast mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, 269(41), 25406–25410. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)47264-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)47264-X)
- Guerrero-Castillo, S., Araiza-Olivera, D., Cabrera-Orefice, A., Espinasa-Jaramillo, J., Gutiérrez-Aguilar, M., Luévano-Martínez, L. A., Zepeda-Bastida, A., y Uribe-Carvajal, S. (2011). Physiological uncoupling of mitochondrial oxidative phosphorylation. Studies in different yeast species. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 43(3), 323–331. <https://doi.org/10.1007/s10863-011-9356-5>
- Guo, R., Xu, X., Lu, Y., y Xie, X. (2017). Physiological oxygen tension reduces hepatocyte dedifferentiation in in vitro culture. *Scientific Reports*, 7(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06433-3>
- Gutiérrez-Aguilar, M., y Baines, C. P. (2015). Structural mechanisms of cyclophilin D-dependent control of the mitochondrial permeability transition pore. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1850(10), 2041–2047. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.11.009>
- Gutiérrez-Aguilar, M., Douglas, D. L., Gibson, A. K., Domeier, T. L., Molkentin, J. D., y Baines, C. P. (2014). Genetic manipulation of the cardiac mitochondrial phosphate carrier does not affect permeability transition. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 72, 316–325. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2014.04.008>
- Halestrap, A. P. (2010). A pore way to die: The role of mitochondria in reperfusion injury and cardioprotection. *Biochemical Society Transactions*, 38(4), 841–860. <https://doi.org/10.1042/BST0380841>

- Halestrap, A. P., y Davidson, A. M. (1990). Inhibition of Ca²⁺-induced large-amplitude swelling of liver and heart mitochondria by cyclosporin is probably caused by the inhibitor binding to mitochondrial-matrix peptidyl-prolyl cis-trans isomerase and preventing it interacting with the adenine nucle. In *Biochem. J* (Vol. 268).
- Halestrap, A. P., y Pasdois, P. (2009). The role of the mitochondrial permeability transition pore in heart disease. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1787(11), 1402–1415. <https://doi.org/10.1016/J.BBABIO.2008.12.017>
- Haworth, R. A., y Hunter, D. R. (1979). The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondria. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 195(2), 460–467. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(79\)90372-2](https://doi.org/10.1016/0003-9861(79)90372-2)
- Hinkle, P. C. (2005). P/O ratios of mitochondrial oxidative phosphorylation. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1706(1–2), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.bbatio.2004.09.004>
- Hurst, S., Hoek, J., y Sheu, S.-S. (2017). Mitochondrial Ca²⁺ and regulation of the permeability transition pore. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 49(1), 27–47. <https://doi.org/10.1007/s10863-016-9672-x>
- Hüser, J., y Blatter, L. A. (1999). Fluctuations in mitochondrial membrane potential caused by repetitive gating of the permeability transition pore. *Biochemical Journal*. 343(2), 311–317. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3430311>
- Izzo, V., Bravo-San Pedro, J. M., Sica, V., Kroemer, G., y Galluzzi, L. (2016). Mitochondrial permeability transition: New findings and persisting uncertainties. *Trends in Cell Biology*, 26(9), 655–667. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2016.04.006>
- Jafri, M. S., Dudycha, S. J., y O'Rourke, B. (2001). Cardiac energy metabolism: Models of cellular respiration. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 3(1), 57–81. <https://doi.org/10.1146/annurev.bioeng.3.1.57>
- Jastroch, M., Divakaruni, A. S., Mookerjee, S., Treberg, J. R., y Brand, M. D. (2010). Mitochondrial proton and electron leaks. *Essays in Biochemistry*, 47, 53–67. <https://doi.org/10.1042/BSE0470053>
- Jung, D. W., Bradshaw, P. C., y Pfeiffer, D. R. (1997). Properties of a cyclosporin-insensitive permeability transition pore in yeast mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, 272(34), 21104–21112. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.34.21104>
