



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**PARTICIPACIÓN DE LA MITOCONDRIA EN LA RESISTENCIA DE LOS
FIBROBLASTOS A LA APOPTOSIS EN LA FIBROSIS PULMONAR IDIOPÁTICA**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

M. EN C. LUIS GARCÍA ERIKA RUBÍ

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: M. EN C. MOISÉS EDUARDO SELMAN LAMA
INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS, ISMAEL COSIO VILLEGAS.

COMITÉ TUTOR: DR. MOHAMMED EL HAFIDI BENTLAKDER
INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA, IGNACIO CHÁVEZ.

COMITÉ TUTOR: DRA. MARÍA EUGENIA GONSEBATT BONAPARTE
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**PARTICIPACIÓN DE LA MITOCONDRIA EN LA RESISTENCIA DE LOS
FIBROBLASTOS A LA APOPTOSIS EN LA FIBROSIS PULMONAR IDIOPÁTICA**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

M. EN C. LUIS GARCÍA ERIKA RUBÍ

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: M. EN C. MOISÉS EDUARDO SELMAN LAMA
INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS, ISMAEL COSIO VILLEGAS.

COMITÉ TUTOR: DR. MOHAMMED EL HAFIDI BENTLAKDER
INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA, IGNACIO CHÁVEZ.

COMITÉ TUTOR: DRA. MARÍA EUGENIA GONSEBATT BONAPARTE
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM.

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

OFICIO CPCB/582/2022

ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
P r e s e n t e

Me permito informar a usted qué en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **8 de noviembre de 2021** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la estudiante **LUIS GARCÍA ERIKA RUBÍ** con número de cuenta **300127166** con la tesis titulada **“PARTICIPACIÓN DE LA MITOCONDRIA EN LA RESISTENCIA DE LOS FIBROBLASTOS A LA APOPTOSIS EN LA FIBROSIS PULMONAR IDIOPÁTICA”**, realizada bajo la dirección del **M. EN C. MOISÉS EDUARDO SELMAN LAMA**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DR. SALVADOR URIBE CARVAJAL
Vocal: DR. JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI
Vocal: DRA. MARÍA SANDRA CABRERA BENÍTEZ
Vocal: DRA. VILMA ARACELI MALDONADO LAGUNAS
Secretario: DRA. MARÍA EUGENIA GONSEBATT BONAPARTE

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 17 de junio de 2022

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Agradezco al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM su aprobación para el desarrollo de esta tesis de doctorado, así como también su apoyo económico para la presentación de este trabajo en el Congreso Internacional de la Sociedad Americana del Toráx, ATS (2018).

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) su apoyo y patrocinio para la realización de este proyecto de tesis.

Agradezco al M. en C. Moisés Eduardo Selman Lama, a la Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte y al Dr. Mohammed el Hafidi Bentlakder, miembros del Comité Tutor, la aprobación de este proyecto, así como sus comentarios y sugerencias para su enriquecimiento y realización.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

A Dios por iluminar mi camino y permitir terminar de manera satisfactoria mi tesis de doctorado.

A mi mamá por guiarme y enseñarme que en la vida hay que luchar para salir adelante. Gracias a sus consejos, cariño y apoyo he podido llegar hasta aquí.

A mi hijo Alfonsito por su paciencia, comprensión y amor durante la realización de esta tesis. Te amo.

A mis hermanos Fernando y Pedro, por su apoyo, cariño y consejos y por estar junto a mí siempre.

A la M. en C. Martha Montaña Ramírez por facilitar los recursos para la realización de este proyecto, por su amistad y apoyo incondicional.

A la M. en C. Carina Becerril Berrocal, por el asesoramiento técnico de esta tesis. Además, quiero agradecerle también por ser mi amiga y estar conmigo en los momentos más difíciles de mi vida, te aprecio mucho Cari.

A la Dra. Criselda Mendoza Milla por su paciencia, ayuda y amistad muchas gracias.

A mi amiga QFB. Damaris Romero por su paciencia y ayuda en citometría de flujo, gracias.

A mis amigos de laboratorio Mayela, Mariel, Miguel, Juan Manuel, Placido, Marco, Ángeles y a mis alumnas Yoselin y Ana, gracias por brindarme su amistad y apoyo a cada uno de ustedes les doy las gracias.

A mi profesor el Dr. José Pedraza Chaverri por guiarme, apoyarme y brindarme su amistad incondicional. Mi admiración y respeto hacia usted siempre.

A mi maestra y amiga incondicional Dra. Marisol Orozco Ibarra, por enseñarme todo lo que se hasta ahora y por siempre estar junto a mí.

A mi tutor M. en C. Moisés Selman Lama por guiarme correctamente, por ser una persona comprensiva y especialmente por su amistad, gracias por confiar en mí y también por sus consejos.

DEDICATORIA

Dedico esta tesis de grado a mi hijo Alfonso Olivos Luis quien es mi motor para seguir adelante, a mi madre Rubí García Cardel por brindarme su apoyo incondicional y ayudarme a salir a delante en todos los problemas que la vida ha puesto en mi camino. En especial quiero dedicar esta tesis a mi padre Fernando Luis Juárez y al padre de mi hijo Alfonso Olivos García quienes no tuvieron la dicha de estar conmigo, pero siempre estarán en mis pensamientos y en mi corazón.

ÍNDICE

Páginas

LISTA DE FIGURAS Y CUADROS

ABREVIATURAS

Resumen	1
Abstract	2
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1 Fibrosis Pulmonar Idiopática	3
1.2 Mecanismos patogénicos en FPI	4
1.3 Estructura y función de la mitocondria	7
1.3.1 Bioenergética mitocondrial	10
1.4 Cadena de transporte de electrones mitocondrial	11
1.4.1 Complejo I o NADH: ubiquinona oxidoreductasa	12
1.4.2 Complejo II o Succinato deshidrogenasa	13
1.4.3 Complejo III o ubiquinol: citocromo c oxidoreductasa	14
1.4.4 Complejo IV o citocromo c oxidasa	15
1.4.5 ATP sintasa o F1Fo-ATPasa	16
1.5 Capacidad respiratoria y disfunción mitocondrial	18
1.6 Mitocondria y apoptosis celular	23
1.7 Poro de transición de permeabilidad mitocondrial	25
1.8 Regulación del PTPm por calcio	29
1.9 Papel del PTPm en enfermedades	32
2. JUSTIFICACIÓN	35
3. HIPÓTESIS	35

	Páginas
4. OBJETIVOS	35
4.1 Objetivo General	35
4.2 Objetivos Específicos	36
5. METODOLOGÍA	37
5.1 Reactivos	37
5.2 Bioética y diseño experimental	38
5.3 Cultivo y tratamiento de fibroblastos humanos	38
5.4 Viabilidad celular	38
5.5 Apoptosis celular	39
5.6 Aislamiento de la fracción citosólica y mitocondrial	39
5.7 Western blot	40
5.8 Liberación de citocromo c	40
5.9 Evaluación del PTPm	41
5.10 Concentración de calcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$)	41
5.11 Tasa de respiración celular en fibroblastos	42
5.11.1 Respirimetría en células no permeabilizadas	42
5.11.2 Respirimetría en células permeabilizadas	43
5.12 Potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$)	43
5.13 Producción de ATP	44
5.14 Cociente ADP/ATP	44
5.15 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)	45
5.16 Análisis Estadístico	45

	Páginas
6. RESULTADOS -----	46
6.1 Los fibroblastos de FPI son resistentes a la apoptosis inducida por mitomicina C -----	46
6.2 Los fibroblastos FPI presentan una disminución en la liberación del citocromo c -----	49
6.3 Los fibroblastos de FPI presentan resistencia a la apertura de PTPm inducida por Ionomicina -----	52
6.4 Los fibroblastos de FPI presentan una disminución en la expresión de la proteína ANT en lisado total -----	55
6.5 Los fibroblastos de FPI presentan una disminución de la liberación de calcio mitocondrial -----	56
6.6 La inhibición de la apertura de PTPm con BKA disminuyó la apoptosis en los fibroblastos de control -----	58
6.7 Los fibroblastos de pulmones con FPI disminuyen el consumo de oxígeno -----	60
6.8 Los fibroblastos de FPI no muestran cambios en el potencial de membrana mitocondrial. Sin embargo, presentan una disminución en los niveles de ATP total -----	63
6.9 Los fibroblastos extraídos de pacientes con FPI muestran una estructura mitocondrial anormal -----	66
7. DISCUSIÓN -----	69
8. CONCLUSIÓN -----	77
9. PRESPECTIVAS -----	77
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	79
11. ANEXO (Artículo requisito para la obtención del grado) -----	90

LISTA DE FIGURAS Y CUADROS

	Páginas
Figura 1. Fenotipos clínicos de Fibrosis Pulmonar Idiopática -----	3
Figura 2. Esquema de los principales eventos fibrogénicos propuestos en la patogénesis de FPI -----	5
Figura 3. Estructura básica de la mitocondria -----	10
Figura 4. Componentes de la fosforilación oxidativa -----	12
Figura 5. Rutas propuestas para la transferencia de electrones en el complejo III -----	15
Figura 6. Representación esquemática de los estados de respiración mitocondrial -----	20
Figura 7. Respirometría de alta resolución y protocolo de acoplamiento en células intactas -----	21
Figura 8. Liberación de proteínas del espacio intermembranal -----	24
Figura 9. Estructura propuesta de los componentes que conforman al Poro de Transición de Permeabilidad Mitocondrial (PTPm) -----	26
Figura 10. Mecanismos propuestos para explicar la entrada y salida de Ca^{2+} en la mitocondria -----	30
Figura 11. Efecto de la mitomicina C (MMC) sobre la viabilidad y resistencia a la apoptosis en fibroblastos control y de pacientes con Fibrosis Pulmonar Idiopática -----	48
Figura 12. Los fibroblastos de Fibrosis Pulmonar Idiopática presentan una disminución en la liberación de citocromo c inducida por mitomicina C (MMC) -----	51
Figura 13. Los fibroblastos de pacientes con Fibrosis Pulmonar Idiopática presentan una fuerte resistencia a la apertura del PTPm inducida por ionomicina -----	54
Figura 14. Los fibroblastos de pacientes con Fibrosis Pulmonar Idiopática presentan una disminución en los niveles de expresión de la proteína ANT-1 en lisado total de fibroblastos -----	56

	Páginas
Figura 15. Trazos de la concentración de calcio intracelular $[Ca^{2+}]_i$ en fibroblastos control y provenientes de pacientes con FPI -----	57
Figura 16. Los fibroblastos de control presentan resistencia a la apoptosis inducida por mitomicina C en presencia de ácido bongkreico (BKA) sin cambios con atractilósido (ATR) -----	59
Figura 17. Consumo de oxígeno en fibroblastos control y de pacientes con Fibrosis Pulmonar Idiopática no permeabilizados y permeabilizados con digitonina -----	62
Figura 18. Los fibroblastos de FPI no modifican el potencial transmembrana mitocondrial, pero disminuyen la producción de ATP total -----	65
Figura 19. Número y morfología de las mitocondrias de fibroblastos pulmonares control y de pacientes con fibrosis pulmonar idiopática ----	67
Figura 20. Los fibroblastos de pacientes con fibrosis pulmonar idiopática no presentan diferencias en la intensidad media de fluorescencia de MitoTracker en comparación con los fibroblastos control -----	68
Cuadro 1. Estados metabólicos mitocondriales -----	19

ABREVIATURAS

FPI	Fibrosis pulmonar idiopática
PTPm	Poro de transición de permeabilidad mitocondrial
ANT	Translocador de nucleótidos de adenina
ATP	Adenosín trifosfato
ADP	Adenosín difosfato
NIU	Neumonía intersticial usual
TNF-R1	Receptor 1 de factor de necrosis tumoral
FAS	Receptor de Fas
XIAP	Inhibidor ligado al cromosoma X de la proteína de apoptosis
c-FLIP	inhibidor celular proteico de FLICE
MME	Membrana mitocondrial externa
MMI	Membrana mitocondrial interna
TOM	Translocador de membrana externa
SAM	Maquinaria de ensamble y clasificación
SLC25	Familia 25 de Transportadores de Solutos
TIM	Translocador de membrana interna
MIA	Maquinaria de ensamble de proteínas del espacio intermembrana
Pi	Fosfato inorgánico
IMS	Espacio intermembranal
PAM	Motor de importe asociado a presecuencia
OXA	Translocasa de exportación mitocondrial
OXPHOS	Fosforilación oxidativa
PDH	Piruvato deshidrogenasa
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
FADH	Flavina adenina dinucleótido
CTE	Cadena de transporte de electrones
FPM	Fuerza protón motriz

Fe-S	Centros fierro-azufre
Q	Ubiquinona
QH ₂	Ubiquinol
$\Delta\mu\text{H}^+$	Gradiente electroquímico de protones
DNAm	Ácido desoxirribonucleico mitocondrial
RNA	Ácido ribonucleico
Cyt c	Citocromo c
$[\text{Ca}^{2+}]_i$	Calcio intracelular
$[\text{Ca}^{2+}]_m$	Calcio mitocondrial
Smac/DIABLO	Segundo activador de caspasa derivado de mitocondria (Smac) /inhibidor de la proteína de unión a apoptosis con bajo pl (DIABLO).
Endo G	Endonucleasa G
Htra2/Omi	Proteína A de requerimiento de alta temperatura
AIF	Factor inductor de apoptosis
IAP	Proteína inhibidora de apoptosis
APAF-1	Factor de activación de la apoptosis 1
CARD	Dominio reclutador de caspasas
HSP	Proteína de choque térmico
MMP	Permeabilidad de la membrana mitocondrial
MOMP	Permeabilidad de la membrana mitocondrial externa
BID	Agonista de muerte de dominio interactivo BH3
Bcl-2	Linfoma de células B2
$\Delta\psi_m$	Potencial de membrana mitocondrial
VDAC	Canal de aniones dependiente de voltaje
ANT	Translocador de nucleótidos de adenina
CypD	Ciclofilina D
CK	Creatina cinasa
HSP	Proteína de choque térmico
HKII	Hexoquinasa II

TSPO	Proteína translocadora
PiC	Acarreador de fosfato
GSK3	Proteína glucógeno sintasa cinasa 3
ERO	Especies reactivas de oxígeno
CsA	Ciclosporina A
MUC	Uniportador de calcio mitocondrial
AD	Enfermedad de Alzheimer
PD	Enfermedad de Parkinson
HD	Enfermedad de Huntington
ALS	Enfermedad de Esclerosis Lateral Amiotrófica
NaCl	Cloruro de sodio
NaHCO ₃	Bicarbonato de sodio
KCl	Cloruro de potasio
KH ₂ PO ₄	Fosfato monopotásico
MgSO ₃	Sulfato de manganeso
CaCl ₂	Cloruro de calcio
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)piperazin-1-iletanosulfónico
KOH	Hidróxido de potasio
CoCl ₂	Cloruro de cobalto
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
PBS	Amortiguador de fosfato salino
SFB	Suero fetal bovino
WST-1	Reactivo de proliferación celular
ICR	Índice de control respiratorio
JC-1	Colorante catiónico de carbocianina
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
SEM	Error estándar de la media
ANOVA	Análisis de varianza
STS	Estaurosporina

FITC	Isotiocianato de fluoresceína o fluoresceína-5-isotiocianato
PI	Ioduro de propidio
OSCP	Proteína que confiere sensibilidad a oligomicina
CTRL	Control
CR	Control respiratorio
mTORC1	Diana mecanicista del complejo de rapamicina 1
ATG5	Proteína 5 relacionada con la autofagia
LC3	Proteína asociada a microtúbulos 1B (MAP1B)
CHAPS	Detergente derivado de sulfobetaína del ácido fólico.
TBS	Amortiguador salino con Tris
BCA	Ensayo de ácido bicinconínico
PMSF	Inhibidor de proteasas fluoruro de fenilmetilsulfonilo
SDS-PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
GAPDH	Enzima gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
PVDF	Membrana de fluoruro de polivinilideno
FCCP	Carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona
CCCP	El carbonilcianuro-m-clorofenilhidrazona
DNF	2,4-dinitrofenol
BKA	Ácido bongkrekico
ATK	Atractilósido
O ₂	Oxígeno
O ₂ ^{•-}	Superóxido
OH [•]	Radical hidroxilo
OH ⁻	Ion hidroxilo
ON [•]	Óxido nítrico
ONOO ⁻	Peroxinitrito
OXPPOS	Fosforilación oxidativa
ADP/O	Relación de moles de ATP sintetizados por mol de O ₂ usado

RESUMEN

La fibrosis pulmonar idiopática (FPI) es una enfermedad progresiva, irreversible y letal, caracterizada por el incremento y activación de fibroblastos/miofibroblastos. En estudios previos se ha sugerido que los fibroblastos de FPI son resistentes a la apoptosis, pero los mecanismos no se conocen con precisión. La inhibición del poro de transición de permeabilidad (PTPm) ha sido implicada en la resistencia a la apoptosis en algunos tipos celulares, y en este contexto, analizamos el papel de la función mitocondrial y el PTPm en la resistencia a la apoptosis de fibroblastos de pacientes con FPI tanto en condiciones basales como después de la apoptosis inducida por mitomicina C. Con este propósito, se midió en fibroblastos de pulmones normales y de pacientes diagnosticados con FPI la liberación de citocromo c, apertura del PTPm, respiración mitocondrial, potencial de membrana mitocondrial, cociente ADP/ATP, concentración de ATP y morfología mitocondrial. Nuestros resultados revelaron que los fibroblastos provenientes de pacientes con FPI son resistentes a la apoptosis inducida por mitomicina C y presentan menor liberación de citocromo c que los fibroblastos control. Además, los fibroblastos de FPI mostraron resistencia a la apertura del PTPm inducida por ionomicina, lo cual correlacionó con una disminución marcada en los niveles de expresión del translocador de nucleótidos de adenina (ANT) y con una reducción en la liberación de calcio. A pesar de que los fibroblastos de FPI no presentaron cambios en el potencial de membrana mitocondrial, encontramos una red mitocondrial fragmentada con mitocondrias delgadas, escasas, y desordenadas. Además, los fibroblastos de FPI mostraron disfunción mitocondrial evidenciada por un decremento en los parámetros respiratorios, los niveles de ATP y el cociente ADP/ATP, lo que coincide con la disminución de los niveles de expresión de ANT. Nuestros hallazgos demuestran que los fibroblastos de FPI son resistentes a la apoptosis inducida por mitomicina y que la alteración en la apertura del PTPm contribuye a dicha resistencia.

ABSTRACT

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is a progressive, irreversible, and lethal disease characterized by the increase and activation of fibroblasts/myofibroblasts. Previous reports have suggested that IPF fibroblasts are resistant to apoptosis, but the mechanisms remain unclear. Since inhibition of the mitochondrial permeability transition pore (mPTP) has been implicated in the resistance to apoptosis, in this study, we analyzed the role of mitochondrial function and the mPTP on apoptosis resistance of IPF fibroblasts under basal conditions and after mitomycin C-induced apoptosis. We measured the release of cytochrome c, mPTP opening, mitochondrial respiration, mitochondrial membrane potential, ADP/ATP ratio, ATP concentration, and mitochondrial morphology. We found that IPF fibroblasts were resistant to mitomycin C-induced apoptosis and exhibited less cytochrome c release than control fibroblasts. Likewise, IPF fibroblasts showed resistance to ionomycin-induced mPTP opening, which correlated with a marked decrease in adenine nucleotide translocator 1 expression levels and a reduction in calcium release. IPF fibroblasts did not present changes in the mitochondrial membrane potential, but still, we found a fragmented mitochondrial network with scarce, thin, and disordered mitochondria. In addition, IPF fibroblasts showed mitochondrial dysfunction evidenced by decreased respiratory parameters, ATP levels, and ratio ADP/ATP, which coincides with the decrease in the expression levels of ANT. Our findings demonstrate that IPF fibroblasts are resistant to mitomycin-induced apoptosis and that altered mPTP opening contributes to this resistance.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Fibrosis pulmonar idiopática

La fibrosis pulmonar es el resultado final de numerosas enfermedades respiratorias, y se caracteriza por el depósito excesivo de matriz extracelular que destruyen la arquitectura y función normal del pulmón. Uno de los padecimientos más frecuentes, y de hecho el más agresivo, es la fibrosis pulmonar idiopática (FPI).

La FPI es definida como una forma específica de neumonía intersticial fibrosante, de etiología desconocida, progresiva, irreversible y letal a corto plazo. Ocurre principalmente en personas adultas mayores (55-75 años) y se encuentra limitada a los pulmones. La FPI presenta un patrón radiológico e histopatológico de una neumonía intersticial usual (NIU) [1].

La FPI puede presentarse en forma esporádica o familiar y se manifiesta usualmente con disnea de esfuerzo progresiva, tos crónica, hiporexia, astenia, así como deterioro del desempeño en las pruebas de función pulmonar. La reducción funcional respiratoria es lenta y progresiva, pero algunos pacientes pueden presentar exacerbaciones agudas, o lesiones enfisematosas, lo que resulta en diferentes patrones de sobrevivencia [2] (**Figura 1**).

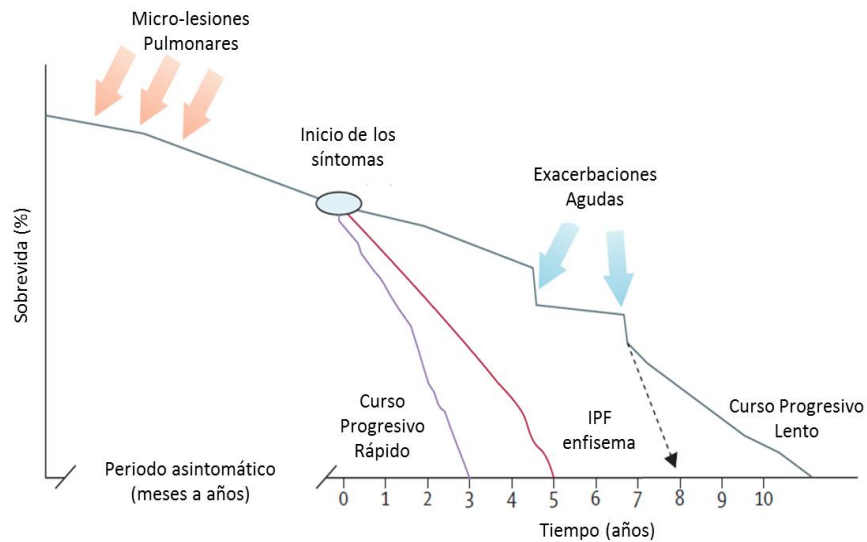


Figura 1. Fenotipos clínicos de Fibrosis Pulmonar Idiopática. Diferentes fenotipos clínicos caracterizan la historia natural en pacientes con FPI.

La enfermedad tiene un periodo asintomático largo (meses a años). Los pacientes acuden a valoración clínica cuando las lesiones pulmonares alcanzan un umbral suficiente para provocar síntomas. La mayoría de los pacientes siguen un declive clínico y funcional lento después del diagnóstico (curso progresivo lento). Aproximadamente el 10% de los pacientes presentan episodios de deterioro clínico agudo (exacerbaciones agudas), lo cual inicia la fase terminal de la enfermedad. Algunos pacientes tienen una breve duración de la enfermedad con una progresión rápida (curso progresivo rápido). Los fumadores pueden desarrollar fibrosis pulmonar combinada con enfisema, con una supervivencia más corta en comparación con los pacientes que solo presentan FPI. **Imagen modificada de King y Cols, 2011 [2].**

A nivel mundial, la FPI afecta a aproximadamente 3 millones de personas, con una incidencia anual estimada de 2-30 casos y una prevalencia de 10-60 casos por cada 100,000 habitantes [3-5]. La mitad de los pacientes con FPI muere entre 3 a 5 años después del diagnóstico y a la fecha no existe un tratamiento que mejore su calidad de vida [3]. El índice de mortalidad en FPI está asociado fuertemente con el sexo, la edad y las anomalías fisiológicas del paciente. La enfermedad es más recurrente en hombres que en mujeres y su frecuencia incrementa de manera considerable durante el envejecimiento. Además, existen otros factores de riesgo ambiental importantes en el desarrollo de FPI como son el humo de cigarro, infecciones virales, reflujo gastroesofágico, predisposición genética y la exposición a polvos de madera y/o metal [2].

1.2 Mecanismos patogénicos en FPI

Desde el punto de vista de sus mecanismos patogénicos, se ha postulado que la FPI inicia con micro lesiones y activación aberrante del epitelio alveolar, el cual secreta numerosas citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento, los cuales en conjunto inducen la migración, proliferación y diferenciación de fibroblastos en miofibroblastos. Los miofibroblastos activos secretan cantidades excesivas de matriz extracelular, en especial colágenas fibrilares, dando como resultado la pérdida de la arquitectura y función normal del pulmón [3].

Uno de los aspectos más interesantes de la patogénesis de la FPI, es la resistencia que presentan los fibroblastos y miofibroblastos a la apoptosis [6-11], mientras que, por el contrario, las células epiteliales alveolares son muy sensibles a este proceso [12] (**Figura 2**).

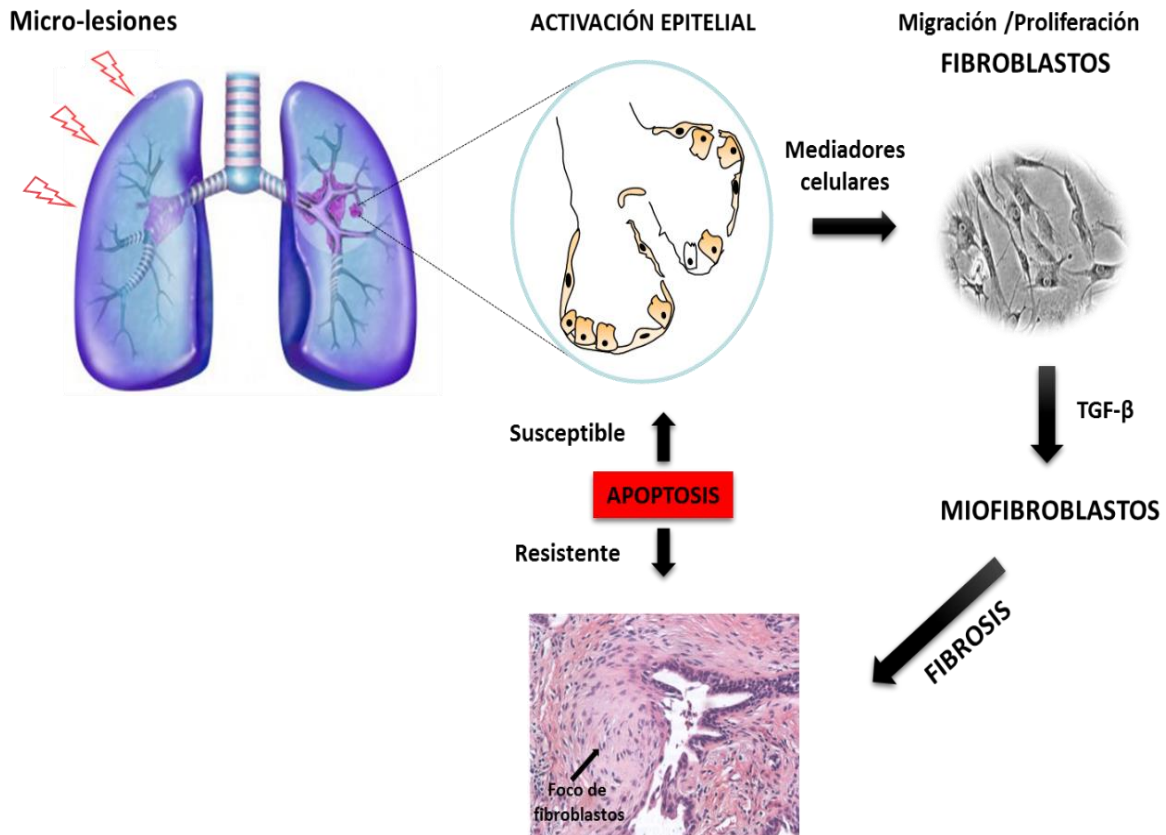


Figura 2. Esquema de los principales eventos fibrogénicos propuestos en la patogénesis de FPI. La FPI inicia con micro lesiones y activación del epitelio alveolar, el cual secreta diversos mediadores que inducen migración, proliferación y diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos, los cuales secretan cantidades excesivas de matriz extracelular dando como resultado fibrosis pulmonar.

Los mecanismos de este comportamiento paradójico se desconocen, pero en el caso de las células epiteliales se ha atribuido, al menos parcialmente, a defectos en la actividad de las mitocondrias [13,14].

Los fibroblastos y miofibroblastos son las células efectoras críticas en la fibrosis tisular debido a su participación en la elaboración de la matriz extracelular y los mecanismos de contracción y remodelación del tejido dañado. Durante la

regeneración fisiológica, los fibroblastos son eliminados por apoptosis y la evasión o resistencia a este proceso se ha asociado con una fibrosis progresiva [15].

Hallazgos histopatológicos han demostrado que los pacientes con FPI presentan acumulación de fibroblastos y miofibroblastos en grupos peculiares formando focos subepiteliales. La extensión o profusión de estos focos de fibroblastos en biopsias pulmonares está fuertemente correlacionada con una mayor mortalidad en pacientes con FPI. Además, existe evidencia de que los fibroblastos de FPI tanto en el microambiente *in vivo* como durante el proceso de diferenciación *in vitro*, adquieren resistencia a la apoptosis [16].

Se considera que la resistencia a la apoptosis contribuye a la persistencia de miofibroblastos activos en los sitios de lesión lo cual desempeña un papel importante en la patofisiología de la FPI. La apoptosis es un proceso fisiológico importante para el desarrollo y la homeostasis del tejido, manteniendo un balance en el número de células a través de la regulación de proliferación y muerte celular. El proceso de apoptosis puede participar en el desarrollo de la FPI por dos mecanismos principales: 1) incrementando la muerte de células epiteliales, las cuales conducen a una ineficiente re-epitelización y regeneración tisular y/o 2) por resistencia a la apoptosis de fibroblastos y miofibroblastos, conduciendo a un incremento en la fibrosis [16].

La apoptosis puede ser activada por dos vías distintas: la vía extrínseca o ligada al receptor de muerte, la cual involucra la activación de los receptores Fas (CD95) y receptor 1 del factor de necrosis tumoral (TNF-R1) y la vía intrínseca que se encuentra asociada a disfunción mitocondrial [17].

En diversos estudios se ha demostrado que los fibroblastos de pacientes con FPI son resistentes a la apoptosis mediada por la vía extrínseca de Fas. Esta resistencia ha sido atribuida, al menos en parte, a un incremento en la expresión de algunos de los miembros de las familias de proteínas inhibitoras de la apoptosis como el inhibidor ligado al cromosoma X de la proteína de apoptosis (XIAP), inhibidor celular proteico de FLICE (c-FLIP) y el inhibidor baculoviral de la apoptosis (survivina). Sin embargo, los mecanismos moleculares implicados son inciertos [6-11].

A pesar de que la mitocondria desempeña un papel central en la ejecución, amplificación y regulación de la apoptosis celular a través de la vía intrínseca, aún se desconoce cuál es su participación en la resistencia a la apoptosis observada en fibroblastos de pacientes con FPI.

1.3. Estructura y función de la mitocondria.

Las mitocondrias son organelos en donde se lleva a cabo el metabolismo oxidativo de las células eucariontes, estas desempeñan un papel central en la bioenergética celular, ya que generan más del 90% de adenosín trifosfato (ATP), el cual es empleado como fuente energética de la célula [18]. Además, estos organelos regulan la homeostasis de calcio y participan en las vías de señalización que controlan la respuesta celular ante estímulos externos e intervienen en la regulación de la apoptosis celular [18].

La morfología y tamaño de las mitocondrias varía entre los diferentes tipos celulares de acuerdo a su función de origen y a su estado metabólico; éstas pueden ser de forma esférica, alargada o filamentosa. Además, su número en los diferentes tejidos varía dependiendo de las necesidades energéticas de las células [19].

Estos organelos están conformados por dos bicapas lipídicas una externa y una interna separadas por dos subcompartimentos acuosos, el espacio intermembrana y la matriz. La membrana mitocondrial externa (MME) es altamente permeable a los solutos y metabolitos pequeños de aproximadamente 5 KDa, debido a la presencia de porinas y al canal de aniones dependiente de voltaje (VDAC), el cual es responsable de la alta permeabilidad de la MME [20]. Además, la membrana externa cuenta con múltiples complejos proteicos, los cuales favorecen el transporte de proteínas mitocondriales codificadas por genes nucleares, a los distintos compartimentos mitocondriales internos. Se han caracterizado dos sistemas de importación e incorporación de proteínas en la MME, uno de ellos integrado por el translocador de membrana externa (TOM), formado por un poro de importe principal Tom40, los receptores Tom20, Tom70 y Tom22 y pequeñas proteínas Tom5, Tom6 y Tom7. Este complejo se encarga de transportar a las proteínas destinadas a

cualquiera de los compartimentos mitocondriales, mientras que el segundo complejo corresponde a la maquinaria de ensamble (SAM), al que se dirigen los precursores de proteínas con conformación de barril- β cuyo destino final es la MME [21].

La membrana mitocondrial interna (MMI) es poco permeable a iones incluyendo protones tales como H^+ , K^+ , Na^+ y Cl^- , por lo que su transporte de la matriz mitocondrial al espacio intermembranal es altamente regulado por canales y transportadores selectivos. La impermeabilidad de la MMI es esencial para mantener el gradiente de protones para la fosforilación oxidativa (OXPHOS). Esto significa que el flujo de una variedad de metabolitos, nucleótidos, coenzimas y componentes de la matriz mitocondrial cruzan la MMI de una manera altamente regulada. Este transporte selectivo es catalizado principalmente por los miembros de la familia de transportadores mitocondriales SLC25, los cuales varían en la naturaleza y tamaño de los sustratos transportados y en el mecanismo de transporte: uniporte, simporte o antiporte [22]. Entre estos transportadores mitocondriales encontramos al translocador de nucleótidos de adenina (ANT), encargado de catalizar el intercambio electrogénico de ADP^{3-} citosólico por ATP^{4-} de matriz con alta especificidad y a la translocasa de fosfato, la cual se encarga de translocar fosfato inorgánico (P_i) y un protón (H^+) a la matriz [22].

La MMI, contiene aproximadamente un 75% de su masa en proteínas y un 25% de lípidos. Además, cuenta con cuatro diferentes complejos transportadores de proteínas: 1) la maquinaria de ensamblaje de proteínas del espacio intermembranal (MIA), que impulsa la importación y plegamiento oxidativo de las proteínas al IMS; 2) la translocasa de la membrana interna 22 (TIM22), que reconoce a secuencias señal internas e inserta proteínas con estructura de barril- β ; 3) la translocasa de membrana interna 23 (TIM23), que transporta proteínas con presecuencias, tanto a la membrana externa como a la matriz mitocondrial, para lo que requiere de un motor de importe asociado a la presecuencia (PAM) y 4) la translocasa de exportación mitocondrial (OXA), que exporta a las proteínas mitocondriales sintetizadas en la matriz por los ribosomas hacia la membrana interna [23].

La MMI se puede dividir en dos subcompartimentos morfológicamente distintos, las crestas y la membrana límite interna. Las crestas sobresalen en el espacio de la matriz y pueden comprender más del 90% de la membrana interna, mientras que la membrana límite interna está estrechamente unida a la membrana externa. En la MMI se encuentra embebido el sistema multienzimático que se encarga de llevar a cabo la fosforilación oxidativa (OXPHOS) [23].

El espacio que se genera entre la membrana externa y la interna se denomina espacio intermembranal, el cual tiene una alta concentración de protones como resultado del bombeo de los complejos enzimáticos de la cadena respiratoria. Así mismo, es el compartimento submitocondrial más restringido, que alberga alrededor del 5% del proteoma mitocondrial y está dotado de diferentes mecanismos de importación de proteínas [24].

