



**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE TECNOLOGÍA MÉDICA**

**AVANCES EN LA ELUCIDACIÓN DE LA ESTRUCTURA Y
MECANISMOS DE REGULACIÓN DEL PORO DE TRANSICIÓN DE LA
PERMEABILIDAD MITOCONDRIAL**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO
DE LICENCIADO EN TECNOLOGÍA MÉDICA**

**AUTORA: BELÉN VÁSQUEZ PRADO
PROFESOR GUÍA: PhD. BQ. DANIEL GONZALEZ REINOSO**

**TALCA-CHILE
2021**

CONSTANCIA

La Dirección del Sistema de Bibliotecas a través de su unidad de procesos técnicos certifica que el autor del siguiente trabajo de titulación ha firmado su autorización para la reproducción en forma total o parcial e ilimitada del mismo.



Talca, 2022

TABLA DE CONTENIDOS

	Pág.
RESUMEN	6
INTRODUCCIÓN	7
OBJETIVOS	9
1. OBJETIVO GENERAL	9
2. OBJETIVO ESPECÍFICO	9
METODOLOGÍA DE BÚSQUEDA Y ORGANIZACIÓN DE LA INFORMACIÓN	10
MARCO TEÓRICO	11
1. GENERALIDADES	11
1.1. Generalidades de la mitocondria	11
1.2. Estructura de la mitocondria	12
1.3. Funciones de la mitocondria	15
1.4. Generalidades del poro de transición de la permeabilidad mitocondrial	16
1.5. Función del poro de transición de la permeabilidad mitocondrial	17
1.6. Consecuencias de la apertura del poro	17
2. ESTRUCTURA DEL PORO DE TRANSICIÓN DE LA PERMEABILIDAD MITOCONDRIAL	19
2.1. Componentes del poro	19
2.2. Translocador de nucleótidos de adenina (ANT)	20
2.2.1. Estructura del ANT	20
2.2.2. Genómica e isoformas del ANT	22
2.2.3. Función del ANT	24
2.3 Canal aniónico dependiente de voltaje	26
2.3.1 Estructura molecular del VDAC	27
2.3.2 Función del VDAC	28

2.3.3 Reguladores del VDAC	29
2.4 ATP sintasa	30
2.4.1 Estructura de la ATP sintasa	30
3. REGULADORES DEL PORO DE TRANSICIÓN DE LA PERMEABILIDAD MITOCONDRIAL	35
3.1 Ciclofilina D	35
3.2 Proteínas BAX	38
3.3 Calcio Ca ²⁺	41
3.4 Especies reactivas del oxígeno	44
3.5 Hexoquinasas	46
3.6 Proteína translocadora	49
4. PATOLOGÍAS ASOCIADAS AL PORO DE TRANSICIÓN DE LA PERMEABILIDAD MITOCONDRIAL	51
4.1 Lesión por isquemia y reperfusión	51
4.2 Enfermedad de Alzheimer	56
4.3 Cáncer	61
CONCLUSIÓN	64
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

	Pág.
1. GENERALIDADES	
1.2. Estructura de la mitocondria	
Figura 1. Representación esquemática de la estructura de la mitocondria.	13
2. ESTRUCTURA DEL PORO DE TRANSICIÓN DE LA PERMEABILIDAD MITOCONDRIAL	
2.2. Componentes del poro	
Figura 2. Estructura hipotética del poro de transición de la permeabilidad mitocondrial.	19
2.2 Translocador de nucleótidos de adenina (ANT)	
2.2.1 Estructura del Translocador de nucleótidos de adenina	
Figura 3. Estructura del translocador de nucleótidos de adenina	21
2.2.2 Genómica e isoformas de ANT	
Tabla 1. Isoformas del Translocador de nucleótidos de adenina	23
2.2.3 Función del ANT	
Figura 4. Mecanismo de cambio conformacional de ANT	25
2.3 Canal aniónico dependiente de voltaje	
2.3.1 Estructura molecular del VDAC	
Figura 5. Estructura tridimensional del VDAC	28
2.4 ATP sintasa	
2.4.1 Estructura de la ATP sintasa	
Figura 6. Estructura de la ATP sintasa	31

3. REGULADORES DEL PORO DE TRANSICIÓN DE LA PERMEABILIDAD MITOCONDRIAL	
3.1 Ciclofilina D (CypD)	
Figura 7. Funciones de la ciclofilina D	38
3.2 Proteínas Bax	
Figura 8. Mecanismos de activación de la proteína Bax	40
3.3 Calcio (Ca ²⁺)	
Figura 9. Complejo MCU en sus conformaciones abierto y cerrado	43
3.6 Proteína translocadora	
Figura 10. Estructura de la proteína translocadora	49
4. PATOLOGÍAS ASOCIADAS AL PORO DE TRANSICIÓN DE LA PERMEABILIDAD MITOCONDRIAL	
4.1 Lesión por isquemia y reperfusión	
Figura 11. Calcio y ROS en la lesión por isquemia/reperfusión en mitocondrias cardíacas	54
4.2 Enfermedad de Alzheimer	
Figura 12. Esquema de desregulación sináptica del Ca ²⁺ en EA	58

RESUMEN

El poro de transición de la permeabilidad mitocondrial (mPTP) corresponde a un canal transmembrana ubicado en la mitocondria. Esta estructura está compuesta por tres componentes principales: como el canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC), el translocador de nucleótidos de adenina (ANT) y la ATP sintasa, teniendo como reguladores a diferentes moléculas que interactúan con estos componentes estructurales. El mPTP tiene como función fisiológica permitir el paso de ciertos elementos a través de las membranas de las mitocondrias con el fin de mantener una homeostasis entre la matriz mitocondrial y el citosol de la célula. Sin embargo, en condiciones fisiopatológicas, se produce la apertura prolongada del poro inducido por elevadas concentraciones de calcio (Ca^{2+}) o la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS), permitiendo el paso descontrolado de moléculas e iones, disminuyendo la permeabilidad mitocondrial y alterando el equilibrio de los medios intramitocondrial y extramitocondrial. Esto conduce al proceso de muerte celular por vía apoptótica o necrótica. Este episodio de apertura no controlada del poro se presenta en ciertas patologías como en la lesión por isquemia y reperfusión, enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer o enfermedad de Parkinson y también es evidenciado en células cancerosas, contribuyendo a la progresión de cada una de estas patologías. En el presente trabajo, se pretende discutir los potenciales componentes estructurales y reguladores del mPTP, mostrando como participan en su composición y control respectivamente, además, como influye este poro en la generación y desarrollo de diferentes patologías.

Palabras clave: Mitocondrias, poro de transición de la permeabilidad mitocondrial, Calcio, especies reactivas del oxígeno, patologías.

INTRODUCCIÓN

Actualmente, se tiene conocimiento del importante rol que juega la mitocondria en la proporción de energía para la actividad y supervivencia celular. Sin embargo, las mitocondrias tienen también una importante participación en el proceso de muerte celular por necrosis, relacionada con un aumento en la permeabilidad mitocondrial, esto dado que diversos factores que provocan la apertura del denominado *poro de transición de la permeabilidad mitocondrial* (mPTP). El mPTP es un poro no específico ubicado entre la membrana externa y la membrana interna de la mitocondria, que conecta la matriz mitocondrial con el citoplasma. Su función fisiológica en células sanas es aún desconocida, sin embargo, se ha sugerido que podría proporcionar un mecanismo de eliminación de mitocondrias envejecidas en la célula sana mediante autofagia, debido a que estarán expuestas a mayor estrés oxidativo, provocando la susceptibilidad a la apertura del poro. De esta forma, esta eliminación evita la proliferación de mitocondrias dañadas.

La estructura molecular exacta del poro sigue siendo incierta. Se conocen algunas proteínas que estarían implicadas en su actividad, como lo es la ciclofilina-D (CypD), una proteína de 18 kDa que actúa como inhibidor de la apertura del MPTP mediante la unión de ciclosporina A (CsA). Otro componente que participa en la actividad del poro es el translocador de nucleótidos de adenina (ANT) que es un poro cerrado el cual se puede encontrar en dos conformaciones diferentes: estado “m” cuando el sitio de unión a sus sustratos como ADP o ATP se encuentra orientado hacia la matriz de la membrana interna y el estado “c” cuando el sitio de unión a sus sustratos se encuentra orientado hacia el lado citoplasmático, determinando así que aquellos ligandos que se unen a la conformación o estado “m” van a inhibir la apertura del poro de transición de la permeabilidad mitocondrial, mientras que aquellos ligandos que se unen a la conformación “c”, van a provocar el suceso contrario. Por último, el tercer componente que tendría relación con la actividad del mPTP, corresponde al canal de aniones dependiente de voltaje (VDAC), el cual podría actuar como sitio de acoplamiento citosólico en el espacio intermembrana mitocondrial citosólico para

proteínas como ANT, proteínas de la familia BCL-2 y otras. En conjunto, estas tres proteínas son las de mayor alcance en cuanto a estudios clínicos. Sin embargo, no son las únicas que podrían estar implicadas en la estructura o regulación del mPTP, se encuentran también involucrados el receptor periférico de benzodiazepinas (PDBR) y la ciclofilina D.

La apertura prolongada del poro ocurre de manera patológica provocando la disminución del potencial de membrana mitocondrial (Ψ) y se dice que marca el punto de no retorno en la muerte celular. Esto, debido a que una vez activado, va a permitir el paso poco selectivo de moléculas de tamaño pequeño (<1500 Da) y agua a través de la membrana mitocondrial interna, provocando un aumento del volumen de la mitocondria o también denominado *hinchazón mitocondrial*, provocándose así una disminución en la producción de ATP como efecto secundario a la despolarización de la membrana, ya que se estará ocupando para lograr mantener el potencial de membrana. Una vez que aquellas mitocondrias dañadas que están hidrolizando el ATP sobrepasan en cantidad a las mitocondrias que se encuentran normales y por tanto, con capacidad de sintetizar ATP, se generará una deficiencia para la célula de esta molécula energética, a tal punto que se verán afectadas las funciones celulares, incluyendo la homeostasis iónica, lo que provocará una acumulación excesiva de calcio (Ca^{+2}) que afectará a aquellas mitocondrias normales restantes, debido a la estimulación de la apertura del mPTP, llevando así a la muerte celular.

Esta revisión bibliográfica tiene como propósito estudiar y comparar las principales teorías sobre los componentes estructurales del mPTP, conociendo además sus inhibidores y reguladores que influyen en el funcionamiento del poro. Adicionalmente, se realizará una búsqueda de las consecuencias de la apertura prolongada de esta estructura y su participación en diferentes patologías, específicamente a nivel cardíaco, ya que se cree que el mPTP juega un importante papel en las enfermedades cardiovasculares, tales como la isquemia e insuficiencia cardíaca.

OBJETIVOS

1. OBJETIVO GENERAL

1.1 Comprender a través de una revisión de literatura reciente y emergente, los modelos propuestos para la estructura molecular del poro de transición de la permeabilidad mitocondrial (mPTP), sus reguladores, inhibidores y patologías asociadas.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.1 Investigar y conocer los componentes de la estructura mPTP, sus funciones e importancia de cada uno.

2.2 Analizar las teorías más recientes acerca de la regulación molecular del mPTP.

2.3 Comprender el funcionamiento fisiológico y fisiopatológico del mPTP además de su participación en patologías.

METODOLOGÍA DE BÚSQUEDA Y ORGANIZACIÓN DE LA INFORMACIÓN

Como herramienta principal, se utilizará *Pubmed* y *Scielo* para la búsqueda de información científica referente al tema. Las revistas de preferencia, serán aquellas que se encuentren en las bases de datos mencionados anteriormente. Los años en los que se basará la búsqueda preferentemente, son desde el año 2010 hasta el presente, sin embargo, no se descartarán artículos de años anteriores que puedan ser un aporte importante en la revisión bibliográfica, incluyendo aquellas investigaciones que hacen alusión a los primeros y principales descubrimientos sobre el tema. En cuanto a las palabras clave usadas para la búsqueda de información, las principales frases que se utilizarán para la realización de la búsqueda serán en idioma inglés: “Mitochondrial permeability transition pore structure”, “adenine nucleotide translocator”, “transition pore regulators of mitochondrial permeability”, “Transition pore components of mitochondrial permeability”, “Hexokinase”, “mitochondrial calcium and mitochondrial permeability transition pore”, “reactive oxygen species and mitochondria”.

En cuando a la organización de la información que se buscará, esta será organizada de manera cronológica, desde las generalidades hasta lo más específico, iniciando por lo que corresponde a generalidades y estructura de la mitocondria, que es el orgánulo en el cual se encuentra la estructura a investigar. Luego se procederá a la introducción del tema principal que corresponde a generalidades y características del poro de transición de la permeabilidad mitocondrial (mPTP), para posteriormente, llevar a cabo el objetivo principal de la revisión bibliográfica, que trata sobre la estructura, reguladores, inhibidores y patologías asociadas a esta.

MARCO TEÓRICO

1. GENERALIDADES

1.1. Generalidades de la mitocondria

Las mitocondrias son estructuras presentes en la gran mayoría de las células eucariotas. Su descubrimiento fue realizado durante los años 1880-1888 por el botánico de nacionalidad suiza Kolliker, quien denominó *sarcosomas* a unos gránulos que divisó en las células de insectos. Sin embargo, fue Carl Benda quien en 1889 le otorgó el nombre de *mitocondria* a las estructuras brillantes que observó presentes en la célula, al ser teñidas con cristal violeta y alizarina (1). Sin embargo, la comprensión de su función no se dio hasta el año 1948, donde se realizó el aislamiento de mitocondrias intactas y purificadas a partir de células del hígado (2).

La teoría actual sobre el origen de la mitocondria, la llamada *teoría endosimbiótica*, indica que estas evolucionaron a partir de una alfa-proteobacteria endosimbiótica, la que habitaba dentro de una célula hospedera que provenía del linaje de otro grupo bacteriano, las *arqueas*. Si bien, el momento en el cual sucedió la endosimbiosis de la protobacteria es incierto, se cree que esto ocurrió antes del primer y del último ancestro común eucariota. La teoría endosimbiótica indica que se produjo una unión entre la célula procariota inicialmente fagocitada, la cual cumplía la función de proporcionar ATP y la célula hospedera que otorgaba un medio estable y rico en nutrientes para ser habitado. Es así, como la célula fagocitada terminó formando parte del organismo mayor, denominándose mitocondria (3).

Gracias al avance de la tecnología, se ha logrado evidenciar la evolución del comportamiento de la mitocondria para lograr la transmisión crítica de su genoma y con ello, responder las necesidades energéticas de la célula.

1.2. Estructura de la mitocondria

El tamaño de las mitocondrias varía entre 0,1 y 0,5 μm de diámetro y una longitud de hasta 7 μm (4). La morfología de las mitocondrias es cambiante: se pueden organizar formando una red junto a otras mitocondrias o también pueden estar distribuidas en forma individual (5). Independiente de esto, las mitocondrias están constituidas por una membrana externa, membrana interna, espacio intermembrana y matriz mitocondrial.

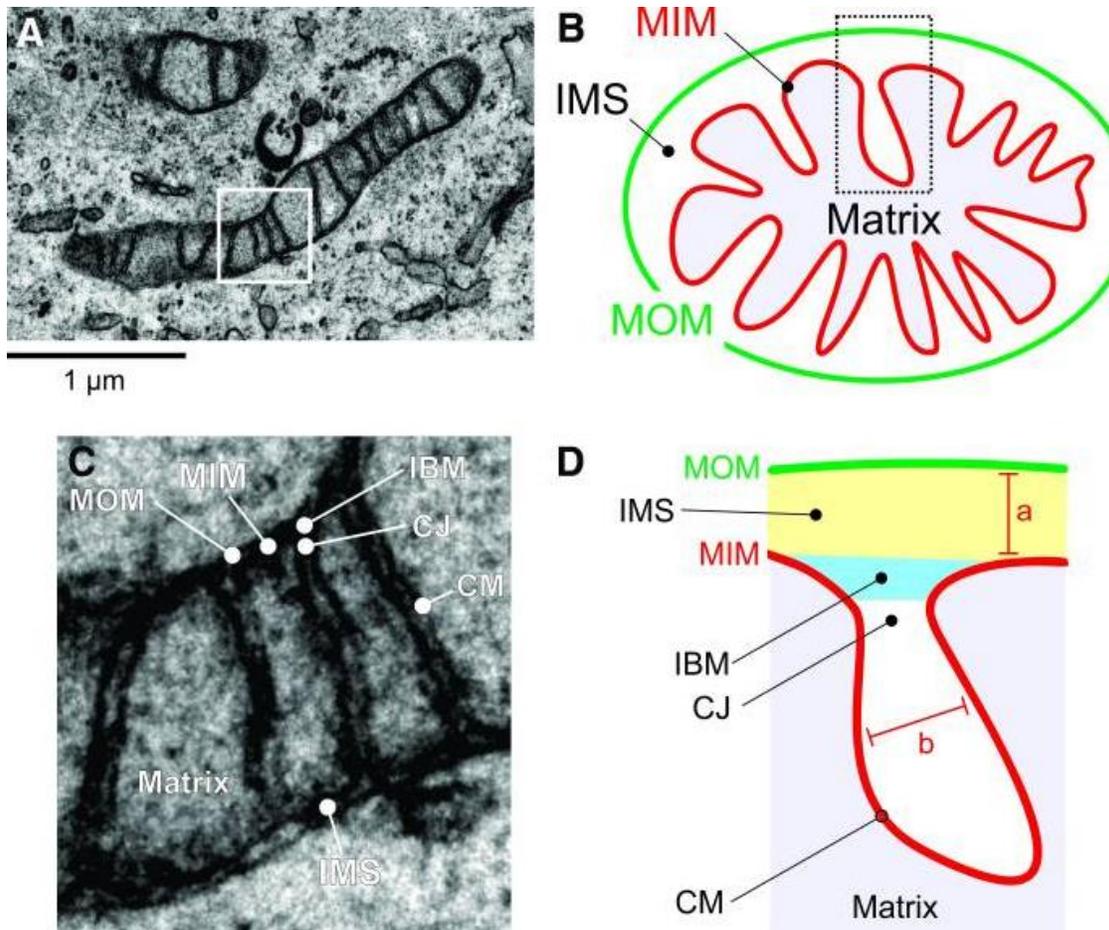


Fig. 1. Estructura mitocondrial. A) Imagen de la mitocondria vista por microscopía electrónica, ampliada en C). B) Representación esquemática de la estructura mitocondrial donde se observa la membrana mitocondrial interna (MIM), membrana mitocondrial externa (MOM) y el espacio intermembrana (IMS). C) Ampliación de la imagen mostrada en A) observándose el limite interno de la membrana (IBM), cruce de crestas (CJ) y las crestas en la membrana (CM). D) Representación esquemática de las crestas y membranas. Tomado de (Bulthuis, 2019) (6).

La membrana mitocondrial externa corresponde a una bicapa lipídica, altamente permeable a iones, metabolitos y polipéptidos. Permite el paso de moléculas a través de sus canales aniónicos dependiente de voltaje (VDAC) de hasta 10 kDa y un diámetro de aproximadamente 2nm. Dentro de su composición química, contiene un 40% de lípidos y un 60% de proteínas, tales como quinasas, porinas, entre otras (7).