- Kadenbach, B. (2003). Intrinsic and extrinsic uncoupling of oxidative phosphorylation. In *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* (Vol. 1604, Issue 2, pp. 77–94). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(03\)00027-6](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(03)00027-6)
- Karch, J., Bround, M. J., Khalil, H., Sargent, M. A., Latchman, N., Terada, N., Peixoto, P. M., y Molkentin, J. D. (2019). Inhibition of mitochondrial permeability transition by

- deletion of the ANT family and CypD. *Science Advances*, 5(8), 1–8. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aaw4597>
- Kharechkina, E., Nikiforova, A., y Kruglov, A. (2021). NAD(H) regulates the permeability transition pore in mitochondria through an external site. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(16). <https://doi.org/10.3390/ijms22168560>
- Kim, J.-S., He, L., y Lemasters, J. J. (2003). Mitochondrial permeability transition: a common pathway to necrosis and apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 304(3), 463–470. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(03\)00618-1](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(03)00618-1)
- Knaapen, P., Germans, T., Knuuti, J., Paulus, W. J., Dijkmans, P. A., Allaart, C. P., Lammertsma, A. A., y Visser, F. C. (2007). Myocardial energetics and efficiency. *Circulation*, 115(7), 918–927. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.660639>
- Kokoszka, J. E., Waymire, K. G., Levy, S. E., Sligh, J. E., Cai, J., Jones, D. P., MacGregor, G. R., y Wallace, D. C. (2004). The ADP/ATP translocator is not essential for the mitochondrial permeability transition pore. *Nature*, 427(6973), 461–465. <https://doi.org/10.1038/nature02229>
- Korge, P., Yang, L., Yang, J. H., Wang, Y., Qu, Z., y Weiss, J. N. (2011). Protective role of transient pore openings in calcium handling by cardiac mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, 286(40), 34851–34857. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.239921>
- Kroemer, G., Galluzzi, L., y Brenner, C. (2007). Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiological Reviews*, 87(1), 99–163. <https://doi.org/10.1152/physrev.00013.2006>
- Kruglov, A. G., Kharechkina, E. S., Nikiforova, A. B., Odinkova, I. v., y Kruglova, S. A. (2021). Dynamics of the permeability transition pore size in isolated mitochondria and mitoplasts. *The FASEB Journal*. 35(8), 1–16. <https://doi.org/10.1096/fj.202100596R>
- Kühlbrandt, W. (2015). Structure and function of mitochondrial membrane protein complexes. *BMC Biology*, 13(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12915-015-0201-x>
- Leiva, F. P., Garcés, C., Verberk, W. C. E. P., Care, M., Paschke, K., y Gebauer, P. (2018). Differences in the respiratory response to temperature and hypoxia across four life-stages of the intertidal porcelain crab *Petrolisthes laevigatus*. *Marine Biology*, 165(9), 1–10. <https://doi.org/10.1007/s00227-018-3406-z>
- Lemeshko, V. (2018). El papel de la membrana mitocondrial externa en el control del metabolismo energético celular. *Revista de La Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 42(162), 6. <https://doi.org/10.18257/raccefyn.549>
- Lisa, F., y Bernardi, P. (2015). Modulation of mitochondrial permeability transition in ischemia-reperfusion injury of the heart. Advantages and limitations. *Current*

- Medicinal Chemistry*, 22(20), 2480–2487.
<https://doi.org/10.2174/0929867322666150530210005>
- Lu, X., Kwong, J. Q., Molkenin, J. D., y Bers, D. M. (2016). Individual cardiac mitochondria undergo rare transient permeability transition pore openings. *Circulation Research*, 118(5), 834–841. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.308093>
- Macintyre, N. R. (2014). Tissue hypoxia: Implications for the respiratory clinician. *Respiratory Care*, 59(10), 1590–1596. <https://doi.org/10.4187/respcare.03357>
- Manon, S., Roucou, X., Guérin, M., Rigoulet, M., y Guérin, B. (1998). Minireview: Characterization of the yeast mitochondria unselective channel: A counterpart to the mammalian permeability transition pore? In *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* (Vol. 30, Issue 5, pp. 419–429).