Las mitocondrias cuentan también con una matriz mitocondrial, la cual contiene muchas de las enzimas que forman parte de las principales rutas metabólicas celulares, tales como las del ciclo del ácido tricarbóxico, el ciclo de la urea, la gluconeogénesis, la oxidación de ácidos grasos y la OXPHOS. Además, la matriz también contiene a otros componentes como son: el ácido desoxirribonucleico mitocondrial (DNAm), ácido ribonucleico de transferencia (RNAt), DNA y RNA polimerasa, los mitoribosomas, cofactores de nucleótidos e iones inorgánicos [24] **(Figura 3)**.

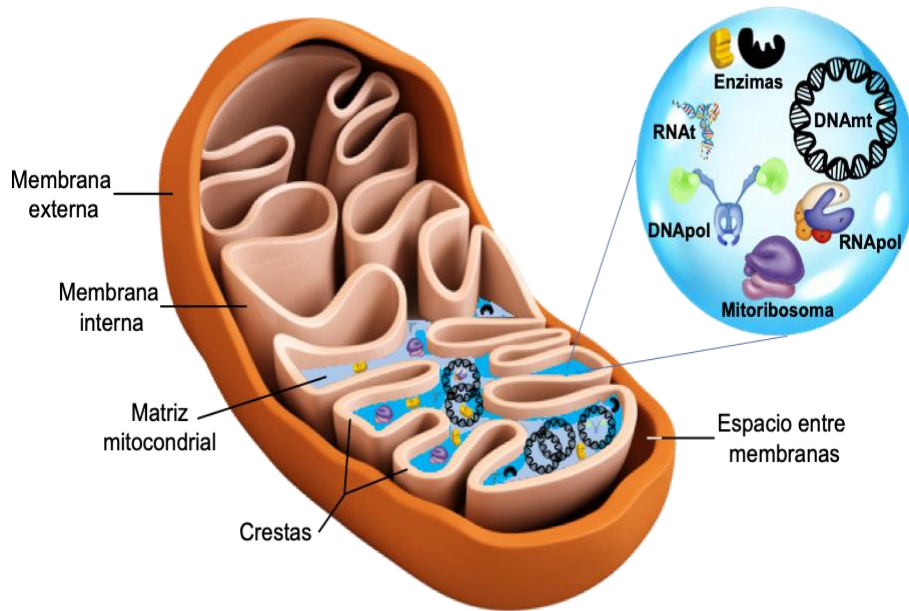


Figura 3. Estructura básica de la mitocondria. La morfología de la mitocondria es muy plástica, ya que son organelos que activan constantemente los procesos de fisión y fusión para disminuir el estrés y el daño mitocondrial. Normalmente se las representa en forma alargada, con un diámetro que oscila entre 0.5 y 1 μm , y con una longitud de hasta 8 μm . La mitocondria está formada por una membrana externa, una interna, un espacio intermembranal y una matriz mitocondrial que alberga al genoma mitocondrial (DNAm), mitoribosomas, polimerasas de DNA (DNAPol), de RNA (RNAPol), RNAs de transferencia (RNAt) y enzimas involucradas en la obtención de energía. **Imagen modificada de Russi & Morelli.**

1.3.1 Bioenergética mitocondrial

La producción de energía dentro de la mitocondria se lleva a cabo a partir del catabolismo de la glucosa en el citosol, en la cual se generan dos moléculas de piruvato, las cuales pasan a través de la mitocondria hasta llegar al complejo piruvato deshidrogena (PDH), enzima que transforma a las dos moléculas de piruvato en dos moléculas de acetil coenzima A (acetil-CoA). Estas dos moléculas de acetil-CoA entran al ciclo de Krebs donde se producen 3 moléculas de nicotinamida adenina dinucleótido (NADH) y 2 moléculas de flavina adenina dinucleótido (FADH_2), en total 6 NADH y 4 FADH_2 por molécula de piruvato. Posteriormente, las coenzimas NADH y FADH_2 donan sus electrones a los complejos I (NADH: ubiquinona oxidorreductasa) y II (succinato deshidrogenasa) de

la cadena de transporte de electrones (CTE), respectivamente. Luego, los electrones son transferidos a los complejos III y IV a través de acarreadores electrónicos móviles como son la ubiquinona y el citocromo c. El flujo de electrones a través de los complejos genera un gradiente electroquímico, el cual da como resultado la reducción del oxígeno a H₂O por la enzima citocromo c oxidasa. De forma simultánea, se lleva a cabo un bombeo de protones (H⁺) de la membrana mitocondrial interna hacia el espacio intermembranal por los complejos I, III y IV generando energía en forma de fuerza protón motriz (FPM), dicha energía hace posible que la ATP sintasa pueda generar ATP a partir de adenosín difosfato (ADP) y fosfato inorgánico (Pi) [18].

1.4 Cadena de transporte de electrones mitocondrial

El sistema de la OXPHOS en los mamíferos está compuesto de cinco complejos multiprotéicos (I-V) y dos acarreadores electrónicos móviles (ubiquinona y citocromo c), los cuales se encuentran embebidos en la MMI. Los primeros cuatro complejos redox constituyen a la CTE mitocondrial. Estos se distribuyen de manera heterogénea en la MMI y pueden encontrarse en combinaciones específicas formando a los “supercomplejos”, los cuales están constituidos principalmente por aglomeración de los complejos I, III y IV en la membrana mitocondrial. Se ha sugerido que la función de los supercomplejos puede ser la regulación de la eficiencia en la producción de ATP en las mitocondrias por medio de la OXPHOS, ya que están formados únicamente por las proteínas de la cadena de transporte de electrones, en específico por las proteínas que tienen la capacidad de transportar protones de la matriz mitocondrial al espacio intermembranal [25] **(Figura 4)**.

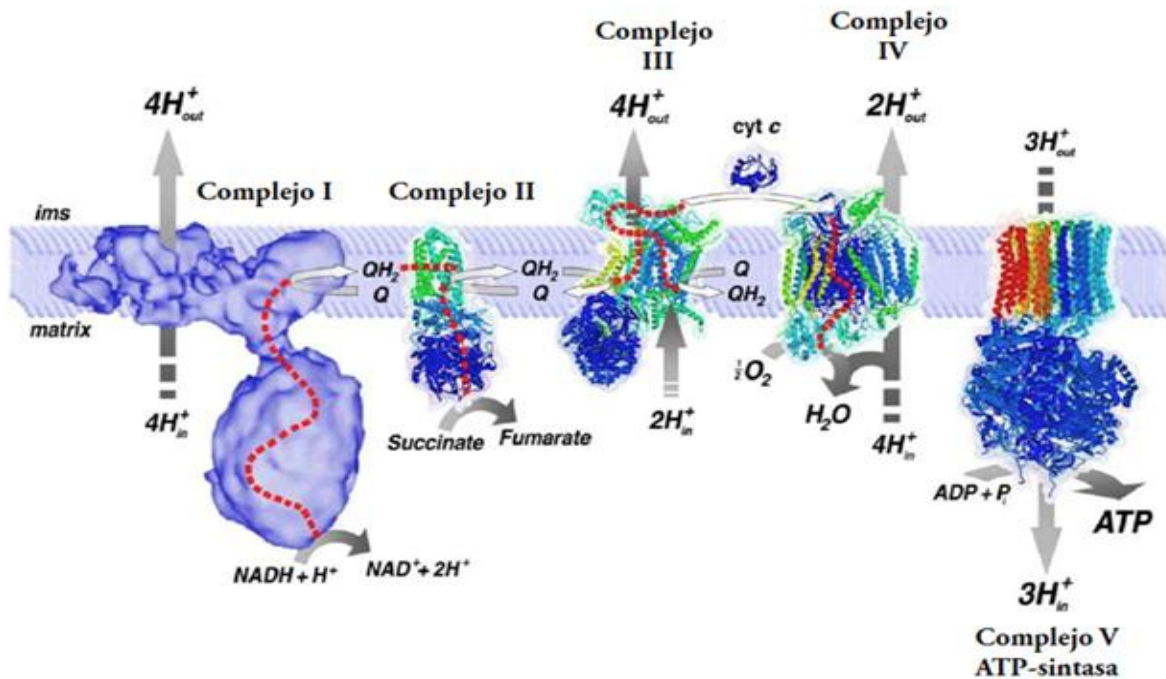


Figura 4. Componentes de la fosforilación oxidativa. Los complejos respiratorios I y II oxidan sustratos provenientes del ciclo de Krebs, como lo son el NADH y el succinato, para generar una corriente de electrones a lo largo de la membrana que culmina en el consumo de oxígeno por el complejo IV y la formación de agua. Durante la respiración, los complejos I, III y IV bombean protones a través de la membrana interna mitocondrial hacia el espacio intermembranal, los cuales son transportados de regreso a la matriz mitocondrial por la ATP sintasa (o complejo V). Este flujo de protones es lo que impulsa la síntesis del ATP durante la fosforilación oxidativa de acuerdo con la teoría quimiosmótica de Peter Mitchell (**Imagen tomada de Tuena de Gómez Puyou, 2015**).

1.4.1 Complejo I o NADH: ubiquinona oxidoreductasa

Es una enzima compuesta por al menos 46 polipéptidos diferentes y contiene un mononucleótido de flavina (FMN) unido de manera no covalente. Además, posee por lo menos 8 centros hierro-azufre (Fe-S) como cofactores redox. En este complejo se catalizan dos procesos simultáneos que están obligadamente acoplados:

- a) La transferencia exergónica de un ion hidruro a la ubiquinona (Q) por el NADH y de un protón proveniente de la matriz, expresada por:



- b) La transferencia endergónica de 4 H⁺, los cuales son bombeados desde la matriz hacia el espacio intermembranal, contribuyendo a la generación del gradiente electroquímico de protones ($\Delta\mu\text{H}^+$) para la síntesis de ATP.

El ubiquinol (QH₂) es un compuesto liposoluble móvil, el cual facilita la transferencia de los electrones desde el complejo I al III. Existen diversos compuestos capaces de bloquear la transferencia de los electrones desde los centros Fe-S hacia la Q, entre los que se encuentran la rotenona, la piericidina, el amital y los barbitúricos. El uso de estos inhibidores específicos ha sido empleado en el estudio de los diferentes estados de oxido-reducción de este complejo [26]. Además, el complejo I es uno de los principales sitios de producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) [27].

1.4.2 Complejo II o Succinato deshidrogenasa

Es una enzima compuesta por 4 subunidades proteicas y 5 grupos prostéticos. Las dos subunidades mayores A y B son solubles en agua y se orientan hacia el lado de la matriz mitocondrial, en donde forman parte del ciclo de Krebs. Estas subunidades unen a los grupos prostéticos flavín adenín dinucleótido (FAD) y a tres centros Fe-S, además de que están unidas al resto de las subunidades hidrofóbicas C y D que se anclan en la membrana y poseen un grupo hemo tipo b, que provee el sitio de unión a la Q. En la oxidación de succinato a fumarato, 2 e⁻ y 2 H⁺ son transferidos a FAD.

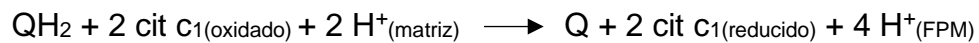


El FADH₂ transfiere los electrones a la Q vía centros Fe-S del Complejo II y posteriormente estos electrones pasan al complejo III. No obstante, la transferencia de electrones en este complejo no se encuentra acoplada a la translocación de H⁺, por lo que el complejo II no contribuye a la generación del $\Delta\mu\text{H}^+$ [26].

1.4.3 Complejo III o ubiquinol: citocromo c oxidoreductasa

El ubiquinol (QH₂) producto de los complejos I y II puede difundir a lo largo de la MMI, donde se encuentra con el sitio de oxidación para el QH₂ del complejo III. Aquí se oxida de nuevo a ubiquinona Q. Los dos protones se liberan al espacio intermembrana y los electrones se transfieren al citocromo c soluble. Por lo tanto, la actividad general del complejo III es la catálisis de la oxidación de QH₂ y la reducción del citocromo c [25].

El complejo III es un dímero de monómeros idénticos, la interfase entre ambos monómeros forma dos cavidades, cada una de ellas contiene un sitio de unión diferente para QH₂. En este complejo se acopla la transferencia de electrones del QH₂ al citocromo c con la transferencia de H⁺ de la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembranal. El paso de electrones y H⁺ a través del complejo III se puede describir con la ecuación para la reacción redox del ciclo Q:



El complejo III además adecúa el intercambio de electrones entre la Q (acarreadora de 2 e⁻) y los citocromos b₅₆₂ y b₅₆₆, c₁ y c (acarreadores de 1 e⁻). Así, 4 H⁺ son translocados al espacio intermembranal por cada 2 e⁻ que pasan a través del complejo III al citocromo c. La transferencia de electrones de QH₂ al citocromo c se lleva a cabo por el ciclo de la Q (**Figura 5**). En este ciclo se generan intermediarios de la Q como las semiquinonas, que contribuyen a la generación de ERO en presencia de metales de transición. El citocromo c es una proteína soluble en el espacio intermembranal y está anclada a la MMI. Una vez que el grupo hemo del complejo III acepta 1 e⁻, el citocromo c se moviliza hacia el complejo IV para donar 1 e⁻ al centro binuclear del cobre. La antimicina A bloquea el flujo de electrones de la Q al citocromo c mientras que el mixotiazol previene el flujo de electrones de la QH₂ a la proteína Fe-S Rieske [26].

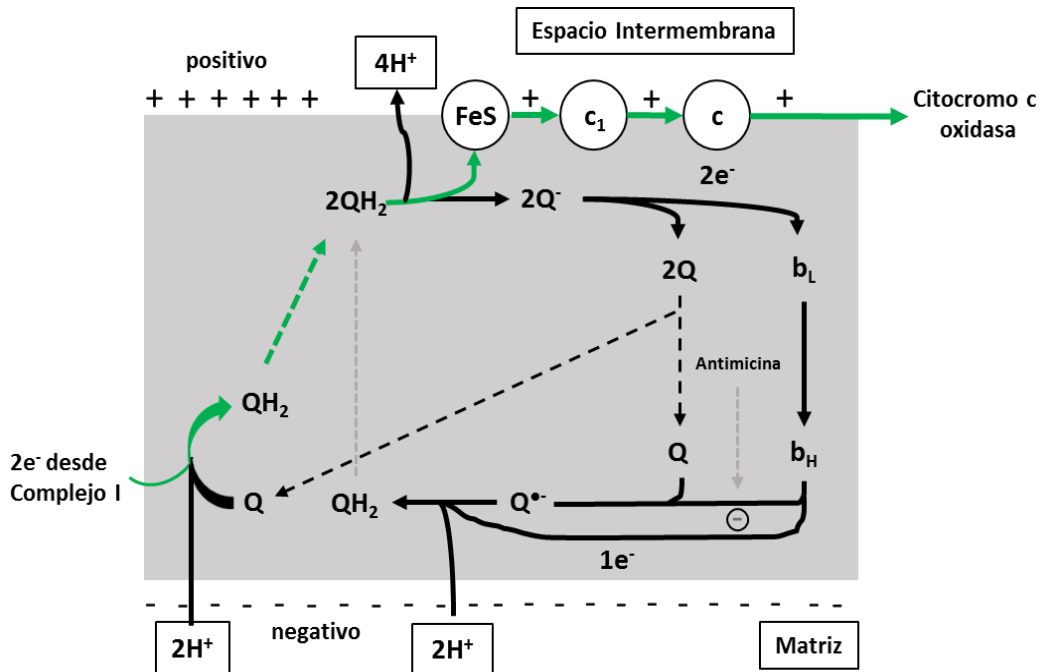
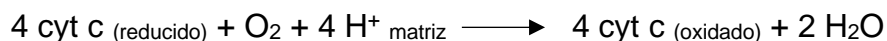


Figura 5. Rutas propuestas sobre la transferencia de electrones en el complejo III. En este esquema se muestra como la Q es reducida a QH₂ por el complejo I, usando 2H⁺ por cada QH₂ al espacio intermembranal. Uno de los electrones es transferido hacia la proteína Rieske (Fe-S) y de ahí pasa al citocromo c₁ y posteriormente al citocromo c. El otro electrón es transferido al grupo hemo b_L del citocromo b, es entonces cuando atraviesa la membrana y pasa al grupo hemo b_H, que reduce a la Q a radical aniónico de Q (Q^{•-}). Posteriormente, un segundo QH₂ es oxidado en la misma forma y el electrón pasa a través del centro del citocromo b y es usado para reducir la Q^{•-} a QH₂, el cual toma otros 2H⁺ desde la matriz. El resultado neto es el bombeo de 4H⁺ por cada 2 electrones que pasan a través de este complejo. **Modificado de Metzler, 2003.**

1.4.4 Complejo IV o citocromo c oxidasa.

El citocromo c oxidasa cataliza la transferencia de electrones desde el citocromo c reducido producido por el complejo III al oxígeno molecular (O₂). Esta reducción de dos moléculas de H₂O requiere de la transferencia de cuatro electrones desde el citocromo c junto con cuatro protones, los cuales son tomados de la matriz.



El citocromo c es un transportador soluble que pasa electrones al complejo IV. Este complejo está formado por 13 subunidades que, a su vez, conforman 3 subunidades, una de ellas cumple únicamente funciones estructurales, mientras que los otros 2 restantes contienen centros redox: citocromos a y a₃; iones Cu (Cu_a²⁺ y Cu_b²⁺). En cada ciclo catalítico completo la enzima citocromo c oxidasa acepta 4 electrones del citocromo c (2 por cada par de electrón), uno a la vez, los cuales se emplean para realizar la reducción del oxígeno a agua.



Los electrones entran a través del centro Cu_a²⁺, pasan por citocromo a, después por el citocromo a₃ y por último al centro Cu_b²⁺ donde se lleva a cabo la reducción del oxígeno, dicha reacción requiere 4 e⁻ y 4 H⁺, por lo que adicionalmente 4 H⁺ son bombeados a través de la membrana interna en cada ciclo catalítico [26].

1.4.5 ATP sintasa o F1Fo-ATPasa

La ATP sintasa o complejo V, es un complejo enzimático que cataliza la formación de ATP a partir de ADP y Pi. Este complejo consta de 16 subunidades las cuales conforman a dos componentes principales F1 y Fo. El complejo F1Fo consiste en un dominio F1 soluble, responsable de la síntesis de ATP, y un dominio Fo de membrana, involucrado en la translocación de protones. Estos dominios están conectados por un tallo central conformado por las subunidades γ, δ y ε, que gira dentro del dominio F1 y un tallo periférico estacionario con las subunidades b, d, F₆ y la proteína que confiere sensibilidad a oligomicina (OSCP). El tallo central y un anillo de 8 subunidades c en el dominio membranal constituyen al rotor de la enzima. Durante la síntesis de ATP, la rotación impulsada por FPM del anillo c en Fo se transmite a través del tallo central para impulsar los cambios conformacionales en F1, lo que da como resultado la síntesis de una molécula de ATP por rotación de 120°. El dominio F1, es una proteína de membrana, que lleva a cabo la producción de ATP y en condiciones de aislamiento puede catalizar la hidrólisis de ATP, mientras que Fo es una proteína integral de membrana sensible a oligomicina, que tiene un poro protónico a través del cual los (H⁺) generados por la CTE pasan hasta

llegar a síntesis de ATP. A este complejo también se le conoce como ATPasa o ATP sintasa, ya que puede realizar actividades catalíticas distintas ya que no solo se encarga de sintetizar ATP, sino que también lo puede hidrolizar, dependiendo de la dirección del flujo de protones y del estado estructural de la CTE [28]. La ATP sintasa ocupa 3 protones, que pasan a través de su subunidad c para realizar un giro de sus subunidades α y β permitiendo la síntesis de ATP, de esta manera es como se acopla el transporte de electrones con la fosforilación oxidativa utilizando la FPM acumulada en el espacio intermembranal [26]. Además, el complejo F1Fo, se encuentra implicado en la formación estructural de las crestas mitocondriales, debido a que forma dímeros que contribuyen con la forma altamente curvada de las crestas, lo que favorece el contacto con los complejos mitocondriales de la OXPHOS para la producción de ATP [29,30].

El transporte de H^+ a partir de los complejos mitocondriales crea un gradiente electroquímico, el cual es ácido y positivo en el espacio intermembranal, y negativo y alcalino en el lado de la matriz mitocondrial. La energía almacenada en este gradiente electroquímico se utiliza para: 1) el importe de proteínas y calcio en la mitocondria, 2) para generar calor y 3) para la síntesis de ATP en la matriz mitocondrial. La eficiencia del acoplamiento mitocondrial está determinada tanto por la eficiencia con la cual los H^+ son bombeados hacia el exterior de la matriz mitocondrial por los complejos I, III y IV, como por la eficiencia con la cual el flujo de protones es convertido a ATP por la ATP sintasa. Finalmente, el ATP generado es intercambiado por ADP citosólico por el transportador de nucleótidos de adenina de la membrana mitocondrial interna [18].

Existen diversos compuestos capaces de desacoplar la fosforilación oxidativa de la cadena respiratoria a estos compuestos se le conoce como agentes desacoplantes. Algunos ejemplos son: el 2,4-dinitrofenol (DNF), el carbonilcianuro-p-trifluorometoxihidrazona (FCCP) y el carbonilcianuro-m-clorofenilhidrazona (CCCP), los cuales disipan el gradiente electroquímico entre la matriz y el espacio intermembranal, esto provoca que continúe el consumo de oxígeno y la transferencia de electrones, pero sin llegar a la síntesis de ATP [31].

1.5 Capacidad respiratoria y disfunción mitocondrial.

El consumo de oxígeno en las mitocondrias está regulado no solo por el aporte de NADH, sino también por los niveles de ADP y Pi. La regulación de la velocidad de la OXPHOS por los niveles de ADP se denomina control respiratorio (CR). Este mecanismo de regulación permite que, cuando los niveles de ADP se incrementan como consecuencia de un gasto de ATP, paralelamente aumenta la velocidad de la OXPHOS para reponer el ATP consumido. El incremento en la velocidad de la OXPHOS se refleja en un aumento del flujo de electrones a través de la cadena respiratoria y, por lo tanto, un incremento en el consumo de oxígeno. [32].

En condiciones experimentales el control respiratorio puede evaluarse en mitocondrias aisladas de tejido en presencia de oxígeno. Las mitocondrias intactas deben ser incubadas con un medio de sustratos oxidables que le permitan la generación de coenzimas reducidas. Los cambios en la velocidad del consumo de oxígeno se pueden determinar a través de un electrodo de oxígeno tipo Clark [33].

El consumo de oxígeno en las mitocondrias aisladas se puede determinar a través de cómo éstas responden a la presencia de diferentes sustratos como son: succinato, malato-glutamato, ADP y Pi o inhibidores de la CTE como cianuro de potasio (complejo IV), antimicina A (complejo III), rotenona (complejo I) y oligomicina (complejo V) o desacoplantes mitocondriales como son la carbonil-cianida-4-(trifluorometoxi) fenilhidrazona (FCCP). Las variaciones registradas en la velocidad del consumo de oxígeno en presencia de alguna de las sustancias antes mencionadas, se conocen como los estados de respiración mitocondrial [34].

El estado 1 representa la respiración mitocondrial basal, este estado se mide sólo en presencia de las mitocondrias aisladas y Pi presentes en el medio de respiración. El estado 2 representa la respiración mitocondrial en presencia de Pi y sustratos de oxidación (succinato o glutamato/malato/piruvato). El estado 3 es la respiración mitocondrial en presencia de ADP, sustratos de oxidación y Pi. La adición de ADP al medio estimula la síntesis de ATP e incrementa la velocidad del transporte de electrones, por lo que incrementa el consumo de oxígeno. El estado 4 comienza

cuando todo el ADP añadido ha sido fosforilado, esto provoca una disminución en el consumo de oxígeno por la ausencia de alguno de los sustratos y por lo tanto la respiración se hace lenta. La respiración en presencia del inhibidor de la ATP sintasa, oligomicina, puede aproximar la tasa de respiración del estado 4, el consumo de oxígeno utilizado para impulsar la fuga de protones [32,33]. Los distintos estados metabólicos mitocondriales pueden ser visualizados en el **Cuadro 1.**

Cuadro 1. Estados metabólicos mitocondriales

Estado Metabólico	O ₂	Nivel de ADP	Nivel de sustrato	Velocidad de respiración	Factor determinante de la actividad respiratoria
1	Disponible	Bajo	Bajo	Lenta	ADP
2	Disponible	Alto	Muy bajo	Lenta	Sustrato cadena respiratoria
3	Disponible	Alto	Alto	Rápida	Cadena respiratoria
4	Disponible	Bajo	Alto	Lenta	ADP
5	No disponible	Alto	Alto	Nula	Oxígeno

Además, la adición de un protonóforo como FCCP puede ayudar a estimar la tasa máxima de consumo de O₂, sin tomar en cuenta la maquinaria que limita la velocidad para la formación de ATP, aumentando la actividad de la cadena respiratoria.

La relación entre los estados 3 y 4 de respiración [Edo3/Edo4], se denomina CR, este valor es muy útil para poder estimar la integridad mitocondrial. El valor del CR proporciona la tasa de acoplamiento entre la síntesis de ATP y el flujo de electrones. Valores de CR<2 indican mitocondrias desacopladas, mientras que los CR>3 son detectados en mitocondrias acopladas. Otro índice útil para evaluar la actividad mitocondrial es la relación ADP/O, es decir, los moles de ATP sintetizados por mol de O (^{1/2}O₂) usado. Ambos valores, tanto el CR como la relación ADP/O son utilizados para expresar el grado de acoplamiento entre los procesos de oxidación y de fosforilación [32] (**Figura 6**).

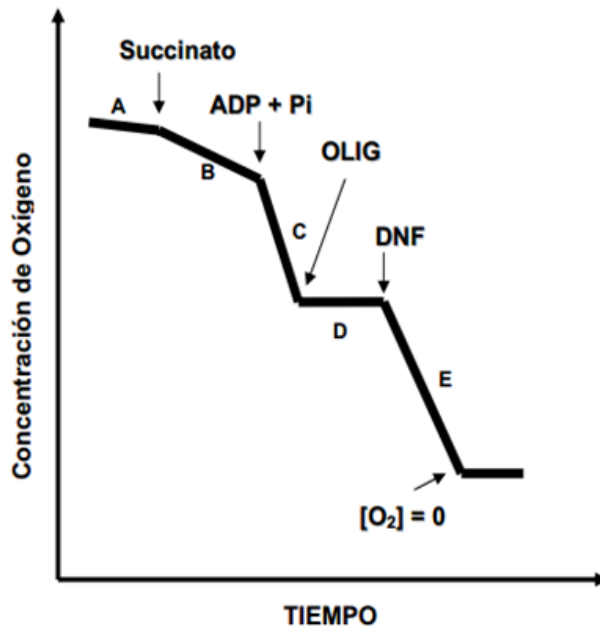


Figura 6. Representación esquemática de los estados de respiración mitocondrial. **A)** Estado 1 (Respiración mitocondrial basal), **B)** Estado 2 (Respiración mitocondrial en presencia de Pi y un sustrato de oxidación como succinato o una mezcla glutamato/malato), **C)** Estado 3 (Respiración en presencia de ADP, Pi y sustrato de oxidación), **D)** Estado 4 inducido (Respiración en presencia del inhibidor de la ATP sintasa oligomicina), **E)** Estado 5 (Respiración mitocondrial máxima en presencia de 2,4 dinitrofenol DNF).

Por otro lado, la respiración mitocondrial también puede ser evaluada en células intactas, a través de un oxígrafo de alta resolución (Oroboros, Oxígrafo-2k). Este equipo permite determinar los cambios en la respiración celular, manteniendo la integridad funcional de la mitocondria. El equipo Oroboros, censa el flujo de oxígeno ($\text{pmol } O_2/\text{s}/10^6$ células), el cual es directamente proporcional a el consumo de oxígeno celular. Este ensayo nos permite obtener distintos parámetros de respiración en las células intactas como: a) respiración de rutina o basal, el cual representa el consumo de oxígeno debido a la combinación de la producción de ATP y la fuga de protones. Este parámetro representa la demanda de energía en condiciones basales; b) fuga de protones, es la respiración mitocondrial remanente, después de la inyección con oligomicina, inhibidor del complejo V. Un incremento significativo en estos valores puede ser indicativo de daño mitocondrial; c) respiración máxima, es la respiración inducida por la adición de

desacoplantes mitocondriales tales como DNF, CCCP o FCCP, los cuales imitan la demanda de energía fisiológica, conduciendo a un incremento en el consumo de oxígeno; d) consumo de oxígeno residual (ROX), es inducido por la adición de inhibidores mitocondriales, rotenona (complejo I) y antimicina (complejo III), los cuales bloquean por completo el flujo de transporte de electrones en conjunto con la inhibición del complejo V inducida por oligomicina. El consumo de oxígeno restante se debe a la respiración no mitocondrial, inducida por oxidasas y otras enzimas celulares; e) respiración asociada a la producción de ATP, esta se obtiene por la diferencia entre la respiración de rutina y la fuga de protones. La disminución en el consumo de oxígeno con la inyección de oligomicina representa el consumo de oxígeno utilizado para la producción de ATP [35]. En la **Figura 7** se observan los diferentes estados de respiración mitocondrial inducidos en células intactas.

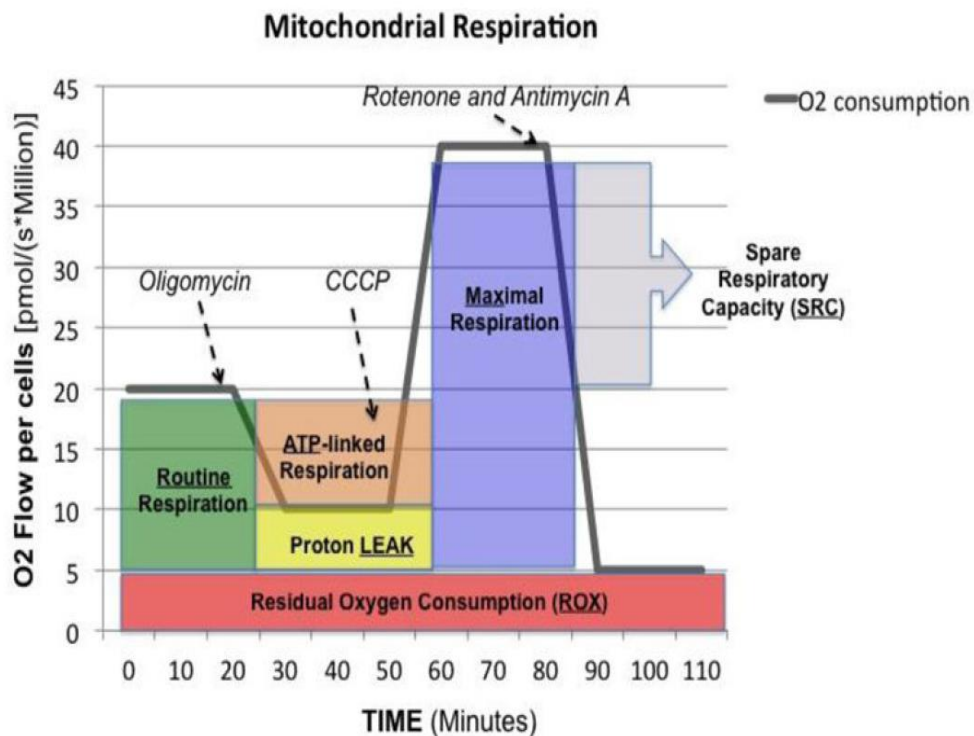


Figura 7. Respirometría de alta resolución y protocolo de acoplamiento en células intactas. Trazo representativo del consumo de oxígeno medido en células intactas. La línea gris continua muestra la tasa de consumo de oxígeno. Después de medir el consumo de oxígeno de rutina, se agrega el inhibidor de la ATP sintasa “oligomicina” para obtener la fuga de protones. El desacoplador CCCP estimula la respiración máxima, suponiendo que todos los sustratos necesarios estén presentes. Finalmente, la rotenona (inhibidor del complejo I) y la antimicina A

(inhibidor del complejo III) evitarán por completo el consumo de oxígeno a través del bloqueo de la CTE. El consumo de oxígeno residual restante (ROX) se atribuye a otras fuentes no mitocondriales, como las oxidasas. El consumo de oxígeno ligado a ATP se calcula como la respiración de rutina menos la fuga y la capacidad respiratoria adicional (SRC) se calcula como la respiración máxima menos el consumo de oxígeno de rutina.

La disfunción mitocondrial se define como la incapacidad de las mitocondrias para poder producir ATP de manera adecuada en respuesta a las demandas energéticas del organismo. Uno de los agentes causante de disfunción mitocondrial son la generación de ERO. Existen diversos estudios que señalan que los complejos I y III de la CTE son los principales sitios de producción del $O_2^{\cdot-}$ en la mitocondria [27]. Sin embargo, otros autores han observado que estos complejos no son los únicos generadores de ERO, ya que se ha descrito que la oxidación de succinato por el complejo II también puede contribuir de manera importante a su producción [36]. Además, en condiciones patológicas cuando la CTE es inhibida por alguna alteración en el flujo de electrones o mutación genética en la OXPHOS, se produce una fuga excesiva de electrones, los cuales pueden reducir directamente al oxígeno a $O_2^{\cdot-}$ [27]. En bajas concentraciones, la producción de $O_2^{\cdot-}$ puede estar involucrada en la transducción de señales celulares, pero a altas concentraciones causa daño oxidativo debido a su alta reactividad con otros compuestos celulares. De esta manera, el $O_2^{\cdot-}$ que se genera, es liberado a la matriz mitocondrial, donde es convertido a H_2O_2 por la enzima superóxido dismutasa dependiente de manganeso (Mn-SOD). Por otra parte, el $O_2^{\cdot-}$ generado por el complejo III es liberado en el espacio intermembranal, donde es convertido a H_2O_2 por la enzima superóxido dismutasa dependiente de cobre-zinc (Cu/Zn-SOD), localizada tanto en el espacio intermembranal como en el citosol [18]. Si el H_2O_2 generado por estos dos complejos encuentra a un metal de transición o si se une a $O_2^{\cdot-}$, éste puede llevar a la formación de OH^{\cdot} , el más potente agente oxidante de las ERO, produciendo daño celular a nivel de proteínas, lípidos y DNA [27].

1.6 Mitocondria y apoptosis celular

La mitocondria tiene un papel central en la ejecución, amplificación y regulación de la apoptosis celular intrínseca, la cual está regulada por cambios en la alteración en la función mitocondrial y eventual permeabilización de la membrana interna mitocondrial [37]. Existen diversas señales intrínsecas que pueden inducir apoptosis celular, tales como daño al ADN, estrés oxidante, hipoxia, deprivación de factores de crecimiento y/o incremento en los niveles de Ca^{2+} . La activación de la apoptosis por alguno de estos estímulos induce cambios fisiológicos y estructurales en la mitocondria, los cuales están implicados en la permeabilización de la membrana mitocondrial externa, con la posterior liberación de factores pro-apoptóticos tales como el citocromo c (Cyt c), la proteína de unión a apoptosis con punto isoeléctrico bajo (Smac/Diablo), la endonucleasa G, la serina proteasa Htra2 mitocondrial (Htra2/Omi) y el factor inductor de apoptosis (AIF), desde el espacio intermembranal hacia el citosol [38].