La membrana mitocondrial interna tiene una composición especializada, formada por crestas orientadas hacia la matriz mitocondrial que permiten el aumento de la superficie total. Es una membrana impermeable, debido a la alta cantidad de cardiolipina, bombas y transportadores específicos, los que van a permitir el paso de metabolitos hacia el interior y viceversa (5) como, por ejemplo, oxígeno, agua, ADP, ATP, ácidos grasos y ácido pirúvico (7).

El espacio intermembrana en su interior contiene un líquido similar al presente en el citoplasma. Además, contiene una alta cantidad de protones como resultado de la actividad de la cadena respiratoria (1). Su grosor va a depender de la actividad que posea la mitocondria, es decir, entre más actividad presente la mitocondria, más grueso va a ser el espacio intermembrana. En este espacio también se encuentra presente la carnitina, que corresponde a un aminoácido no proteico que participa en el transporte de ácidos grasos desde el citosol hacia la matriz mitocondrial para su posterior oxidación (β -oxidación).

La matriz mitocondrial contiene varios iones, los sustratos para el metabolismo oxidativo, ADN y ARN mitocondriales, además de numerosas enzimas que participan en las rutas metabólicas realizadas en las mitocondrias, que son esenciales para la obtención de energía como la β -oxidación de ácidos grasos y el ciclo de Krebs.

Las membranas mitocondriales poseen una baja cantidad de ácido fosfatídico, esfingomielinas, fosfatidilserina y glucolípidos, los que se encuentran abundantemente en las membranas de las células eucariontes. Sin embargo, posee una alta cantidad de fosfatidilcolina, cardiolipinas y fosfatidilinositol, lo que les da una semejanza a las membranas de ciertas bacterias (4).

1.3. Funciones de la mitocondria.

La principal función de la mitocondria es la producción de ATP, por lo que es esencial para la vida de la célula animal eucarionte, aunque no es su único rol. Este orgánulo también regula la homeostasis del Ca^{2+} citoplasmático, participa en el crecimiento y desarrollo celular, además de regular el ciclo de Krebs, el metabolismo de la urea, ácidos grasos, regulación del balance iónico, y también media el proceso de apoptosis y muerte celular (8).

Aproximadamente el 90% del ATP sintetizado en la mayor parte de las células animales proviene de las mitocondrias (7), mientras que el resto es producido por el proceso de glucólisis en condiciones anaeróbicas. Este proceso de formación de ATP consta de dos partes: la primera va a corresponder al proceso de glucólisis que ocurre a nivel del citosol, para luego dar paso al proceso de respiración celular, compuesta por el ciclo de Krebs y la cadena transportadora de electrones, procesos que son realizados en la mitocondria.

En la mitocondria ocurre además la formación de ciertos lípidos como el ácido lisofosfatídico, con el cual se sintetizan posteriormente triacilgliceroles, ácido fosfatídico y fosfatidilglicerol, que es necesario para la formación de fosfatidil etanolamina y cardiolipina, constituyente a su vez, de la membrana mitocondrial.

La mitocondria también se ve involucrada en el proceso de muerte celular, lo que se puede evidenciar de diferentes formas: autofagia, paraptosis, necrosis, apoptosis, entre otras (4). Algunas de estas formas se relacionan con la mitocondria, debido al denominado *poro de transición de la permeabilidad mitocondrial* (mPTP), que es un canal específico de la mitocondria que por efecto de su apertura prolongada, provoca un aumento de la permeabilidad y desbalance osmótico que va a generar un efecto de “hinchazón” de la

mitocondria junto con la liberación de diferentes factores de la muerte celular como lo son el citocromo C, procaspasas 2, 3, 4 y el factor iniciador de apoptosis (9), que van a inducir el proceso de apoptosis de la célula eucarionte.

1.4. Generalidades del poro de transición de la permeabilidad mitocondrial (mPTP)

Los estudios de Haworth y Hunter evidenciaron la existencia de este poro en el año 1979, a través de un estudio donde se mostró que las mitocondrias energizadas en presencia de altas concentraciones de Ca^{2+} sufren una hinchazón masiva, relacionándolo con una alteración de la permeabilidad mitocondrial (10). Luego M. Crompton en el año 1987 mostró evidencia de la presencia de un poro dependiente de Ca^{2+} que se abre por exposición a agentes oxidantes (11). Este canal fue reconocido como el poro de transición de permeabilidad mitocondrial (mPTP), el cual ha sido extensamente estudiado en los años posteriores, por su aparente contribución en la muerte celular.

El mPTP se encuentra localizado entre las membranas internas y externas de la mitocondria, comunicando el citoplasma directamente con la matriz mitocondrial. Corresponde a un canal específico que una vez activado, va a permitir el paso no selectivo de moléculas de tamaño inferior a 1,5 kDa y que puede llegar a tener un diámetro aproximado de 3nm (12).

1.5. Función del mPTP

El rol del mPTP en las células sanas aún no ha sido completamente definido. Se cree que la apertura transitoria de este poro contribuye a la regulación del paso de ciertos compuestos de tamaño mayor a 1,5 kDa, con el fin de mantener la homeostasis iónica (13). Además, se especula que el poro regularía la eliminación de mitocondrias envejecidas, proceso denominado *autofagia*, ya que a medida que envejecen, están sometidas a mayor daño oxidativo, lo que va a provocar la apertura de este poro, que a su vez va a permitir el paso descontrolado de moléculas de tamaño inferior a 1,5 kDa, que van a arrastrar el agua al interior de la mitocondria, provocando el proceso denominado “hinchazón” del orgánulo dado por el aumento de volumen en su interior. De esta manera, las células eliminan las mitocondrias envejecidas o no funcionales y las van a ir reemplazando por mitocondrias jóvenes y funcionales (14).

En condiciones patológicas, la apertura prolongada del mPTP por exposición a estrés oxidativo o la presencia de altas concentraciones de Ca^{2+} citoplasmático, van a provocar un daño irreversible en las mitocondrias, las que van a dejar de ser funcionales, provocando a su vez, una disminución marcada en la producción de ATP de la célula, llevando así al proceso de muerte celular por necrosis.

1.6. Consecuencias de la apertura del poro

Una de las consecuencias de la apertura prolongada del mPTP es la despolarización de la membrana mitocondrial interna debido al paso descontrolado de protones a través del poro, lo que provoca un aumento de la permeabilidad de la membrana interna para permitir el paso de moléculas de hasta 1,5 kDa. Este cambio repentino de la permeabilidad se

denomina *transición de la permeabilidad mitocondrial* (PTM) (14). Este paso descontrolado de iones y osmolitos de bajo peso molecular, va a producir un equilibrio de estos, sin embargo, se genera un cambio en la concentración de proteínas, siendo de mayor concentración en la matriz que en el espacio intermembrana y citosol. Esto va a provocar un aumento en la presión coloidosmótica, lo que trae como consecuencia la entrada excesiva de moléculas de agua a la matriz mitocondrial, provocando un aumento considerable de volumen de la mitocondria y posteriormente su ruptura (15). Otra consecuencia de la apertura de este poro es el desacople en el proceso de fosforilación oxidativa, dado por el paso descontrolado de protones, provocando una disminución de su gradiente, reduciendo la producción de ATP e incluso activando su hidrólisis, teniendo como consecuencia una falta de esta molécula energética en la célula, conduciendo a la muerte (13).

2. ESTRUCTURA DEL PORO DE TRANSICIÓN DE LA PERMEABILIDAD MITOCONDRIAL

2.1. Componentes del poro

Hasta el día de hoy, la estructura del mPTP sigue siendo incierta. Sin embargo, se consideran a las proteínas VDAC, ANT y la ATP sintasa como elementos centrales del complejo. Asimismo, el extendido estudio de los componentes del mPTP, han demostrado que ANT, PiC y CypD podrían tener funciones de regulación del poro (16), mientras que proteínas inductoras de la apoptosis como BH3 Bax/Bak se posicionan en la membrana externa, participando en la inflamación y ruptura de la estructura mitocondrial una vez desencadenado el efecto de la apertura del poro (Figura 2).

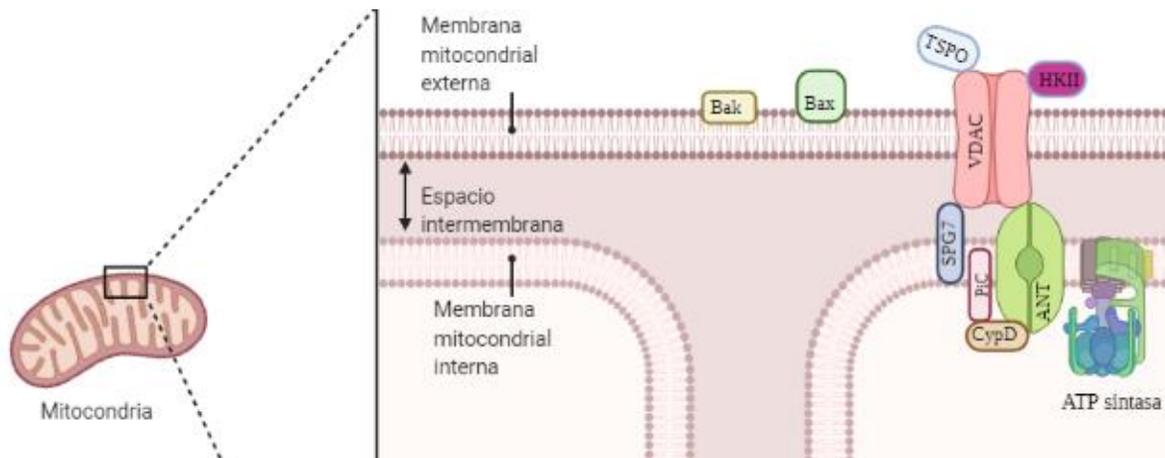


Fig. 2. Estructura hipotética del mPTP. Se pueden observar los diferentes componentes del mPTP como el canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC), el translocador de nucleótidos de adenina (ANT), la ATP sintasa y diferentes moléculas que pueden actuar en su regulación, como la proteína translocadora (TSPO), ciclofilina D (CypD) hexoquinasa II (HKII), proteínas Bax y Bak, etc. Elaboración propia, Vásquez B, 2021.

2.2 Translocador de nucleótidos de adenina (ANT)

2.2.1 Estructura del translocador de nucleótidos de adenina

El *translocador de nucleótidos de adenina* (ANT) corresponde a una de las proteínas más abundantes de la membrana interna mitocondrial. Presenta un peso molecular de aproximadamente 30 kDa y su secuencia primaria contiene un dominio de 100 aminoácidos en triplicado, donde cada uno de estos está conformado por dos segmentos terminales denominados extremos N- y C- que estarán situados hacia el espacio intermembrana (17).

Inicialmente, se pensaba que la estructura de ANT estaba conformada por homodímeros, sin embargo, esta teoría fue descartada debido a que se demostró que la estructura del ANT está compuesto por seis α -hélices transmembrana en vez de doce α -hélices como se esperaba (18). Estas hélices se van a agrupar y otorgar una forma de cono a la estructura del ANT, con una profundidad de 30 Å y un diámetro de 20 Å. Como se puede apreciar en la figura 3a, las hélices impares van a presentar una desviación o torsión debido a la presencia de residuos de prolina, la cual induce quiebres en las estructuras proteicas secundarias. Ubicados hacia la matriz mitocondrial se encuentran estructuras denominadas *hélices superficiales* como lo son h12, h34 y h56, que van actuar como conectores de los pares de hélices que van a estar posicionados en forma paralela a la membrana interna mitocondrial (19). Adicionalmente, las hélices comprenden diferentes segmentos, como, por ejemplo: 4–37 (H1), 53–64 (h12), 73–99 (H2), 108–142 (H3), 156–167 (h34), 176–199 (H4), 209–238 (H5), 253–264 (H56) y 273–290 (H6). En la figura 3b, se muestra la estructura vista lateralmente con el extremo N- terminal de color azul, mientras que el extremo C- terminal se encuentra identificado con un color rojo. La figura 3c y 3d muestran la estructura del ANT vista desde el interior y exterior, respectivamente (20).

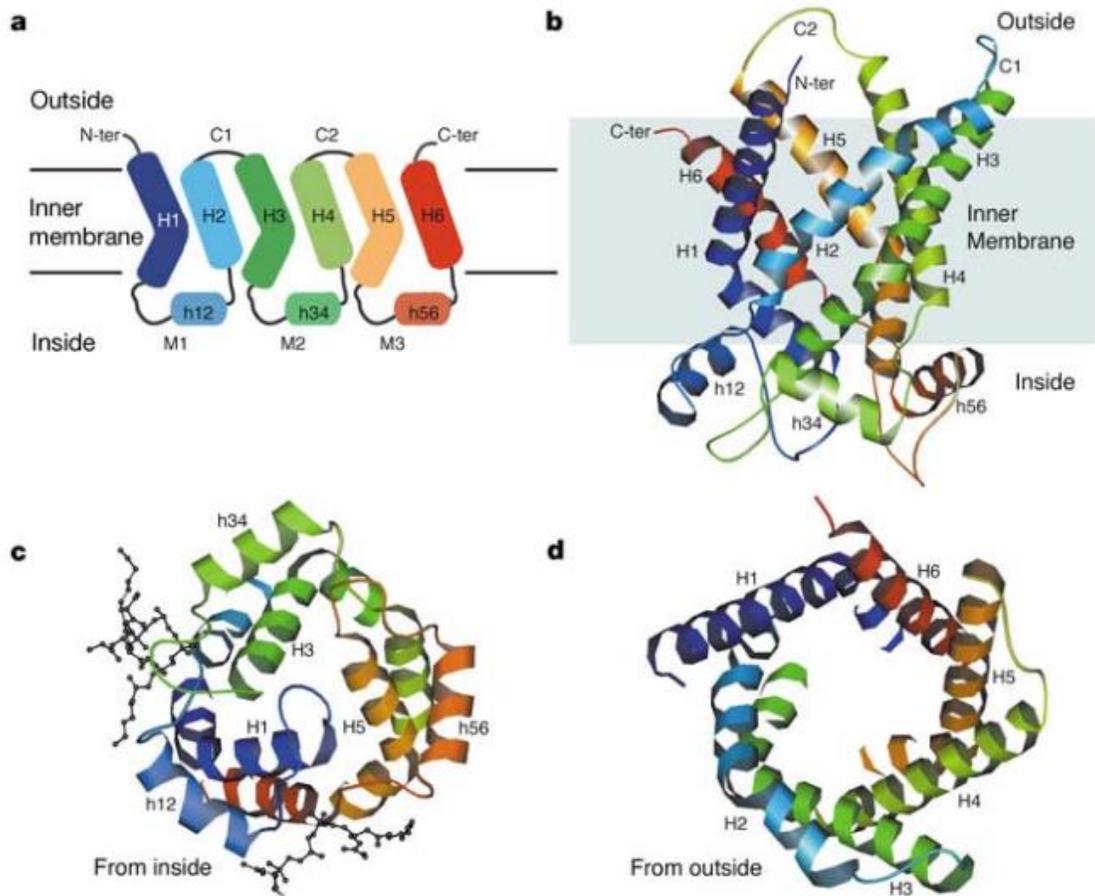


Fig. 3. Estructura del ANT. H: hélices transmembrana, h: hélices de superficie, C: loops espaciales intermembrana y M: loops de la matriz. a) estructura general de ANT, donde se pueden observar torsiones por la presencia de residuos de prolina. b) estructura de ANT vista lateralmente. c) estructura de ANT vista desde el interior. d) estructura de ANT vista desde el exterior. Tomado de (Pebay-Peyroula, 2003) (21).

2.2.2 Genómica e isoformas de ANT

Los genes que codifican para ANT se incluyen dentro de la familia *SLC25* que corresponden a transportadores mitocondriales, la gran mayoría distribuidos en la membrana mitocondrial interna. La función de los transportadores pertenecientes a esta familia, es proporcionar un medio de comunicación entre el citosol y la mitocondria, para permitir el paso de moléculas de distinta naturaleza provenientes desde el citoplasma hacia la matriz mitocondrial y viceversa, proceso que es importante para la realización de diversos procesos fisiológicos como son la gluconeogénesis, lipogénesis, degradación de aminoácidos, etc. y además para el equilibrio entre el medio extra e intramitocondrial (21). Los genes de esta familia se distribuyen de manera uniforme en los cromosomas, pero tienen grandes diferencias en su tamaño y organización, teniendo tamaños genómicos variables entre los 118-65.456 pb, conteniendo de 1 a 18 exones (22). Un punto importante que permite reconocer y diferenciar a los miembros de la familia de genes *SCL25* es su estructura común, ya que todos los miembros de la familia de transportadores mitocondriales a pesar de tener sustratos de diferente naturaleza, tienen una estructura idéntica que consta de seis α -hélices que atraviesan la membrana mitocondrial interna y *loops* repetidos tres veces que permiten su rápida identificación, ya que esta estructura difiere de cualquier miembro de otras familias de transportadores mitocondriales (23).

En el humano, se han descrito cuatro isoformas de ANT: ANT1, ANT2, ANT3 y ANT4, las que contribuyen a evitar la muerte celular programada catalizando el intercambio de ADP/ATP a través de las membranas mitocondriales y regulando el $\Delta\Psi_m$, el cual es fundamental para mantener la función fisiológica de la cadena respiratoria para generar ATP. Cada una de estas isoformas se regula de distinta manera, otorgando cierta especificidad en los distintos tejidos. El gen *SLC25A4* codifica para el ANT1, el cual ha sido mapeado en el cromosoma 4 y se expresa en tejidos del corazón y el músculo esquelético (24). Mientras que el ANT2 es codificado por el gen *SLC25A5* en el brazo largo del cromosoma X y su expresión es abundante en células cancerígenas o en células en proliferación. El ANT3, codificado por

el gen *SLC25A6*, se descubrió en la región pseudoautosomal del cromosoma X e Y, expresándose en todos los tejidos diferenciados (25). Finalmente, el gen *SLC25A31* se ubica en el brazo largo del cromosoma 4 y se expresa como ANT4 en el hígado, cerebro y testículos, en particular en este último tejido, en donde posee una función fundamental energética fundamental para la espermatogénesis (26). (Ver tabla 1).

Tabla 1. Isoformas del translocador de nucleótidos de adenina (ANT). Tomado y adaptado de (Chevrollier 2011) (27)

Isoforma ANT	ANT1	ANT2	ANT3	ANT4
GeneCards	SLC25A4	SLC25A5	SLC25A6	SLC25A31
Cromosoma	4q35	Xq24	Xp22	4q28.1
Número del exón	4	4	4	6
Intercambio de ATP/ADP	Exporta ATP hacia el citosol	Importe de ATP hacia la matriz mitocondrial	Exportación constante de ATP al citosol	Importe de ATP mitocondrial para los espermatozoides
Naturaleza apoptótica	Pro-apoptótico	Anti-apoptótico	Pro-apoptótico	Anti-apoptótico
Expresión en tejidos	Corazón, músculo esquelético y cerebro.	Células de rápido crecimiento, línea de células cancerígenas y cáncer.	Expresado constitutivamente en todos los tejidos	Testículos y células germinales
Elementos regulatorios	CCAAT y caja TATA. Regulación oxidativa OXBOX/REBOX	Caja TATA, elementos Sp1 (las cajas AB) Go-1/Go-2, que se unen al factor nuclear 1 (FN1). Regulador de glucólisis GRBOX.	Dominio de repetición SPI; Cajas GC	

2.2.3 Función del ANT

El ANT tiene como función principal el transporte de moléculas de ADP y ATP con modalidad de *antiporte*, es decir, transporta solo un nucleótido hacia el interior de la mitocondria, mientras mueve otro en dirección opuesta, cumpliendo una estequiometría de 1:1, esto con el fin de no generar cambios en los niveles totales de las reservas de nucleótidos. La afinidad de este transportador por los dos nucleótidos mencionados puede variar dependiendo de la condición de la mitocondria. Si este orgánulo se encuentra desacoplado, ocurrirá el intercambio de ATP/ADP por igual en cualquier dirección, pero si la mitocondria se encuentra en situación de carga, el potencial de membrana mitocondrial generará una preferencia hacia la entrada de ADP a la matriz mitocondrial y una exclusión de ATP hacia el citosol.