<https://doi.org/10.1023/A:1020533928491>
- Mattson, M. P., Gleichmann, M., y Cheng, A. (2008). Mitochondria in neuroplasticity and neurological disorders. *Neuron*, 60(5), 748–766.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.10.010>
- Mazat, J.-P., Devin, A., y Ransac, S. (2020). Modelling mitochondrial ROS production by the respiratory chain. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 77(3), 455–465.
<https://doi.org/10.1007/s00018-019-03381-1>
- McBride, S., Wei-LaPierre, L., McMurray, F., MacFarlane, M., Qiu, X., Patten, D. A., Dirksen, R. T., y Harper, M.-E. (2019). Skeletal muscle mitoflashes, pH, and the role of uncoupling protein-3. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 663(3), 239–248.
<https://doi.org/10.1016/j.abb.2019.01.018>
- Mitchell, P. (1961). Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature*, 191(4784), 144–148.
<https://doi.org/10.1038/191144a0>
- Mnatsakanyan, N., Beutner, G., Porter, G. A., Alavian, K. N., y Jonas, E. A. (2017). Physiological roles of the mitochondrial permeability transition pore. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 49(1), 13–25. <https://doi.org/10.1007/s10863-016-9652-1>
- Morciano, G., Naumova, N., Koprowski, P., Valente, S., Sardão, V. A., Potes, Y., Rimessi, A., Wieckowski, M. R., y Oliveira, P. J. (2021). The mitochondrial permeability transition pore: an evolving concept critical for cell life and death. *Biological Reviews*, 3. <https://doi.org/10.1111/brv.12764>
- Morelli, A. M., Ravera, S., Calzia, D., y Panfoli, I. (2019). An update of the chemiosmotic theory as suggested by possible proton currents inside the coupling membrane. *Open Biology*, 9(4). <https://doi.org/10.1098/rsob.180221>

- Nasirudeen, A. M. A., y Tan, K. S. W. (2005). Programmed cell death in *Blastocystis hominis* occurs independently of caspase and mitochondrial pathways. *Biochimie*, 87(6), 489–497. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2005.03.003>
- Nicholls, D. (2013). *Bioenergetics 4* (Nicholls, Ed.; Fourth edi). Academic Press Inc. <https://www.elsevier.com/books/bioenergetics/nicholls/978-0-12-388425-1>
- Nolfi-Donagan, D., Braganza, A., y Shiva, S. (2020). Mitochondrial electron transport chain: oxidative phosphorylation, oxidant production, and methods of measurement. *Redox Biology*, 37, 101674. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101674>
- Ong, S. B., Subrayan, S., Lim, S. Y., Yellon, D. M., Davidson, S. M., y Hausenloy, D. J. (2010). Inhibiting mitochondrial fission protects the heart against ischemia/reperfusion injury. *Circulation*, 121(18), 2012–2022. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.109.906610>
- Palmeira, C. M., y Rolo, A. P. (2012). Mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi$) fluctuations associated with the metabolic states of mitochondria. *Methods in Molecular Biology*, 810, 89–101. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-382-0_6
- Paulsen, C. E., y Carroll, K. S. (2010). Orchestrating redox signaling networks through regulatory cysteine switches. *ACS Chemical Biology*, 5(1), 47–62. <https://doi.org/10.1021/cb900258z>
- Penna, C., Perrelli, M. G., y Pagliaro, P. (2013). Mitochondrial pathways, permeability transition pore, and redox signaling in cardioprotection: therapeutic implications. *Antioxidants and Redox Signaling*, 18(5), 556–599. <https://doi.org/10.1089/ARS.2011.4459/ASSET/IMAGES/LARGE/FIGURE12.JPEG>
- Pérez, M. J., y Quintanilla, R. A. (2017). Development or disease: duality of the mitochondrial permeability transition pore. In *Developmental Biology* (Vol. 426, Issue 1, pp. 1–7). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2017.04.018>
- Pérez-Vázquez, V., Saavedra-Molina, A., y Uribe, S. (2003). In *Saccharomyces cerevisiae*, cations control the fate of the energy derived from oxidative metabolism through the opening and closing of the yeast mitochondrial unselective channel. In *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* (Vol. 35, Issue 3). <https://doi.org/https://doi.org/10.1023/A:1024659615022>