Una vez liberados en el citosol AIF y endonucleasa G, se translocan al núcleo celular donde median la condensación de la cromatina y la fragmentación del DNA, de forma independiente de las caspasas [39,40]. Por otra parte, las proteínas mitocondriales Htra2/Omi y SMAC/Diablo se unen en el citosol a proteínas inhibitoras de apoptosis (IAP), inactivándolas y favoreciendo de esta manera la apoptosis celular [41]. La liberación de Cyt c de la mitocondria al citosol es considerado un “punto de no retorno” en el proceso de apoptosis, ya que su liberación induce la formación del apoptosoma al unirse y oligomerizarse con el factor activador de proteínas apoptóticas (Apaf-1), los cuales reclutan a la pro-caspasa 9 en presencia de ATP. Posteriormente, Apaf-1 y pro-caspasa 9 interaccionan a través de sus dominios de reclutamiento de caspasas (CARDs), lo que lleva al procesamiento auto catalítico de esta última, dando lugar a su forma activa. La caspasa 9 activa provoca la proteólisis a nivel de los grupos aspartatos de las caspasas efectoras 3 y 7, lo que lleva a muchos de los cambios morfológicos asociados con apoptosis. Finalmente, las caspasas efectoras una vez activadas son capaces de hidrolizar proteínas estructurales del citoesqueleto y del núcleo celular

como actina, láminas A y B y proteínas relacionadas con la replicación y transcripción del DNA [37] (**Figura 8**).

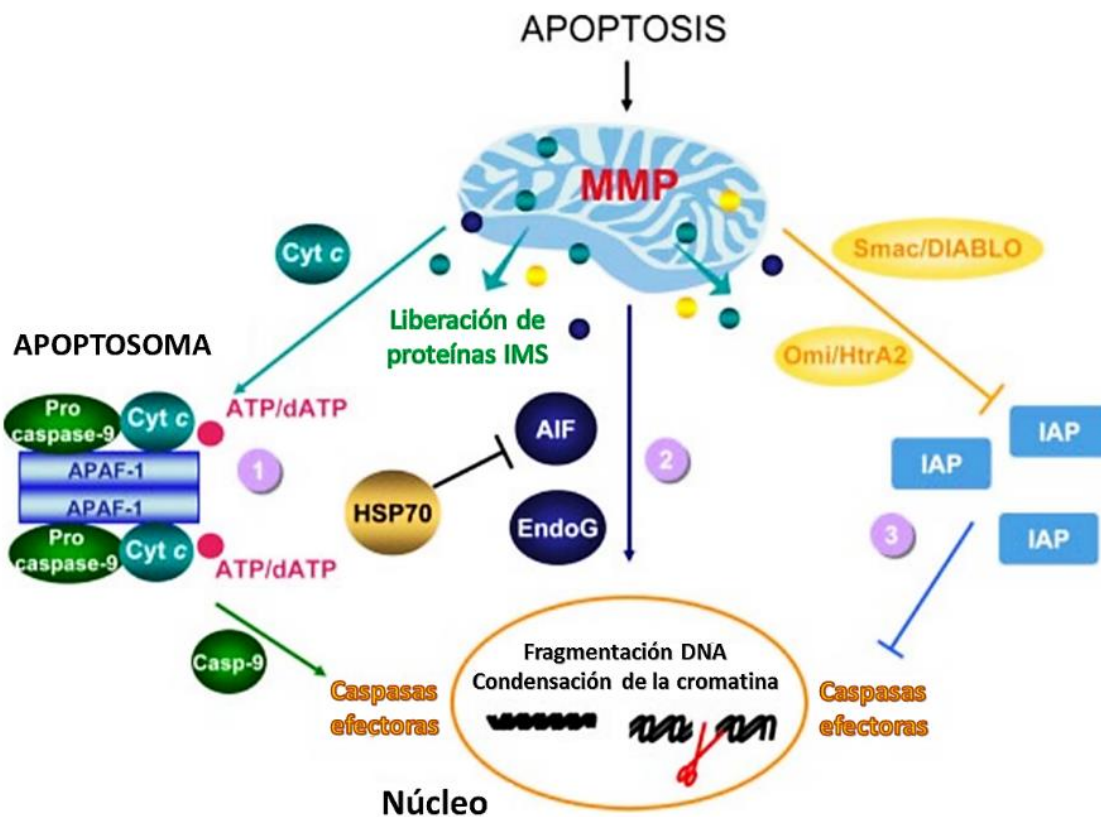


Figura 8. Liberación de proteínas del espacio intermembranal (IMS). Señales pro-apoptóticas resultan en la permeabilización de la membrana mitocondrial externa (MMP) favoreciendo la liberación de proteínas del IMS. Una vez en el citosol las proteínas del IMS siguen diferentes caminos: 1) El citocromo c promueve la formación del “apoptosoma”, una plataforma molecular para la activación de Caspasa 9 (Casp-9), incluyendo también al Factor 1 activador de proteasa de apoptosis (APAF-1) y ATP/dATP. La casp-9 cataliza la activación proteolítica de las caspasas efectoras, las cuales contribuyen a la aparición de marcadores morfológicos de apoptosis (fragmentación de DNA y condensación de la cromatina). 2) El factor inductor de apoptosis (AIF) y endonucleasa G (Endo G) son translocadas del citosol al núcleo donde favorecen la fragmentación del DNA y condensación de la cromatina. Miembros de las proteínas de choque térmico (HSP), como HSP70 antagoniza la actividad pro-apoptótica de AIF impidiendo su importación nuclear. 3) Las proteínas Smac/DIABLO y Omi/HtrA2 promueven la apoptosis indirectamente, por su unión e inactivación de las proteínas inhibidoras de apoptosis (IAP). En condiciones normales las IAPs ejercen un efecto anti-apoptótico previniendo la activación de caspasas. **Imagen modificada de Kroemer et al., 2007.**

Por otra parte, el estímulo de muerte también puede llegar a la mitocondria proveniente de los receptores de muerte de membrana plasmática como FAS y TNFR-1, a través del agonista de muerte del dominio de interacción con BH3 (Bid), una proteína de la familia de linfoma de células B2 (Bcl-2), que promueve la apoptosis activando a las proteínas Bax y Bak, provocando la permeabilidad de la membrana externa mitocondrial (MOMP) [42].

El incremento de la permeabilidad de la membrana mitocondrial externa es un paso central en la apoptosis celular [43]. Los cambios en la MOMP pueden ser explicados a través de dos mecanismos: el primero es la formación de canales en la membrana mitocondrial externa por algunos miembros de la familia Bcl-2, Bax y Bak, las cuales después de un estímulo intrínseco son activadas y traslocadas a la mitocondria donde se oligomerizan formando poros suficientemente amplios como para permitir la salida de proteínas apoptogénicas [44,45]. El segundo mecanismo implica la regulación de la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (PTPm), un canal macromolecular que conduce al hinchamiento de la matriz, disminución del potencial transmembrana, ruptura de la membrana mitocondrial externa y liberación no selectiva de proteínas pro-apoptóticas al citosol. Los experimentos *in vitro*, así como los experimentos en mitocondrias aisladas, indican que las proteínas de la familia Bcl-2 tanto anti-apoptóticas como pro-apoptóticas pueden regular la apertura de PTPm [46].

1.5 Poro de transición de permeabilidad mitocondrial.

El PTPm es un canal de alta conductancia, que se forma en la MMI para transportar solutos con una masa molecular de hasta 1.5 kDa, desde la matriz hasta el espacio intermembranal. Este canal está involucrado en la liberación de componentes mitocondriales durante la muerte celular [46]. El PTPm se forma en los sitios de contacto entre la MME y la MMI, donde el translocador de nucleótidos de adenina es el principal regulador. La formación de estos sitios de contacto ha sido relacionada con los niveles de ADP en la célula [47].

La composición molecular del PTPm aún se encuentra en controversia. Sin embargo, existen varias proteínas que probablemente participen en su estructura como el canal dependiente de voltaje (VDAC), el acarreador de fosfato (PiC) y el translocador de nucleótidos de adenina (ANT). Además, se ha demostrado que existen otras proteínas adicionales que son reclutadas para modular su activación como son: ciclofilina D (CypD), creatina cinasa (CK), hexoquinasa II (HK II), la proteína translocadora (TSPO) y las proteínas de la familia Bcl-2 (Bax y Bak) [48]. Recientemente, algunos grupos de investigación han implicado a diferentes subunidades de la ATP sintasa como la unidad formadora del PTPm (**Figura 9**).

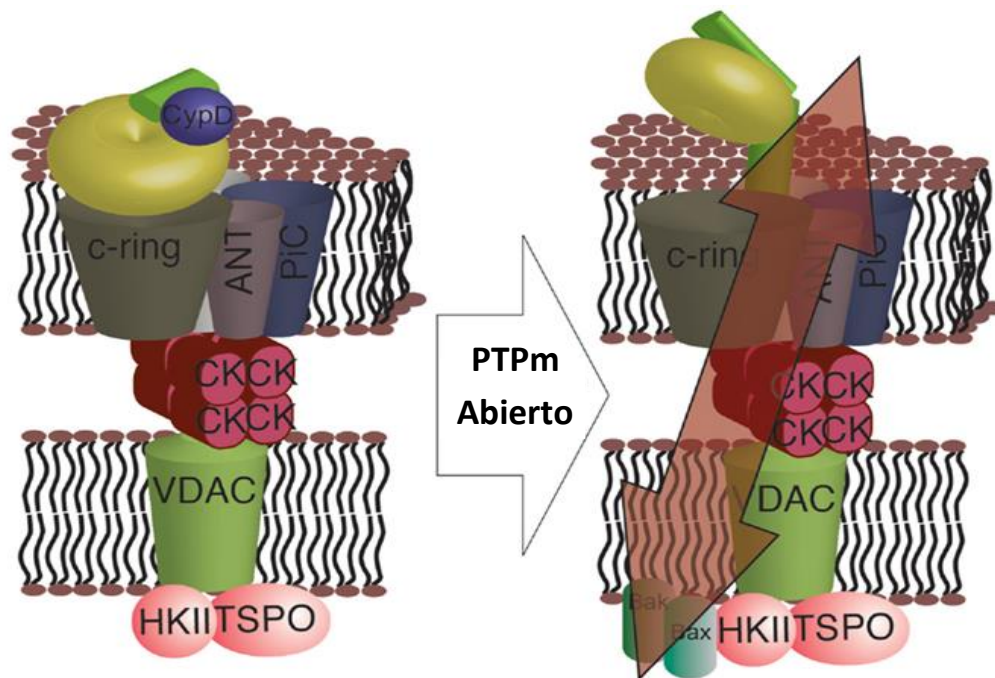


Figura 9. Estructura propuesta de los componentes que conforman al Poro de Transición de Permeabilidad Mitocondrial (PTPm). En la imagen de la izquierda se observa el PTPm en estado cerrado, el cual está formado por la ATP sintasa unida con los reguladores del PTPm como ANT y acarreador de fosfato (PiC) (arriba, izquierda). Estos reguladores, a su vez, pueden interactuar con otros reguladores del PTPm, como HKII, VDAC, TSPO y CK (abajo, izquierda). La inducción de la transición de permeabilidad mitocondrial da como resultado una reorganización de la estructura de la ATP sintasa, lo que conduce a la apertura del PTPm (arriba, derecha). Estos eventos, están asociados generalmente con el desprendimiento de HKII de la MME y son facilitados por la interacción con GSK3 y por la inserción de Bax y Bak en la MME (abajo, derecha). **Imagen modificada de Bonora y Pinton, 2014.**

Giorgio y cols., 2013 propusieron que el PTPm está asociado con el complejo dimérico ATP sintasa, debido a que en ensayos experimentales observaron que los dímeros purificados de F_1F_0 ATP sintasa, incorporados en bicapas lipídicas, forman canales activados por Ca^{2+} con características electrofisiológicas equivalentes a las del PTPm [49]. Posteriormente, Urbani et al., 2019, utilizando F-ATP sintasa purificada de bovino, demostraron que el tratamiento con calcio también da lugar a la formación de canales de alta conductancia, los cuales responden tanto a agonistas como a inhibidores específicos del PTPm [50]. En esta misma línea, Pinke et al., 2020 propusieron que la F_1F_0 ATP sintasa de mamíferos es parte del PTPm, basándose en un modelo atómico desarrollado a través de datos de microscopía electrónica criogénica (crio-EM). El mapa de Cryo-EM mostró sitios de unión de iones de calcio a las subunidades β del dominio F1 de la ATP sintasa, los cuales pueden provocar cambios conformacionales que favorecen a la retracción de la subunidad e y el desensamble gradual del anillo c, lo cual conduce a la apertura del PTPm en la membrana [51].

A pesar de estos hallazgos, la formación de PTPm a partir de ATP sintasa ha sido cuestionada en estudios recientes, donde algunos autores encontraron que la formación del PTPm persiste en ausencia de varias subunidades de ATP sintasa. Walker y colaboradores demostraron que la formación del PTPm persiste en ausencia de algunas subunidades funcionales de la ATP sintasa como la subunidad c y las subunidades b y OSCP del tallo periférico. Dado que la eliminación de estas subunidades evita el ensamblaje de una ATP sintasa funcional, los autores concluyen que la ATP sintasa no podría estar participando directamente en la formación del PTPm [52,53].

La apertura del PTPm es inducida por altas concentraciones de calcio mitocondrial $[Ca^{2+}]_m$. La sensibilidad del PTPm al calcio se incrementa en condiciones de estrés oxidante, disminución de nucleótidos de adenina, altas concentraciones de fosfato o despolarización de la membrana. Existen dos estados de apertura del PTPm, un estado de apertura prolongada el cual se encuentra asociado a muerte celular y un estado de apertura transitoria, el cual tiene un papel fisiológico en las células, proporcionando una vía de liberación de ERO y calcio en la mitocondria, la cual es

también regulada por CypD. Esta regulación proporciona a las mitocondrias un mecanismo rápido para la liberación de Ca^{2+} [54,55]. La apertura prolongada del PTPm conduce a la despolarización mitocondrial, inhibición de la síntesis de ATP, liberación de Ca^{2+} , agotamiento de nucleótidos de piridina, inhibición de la respiración y el hinchamiento de la matriz mitocondrial provocando la movilización del Cyt c, la ruptura de la MME y finalmente, la liberación de proteínas pro-apoptóticas [55].

Un hallazgo importante para el estudio detallado del PTPm es la inhibición específica por Ciclosporina A (CsA), la cual actúa como inhibidor de CypD, una peptidil-propil cis-trans isomerasa presente en la matriz mitocondrial. CsA bloquea la salida de calcio mitocondrial $[\text{Ca}^{2+}]_m$, permitiendo su acumulación en el interior de la mitocondria. Estudios de delección genética confirman que CypD es un activador de la apertura del PTPm [56].

Por otra parte, la apertura del PTPm también puede ser inhibida por compuestos que modulan la actividad de ANT como el ácido bongkreico (BKA) que es una toxina respiratoria producida en coco fermentado o maíz contaminado por la bacteria *Burkholderia gladioli*, que inhibe de manera específica los cambios en la conformación (m) de ANT en la matriz. La inhibición del PTPm por BKA, previene la despolarización mitocondrial, el hinchamiento de las crestas, la ruptura de la MME e inhibe la liberación de proteínas apoptogénicas como el Cyt c, inhibiendo de esta manera la apoptosis [58]. Por el contrario, el atractilósido, inhibidor competitivo del transporte de nucleótidos por ANT, es un inductor de la formación del PTPm, a través de cambios en la conformación (c) de ANT en la cara citosólica, dando como resultado la permeabilización de la membrana mitocondrial [58].

Debido a que existe evidencia experimental que sustenta que la apertura del PTPm puede ser inducido tanto por la regulación del ANT, como por los cambios conformacionales de la ATP sintasa, Bernandi *et al.*, 2022 propone dos modelos hipotéticos sobre la formación del PTPm. Un modelo denominado “dedo de la muerte”, el cual propone que el movimiento de la subunidad e del C-terminal, que hace contacto con los lípidos dentro del anillo c, provoca cambios conformacionales

que transforman al anillo c de la ATP sintasa en un poro conductor de iones. En presencia de bajas concentraciones de Ca^{2+} , con la CypD unida a la subunidad OSCP, el tallo periférico transmite una fuerza mecánica producida por la unión del Ca^{2+} hasta la subunidad e, la cual ejerce una acción de tracción arrastrando algunos lípidos hacia afuera. En esta condición, el PTPm tiene baja conductancia, por lo que la apertura del canal induce el paso de iones, pero no de solutos más grandes, lo que representa una apertura transitoria del PTPm. Cuando los niveles de Ca^{2+} se incrementan, la fuerza mecánica ejercida sobre la subunidad e es más fuerte, lo que permite la eliminación del tapón de lípidos del anillo c y el desplazamiento de la subunidad F1 con la formación un poro de alta conductancia el cual es reversible si disminuye la concentración de calcio [59]. Por otra parte, una segunda hipótesis propone que a ANT como la unidad formadora del PTPm. En este modelo la presencia de Ca^{2+} y CypD pueden favorecer a un cambio conformacional indefinido en ANT, el cual puede inducir la formación de canales de alta conductancia. Además, se ha sugerido que transición de la permeabilidad se puede incrementarse por la oxidación de los residuos de C57 y C160 de ANT, lo que provoca la formación de un puente disulfuro favoreciendo la unión de CypD [59].

1.6 Regulación del PTPm por calcio.

El calcio intracelular $(\text{Ca}^{2+})_i$ es un mensajero clave de señalización, que puede traducir señales de vida o muerte a las mitocondrias [60]. Los mecanismos de captación y liberación de Ca^{2+} mitocondrial se basan en los uniportadores para la captación de Ca^{2+} e intercambiadores para su liberación, que dependen del potencial de membrana mitocondrial $(\Delta\psi)_m$, que representa la fuerza impulsora para la acumulación de Ca^{2+} en la matriz mitocondrial. El uniportador de calcio mitocondrial (MUC), es el responsable de la entrada de Ca^{2+} a la mitocondria [61], mientras los antiportadores de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ mitocondrial (NCLX), son responsables de su salida [62]. Dos mecanismos han sido propuestos para explicar la salida del Ca^{2+} en la mitocondria, uno basado en los antiportadores y el otro basado en el PTPm [63] (**Figura 10**).

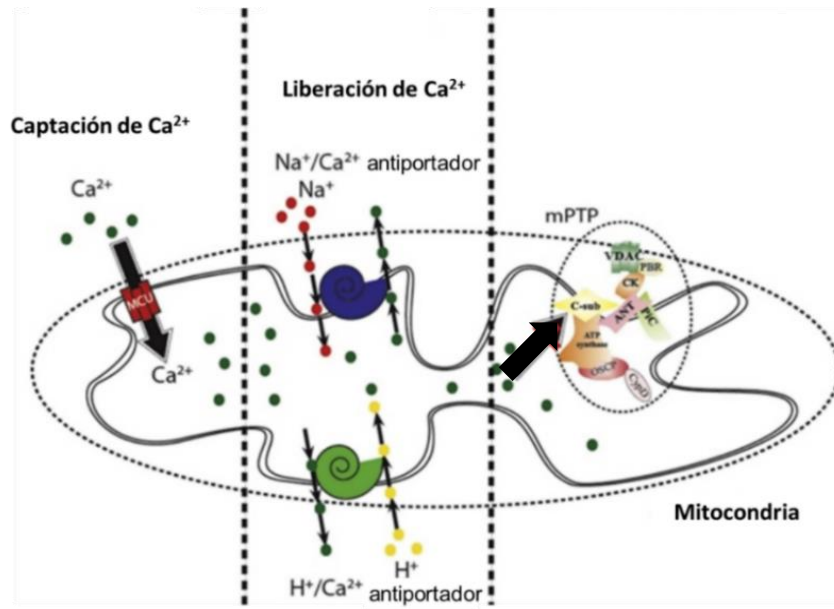


Figura 10. Mecanismos propuestos para explicar la entrada y salida de Ca^{2+} en la mitocondria. La mitocondria capta y libera el calcio por mecanismos que se basan en la utilización de transportadores para la captación e intercambio de calcio, los cuales dependen del potencial de membrana mitocondrial. Los uniportadores de calcio mitocondrial (MUC), son responsables de la entrada de Ca^{2+} a la mitocondria, mientras que los antiportadores de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ son responsables de su salida. La alteración de alguno de estos sistemas de transporte de calcio puede estar implicados en la regulación del PTPm. **Imagen modificada de Marchi et al. 2014.**

Algunos autores han propuesto que el PTPm es un componente del sistema de salida de Ca^{2+} debido a las propiedades no específicas del canal que fueron observadas durante su apertura. Estos estudios se basan en inhibiciones farmacológicas del PTPm por CsA o por “knock-down” de CypD, los cuales causan alteraciones típicas en la homeostasis de Ca^{2+} que podrían estar asociadas con alteraciones en la salida de Ca^{2+} mitocondrial. Las mitocondrias aisladas de diferentes tejidos poseen una capacidad finita para acumular y retener el Ca^{2+} , cuando este límite se excede, las mitocondrias ensamblan el PTPm en su membrana interna que es permeable a iones y solutos no-selectivos. En algunos estudios se ha demostrado que el fosfato, es requerido para la carga adecuada de $[\text{Ca}^{2+}]_m$ [63].

En diversos estudios se ha demostrado que el PTPm desempeña un papel importante en la homeostasis de $[Ca^{2+}]_m$. La pérdida del balance entre la entrada de Ca^{2+} de la membrana plasmática y su salida conduce a una elevación sostenida del $[Ca^{2+}]_c$ que puede ir desde 100 nM a $\geq 1\mu M$, induciendo a un aumento progresivo de la captación de Ca^{2+} mitocondrial. Cuando se acumulan grandes cantidades de Ca^{2+} en la matriz mitocondrial este interactúa con la CypD para inducir la apertura del PTPm. Además, el aumento de $[Ca^{2+}]_m$ estimula la generación ERO y ácidos grasos libres, que también promueven la apertura del PTPm. La apertura del PTPm provoca la disipación del $\Delta\psi_m$ y liberación de Ca^{2+} . Si la sobrecarga de Ca^{2+} citoplasmático persiste, la PTPm permanece abierto y permite la acumulación de solutos en la matriz mitocondrial. Esto a su vez, conduce a hinchamiento de la matriz y ruptura del OMM, dando lugar a la liberación del contenido del espacio intermembranal. Finalmente, el deterioro de la función mitocondrial y activación de mecanismos citoplasmáticos por la liberación de factores mitocondriales conduce a la muerte celular [64].

Chalmers y Nicholls, 2003 demostraron en mitocondrias aisladas de cerebro e hígado que la adición de 450 nmol de Ca^{2+} /mg de proteína inicia la transición de permeabilidad a los 15 minutos, mientras que pequeñas adiciones de 50 nmol de Ca^{2+} /mg de proteína a una tasa de velocidad menor permitió una mayor acumulación de Ca^{2+} antes de que ocurriera la transición de permeabilidad. Además, observaron una correlación directa entre la liberación de $[Ca^{2+}]_m$ con la liberación de Cyt c, la pérdida del potencial de membrana mitocondrial y la reducción de la enzima NAD(P)⁺ transhidrogenasa [65].

Existen diversas estrategias para reducir la apertura del PTPm, una de ellas es la reducción de la entrada de $[Ca^{2+}]_m$. Recientemente, se ha demostrado que la delección de los uniportadores de calcio (MUC), se asocia con la inhibición de la apertura del PTPm [66,67].

1.7 Papel del PTPm en enfermedades

La desregulación en la apertura y/o cierre del PTPm es una característica común en una amplia variedad de padecimientos, en los cuales la apertura excesiva induce a daño tisular o, por el contrario, su cierre limita la apoptosis. La apertura no controlada del PTPm causa disfunción mitocondrial ya que induce la pérdida del potencial de membrana mitocondrial y la inhibición de la síntesis de ATP. La mayor parte de los trastornos mitocondriales involucrados en la muerte celular revelan estas características. Por esta razón, el tratamiento de enfermedades caracterizadas por un incremento en la apertura de PTPm, alienta a abordar el diseño de fármacos para modular su actividad [68].

En diversos estudios se ha demostrado que la apertura del PTPm está implicada en diversas enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer (AD), Parkinson (PD), Huntington (HD) y esclerosis lateral amiotrófica (ALS) [69]. En estas enfermedades la formación del PTPm induce el desacoplamiento del potencial electroquímico, alteraciones en la regulación osmótica del Ca^{2+} y reducción de la generación de ATP en las mitocondrias. Con el inicio de una alta demanda de energía y la producción de ATP comprometida, la masa celular pierde su integridad estructural y funcional, lo que resulta en daño irreversible y muerte celular por apoptosis. Se ha observado en pacientes con AD que la interacción entre la proteína beta amiloide ($\text{A}\beta$) y CypD favorece la formación de PTPm, resultando en la reducción del potencial mitocondrial, disminución de la función respiratoria e incremento en la formación de radicales libres, conduciendo a estrés oxidante y la liberación de proteínas pro-apoptóticas [70].

Du *et al.*, 2008, encontraron que las mitocondrias aisladas de las regiones cortical e hipocampo del cerebro de pacientes con AD presentan un incremento significativo en la expresión de CypD, una proteína que favorece la formación del PTPm, comparado con mitocondrias aisladas de las mismas regiones cerebrales sin AD. El incremento en la expresión de CypD se correlacionó de manera positiva con un incremento en la expresión de la proteína beta amiloide ($\text{A}\beta$) en estos pacientes [70,71].

De manera similar a lo que ocurre en AD, la formación del PTPm en pacientes con PD, se ha asociado a muerte neuronal por varios mecanismos, incluyendo excitotoxicidad, apoptosis y necrosis [72].

De manera opuesta, se ha informado que la inhibición del PTPm se ha relacionado con resistencia a la apoptosis en algunos tipos celulares, principalmente en cáncer. Norman, 2010 demostraron que la inhibición del PTPm promueve el cáncer de piel en pacientes trasplantados, por favorecer la supervivencia de queratinocitos bajo condiciones de estrés genotóxico, proponiendo un papel importante de la inhibición del PTPm en el desarrollo de tumores [73].

La resistencia que presentan algunos tipos de células cancerosas a la muerte celular sugiere que estas células han desarrollado mecanismos para evadir la apertura del PTPm. Dado que la reducción en la apertura del PTPm favorece a la progresión tumoral, la reactivación del PTPm podría utilizarse como una estrategia prometedora para evitar defectos oncogénicos [48].

Estudios recientes han propuesto la existencia de una “conformación aberrante” de los componentes que participan en la formación del PTPm, que son indispensables para la fisiología mitocondrial. Existen varios mecanismos reguladores del PTPm que se encuentran alterados en los tumores en comparación con los tejidos normales. Estas alteraciones se pueden clasificar como: 1) modificaciones en las concentraciones de inductores de PTPm (Ca^{2+}), 2) promoción o inhibición de reguladores que interactúan directamente con el PTPm (redes de chaperonas), 3) desensibilización a través de vías de señalización de quinasas y 4) inhibición mediada por cambios metabólicos. Todos estos mecanismos no ocurren en el mismo tipo de tumor; sin embargo, no son necesariamente independientes y podrían integrarse entre sí [48].

Por todo lo anterior, la inhibición del PTPm en las células cancerosas podría estar participando como un mecanismo de inhibición de la apoptosis celular, lo que promueve la supervivencia y proliferación de estas células. Al igual que lo que ocurre en las células tumorales, es posible que durante el desarrollo de la FPI la

inhibición del PTPm contribuya a la resistencia de los fibroblastos a la apoptosis y en consecuencia a la progresión de la enfermedad.

Si esto es así, el conocimiento sobre los mecanismos de regulación del PTPm favorecerá el diseño de nuevos medicamentos dirigidos para tratar a la FPI, así como a una amplia gama de enfermedades caracterizadas por la desregulación del PTPm. En consecuencia, los moduladores selectivos del PTPm constituirán una herramienta farmacéutica eficaz en el tratamiento de enfermedades relacionadas en la prevención y/o promoción de su formación.

2. JUSTIFICACIÓN

Los fibroblastos y miofibroblastos desempeñan un papel central en el desarrollo de la fibrosis pulmonar idiopática, debido a que producen cantidades excesivas de matriz extracelular, dando como resultado la pérdida de la arquitectura y función normal del pulmón. Una característica importante de estas células es su alta resistencia a la apoptosis lo cual favorece su proliferación excesiva, diferenciación a miofibroblastos, síntesis de matriz extracelular, y persistencia en el tejido pulmonar. Investigaciones recientes han propuesto al poro de transición de permeabilidad mitocondrial como un regulador estratégico de la muerte celular por apoptosis. En este sentido, el estudio sobre los mecanismos moleculares implicados en la resistencia a la apoptosis de fibroblastos/miofibroblastos de pacientes con FPI y su posible asociación con actividad PTPm podría favorecer el desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas para tratar esta enfermedad.

3. HIPOTESIS

Los cambios en la función y en la permeabilidad de la membrana mitocondrial determinados a través de la apertura del PTPm en fibroblastos de pacientes con FPI están implicados en su resistencia a la apoptosis.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar si la alteración en la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial y los cambios en la función mitocondrial correlacionan con la resistencia de los fibroblastos a la apoptosis en pacientes con Fibrosis Pulmonar Idiopática.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Medir la viabilidad y la tasa de apoptosis celular inducida por el estímulo con mitomicina c, en fibroblastos aislados de pulmones de individuos control y pacientes con FPI.
2. Determinar la activación de la vía intrínseca de apoptosis después del estímulo con mitomicina c, a través de la cuantificación de proteínas pro y anti apoptóticas presentes en la fracción citosólica. Asimismo, cuantificar la presencia de Cyt c tanto en la fracción citosólica como en la mitocondrial, mediante Western blot y cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).
3. Evaluar los cambios en la permeabilidad de la membrana mitocondrial a través de la medición de la apertura del PTPm, mediante la disminución de la fluorescencia de calceína-AM en presencia de CoCl_2 por microscopía confocal y citometría de flujo.
4. Evaluar los niveles de expresión de las proteínas que participan en la formación del PTPm en extracto total de proteínas (VDAC-1, ANT-1, ATP5A).
5. Cuantificar la liberación de calcio mitocondrial a través de la sonda Fura2-AM y en presencia de ciclosporina A (CsA) un inhibidor específico del PTPm.
6. Medir la tasa de apoptosis inducida por Mitomicina c, en presencia de inhibidores y/o inductores específicos del PTPm, a través de la técnica de citometría de flujo.
7. Determinar los cambios en la función mitocondrial de fibroblastos de pulmón control y con FPI, mediante la cuantificación del consumo de oxígeno, el potencial de membrana mitocondrial y la producción de ATP.
8. Determinar si la regulación de la apertura del PTPm está asociada con los cambios en la morfología y estructura mitocondrial y si estos cambios se encuentran relacionados al número de mitocondrias presentes en los fibroblastos de pulmones sanos y con FPI.

5. METODOLOGÍA

5.1 Reactivos

Reactivo para proliferación celular WST-1 (Cat. No. 11644807001) se adquirió de Roche Diagnostics (Mannheim, Alemania). El kit para detección de apoptosis FITC Annexin V (Cat. No. 556547) se adquirió de BD Biosciences (San Diego, CA, EUA). El kit de aislamiento de mitocondrias para cultivo celular (Cat. No. 89874) y el kit para el ensayo de proteínas Pierce™ BCA (Cat. No. 23225) se adquirieron de Thermo Fisher Scientific (Rockford, IL, EUA). El kit para el análisis del poro de transición mitocondrial, Image-IT™ LIVE para microscopía (Cat. No. I35103), el kit para el análisis del poro de transición mitocondrial, MitoProbe™ para citometría de flujo (Cat. No. M34153), el kit para determinación de ATP (Cat. No. A22066) y el colorante de yoduro de tetraetil benzimidazolil carbocianina JC-1 (Cat. No. T3168) fueron adquiridos en Molecular Probes (Eugene, OR, EUA). El kit para la determinar el cociente ADP/ATP (Cat. No. MAK135), la oligomicina A, la rotenona, la antimicina A, el ácido L-glutámico, la sal disodio de ácido L(-)-málico, el succinato de sodio dibásico hexahidratado, el carbonilo cianuro 4- (trifluorometoxi) fenilhidrazina (FCCP), el cianuro de carbonilo-3-clorofenilhidrazona (CCCP), el ácido etilenglicol-bis (2-aminoetiléter) -N, N, N', N'-tetraacético (EGTA), la sal de potasio, la sal de potasio del ácido 4- (2-hidroxiethyl) piperazina-1-etanosulfónico (HEPES), la albúmina de suero bovino (BSA) libre de ácidos grasos, el cloruro de magnesio (MgCl₂), el fosfato de potasio monobásico (KH₂PO₄), el Cyt c, el ácido bongkreico (BKA) y el atractilosido (ATR) se adquirieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). La mitomicina C (Cat. sc-3514) y los anticuerpos anti-VDAC-1 (sc-390996) y anti-caspasa-3 (sc-7272) adquiridos de Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Alemania). El anti-citocromo c (612504) y el IgG anti-conejo HRP (406401) fueron comprados en BioLegend (San Diego, CA, EUA). El anti-caspasa-9 (ab32539) se adquirió de Abcam (Cambridge, MA, EUA). El anticuerpo secundario HRP-Anti-Mouse IgG (115-035-003) se adquirió de Jackson Immuno Research (West Grove, PA, EUA) y los anticuerpos IgG anti-cabra HRP (611620) y anti-GAPDH (PA1-987) anti-β-actina (A5441) fueron adquiridos Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA).

5.2 Bioética y diseño experimental

Los fibroblastos de pacientes con FPI se obtuvieron a partir de biopsias pulmonares realizadas con fines de diagnóstico. Estas fueron obtenidas en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas (INER), con la aprobación del Comité de Bioética (B05-21) y consentimiento informado de todos los pacientes. Como controles se utilizaron fibroblastos de pulmón sano, obtenidos mediante lobectomía pulmonar, sin datos morfológicos de enfermedad intersticial. Además, se utilizó la línea comercial de fibroblastos humanos normales NHLF (Normal Human Lung Fibroblasts CC-2512 Lonza Clonetics). Se estudiaron fibroblastos de pulmones sanos y con FPI pareados por edad en condiciones basales y después de la apoptosis inducida por mitomicina C.

5.3. Cultivo y tratamiento de fibroblastos humanos

Los fibroblastos se cultivaron en medio Ham (F-12), suplementado con penicilina (100 U/mL), estreptomina (100 mg/mL) y suero fetal bovino (SFB) al 10%. Las células fueron incubadas a 37°C con 5% de CO₂, hasta alcanzar una confluencia del 80%. Los fibroblastos se trataron con diferentes dosis de mitomicina C (10, 25 o 50 µg/mL) en medio F-12 con SFB al 1% a diferentes tiempos (4, 8, 16 y 24 h). Los fibroblastos control, se incubaron en medio F-12 con SFB al 1% durante el mismo período. Después del tratamiento, los fibroblastos se lavaron tres veces con amortiguador de fosfato salino (PBS) y se mantuvieron en el medio F-12 para experimentos posteriores.

5.4. Viabilidad celular

La viabilidad celular se evaluó utilizando el reactivo de tasa de crecimiento celular (WST-1), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células se sembraron en placas de 96 pozos a una densidad final de 5×10^3 células/pozo en 100 µl de medio de cultivo F-12. Después del tratamiento con mitomicina C, se agregaron 10 µl de solución WST-1 a cada pozo y las células fueron incubadas durante 3 h a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5%. La densidad óptica se midió utilizando un lector de

microplacas multimodal (Synergy HTX BioTek, Winooski, VT, EUA) a una longitud de onda de 450 nm.

5.5. Apoptosis celular

Los fibroblastos fueron estimulados con mitomicina C durante 24 horas y posteriormente fueron teñidos con Anexina V-Ioduro de Propidio para su análisis por citometría de flujo. Se utilizó estaurosporina (1 μ M) como control positivo. Las células se adquirieron usando un citómetro de flujo FACS Aria (BD Biosciences). Los datos se analizaron utilizando el software FlowJo 7.8 (FlowJo, Ashland, OR, EUA, Becton Dickinson and Company).