Estudios realizados recientemente, indican que el ANT realiza un modelo de transporte denominado “ajuste de transición inducido” (28). El modo de funcionamiento de este transportador comienza cuando un nucleótido, generalmente ADP citosólico, se une a un sitio común de unión que posee esta estructura, mientras está en “estado c”, que corresponde a cuando la proteína se encuentra abierta hacia la parte externa en dirección al citosol, mientras que se encuentra cerrada hacia la parte más interna, es decir, en dirección a la matriz mitocondrial. Al unirse ADP al sitio de unión común del ANT, provocará un cambio conformacional, pasando este transportador a un “estado m”, el cual consiste en todo lo contrario al estado c, es decir, la proteína se abrirá hacia la matriz mitocondrial mientras se cierra hacia el espacio intermembrana. Ambos estadios, cuentan con una red de puentes salinos que se rompe cada vez que ocurre el cambio conformacional de un estado a otro (29). Una vez que el ADP se desvincula del ANT e ingresa a la matriz mitocondrial, se va a unir al mismo sitio de unión, un nucleótido de ATP, generando un cambio de conformación al “estadio c” del translocador para ser exportado hacia el espacio intermembrana. De esta

manera, va a ocurrir el ingreso de una molécula de ADP para la formación de energía por parte de las mitocondrias y la exportación de moléculas energéticas que aportan a la realización de procesos fundamentales para la supervivencia celular (Fig 4).

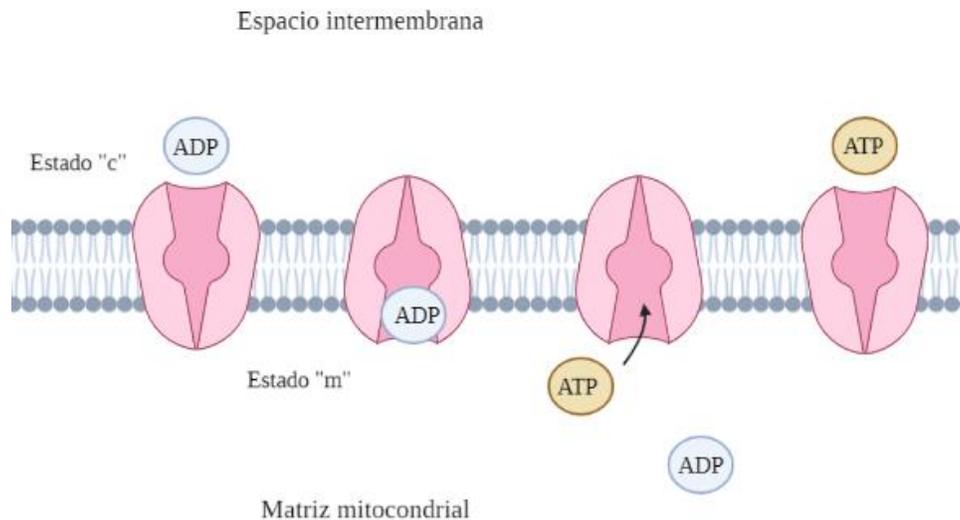


Fig 4. Mecanismo de cambio conformacional de ANT. Inicialmente se tiene el ANT en estado "c", al entrar una molécula de ADP, para que sea transportado hacia la matriz mitocondrial debe cambiar su conformación a estado "m". una vez liberado el ADP, una molécula de ATP se une al sitio de unión de ANT para ser transportado hacia el citosol, cambiando la conformación del canal desde un estado "m" a un estado "c". Elaboración propia, Vásquez B, 2021.

Además del "estado m" y "estado c" mencionados anteriormente, el ANT cuenta con un tercer estadio asociado al mPTP, el denominado "estado p", el cual corresponde a cuando la proteína deja de ser selectiva, ocurriendo la entrada descontrolada de metabolitos hacia la matriz mitocondrial. El atractilósido (ATR) junto al carboxatractilósido (CATR), pertenecen a una de las dos clases de inhibidores del ANT; el primero tiene como función la inhibición del intercambio de moléculas de ATP y ADP en la mitocondria ya que se une de manera competitiva al sitio de unión común en el translocador, mientras que el segundo bloquea irreversiblemente el ANT. Ambos inhibidores actúan únicamente cuando el transportador se encuentra en "estado c" (30). Al presentarse estos inhibidores y mantener al ANT en "estado

c”, se considera que el poro de transición de la permeabilidad mitocondrial está sensibilizado, por lo tanto, en respuesta a concentraciones elevadas de Ca^{2+} en la matriz mitocondrial, se producirá un repentino cambio del translocador desde el “estado c” al “estado p” permitiendo la entrada descontrolada de metabolitos generando el proceso de “hinchazón mitocondrial” que llevará posteriormente a la muerte de la mitocondria.

A pesar de que inicialmente se creía que el ANT constituía una parte fundamental de la estructura del mPTP, estudios posteriores en mitocondrias de hígado de ratón mostraron que esta proteína si bien forma parte de la estructura molecular del poro, no es fundamental en su funcionamiento, ya que al inactivarse genéticamente el transportador, aun persistía la transición de permeabilidad mitocondrial y la apertura del poro aunque no de manera normal, debido a que, al no estar siendo regulado por ligando de ANT, se requería de una mayor concentración de Ca^{2+} para inducir la liberación de citocromo c y la activación del mPTP (31).

2.3 Canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC)

Este canal es una de las proteínas más abundantes posicionadas en la membrana mitocondrial externa, el cual, delimita una barrera entre el citoplasma celular y el espacio intermembrana, seguida de la membrana interna mitocondrial. El VDAC como su nombre lo indica, se encuentra regulado por voltaje, cumpliendo como función el transporte de metabolitos a través de la membrana mitocondrial interna, desde el citosol a la matriz mitocondrial o viceversa. Al encontrarse el potencial de membrana entre +20mV y -20mV este canal aniónico dependiente de voltaje se encontrará en estado abierto, dando como resultado el paso con mayor afinidad de iones con carga negativa, como nucleótidos de adenina, fosfato, glutamato, etc., mientras es débilmente selectivo para iones como potasio o sodio. Todo lo contrario, ocurre cuando el potencial de membrana se encuentra fuera de los

valores límites mencionados anteriormente, es decir, sobre +20mV y bajo -20mV, en este caso, el canal se encontrará en un estado cerrado, el cual tendrá una mayor afinidad por los iones de carga positiva, por lo que no permitirá el paso de moléculas de ADP o ATP hacia el otro extremo de la membrana mitocondrial externa (32). Por lo tanto, los cambios de voltaje pueden controlar los flujos de iones y metabolitos dentro y fuera de las mitocondrias.

Estos canales son sintetizados con la asistencia de chaperonas citosólicas y reconocidos por las translocasas de la membrana externa (TOM) y van a ser insertadas en la membrana mitocondrial externa mediante el complejo de maquinaria de clasificación y ensamblaje (33).

2.3.1 Estructura molecular del VDAC

Este canal es una proteína con un peso molecular de 31 kDa que mide aproximadamente 3,1 a 3,5nm en forma horizontal y 4nm verticalmente (34), sin embargo, mide 1,5nm de diámetro cuando la hélice alfa N-terminal se encuentra dentro del poro. La estructura del canal aniónico dependiente de voltaje tiene una forma cilíndrica que cuenta con 19 hebras beta transmembrana unidas por bucles flexibles, además posee una única alfa-hélice con función estabilizadora o conmutadora, situada en el extremo N-terminal, el cual contiene 25 residuos y puede encontrarse dentro o fuera del poro, modulando la activación del VDAC y la unión con hexoquinasas o también con proteínas reguladoras de la apoptosis (35). En la figura 5, se representa la estructura tridimensional del VDAC. En la letra A se observa la vista lateral del canal, en donde de color amarillo se representan las 19 hebras β -hélice, el extremo N-terminal se expresa en color rojo y el color verde, los *loops* que unen las β -hélices. Sin embargo, existe un bucle más largo, que es aquel que une las β -hélices 18 y 19, el cual se representa en color azul. En la letra B puede observarse la misma estructura, pero con una vista superior.

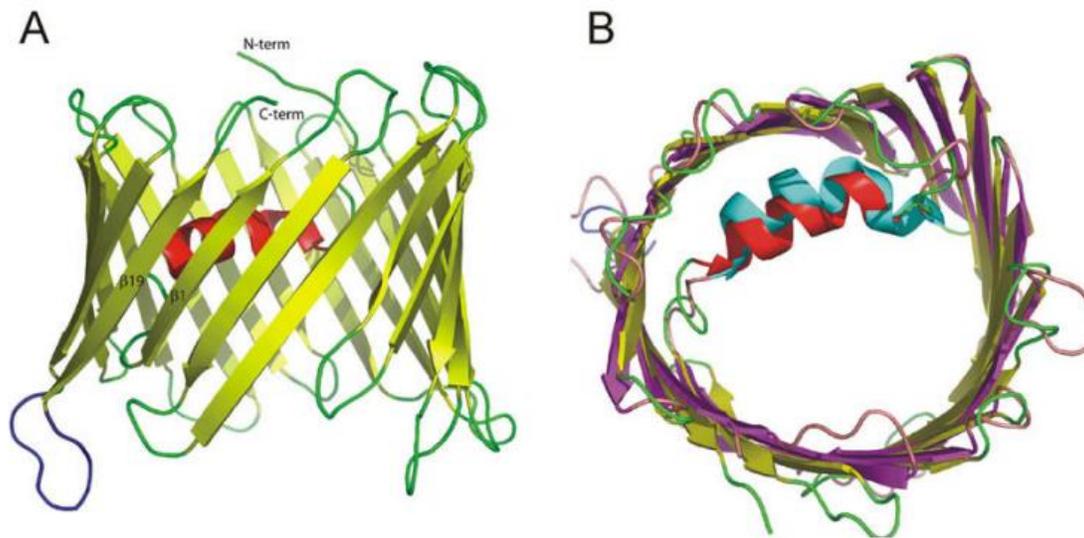


Fig 5. Estructura tridimensional del VDAC. a) vista lateral de VDAC donde se observan los extremos N-terminal y C-terminal y en color amarillo se aprecian las 19 hebras β - hélice. b) vista superior de la estructura tridimensional de VDAC. Tomado de (Varda Shoshan-Barmatz, 2010) (34).

El VDAC consta de tres isoformas: VDAC1, VDAC2 y VDAC3, las cuales se expresan en tejido de órganos como el riñón, cerebro, corazón y musculo esquelético. Estas isoformas tienen secuencias primarias de 285 aminoácidos, compartiendo aproximadamente un 70% de identidad (32). En la mitocondria, la isoforma VDAC 1 se expresa en mayor cantidad que las otras dos, seguido de VDAC2 y VDAC3.

2.3.2 Función del VDAC

La principal función del VDAC, corresponde al transporte de una gran variedad de metabolitos con un tamaño de hasta 5 kDa hacia el interior o exterior de la mitocondria, una

de ellos es el Ca^{2+} , lo que regula su señalización; también se transportan moléculas necesarias para el funcionamiento de la cadena respiratoria, como NADH. Además, forma una interacción funcional con el ANT mediante el cual se introducen a la matriz mitocondrial nucleótidos como el ADP, fundamental para la generación de energía (36). Otra función muy importante consiste en la participación en el proceso de apoptosis por vía intrínseca.

La apoptosis mitocondrial puede ser gatillada por diversos factores, entre ellos, las especies reactivas del oxígeno (ROS) o también concentraciones elevadas de Ca^{2+} citosólico. Estos factores van a provocar una ruptura en la membrana mitocondrial generando la liberación de citocromo c, el cual es un componente de la cadena respiratoria mitocondrial, a la vez que corresponde a un factor pro-apoptótico una vez liberado. Esta liberación inducirá la activación de las caspasas, debido a la formación del complejo caspasa 3/ factor 1 de activación de proteasa. Ante la presencia de caspasas, se activarán otras proteínas pro-apoptóticas, las cuales se unirán a la membrana mitocondrial externa y producirán la pérdida de la permeabilización selectiva de esta membrana, permitiendo el paso descontrolado de metabolitos, generando un “punto de no retorno” en el proceso de apoptosis (37).

2.3.3 Reguladores del VDAC

Uno de los reguladores del VDAC corresponde a la tubulina, proteína citoesquelética compuesta por una subunidad α y una subunidad β , las cuales tienen una mayor afinidad por las mitocondrias, razón por la cual, se une al VDAC mediante la cola c-terminal. Esto va a resultar en un cierre parcial de este canal, perjudicando el intercambio de nucleótidos de adenina, alterando el proceso de generación de energía celular, el transporte de electrones mitocondriales y, por último, se modificaría el potencial de la membrana mitocondrial (38). Otro regulador corresponde a Bcl-XL, que se va a unir al VDAC reduciendo la muerte celular al provocar el cierre de este. Por otro lado, Bax y Bak van a desencadenar el efecto contrario,

ya que se consideran proteínas pro-apoptóticas. Finalmente, la hexoquinasa se va a unir al canal a través de su región N-terminal que tiene gran afinidad por la proteína, siendo favorecido la formación del complejo HK-VDAC por el ATP y la glucosa (39).

2.4 ATP sintasa

Se ha asociado esta estructura como uno de los componentes estructurales del mPTP, ya que se encuentra posicionada en la membrana mitocondrial interna y se ha encontrado evidencia que la porción F₀ y F₁ de la ATP sintasa forman parte de la estructura molecular del poro (40). Además, algunas subunidades como el anillo c y OSCP tienen directa relación con el poro, al permitir la interacción entre reguladores y el canal.

2.4.1 Estructura de la ATP sintasa

La ATP sintasa o F₁-F₀-ATPasa, corresponde a un complejo proteico de aproximadamente 600 kDa formado por dos dominios: F₁ o complejo soluble, es un dominio globular que sobresale de la membrana mitocondrial y un dominio F₀ que se encuentra embebido en la membrana mitocondrial interna. Ambos dominios están unidos por un tallo central y un tallo lateral. La ATP sintasa está formada por 15 subunidades, como se observa en la figura 6: la porción F₁ va a contener tres subunidades α , tres subunidades β y una subunidad γ , δ y ϵ , las cuales conforman el *tallo central*. Por otro lado, el dominio F₀ o porción hidrofóbica, está formada por las subunidades a, b, c, d, F₆, OSCP (proteína que confiere sensibilidad a la oligomicina) y subunidades accesorias e, f, g y A6L. Las subunidades b, d, F₆ y OSCP conforman el *tallo periférico* (41).

La subunidad β en la porción F1 puede cambiar su conformación en tres estados diferentes, según su afinidad con los diferentes nucleótidos. Una de esas conformaciones presenta alta afinidad por el ATP y se denomina *conformación β_{TP}* , otra de las conformaciones es *β_{DP}* y corresponde a cuando el complejo presenta una alta afinidad por el ADP, mientras que la tercera conformación se denomina *β_E* y es aquella que presenta una baja afinidad por el ATP (42).

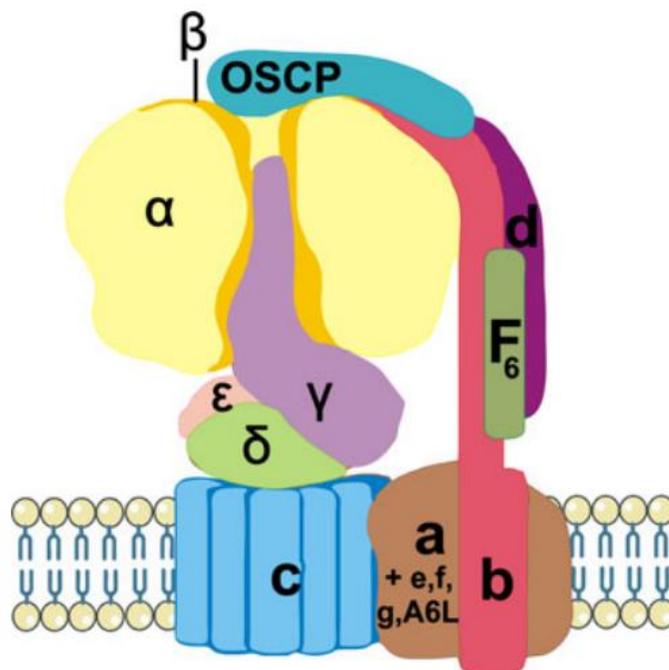


Fig 6. Estructura de la ATP sintasa. Se observa la porción F0 de la ATP sintasa (inserto en la membrana), apreciándose los diferentes componentes de esta estructura, como el anillo c insertado en la membrana mitocondrial interna junto a las subunidades a, b, e, f, g y A6L, mientras que también se observa la porción F1 que sobresale de la membrana con las subunidades correspondientes como OSCP, α , β , δ , γ y d. Tomado de (An I. Jonckheere, 2012) (43)

Dentro de esta estructura, además se destaca la proteína OSCP, debido a que participa fundamentalmente en el acoplamiento estructural y también funcional entre los dominios F1

y F₀ a través del contacto con el hexámero $\alpha_3\beta_3$ y otras unidades que conforman el tallo periférico. La discusión sobre la posible presencia de regiones flexibles es de importancia, ya que estas podrían influir en el movimiento y posición del tallo periférico, regulando a su vez la porción F₀ que es la que participa en la formación del mPTP (44). La forma en que se relaciona el mPTP y la proteína OSCP es que la ciclofilina D (CypD), que es un componente regulador del poro, se une al tallo periférico de la ATP sintasa, específicamente en OSCP, modulando así la activación del mPTP. Por lo tanto, OSCP ha sido considerado como objetivo de estudio debido que posibilita la interacción con proteínas reguladoras y fármacos con la ATP sintasa, repercutiendo directamente en mPTP (45).

Otro componente que destaca es su anillo c transportador de protones, que consiste en múltiples copias de subunidades c que son codificadas específicamente por tres genes: *ATP5G1*, *ATP5G2* y *ATP5G3* (46). Están dispuestas como un círculo y estabilizadas por la unión del fosfolípido cardiolipina, el cual está ampliamente distribuido en la membrana mitocondrial interna. Se cree que la subunidad c de F₀ es necesaria para la apertura del poro, la fragmentación mitocondrial, la muerte celular inducida por sobrecarga de Ca²⁺ mitocondrial y el estrés oxidativo. Además, este anillo posee un grupo carboxilo formando parte de un residuo Glu o Asp, el cual está involucrado en el paso de protones hidrógeno (H⁺) a través de la membrana mitocondrial desde la subunidad α hacia el anillo c. Este paso de H⁺ va a provocar que el anillo c comience a rotar, provocando así cambios conformacionales en la subunidad hidrofílica del complejo ATP sintasa, favoreciendo la producción de ATP. Esta rotación se puede dar a una velocidad de 700 veces por segundo, dependiendo de factores como disponibilidad de sustratos, temperatura, entre otros; generando tres moléculas de ATP por cada giro de 360°. Sin embargo, la rotación del anillo c se ve inhibida por la oligomicina, que se une a esta estructura e impide su rotación (47).