- Petronilli, V., Cola, C., y Bernardi, P. (1993). Modulation of the mitochondrial cyclosporin A-sensitive permeability transition pore. II. The minimal requirements for pore induction underscore a key role for transmembrane electrical potential, matrix pH, and matrix Ca^{2+} . *Journal of Biological Chemistry*, 268(2), 1011–1016. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)54034-5](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)54034-5)

- Phaniendra, A., Jestadi, D. B., y Periyasamy, L. (2015). Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 30(1), 11–26. <https://doi.org/10.1007/s12291-014-0446-0>
- Pilchova, I., Klacanova, K., Tatarkova, Z., Kaplan, P., y Racay, P. (2017). The involvement of Mg²⁺ in regulation of cellular and mitochondrial functions. In *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* (Vol. 2017). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2017/6797460>
- Quinlan, C. L., Perevoshchikova, I. v., Hey-Mogensen, M., Orr, A. L., y Brand, M. D. (2013). Sites of reactive oxygen species generation by mitochondria oxidizing different substrates. *Redox Biology*, 1(1), 304–312. <https://doi.org/10.1016/J.REDOX.2013.04.005>
- Racay, P. (2008). Effect of magnesium on calcium-induced depolarisation of mitochondrial transmembrane potential. *Cell Biology International*. 32(1), 136–145. <https://doi.org/10.1016/j.cellbi.2007.08.024>
- Rosas-Lemus, M., Uribe-Alvarez, C., Contreras-Zentella, M., Luévano-Martínez, L. A., Chiquete-Félix, N., Morales-García, N. L., Simón, E. E., Muhlia-Almazán, A., Escamilla-Marván, E., y Uribe-Carvajal, S. (2016). Oxygen: from toxic waste to optimal (toxic) fuel of life. In *Free Radicals and Diseases*. InTech. <https://doi.org/10.5772/63667>
- Rowe, L. A., Degtyareva, N., y Doetsch, P. W. (2008). DNA damage-induced reactive oxygen species (ROS) stress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Free Radical Biology and Medicine*, 45(8), 1167–1177. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.07.018>
- Saotome, M., Katoh, H., Yaguchi, Y., Tanaka, T., Urushida, T., Satoh, H., y Hayashi, H. (2009). Transient opening of mitochondrial permeability transition pore by reactive oxygen species protects myocardium from ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 296, 1125–1132. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00436.2008>.- Reactive
- Scarpelli, P. H., Pecenin, M. F., y Garcia, C. R. S. (2021). Intracellular Ca²⁺ signaling in protozoan parasites: An overview with a focus on mitochondria. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 22, Issue 1, pp. 1–12). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms22010469>
- Schenkel, L. C., y Bakovic, M. (2014). Formation and regulation of mitochondrial membranes. *International Journal of Cell Biology*, 2014(1), 1–13. <https://doi.org/10.1155/2014/709828>
- Scialò, F., Fernández-Ayala, D. J., y Sanz, A. (2017). Role of mitochondrial reverse electron transport in ROS signaling: potential roles in health and disease. *Frontiers in Physiology*, 8(JUN), 428. <https://doi.org/10.3389/FPHYS.2017.00428>

- Stuart, J. A., Cadenas, S., Jekabsons, M. B., Roussel, D., y Brand, M. D. (2001). Mitochondrial proton leak and the uncoupling protein 1 homologues. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1504(1), 144–158. [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(00\)00243-7](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(00)00243-7)
- Su, L. J., Zhang, J. H., Gomez, H., Murugan, R., Hong, X., Xu, D., Jiang, F., y Peng, Z. Y. (2019). Reactive oxygen species-induced lipid peroxidation in apoptosis, autophagy, and ferroptosis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/5080843>
- Tahara, E. B., Navarete, F. D. T., y Kowaltowski, A. J. (2009). Tissue-, substrate-, and site-specific characteristics of mitochondrial reactive oxygen species generation. *Free Radical Biology and Medicine*, 46(9), 1283–1297. <https://doi.org/10.1016/J.FREERADBIOMED.2009.02.008>
- Turrens, J. F., Freeman, B. A., y Crapo, J. D. (1982). Hyperoxia increases H₂O₂ release by lung mitochondria and microsomes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 217(2), 411–421. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(82\)90519-7](https://doi.org/10.1016/0003-9861(82)90519-7)
- Tymoczko, J. L., Berg, J. M., y Stryer, L. (2015). Biochemistry: A short course, Third Edition. In *W.H. Freeman y Company*.