5.6. Aislamiento de la fracción citosólica y mitocondrial

Los fibroblastos de individuos control y de pacientes con FPI fueron estimulados con mitomicina C (25 μ g/mL) durante 4 y 24 h. Después del tratamiento con mitomicina C, las células se lavaron y tripsinizaron. Su viabilidad fue determinada mediante la prueba de exclusión con azul de tripán. Para cada condición experimental, se utilizaron 1×10^7 células viables. Posteriormente, se realizó el aislamiento de la fracción citosólica y mitocondrial de los fibroblastos con el estuche de aislamiento de mitocondrias para cultivo celular, siguiendo las instrucciones del fabricante. Para obtener una mayor cantidad de proteína mitocondrial utilizamos el homogeneizador Dounce, seguido de centrifugación diferencial. Ambas fracciones obtenidas se utilizaron para el análisis de proteínas apoptóticas mediante la técnica de Western blot. El sedimento mitocondrial fue lisado con detergente 3-(3-colamidopropil) dimetil amonio)-1-propano sulfonato (CHAPS) al 2% en amortiguador salino de Tris (TBS; Tris 25 mM, NaCl 0.15 M; pH: 7.2). El sobrenadante contenía la proteína mitocondrial soluble, la cual fue cuantificada con el estuche de ensayo de proteínas BCA.

5.7. Western blot

La muestra de lisado total de fibroblastos y de las fracciones citosólica y mitocondrial se analizaron mediante Western blot. La muestra de lisado total de fibroblastos fue obtenida utilizando una mezcla de buffer de lisis RIPA e inhibidor de proteasas, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), mientras que la fracción citosólica y mitocondrial fue obtenida como se describe en el punto anterior 5.6. Para el lisado total, la concentración de proteína se cuantificó utilizando el ensayo de Bradford; mientras que para el caso de la fracción citosólica y mitocondrial se cuantifico por BCA. Posteriormente, se colocaron 16 µg de proteína en un gel de poliacrilamida SDS-PAGE (110 V durante 1h a temperatura ambiente) y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa usando un sistema de transferencia de cámara húmeda. Las membranas de nitrocelulosa fueron bloqueadas con una solución de leche en polvo al 5% y luego incubadas durante toda la noche a 4°C con los anticuerpos primarios: anti-citocromo c (1:500); anti-caspasa 9 (1:500); anti-VDAC-1 (1:100); anti-Bax (1:100); anti-ATP5A (1: 500); anti-ANT1 (1:1000); anti-GAPDH (1:2000); anti-β-actina (1:10,000). Los anticuerpos secundarios se incubaron durante 1h a temperatura ambiente con las siguientes diluciones: anti-ratón (1:10,000), anti-conejo (1:2500) y anti-cabra (1: 1000).

5.8. Liberación de Cyt c

La liberación de Cyt c en la fracción citosólica se cuantificó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). La muestra citosólica fue filtrada a través de una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) de 0.45 µm y el contenido de Cyt c se determinó utilizando una columna Delta Pack C4 de 300 Å con partículas de 5 µm (3.9 × 150 mm; Waters). Se utilizó un gradiente de acetonitrilo al 30% en agua con ácido tricloroacético (0.1%, vol/vol) con acetonitrilo al 70% en agua con ácido tricloroacético (0.1%, vol/vol) durante 15 min a una tasa de flujo de 1 mL/min, como lo describen Ruiz-Ramírez *et al*, 2015 [74]. El Cyt c se detectó a 393 nm y su concentración se cuantificó utilizando una curva estándar de Cyt c de corazón bovino.

5.9. Evaluación del PTPm

La apertura de PTPm se evaluó por la disminución en la fluorescencia de calceína-AM por cloruro de cobalto (CoCl_2). Los fibroblastos fueron cargados con calceína-AM (1 μM , Molecular Probes, Life Technologies) a 37°C en la oscuridad, posteriormente, se añadió CoCl_2 (1 mM) y las células se incubaron durante otros 15 min. Luego, se midió la fluorescencia de 30,000 células para cada experimento con un citómetro de flujo (FACS Aria II, BD, San José CA, EUA), los datos se procesaron con el software FlowJo. Para los experimentos de microscopía confocal, se cultivaron 1×10^4 fibroblastos en placas de cultivo con fondo de vidrio. Primero, las células se cargaron con calceína-AM (1 μM), MitoTracker Red (150 nM), Hoechst (1 mM), con o sin CoCl_2 (1 mM), en solución salina equilibrada de Hank's 1X (HBSS) durante 15 min a 37°C. Luego, las células se lavaron tres veces con HBSS 1X. Las imágenes en vivo de las células se capturaron con el microscopio confocal Olympus FluoView FV1000 y se analizaron utilizando el software ImageJ versión 1.53i (Bethesda, MD, E.U.).

5.10. Concentración de calcio intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) en fibroblastos.

Para evaluar los cambios de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducidos por FCCP en fibroblastos control y de pacientes con FPI, las células se sembraron en cubreobjetos redondos recubiertos con poli-L-lisina y se cultivaron durante 2 días. Luego, se cargaron con Fura 2-AM (2.5 μM) en una concentración baja de Ca^{2+} (0.1 mM) a temperatura ambiente. Después, los fibroblastos se incubaron durante 1 h a 37°C bajo una atmósfera de CO_2 al 5%. Posteriormente, las células se transfirieron a una cámara de perfusión a 37°C, montada en un microscopio Nikon Diaphot 200 invertido (Nikon, Tokio, Japón). Las células se registraron en perfusión continua y con burbujeo de carbógeno (para mantener el pH a 7.4) a una velocidad de 2 a 2.5 ml/min con buffer de Krebs-Ringer (NaCl 118 mM, NaHCO_3 25 mM, KCl 4.7 mM, KH_2PO_4 1.2 mM, MgSO_3 1.2 mM, glucosa 11 mM y CaCl_2 2.5 mM) a 37°C. Después del registro de la fluorescencia basal, las células se estimularon con FCCP 1 μM . A continuación, los fibroblastos cargados con Fura 2-AM se sometieron a una lámpara Xe a 340 nm

y luz de excitación de 380 nm. La fluorescencia de emisión se midió a 510 nm utilizando un microfotómetro (modelo D-104), de Photon Technology International (PTI, Princeton, N.J., E.U.). Se midió la fluorescencia a intervalos de 0.5 s durante 10 min, y se calculó la concentración de $[Ca^{2+}]_i$ de acuerdo con la fórmula de Grynkiewicz [75] de la siguiente manera:

$$[Ca^{2+}]_i = b \cdot Kd (R - R_{min}) / (R_{max} - R)$$

donde Kd es la constante de disociación de Fura-2 AM, b es la relación de señales fluorescentes (R) a 380 nm para colorante sin Ca^{2+} y con Ca^{2+} -saturado, R_{min} es R en ausencia de Ca^{2+} externo y R_{max} es R en saturación $[Ca^{2+}]_i$ [60]. Estos parámetros se determinaron *in vitro*. Las proporciones medias de fluorescencia de 340 a 380 nm para R_{max} (6,06) y R_{min} (0,39) se obtuvieron al exponer las células a Ca^{2+} (10 mM) en presencia de ionomicina (10 μ M) y Krebs libre de Ca^{2+} con EGTA (10 mM), respectivamente. La relación de fluorescencia a 380 nm de excitación de luz en medio libre de Ca^{2+} y células saturadas con Ca^{2+} fue de 4.23. Se supuso que la Kd de Fura 2-AM fue de 386 nM [76]. Para evaluar la respuesta de Ca^{2+} a FCCP, las células se perfundieron con FCCP 1 μ M para estimular PTPm. Para determinar farmacológicamente si PTPm estaba involucrado en esta respuesta, se utilizó CspA 10 μ M más ATP.

5.11. Tasa de respiración celular en fibroblastos

5.11.1. Respirometría en células no permeabilizadas

Los experimentos de consumo de oxígeno en células intactas se realizaron como se describió previamente, utilizando un oxímetro de alta resolución (Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria) [77]. Las mediciones se realizaron a 37°C utilizando 2 mL de medio de cultivo. Los parámetros respiratorios se definieron como: a) respiración basal, correspondiente al consumo de oxígeno en presencia solo de células, b) la fuga de protones, correspondiente al consumo de oxígeno celular en presencia de oligomicina 5 μ M, c) control respiratorio correspondiente a la relación entre la respiración basal y la fuga de protones, d) la respiración desacoplada máxima se determinó mediante titulaciones de 0.5 μ L de CCCP 1 μ M. Todos los

parámetros fueron normalizados por el número de células 2×10^6 y corregidos por la respiración residual no mitocondrial, que se obtuvo agregando $5 \mu\text{M}$ de rotenona más $5 \mu\text{M}$ de antimicina A.

5.11.2. Respirimetría en células permeabilizadas

El consumo de oxígeno en fibroblastos permeabilizados se realizó como fue descrito previamente por Kuznetsov et al., [78]. Se sembraron fibroblastos control y de FPI en condiciones estándar, y se usó la prueba de exclusión con azul tripán para determinar la densidad celular. Para cada condición experimental, se agregaron 5×10^5 fibroblastos, el sistema se equilibró durante 5 min. La reacción se llevó a cabo en medio de respiración (EGTA 0.5 mM; MgCl_2 3 mM; KH_2PO_4 10 mM; HEPES 20 mM; BSA 1 g; manitol 110 mM por litro) pH 7.1, ajustado con KOH 5 N. A continuación, los fibroblastos se permeabilizaron con digitonina ($20 \mu\text{g}/\text{mL}$) y se incubaron durante 5 min a 37°C . Después de la adición de digitonina, la frecuencia respiratoria debe disminuir marcadamente durante 3-5 min. Luego, se usó glutamato / malato (10 mM / 5 mM) como sustrato para la actividad del complejo I, se agregó ADP 2 mM para inducir la producción de ATP y la respiración fue inhibida por rotenona $0.5 \mu\text{M}$, que es un inhibidor específico de complejo I. Posteriormente, se utilizó succinato (10 mM) como sustrato para inducir la respiración asistida por el complejo II, se añadió ADP 2 mM para inducir la respiración mitocondrial (estado 3) y se inhibió la respiración con oligomicina $5 \mu\text{M}$ (estado 4). Se agregó ADP. El índice de control respiratorio (ICR) se calculó dividiendo los valores respiratorios del estado 3/estado 4.

5.12. Potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$)

$\Delta\psi_m$ mitocondrial se midió utilizando JC-1, que es un colorante catiónico liposoluble fluorescente que se acumula de manera dependiente del potencial de membrana mitocondrial. Las mitocondrias polarizadas están marcadas por una tinción fluorescente de color rojo. En la despolarización, la tinción de color rojo se reemplaza por fluorescencia de monómero verde. Por tanto, la despolarización

mitocondrial está indicada por una disminución en la relación de intensidad de fluorescencia rojo/verde. Los fibroblastos control y con FPI se tiñeron con JC-1 (4 μM) en medio de cultivo Ham F-12 durante 30 min a 37°C en la oscuridad. Posteriormente, las células se lavaron dos veces con PBS y se estimularon con el agente desacoplante FCCP (100 μM) u oligomicina (5 μM). Los fibroblastos se observaron con un microscopio confocal usando el objetivo de 20x, y se midieron tanto la fluorescencia verde (520 nm) como la roja (572 nm) para detectar el cambio de emisión. Este desplazamiento se calculó como la relación de intensidad de fluorescencia rojo/verde. Las imágenes se analizaron utilizando el software ImageJ.

5.13. Producción de ATP

La producción de ATP se determinó cuantitativamente en fibroblastos control y con FPI utilizando el estuche de determinación de ATP, basado en un ensayo bioluminiscente. Para este ensayo, se colocaron 1×10^4 fibroblastos en una microplaca blanca de 96 pozos con un fondo transparente. El ensayo se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante. La medición de la bioluminiscencia se registró utilizando un lector de microplacas multimodal (Synergy HTX BioTek, Winooski, VT, E.U.) en el modo de luminómetro. Los resultados fueron normalizados con la cantidad de proteína obtenida de cada pozo.

5.14. Cociente ADP/ATP

Se midió el cociente ADP/ATP en fibroblastos control y con FPI usando el estuche ADP/ATP. Brevemente, se sembraron en placas fibroblastos control y con FPI a una densidad de 1×10^4 células/cm² en una microplaca blanca de 96 pocillos con un fondo transparente. Después de la incubación durante la noche, se determinó el cociente ADP/ATP siguiendo las instrucciones del fabricante. A continuación, se midió la bioluminiscencia utilizando un lector de microplacas multimodal (Synergy HTX BioTek, Winooski, VT, E.U.). Los resultados fueron normalizados con la cantidad de proteína obtenida de cada pozo.

5.15. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

La TEM se realizó con el apoyo del Centro de Microscopía Avanzada (North Western University, Chicago EUA). En resumen, se cultivaron fibroblastos de pulmón en cubreobjetos Thermanox colocados en una placa de 24 pozos. Después de 48 h de incubación, las muestras se fijaron en cacodilato de sodio 0.1 M (pH 7.2) que contenía paraformaldehído al 2% y glutaraldehído al 2.5%, se fijaron posteriormente con tetróxido de osmio al 2% y se tiñeron con acetato de uranilo al 3%. Las muestras se deshidrataron en grados de etanol ascendentes, se hicieron transiciones con una mezcla 1:1 de etanol y resina, y se embebieron en la mezcla de resina del kit EMBED-812. Con un ultramicrotomo Leica Ultracut UC6, se recogieron secciones ultrafinas (70 nm) en rejillas de cobre de malla 200 y se tiñeron posteriormente con acetato de uranilo al 3% y citrato de plomo de Reynolds. Se utilizaron secciones ultrafinas para obtener imágenes de cada muestra con el microscopio electrónico de transmisión Tecnai G2 Spirit (FEI Company, Hillsboro, OR, E.U.) a 120 kV. La longitud de las mitocondrias se utilizó para determinar la media de elongación mitocondrial por imagen; se midieron al menos 70 mitocondrias por condición. Las imágenes se analizaron utilizando el software ImageJ.

5.16. Análisis estadístico

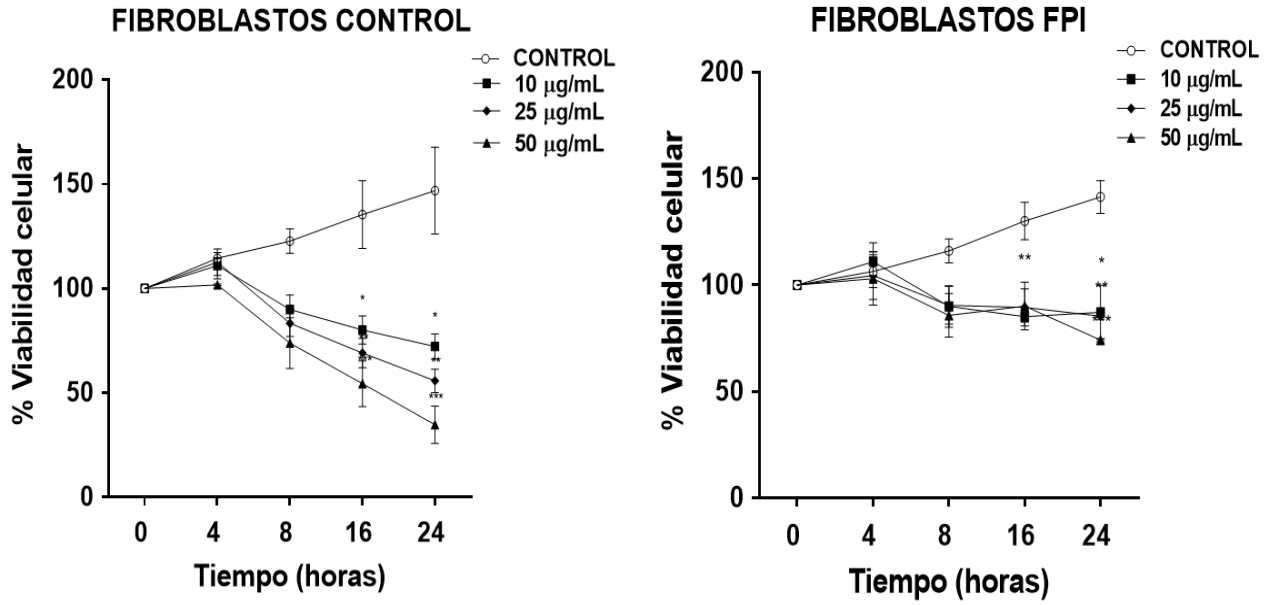
Todos los datos se expresaron como la media \pm error estándar (SEM). Para analizar las diferencias significativas entre el grupo de control y FPI, utilizamos una prueba t de student para datos no apareados. Para realizar la comparación entre las diferentes dosis de mitomicina utilizadas se realizó el análisis de varianza bidireccional (ANOVA), seguida de la prueba de Bonferroni. Los valores de p inferiores a 0.05 se consideraron estadísticamente significativos. El análisis estadístico se realizó utilizando el software GraphPad Prism 6.01 (San Diego, CA, EUA).

6. RESULTADOS

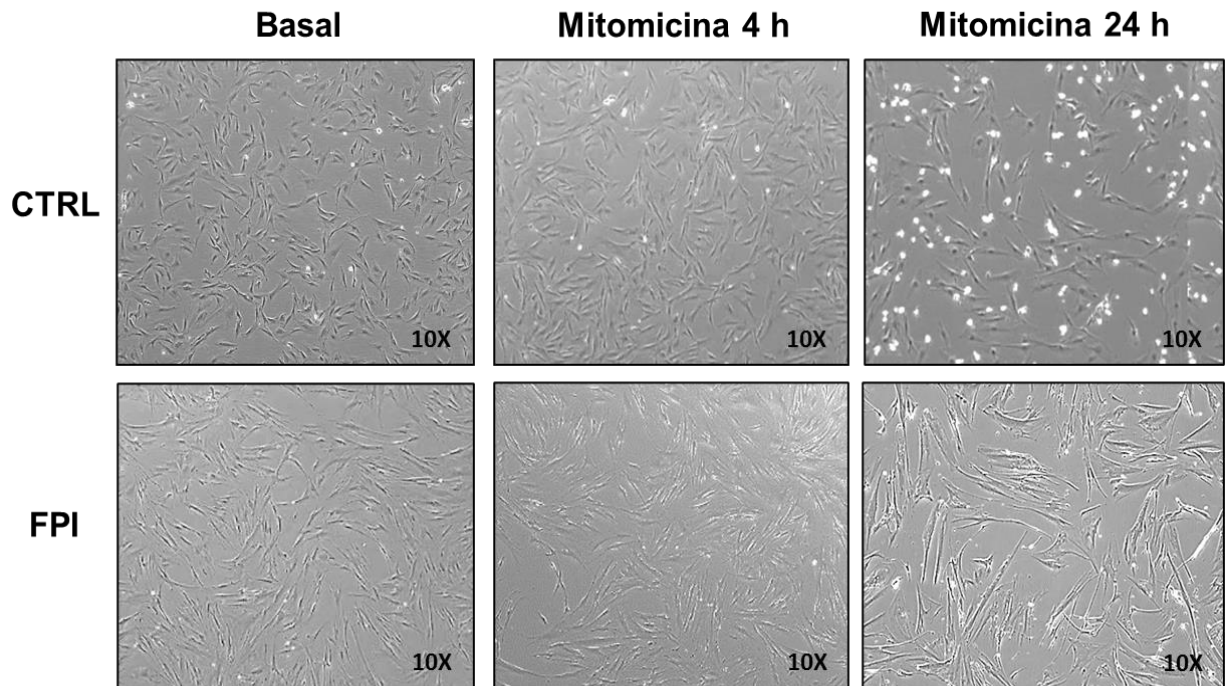
6.1 Los fibroblastos de FPI son resistentes a la apoptosis inducida por mitomicina C

Diversos estudios han demostrado que cuando es administrada a dosis altas la mitomicina C inhibe la proliferación de fibroblastos e induce la apoptosis mediante la activación de la vía intrínseca mitocondrial [79,80]. Para investigar el efecto de la mitomicina C en los fibroblastos, evaluamos la viabilidad celular usando el ensayo WST-1 luego de la exposición a varias concentraciones de mitomicina C (10, 25 o 50 µg/mL) en diferentes tiempos (4, 8, 16 y 24 h). Como se observa en la **Figura 11A**, la mitomicina C redujo significativamente la viabilidad de los fibroblastos control de manera dosis dependiente. El tratamiento de fibroblastos control con mitomicina C (25 µg/ml) durante 24 h condujo a una disminución de casi el 50% en la viabilidad celular. Sin embargo, la administración de mitomicina C no tuvo el mismo efecto en los fibroblastos de FPI, donde el porcentaje máximo de muerte celular se alcanzó con mitomicina C (50 µg/mL) a las 24 h. En la **Figura 11B** se presentan micrografías de campo claro representativas de imágenes de fibroblastos tratados con 25 µg/mL de mitomicina C. Para determinar si los fibroblastos de pacientes con FPI son resistentes a la apoptosis inducida por mitomicina C, se realizaron ensayos de apoptosis utilizando la doble tinción con Anexina V/ Ioduro de propidio mediante la técnica de citometría de flujo. Después de 24 h del tratamiento con las diferentes dosis de mitomicina C (10, 25 y 50 µg/ml), se evaluó el porcentaje de células apoptóticas (incluida la apoptosis temprana y tardía). Los resultados revelaron que los fibroblastos de FPI son significativamente más resistentes a la apoptosis inducida por mitomicina C a las dosis de 25 y 50 µg/mL, en comparación con los fibroblastos de control (**p<0.05, ***p<0.01) **Figura 11C**.

A)



B)



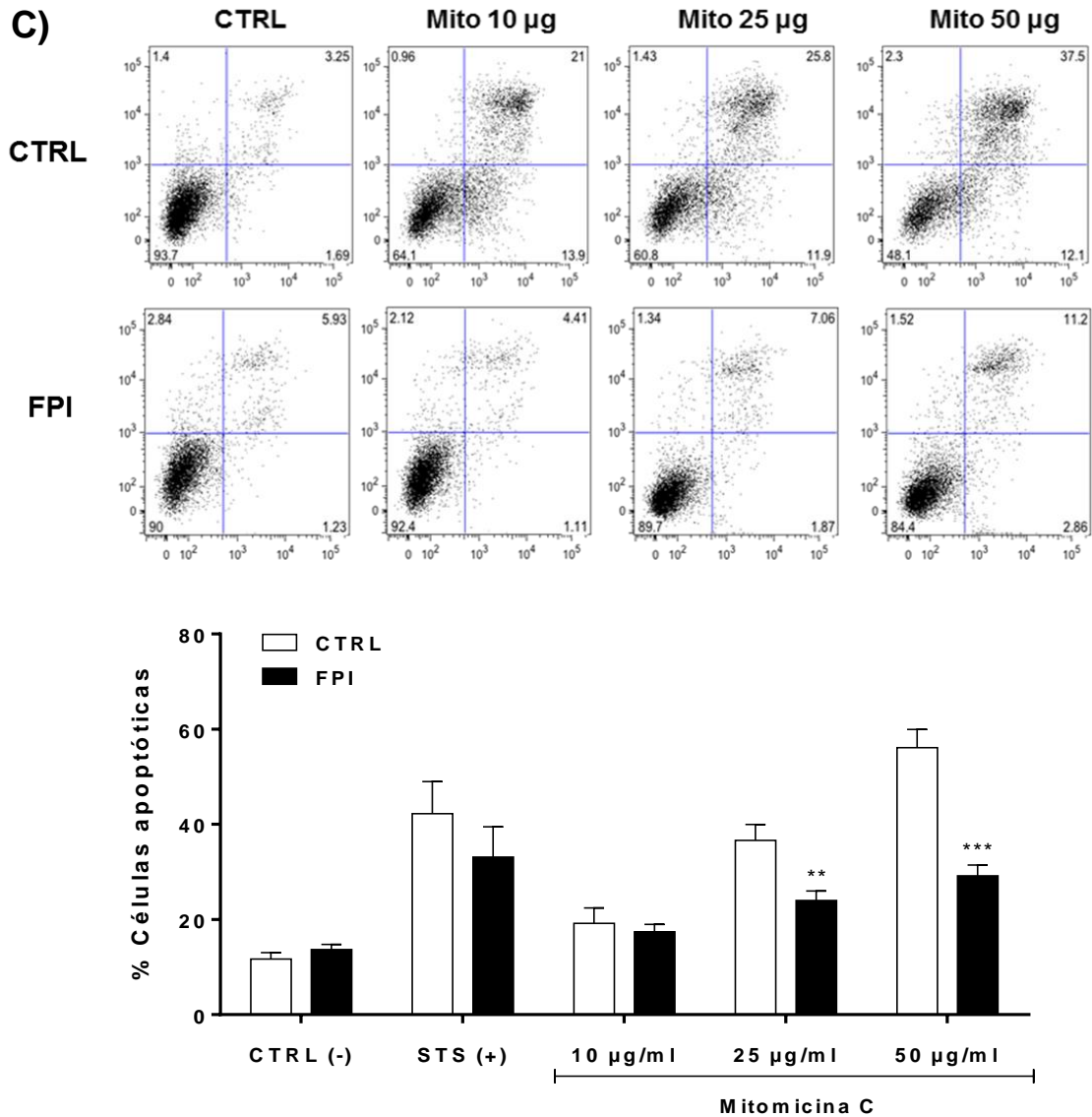


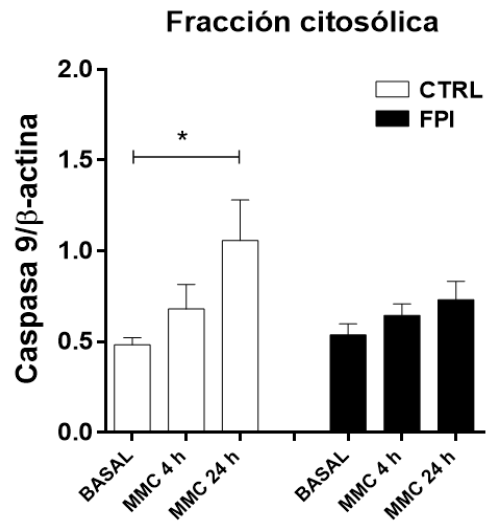
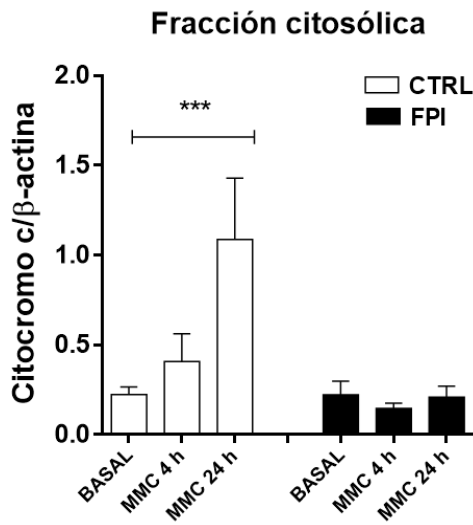
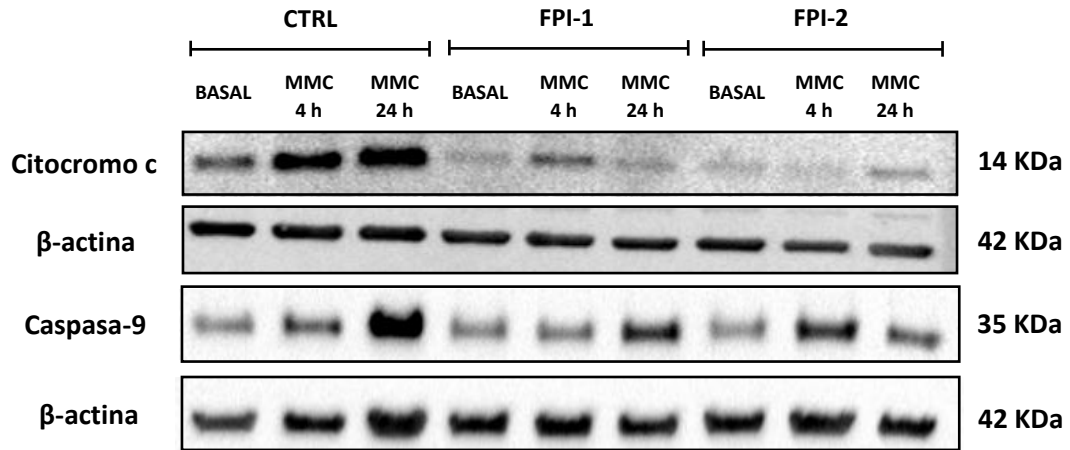
Figura 11. Efecto de la mitomicina C (MMC) sobre la viabilidad y resistencia a la apoptosis en fibroblastos control y de pacientes con Fibrosis Pulmonar Idiopática. **A)** Después del tratamiento con mitomicina C a distintas dosis (10, 25 y 50 µg/mL) a los tiempos de 4, 8, 16 y 24 h, se determinó el efecto sobre la viabilidad celular utilizando el ensayo WST-1. Los datos representan la media ± SEM de dos experimentos independientes ** $p < 0.05$, *** $p < 0.01$, en comparación con el grupo de control. **B)** Imágenes representativas de campo claro de fibroblastos control y con FPI, después de la incubación con mitomicina C (25 µg/mL) durante 4 y 24 h. **C)** La tasa de apoptosis celular se analizó mediante citometría de flujo utilizando el método de doble tinción de Anexina V/Ioduro de propidio (FITC/PI). Los fibroblastos se estimularon con mitomicina C durante 24 h. Se utilizó estaurosporina como control positivo (STS, 1 µM). Los resultados se expresan como la media ± EEM. Las diferencias se analizaron mediante ANOVA bidireccional seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni. ** $p < 0.05$, *** $p < 0.01$ vs. control. CTRL (n = 2) y FPI (n = 4).

6.2. Los fibroblastos FPI presentan una disminución en la liberación del Cyt c.

Para determinar si la resistencia a la apoptosis en fibroblastos de FPI está asociada con la liberación de Cyt c, se estimularon fibroblastos control y FPI con mitomicina C (25 µg/mL) durante 4 y 24 h. Posteriormente, se aislaron las fracciones citosólica y mitocondrial. El Cyt c se determinó en la fracción citosólica por Western blot y HPLC, mientras que la fracción mitocondrial solo fue analizada por WB debido a la pequeña cantidad de muestra obtenida durante el aislamiento. Como se ilustra en la **Figura 12A**, la fracción citosólica aislada de los fibroblastos control tenía un mayor contenido de Cyt c después del tratamiento con mitomicina C, con respecto a la condición basal ($***p<0.01$). Por el contrario, el contenido de Cyt c citosólico no cambió en los fibroblastos de FPI después del tratamiento con mitomicina C. Estos resultados fueron confirmados por análisis de HPLC (**Figura 12B**). Además, analizamos los niveles de expresión de Bax, una proteína pro-apoptótica de la familia Bcl-2. Encontramos una disminución marcada de Bax en la fracción citosólica de los fibroblastos controles estimulados con mitomicina C durante 24 h, lo que sugiere que Bax se translocó del citosol a la membrana mitocondrial, contribuyendo al proceso de apoptosis. Por el contrario, el nivel de esta proteína reveló solo una ligera disminución a las 24 h en los fibroblastos de FPI. Además, la estimulación con mitomicina C durante 24 h aumentó la forma activa de caspasa 9 en la fracción citosólica de los fibroblastos control ($**p<0.05$) pero no en los fibroblastos de FPI (**Figura 12A**). Estos resultados revelan que la vía intrínseca se activa en los fibroblastos control, pero no en los fibroblastos de pacientes con FPI. Por otro lado, el análisis de la fracción mitocondrial de los fibroblastos control presentó un alto contenido de Cyt c en condiciones basales, mientras que el tratamiento con mitomicina C durante 24 h provocó una disminución significativa ($***p<0.01$). Además, observamos que, en condiciones basales, el contenido de Cyt c mitocondrial en los fibroblastos de pacientes con FPI fue significativamente menor que en los fibroblastos control, mientras que el tratamiento con mitomicina C no cambió sus niveles en los fibroblastos de FPI (**Figura 12C**). Estos datos nos indican que los fibroblastos de pacientes con FPI liberan menos Cyt c después de la estimulación con mitomicina C en comparación con los fibroblastos control.

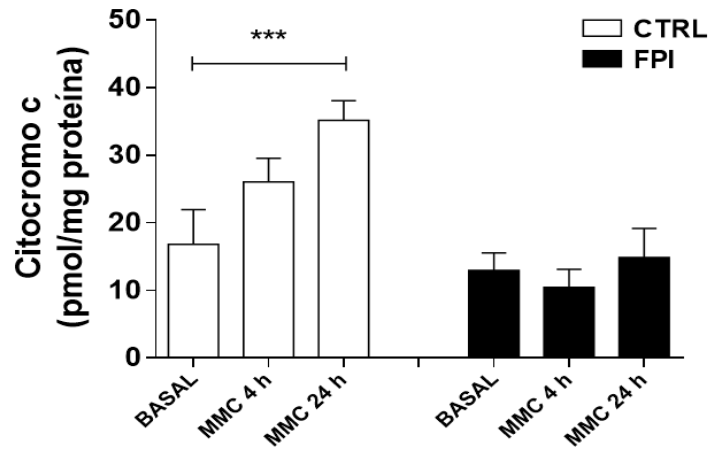
A)

Fracción citosólica



B)

Fracción citosólica (HPLC)



C)

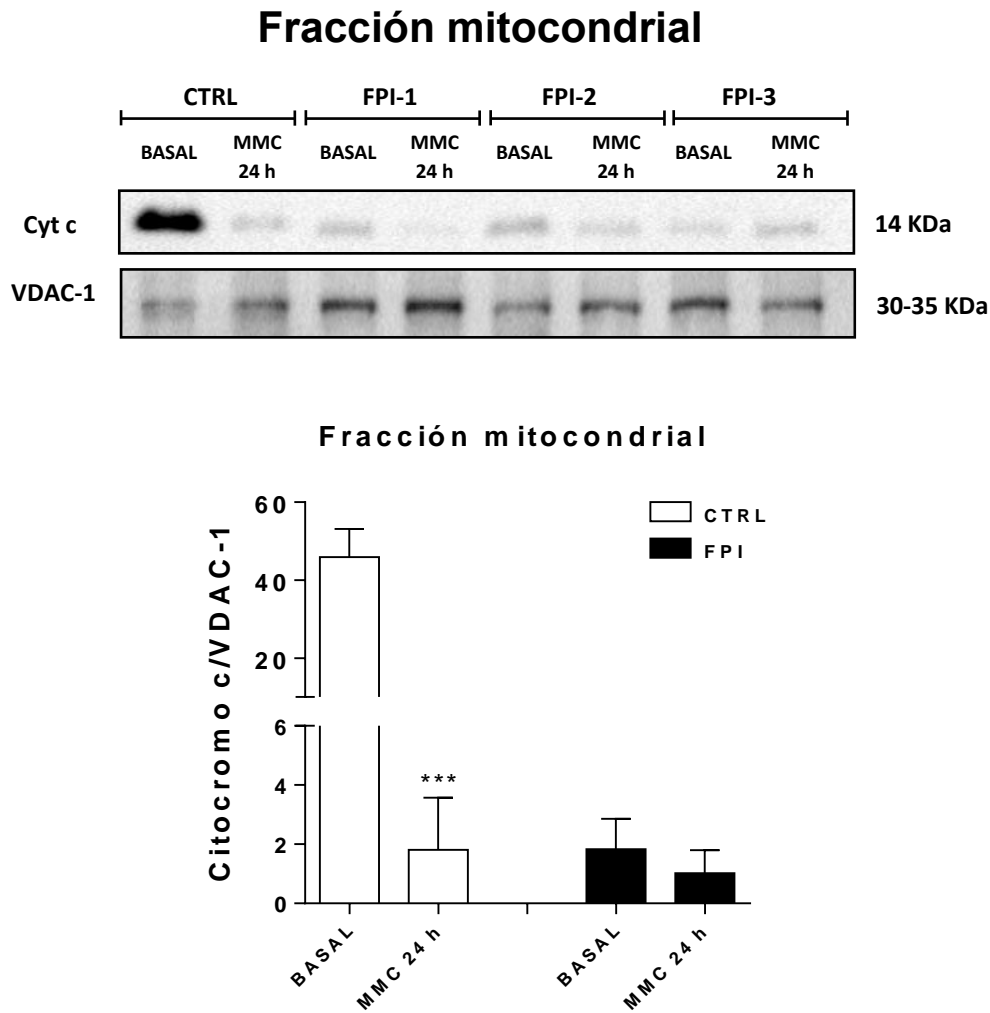


Figura 12. Los fibroblastos de Fibrosis Pulmonar Idiopática presentan una disminución en la liberación de citocromo c inducida por mitomicina C (MMC). Después del estímulo con mitomicina C (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por 4 y 24 h, aislamos las fracciones citosólica y mitocondrial en los fibroblastos control y con FPI. **A)** Los niveles de expresión del citocromo c, caspasa 9 y Bax en la fracción citosólica se determinaron mediante análisis de WB. Los niveles de expresión de β -actina se utilizaron como control de carga. **B)** La fracción citosólica también se analizó mediante la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). **C)** Los niveles de expresión del citocromo c en la fracción mitocondrial se determinaron mediante el análisis de WB. Los niveles de expresión de VDAC-1 se utilizaron como control de carga. Los resultados se expresan como la media \pm EEM de al menos tres experimentos independientes. Las diferencias se analizaron usando ANOVA de una vía seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. control. CTRL (n = 3) y FPI (n = 3).