La función de la ATP sintasa es formar moléculas de ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico a partir de la energía generada por la cadena respiratoria denominada *fuera protón-motriz* o pmf. Por el contrario, en casos de episodios patológicos como la hipoxia, la

fuerza protón-motriz no es la adecuada para que ocurra el proceso de generación de energía, lo que va a provocar el efecto contrario, las moléculas de ATP se van a hidrolizar dando como producto ADP y fosfato inorgánico, cayendo rápidamente los niveles de ATP intracelular. Para evitar que esto ocurra, el complejo mitocondrial va a unirse de manera irreversible al factor inhibidor o IF1, que cumple como función la inhibición total de la actividad de la enzima que contribuye a la hidrólisis del ATP (48).

El mecanismo de funcionamiento de esta estructura para la generación de ATP, involucra al anillo c, donde su rotación a una frecuencia de 300 Hz genera una energía que se transmite a través del tallo central hasta el dominio catalítico, implicando a su vez, una translocación de H^+ a través del dominio de membrana. En tres subunidades α - β del dominio catalítico, se van a encontrar los sitios catalíticos de la enzima, que es donde ocurre la formación de ATP impulsado por la energía producida en la rotación del anillo c (46). Para la formación de ATP, la porción F0 translocará iones H^+ o, dependiendo de la especie, iones Na^+ a través de la membrana, gracias a un potencial electroquímico. Cuando los iones H^+ se mueven hacia el citoplasma mientras ocurre la rotación del anillo en sentido de las agujas del reloj, se forzarán cambios conformacionales en F1, impulsando la síntesis de ATP. Sin embargo, la porción F1 también puede provocar el efecto contrario e hidrolizar ATP cuando la rotación del anillo es en sentido anti horario (49).

Un experimento pudo demostrar las ambigüedades de cómo ocurre la rotación en la porción F1 impulsada por ATP, en donde se unió el subcomplejo $\alpha_3\beta_3\gamma$ a F1, demostrándose que la rotación se generaba a partir de la repetición de cuatro etapas, que corresponden a: i) tiempo de espera de ATP, ocurriendo una pausa iniciada cuando la concentración de esta molécula es baja y donde la enzima, espera a que los niveles de ATP comiencen a aumentar, uniéndose al sitio catalítico. El siguiente paso es ii) una rotación rápida de 80° luego de la unión del ATP. Otro tiempo es el iii) espera, en el cual se va a producir la hidrólisis de ATP y finalmente, iv) una última rotación rápida de 40° (50, 51).

El modo en que la ATP sintasa se relaciona al mPTP es que puede unirse a componentes ya sea estructurales o funcionales, de este como son el translocador de nucleótidos de adenina y el fosfato inorgánico. Esto va a fomentar la producción y exportación de moléculas de ATP. Por otro lado, dentro de los reguladores de esta estructura se encuentra la CypD que se une a OSCP en el tallo periférico, afectando a la zona intramitocondrial a través de la reducción de la actividad hidrolítica de la ATP sintasa (46). Por otro lado, existe la proteína BCL-XL, una molécula que cumple la función de mejorar la actividad sintética del complejo ATP sintasa, por lo que se considera un regulador de esta estructura, siendo también un regulador del mPTP (43). Otro complejo que cumple la misma función es MCL-1, pero no se ha encontrado evidencia de si se une a alguna estructura de la ATP sintasa o si la regula de manera indirecta. Esta relación entre el mPTP y ATP sintasa sugiere que esta última estructura cumple un importante papel estructural o funcional dentro del poro (48).

A pesar de que se considera la ATP sintasa como una estructura molecular del mPTP, existen estudios que contradicen esta afirmación, ya que al eliminar subunidades como OSCP o b de esta proteína no altera el funcionamiento del poro. Además, la sensibilización por CsA se mantenía activa aún con la ausencia de OSCP, lo que sugiere que esta proteína no es la única que permite la interacción entre CypD y mPTP (52). Por otro lado, la eliminación del anillo c en las mitocondrias, no impide la activación del mPTP, siendo sensible a la CsA de manera normal, demostrándose que el anillo c no es un componente estructural del poro (53). Finalmente, otros ensayos que demostraron que la ATP sintasa no forma parte estructural del mPTP (54).

3. REGULADORES DEL PORO DE TRANSICIÓN DE LA PERMEABILIDAD MITOCONDRIAL

Para el funcionamiento celular adecuado, se necesitan reguladores esenciales para controlar la apertura del mPTP, ya sea actuando positiva o negativamente. Estas moléculas van a controlar constantemente, a través de vías de señalización, la susceptibilidad de las aberturas del poro por tiempo prolongado. Se han identificado una diversidad de componentes reguladores del mPTP, conociéndose el método de funcionamiento de cada uno de ellos, mencionando en primer lugar, a la ciclofilina D, proteínas Bax, Calcio, hexoquinasas, entre otras.

3.1. Ciclofilina D (CypD)

La ciclofilina D es una proteína globular que pertenece a la familia de las ciclofilinas, también conocidas como peptidil-prolil cis-trans isomerasa (PPIasa), compuesta por 206 residuos, con 2 α hélices que rodean las 8 láminas β en posición antiparalela. Es importante mencionar que una de las α hélices posee un triptófano necesario para la unión de la ciclosporina A (55). Reside en la matriz mitocondrial y tiene un tamaño aproximado de 19 a 22kDa siendo codificada por el gen *Ppif*. Se ve involucrada en la transmisión de señales y respuesta inmunitaria por lo que es considerada biológicamente importante. Además de eso, es una sensibilizadora del mPTP, regulando así el acoplamiento mitocondrial. La CypD también puede unirse a la ATP sintasa reduciendo la producción de moléculas de ATP. Otra de las funciones que desempeña en la mitocondria es la regulación de la expresión de genes pertenecientes a la misma, lo que lleva a la modificación en la diferenciación celular. Junto

con esto, regula la síntesis de ARN a nivel mitocondrial de la NADH deshidrogenasa, ATP sintasa y citocromo oxidasa (56).

La ciclofilina puede sufrir diversas modificaciones postraduccionales que le permiten modificar su función, de acuerdo al estado metabólico de la célula:

Fosforilación: el resultado obtenido va a depender del residuo fosforilado, por ejemplo, la glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK-3) puede fosforilar a la CypD favoreciendo así la apertura del mPTP. Cuando ocurre el proceso contrario y la GSK-3 se encuentra inhibida, no se favorecerá la apertura del poro por lo que puede ayudar en caso de cuadros de isquemia o hipoxia. Otro fosforilador de la ciclofilina es la serina/treonina quinasa 2, que la fosforila en el residuo serina 31. Además de las anteriores, se destaca la fosforilación de la ciclofilina D en el residuo serina 42 que otorga la capacidad de retener calcio y que ocurra la apertura del mPTP (57).

Acetilación: la acetilación de la ciclofilina D se desarrolla en el residuo de lisina 166 el cual puede desacetilarse mediante sirtuina 3 (SIRT3), que se presenta de manera importante en las mitocondrias. Una vez acetilada la ciclofilina D, ocurre una sensibilización del mPTP y a su vez la apertura prolongada de este, promoviendo de esta forma la muerte celular. Mientras que, la no acetilación de esta estructura generará el efecto contrario: evitará la apertura del poro y por ende la muerte celular. Todo este proceso de acetilación está dado por la presencia de una abundante cantidad de acetil-CoA.

S-nitrosilación: corresponde a una modificación postraducciona realizada con tiol que se une a un residuo de cisteína de la ciclofilina D. Asociado a este proceso, se han observado episodios de cardioprotección, es decir, resistencia a la muerte celular y ausencia

de la apertura del mPTP, sugiriendo así que la modificación con tiol es un elemento fundamental para la protección celular (58).

La ciclofilina puede unirse a PiC, VDAC y ciclosporina A (CsA) que como hemos visto, corresponden a proteínas reguladoras del poro. Esta interacción es clave para el funcionamiento del mPTP. Además de estas proteínas, la ciclofilina puede unirse a componentes de la ATP sintasa como OSCP, el portador de fosfato inorgánico y hasta el translocador de nucleótidos de adenina, por lo que se refuerza la idea de que esta estructura puede regular el mPTP a través de la ATP sintasa y otras estructuras (56). Otra molécula que puede unirse la CypD corresponde al fosfato inorgánico, esta formación del súpercomplejo tiene relevancia, debido a que cuando está unida únicamente la CypD al fosfato inorgánico, se unen a la membrana mitocondrial interna y en respuesta al estrés oxidativo, de manera tal que la probabilidad de apertura del mPTP aumenta considerablemente. Sin embargo, cuando es la CypD es reemplazada por CsA y existe un aumento de la concentración de fosfato inorgánico, va significar un impedimento para que ocurra la unión a la membrana mitocondrial interna, por lo tanto, la probabilidad de que se genere la apertura del poro disminuye (59). Este mismo proceso se presenta cuando la CypD se encuentra unida a ATP sintasa, específicamente a la parte OSCP del tallo lateral en presencia de fosfato inorgánico, donde ocurrirá una notoria disminución de la actividad enzimática. Por el contrario, cuando se une al mismo sitio la ciclosporina A desplazando a la CypD, ocurre el aumento considerable de la actividad enzimática, por lo que estas uniones corresponderían a una forma de regulación indirecta del mPTP (60).

A modo de resumen, en la figura 7 se muestran las diferentes funciones que posee la CypD, entre ellas se encuentran la regulación del mPTP, ya sea a través de la regulación y unión al anillo c, o dímeros de la ATP sintasa y la membrana mitocondrial interna. También, se regula la actividad de la fosforilación oxidativa a través de la interacción en la cadena respiratoria. Como es una proteína de andamio, la CypD puede unirse a diversas moléculas que cumplen funciones estructurales o regulatorias y así influir en su actividad, provocando

cambios en la fisiología mitocondrial. Finalmente, este complejo puede cumplir variadas funciones gracias a las modificaciones postraduccionales a las que se somete, que corresponden a, como se mencionó anteriormente, fosforilación, acetilación y s-nitrosilación.

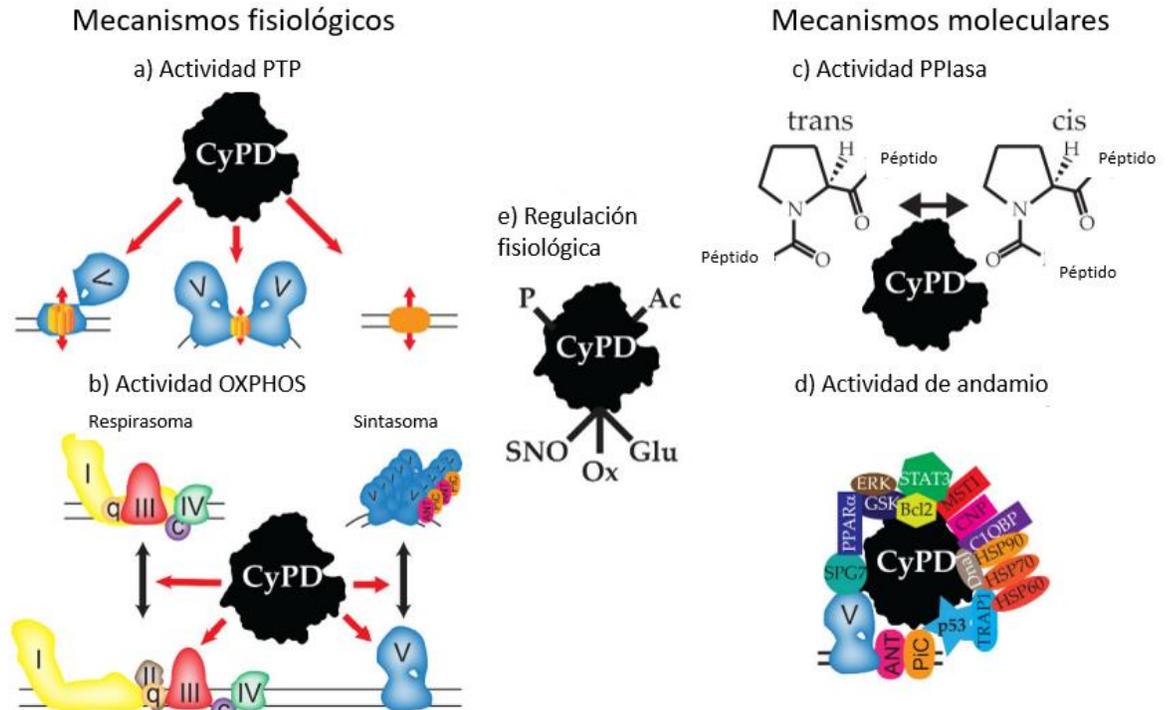


Fig 7. Funciones de la ciclofilina D. (a) regulación del MPTP en anillo c de ATP sintasa (izquierda), ATP sintasa (centro), MMI (derecha). (b) participación en la cadena transportadora de electrones. (c) actividad PPIasa como ciclofilina. (d) actividad de andamio. Tomada y modificada de (Porter, 2018) (61).

3.2 Proteína Bax

La proteína Bax corresponde a uno de los miembros pro-apoptóticos pertenecientes a la familia BCL-2, la cual, mediante la regulación de la permeabilidad de la membrana mitocondrial externa, van a controlar el proceso de apoptosis. Referente a su estructura, posee

tres dominios de homología que son BH1, BH2, BH3 y contiene 9 hélices α de naturaleza hidrófoba y están conectadas por bucles cortos. Normalmente esta proteína se encuentra posicionada en el citosol, sin embargo, al presentarse estímulos apoptóticos Bax va a sufrir un cambio conformacional desde un estado pasivo a un estado activo, introduciéndose paralelamente al interior de la membrana externa mitocondrial. Esto último está controlado por las hélices $\alpha 5$, $\alpha 6$ y $\alpha 9$, las dos primeras están organizadas en forma de horquilla de manera tal que se genera un canal en la superficie de la proteína Bax y en medio de este canal, se posiciona la hélice $\alpha 9$. Una vez posicionado en la membrana se va a unir en oligómeros y este proceso se va a denominar *punto de no retorno*, ya que esta unión va a provocar la formación de poros que van a permitir el paso descontrolado de moléculas, incluyendo elementos proapoptóticos (62).

La proteína Bax una vez insertada en la membrana mitocondrial externa puede unirse a otras proteínas presentes en la zona, la más común es el VDAC o las translocasas de membrana externa (TOM), lo que tiene relación con la regulación del mPTP. Además de las proteínas de la membrana mitocondrial externa, también pueden unirse a proteínas antiapoptóticas pertenecientes a la familia BCL-2 que son: Bcl-2 y Bcl-xL las cuales inhibirán su activación y evitarán el proceso de muerte celular (63).

En la figura 8 se aprecia el modelo de activación de Bax dado por otros miembros de la familia Bcl-2, que muestra la forma clásica (a) en donde Bax, representado en color azul, se encuentra localizado en el citosol unido a proteínas antiapoptóticas, identificadas en rojo. Al momento de presentarse una señal apoptótica, las proteínas inhibidoras de BH3 (color verde) se van a unir únicamente a las proteínas anti-apoptóticas, dejando a Bax libre, el cual va a ser guiado y regulado por las proteínas activadoras de BH3 representadas en color amarillo hacia la membrana mitocondrial externa, desencadenando entonces el punto de no retorno y liberación de citocromo c, que lleva a la muerte celular. Por otro lado, se encuentra el modelo de cebado (b) donde se encontrará la proteína Bax inactiva que luego interactuará con proteínas antiapoptóticas en la membrana mitocondrial externa, quedando en una

condición de pre-activación. También puede ser pre-activada por proteínas activadoras solo de BH3, una vez ocurrido esto, Bax tendrá la capacidad de permeabilizar la membrana generando el proceso de muerte celular (64).

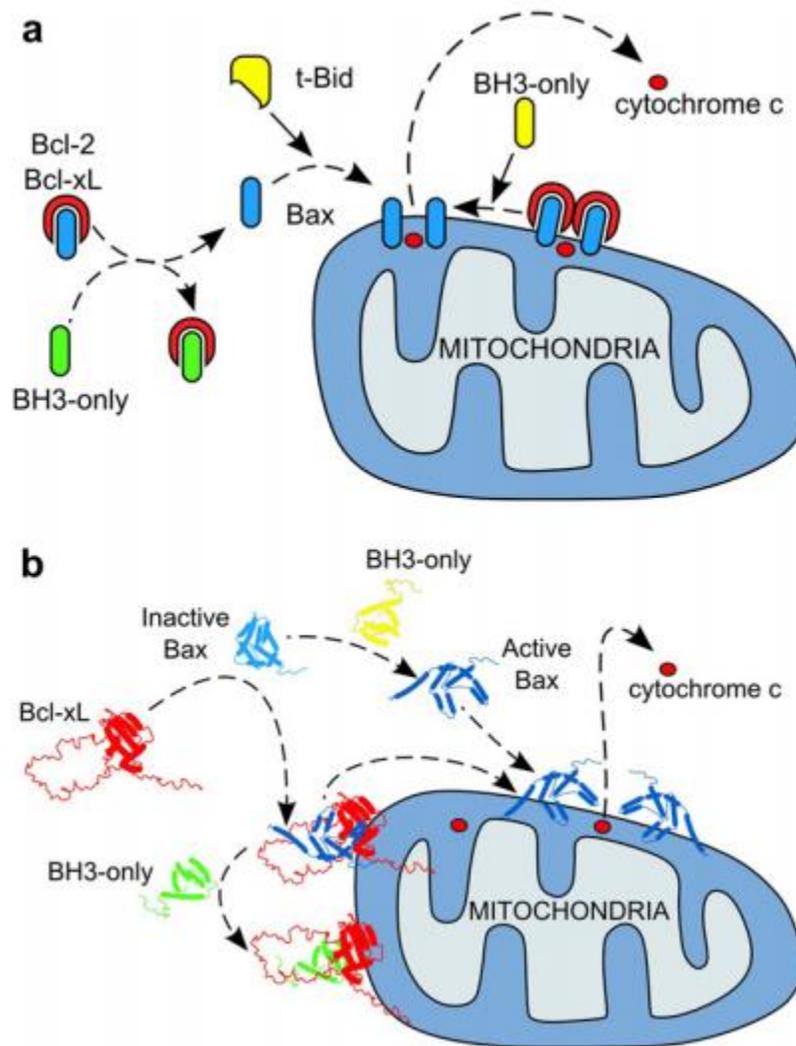


Fig 8. Mecanismos de activación de la proteína Bax. A) Se muestra la forma clásica de activación de Bax mientras en B) se representa el modelo cebado. Tomado de (Renault, 2011) (64).