- Uribe-Carvajal, S., Luévano-Martínez, L. A., Guerrero-Castillo, S., Cabrera-Orefice, A., Corona-de-la-Peña, N. A., y Gutiérrez-Aguilar, M. (2011). Mitochondrial Unselective Channels throughout the eukaryotic domain. In *Mitochondrion* (Vol. 11, Issue 3, pp. 382–390). <https://doi.org/10.1016/j.mito.2011.02.004>
- Vainio, H., Mela, L., y Chance, B. (1970). Energy Dependent Bivalent Cation Translocation in Rat Liver Mitochondria. *European Journal of Biochemistry*, 12(2), 387–391. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1970.tb00863.x>
- Vay, L., Hernández-SanMiguel, E., Lobatón, C. D., Moreno, A., Montero, M., y Alvarez, J. (2009). Mitochondrial free [Ca²⁺] levels and the permeability transition. *Cell Calcium*, 45(3), 243–250. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2008.10.007>
- Vianello, A., Casolo, V., Petrusa, E., Peresson, C., Patui, S., Bertolini, A., Passamonti, S., Braidot, E., y Zancani, M. (2012). The mitochondrial permeability transition pore (PTP) - An example of multiple molecular exaptation? *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1817(11), 2072–2086. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2012.06.620>
- Walker, J. E., Carroll, J., y He, J. (2020). Reply to Bernardi: The mitochondrial permeability transition pore and the ATP synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(6), 2745–2746. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1921409117>
- Wang, W., y Sheu, S. S. (2020). Unsolved mysteries and controversies of mitochondria in the heart— A Virtual Special Issue in JMCC: Part III. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 144, A1–A2. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2020.06.009>

- Wang, X., Jian, C., Zhang, X., Huang, Z., Xu, J., Hou, T., Shang, W., Ding, Y., Zhang, W., Ouyang, M., Wang, Y., Yang, Z., Zheng, M., y Cheng, H. (2012). Superoxide flashes: Elemental events of mitochondrial ROS signaling in the heart. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 52(5), 940–948. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2012.02.007>
- Wei-LaPierre, L., Ainbinder, A., Tylock, K. M., y Dirksen, R. T. (2019). Substrate-dependent and cyclophilin D-independent regulation of mitochondrial flashes in skeletal and cardiac muscle. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 665, 122–131. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2019.03.003>
- Wong, H. S., Dighe, P. A., Mezera, V., Monternier, P. A., y Brand, M. D. (2017). Production of superoxide and hydrogen peroxide from specific mitochondrial sites under different bioenergetic conditions. *Journal of Biological Chemistry*, 292(41), 16804–16809. <https://doi.org/10.1074/JBC.R117.789271>
- Zhong, Z., Ramshesh, V. K., Rehman, H., Currin, R. T., Sridharan, V., Theruvath, T. P., Kim, I., Wright, G. L., y Lemasters, J. J. (2008). Activation of the oxygen-sensing signal cascade prevents mitochondrial injury after mouse liver ischemia-reperfusion. *Am J Physiol Gastro-Intest Liver Physiol*, 295, 823–832. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.90287.2008>.-The
- Zoratti, M., y Szabò, I. (1995). The mitochondrial permeability transition. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes*, 1241(2), 139–176. [https://doi.org/10.1016/0304-4157\(95\)00003-A](https://doi.org/10.1016/0304-4157(95)00003-A)