6.3. Los fibroblastos de FPI presentan resistencia a la apertura de PTPm inducida por Ionomicina.

Se ha propuesto que la modulación de la apertura del PTPm es un regulador estratégico de la muerte celular por apoptosis. Para determinar si la apertura del PTPm está asociada con la resistencia a la apoptosis que muestran los fibroblastos aislados de pacientes con FPI, comparamos la apertura del PTPm de fibroblastos control y con FPI en condiciones basales, utilizando el ensayo de fluorescencia de calceína en presencia de cloruro de cobalto (CoCl_2). Primero, medimos la fluorescencia de la calceína-AM por microscopía confocal en ausencia de cobalto. Como era de esperar, la fluorescencia de la calceína es mucho mayor en ausencia de CoCl_2 (Co^{2+} libre). Los resultados revelaron niveles similares de calceína entre fibroblastos control y con FPI, lo que indicó que ambos fibroblastos tienen la misma capacidad de absorción de calceína (**Figura 13A, 13B**). Sin embargo, en presencia de CoCl_2 , la fluorescencia de la calceína dentro de las mitocondrias fue significativamente menor en los fibroblastos control que en los de FPI ($*p < 0.05$). Este resultado sugiere que el PTPm es más sensible a la apertura en los controles que los fibroblastos FPI (**Figura 13A, 13B**). Por otra parte, se analizó la apertura de PTPm en fibroblastos mediante citometría de flujo utilizando un estuche de poro de transición MitoProbe para corroborar este hallazgo. El cambio en la fluorescencia entre las células incubadas solo con CoCl_2 y las incubadas con ionomicina indica la activación continua de PTPm. Nuestros resultados revelaron que la apertura de PTPm inducida por ionomicina fue significativamente mayor en el control que en los fibroblastos FPI ($***p < 0.01$) (**Figura 13C, 13D**). Este resultado confirmó que los fibroblastos de FPI son más resistentes a la apertura de PTPm inducida por ionomicina, como lo demuestra la retención de la fluorescencia de calceína en presencia de ionomicina en fibroblastos de FPI ($*p < 0.01$ vs. control) (**Figura 13E**).

A)

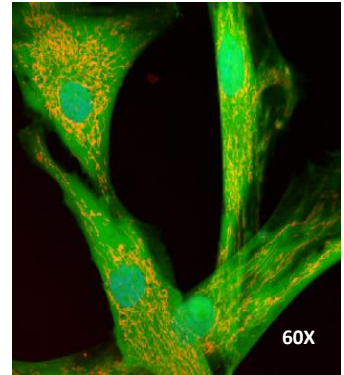
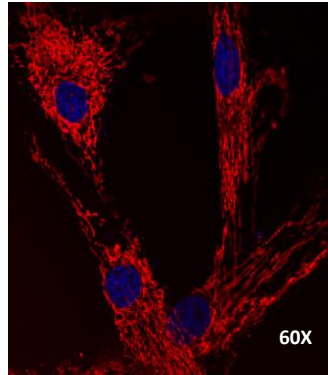
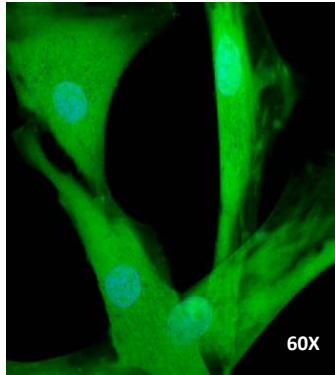
CALCEINA

MITOTRACKER

MERGE

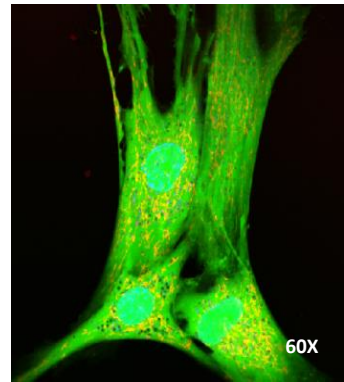
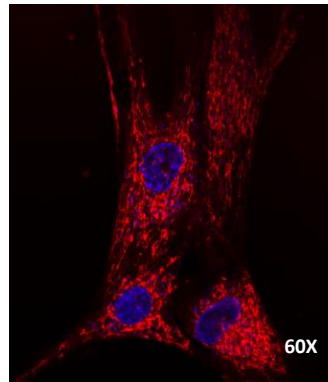
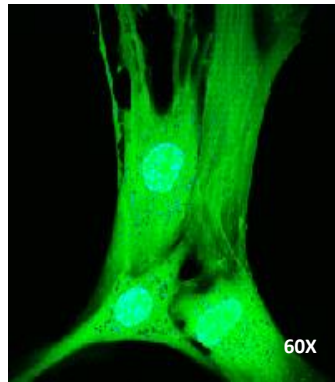
CTRL

Co²⁺-Libre



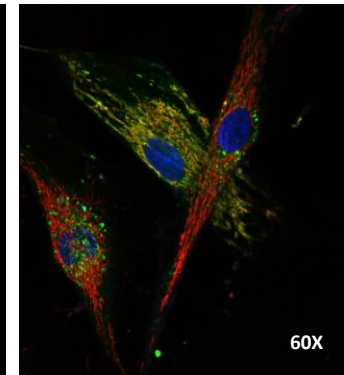
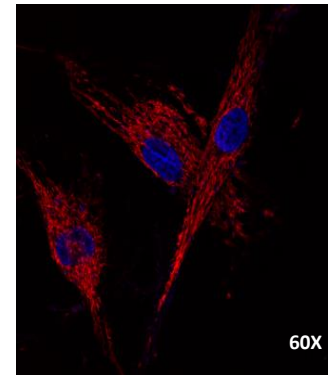
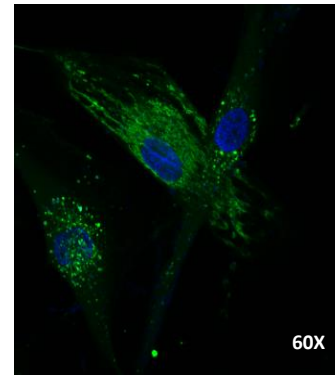
FPI

Co²⁺-Libre



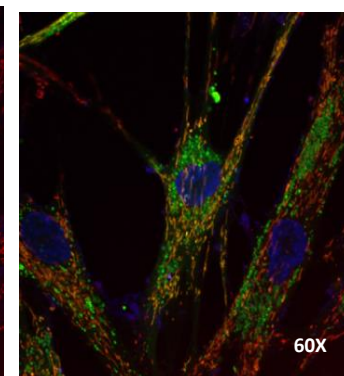
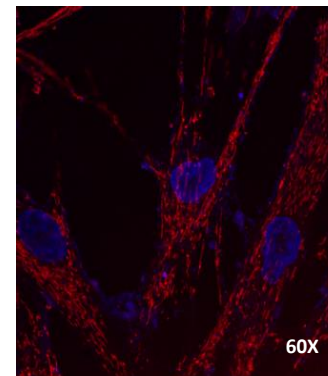
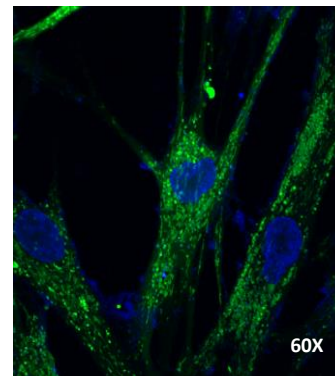
CTRL

Co²⁺
+ Co²⁺



FPI

Co²⁺
+ Co²⁺



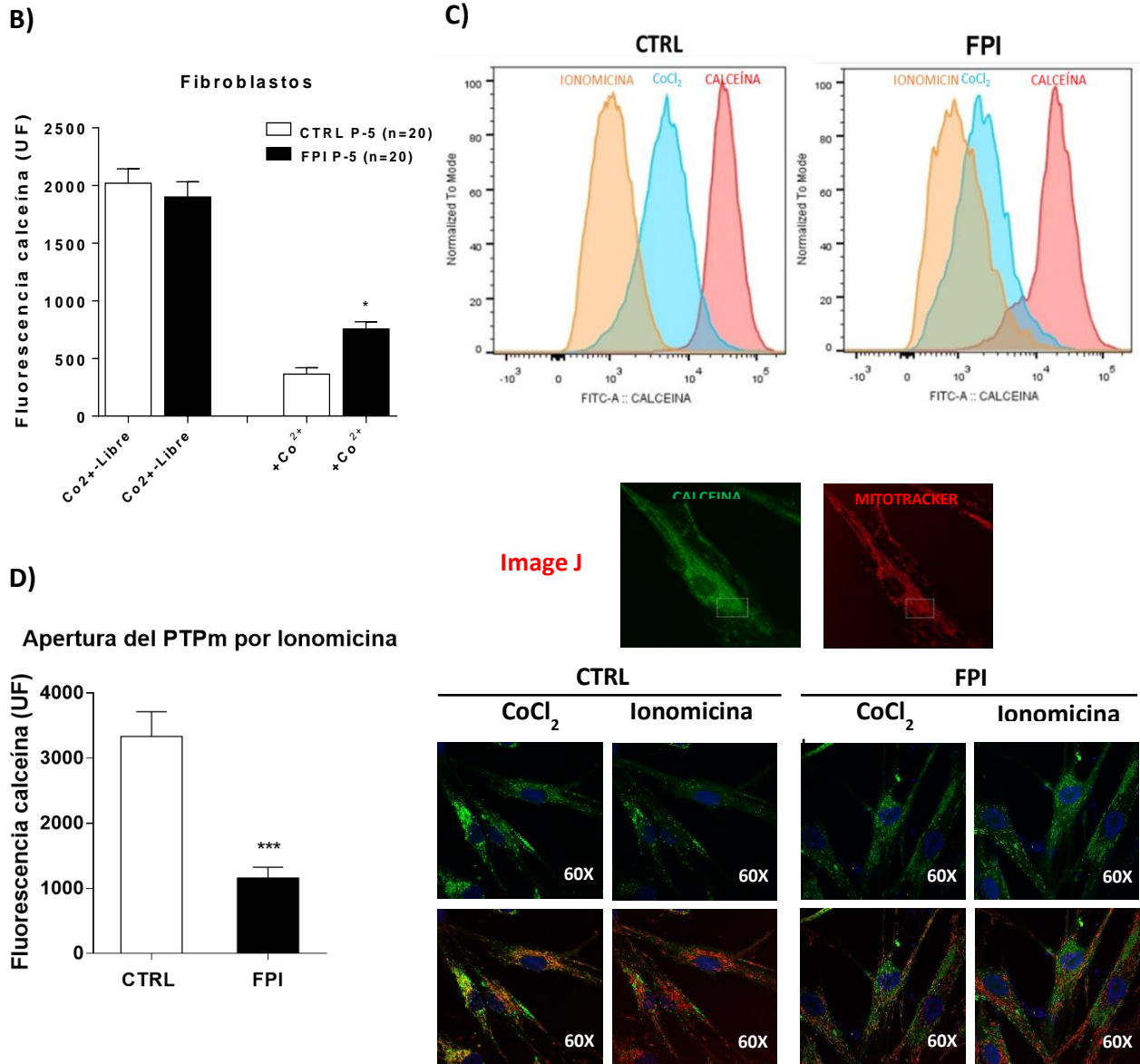
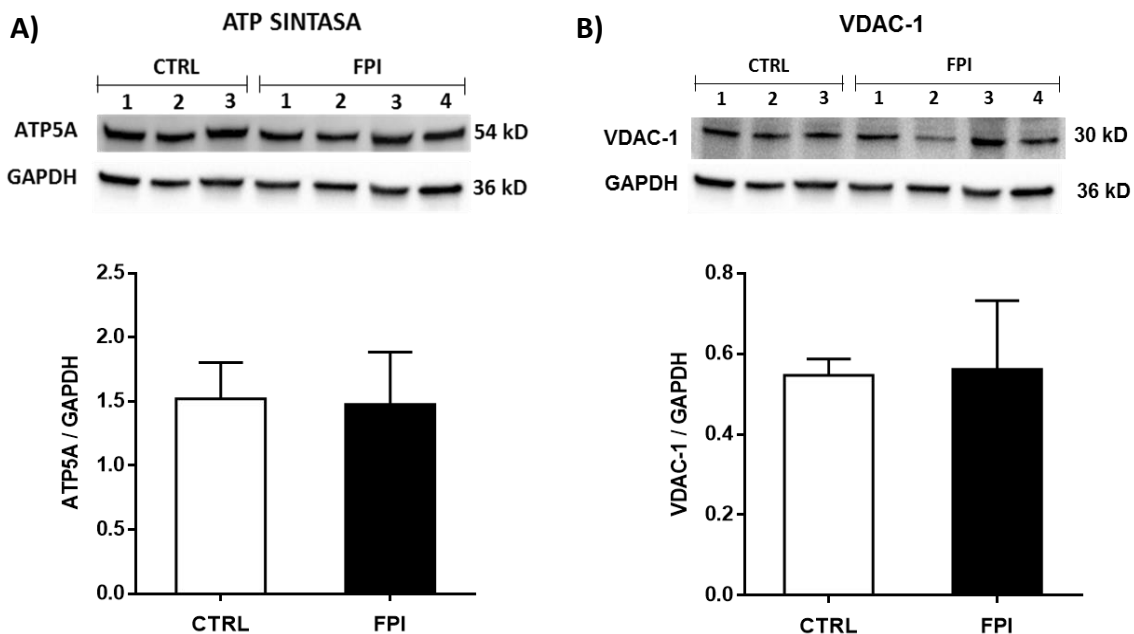


Figura 13. Los fibroblastos de pacientes con Fibrosis Pulmonar Idiopática presentan una fuerte resistencia a la apertura del PTPm inducida por ionomicina. A) Micrografías de microscopía confocal representativas de fibroblastos control y con FPI después de la incubación con calceína-AM (1 μ M) y MitoTracker Red (150 nM) en presencia o ausencia de Co^{2+} (1 mM), que apaga la fluorescencia de la calceína (verde) fuera de la mitocondria. En ausencia de Co^{2+} , la señal fluorescente de calceína es muy intensa y está presente en toda la célula. La fluorescencia de la calceína en las mitocondrias es menor en presencia de Co^{2+} . **B)** El gráfico de barras indica la cuantificación de la fluorescencia de calceína en FPI y células de control en ausencia o presencia de Co^{2+} . El número que se presenta en el panel indica el número de celdas utilizadas en el estudio. Los resultados se expresan como la media \pm EEM. Las diferencias se analizaron mediante ANOVA de un factor seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni. * $p < 0.05$.

C) El histograma de citometría de flujo representativo revela la intensidad de las señales de calceína en fibroblastos de FPI y los fibroblastos de control. El cambio de fluorescencia entre el Co^{2+} y la ionomicina indica la activación continua de los poros de transición de la permeabilidad mitocondrial. **D)** El gráfico de barras indica la cuantificación de la fluorescencia media de calceína en FPI y células de control. Los resultados se expresan como la media \pm EEM. Las diferencias se analizaron mediante una prueba t para datos no pareados. *** $p < 0.01$ vs. control CTRL (n = 3) y FPI (n = 4).

6.4 Los fibroblastos de FPI presentan una disminución en la expresión de la proteína ANT en lisado total.

Para determinar si la disminución en la apertura del PTPm en los fibroblastos de pacientes con FPI es debida a una disminución en la expresión de las proteínas involucradas en su formación, nosotros evaluamos la expresión de las principales proteínas asociadas con la formación del PTPm (ATP5A, VDAC-1 y ANT-1) en lisados totales de fibroblastos pulmonares controles y con FPI. Los resultados no revelaron cambios en los niveles de expresión de las proteínas ATP5A y VDAC-1 entre fibroblastos control y con FPI (**Figura 14A y 14B**). Sin embargo, al evaluar los niveles de expresión de la proteína ANT-1, observamos una disminución de la expresión de esta proteína en los fibroblastos de pacientes con FPI con respecto a los fibroblastos control (* $p < 0.05$), como se observa en la **Figura 14C**.



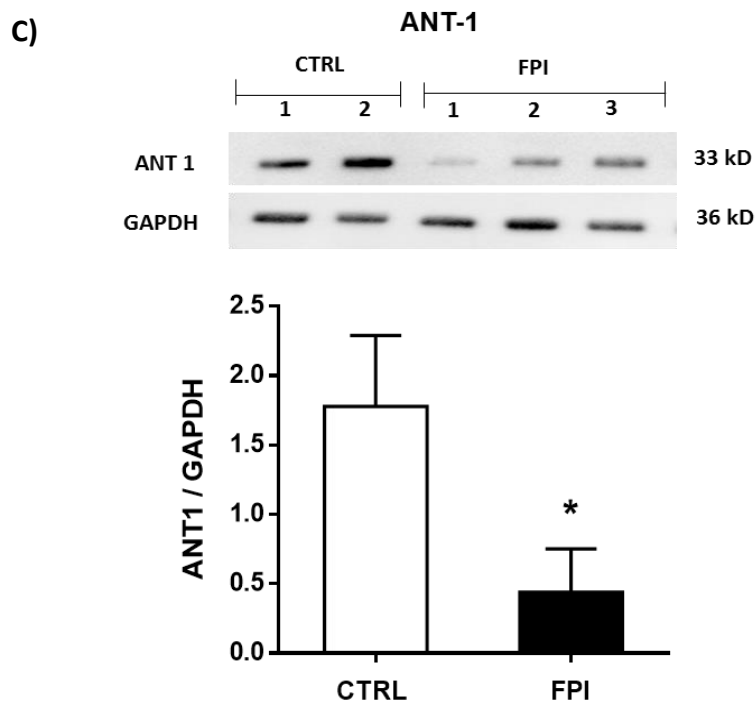


Figura 14. Los fibroblastos de pacientes con Fibrosis Pulmonar Idiopática presentan una disminución en los niveles de expresión de la proteína ANT-1 en lisado total de fibroblastos. A) Imagen representativa de la expresión de la proteína ATP sintasa (ATP5A) y **B)** VDAC-1 en fibroblastos de control y con FPI. Los resultados se expresan como la media \pm SEM. CTRL (n= 3) y FPI (n= 4). **C)** Imagen representativa de la expresión de la proteína ANT-1 en fibroblastos de control y con FPI. Los niveles de expresión de GAPDH se utilizaron como control de carga. Los resultados se expresan como la media \pm EEM. Las diferencias se analizaron mediante una prueba t para datos no apareados. * $p < 0.05$ vs. control, CTRL (n = 2) y FPI (n = 3), un solo experimento.

6.5. Los fibroblastos de FPI presentan una disminución de la liberación de calcio mitocondrial.

Debido a que se ha demostrado que los niveles elevados de calcio mitocondrial inducen la formación del PTPm, evaluamos los niveles de este ion en fibroblastos control y provenientes de pacientes con FPI. Para este ensayo usamos FCCP para aumentar el $[Ca^{2+}]_i$ activando al PTPm en los fibroblastos control y de FPI. Nuestros resultados indican que FCCP provocó en fibroblastos pulmonares normales un aumento transitorio de los niveles de $[Ca^{2+}]_i$ a $115,76 \pm 9,53$ y $108,09 \pm 7,01$ nM, respectivamente (**Figura 15A y 15C**). En contraste, los fibroblastos FPI exhibieron

una disminución significativa en los niveles de $[Ca^{2+}]_i$ de 13.59 ± 1.49 y 18.36 ± 5.24 nM, respectivamente (**Figura 15B y 15C**) (** $p < 0.01$). Para corroborar que el aumento de $[Ca^{2+}]_i$ se debe a la activación del PTPm con FCCP, bloqueamos farmacológicamente al PTPm con CsA, observándose una inhibición en la respuesta (**Figura 15D**).

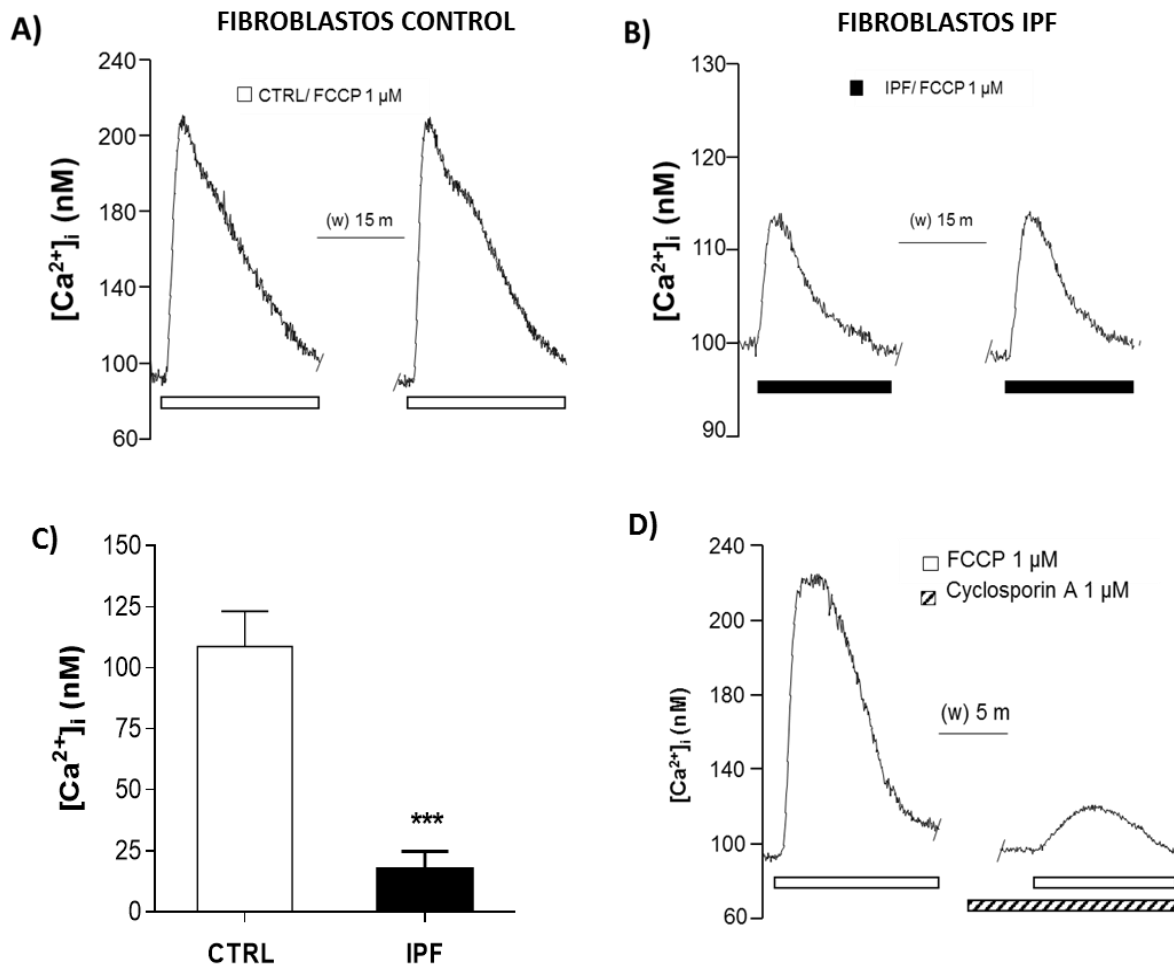
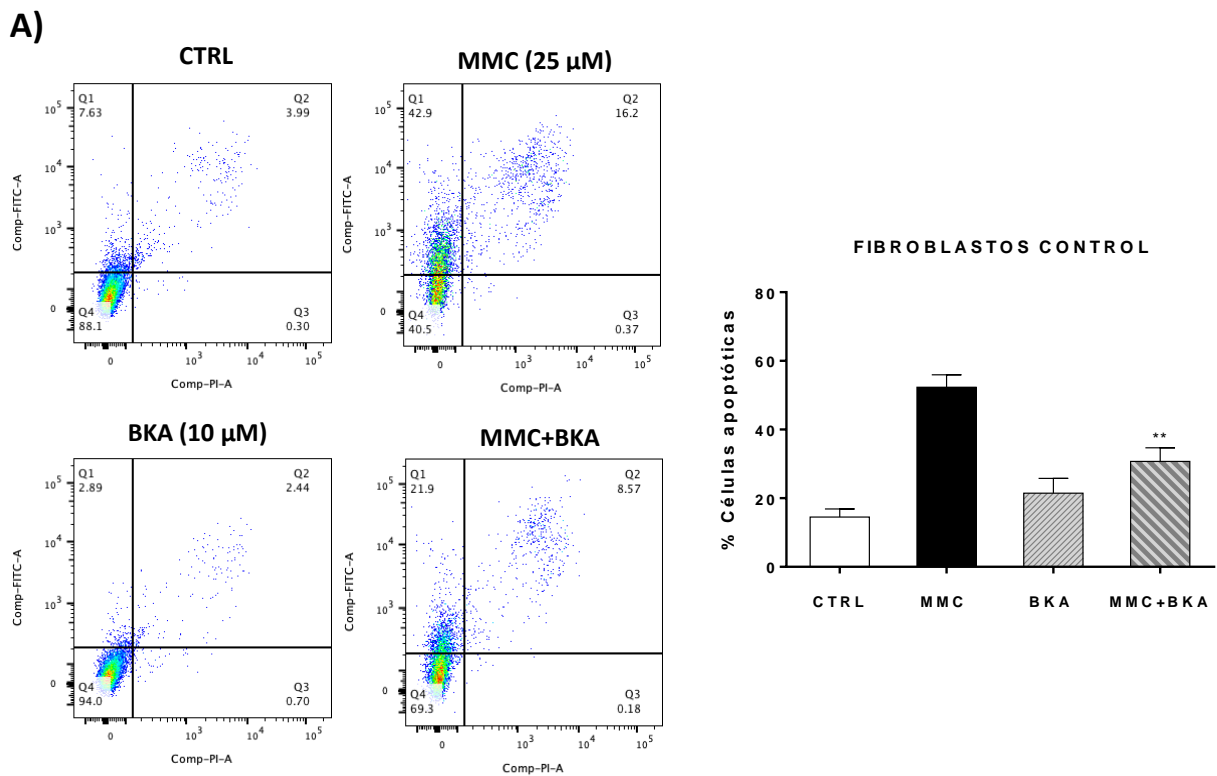


Figura 15. Trazos de la concentración de calcio intracelular $[Ca^{2+}]_i$ en fibroblastos control y provenientes de pacientes con FPI. A) y B) Se aplicaron dos pulsos de FCCP con un intervalo entre estímulos de 15 min para determinar la reproducibilidad de la respuesta, CTRL (n=2) y FPI (n=2). Se evaluaron seis fibroblastos para cada condición experimental. **C)** Los datos se presentan como media \pm EEM y se compararon mediante la prueba t de Student, ** $p < 0.01$. **D)** El aumento de Ca^{2+} inducido por FCCP fue bloqueado por ciclosporina A (n=2).

6.6. La inhibición de la apertura de PTPm con BKA disminuyó la apoptosis en los fibroblastos de control.

Para determinar si la inhibición de la apertura del PTPm participa en la resistencia de los fibroblastos a la apoptosis, se estimularon fibroblastos control con ácido bongkreico (BKA), un inhibidor de la apertura de PTPm, 10 μM por 6 h, y luego se estimularon con mitomicina C (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante 24 h. Nuestros resultados revelaron un aumento en el número de células apoptóticas positivas cuando usamos mitomicina C. De manera interesante, la administración del BKA disminuyó el porcentaje de células apoptóticas en los fibroblastos de control (** $p < 0.01$), las cuales son muy susceptibles a la muerte celular (**Figura 16A**). Por otro lado, cuando estimulamos los fibroblastos de control con atractilósido (ATR), un inductor de la apertura de PTPm, encontramos un aumento, aunque no significativo en el porcentaje de apoptosis inducida por mitomicina C (**Figura 16B**).



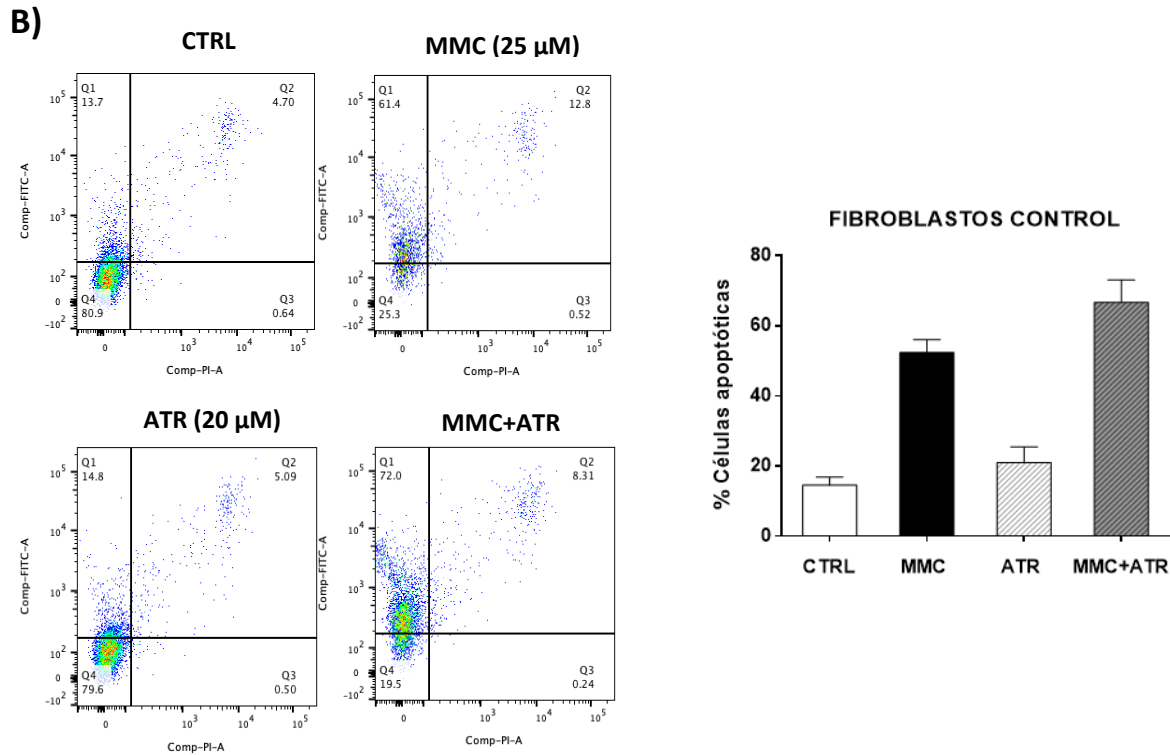


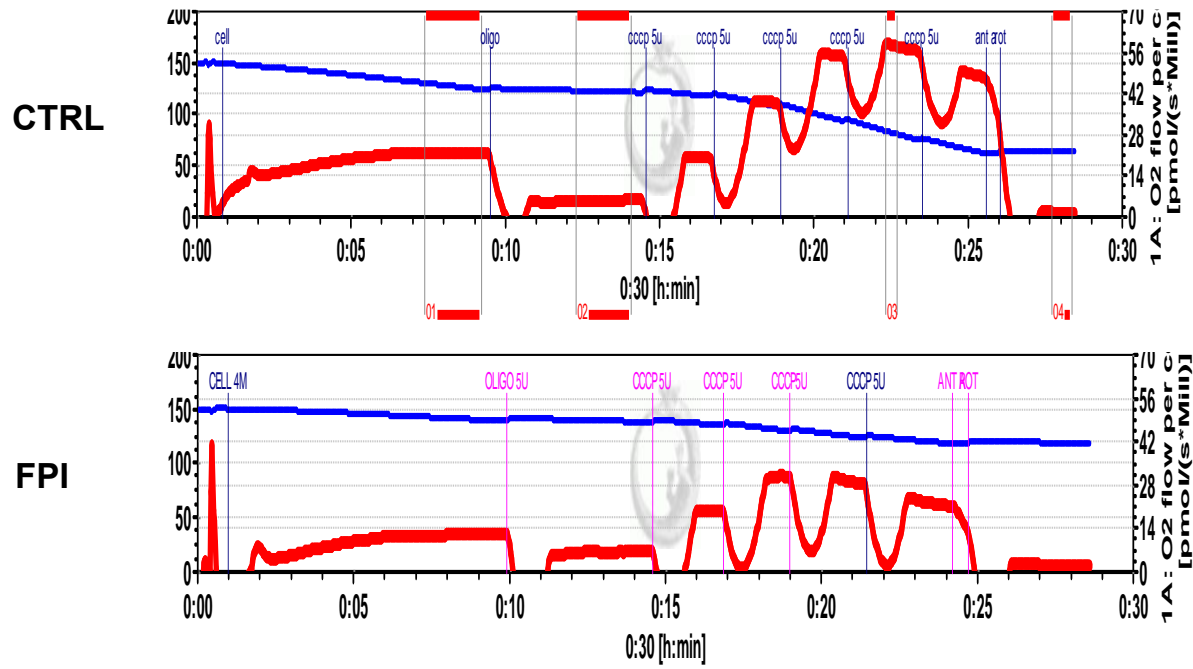
Figura 16. Los fibroblastos de control presentan resistencia a la apoptosis inducida por mitomicina C en presencia de ácido bongkreico (BKA) sin cambios con atracilósido (ATR). **A)** Imagen representativa de los análisis en dot plot por la técnica de citometría de flujo. Las tasas de apoptosis celular se analizaron utilizando el método de doble tinción de Anexina V-FITC / PI. **B)** Los fibroblastos se estimularon con BKA (10 μM) durante 6 h, y luego, se incubaron con mitomicina C (MMC; 25 μg/mL) durante 24 h. Los fibroblastos se estimularon con ATR (20 μM) durante 1 h, y luego se incubaron con (25 μg/mL) durante 24 h. Los resultados se expresan como la media ± SEM. Las diferencias se analizaron mediante ANOVA de una vía seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni, **p<0.01 vs. control. CTRL (n = 3).