Una vez activada la proteína Bax, va a sufrir un cambio conformacional desde una estructura globular hacia una extendida, lo que, mediante la inserción del dominio C-terminal, va a permitir un anclaje adecuado a la membrana mitocondrial externa. Además de esto, Bax puede formar dímeros inactivos al unirse la región N-terminal de un monómero con C-terminal del otro, la cual se disocia una vez que la proteína se ancla a la membrana mitocondrial externa, una vez que se activa (65).

A pesar de que Bax participa activamente en la regulación del poro al interactuar con moléculas estructurales de este como VDAC o ANT, existe controversia sobre si se puede considerar un regulador del mPTP como tal, ya que, a pesar de interactuar con estos componentes, también es capaz por si solo controlar la permeabilidad de la membrana mitocondrial externa, independientemente de la presencia del poro (66).

3.3 Calcio (Ca^{2+})

El calcio (Ca^{2+}) es considerado como uno de los principales activadores del mPTP. Este electrolito ingresa a la mitocondria impulsado por el potencial de membrana mitocondrial. Sin embargo, un estudio determinó otra vía de entrada de Ca^{2+} a la matriz mitocondrial, a través de una proteína antes denominada CCDC109A, llamado posteriormente *uniportador de Ca^{2+} mitocondrial* (MCU) (67). Este canal tiene una arquitectura en forma de pentámero con dos dominios transmembrana orientando sus extremos N y C en la matriz mitocondrial, ubicando el resto de su estructura en el interior de la membrana mitocondrial interna, es altamente selectivo y dependiente del potencial de membrana. Los componentes moleculares del complejo MCU corresponden a tres subunidades: la subunidad formadora de poros del complejo uniportador de Ca^{2+} mitocondrial contenida en el dominio transmembrana (TM), MCUB que es su parólogo inactivo que cuando es sobreexpresado disminuye considerablemente la captación de Ca^{2+} y un regulador fundamental denominado EMRE.

Junto con esto se establecen dos reguladores solubles que son MICU1 y MICU2, teniendo más afinidad por el Ca^{2+} el primero de ellos (68).

Se ha demostrado que el canal MCU es sensible al rojo de rutenio, que al unírsele provoca la inhibición del canal transportador de Ca^{2+} . Por ello, es posible inhibir la apertura del mPTP por esta vía, demostrándose que al encontrarse inhibido el MCU, se reduce la acumulación de Ca^{2+} otorgando protección al corazón ante la lesión por isquemia y reperfusión (69).

La proteína 1 de absorción de Ca^{2+} mitocondrial o MICU1 cumple la función de censar las concentraciones de Ca^{2+} citosólico; cuando este aumenta sobre concentraciones de 1 a 2 $\mu\text{mol/L}$ se va a provocar la apertura del canal MCU y por ende ocurrirá la entrada de Ca^{2+} a la mitocondria en un intento de equilibrar las concentraciones entre la matriz mitocondrial y el citosol. Por otro lado, el regulador del uniportador de Ca^{2+} mitocondrial o MCUR1 controlará positivamente al canal, promoviendo la absorción de Ca^{2+} en las mitocondrias (70). Otro regulador de importancia corresponde a EMRE, una proteína de 10 kDa que cumple un rol fundamental en la captación de Ca^{2+} por parte del MCU ya que participa en la apertura de este canal a través del censo de niveles de Ca^{2+} , además de mediar la interacción de los reguladores MICU1 y MICU2 con MCU (71). En la figura 9 se muestra el transportador MCU en sus estados abierto y cerrado con sus respectivos interactuantes que le permiten unir al Ca^{2+} y transportarlo hacia la matriz mitocondrial.

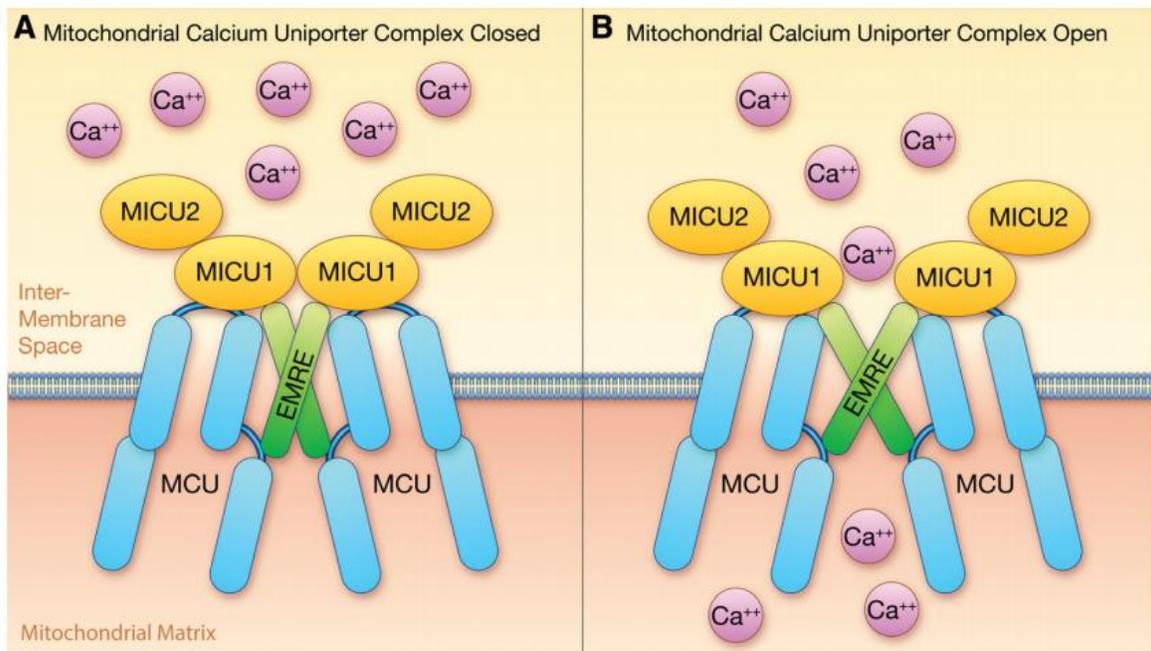


Fig 9. Complejo MCU en sus conformaciones abierto y cerrado. A) apertura del uniportador de Ca²⁺ mitocondrial con participación de EMRE, unido a MCU se encuentra MICU1 con función de censar concentraciones de Ca²⁺. B) estado cerrado del canal MCU. Tomado de (Bauer, 2020) (72).

Por otro lado, el NCLX es un intercambiador mitocondrial de iones Na⁺/Ca²⁺ que se ubica en la membrana mitocondrial interna, cuya función radica en la salida del Ca²⁺ mitocondrial de las células excitables. Este transportador de iones es de baja afinidad y una alta capacidad que utiliza un gradiente electroquímico de los iones Na⁺ para que el Ca²⁺ salga de la mitocondria (73). Considerando que la salida de Ca²⁺ es mucho más lenta que el influjo mediado por el MCU, el NCLX posee un rol de mediador en la homeostasis del Ca²⁺ mitocondrial. Es por esto que la delección de NCLX está asociada a fenotipos más graves de disfunción cardíaca e insuficiencia cardíaca fulminante (74). Este intercambiador es regulado por distintos mecanismos como la concentración del Ca²⁺, mediante mecanismos directos o indirectos como la degradación inducida por calpaína, el pH, PKC o PKA (75).

En relación a las funciones que cumple el Ca^{2+} en el interior de la mitocondria, en primer lugar, participa en la regulación de la producción de energía que puede ser a través del ciclo de Krebs, donde el Ca^{2+} aumenta la actividad de la piruvato deshidrogenasa y la α -cetoglutarato deshidrogenasa, lo que llevará a un aumento de NADH mitocondrial, que se ocupará como en la cadena transportadora de electrones, aumentando así la generación de ATP. Otra de sus funciones corresponde a la activación de enzimas proteolíticas ubicadas en la mitocondria, como las calpaínas I, II, IV y X, que en condiciones de reperfusión, debido a la concentración de Ca^{2+} elevada, va a conducir a las mitocondrias a la vía apoptótica (76).

El retículo endoplasmático es el organelo que contiene grandes cantidades de calcio almacenadas que pueden ser liberadas ante condiciones extremas como, por ejemplo, el estrés oxidativo dado por la exposición a radicales del oxígeno induciendo la entrada deliberada de Ca^{2+} al interior de la célula y también su liberación desde el compartimento intracelular. Por lo tanto, cuando se interrumpe el ciclo normal de flujo de calcio entre el interior y exterior de la mitocondria, se provoca un aumento sostenido de este en la mitocondria, ocurriendo la activación del mPTP, lo que trae como consecuencia una alteración en el gradiente de protones e inflamación de las mitocondrias, que llevan a su posterior destrucción y muerte celular por necrosis (70).

3.4 Especies reactivas del oxígeno (ROS)

Anteriormente se creía que las especies reactivas del oxígeno (ROS) eran participes únicamente de enfermedades o afectaciones patológicas de tipo neurológicas, cardiovasculares e incluso cáncer. Sin embargo, también se ha encontrado que ROS participa en procesos fisiológicos y modulación de vías de señalización donde se encuentra involucrado el peróxido de hidrogeno (H_2O_2) el cual, al ser soluble en lípidos puede difundir fácilmente a través de las membranas y va a actuar como una molécula de señalización de

segundo mensajero mediante la oxidación de proteínas blanco, las cuales finalmente, al encontrarse ante la presencia de alteraciones de la homeostasis local, a través de cambios conformacionales e interacciones moleculares van a reaccionar a estas y responder adecuadamente (77).

ROS participan en múltiples procesos de crecimiento, diferenciación y proliferación de organismos celulares. Cuando existe una excesiva producción de estos sin modificarse su eliminación normal, va a ocurrir un aumento de ROS que sobrepasan los niveles normales o fisiológicos necesarios para el funcionamiento normal de la célula, llamándose a este evento “estrés oxidativo”, el cual puede ser responsable del aumento significativo de Ca^{2+} y, por ende, la apertura prolongada del mPTP (78). La primera justificación que relaciona esta teoría, es que debido al estrés oxidativo se observará un aumento de calcio citosólico por liberación desde depósitos intracelulares, por lo tanto, como la matriz mitocondrial mantiene una concentración de Ca^{2+} , cuando este aumenta a nivel del citosol, como método de regulación de la homeostasis, se va a provocar la apertura del poro para el ingreso de este electrolito, deprimiendo la función mitocondrial y generando posteriormente daño que la puede llevar a la muerte celular. Otra posibilidad existente es que, el ANT presente en la membrana mitocondrial interna, los grupos tiol presentes se van a oxidar y formar reticulaciones en presencia de calcio. Esta oxidación del ANT, por lo tanto, van a inducir la acción de ROS en la mitocondria y en consecuencia, la apertura del poro (79).

En un estudio realizado con indicadores fluorescentes como TMRM y TMRE en la matriz mitocondrial, se generaron ROS con luz y se mostró como estos afectan la despolarización dependiente de mPTP, en donde se demostró que la presencia de ROS genera, en primer lugar, la apertura transitoria del poro y posteriormente, su apertura permanente, los cuales también fueron inhibidos por el regulador ciclosporina A (CsA). Sin embargo, todo este proceso fue observado principalmente en mitocondrias individuales, por lo que también se demuestra que no existe una red acoplada de mitocondrias (80). Respecto a lo último mencionado, como consecuencia de la apertura del poro, se va a producir un

aumento de ROS, este proceso es mediado por el succinato, el cual aumenta la producción de estas especies después, en lugar de antes de la apertura del mPTP, llevando por lo tanto a una mayor apertura de poros en mitocondrias adyacentes, lo que sugiere que en realidad estas estructuras no están conectadas, sino que existe un acontecimiento en común que provoca la misma reacción en cada mitocondria (81).

Se ha relacionado ROS con el envejecimiento celular, ya que es probable que debido al aumento de ROS ocurra la oxidación de proteínas y lípidos asociados al mPTP que promuevan la apertura de este durante el envejecimiento. La cardiolipina corresponde a un fosfolípido presente en la membrana mitocondrial y es susceptible a la peroxidación lipídica a medida que la célula envejece. Una vez oxidada, actúa como sensibilizador de las mitocondrias a la apertura del mPTP, a través de la salida del Ca^{2+} , ya que la capacidad de retención de este por parte de las mitocondrias disminuye con el envejecimiento (82). Otro de los mecanismos que implican a ROS a la muerte celular, ocurre cuando existe una alta cantidad de estos en el medio, provocando una lesión considerable en las membranas mitocondriales. Como consecuencia de esto, se va a producir la liberación de una serie de proteínas que, en estados fisiológicos, se encuentran en la matriz mitocondrial, pero pasan a ser proteínas proapoptóticas cuando ocurre su liberación al citosol. Estas proteínas son el citocromo c, Smac/DIABLO y Omi/HtrA2 (serina peptidasa HtrA2 mitocondrial). Cuando el mPTP se abre, se va a producir hidrólisis de ATP y desregulación de homeostasis iónica por el excesivo paso de estas a través del poro, generando finalmente, hinchazón mitocondrial por la presión oncótica provocada por proteínas de la matriz que no pueden transportarse cuando el poro se encuentra en estado abierto. Esta hinchazón de las mitocondrias va a llevar a la ruptura de la membrana externa y la liberación de estas proteínas proapoptóticas (83).

3.5 Hexoquinasas (HK)

Las hexoquinasas (HK) adquieren un importante papel durante los episodios de isquemia/reperfusión. Durante este episodio, las células se encuentran en un periodo de hipoxia, por lo que la producción de energía se realiza principalmente por vía de la glucólisis anaerobia. En estas condiciones, la HK participa en la transformación de glucosa a glucosa-6- fosfato (G6P). Además de esta función, también se ha atribuido como un importante regulador de la apertura del mPTP, esto debido a que dos de sus isoformas, HK1 y HK2 adquieren propiedades antiapoptóticas cuando se unen al VDAC presente en la membrana externa mitocondrial y que, como fue mencionado anteriormente, se considera una parte estructural del poro (84).

Existen cuatro isoformas conocidas de las HK: HK1, HK2, HK3 y HK4. La primera se encuentra principalmente en tejido cerebral y facilita el proceso de glucólisis, mientras que la segunda predomina en músculo esquelético y cardiomiocitos con participación anabólica proporcionando G6P para la producción de glucógeno. Ambas poseen un extremo amino-terminal hidrófobo que le permite la interacción con mitocondrias, propiedad que no se encuentra en las otras dos hexoquinasas. Durante la unión con las mitocondrias, HK2 es regulada por quinasas como Akt, Glucosa-6P (G6P) y glucosa, por lo tanto, corresponde a un proceso intermitente (85).

Existen diferentes mecanismos en los que HK desarrolla efectos citoprotectores cuando se une a VDAC, que pueden ser directos o indirectos y permiten que el gasto de moléculas energéticas sea más lento en episodios de isquemia.

El primero corresponde a la interferencia con la translocación de proteínas proapoptóticas Bax a VDAC. Cuando la proteína inductora del proceso de apoptosis se une

a VDAC, genera un mega canal en la membrana mitocondrial externa, lo que permite el paso de moléculas grandes, incluido el citocromo c. HK actúa evitando que las proteínas Bax pasen desde el citoplasma a la membrana mitocondrial externa para unirse a VDAC (86).

El segundo mecanismo corresponde a la reducción del consumo inútil de ATP por la ATP sintasa. Durante condiciones de isquemia, la proteína ATP sintasa comienza a funcionar de manera inversa, en lugar de producir ATP lo va a hidrolizar en un intento de equilibrar el potencial de membrana. Las HK van a actuar uniéndose a VDAC, promoviendo y manteniendo una conformación cerrado del canal, de esta manera, se impedirá el paso de moléculas energéticas a través de la membrana mitocondrial externa para su posterior destrucción. Adicionalmente, si el VDAC se encuentra en estado abierto, las HK van a desfosforilar las moléculas de ATP a ADP, de esta forma ingresarán a la matriz mitocondrial y no podrán ser usadas por la ATP sintasa. Junto con esto, el proceso de desfosforilación de estas moléculas, las HK van a generar G6P adicional que será utilizado para la producción de moléculas de ATP. Sin embargo, también puede ser utilizada en la vía de las pentosas fosfato para producir NADPH.

El tercer mecanismo es que las HK van a evitar el agotamiento de energía a través de la estimulación de la adenilato quinasa, la cual utilizará el ADP ingresado al interior de la membrana mitocondrial y producirá moléculas de ATP que luego serán exportadas fuera de la mitocondria por el VDAC para apoyar los procesos bioenergéticos desarrollados en el citoplasma (87).

3.6 Proteína translocadora (TSPO)

La proteína translocadora (TSPO) anteriormente denominada *receptor periférico de benzodiazepinas*, es una proteína de 18 kDa que reside en la membrana mitocondrial externa y está vinculada con el transporte de colesterol a través de esta membrana, además de una función implicada en la síntesis de esteroides. Corresponde a una proteína helicoidal que posee cinco α -hélices transmembrana y su extremo C-terminal está en dirección al citoplasma, mientras que su extremo N-terminal, como lo muestra la fig. 10, se encuentra en dirección al interior mitocondrial. Las hélices se observan con torceduras por la presencia de residuos de prolina (88).

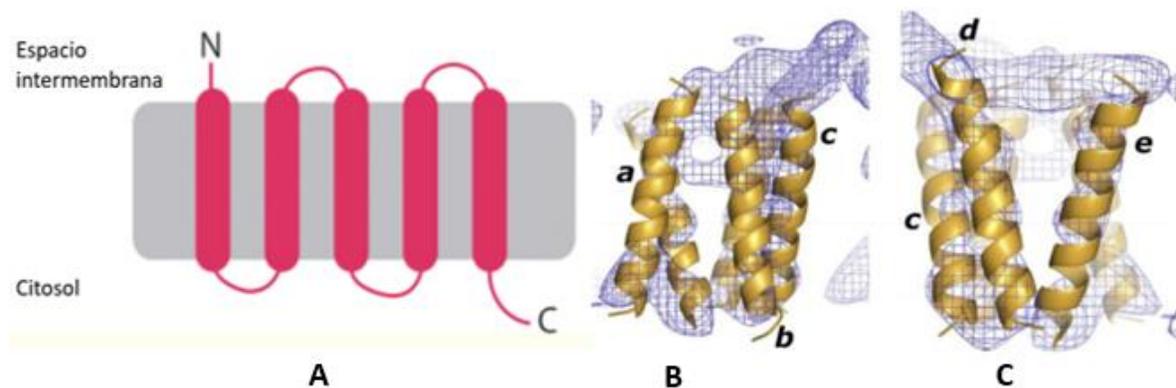


Fig 10. Estructura de la proteína translocadora. A) se observa la estructura básica con sus cinco hélices transmembrana y los extremos N y C- terminal fuera de la membrana mitocondrial. B-C) se observan las α -hélices en el monómero de TSPO al interior de la membrana mitocondrial. Tomado y modificado de (Gatliff, 2017) (89).

Inicialmente, era sugerido que la TSPO actuaba regulando al mPTP indirectamente a través de sus ligandos como PK11195, Ro5-4864 y PP IX pero dependía de las condiciones ambientales y la concentración utilizada. El primer ligando actuaba como antagonista, mientras que el segundo como agonista en el mismo tipo de células. Además de la regulación

por ligandos, se asociaba por la unión con el VDAC y el translocador de nucleótidos de adenina regulando directamente al mPTP a través de sus componentes moleculares (90).