6.7. Los fibroblastos de pulmones con FPI disminuyen el consumo de oxígeno.

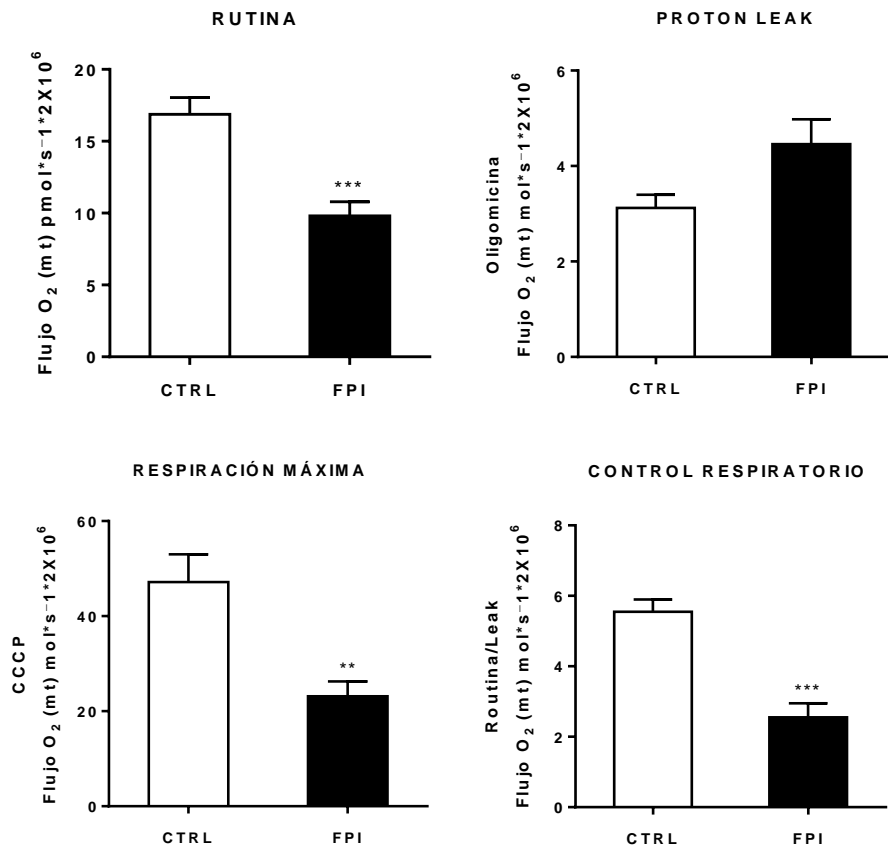
Para investigar si la resistencia a la apoptosis en los fibroblastos de la FPI está asociada con disfunción mitocondrial, analizamos la integridad de las mitocondrias a través del consumo de oxígeno en fibroblastos pulmonares control y de FPI. Se determinó el consumo de oxígeno ($\text{pmolO}_2/\text{s}/10^6\text{células por ml}$) en 2×10^6 fibroblastos no permeabilizados. La **Figura 17A** presenta un trazo representativo de la respiración de fibroblastos control y de FPI. La respiración de rutina de los fibroblastos se midió en un medio de incubación estándar (10-20 min), y luego, realizamos inyecciones secuenciales de sustrato-desacoplador-inhibidor-titulación para medir parámetros clave de la respiración mitocondrial. Como se observa en la **Figura 17B**, la respiración de rutina de los fibroblastos control fue mayor que la de los fibroblastos de FPI ($***p < 0.01$), la cual fue suprimida por la oligomicina, un inhibidor específico de la ATP sintasa mitocondrial y la fosforilación oxidativa. La fuga de protones aumentó ligeramente en los fibroblastos FPI, pero la diferencia con los fibroblastos control no fue significativa ($p = 0.06$). La respiración máxima de los fibroblastos se determinó después del desacoplamiento de las mitocondrias con CCCP. Los resultados revelaron que los fibroblastos de FPI tenían una tasa de consumo de oxígeno respiratorio máximo (OCR) significativamente disminuido en comparación con el grupo de control ($**p < 0.01$). Finalmente, el control respiratorio se calculó mediante la diferencia entre la respiración basal y la fuga de protones. Los resultados revelaron que los fibroblastos de FPI exhibieron un control respiratorio más bajo que los fibroblastos control ($***p < 0.01$). Nuestros hallazgos indican una alteración de la respiración en los fibroblastos de FPI. Por otra parte, evaluamos el consumo de oxígeno en fibroblastos permeabilizados para determinar si la modificación de la respiración en fibroblastos de FPI se asociaba con una alteración en el complejo I y II de la cadena de transporte de electrones. Determinamos la actividad de la cadena de transporte de electrones utilizando sustratos específicos para el complejo I (glutamato/malato) y el complejo II (succinato). Un trazo representativo se observa en la **Figura 17C**. La actividad de la cadena de transporte de electrones disminuyó en los fibroblastos de FPI cuando se estimuló a través del complejo I ($**p < 0.01$) o el complejo II ($*p < 0.05$) (**Figura 17D**).

A)

2x10⁶ Fibroblastos no permeabilizados

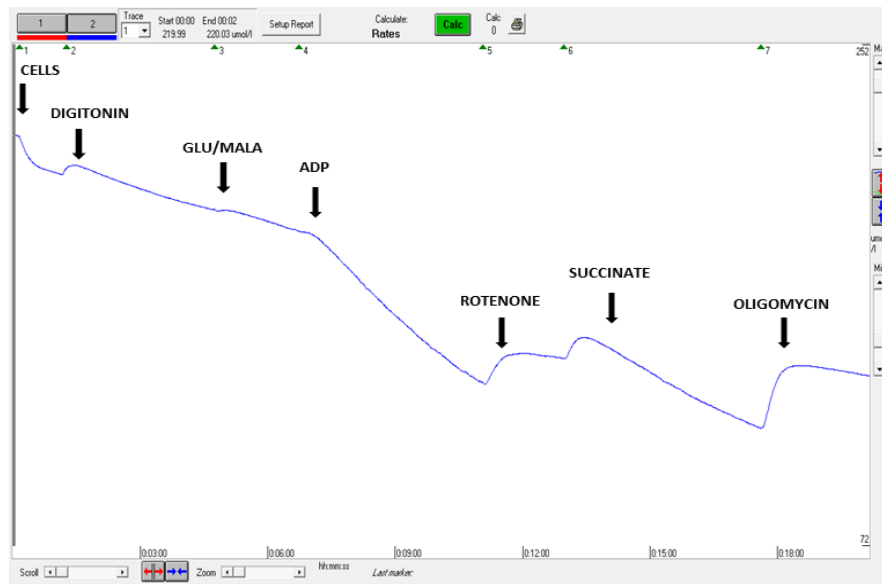


B)



C)

5×10^5 fibroblastos permeabilizados con digitonina



D)

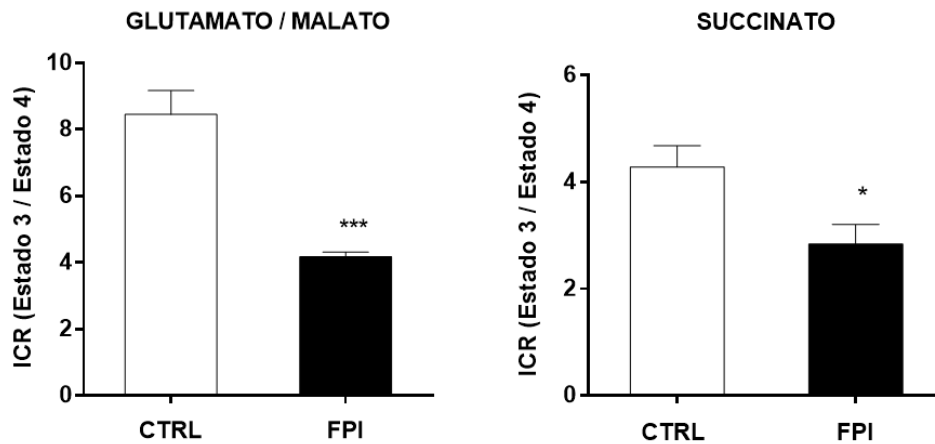


Figura 17. Consumo de oxígeno en fibroblastos control y de pacientes con Fibrosis Pulmonar Idiopática no permeabilizados y permeabilizados con digitonina. Los fibroblastos intactos se colocaron en una cámara de 2 ml a una concentración final de 2×10^6 células/ml. La medición del consumo de oxígeno se realizó a 37°C en el oxígrafo de alta resolución (Oxygraph-2k Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria). La fuga de protones fue inducida por oligomicina ($5 \mu\text{M}$), y las titulaciones de CCCP $1 \mu\text{M}$ indujeron la máxima respiración desacoplada. Finalmente, inhibimos el OXPHOS con rotenona y antimicina. **A)** Trazos representativos de consumo de oxígeno en fibroblastos control y de FPI. **B)** Gráficos de diferentes parámetros de la respiración mitocondrial (Rutina, Fuga de Protones, Respiración Máxima y Control Respiratorio). Los resultados se expresan como la media \pm SEM. Las diferencias se analizaron mediante una prueba t para datos no pareados, ** $p < 0,05$, *** $p < 0,01$ vs. control. CTRL ($n = 2$) y FPI ($n = 4$). **C)** Trazos representativos del consumo de oxígeno utilizando diferentes sustratos para el

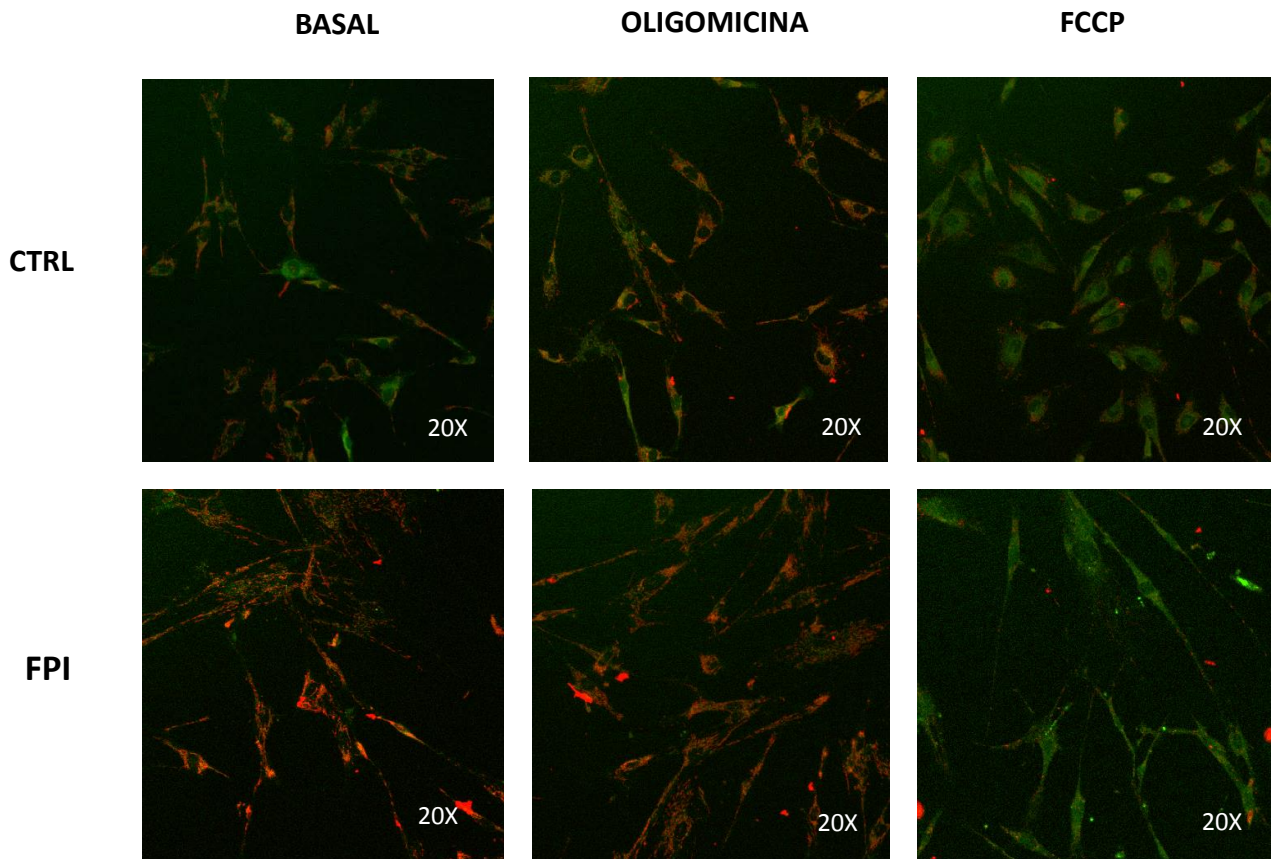
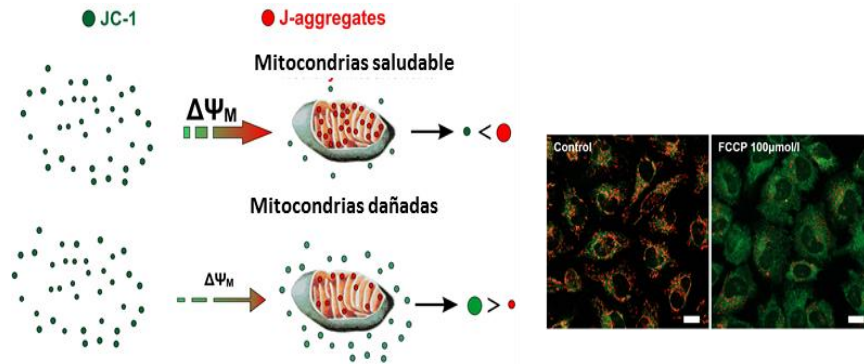
complejo I y II. **D)** Gráficos del índice de control respiratorio (ICR) usando glutamato / malato (10 mM / 5 mM) y succinato (5 mM). La inhibición de la respiración se llevó a cabo en presencia de rotenona (0.5 μ M) por el complejo I y oligomicina (5 μ M) del complejo II. Los resultados se expresan como la media \pm SEM. Las diferencias se analizaron mediante una prueba t para datos no pareados, * $p < 0,05$, *** $p < 0,01$ vs. control. CTRL (n = 3) y FPI (n = 2).

6.8. Los fibroblastos de FPI no muestran cambios en el potencial de membrana mitocondrial. Sin embargo, presentan una disminución en los niveles de ATP total.

Debido a que observamos alteraciones en el consumo de oxígeno mitocondrial, decidimos analizar cómo se encontraba el potencial de membrana mitocondrial en los fibroblastos pulmonares de pacientes con FPI. Usando microscopía confocal, medimos el $\Delta\psi_m$ de fibroblastos controles y de FPI teñidos con JC-1 (4 μ M). El JC-1 es un colorante fluorescente, catiónico, liposoluble que forma agregados de manera dependiente del potencial mitocondrial (agregados de color rojo) (**Figura 18A**). Nuestros resultados revelan que no hay diferencias significativas en la señal de fluorescencia de JC-1 entre los fibroblastos controles y de FPI. Sin embargo, los fibroblastos de FPI exhibieron un ligero incremento en el potencial de membrana con respecto a los fibroblastos control (**Figura 18A y 18B**). Para asegurar que el colorante estaba funcionando en condiciones óptimas, comparamos la fluorescencia de JC-1 en fibroblastos control y de FPI después del tratamiento con oligomicina o FCCP. La oligomicina, un inhibidor de la ATP sintasa, induce la hiperpolarización de las mitocondrias y aumenta la formación de agregados (aumenta la fluorescencia roja), mientras que la FCCP disipa el potencial transmembranal, conduciendo a la pérdida del gradiente electroquímico, evitando la formación de agregados de JC-1 (aumento de la fluorescencia verde) (**Figura 18A y 18B**). Por otra parte, cuantificamos la producción de ATP en fibroblastos control y de FPI mediante un ensayo de luminiscencia. Los resultados revelaron que los fibroblastos FPI tenían una concentración de ATP total más baja que el grupo de fibroblastos control (** $p < 0.01$). Además, la disminución de la respiración

mitocondrial en los fibroblastos de FPI se correlacionó con una disminución en la producción de ATP (**Figura 18C**).

A)



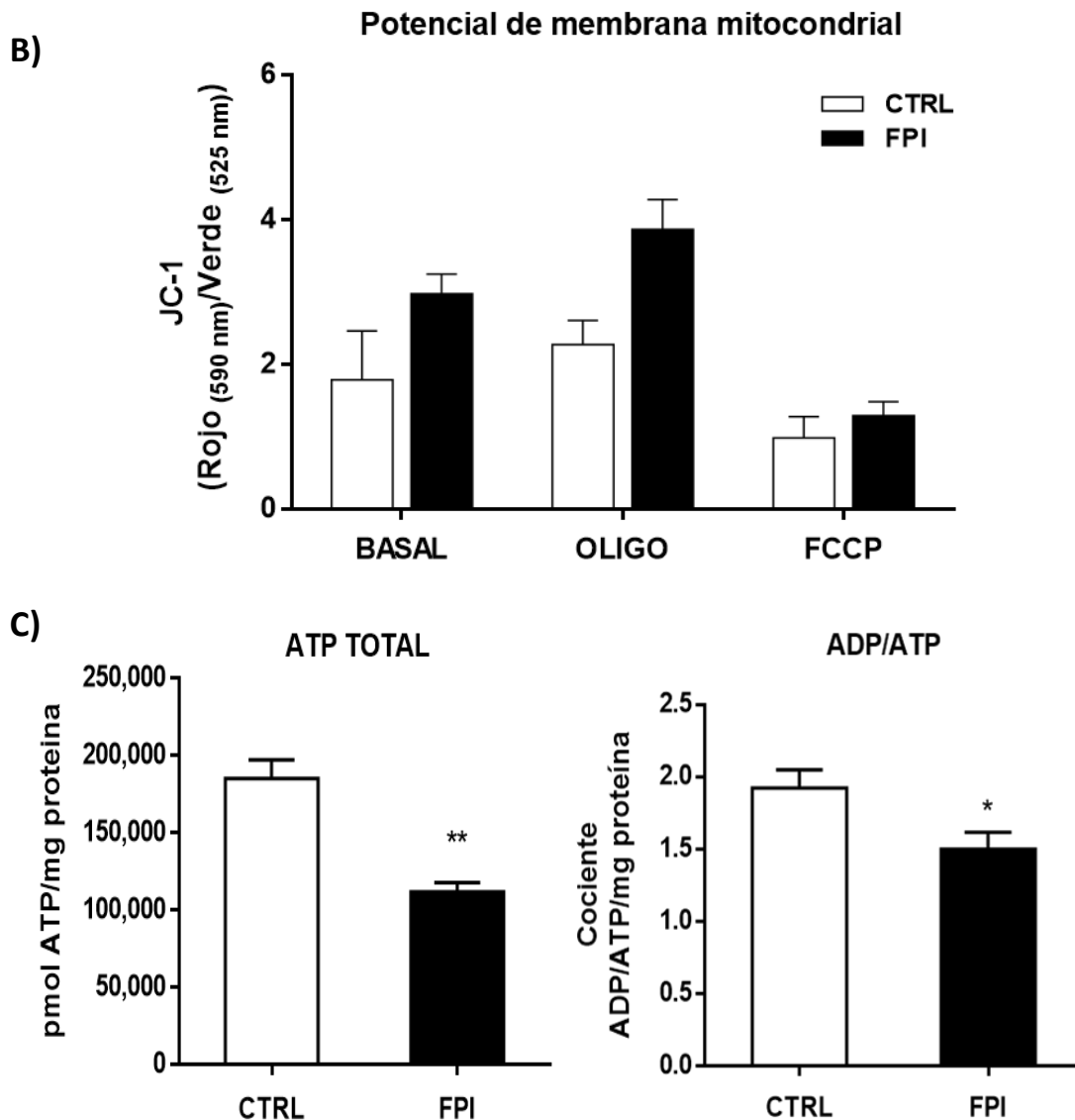


Figura 18. Los fibroblastos de FPI no modifican el potencial transmembrana mitocondrial, pero disminuyen la producción de ATP total. A) Imagen representativa de microscopía confocal de fibroblastos control y FPI después de la tinción con JC-1 (4 μ M) en presencia o ausencia de oligomicina (5 μ M) o FCCP (100 μ M). La intensidad de JC-1 refleja el nivel de potencial transmembrana mitocondrial. **B)** El gráfico de barras indica la cuantificación de las señales de JC-1 en fibroblastos control y de FPI. Los resultados se expresan como la media \pm SEM. CTRL (n = 1) y FPI (n = 2) Las diferencias se analizaron utilizando una prueba t para datos no pareados, *p<0.05 vs. control. **C)** Producción de ATP y cociente ADP/ATP se cuantificó mediante ensayo de luminiscencia en fibroblastos de control y de FPI. Los resultados se expresan como la media \pm SEM. Las diferencias se analizaron mediante una prueba t para datos no pareados. **p<0.01 vs. control. CTRL (n = 3) y FPI (n = 3).

6.9. Los fibroblastos extraídos de pacientes con FPI presentan una estructura mitocondrial anormal.

Para evaluar si existen cambios en la estructura mitocondrial entre fibroblastos controles y aislados de pacientes con FPI, utilizamos microscopía electrónica de transmisión (TEM) y microscopía confocal. Como se observa en la micrografía tomada por microscopía confocal con el colorante MitoTracker Red, la red mitocondrial en los fibroblastos de pacientes con FPI se observa fragmentada y con acumulación de mitocondrias, en comparación con los fibroblastos control. Además, el análisis por microscopía electrónica reveló que las mitocondrias de fibroblastos sanos son ramificadas, alargadas y están distribuidas de manera homogénea a lo largo del fibroblasto, sus crestas son más electrodensas y compactas. Por el contrario, en los fibroblastos de pulmones con FPI, las mitocondrias fueron escasas, adelgazadas y desordenadas, sus crestas fueron menos electrodensas y algunas se encontraron embebidas en autofagosomas (**Figura 19A**). Como se observa en el histograma de frecuencia, las mitocondrias de los fibroblastos de control tienen un tamaño de alrededor de 600 nm², mientras que las mitocondrias de pacientes con FPI tienen un tamaño mucho menor de alrededor de 250 nm² (**Figura 19B**). También evaluamos la elongación mitocondrial por la longitud de las mitocondrias encontradas, utilizando el analizador de imágenes ImageJ. Las mitocondrias de fibroblastos FPI exhibieron un alargamiento menor que las mitocondrias control (**Figura 19C**).

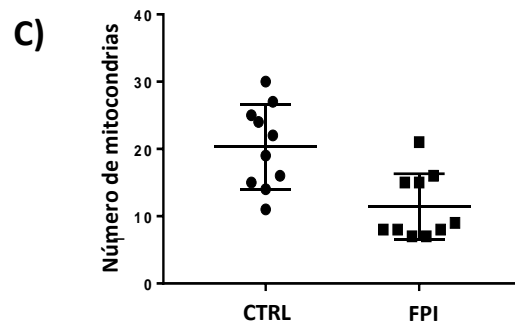
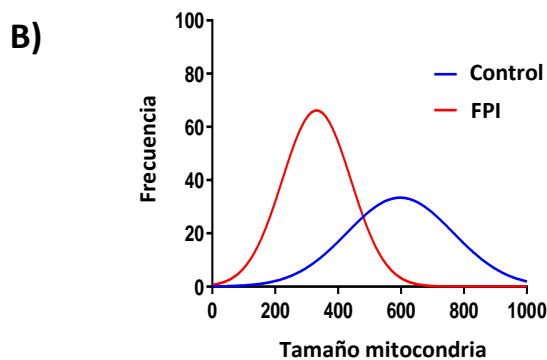
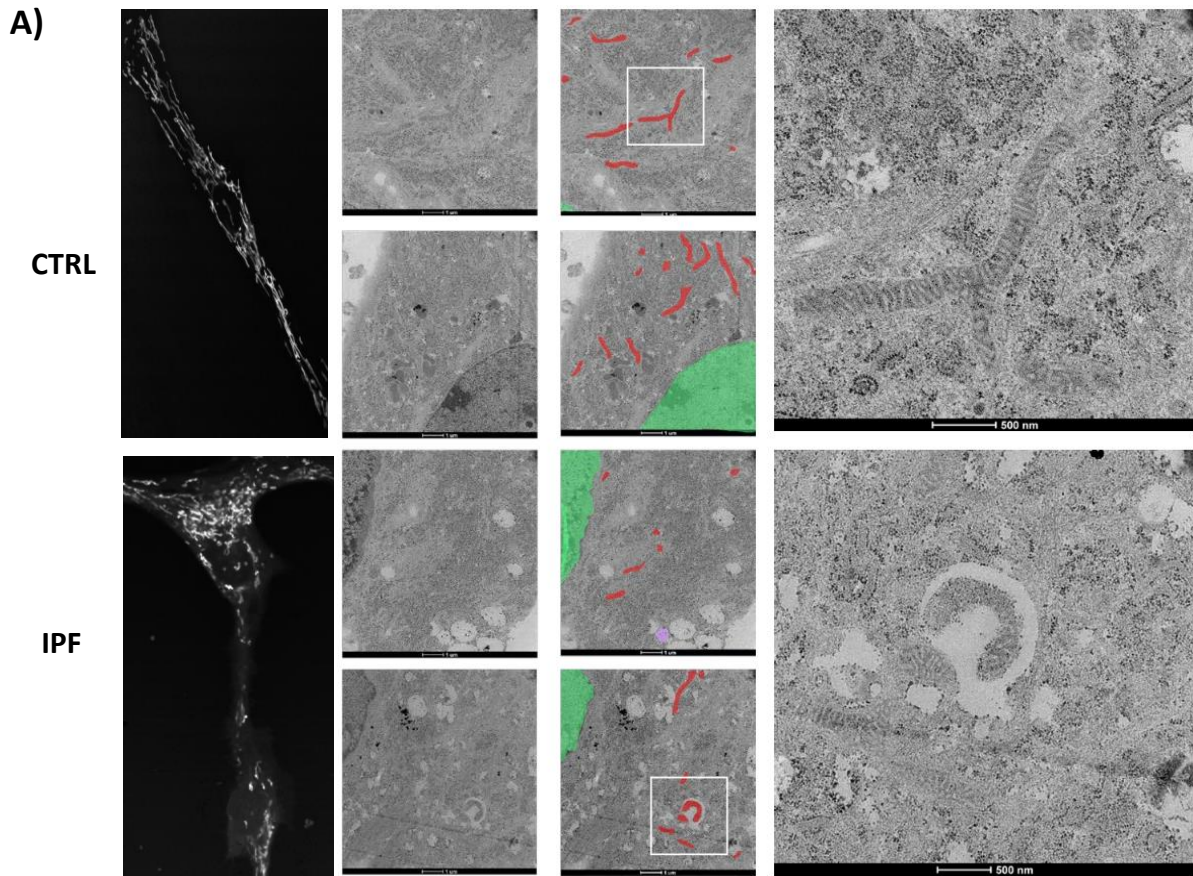


Figura 19. Número y morfología de las mitocondrias de fibroblastos pulmonares control y de pacientes con fibrosis pulmonar idiopática. A) Microscopía electrónica confocal y de transmisión (TEM) representativa de la morfología mitocondrial de fibroblastos control y de pacientes con FPI. En la imagen de TEM, se presentan dos aumentos diferentes de la misma célula y las mitocondrias están resaltadas en rojo. **B)** Histograma de frecuencia del tamaño de las mitocondrias (nm^2) $n > 100$, utilizando al menos cinco diferentes células por cada condición experimental CTRL ($n = 2$) y FPI ($n = 2$). **C)** Las imágenes se analizaron semiautomáticamente utilizando el software ImageJ. Se cuantificó la longitud de las mitocondrias por imagen; se midieron al menos 70 mitocondrias por condición.

Finalmente, para poder determinar si el número de mitocondrias es diferente entre los fibroblastos control y con FPI, teñimos a los fibroblastos con MitoTracker y realizamos un análisis en Z de la intensidad de fluorescencia media del MitoTracker en la célula completa. Para esta técnica, realizamos cortes a lo largo de toda la célula para evaluar de manera indirecta si había cambios en la masa mitocondrial total. Nuestros resultados no revelan ningún cambio significativo en la fluorescencia del marcador mitocondrial MitoTracker entre el control y los fibroblastos FPI, lo que sugiere que no hay diferencias significativas en el número de mitocondrias **(Figura 20 A y B)**. Además, en estudios previos se ha demostrado que no existen diferencias en la cantidad de ADN mitocondrial entre fibroblastos de pulmón normal y fibroblastos de FPI [20].

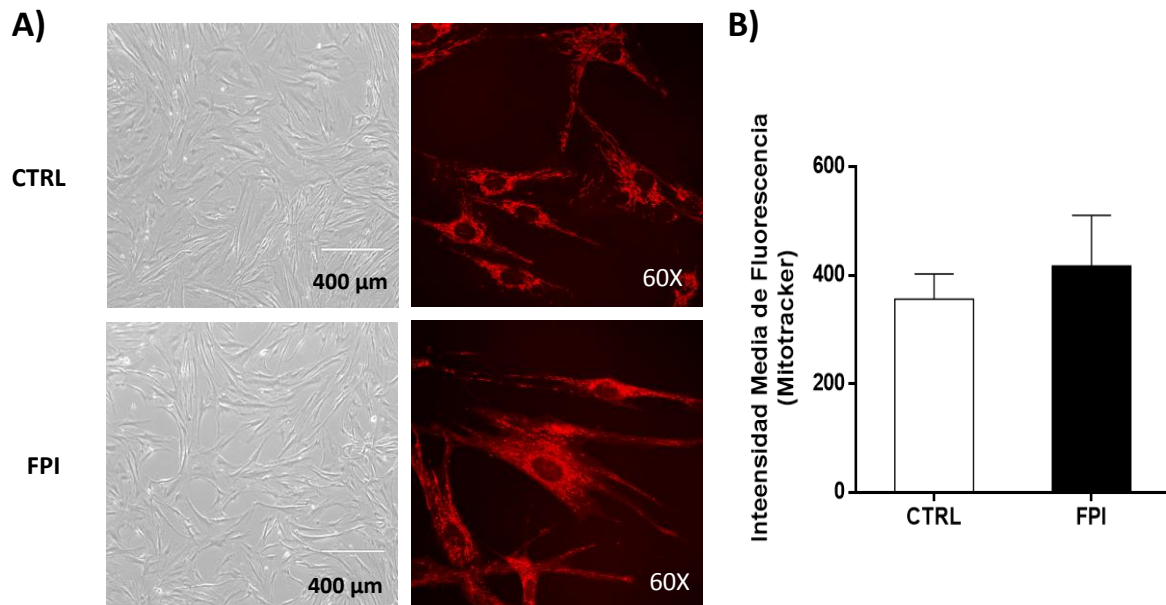


Figura 20. Los fibroblastos de pacientes con fibrosis pulmonar idiopática no presentan diferencias en la intensidad media de fluorescencia de MitoTracker en comparación con los fibroblastos control. A) Para determinar si los fibroblastos de FPI tenían diferencias en el número de mitocondrias en comparación con los fibroblastos control, realizamos un análisis de la intensidad media de fluorescencia de MitoTracker realizando un estudio en Z (cortes de toda la célula). B) Gráfica de la intensidad media de fluorescencia de Mitotracker. Los resultados se expresan como la media \pm SEM. Las diferencias se analizaron mediante una prueba t para datos no pareados, $*p < 0.05$ vs. el control. CTRL (n= 2) y FPI (n= 2).

7. DISCUSIÓN

Los fibroblastos/miofibroblastos desempeñan un papel crítico en el desarrollo y progresión de la fibrosis. En el caso de la FPI, existe evidencia que indica que los fibroblastos provenientes de pacientes con FPI son resistentes a la apoptosis [6-10]. Los mecanismos de esta resistencia se desconocen, pero algunos estudios sugieren la participación de la vía extrínseca de apoptosis mediada por Fas [9]. Sin embargo, hasta la fecha no existen estudios que indiquen el papel de la apoptosis por la vía intrínseca, el cual es mediado por la mitocondria. En este contexto, nuestro estudio demuestra que los fibroblastos de pacientes con FPI presentan resistencia a la apoptosis mitocondrial, caracterizada por la disminución de liberación de Cyt c, resistencia a la apertura del PTPm, disminución de la liberación de $[Ca^{2+}]_m$, disfunción mitocondrial y alteraciones en la red y morfología mitocondrial.

Recientemente, se ha descrito que la disfunción mitocondrial en fibroblastos de FPI podría estar asociada con la presencia y mantenimiento de un fenotipo senescente [81], pero su papel específico en la apoptosis de estas células es incierto.

La apoptosis intrínseca puede ser activada por diversos estímulos como son el estrés oxidante, hipoxia, daño al DNA, e incremento en las concentraciones de calcio intracelular, los cuales están implicados en la liberación de moléculas pro-apoptóticas mitocondriales tales como el Cyt c. Este proceso es crucial en la apoptosis mitocondrial y está relacionado con la apertura del PTPm.

Una vez en el citosol, el Cyt c activa la formación del apoptosoma, que es un complejo multiprotéico compuesto por Cyt c, Apaf-1 y ATP. Este complejo induce la activación de la caspasa 9, desencadenando la activación de las caspasas efectoras que provocan la muerte celular [82]. Por lo tanto, en el proceso fibrótico, la desregulación de la liberación de Cyt c puede resultar en la acumulación de fibroblastos resistentes a apoptosis, los cuales son los responsables del depósito excesivo de matriz extracelular con la consecuente alteración de la arquitectura pulmonar.

Los resultados de nuestro estudio indican que los fibroblastos de FPI presentan una marcada disminución en los niveles de Cyt c tanto en condiciones basales como después del estímulo con mitomicina C. En este contexto, es importante destacar que el Cyt c, además de ser una molécula de señalización crucial durante la apoptosis, también desempeña un papel esencial en la fosforilación oxidativa, ya que es el encargado de transferir electrones del complejo III al complejo IV en la cadena de transporte de electrones [83].

Una parte importante de Cyt c se encuentra asociada a la cardiolipina, la cual se encuentra embebida en las crestas mitocondriales, mientras que el Cyt c restante está libre en el espacio intermembranal. La liberación del Cyt c de las mitocondrias se lleva a cabo durante las primeras etapas de la apoptosis y requiere un proceso de dos pasos. En primer lugar, la solubilización del Cyt c, la cual se lleva a cabo por una ruptura de las fuerzas electrostáticas e hidrófobas que mantiene con la cardiolipina, la liberación de Cyt c en este caso se asocia a los estados de oxidación de cardiolipina y en segundo lugar, la transición de la permeabilidad mitocondrial, la cual induce la liberación directa de Cyt c al citosol [84]. Por tanto, los niveles bajos de Cyt c en condiciones basales observados en los fibroblastos de pacientes con FPI pueden estar relacionados con la disminución del consumo de oxígeno y la reducción de los niveles de ATP observados en estos fibroblastos. En este contexto, en varios estudios se ha descrito que la falta de Cyt c altera el ensamblaje y la estabilidad de los complejos respiratorios I y IV en los fibroblastos [85].

De manera interesante, se ha demostrado que los fibroblastos derivados de ratones deficientes en la isoforma somática del Cyt c son resistentes a la apoptosis que inducen diferentes agentes conocidos de desencadenar la vía apoptótica intrínseca y este efecto se asocia con defectos de la cadena respiratoria [86].

La vía de la apoptosis mitocondrial está regulada principalmente por cambios en la permeabilidad de su membrana. La permeabilización de la membrana externa mitocondrial es el último paso de las vías de transducción de señales apoptóticas, que convergen en las mitocondrias. En este contexto, el PTPm es uno de los sistemas representativos propuestos para este proceso porque es el responsable

de la permeabilización de la membrana mitocondrial externa. Aunque el concepto de PTPm todavía está evolucionando, evidencia creciente indica que el PTPm es directamente responsable de la liberación del Cyt c y por esta razón, se considera un regulador estratégico de la muerte celular [87].

La inducción de PTPm conduce a la despolarización de la membrana mitocondrial, inhibición de la síntesis de ATP, liberación de Ca^{2+} intracelular, inhibición de la cadena respiratoria, generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), inflamación mitocondrial y finalmente la ruptura de la membrana mitocondrial externa que conduce a la liberación de proteínas apoptogénicas mitocondriales como Cyt c, Smac/DIABLO, endonucleasa G y AIF. Por esta razón, los estudios sobre el PTPm están llamando de manera importante la atención de especialistas en diferentes áreas de la patología humana. Sin embargo, hasta la fecha la composición molecular exacta del PTPm se encuentra en controversia debido a la falta de conocimiento sobre las proteínas que lo forman [87].

La apertura de PTPm puede ser inducida por altas concentraciones de Ca^{2+} mitocondrial, estrés oxidativo, fosfato inorgánico y puede ser inhibida por ciclosporina A, nucleótidos de adenina, iones Mg^{2+} , pH ácido y agentes reductores [88]. El PTPm se ha implicado en diversas enfermedades, pero hasta la fecha, no se han realizado estudios en fibroblastos pulmonares de pacientes con FPI u otras enfermedades fibrosantes del pulmón. Nuestro estudio demuestra por primera vez que los fibroblastos de FPI son resistentes a la apertura de PTPm. Este hallazgo es intrigante, debido a que estudios previos han indicado una mayor producción de ROS basal en los fibroblastos de pacientes con FPI con respecto a los fibroblastos de pulmón sano [89], por lo que este incremento en la formación de ROS debería favorecer la formación del PTPm en los fibroblastos de pacientes con FPI, y no lo contrario como demostramos en nuestro estudio. Sin embargo, un efecto similar ha sido descrito en células cancerosas de algunos tumores. Norman *et al.*, 2010 demostraron que la inhibición de PTPm por CsA promueve el cáncer de piel en pacientes trasplantados al permitir la supervivencia de los queratinocitos en condiciones de estrés genotóxico, destacando el papel fundamental de la inhibición de PTPm en el desarrollo de tumores [90].

Por otro lado, se ha demostrado que diferentes factores pueden influir en la resistencia a la apertura de PTPm como son la disminución en la expresión de componentes proteicos que inducen su formación. Recientemente, se ha propuesto que las proteínas ANT, VDAC, CypD y la ATP sintasa son parte fundamental del PTPm [50,51].

Sin embargo, este concepto, en especial el papel de la ATP sintasa, ha sido cuestionado en estudios recientes, porque algunos autores demostraron que PTPm persiste en ausencia de varias subunidades de esta enzima [52,53]. En nuestro estudio analizamos los niveles de expresión de ATP sintasa y VDAC en lisados totales de fibroblastos y no encontramos diferencias significativas entre el grupo control y de FPI, lo que sugiere que los niveles de expresión de dichas proteínas, no influyeron en la inhibición de la apertura del PTPm. De manera interesante, cuando analizamos la expresión de la proteína ANT-1, encontramos una disminución marcada en los fibroblastos aislados de pacientes con FPI, lo que podría sugerir esta proteína participa en la inhibición del PTPm.

En apoyo a este hallazgo, estudios previos han encontrado que los fármacos que estabilizan la conformación de ANT en el citosol mejoran la apertura de mPTP, mientras que los que la estabilizan en la matriz inhiben su apertura. Cuando el ANT se estabiliza en la conformación citosólica por el compuesto atractilósido, se favorece la base estructural para la formación de PTPm al aumentar la sensibilidad a Ca^{2+} . Mientras que, por otro lado, el ácido bongkreico, un inhibidor de ANT que estabiliza la conformación de la matriz, inhibe la apertura de PTPm al disminuir la sensibilidad a Ca^{2+} [88]. Este efecto se observó en nuestro estudio al utilizar atractilósido o ácido bongkreico en los fibroblastos de pulmones sanos. Así, nosotros observamos un aumento de la tasa de apoptosis al estimular a los fibroblastos pulmonares con atractilósido y una disminución al utilizar ácido bongkreico.

Otros factores que influyen en la apertura del PTPm pueden estar relacionados con la interacción del Cyt c con los lípidos de la membrana mitocondrial interna o la capacidad de acumular calcio en la mitocondria, ya que se ha demostrado que el

calcio es un activador del PTPm. La reducción de la liberación de calcio mitocondrial induce la inhibición de PTPm y esta inhibición aumenta la acumulación de Ca^{2+} en las mitocondrias, estabiliza el potencial de la membrana mitocondrial y retrasa la desregulación de Ca^{2+} [60]. Además, se ha informado que los cambios en los niveles de expresión de las proteínas formadoras de los uniportadores de calcio mitocondrial (MUC), que permiten la entrada de calcio a la mitocondria, podrían estar implicadas en la regulación del PTPm [90].

Nuestros resultados sobre la cuantificación del calcio mitocondrial indican una marcada disminución en la liberación de calcio mitocondrial en fibroblastos de pacientes con FPI, lo que confirma que la actividad de PTPm se encuentra disminuida en estas células. Además, no observamos cambios en el potencial en la membrana mitocondrial de los fibroblastos de pacientes con FPI, lo que apoya el hallazgo de que el PTPm se encuentra inhibido en estas células.

Por otra parte, la apertura del PTPm también podría estimular el proceso de autofagia, favoreciendo la eliminación de mitocondrias anormales. La membrana mitocondrial externa recluta las proteínas de autofagia ATG5 y LC3, no solo para la mitofagia sino también para el anclaje y división de los lípidos necesarios para el alargamiento del fagóforo inicial [91]. En un estudio previo, de nuestro grupo de trabajo, se demostró que los fibroblastos de pacientes con FPI presentan una disminución de la autofagia causada por la activación del complejo 1 de rapamicina (mTORC1), lo que contribuye a la resistencia a la muerte celular [92]. Con los resultados obtenidos en el presente trabajo, podríamos inferir que la inhibición de la apertura del PTPm puede contribuir en la disminución de la autofagia en fibroblastos de FPI.

Como ya se mencionó, el estímulo de fibroblastos control con BKA inhibió la muerte celular inducida por mitomicina c, mientras la administración de ATR hizo que las células sean más susceptibles a la apoptosis. BKA previene la acidificación intracelular y es un ligando del ANT que puede inhibir la apoptosis. Estos resultados coinciden con lo informado por Liu *et al.*, 2008 quienes demostraron que la inhibición del PTPm por CsA y BKA afectaba la translocación de p53 en las mitocondrias, lo

que conducía a la protección contra la pérdida del potencial de la membrana mitocondrial y la actividad del complejo I, conduciendo a la supresión de la apoptosis [93].

Otro hallazgo importante de nuestro estudio fue que los fibroblastos de pacientes con FPI presentan disfunción mitocondrial, la cual fue evidenciada por la disminución en consumo de oxígeno y en la producción de ATP, aunque no observamos cambios significativos en la relación ADP/ATP ni en el potencial de la membrana mitocondrial. El hecho de que la relación ADP/ATP no se modifique sugiere que los fibroblastos de pacientes con FPI se adaptan para mantener una actividad mitocondrial mínima para poder suministrar suficiente ATP y mantener viva la célula con un potencial transmembranal basal, evitando la muerte celular a través de la vía intrínseca de la apoptosis.

Estos hallazgos concuerdan con los estudios descritos previamente por Álvarez *et al.*, 2017 quienes encontraron niveles bajos de ATP en fibroblastos senescentes provenientes de pacientes con FPI, los cuales se asociaron con una disminución del oxígeno respiratorio máximo, disminución de la capacidad glucolítica y anomalías en la fosforilación oxidativa [94].

Existe considerable evidencia que indica que la organización de la red mitocondrial está asociada directamente con la bioenergética y la generación de especies reactivas de oxígeno. En este sentido, nuestros resultados revelan que los fibroblastos de FPI exhibían una red mitocondrial fragmentada, con mitocondrias adelgazadas y desordenadas, que presentaron crestas poco electrodensas. Además, se encontró que las mitocondrias de FPI son menos alargadas que las mitocondrias de fibroblastos provenientes de pulmones sanos y algunas se encontraban en los autofagosomas.

La arquitectura de las crestas está determinada por las proteínas que las forman y que depende principalmente del estado dimérico de la ATP-sintasa. La formación de crestas mitocondriales aumenta la superficie mitocondrial, localizando un mayor número de complejos enzimáticos y mejorando la fosforilación oxidativa (OXPHOS) [95].

Las alteraciones en la respiración y los cambios en los niveles de ATP están asociadas con cambios en la morfología mitocondrial. Benard *et al.*, 2007 demostraron que el silenciamiento de la proteína DRP1 en células HeLa resulta en alteraciones morfológicas de la red mitocondrial. Este efecto se asoció con una disminución de la sensibilidad a inductores de apoptosis, la inhibición ATP y aparición de múltiples áreas de gemación, lo que sugirió una perturbación de la dinámica mitocondrial [96].

Nuestros resultados demuestran una reducción en la respiración acoplada y una disminución en la producción de ATP, esto fue asociado con alteraciones en la morfología mitocondrial. Estudios sobre el efecto de la inhibición de la fosforilación oxidativa (OXPHOS) sobre la organización de la red mitocondrial en fibroblastos humanos primarios sugieren que puede contribuir a estas anomalías. En general, una alta eficiencia en la OXPHOS se correlaciona con una red altamente interconectada, ramificada y crestas electrodensas, mientras que una baja actividad de la OXPHOS y elevada glucólisis se correlacionan con túbulos voluminosos, esféricos y mitocondrias que presentan un espacio intracrestas reducido [96].

Por otro lado, encontramos alteraciones en el complejo I y II de la cadena respiratoria en los fibroblastos de pacientes con FPI. Sin embargo, no podemos hacer conclusiones al respecto, debido a que no se analizó la actividad de este complejo. Por esta razón, proponemos que es necesario estudiar la formación y actividad de los complejos mitocondriales y respirasomas, debido a que existe evidencia de que el Cyt c puede influir en la función de la cadena respiratoria. La relación entre la función y la morfología mitocondrial ha generado una gran atención en los últimos años, y se ha verificado que existe una relación directa entre la estructura de las crestas y la cadena respiratoria.

Las mitocondrias son orgánulos muy complejos que controlan muchas funciones diversas que, en su conjunto, definen el destino de la célula, y la disfunción mitocondrial suele entenderse como un evento que conduce a la muerte celular. Sin embargo, encontramos que, por el contrario, la disfunción mitocondrial está asociada con la resistencia a la apoptosis en los fibroblastos de FPI, como ocurre

en las células cancerosas. Consecuentemente, el estudio a profundidad de los mecanismos a través de los cuales la disfunción mitocondrial conduce a la proliferación o muerte en diferentes patologías será útil para identificar nuevos blancos terapéuticos para la FPI, el cáncer u otras patologías.

La fibrosis tisular es probablemente un proceso adaptativo conservado evolutivamente y la fibrosis persistente casi siempre acompaña a una regeneración incompleta o fallida. Sin embargo, en el caso de la FPI, los mecanismos subyacentes que contribuyen a la persistencia de miofibroblastos y la acumulación continua de matriz extracelular en el parénquima pulmonar no han sido elucidados. Diferentes evidencias indican que uno de ellos es la evasión de la apoptosis, que generalmente ocurre durante la cicatrización fisiológica de heridas. Sin embargo, las vías moleculares que están involucradas en la resistencia a la apoptosis de miofibroblastos en tejidos fibróticos aún no están claras y pueden incluso involucrar diferentes mecanismos, incluyendo la participación de la vía extrínseca de la apoptosis, y como hemos demostrado en este estudio, de la vía intrínseca mediada por mitocondrias.

En este contexto, nuestros resultados apuntan a una importante contribución de la inhibición de la apertura de PTPm, dada su relevancia en la regulación de la muerte celular. Nuestros hallazgos revelaron que la apertura del PTPm es inhibida en los fibroblastos de FPI, y que el calcio, un activador bien establecido en la apertura del PTPm, se encuentra reducido en estos fibroblastos, lo cual también se asoció a una inhibición en la liberación de proteínas pro apoptóticas como el Cyt c. Consideramos que este hallazgo es relevante para comprender algunos de los mecanismos biopatológicos que participan en la resistencia a la apoptosis de los fibroblastos durante la fibrosis progresiva como en la FPI. Una mejor comprensión de la composición molecular del PTPm y los mecanismos de apoptosis mitocondrial proporcionará pistas para desarrollar estrategias terapéuticas eficaces y selectivas para el tratamiento de esta devastadora enfermedad.

8. CONCLUSION

En este estudio hemos demostrado que los fibroblastos/miofibroblastos pulmonares provenientes de pacientes con FPI presentan una resistencia a la apoptosis intrínseca, la cual fue asociada con una reducción en la liberación de Cyt c y con una reducción en la apertura del PTPm. Esta disminución en la apertura del PTPm puede estar relacionada con una disminución en los niveles de expresión de la proteína ANT-1, la cual participa directamente en la formación del PTPm o un decremento en los niveles de calcio mitocondrial. Es interesante destacar que los fibroblastos de FPI mantienen el potencial de membrana mitocondrial, a pesar de las alteraciones en la función mitocondrial, la cual fue evidenciada por una reducción en los parámetros respiratorios, disminución en los niveles de producción de ATP y cambios morfológicos mitocondriales. Estos resultados sugieren que los fibroblastos de pacientes con FPI se adaptan para mantener una actividad mitocondrial mínima para poder suministrar suficiente ATP y mantener viva la célula con un potencial transmembranal basal, evitando de esta manera la apoptosis celular. El conocimiento sobre los mecanismos de regulación del PTPm favorecerá la búsqueda de nuevos medicamentos mitocondriales para tratar una amplia gama de enfermedades caracterizadas por la desregulación del PTPm. En consecuencia, los moduladores selectivos del PTPm constituirán una herramienta terapéutica eficaz en el manejo de enfermedades relacionadas en la prevención y/o promoción de su formación.

9. PERSPECTIVAS

Debido a que en el presente estudio encontramos que las mitocondrias de los fibroblastos pulmonares de pacientes con FPI presentan una disminución en la liberación de calcio mitocondrial, proponemos el estudio de la proteína uniportadora de calcio mitocondrial (MICU1), debido a que se ha demostrado que el silenciamiento esta proteína disminuye el nivel de calcio necesario para activar la captación de calcio mitocondrial, por lo que podría estar implicada en la regulación

del PTPm. Por esta razón sería importante analizar su expresión en fibroblastos de pacientes sanos y con FPI.

Otra perspectiva es analizar la participación de otras proteínas que recientemente han mostrado modular al PTPm a través de la regulación de la concentración de Ca^{2+} mitocondrial, como la proteasa paraplejía espástica 7 (SPG7), la cual ha sido implicada como un componente regulador del PTPm, debido a que se ha reportado que la pérdida del gen SPG7 aumenta la resistencia a la apertura del PTPm inducida por Ca^{2+} .

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Raghu G, Collard HR, Egan JJ, Martinez FJ, Behr J, Brown KK, Colby TV, Cordier JF, Flaherty KR, Lasky JA, Lynch DA, Ryu JH, Swigris JJ, Wells AU, Ancochea J, Bouros D, Carvalho C, Costabel U, Ebina M, Hansell DM, Johkoh T, Kim DS, King TE Jr, Kondoh Y, Myers J, Müller NL, Nicholson AG, Richeldi L, Selman M, Dudden RF, Griss BS, Protzko SL, Schönemann HJ. (2011). An official ATS/ERS/JRS/ALAT statement: idiopathic pulmonary fibrosis: evidence-based guidelines for diagnosis and management. *Am J Respir Crit Care Med.*183: 788-824.
2. King TE Jr, Pardo A, Selman M. (2011). Idiopathic pulmonary fibrosis. *Lancet.* 378: 1949-1961.
3. Martinez FJ, Collard HR, Pardo A, Raghu G, Richeldi L, Selman M, Swigris JJ, Taniguchi H, Wells AU. (2017). Idiopathic pulmonary fibrosis. *Nat Rev Dis Primers.* 17074: 1-19.
4. Ley B, Collard HR, King TE Jr. (2011). Clinical course and prediction of survival in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 183 :431-440.
5. Raghu G, Weycker D, Edelsberg J, Bradford WZ, Oster G. (2006). Incidence and prevalence of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 174: 810-816.
6. Wynes MW, Edelman BL, Kostyk AG, Edwards MG, Coldren C, Groshong SD, Cosgrove GP, Redente EF, Bamberg A, Brown KK, Reisdorph N, Keith RC, Frankel SK, Riches DW (2011). Increased cell surface Fas expression is necessary and sufficient to sensitize lung fibroblasts to Fas ligation-induced apoptosis: implications for fibroblast accumulation in idiopathic pulmonary fibrosis. *J Immunol.* 187(1):527-537.
7. Sisson TH, Maher TM, Ajayi IO, King JE, Higgins PD, Booth AJ, Sagana RL, Huang SK, White ES, Moore BB, Horowitz JC (2012). Increased survivin expression contributes to apoptosis-resistance in IPF fibroblasts. *Adv Biosci Biotechnol.* 3(6A): 657-664.

8. Ajayi IO, Sisson TH, Higgins PD, Booth AJ, Sagana RL, Huang SK, White ES, King JE, Moore BB, Horowitz JC (2013). X-linked inhibitor of apoptosis regulates lung fibroblast resistance to Fas-mediated apoptosis. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 49(1): 86-95.
9. Tanaka T, Yoshimi M, Maeyama T, Hagimoto N, Kuwano K, Hara N (2002). Resistance to Fas-mediated apoptosis in human lung fibroblast. *Eur Respir J.* 20(2): 359-368.
10. Predescu SA, Zhang J, Bardita C, Patel M, Godbole V, Predescu DN (2017). Mouse Lung Fibroblast Resistance to Fas-Mediated Apoptosis Is Dependent on the Baculoviral Inhibitor of Apoptosis Protein 4 and the Cellular FLICE-Inhibitory Protein. *Front Physiol.* 14; 8: 128.
11. Ashley SL, Sisson TH, Wheaton AK, Kim KK, Wilke CA, Ajayi IO, Subbotina N, Wang S, Duckett CS, Moore BB, Horowitz JC (2016). Targeting Inhibitor of Apoptosis Proteins Protects from Bleomycin-Induced Lung Fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 54(4):482-92.
12. Jablonski RP, Kim SJ, Cheresch P, Williams DB, Morales-Nebreda L, Cheng Y, Yeldandi A, Bhorade S, Pardo A, Selman M, Ridge K, Gius D, Budinger GRS, Kamp DW. (2017). SIRT3 deficiency promotes lung fibrosis by augmenting alveolar epithelial cell mitochondrial DNA damage and apoptosis. *FASEB J.* 31(6):2520-2532.
13. Bueno M, Lai YC, Romero Y, Brands J, St Croix CM, Kamga C, Corey C, Herazo-Maya JD, Sembrat J, Lee JS, Duncan SR, Rojas M, Shiva S, Chu CT, Mora AL. (2015). PINK1 deficiency impairs mitochondrial homeostasis and promotes lung fibrosis. *J Clin Invest.* 125(2): 521-538.
14. Patel AS, Song JW, Chu SG, Mizumura K, Osorio JC, Shi Y, El-Chemaly S, Lee CG, Rosas IO, Elias JA, Choi AM, Morse D. (2015). Epithelial cell mitochondrial dysfunction and PINK1 are induced by transforming growth factor-beta1 in pulmonary fibrosis. *PLoS One.* Mar 18;10(3): e0121246.
15. Darby IA, Zakuan N, Billet F, Desmoulière A. (2016). The myofibroblast, a key cell in normal and pathological tissue repair. *Cell Mol. Life Sci.* 73:1145–1157.
16. Thannickal VJ, Horowitz JC (2006). Evolving concepts of apoptosis in Idiopathic pulmonary fibrosis. *Proc Am Thorac Soc.* 3(4): 350-356.

17. Jeong SY, Seol DW. (2008). The role of mitochondria in apoptosis. *BMB Rep.* 41(1): 11-22.
18. Wallace DC, Fan W, Procaccio V (2010). Mitochondrial energetics and therapeutics. *Annu Rev Pathol* 5:297-348.
19. Youle RJ, Van der Bliek AM (2012). Mitochondrial fission, fusion, and stress. *Science.* 337(6098):1062-1055.
20. De Pinto VD, Palmieri F. (1992). Transmembrane arrangement of mitochondrial porin or voltage-dependent anion channel (VDAC). *J Bioenerg Biomembr.* 24(1): 21-26.
21. Ellenrieder L, Martensson CU, Becker T. (2015). Biogenesis of mitochondrial outer membrane proteins, problems and diseases. *Biological chemistry,* 396(11), 1199–1213.
22. Palmieri F. (2013). The mitochondrial transporter family SLC25: identification, properties and physiopathology. *Mol Aspects Med.* 34(2-3): 465-484.
23. Schmidt O, Pfanner N, Meisinger C. (2010). Mitochondrial protein import: from proteomics to functional mechanisms. *Nature reviews. Molecular cell biology,* 11(9), 655–667.
24. Edwards R, Eaglesfield R, Tokatlidis K. (2021). The mitochondrial intermembrane space: the most constricted mitochondrial sub-compartment with the largest variety of protein import pathways. *Open Biol.*11(3): 210002.
25. Rich PR, Maréchal A. (2010). The mitochondrial respiratory chain. *Essays Biochem.* 47: 1-23.
26. Metzler D. (2003). *Biochemistry: The Chemical Reactions of Living Cells.* 2a. ed. Academic Press, Massachusetts, USA. Pág. 1013-1057.
27. Andreyev AY, Kushnareva YE, Starkov AA. (2005). Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry (Mosc).* 70(2): 200-214.
28. Kühlbrandt W. (2019). Structure and Mechanisms of F-Type ATP Synthases. *Annu Rev Biochem.* 88: 515-549.

29. Davies, K. M., Anselmi, C., Wittig, I., Faraldo-Gómez, J. D. & Kühlbrandt, W. (2012). Structure of the yeast F₁F_o-ATP synthase dimer and its role in shaping the mitochondrial cristae. *Proc. Natl Acad. Sci.* 109: 13602–13607.
30. Paumard P, Vaillier J, Couлары B, Schaeffer J, Soubannier V, Mueller DM, Brèthes D, di Rago JP, Velours J. (2002). The ATP synthase is involved in generating mitochondrial cristae morphology. *EMBO J.* 21(3): 221-230.
31. Terada H. (1990). Uncouplers of oxidative phosphorylation. *Environ Health Perspect.* 87: 213-218.
32. Brand MD, Nicholls DG. (2011). Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochem J.* 435(2): 297-312.
33. Divakaruni AS, Rogers GW, Murphy AN. (2014). Measuring Mitochondrial Function in Permeabilized Cells Using the Seahorse XF Analyzer or a Clark-Type Oxygen Electrode. *Curr Protoc Toxicol.* 60: 1-16.
34. Nicholls, D. G., Palmeira, C. M., & Moreno, A. J. (2012). Mitochondrial Bioenergetics: Methods and Protocols. Chapter 3. 25-58.
35. Jang DH, Shofer FS, Weiss SL, Becker LB. (2016). Impairment of mitochondrial respiration following ex vivo cyanide exposure in peripheral blood mononuclear cells. *Clin Toxicol.* 54(4): 303-307.
36. Moreno-Sánchez R, Hernández-Esquivel L, Rivero-Segura NA, Marín-Hernández A, Neuzil J, Ralph SJ, Rodríguez-Enríquez S. (2013). Reactive oxygen species are generated by the respiratory complex II--evidence for lack of contribution of the reverse electron flow in complex I. *FEBS J.* 280: 927-938.
37. Schug ZT, Gottlieb E (2009). Cardiolipin acts as a mitochondrial signalling platform to launch apoptosis. *Biochim Biophys Acta.* 1788 (10): 2022-2031.
38. Galluzzi, L.; Zamzami, N.; de La Motte Rouge, T.; Lemaire, C.; Brenner, C.; Kroemer, G. (2007). Methods for the assessment of mitochondrial membrane permeabilization in apoptosis. *Apoptosis*, 12, 803–813.
39. Daugas E, Susin SA, Zamzami N, Ferri KF, Irinopoulou T, Larochette N, Prévost MC, Leber B, Andrews D, Penninger J, Kroemer G. (2000) Mitochondrio-nuclear translocation of AIF in apoptosis and necrosis. *FASEB J.* Apr;14(5): 729-739.

40. Li LY, Luo X, Wang X (2001) Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* 412: 95–99.
41. Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. (2000). Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*. Jul 7;102(1):33-42.
42. Campbell C, Gross A, Leber B, Andrews DW, Fradin C. (2013). tBid undergoes multiple conformational changes at the membrane required for Bax activation. *J Biol Chem*. Jul 26;288(30):22111-27.
43. Tsujimoto Y, Shimizu S. (2007). Role of the mitochondrial membrane permeability transition in cell death. *Apoptosis*.12(5): 835-840.
44. Estaquier J, Vallette F, Vayssiere JL, Mignotte B. (2012). The mitochondrial pathways of apoptosis. *Adv Exp Med Biol*. 942:157-183.
45. Uren RT, Iyer S, Kluck RM. (2017). Pore formation by dimeric Bak and Bax: an unusual pore? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 372(1726): 20160218.
46. Crompton M. (1999). The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J*. 341: 233-249.
47. Bücheler K, Adams V, Brdiczka D. (1991). Localization of the ATP/ADP translocator in the inner membrane and regulation of contact sites between mitochondrial envelope membranes by ADP. A study on freeze-fractured isolated liver mitochondria. *Biochim Biophys Acta*.1056(3): 233-242.
48. Bonora M, Pinton P. (2014). The mitochondrial permeability transition pore and cancer: molecular mechanisms involved in cell death. *Front Oncol*. 17(4): 302.
49. Giorgio V, von Stockum S, Antoniel M, Fabbro A, Fogolari F, Forte M, Glick GD, Petronilli V, Zoratti M, Szabó I, Lippe G, Bernardi P. (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.

50. Urbani A, Giorgio V, Carrer A, Franchin C, Arrigoni G, Jiko C, Abe K, Maeda S, Shinzawa-Itoh K, Bogers JFM, McMillan DGG, Gerle C, Szabò I, Bernardi P. (2019). Purified F-ATP synthase forms a Ca²⁺-dependent high-conductance channel matching the mitochondrial permeability transition pore. *Nat Commun.* 10(1): 4341.
51. Pinke G, Zhou L, Sazanov LA. (2020). Cryo-EM structure of the entire mammalian F-type ATP synthase. *Nat Struct Mol Biol.* 27(11): 1077-1085.
52. He J, Carroll J, Ding S, Fearnley IM, Walker JE. (2017). Permeability transition in human mitochondria persists in the absence of peripheral stalk subunits of ATP synthase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 114(34): 9086-9091.
53. Carroll J, He J, Ding S, Fearnley IM, Walker JE. (2019). Persistence of the permeability transition pore in human mitochondria devoid of an assembled ATP synthase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 116(26): 12816-12821.
54. Rasola A, Bernardi P. (2011). Mitochondrial permeability transition in Ca²⁺-dependent apoptosis and necrosis. *Cell Calcium.* 50: 222–233.
55. Petronilli V, Miotto G, Canton M, Brini M, Colonna R, Bernardi P, Di Lisa F. (1999). Transient and long-lasting openings of the mitochondrial permeability transition pore can be monitored directly in intact cells by changes in mitochondrial calcein fluorescence. *Biophys J.* 76(2): 725-734.
56. Karch J, Bround MJ, Khalil H, Sargent MA, Latchman N, Terada N, Peixoto PM, Molkenin JD. (2019). Inhibition of mitochondrial permeability transition by deletion of the ANT family and CypD. *Sci Adv.* 5(8): eaaw4597.
57. Block MR, Lauguin GJ, Vignais PV. (1981). Atractyloside and bongkreikic acid sites in the mitochondrial ADP/ATP carrier protein. An appraisal of their unicity by chemical modifications. *FEBS Lett.* 131(2): 213-218.
58. Allouche M, Pertuiset C, Robert JL, Martel C, Veneziano R, Henry C, dein OS, Saint N, Brenner C, Chopineau J. (2012). ANT-VDAC1 interaction is direct and depends on ANT isoform conformation *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun.* 429(1-2): 12-17.

59. Bernardi P, Carraro M, Lippe G. (2022). The mitochondrial permeability transition: Recent progress and open questions. *The FEBS journal*, 289(22), 7051–7074.
60. De Marchi E, Bonora M, Giorgi C, Pinton P. (2014). The mitochondrial permeability transition pore is a dispensable element for mitochondrial calcium efflux. *Cell Calcium*. 56(1): 1-13.
61. De Stefani D, Raffaello A, Teardo E, Szabò I, Rizzuto R. (2011). A forty-kilodalton protein of the inner membrane is the mitochondrial calcium uniporter. *Nature*. 476(7360): 336-340.
62. Palty R, Silverman WF, Hershfinkel M, Caporale T, Sensi SL, Parnis J, Nolte C, Fishman D, Shoshan-Barmatz V, Herrmann S, Khananshvil D, Sekler I. (2010). NCLX is an essential component of mitochondrial Na⁺/Ca²⁺ exchange. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107(1): 436-441.
63. Bernardi P, Petronilli V. (1996). The permeability transition pore as a mitochondrial calcium release channel: a critical appraisal. *J Bioenerg Biomembr*. 28(2):131-138.
64. Hajnóczky G, Csordás G, Das S, Garcia-Perez, C, Saotome, M, Sinha Roy S, Yi M. (2006). Mitochondrial calcium signalling and cell death: approaches for assessing the role of mitochondrial Ca²⁺ uptake in apoptosis. *Cell calcium*, 40(5-6), 553–560.
65. Chalmers S, Nicholls DG. (2003). The relationship between free and total calcium concentrations in the matrix of liver and brain mitochondria. *J Biol Chem*. 278(21): 19062-19070.
66. Pan X, Liu J, Nguyen T, Liu C, Sun J, Teng Y, Fergusson MM, Rovira II, Allen M, Springer DA, Aponte AM, Gucek M, Balaban RS, Murphy E, Finkel T. (2013). The physiological role of mitochondrial calcium revealed by mice lacking the mitochondrial calcium uniporter. *Nat Cell Biol*. Dec;15(12): 1464-1472.
67. Rasmussen TP, Wu Y, Joiner ML, Koval OM, Wilson NR, Luczak ED, Wang Q, Chen B, Gao Z, Zhu Z, Wagner BA, Soto J, McCormick ML, Kutschke W, Weiss RM, Yu L, Boudreau RL, Abel ED, Zhan F, Spitz DR, Buettner GR, Song LS, Zingman LV, Anderson^o ME. (2015). Inhibition of MCU forces

extramitochondrial adaptations governing physiological and pathological stress responses in heart. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 112(29): 9129-9134.

68. Nesci S. (2020). The mitochondrial permeability transition pore in cell death: A promising drug binding bioarchitecture. *Med Res Rev.* 40(2): 811-817.
69. Kalani K, Yan SF, Yan SS. (2018). Mitochondrial permeability transition pore: a potential drug target for neurodegeneration. *Drug Discov Today.* 23(12): 1983-1989.
70. Du H and Yan SS (2010) Mitochondrial permeability transition pore in Alzheimer's disease: cyclophilin D and amyloid beta. *Biochim. Biophys. Acta* 1802, 198–204.
71. Du H, Guo L, Fang F, Chen D, Sosunov AA, McKhann GM, Yan Y, Wang C, Zhang H, Molkentin JD, Gunn-Moore FJ, Vonsattel JP, Arancio O, Chen JX, Yan SD. (2008). Cyclophilin D deficiency attenuates mitochondrial and neuronal perturbation and ameliorates learning and memory in Alzheimer's disease. *Nat Med.* 14(10):1097-1105.
72. Berman SB, Hastings TG. (1999) Dopamine oxidation alters mitochondrial respiration and induces permeability transition in brain mitochondria: implications for Parkinson's disease. *J Neurochem.* 73(3): 1127-1137.
73. Norman KG, Canter JA, Shi M, Milne GL, Morrow JD, Sligh JE (2010). Cyclosporine A suppresses keratinocyte cell death through MPTP inhibition in a model for skin cancer in organ transplant recipients. *Mitochondrion.* 10(2): 94-101.
74. Ruiz-Ramírez A, Barrios-Maya MA, López-Acosta O, Molina-Ortiz D, El-Hafidi M. (2015). Cytochrome c release from rat liver mitochondria is compromised by increased saturated cardiolipin species induced by sucrose feeding. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 309(9): E777-E786.
75. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. (1985). A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem.* 260(6): 3440-3450.
76. Kajita J, Yamaguchi H. (1993) Calcium mobilization by muscarinic cholinergic stimulation in bovine single airway smooth muscle. *Am J Physiol.* 264(5 Pt 1): L496-L503.

77. Doerrier C, Garcia-Souza LF, Krumschnabel G, Wohlfarter Y, Mészáros AT, Gnaiger E. (2018). High-Resolution FluoRespirometry and OXPHOS Protocols for Human Cells, Permeabilized Fibers from Small Biopsies of Muscle, and Isolated Mitochondria. *Methods Mol Biol.* 1782: 31-70.
78. Kuznetsov AV, Veksler V, Gellerich FN, Saks V, Margreiter R, Kunz WS. (2008). Analysis of mitochondrial function *in situ* in permeabilized muscle fibers, tissues and cells. *Nat Protoc.* 3(6): 965-976.
79. Yan C, Kong D, Ge D, Zhang Y, Zhang X, Su C, Cao X. (2015). Mitomycin C induces apoptosis in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes via a mitochondrial-mediated pathway. *Cell Physiol Biochem.* 35(3): 1125-1136.
80. Sun Y, Ge Y, Fu Y, Yan L, Cai J, Shi K, Cao X, Lu C. (2015). Mitomycin C induces fibroblasts apoptosis and reduces epidural fibrosis by regulating miR-200b and its targeting of RhoE. *Eur J Pharmacol.* 765: 198-208.
81. Schuliga M, Pechkovsky DV, Read J, Waters DW, Blokland KEC, Reid AT, Hogaboam CM, Khalil N, Burgess JK, Prêle CM, Mutsaers SE, Jaffar J, Westall G, Grainge C, Knight DA. (2018). Mitochondrial dysfunction contributes to the senescent phenotype of IPF lung fibroblasts. *J Cell Mol Med.* 22(12): 5847-5861.
82. Cavalcante GC, Schaan AP, Cabral GF, Santana-da-Silva MN, Pinto P, Vidal AF, Ribeiro-Dos-Santos Â. (2019). A Cell's Fate: An Overview of the Molecular Biology and Genetics of Apoptosis. *Int J Mol Sci.* 20(17): 4133.
83. Schug ZT, Gottlieb E. (2009). Cardiolipin acts as a mitochondrial signalling platform to launch apoptosis. *Biochim Biophys Acta.* 1788(10): 2022-2031.
84. Ott M, Robertson JD, Gogvadze V, Zhivotovsky B, Orrenius S. (2002). Cytochrome c release from mitochondria proceeds by a two-step process. *Proc Natl Acad Sci USA.* 99(3):1259-1263.
85. Vempati UD, Han X, Moraes CT. (2009). Lack of cytochrome c in mouse fibroblasts disrupts assembly/stability of respiratory complexes I and IV. *J Biol Chem.* 284(7): 4383-4391.

86. Vempati UD, Diaz F, Barrientos A, Narisawa S, Mian AM, Millán JL, Boise LH, Moraes CT. (2007). Role of cytochrome C in apoptosis: increased sensitivity to tumor necrosis factor alpha is associated with respiratory defects but not with lack of cytochrome C release. *Mol Cell Biol.* 27(5): 1771-1783.
87. Petronilli V, Penzo D, Scorrano L, Bernardi P, Di Lisa F. (2001). The mitochondrial permeability transition, release of cytochrome c and cell death. Correlation with the duration of pore openings in situ. *The Journal of biological chemistry*, 276(15), 12030–12034.
88. Bauer TM, Murphy E. (2020). Role of Mitochondrial Calcium and the Permeability Transition Pore in Regulating Cell Death. *Circ Res.* 126(2): 280-293.
89. Bocchino M, Agnese S, Fagone E, Svegliati S, Grieco D, Vancheri C, Gabrielli A, Sanduzzi A, Avvedimento EV. (2010). Reactive oxygen species are required for maintenance and differentiation of primary lung fibroblasts in idiopathic pulmonary fibrosis. *PLoS One.* 5(11): e14003.
90. Parks RJ, Menazza S, Holmström KM, Amanakis G, Fergusson M, Ma H, Aponte AM, Bernardi P, Finkel T, Murphy E. (2019). Cyclophilin D-mediated regulation of the permeability transition pore is altered in mice lacking the mitochondrial calcium uniporter. *Cardiovasc Res.* 115(2): 385-394.
91. Ghavami S, Shojaei S, Yeganeh B, Ande SR, Jangamreddy JR, Mehrpour M, Christofferson J, Chaabane W, Moghadam AR, Kashani HH, Hashemi M, Owji AA, Łos MJ. (2014). Autophagy and apoptosis dysfunction in neurodegenerative disorders. *Prog Neurobiol.* 112: 24-49.
92. Romero Y, Bueno M, Ramirez R, Álvarez D, Sembrat JC, Goncharova EA, Rojas M, Selman M, Mora AL, Pardo A. (2016). mTORC1 activation decreases autophagy in aging and idiopathic pulmonary fibrosis and contributes to apoptosis resistance in IPF fibroblasts. *Aging Cell.* 15(6): 1103-1112.
93. Liu J, St Clair DK, Gu X, Zhao Y. (2008). Blocking mitochondrial permeability transition prevents p53 mitochondrial translocation during skin tumor promotion. *FEBS Lett.* 582(9): 1319-1324.