Todo esto fue contrarrestado con un estudio donde se demostraba que TSPO no juega ningún papel en la regulación del poro y también que los ligandos no controlaban su apertura y finalmente, que las células cardíacas que carecen de esta proteína son igual de sensibles a la lesión por isquemia/reperfusión que aquellas que sí la presentaban. Sin embargo, en este mismo estudio se demostró que algunos ligandos de TSPO pueden unirse a la ATP sintasa, por lo que, de alguna forma, sí podría participar en la regulación del mPTP (91).

4. PATOLOGÍAS ASOCIADAS AL PORO DE TRANSICIÓN DE LA PERMEABILIDAD MITOCONDRIAL

La permeabilización de la membrana mitocondrial constituye un paso importante en la activación de la muerte celular, ya sea por vía necrótica o apoptótica. La definición de la vía que se tomará para la muerte celular, va a depender del modo en que se alteran las membranas, por ejemplo, la permeabilización de la membrana externa mitocondrial por proteínas. Estas proteínas como Bcl-2, Bax, Bak, factores proapoptóticos intramitocondriales como el citocromo c y smac/DIABLO, van a conducir a la destrucción celular por la vía apoptótica. Por otro lado, la elevada cantidad de Ca^{2+} y la presencia de ROS, van a conducir a un desequilibrio de la membrana mitocondrial interna, que va a conllevar una detención de la producción de ATP, disipación del potencial de membrana, alteración de la cadena respiratoria, inflamación de orgánulos y finalmente, la ruptura de la membrana externa, llevando así, a la muerte celular por necrosis.

4.1 Lesión por isquemia y reperfusión

El proceso de isquemia y la reperfusión es una patología caracterizada inicialmente por la restricción del suministro sanguíneo a un órgano, luego, esta restricción es restaurada con el consecuente re-oxigenación de tejidos. Esta oclusión de la circulación sanguínea puede darse por la formación de algún trombo o también durante episodios de apnea obstructiva del sueño, generando hipoxia tisular y una respuesta inflamatoria a la que se le denomina *lesión por reperfusión*. Esta lesión contribuye al desarrollo de diferentes patologías como, por ejemplo, paro cardíaco. Además, la condición de isquemia/reperfusión en un órgano, puede desencadenar la activación inflamatoria en otros órganos, lo que podría finalmente llevar a un episodio de falla multiorgánica (92). Esta condición, está estrechamente relacionada con

el mPTP, debido a que durante la reperfusión y por la presencia de altos niveles de ROS y Ca^{2+} generados, el poro iniciará su apertura de manera prolongada, permitiendo el desequilibrio homeostático entre el medio intra y extra mitocondrial, llevando, por lo tanto, a los procesos patológicos posteriores que culminan en la muerte celular.

Frente a condiciones fisiológicas, la apertura del mPTP en el corazón contribuye a la señalización de ROS, el desarrollo de cardiomiocitos y el control del ingreso o salida de calcio mitocondrial para la realización de procesos biológicos, además, de la generación de un potencial transmembrana a partir de los equivalentes reductores generados por el ciclo del ácido tricarboxílico, para el proceso de síntesis de ATP (93). Sin embargo, en condiciones patológicas, como es el proceso de isquemia en los cardiomiocitos, se detiene el funcionamiento de la cadena respiratoria y síntesis de ATP por la falta de oxígeno, lo que trae como consecuencia, una caída considerable en los niveles de la molécula energética en el corazón. Esta deficiencia llevará al piruvato a transformarse en ácido láctico por glucólisis anaerobia, acidificando el medio y reduciendo el pH intracelular. Como se observa en la figura 10, el pH provoca el aumento de sodio a nivel intracelular, ya que, a modo de equilibrar el pH, el intercambiador Na^+/H^+ (NHE) intentará transportar iones hidrogeno al medio extracelular, lo que conlleva a una elevada concentración de Na^+ citosólico. Esta sobrecarga de sodio no se equilibra rápidamente, ya que cesa la bomba Na^+/K^+ por falta de ATP, por lo que el Na^+ es equilibrado por el intercambiador sarcolémico $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$ provocando una sobrecarga de Ca^{2+} intracelular lo que conlleva a una apertura prolongada del poro, junto a la entrada de agua por el desequilibrio osmótico. Como consecuencia final, habrá presencia de edemas al interior de la célula, hinchazón celular y rompimiento de membranas (94).

Esto se relaciona con el mPTP, ya que como fue mencionado anteriormente, los principales inductores de la apertura de este son las ROS y la sobrecarga de Ca^{2+} . Estas, además, son contribuyentes de la lesión por reperfusión. El primer lugar, el estrés oxidativo reduce la disponibilidad de óxido nítrico (NO), el cual cumple la función de inactivar radicales superóxido y participa disminuyendo la reperfusión del flujo sanguíneo del

miocardio. Además de esto, posterior a la recirculación de oxígeno después de la reperfusión, se provocará a un aumento de ROS que induce aún más la apertura del poro. Por otro lado, las altas concentraciones de Ca^{2+} aumentan aún más cuando se restauran los niveles de oxígeno luego de la lesión por isquemia/reperfusión ya que al momento del proceso de daño se deteriora el retículo sarcoplásmico por el estrés oxidativo, lo que genera una liberación excesiva de Ca^{2+} (95).

Además de esto, la presencia de ROS activa las MAP quinasas JNK, p38 y ERK, conllevando a la fosforilación y activación del intercambiador Na^+/H^+ (NHE), iniciándose todo el proceso, que trae como consecuencia el continuo aumento de Ca^{2+} citosólico en la lesión por isquemia/reperfusión. Por otro lado, al encontrarse elevada la actividad de la quinasa JNK, fosforila directamente los complejos respiratorios mitocondriales, aumentando así la producción de ROS, p38, por el contrario, posee un efecto cardioprotector, ya que inhibe el uniportador de calcio, evitando la acumulación del mismo a nivel mitocondrial, sin embargo, en células neuronales posee un rol totalmente diferente, activando y movilizand o moléculas proapoptóticas a las mitocondrias (96).

El desequilibrio de la permeabilidad mitocondrial es provocado por la fuga de iones H^+ . Este hecho, generará la producción de especies reactivas del nitrógeno (RNS) como el peroxinitrito (ONOO) lo que trae como consecuencia, un aumento sostenido de fuga de iones H^+ . Además, los productos de oxidación lipídica pueden activar a las proteínas de desacoplamiento mitocondrial (UCP mitocondriales), las cuales tienen como función transportar aniones desde la membrana mitocondrial interna a la externa o viceversa y además regulan la permeabilidad mitocondrial. Como se puede observar en la Figura 10, la proteína quinasa dependiente de AMP (PKA), puede activar a la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS), generando RNS, que bajo condiciones patológicas inhiben la cadena transportadora de electrones (97).

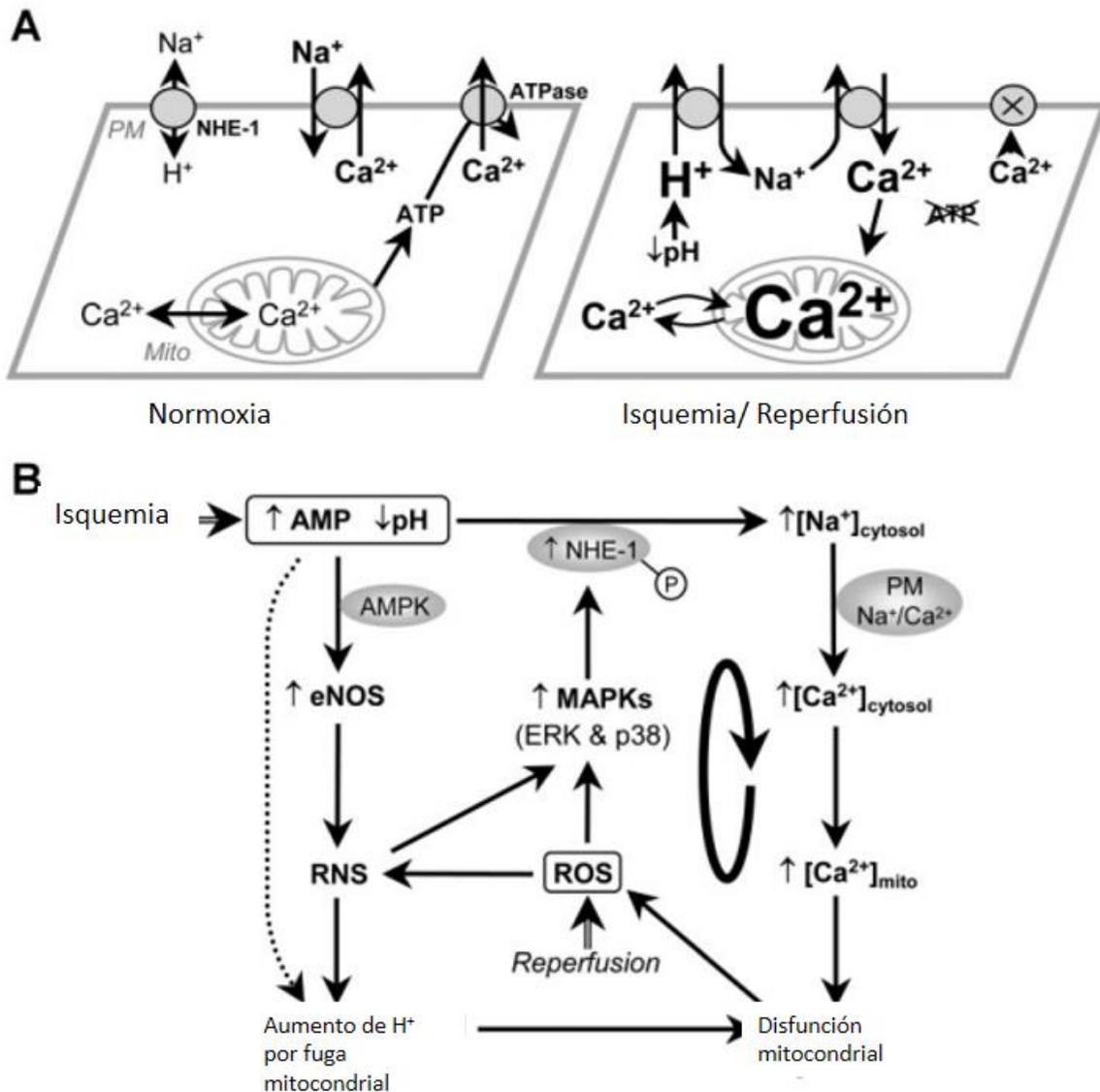


Fig 11. Calcio y ROS en la lesión por isquemia/reperfusion en mitocondrias cardiacas. A) Muestra condiciones fisiológicas en donde el transportador Na⁺/Ca²⁺ funciona de manera adecuada, mientras que en procesos de isquemia/reperfusion se muestra el transportador Na⁺/Ca²⁺ realizando la función contraria. B) Liberación y activación de eNOS y ROS por aumento de AMP en lesión por isquemia. Tomado y modificado de (Brookes, 2004) (95).

Para la preservación del funcionamiento cardiovascular es necesario el control mitocondrial, esto debido a que, en primer lugar, el flujo de Ca²⁺ es imprescindible para la actividad cardiaca, por lo que desregulaciones en la homeostasis de este metabolito pueden

causar graves afectaciones en el corazón. En segundo lugar, las células cardíacas dependen mayoritariamente de la fosforilación oxidativa para la generación de energía, la que se puede ver perjudicada con la alteración de la permeabilidad mitocondrial (98). Por último, la acumulación de mitocondrias defectuosas en el cardiomiocito puede desencadenar procesos de muerte celular programada debido a la liberación de proteínas proapoptóticas que llevarán a la pérdida patológica de tejido (99). Es por estas razones que las mitocondrias asumen un importante rol como desencadenantes de enfermedades cardiovasculares, tales como arritmias, aterosclerosis, infarto agudo al miocardio, hipertensión, entre otras afectaciones cardíacas y vasculares (100).

Como las mitocondrias están ampliamente relacionadas a las afecciones cardíacas más comunes, han sido objeto de estudio farmacológico en los últimos años. Una de las terapias dirigidas a las mitocondrias es el aminoácido L-arginina el que puede aumentar la eficiencia cardíaca y mejorar considerablemente el ciclo del TCA a través del suministro de 2-oxiglutarato, pudiendo, por lo tanto, ser usado en pacientes con miocardiopatía mitocondrial (101). Por otro lado, se encuentra como potencial agente terapéutico el dicloroacetato (DCA), el cual cumple como función la estimulación de la enzima piruvato deshidrogenasa (PDH) que desvía el piruvato hacia el proceso de fosforilación oxidativa. Sin embargo, se concluyó que solo puede ser utilizado eficazmente en personas con deficiencia de PDH (102).

En cuanto a fármacos que interactúan directamente con el mPTP, principalmente se considera a la CsA, la cual se une a ciclofilina D, inhibiendo la apertura del poro y, por lo tanto, las consecuencias que esto conlleva, confirmando protección contra la lesión por isquemia/reperfusión en células cardíacas y corazones intactos (103), reduciendo al menos 20% de infarto al administrarla antes de la intervención coronaria percutánea (104). Un estudio reciente incluye a el curculigósido como un fármaco protector en la reperfusión miocárdica. El curculigósido es un antioxidante glucósido fenólico que ejerce efectos antiinflamatorios y antitumorales, extraído de *Curculigo orchoides* Gaernt, una hierba

tradicional China, demostrándose también, que el curculigósido puede inhibir el estrés oxidativo producido por peróxido de hidrógeno (105). En el estudio fue posible observar que este antioxidante ejerce efectos protectores contra la lesión por isquemia/reperfusión miocárdica, dependiendo de la dosis administrada, ya que es capaz de inhibir la apertura del mPTP alterando su sensibilidad al Ca^{2+} , junto con la disminución de la expresión de proteínas asociadas a la apoptosis (106).

En general, existe una gran cantidad de medicamentos que en estudios *in vitro* demuestran gran eficacia en cardioprotección a través de mecanismos mitocondriales, como xantina oxidasa alopurinol y mercaptopropionil glicina (107, 108). Sin embargo, son descartados debido a que no han tenido éxito en los ensayos clínicos.

4.2 Enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer es un trastorno neurodegenerativo que ocurre frecuentemente en personas de edad avanzada y que produce déficits cognitivos severos por acumulación extracelular e intracelular de beta amiloide ($\text{A}\beta$) en el parénquima y vasos cerebrales, provocando graves afectaciones neuronales (109). Solo un pequeño porcentaje de personas que padecen esta enfermedad portan genes con mutaciones asociadas a esta, mientras que mayoritariamente aparece de manera esporádica en personas susceptibles. El depósito de $\text{A}\beta$ va a provocar la generación de ROS y desequilibrio en la homeostasis del Ca^{2+} intracelular. Además, $\text{A}\beta$ puede ingresar a las mitocondrias y unirse a CypD. Estos tres factores van a influir directamente en la apertura del mPTP, desencadenando la liberación de factores proapoptóticos y lesiones en las membranas mitocondriales (110).

Durante su agregación, el A β genera productos oxidantes, los cuales van a afectar la función de la Na⁺/K⁺ ATPasa y ATPasa cálcica, esta última genera una desregulación del canal de Ca²⁺ sensible al voltaje tipo L (LVSCC), el receptor del ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilisoxazol-4-propiónico (AMPA), N-receptor de D-aspartato de metilo (NMDAR) y también receptores de 1,4,5-trifosfato de inositol, lo que provoca un significativo aumento el flujo de Ca²⁺ hacia el citosol (111). Este aumento de Ca²⁺ a nivel intracelular causa una sobrecarga además de Ca²⁺ mitocondrial que genera un aumento de la producción de ROS mitocondriales. Por lo tanto, las mitocondrias estarán siendo afectadas por ROS exógenas que son inducidas por el A β y por ROS originados en la mitocondria, perturbando en conjunto los niveles de calcio mitocondrial que, a su vez, conducirán a mayor producción de ROS en la mitocondria (112).

Los niveles de Ca²⁺ extracelulares se encuentran en mucha mayor concentración que los niveles citosólicos, aunque en el retículo endoplasmático (RE) se encuentra una gran reserva de este catión. El retículo puede ser activado por receptores de rianodina (RyR), que a su vez son sensibles a cambios en el Ca²⁺ citosólico específicamente a la liberación de Ca²⁺ inducida por Ca²⁺ (CICR), la cual tiene un efecto amplificador por el aumento de la expresión de canales iónicos transportadores de Ca²⁺ como los receptores NMDA o los canales de calcio dependientes de voltaje, aumentando considerablemente los niveles de Ca²⁺ citoplasmático (113). Aunque en estados fisiológicos normalmente este aumento suele eliminarse rápidamente del citosol, en condiciones fisiopatológicas, como en la mutación del gen de la presenilina 1 (PS1), en la cual ocurrirá una mayor expresión de RyR que elevará considerablemente los niveles de Ca²⁺ citosólico, los cuales no podrán ser eliminados en el tiempo que es requerido para mantener una homeostasis, por lo que se producirá un aumento sostenido de niveles de este componente desencadenando las reacciones adversas que conlleva el aumento de Ca²⁺ (Figura 12) (114). Esta alteración en la liberación de Ca²⁺, va a afectar directamente en la activación del mPTP llevando, por lo tanto, al proceso de muerte celular y neurodegeneración.

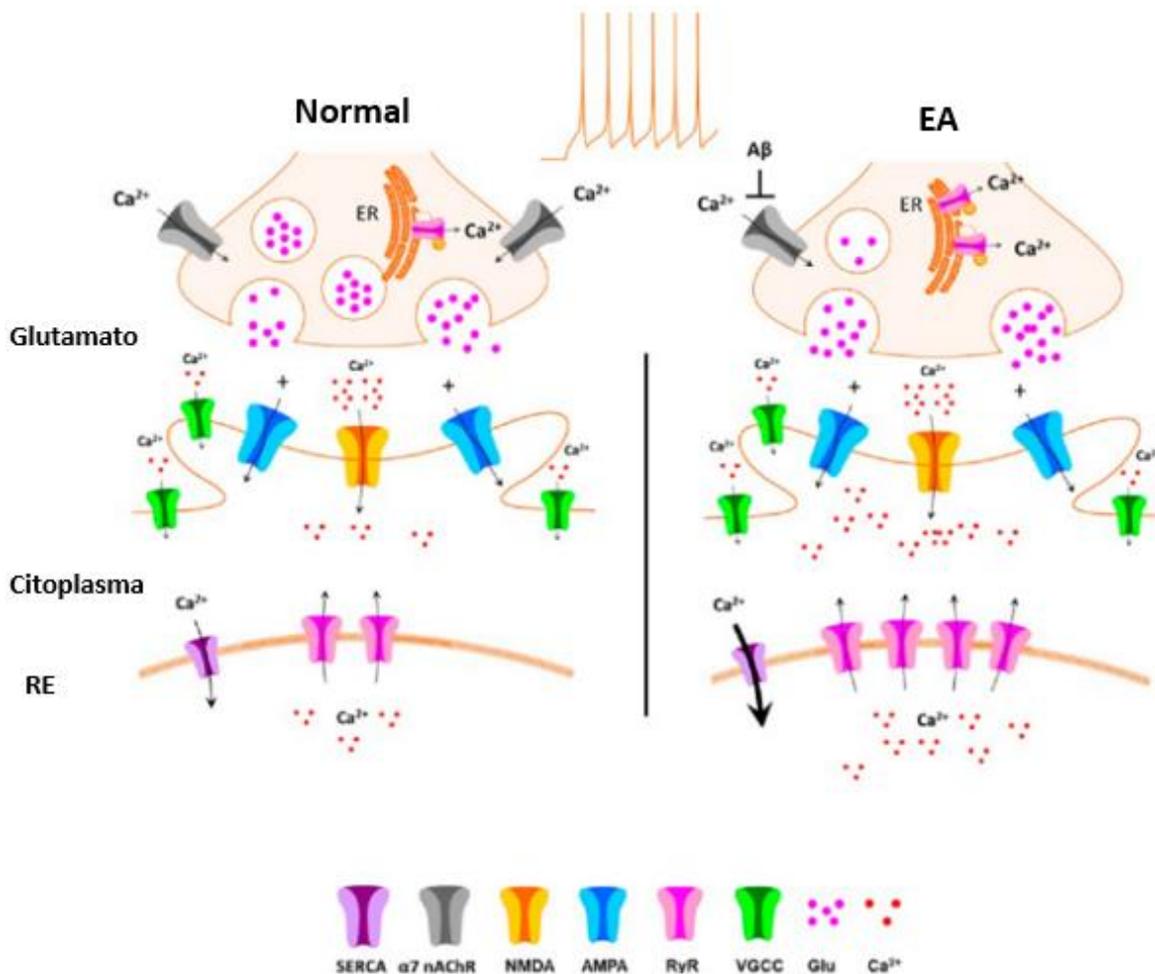


Fig 12. Esquema de desregulación sináptica del Ca^{2+} en EA. Se muestra un cuadro comparativo en condiciones fisiológicas y fisiopatológicas, en la izquierda se observa que, en condiciones normales, el aumento presináptico de Ca^{2+} libera neurotransmisores, mientras que la activación de $\alpha 7$ nAChR y la liberación de RyR también desencadenan la liberación de Ca^{2+} , mientras que, frente al Alzheimer, la probabilidad de liberación del neurotransmisor glutamato por CICR inducida por RyR provocará el agotamiento de las reservas de Ca^{2+} en las vesículas. Por otro lado, $A\beta$ se une a $\alpha 7$ nAChR disminuyendo su expresión. Todos estos factores van a provocar un aumento de Ca^{2+} inducidos por estímulos. Tomado y modificado de (McDaid, 2020) (115).

Otra forma de relación entre el mPTP y la EA corresponde a la pérdida selectiva de la subunidad que confiere sensibilidad a la oligomicina que forma parte de la ATP sintasa. Esta subunidad interactúa con el $A\beta$ produciéndose una alteración en OSCP en cerebros

humanos con Alzheimer (116). Esta pérdida de OSCP genera una disminución en la generación de ATP, aumentando la producción de ROS y activando el poro. Por otro lado, la restauración de esta subunidad corrige las alteraciones mitocondriales humanas que son mediadas por A β , por lo que podría ser considerado como un objetivo terapéutico contra Alzheimer al estabilizar OSCP (117). Además de la implicación de una de las subunidades de la ATP sintasa, existen otros componentes moleculares del mPTP que están involucrados en la EA, uno de ellos es ANT que puede unirse a A β disminuyendo el intercambio ATP/ADP y a la vez disminuyendo el metabolismo energético en esta enfermedad (118).

Otro de las moléculas relacionadas al mPTP que se ven alteradas en la enfermedad de Alzheimer es la CypD, la cual se encuentra significativamente elevada en mitocondrias que contienen A β , posicionadas en las regiones afectadas por Alzheimer que corresponden al polo temporal e hipocampo comparadas con aquellas mitocondrias corticales sanas en pacientes sin Alzheimer de la misma edad. Por lo tanto, la elevación de niveles de CypD en la enfermedad, está directamente relacionada con la presencia de A β mitocondrial en el cerebro, afectando aún más esta patología, además de la perturbación provocada normalmente por la edad (119). El bloqueo de CypD a través de CsA se consideró como enfoque terapéutico significativo en el Alzheimer, sin embargo, los efectos tóxicos, como la inmunosupresión y su imposibilidad de penetrar la barrera hematoencefálica evitan que este componente sea utilizado en el tratamiento contra esta enfermedad progresiva (120). Se asocia también la proteína translocadora (TSPO) a la enfermedad del Alzheimer por dos vías patológicas principalmente. La primera consiste en el transporte de colesterol alterado por niveles de expresión anormales en neuronas dañadas; la segunda es la participación en la activación del mPTP y aunque esto último ha sido contradicho, se estima que los ligandos más conocidos como Ro5-4864 en combinación con PK 11195 reducen los niveles de A β acumulados atenuando el desarrollo de la enfermedad (121).

Además de la enfermedad de Alzheimer, existen otras patologías neurodegenerativas en donde el mPTP se encuentra implicado, una de ellas es la enfermedad de Parkinson (EP),

desencadenada por la muerte de neuronas dopaminérgicas en la región mesencefálica. Estas neuronas dopaminérgicas controlan el flujo y almacenamiento de calcio a través de canales de Ca^{2+} de tipo L dependientes del voltaje que a su vez regulan la liberación de dopamina (122). Es por esta razón que las neuronas son especialmente sensibles a las alteraciones de las concentraciones de Ca^{2+} mitocondrial, aumentando considerablemente la sensibilización de la apertura del mPTP. Junto con esto, se produce una dificultad para amortiguar la presencia de ROS en neuronas dopaminérgicas, aumentando aún más la probabilidad de apertura del poro (123).

La esclerosis múltiple corresponde a una enfermedad inflamatoria crónica del sistema nervioso central. La fisiopatología de esta enfermedad consiste en que la vaina de mielina en las neuronas es destruida por anticuerpos endógenos dirigidos contra antígenos asociados a la mielina, como la proteína básica de mielina (124). Cuando ocurre un ataque inflamatorio, los macrófagos y la microglia producen elevadas cantidades de glutamato, quien a su vez va a conducir a la sobrecarga de Ca^{2+} mitocondrial estimulando, por lo tanto, la activación y apertura prolongada del mPTP (125).

Otra de las patologías asociadas al poro, corresponde a la enfermedad de Huntington, la cual es causada por mutaciones en el gen que codifica la proteína huntingtina (Htt), provocando en las personas que lo padecen, movimientos progresivos incontrolados, demencia y trastornos psiquiátricos que finalmente provocan la muerte. Esta mutación del gen Htt provoca disfunciones mitocondriales en donde la apertura del mPTP se ve inducida por la sobrecarga de Ca^{2+} en el interior mitocondrial, esta apertura del *mega-canal* puede ser inhibida a través de la administración de la CsA (126).

4.3 Cáncer

La apoptosis se reconoce como un proceso clave en el cáncer, ya que se requiere la pérdida de su control para el avance de esta enfermedad, por lo que se ha relacionado con una alteración del mPTP, ocurriendo el proceso contrario a lo que normalmente se produce. Si bien, los niveles elevados de Ca^{2+} inducen la apertura prolongada del mPTP, las células cancerosas evaden este tipo de señalización a través de diversos mecanismos. El oncosupresor de la proteína de leucemia promielocítica (PML) junto a la proteína fosfatasa 2A (PP2A) van a regular la transferencia de Ca^{2+} entre el retículo endoplásmico y las mitocondrias a través del MCU, evitando la fosforilación del receptor de fosfato inositol 3 (IPR3), esto va a disminuir la probabilidad de apertura del poro debido a que no existe el agente inductor como las elevadas concentraciones de Ca^{2+} (127). Otro de los mecanismos que ocurren en el cáncer relacionado al Ca^{2+} es una pérdida o mutación del oncosupresor p53, el que, en condiciones normales, estimula a la proteína del retículo sarco/endoplásmico Ca^{2+} -ATPasa (SERCA) manteniendo elevados los niveles de este metabolito, al perderse p53, junto a los oncosupresores PML y PTEN, lo que conduce a la disminución del Ca^{2+} evitando que sea un desencadenante en la apertura del mPTP (128).

Otro tipo de inductor que se ve alterado en esta patología es la producción aumentada de ROS que se encuentra en las células cancerosas. Aun así, son capaces de evitar la muerte celular inducida por esta vía, esto debido a que, las células cancerosas poseen además altos niveles de proteínas antioxidantes como la superóxido dismutasa que inhibe la toxicidad de ROS (129). La inducción de la apertura de mPTP dependiente de ROS involucra un canal de potasio dependiente del voltaje mitocondrial, que puede ser inhibido por proteínas Bax o por los inhibidores selectivos permeables a la membrana Psora-1, PAP-1 y clofazimina, induciendo así la producción de ROS y despolarización mitocondrial sensible a la CsA (130).

Por otro lado, en el cáncer disminuyen los niveles de HK II, lo que hace suponer que el proceso de apertura del mPTP se ve favorecido. Sin embargo, en las células tumorales se ve favorecida la expresión de las proteínas pertenecientes a la familia Bcl-2, Bcl-Xl y Mcl-1, las cuales tienen función antiapoptótica que al interactuar con VDAC y la subunidad β de la ATP sintasa van a inhibir la apertura del poro (128). Otro componente relacionado al poro es GSK-3, que al activarse va a aumentar la producción de ROS y la muerte celular por apoptosis después de utilizarse un tratamiento con inhibidores del complejo I de la cadena respiratoria en células de neuroblastoma humano. Además, GSK-3 va a fosforilar a CypD facilitando la apertura del poro. Sin embargo, al ser fosforilado por AKT, puede ser inhibido y al ocurrir esto se promueve la asociación entre HKII y VDAC, inhibiendo la apertura del poro y permitiendo la proliferación celular (131). Como la señalización intracelular está alterada en la condición oncogénica, se va a inducir la activación de la quinasa ERK, que se localizará en las mitocondrias cumpliendo la función de inhibir GSK-3 evitando que se fosfore CypD perjudicando la apertura del mPTP (132). Por lo tanto, la activación de estas cascadas de quinasas en células cancerígenas son la principal razón de la inactivación del poro aun en condiciones en las que normalmente se activaría.

El efecto Warburg, por otro lado, consiste en el aumento de la absorción de glucosa y la fermentación láctica en células tumorales independientemente de las condiciones de oxígeno. La glucosa es sometida a todo el proceso para la generación de energía, transformándose en piruvato, siguiendo con la fermentación láctica. Esto significa que, en el cáncer, existe un aumento en la captación de glucosa para la producción continua de moléculas de ATP, evitando la deficiencia de nucleótidos de adenina dada por el escaso rendimiento de la glicólisis láctica, con produce una acumulación de lactato y una disminución del pH, desencadenando la liberación de inhibidores de mPTP (133, 134).

Finalmente, se han estudiado variados compuestos que pueden actuar como quimioterapéuticos al inducir estrés oxidativo y favorecer la apertura del mPTP como, por ejemplo, la hormona vegetal metiljasmonato, el componente de la curcumina en polvo de

cúrcuma y compuestos polifenólicos como el resveratrol, los cuales han tenido resultados prometedores en ensayos clínicos y preclínicos (135).

CONCLUSIÓN

El mPTP es una estructura formada por varios componentes moleculares. A pesar de haber sido ampliamente estudiado, los componentes estructurales que los constituyen sigue sin ser definidos.

Aunque se han considerado varios canales como el translocador de nucleótidos de adenina, la proteína ATP sintasa, el canal aniónico dependiente de voltaje, el transportador de fosfato inorgánico y CypD como componentes estructurales del poro, los últimos dos fueron rápidamente descartados y considerados reguladores. Sin embargo, la estructura hipotética anteriormente mencionada está sujeta a gran controversia, ya que, según estudios recientes, la única estructura que podría realmente formar parte del poro es la ATP sintasa. Las demás, por lo tanto, son ampliamente cuestionadas respecto a si forman o no parte del súper-complejo.

Por otro lado, el mPTP es regulado por una amplia variedad de moléculas. Gran parte de estos reguladores interactúan con los componentes estructurales del poro, de esta manera pueden inducir o inhibir la apertura prolongada de este, desencadenando así, procesos patológicos que pueden llevar a la muerte celular por apoptosis o necrosis.

Las patologías como la lesión isquemia/reperfusión y enfermedades neurodegenerativas, se relacionan directamente con el mPTP ya que, debido a alteraciones en el funcionamiento normal de las células, dado por las diferentes causas específicas de cada enfermedad, se va a provocar la acumulación de los principales agentes inductores en la activación del poro, como el aumento significativo de Ca^{2+} o la producción de ROS. Mientras que, en el caso del cáncer, se genera el efecto contrario, inhibiendo los aumentos sostenidos de estos dos inductores, evadiendo así, la muerte celular.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) Van der Giezen M. 2011. Mitochondria and the Rise of Eukaryotes. *Bioscience* 61(8): 594-601.
- 2) Alberts B, Johnson A, Lewis J, y *col.* *Biología molecular de la célula*. 4ª edición. Nueva York: Garland Science; 2002. The Mitochondrion. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26894/>. [Consultado el 25 de julio de 2020]
- 3) Roger A, Muñoz S, Kamikawa R. 2017. The Origin and Diversification of Mitochondria. *Current Biology*, 27:1177-1192.
- 4) Sánchez R, Arboleda G. 2008. Mitochondria y muerte celular. *Publicación científica en ciencias biomédicas*, 6(10):101-236.
- 5) Friedman J, Nunnari J. 2014. Mitochondrial form and function. *Nature*, 505:335-343.
- 6) Bulthuis E, Adjobo-Hermans M, Willems P, y *col.* 2020. Mitochondrial morfofunction in mammalian cells. *Antioxidants & redox signal*. 30(18):2066-2109.
- 7) Resino S, 01/09/2013. La mitocondria [internet]. *Epidemiología molecular de enfermedades infecciosas*. <https://epidemiologiamolecular.com/la-mitocondria/>. [Consultado el 30 de julio de 2020]
- 8) Tarazona A, Olivera-Angel M, Lenis Y. 2010. Rol de la mitocondria y el estrés oxidativo en el bloqueo del desarrollo de embriones bovinos producidos *in vitro*. *Archivos de medicina veterinaria*, 42(3):125-133.
- 9) Hamana L, Suárez C, 2002. Patología mitocondrial en las enfermedades del miocardio. *Gaceta médica de caracas*. 110(4).
- 10) Haworth R, Hunter D. 1979. The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondria. II. Nature of the Ca²⁺ trigger site. *Arch Biochem Biophys*, 195(2): 460-7.
- 11) Crompton M, Costi A, Hayat L. 1987. Evidence for the presence of a reversible Ca²⁺-dependent pore activated by oxidative stress in heart mitochondria. *Biochem J*, 245(3):915-918.
- 12) Šileikytė J, Forte M. 2019. The Mitochondrial Permeability Transition in Mitochondrial Disorders. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. vol2019.
- 13) Halestrap A, 2009. What is the mitochondrial permeability transition pore?. *J Moll Cell Cardiol*, 46(6):821-31.
- 14) Kwong J, Molkentin J. 2015. Pathological Roles of the Mitochondrial Permeability Transition Pore in the Heart. *Cell metabolism*. 21(2):206-214.
- 15) Tornero D, Ceña V, González-García C, y *col.* 2002. Papel del poro de permeabilidad transitoria mitocondrial en los procesos neurodegenerativos. *Revista de neurología*. 35(4):354-361.
- 16) Klingenberg M. 2008. The ADP and ATP transport in mitochondria and its carrier, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, Volume 1778, Issue 10, Pages 1978-2021
- 17) Belzacq, A.-S, Vieira, H. L. A, Kroemer, G, y *col.* (2002). The adenine nucleotide translocator in apoptosis. *Biochimie*, 84(2-3):167-176.

- 18) Crichton P, Harding M, Ruprecht J, *y col.* 2013. Lipid, detergent, and coomassie blue G-250 affect the migration of small membrane proteins in blue native gels. *The journal of biological chemistry.* 288(30):22163-22173.
- 19) Bamber L, Harding M, Monne M, *y col.* 2007. The yeast mitochondrial ADP/ATP carrier functions as a monomer in mitochondrial membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 104(26):10830–10834.
- 20) Palmieri, F. 2004. The mitochondrial transporter family (SLC25): physiological and pathological implications. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology.* 447(5):689–709.
- 21) Pebay-Peyroula E, Dahout-Gonzalez C, Kahn R, *y col.* 2003. Structure of mitochondrial ADP/ATP carrier in complex with carboxyatractyloside. *Nature,* 426(6962):39–44.
- 22) Palmieri, F. 2013. The mitochondrial transporter family SLC25: Identification, properties and physiopathology. *Molecular Aspects of Medicine.* 34(2-3): 465–484.
- 23) Vieira, H., Haouzi, D., El Hamel, C. *y col.* 2000. Permeabilization of the mitochondrial inner membrane during apoptosis: impact of the adenine nucleotide translocator. *Cell Death Differ.* 7:1146–1154.
- 24) Neckelmann N, Li K, Wade R, *y col.* 1987. cDNA sequence of a human skeletal muscle ADP/ATP translocator: lack of a leader peptide, divergence from a fibroblast translocator cDNA, and coevolution with mitochondrial DNA genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 84(21):7580–7584.
- 25) Levy S, Chen Y, Graham B, *y col.* 2000. Expression and sequence analysis of the mouse adenine nucleotide translocase 1 and 2 genes. *Gene.* 254(1-2):57–66.
- 26) Dolce V, Scarcia P, Iacopetta D, *y col.* 2004. A fourth ADP/ATP carrier isoform in man: identification, bacterial expression, functional characterization and tissue distribution. *FEBS Letters.* 579(3):633–637.
- 27) Chevrollier A, Loiseau D, Reynier P, *y col.* 2011. Adenine nucleotide translocase 2 is a key mitochondrial protein in cancer metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics.* 1807(6):562–567.
- 28) Monné M, Palmieri F. (2014). Antiporters of the mitochondrial carrier family. *Current topics in membranes.* 73:289–320.
- 29) Ruprecht J, King M, Zögg T, *y col.* The molecular mechanism of transport by the mitochondrial ADP/ATP carrier. *Cell.* 176(3):435-447.
- 30) Pebay-Peyroula E, Dahout-Gonzalez C, Kahn R, *y col.* Structure of mitochondrial ADP/ATP carrier in complex with carboxyatractyloside. *Nature.* 426(6962):39-44.
- 31) Kokoszka J, Waymire K, Levy S, *y col.* The ADP/ATP translocator is not essential for the mitochondrial permeability transition pore. *Nature.* 427(6963):461-5.
- 32) Mazure N. 2017. VDAC in cáncer. *Biochim biophys acta bioenerg.* 1858(8):665-673.
- 33) Ponnalagu D, Singh H. 2017. Anion channels of mitochondria. *Handbook of experimental pharmacology.* 240:71-101.
- 34) Shoshan-Barmatz V, De Pinto V, Zweckstetter M, *y col.* 2010. VDAC, a multi-functional mitochondrial protein regulating cell life and death. *Mol aspect med.* 31(3):227-85.
- 35) Soshan-Barmatz V, Nahon-Crystal E, Shteinifer-Kuzmine A, *y col.* 2018. VDAC, mitochondrial dysfunction, and Alzheimer's disease. *Pharmacological research.* 131:87-101.

- 36) Caterino M, Ruoppolo M, Mandola A, *y col.* 2017. Protein-protein interaction networks as a new perspective to evaluate distinct functional roles of voltage-dependent anion channel isoforms. *Molecular biosystems.* 13(12):2466-2476.
- 37) Mertins B, Psakis G, Essen L. 2014. Voltage-dependent anion channels: the wizard of the mitochondrial outer membrane. *Biological chemistry.* 395(12):1435-42.
- 38) Das S, Steenbergen C, Murphy E. 2011. Does the voltage dependent anion channel modulate cardiac ischemia-reperfusion injury?. *Biochim biophys acta.* 1818(6):1451-6.
- 39) Shoshan-Barmatz V, Israelson A, Brdiczka D, *y col.* 2006. The voltage-dependent anion channel (VDAC): Function in intracellular signalling, cell life and cell death. *Current pharmaceutical design.* 12(18):2249-2270.
- 40) Bonora M, Wieckowski M, Chinopoulos C, *y col.* 2015. Molecular mechanisms of cell death: central implication of ATP synthase in mitochondrial permeability transition. *Oncogene.* 34(12):1475-1486.
- 41) Jonas E, Porter G, Beutner G, *y col.* 2015. Cell death disguised: the mitochondrial permeability transition pore as the c-subunit of the F1FO ATP synthase. *Pharmacological research.* 99:382-392.
- 42) Bonora M, Wieckowski M, Chinopoulos C, *y col.* 2014. Molecular mechanisms of cell death: central implication of ATP synthase in mitochondrial permeability transition. *Oncogene.* 34(12):1475-1486.
- 43) Jonckheere A, Smeitink J, Rondenburg R. 2011. Mitochondrial ATP synthase: architecture, function and pathology. *Journal of inherited metabolic disease.* 35(2):211-225.
- 44) Giorgio V, Guo L, Bassot C, *y col.* 2018. Calcium and regulation of the mitochondrial permeability transition. *Cell calcium.* 70:56-63.
- 45) Giorgio V, von Stockum S, Antoniel M, *y col.* 2013. Dimers of mitochondrial ATP synthase form the permeability transition pore. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 110(15):5887-5892.
- 46) Morganti C, Bonora M, Sbano L, *y col.* 2018. The mitochondrial permeability transition pore. *Mitochondrial biology and experimental therapeutics.* 47-73.
- 47) He J, Ford H, Carroll J, *y col.* 2017. Persistence of the mitochondrial permeability transition in the absence of subunit c of human ATP synthase. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America.* 114(13):3409-3414
- 48) Beutner G, Alavian K, Jonas E, *y col.* 2016. The mitochondrial permeability transition pore and ATP synthase. *Pharmacology of mitochondria.* 21-46.
- 49) Pogoryelov D, Yildiz O, Faraldo-Gómez J, *y col.* 2009. High-resolution structure of the rotor ring of a proton-dependent ATP synthase. *Nature structural & molecular biology.* 16(10):1068-1073.
- 50) Noji H, Yasuda R, Yoshida M, *y col.* 1997. Direct observation of the rotation of F1-ATPase. *Nature.* 386(6622):299-302.
- 51) Yasuda R, Noji H, Kinosita K, *y col.* 1998. F1-ATPase is a highly efficient molecular motor that rotates with discrete 120 degree steps. *Cell.* 93(7):1117-1124.
- 52) He J, Carroll J, Ding S, *y col.* 2017. Permeability transition in human mitochondria persists in the absence of peripheral stalk subunits of ATP synthase. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America.* 114(34):9086-9091.

- 53) He J, Ford H, Carroll J, *y col.* 2017. Persistence of the mitochondrial permeability transition in the absence of subunit c of human ATP synthase. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America.* 114(13):3409-3414.
- 54) Carroll J, He J, Ding S, *y col.* 2019. Persistence of the permeability transition pore in human mitochondria devoid of an assembled ATP synthase. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America.* 116(26):12816-12821.
- 55) Gutierrez-Aguilar M, Baines C. 2015. Structural mechanisms of cyclophilin D-dependent control of the mitochondrial permeability transition pore. *Biochimica et biophysica acta.* 1850(10):2041-2047.
- 56) Amanakis G, Murphy E. 2020. Cyclophilin D: an integrator of mitochondrial function. *Frontiers in physiology.* 11:595.
- 57) Dhingra R, Lieberman B, Kishenbaum L. 2019. Cyclophilin D phosphorylation is critical for mitochondrial calcium uniporter regulated permeability transition pore sensitivity. *Cardiovascular research.* 115(2):261-263.
- 58) Elrod J, Molkentin J. 2013. Physiologic functions of cyclophilin D and the mitochondrial permeability transition pore. *Circulation journal: official journal of the Japanese circulation society.* 77(5):1111-22.
- 59) Giorgio V, Soriano M, Basso E, *y col.* 2010. Cyclophilin D in mitochondrial pathophysiology. *Biochimica et biophysica acta.* 1797(6-7):1113-8.
- 60) Di Lisa F, Carpi A, Giorgio V, *y col.* 2011. The mitochondrial permeability transition pore and cyclophilin D in cardioprotection. *Biochimica et biophysica acta.* 1813(7):1316-22.
- 61) Porter G, Beutner G. 2018. Cyclophilin D, somehow a master regulator of mitochondrial function. *Biomolecules.* 8(4):176.
- 62) Jiang Z, Zhang H, Böckmann R. 2016. Allostery in BAX protein activation. *Journal of biomolecular structure and dynamics.* 34(11):2469-2480.
- 63) Kao T, Tsai C, Lan Y, *y col.* 2017. The role of conformational heterogeneity in regulating the apoptotic activity of BAX protein. *Physical chemistry chemical physics.* 19(14):9584-9591.
- 64) Renault T, Manon S. 2011 Bax: addressed to kill. *Biochimie.* 93(9):1379-1391.
- 65) Peña-Blanco A, Garcia-Saez A. 2018. Bax, Bak and beyond-mitochondrial performance in apoptosis. *The FEBS journal.* 285(3):416-431.
- 66) Renault T, Manon S. 2011. Bax: Addressed to kill. *Biochimie.* 93(9):1379-1391.
- 67) Baughman J, Perocchi F, Girgis H, *y col.* 2011. Integrative genomics identifies MCU as an essential component of the mitochondrial calcium uniporter. *Nature.* 476(7360):341-345.
- 68) Kovács-Bogdán E, Sancak Y, Kamer K, *y col.* 2014. Reconstitution of the mitochondrial calcium uniporter in yeast. *Proceedings of the national academy of science of the United States of America.* 111(24):8985-8990.
- 69) Yu N, Wang S, Wang P, *y col.* 2012. The calcium uniporter regulates the permeability transition pore in isolated cortical mitochondria. *Neural regeneration research.* 7(2):109-113.
- 70) Nemani N, Shanmughapriya S, Madesh M. 2019. Molecular regulation of MCU: Implications in physiology and disease. *Cell calcium.* 74:86-93.
- 71) Sancak Y, Markhard A, Kitami T, *y col.* 2014. EMRE is an essential component of the mitochondrial calcium uniporter complex. *Science.* 342(6164):1379-1382.

- 72) Bauer T, Murphy E. 2020. Role of mitochondrial calcium and the permeability transition pore in regulating cell death. *Circulation research*. 126(2):280-293.
- 73) Boyman L, Williams G, Khananshvili D, *y col.* 2013. NCLX: the mitochondrial sodium calcium exchanger. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 59:205-213.
- 74) Pathak T, Trebak M. 2018. Mitochondrial Ca²⁺ signaling. *Pharmacology & therapeutics*. 192:112-123.
- 75) Esteras N, Abramov A. 2020. Mitochondrial calcium deregulation in the mechanism of beta-amyloid and tau pathology. *Cells*. 9(9):2135.
- 76) Hurst S, Hoek J, Sheu S. 2018. Mitochondrial Ca²⁺ and regulation of the permeability transition pore. *Journal of bioenergetics and biomembranes*. 49(1):27-47.
- 77) Cadenas S. 2018. ROS and redox signaling in myocardial ischemia-reperfusion injury and cardioprotection. *Free radical biology & medicine*. 117:76-89.
- 78) Zorov D, Juhaszova M, Sollott S. 2014. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. *Physiological reviews*. 94(3):909-950.
- 79) Venditti P, Di Meo S. 2020. The role of reactive oxygen species in the life cycle of the mitochondrion. *International journal of molecular sciences*. 21(6):2173.
- 80) Boyman L, Coleman A, Zhao G, *y col.* 2020. Dynamics of the mitochondrial permeability transition pore: Transient and permanent opening events. *Archives of biochemistry and biophysics*. 666:31-39.
- 81) Andrienko T, Pasdois P, Pereira G, *y col.* 2017. The role of succinate and ROS in reperfusion injury – A critical appraisal. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 110:1-14.
- 82) Panel M, Ghaleh B, Morin D. 2018. Mitochondria and aging: A role for the mitochondrial transition pore?. *Aging cell*. 17(4):e12793.
- 83) Xiao Y, Karam C, Yi J, *y col.* 2018. ROS-related mitochondrial dysfunction in skeletal muscle of an ALS mouse model during the disease progression. *Pharmacological research*. 138:25-36.
- 84) Miura T, Tanno M, Sato T. 2010. Mitochondrial kinase signalling pathways in myocardial protection from ischemia/reperfusion-induced necrosis. *Cardiovascular research*. 88(1):7-15.
- 85) Miura T, Tanno M. 2012. The mPTP and its regulatory proteins: final common targets of signalling pathways for protection against necrosis. *Cardiovascular research*. 94(2):181-189.
- 86) Calmettes G, Ribalet B, John S, *y col.* 2015. Hexokinases and cardioprotection. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 78:107-115.
- 87) Gut P, Zweckstetter M, Banati R. 2017. Lost in translocation: The function of the 18 kD translocator protein. *Trends in endocrinology and metabolism*. 26(7):349-356.
- 88) Korkhov V, Sachse C, Short J, *y col.* 2010. Three-Dimensional structure of TspO by electron crymicroscopy of helical crystals. *Structure*. 18(6):677-687.
- 89) Gatliff J, East D, Singh A, *y col.* 2017. A role for TSPO in mitochondrial Ca²⁺ homeostasis and redox stress signaling. *Cell death & disease*. 8(6):e2896.
- 90) Ying K, Hunter M, Chai A, *y col.* 2014. Role of the cytoplasmic N-terminal cap and per-arnt-sim (PAS) domain in trafficking and stabilization of Kv11.1 channels. *The journal of biological chemistry*. 289(20):13782-13791.

- 91) Kwong J, Molkenin J. 2016. Physiological and pathological roles of the mitochondrial permeability transition pore in the heart. *Cell metabolism*. 21(2):206-214.
- 92) Eltzschig H, Eckle T. 2014. Ischemia and reperfusion—from mechanism to translation. *Nature medicine*. 17(11):1391-1401.
- 93) Ardehali H, Sabbah H, Burke M, *y col.* 2012. Targeting myocardial substrate metabolism in heart failure: potential for new therapies. *European journal of heart failure*. 14(2):120-129.
- 94) Bernardi P, Di Lisa F. 2015. The mitochondrial permeability transition pore: Molecular nature and role as a target in cardioprotection. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 78:100-106.
- 95) Brookes P, Yoon Y, Robotham J, *y col.* 2004. Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *American journal of physiology, Cell physiology*. 287(4):817-833.
- 96) Cervantes-Villagrana R, Presno-Bernal J. 2013. Fisiopatología de la diabetes y los mecanismos de muerte de las células β pancreáticas. *Revista de endocrinología y nutrición*. 21(3):98-106.
- 97) Carvajal C. 2019. Especies reactivas del oxígeno: formación, función y estrés oxidativo. *Medicina legal de Costa Rica*. 36(1):1409-1415.
- 98) Lopez-Crisosto C, Pennanen C, Vásquez-Trincado C, *y col.* 2017. Sarcoplasmic reticulum-mitochondria communication in cardiovascular pathophysiology. *Nature reviews cardiology*. 14(6):342-360.
- 99) Amgalan D, Chen Y, Kitsis R. 2017. Death receptor signaling in the heart: cell survival, apoptosis, and necroptosis. *Circulation*. 136(8):743-746.
- 100) Suomalainen A, Battersby B. 2017. Mitochondrial diseases: the contribution of organelle stress responses to pathology. *Nature reviews molecular cell biology*. 19(2):77-92.
- 101) Arakawa K, Kudo T, Ikawa M, *y col.* 2010. Abnormal myocardial energy-production state in mitochondrial cardiomyopathy and acute response to L-arginine infusion. C-11 acetate kinetics revealed by positron emission tomography. *Circulation journal*. 74(12):2702-2711.
- 102) Stacpoole P, Kurtz T, Han Z, *y col.* 2008. Role of dichloroacetate in the treatment of genetic mitochondrial diseases. *Advanced drug delivery reviews*. 60(13-14):1478-1487.
- 103) Griffiths E, Halestrap A. 1993. Protection by cyclosporin A of ischemia/reperfusion-induced damage in isolated rat hearts. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 25(12):1461-1469.
- 104) Piot C, Croisille P, Staat P, *y col.* 2008. Effect of cyclosporine on reperfusion injury in acute myocardial infarction. *The New England journal of medicine*. 359(5):473-481.
- 105) Wang Y, Hong Y, Wei M, *y col.* 2010. Curculigoside attenuates human umbilical vein endothelial cell injury induced by H₂O₂. *Journal of ethnopharmacology*. 132(1):233-239.
- 106) Zhao Y, Guo Y, Chen Y, *y col.* 2020. Curculigoside attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by inhibiting the opening of the mitochondrial

- permeability transition pore. *International journal of molecular medicine*. 45(5):1514-1524.
- 107) Chambers D, Parks D, Patterson G, *y col.* 1985. Xanthine oxidase as a source of free radical damage in myocardial ischemia. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 17(2):145-152.
 - 108) Mitsos S, Askew T, Fantone J, *y col.* 1986. Protective effects of N-2-mercaptopropionyl glycine against myocardial reperfusion injury after neutrophil depletion in the dog: evidence for the role of intracellular-derived free radicals. *Circulation*. 73(5):1077-1086.
 - 109) Lyketsos C, Carrillo M, Ryan J, *y col.* 2011. Neuropsychiatric symptoms in Alzheimer's disease. *Alzheimer's & dementia*. 7(5):532-539.
 - 110) Soria J, González H, Léger G. 2019. Alzheimer's disease. *Handbook of clinical neurology*. 167:231-255.
 - 111) Reddy P. 2009. Amyloid Beta, mitochondrial structural, and functional dynamics in Alzheimer's disease. *Experimental neurology*. 218(2):286-292.
 - 112) Tönnies E, Trushina E. 2017. Oxidative stress, synaptic dysfunction, and Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease*. 57(4):1105-1121.
 - 113) Tong B, Wu A, Li M, *y col.* 2018. Calcium signaling in Alzheimer's disease & therapies. *Biochimica et biophysica acta molecular cell research*. 1865(11):1745-1760.
 - 114) Galla L, Redolfi N, Pozzan T, *y col.* 2020. Intracellular calcium dysregulation by the Alzheimer's disease-linked protein presenilin 2. *International journal of molecular sciences*. 21(3):770.
 - 115) McDaid J, Mustaly-Kalimi S, Stutzmann G. 2020. Dyshomeostasis disrupts neuronal and synaptic function in Alzheimer's disease. *Cells*. 9(12):2655.
 - 116) Lim J, Lee J, Pae A. 2020. Mitochondrial dysfunction and Alzheimer's disease: prospects for therapeutic intervention. *BMB reports*. 53(1):47-55.
 - 117) Beck S, Guo L, Phensy A, *y col.* 2016. Desregulation of mitochondrial F1FO-ATP synthase via OSCP in Alzheimer's disease. *Nature communications*. 7:11483.
 - 118) Tan M, Ji X, Li J, *y col.* 2020. Longitudinal trajectories of Alzheimer's ATN biomarkers in elderly persons without dementia. *Alzheimer's research & therapy*. 12(1):55.
 - 119) Du H, Guo L, Fang F, *y col.* 2008. Cyclophilin D deficiency attenuates mitochondrial and neuronal perturbation and ameliorates learning and memory in Alzheimer's disease. *Nature medicine*. 14(10):1097-1105.
 - 120) Du H, Guo L, Zhang W, *y col.* 2011. Cyclophilin D deficiency improves mitochondrial function and learning/memory in aging Alzheimer's disease mouse model. *Neurobiology of aging*. 32(3):398-406.
 - 121) Barron A, Garcia-Segura L, Caruso D, *y col.* 2013. Ligand for translocator protein reverses pathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *The journal of neuroscience*. 33(20):8891-8897.
 - 122) Winklhofer K, Haass C. 2010. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Biochimica et biophysica acta*. 1802(1):29-44.
 - 123) Brundin P, Li J, Holton J, *y col.* 2008. Research in motion: the enigma of Parkinson's disease pathology spread. *Nature reviews neuroscience*. 9(10):741-745.

- 124) Stys P, Zamponi G, van Minnen J, *y col.* 2012. Will the real multiple sclerosis please stand up?. *Nature reviews neuroscience.* 13(7):507-514.
- 125) Su K, Bourdette D, Forte M. 2013. Mitochondrial dysfunction and neurodegeneration in multiple sclerosis. *Frontiers in physiology.* 4:169.
- 126) Milakovic T, Quintanilla R, Johnson G. 2006. Mutant huntingtin expression induces mitochondrial calcium handling defects in clonal striatal cells: functional consequences. *Journal of biological chemistry.* 281(46): 34785-34795.
- 127) Marchi S, Lupini L, Patergnani S, *y col.* 2013. Downregulation of the mitochondrial calcium uniporter by cancer-related miR-25. *Current biology.* 23(1):58-63.
- 128) Missiroli S, Bonora M, Patergnani S, *y col.* 2016. PML at mitochondria-associated membranes is critical for the repression of autophagy and cancer development. *Cell reports.* 16(9):2415-2427.
- 129) Pani G, Colavitti R, Bedogni B, *y col.* 2004. Mitochondrial superoxide dismutase: a promising target for new anticancer therapies. *Current medicinal chemistry.* 11(10):1299-1308.
- 130) Leanza L, Henry B, Sassi N, *y col.* 2012. Inhibitors of mitochondrial Kv1.3 channels induce Bax/Bak-independent death of cancer cells. *EMBO molecular medicine.* 4(7):577-593.
- 131) Duda P, Akula S, Abrams S, *y col.* 2020. Targeting GSK3 and associated signaling pathways involved in cancer. *Cells.* 9(5):1110.
- 132) Rasola A, Bernardi P. 2014. The mitochondrial permeability transition pore and its adaptative responses in tumor cells. *Cell calcium.* 56(6):437-445.
- 133) Warburg O, Wind F, Negelein E. 1927. The metabolism of tumors in the body. *Journal of general physiology.* 8(6):519-530.
- 134) Boland M, Chourasia A, Macleod K. 2013. Mitochondrial dysfunction in cancer. *Frontiers in oncology.* 3:292.
- 135) Suh D, Kim M, Kim H, *y col.* Mitochondrial permeability transition pore as a selective target for anti-cancer therapy. *Frontiers in oncology.* 3:41.