94. Álvarez D, Cárdenes N, Sellarés J, Bueno M, Corey C, Hanumanthu VS, Peng Y, D'Cunha H, Sembrat J, Nouraie M, Shanker S, Caufield C, Shiva S, Armanios M, Mora AL, Rojas M. (2017). IPF lung fibroblasts have a senescent phenotype. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 313(6): L1164-L1173.
95. Paumard P, Vaillier J, Couлары B, Schaeffer J, Soubannier V, Mueller DM, Brèthes D, di Rago JP, Velours J. (2002). The ATP synthase is involved in generating mitochondrial cristae morphology. *EMBO J.* 21(3): 221-230.
96. Benard G, Bellance N, James D, Parrone P, Fernandez H, Letellier T, Rossignol R. (2007). Mitochondrial bioenergetics and structural network organization. *J Cell Sci.*120(Pt 5): 838-848.



Article

Mitochondrial Dysfunction and Alterations in Mitochondrial Permeability Transition Pore (mPTP) Contribute to Apoptosis Resistance in Idiopathic Pulmonary Fibrosis Fibroblasts

Erika Rubí Luis-García ¹, Carina Becerril ¹, Alfonso Salgado-Aguayo ², Omar Emiliano Aparicio-Trejo ³ , Yair Romero ⁴ , Edgar Flores-Soto ⁵ , Criselda Mendoza-Milla ¹ , Martha Montaña ¹ , Victoria Chagoya ⁶, José Pedraza-Chaverri ³ , Mohammed El Hafidi ⁷, Marisol Orozco-Ibarra ⁸ , Annie Pardo ⁴ and Moisés Selman ^{1,*}



Citation: Luis-García, E.R.; Becerril, C.; Salgado-Aguayo, A.; Aparicio-Trejo, O.E.; Romero, Y.; Flores-Soto, E.; Mendoza-Milla, C.; Montaña, M.; Chagoya, V.; Pedraza-Chaverri, J.; et al. Mitochondrial Dysfunction and Alterations in Mitochondrial Permeability Transition Pore (mPTP) Contribute to Apoptosis Resistance in Idiopathic Pulmonary Fibrosis Fibroblasts. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 7870. <https://doi.org/10.3390/ijms22157870>

Academic Editor: Paola Perego

Received: 3 June 2021

Accepted: 17 July 2021

Published: 23 July 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

- ¹ Laboratorio de Biología Celular, Departamento de Fibrosis Pulmonar, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas”, Ciudad de México 14080, Mexico; erikarubi.84@gmail.com (E.R.L.-G.); lcb66@hotmail.com (C.B.); criselda.mendoza@gmail.com (C.M.-M.); mamora572002@yahoo.com.mx (M.M.)
 - ² Laboratorio de Investigación en Enfermedades Reumáticas, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas”, Ciudad de México 14080, Mexico; alfonso.salgado@iner.gob.mx
 - ³ Departamento de Biología, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México 04510, Mexico; emilianoaparicio91@gmail.com (O.E.A.-T.); pedraza@unam.mx (J.P.-C.)
 - ⁴ Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México 04510, Mexico; yair12@hotmail.com (Y.R.); apardos@unam.mx (A.P.)
 - ⁵ Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México 04510, Mexico; edgarfloressoto@yahoo.com.mx
 - ⁶ Departamento de Biología Celular y Desarrollo, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México 04510, Mexico; vchagoya@ifc.unam.mx
 - ⁷ Departamento de Biomedicina Cardiovascular, Instituto Nacional de Cardiología, Ignacio Chávez, Juan Badiano 1, Belisario Domínguez Secc 16, Tlalpan, Ciudad de México 14080, Mexico; medelhafidi@yahoo.com
 - ⁸ Laboratorio de Neurobiología Molecular y Celular, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, Manuel Velasco Suárez, Av. Insurgentes Sur 3877, Colonia La Fama, Alcaldía Tlalpan, Ciudad de México 14269, Mexico; marisol.orozco.ibarra@gmail.com
- * Correspondence: mselman1@yahoo.com.mx; Tel.: +55-5-487-1700

Abstract: Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is a devastating disease characterized by increased activation of fibroblasts/myofibroblasts. Previous reports have shown that IPF fibroblasts are resistant to apoptosis, but the mechanisms remain unclear. Since inhibition of the mitochondrial permeability transition pore (mPTP) has been implicated in the resistance to apoptosis, in this study, we analyzed the role of mitochondrial function and the mPTP on the apoptosis resistance of IPF fibroblasts under basal conditions and after mitomycin C-induced apoptosis. We measured the release of cytochrome c, mPTP opening, mitochondrial calcium release, oxygen consumption, mitochondrial membrane potential, ADP/ATP ratio, ATP concentration, and mitochondrial morphology. We found that IPF fibroblasts were resistant to mitomycin C-induced apoptosis and that calcium, a well-established activator of mPTP, is decreased as well as the release of pro-apoptotic proteins such as cytochrome c. Likewise, IPF fibroblasts showed decreased mitochondrial function, while mPTP was less sensitive to ionomycin-induced opening. Although IPF fibroblasts did not present changes in the mitochondrial membrane potential, we found a fragmented mitochondrial network with scarce, thinned, and disordered mitochondria with reduced ATP levels. Our findings demonstrate that IPF fibroblasts are resistant to mitomycin C-induced apoptosis and that altered mPTP opening contributes to this resistance. In addition, IPF fibroblasts show mitochondrial dysfunction evidenced by a decrease in respiratory parameters.

Keywords: electron transport chain; IPF; mitochondrial dysfunction; mitochondrial networks; myofibroblasts

1. Introduction

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is an aging-associated, progressive, and irreversible disease of unknown etiology. Currently, therapeutic options remain limited, and there is no efficient treatment to improve expectancy and quality of life [1,2]. Furthermore, the pathogenic mechanisms have not been fully elucidated. However, strong evidence suggests that IPF begins with micro-lesions and activation of the alveolar epithelium, which secretes various mediators that induce migration, proliferation, and activation of fibroblasts that produce excessive extracellular matrix amounts with progressive destruction of the lung parenchyma [3,4]. An intriguing aspect of the pathogenesis of IPF is the resistance shown by fibroblasts and myofibroblasts to apoptosis, while on the contrary, alveolar epithelial cells are very susceptible to this process [3–5]. The mechanisms of this paradoxical behavior are uncertain, but in the case of epithelial cells, their susceptibility has been attributed, at least partially, to mitochondrial dysfunction [5].

Fibroblasts and myofibroblasts are the critical effector cells in tissue fibrosis due to their participation in elaborating the extracellular matrix and contraction mechanisms and remodeling of damaged tissue [6]. During physiological regeneration, fibroblasts are eliminated by apoptosis, and evasion or resistance to this process has been associated with progressive fibrosis. In this context, it has been reported that fibroblasts and myofibroblasts from patients with IPF are resistant to apoptosis, although the molecular mechanisms involved are uncertain [7–10]. Due to the central role that mitochondria play in the implementation, amplification, and regulation of cellular apoptosis, this organelle would be involved in the apoptosis resistance of IPF fibroblasts, but this has not yet been studied in depth.

Mitochondria are central organelles that participate in vital metabolic processes, synthesize most ATP, and regulate several signaling cascades, including apoptosis [11]. The transduction of apoptotic signaling of cell death requires permeabilization of the mitochondrial membrane and the subsequent release of pro-apoptotic factors from the mitochondrial inter-membrane space (IMS) (i.e., cytochrome c, apoptosis-binding protein with low pI (Smac/Diablo), Endonuclease G, Serine protease Htra2 (Htra2/Omi), and apoptosis-inducing factor (AIF)) [12]. The release of cytochrome c from mitochondria is commonly considered as the “point-of-no-return” in the sequence of events leading to apoptosis and involves changes in the mitochondrial membrane permeability transition (mtMPT) [13]. mtMPT results in the drop of the mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$), osmotic swelling of the mitochondrial matrix, rupture of the outer mitochondrial membrane, and release of cytochrome c [14].

The mitochondrial permeability transition pore (mPTP) is a non-specific voltage-dependent channel that forms in the inner mitochondrial membrane. The molecular nature of mPTP is controversial due to the lack of knowledge about the identity of the proteins that form it. There are different hypotheses about the components that constitute the mPTP. One of them suggests the participation of the proteins adenine nucleotide translocator (ANT), voltage-dependent anion-selective channel (VDAC), and cyclophilin D (CypD), suggesting that ANT/VDAC form the basic unit of the mPTP, and that the recruitment of additional proteins, such as CypD, Bax, hexokinase, or translocator protein (TSPO), modulate the activation of the mPTP. Another hypothesis recently developed has implicated different subunits of the F_1F_0 -ATP synthase as the inner membrane pore-forming unit of the mPTP [15,16].

Urbani et al. [17] proposed that active F_1F_0 -ATP synthase is responsible for the formation of mPTP; they used highly purified F_1F_0 -ATP synthase and showed that calcium treatment mimics the response with specific agonists and inhibitors of mPTP. Recently, Pinke and Sazanov [18] also stated that the entire mammalian ATP synthase is part of the mPTP, based on an atomic model of ATP opening developed through cryogenic electron microscopy (cryo-EM) data. Despite these findings, the formation of the mPTP from F_1F_0 -ATP synthase has been questioned in recent studies, where some authors showed that mPTP persists in the absence of several subunits of F_1F_0 -ATP synthase. Since deleting such

subunits prevents the assembly of functional F_1F_0 -ATP synthase, the authors concluded that ATP synthase does not participate directly in the mPTP formation [19,20].

mPTP opening is triggered by matrix Ca^{2+} , but its activity can be modulated by several other factors such as oxidative stress, adenine nucleotide depletion, high inorganic phosphate (Pi) concentrations, mitochondrial membrane depolarization, or uncoupling [21]. The prolonged mPTP opening leads to an abrupt increase in the permeability of the inner mitochondrial membrane to solutes with molecular mass up to 1.5 kDa, provoking mitochondrial depolarization, followed by respiratory inhibition and the generation of reactive oxygen species (ROS), and massive release of matrix Ca^{2+} .

This event induces the swelling of mitochondria, leading to breaks in the outer mitochondrial membrane that induce the release of pro-apoptotic factors [22]. For this reason, the mPTP has been proposed as a pivotal effector in the process of cell death [23,24].

Based on this accumulating evidence, we hypothesized that the resistance of IPF fibroblasts to apoptosis might be associated with a dysregulation in the mitochondrial function, mainly by resistance to the mPTP opening. Therefore, we aimed to analyze the mitochondrial function and the mPTP opening on the apoptosis resistance of human IPF fibroblasts. In the present study, we demonstrate that in IPF fibroblasts, mitochondria are dysmorphic and dysfunctional and that the resistance to apoptosis is related to altered mPTP opening. These findings may provide novel insights into the mechanisms involved in the resistance to apoptosis by IPF fibroblasts.

2. Results

2.1. IPF Fibroblasts Are Resistant to Mitomycin C-Induced Apoptosis

Mitomycin C has been shown to inhibit fibroblast proliferation and to induce apoptosis through activation of the intrinsic mitochondrial pathway in human fibroblasts when administered in high doses [25,26]. To investigate the effect of mitomycin C on fibroblasts, we evaluated cell viability using the WST-1 assay following exposure to various mitomycin C concentrations (10, 25, or 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for different times (4, 8, 16, or 24 h). As shown in Figure 1A, mitomycin C significantly reduced the viability of control fibroblasts in a dose- and time-dependent manner. Treatment of control fibroblasts with mitomycin C 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for 24 h led to a nearly 50% decrease in cell viability. In contrast, mitomycin C did not produce the same effect in IPF fibroblasts. The maximum percentage of cell death was reached with mitomycin C 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ at 8 h, and no further cell death was reached by increasing the incubation time or mitomycin C concentration. Representative bright-field micrographs using 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ mitomycin C are shown in Figure 1B. To quantitatively examine the effect of mitomycin C on apoptosis, Annexin V-FITC/PI double staining was measured via flow cytometry in IPF and control fibroblasts. Following treatment with mitomycin C (10, 25, and 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ at 24 h), the percentage of apoptotic cells (including early and late apoptosis) was evaluated. The results showed that IPF fibroblasts are significantly resistant to apoptosis induced by mitomycin C at 25 and 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, compared with control fibroblasts (** $p < 0.05$ or *** $p < 0.01$) Figure 1C.

2.2. IPF Fibroblasts Show a Decrease in the Mitomycin C-Induced Release of Cytochrome c

To determine whether the resistance to apoptosis in IPF fibroblasts is associated with the release of cytochrome c, IPF and control fibroblasts were stimulated with mitomycin C (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 4 and 24 h. Subsequently, the cytosolic and mitochondrial fractions were isolated. The release of cytochrome c was determined in the cytosolic fraction by Western blot (WB) and HPLC, while the mitochondrial fraction was only analyzed by WB due to the small amount of sample obtained during isolation. As illustrated in Figure 2A, the cytosolic fraction isolated from control fibroblasts had a higher cytochrome c content after mitomycin C treatment than basal condition (** $p < 0.01$). In contrast, the cytosolic cytochrome c content did not change in IPF fibroblasts after mitomycin C treatment. These results were confirmed by HPLC analysis (Figure 2B). Additionally, we analyzed the expression levels of Bax, a Bcl-2-associated X protein. We found a strong decrease of Bax in the cytosolic

fraction of control fibroblasts stimulated with mitomycin C for 24 h, suggesting that Bax was translocated from the cytosol to the mitochondrial membrane, contributing to the apoptosis process. By contrast, the level of this protein showed only a slight decrease at 24 h in IPF fibroblasts. Moreover, the stimulation with mitomycin C for 24 h increased the active form of caspase 9 in the cytosolic fraction of control fibroblasts ($* p < 0.05$) but not in IPF fibroblasts (Figure 2A). These results show that the intrinsic pathway is activated in control fibroblasts but not in IPF fibroblasts.

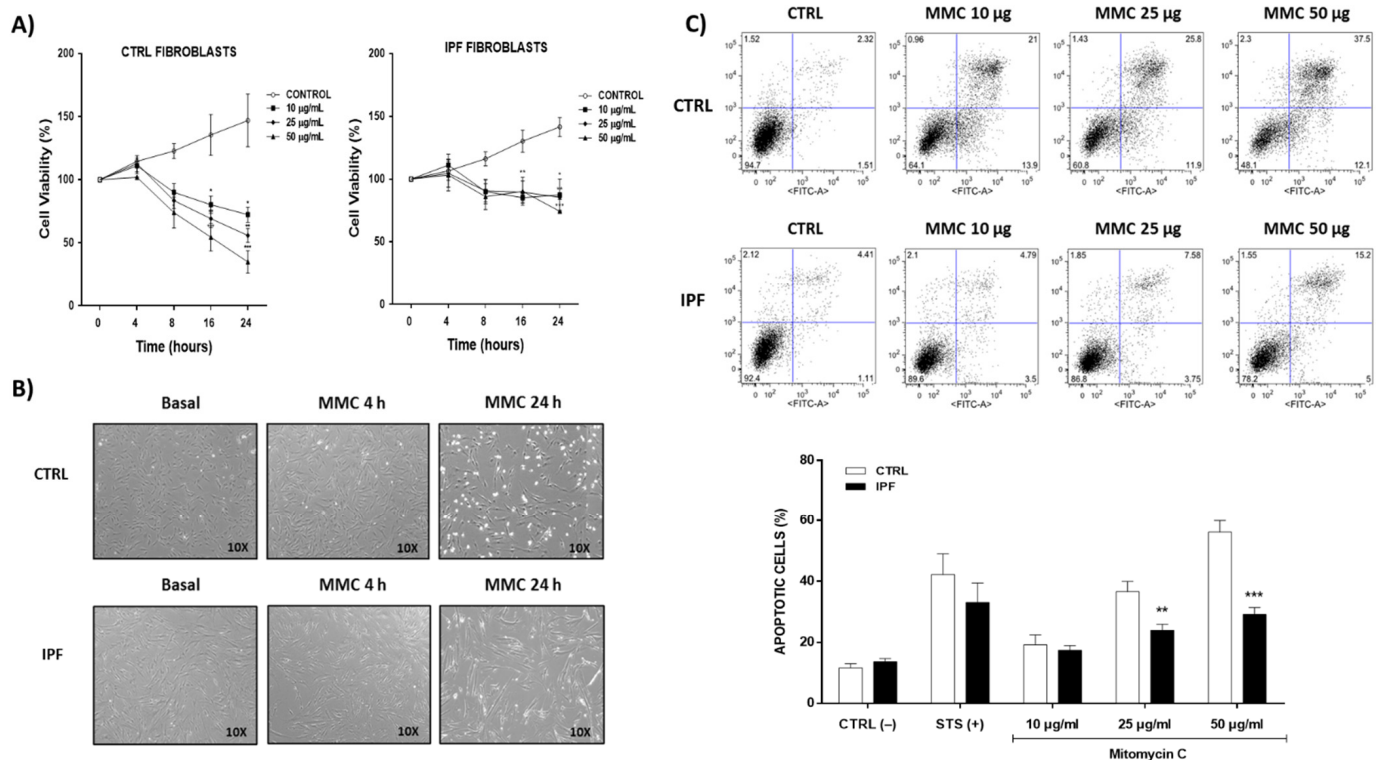


Figure 1. Effect of mitomycin C (MMC) on viability and resistance to apoptosis in idiopathic pulmonary fibrosis and normal lung fibroblasts. (A) After treatment with increasing concentration of mitomycin C for 4, 8, 16, and 24 h, the effect on cell viability was determined using the WST-1 assay. The data represent the means \pm SEM of two independent experiments $** p < 0.01$, $*** p < 0.001$, compared with the control group. (B) Bright field representative images from IPF and control fibroblasts after incubation with mitomycin C (25 $\mu\text{g/mL}$) for 4 and 24 h. (C) Cell apoptosis rates were analyzed via flow cytometry using the Annexin V/propidium iodide (FITC/PI) double staining method. Fibroblasts were stimulated with mitomycin C for 24 h. Staurosporine (STS, 1 μM) was used as a positive control. The results are expressed as the mean \pm SEM. The differences were analyzed using two-way ANOVA followed by the Bonferroni multiple comparisons test. $** p < 0.05$ or $*** p < 0.01$ vs. control. CTRL ($n = 2$) and IPF ($n = 4$).

On the other hand, the analysis of the mitochondrial fraction of control fibroblasts showed a high content of cytochrome c under basal conditions, while the mitomycin C treatment for 24 h provoked a significant decrease ($*** p < 0.01$). Interestingly, under basal conditions, the mitochondrial cytochrome c content in IPF fibroblasts was significantly lower than in control fibroblasts, while treatment did not change their levels (Figure 2C). As a whole, these data indicate that IPF fibroblasts released fewer cytochrome c after stimulation with 25 $\mu\text{g/mL}$ mitomycin C at 24 h compared with control fibroblasts.

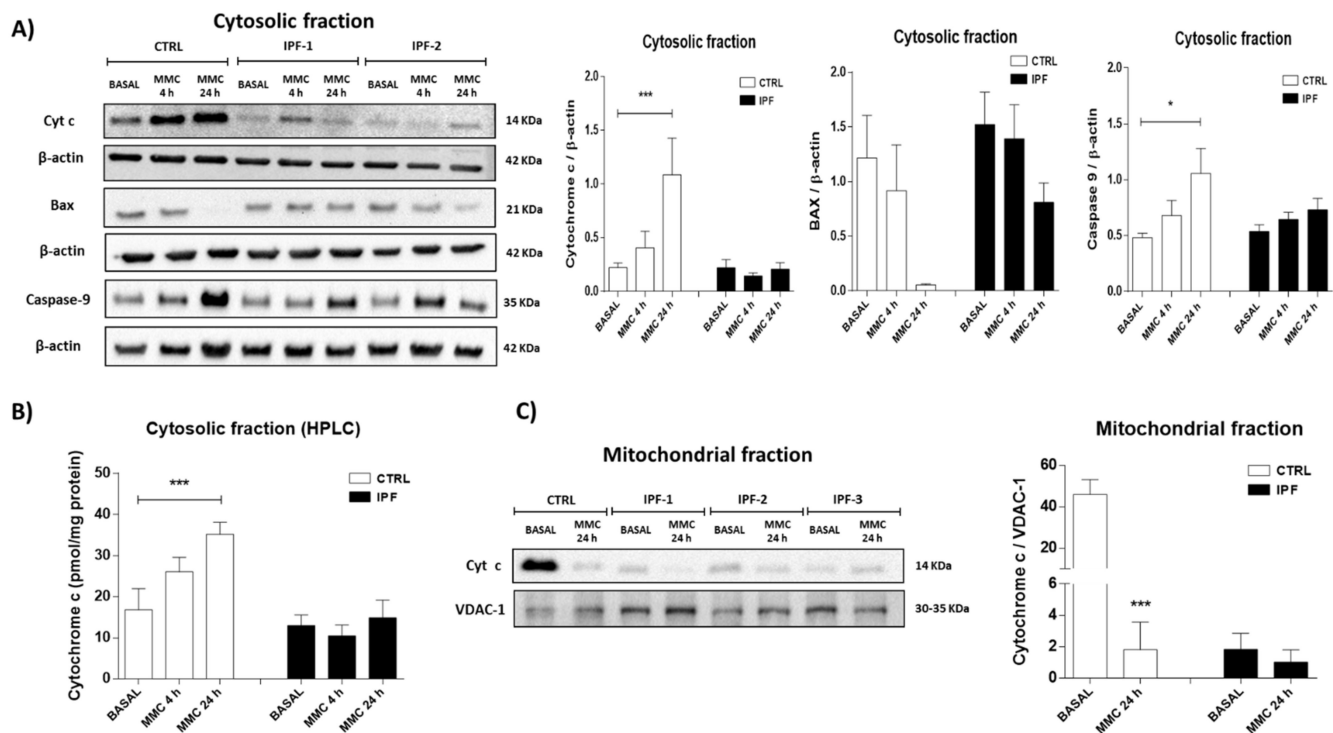


Figure 2. Fibroblasts from idiopathic pulmonary fibrosis show a decrease in the release of cytochrome c induced for mitomycin C (MMC). After exposure to 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ mitomycin C for 4 and 24 h, we isolated the cytosolic and mitochondrial fractions in control and IPF fibroblasts. **(A)** Expression levels of cytochrome c, caspase 9, and Bax in cytosolic fraction were determined via Western blot analysis. The expression levels of β -actin were used as a loading control. **(B)** Cytosolic fraction was also analyzed by the high-performance liquid chromatography (HPLC) technique. **(C)** The expression levels of cytochrome c in mitochondrial fraction were determined via Western blot analysis. Expression levels of VDAC-1 were used as a loading control. The results are expressed as the mean \pm SEM of at least three independent experiments. The differences were analyzed using one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparisons test, * $p < 0.05$, *** $p < 0.01$ vs. control, CTRL ($n = 3$) and IPF ($n = 3$).

2.3. IPF Fibroblasts Show Strong Resistance to mPTP Opening Induced By Ionomycin

It has been proposed that modulation of mPTP opening is a strategic regulator of cell death by apoptosis. We determined whether mPTP opening was associated with the apoptosis resistance shown by IPF fibroblasts. We compared the opening of mPTP in control and IPF fibroblasts under basal conditions using the CoCl_2 -calcein fluorescence-quenching assay. First, we measured the calcein fluorescence by confocal microscopy in the absence of cobalt. As expected, calcein fluorescence is much higher in the absence of CoCl_2 (Co^{2+} -free). The results showed similar levels of calcein between IPF and normal lung fibroblasts, indicating similar calcein loading (Figure 3A,B). However, in the presence of CoCl_2 , calcein fluorescence inside mitochondria is lower in control than in IPF fibroblasts (* $p < 0.05$). This result suggests that mPTP is more open in controls than IPF fibroblasts (Figure 3A,B). We also analyzed mPTP opening in fibroblasts by flow cytometry using a MitoProbe Transition Pore Assay Kit to corroborate this finding. The change in fluorescence between cells incubated with only CoCl_2 and those incubated with ionomycin indicates the continuous activation of mPTP. Our results showed that mPTP opening induced by ionomycin was higher in control than in IPF fibroblasts (*** $p < 0.01$ vs. control) (Figure 3C,D). This result confirmed that IPF fibroblasts are most resistant to mPTP opening ionomycin-induced, as demonstrated by the retention of calcein fluorescence in the presence of ionomycin in IPF fibroblasts (Figure 4A). We also examined the expression levels of ANT-1 protein, and as shown in Figure 4B, these were markedly lower in IPF compared with controls

fibroblasts (* $p < 0.05$ vs. control). This result is captivating because this protein participates in mPTP formation.

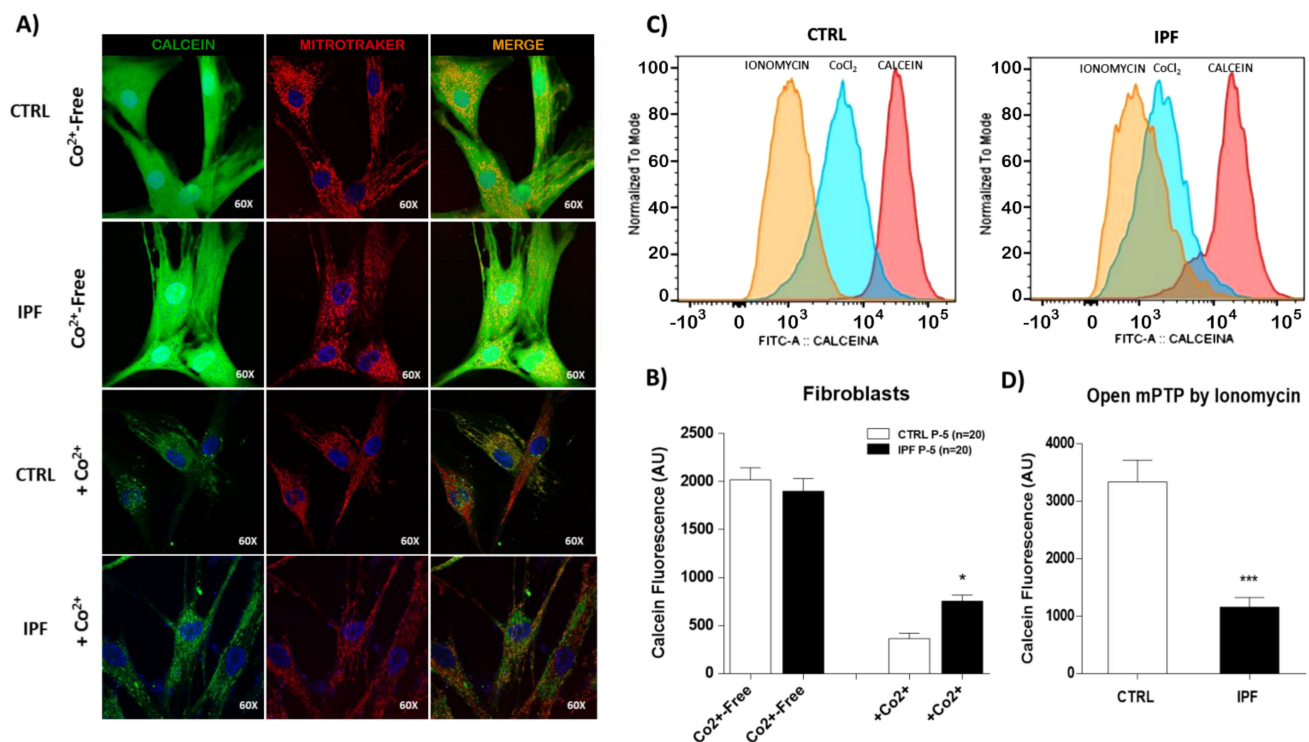


Figure 3. Idiopathic pulmonary fibrosis fibroblasts show strong resistance to ionomycin-induced mPTP opening. (A) Representative confocal micrographs of IPF and control fibroblasts after incubation with calcein-AM (1 μ M) and MitoTracker Red (150 nM) in the presence or absence of Co²⁺ (1 mM), which quenches calcein fluorescence (green) outside of mitochondria. In the absence of Co²⁺, the calcein fluorescent signal is very intense and is present in the entire cell. The calcein fluorescence in mitochondria is lower in the presence of Co²⁺. (B) The bar graph shows the quantification of calcein fluorescence in IPF and control cells in the absence or presence of Co²⁺. The number shown in the panel indicates the number of cells used in the study. The results are expressed as the mean \pm SEM. The differences were analyzed using one-way ANOVA followed by the Bonferroni multiple comparisons test. * $p < 0.05$. (C) Representative flow cytometry histogram shows the intensity of calcein signals in IPF and control fibroblasts. The change in fluorescence between Co²⁺ and ionomycin indicates the continuous activation of mitochondrial permeability transition pores. (D) The bar graph shows the quantification of mean calcein fluorescence in IPF and control cells. The results are expressed as the mean \pm SEM. The differences were analyzed using an unpaired t -test. *** $p < 0.01$ vs. control. CTRL ($n = 3$) and IPF ($n = 4$).

2.4. IPF Fibroblasts Show Decreased Release Mitochondrial Calcium

We also evaluated mitochondrial calcium in control and IPF fibroblasts, since elevated mitochondrial calcium levels induces the opening of the mPTP. We used FCCP to increase the [Ca²⁺]_i by activating the mPTP in control and IPF fibroblasts. Our results indicate that FCCP elicited in normal fibroblasts a transient moderate increase in [Ca²⁺]_i to 115.76 ± 9.53 and 108.09 ± 7.01 nM, respectively (Figure 5A). In contrast, the IPF fibroblasts exhibited a significantly diminished increase in [Ca²⁺]_i levels by 13.59 ± 1.49 and 18.36 ± 5.24 nM, respectively (Figure 5B,C) (** $p < 0.01$). To corroborate that the increase in [Ca²⁺]_i is due to the activation of the mPTP with FCCP, we blocked pharmacologically the mPTP with cyclosporin A, inhibiting the response (Figure 5D).

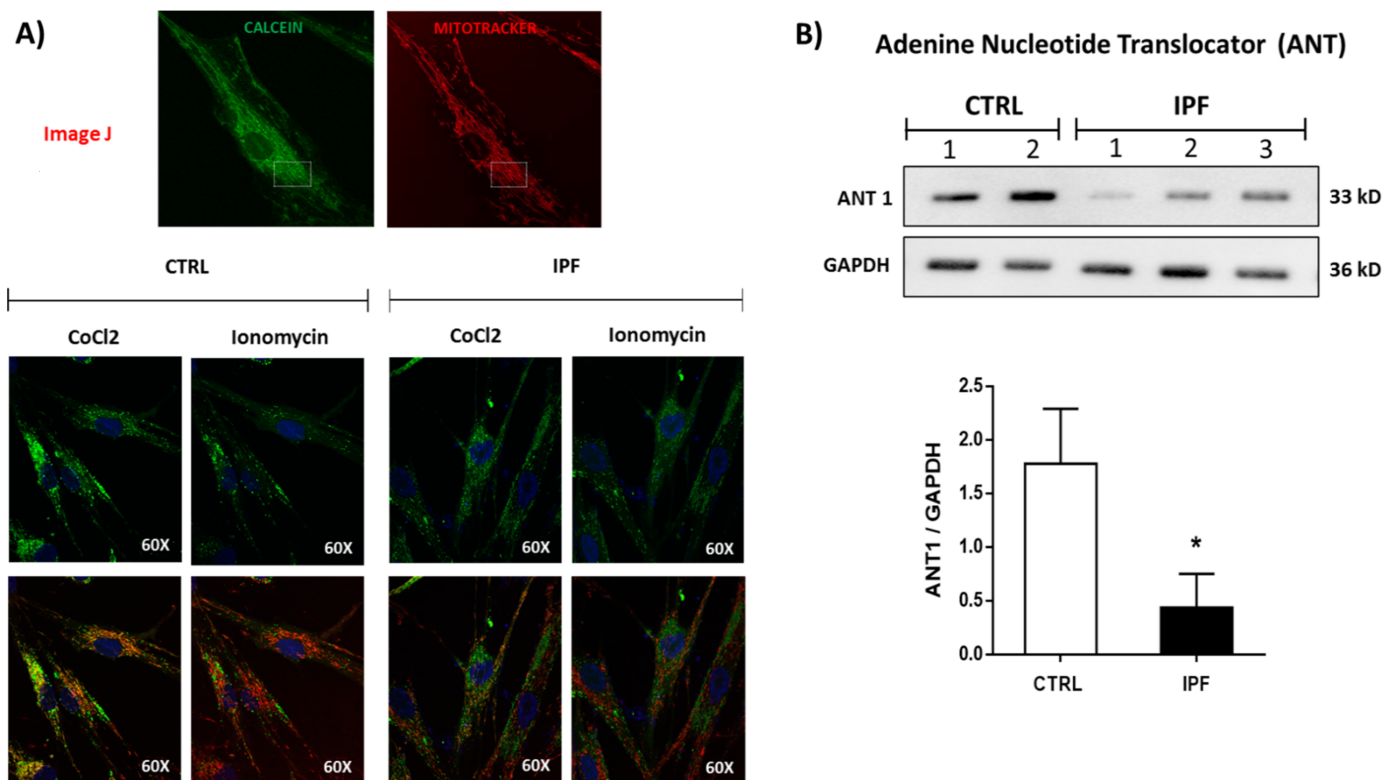


Figure 4. Idiopathic pulmonary fibrosis fibroblasts show resistance to mPTP opening induced by ionomycin. (A) Representative confocal micrographs of IPF and control fibroblasts after incubation with calcein-AM (1 μ M), MitoTracker Red (150 nM), and Co^{2+} (1 mM), in the presence or absence of ionomycin (1 μ M), which quenches calcein fluorescence (green) within mitochondria. The fluorescence of calcein is maintained in IPF fibroblasts after ionomycin administration compared to control fibroblasts. (B) Image representative of ANT protein expression in control and IPF fibroblasts. The expression levels of GAPDH were used as a loading control. The results are expressed as the mean \pm SEM. The differences were analyzed using an unpaired *t*-test. * $p < 0.05$ vs. control, CTRL ($n = 2$) and IPF ($n = 3$), one experiment.

2.5. Inhibition of the mPTP Opening with BKA Decreased Apoptosis in Control Fibroblasts

To determine whether the inhibition of mPTP opening participates in the resistance of fibroblasts to apoptosis, control fibroblasts were stimulated with BKA (10 μ M, for 6 h), an inhibitor of the opening of mPTP, and then were stimulated with mitomycin C (25 μ g/mL) for 24 h. Our results showed an increase in the number of positive apoptotic cells when we used mitomycin C. Interestingly, the administration of BKA decreased the percentage of apoptotic cells in control fibroblasts (** $p < 0.01$), which are very susceptible to cell death (Figure 6A). On the other hand, when we stimulated control fibroblasts with ATR, an inducer of mPTP opening, we found a slight and not significant increase in the percentage of apoptosis induced by mitomycin C (Figure 6B).

2.6. IPF Fibroblasts Exhibit Lower Oxygen Consumption Than Control Fibroblasts

To investigate whether apoptosis resistance in IPF fibroblasts is associated with mitochondrial dysfunction, we analyzed the integrity of mitochondria through oxygen consumption in IPF and control fibroblasts. Oxygen flux (pmol O_2 /s/ 10^6 cells/mL) was determined in 2×10^6 non-permeabilized fibroblasts. Figure 7A shows a representative trace of control and IPF fibroblasts respiration. The routine respiration of fibroblasts was measured in standard incubation media (10–20 min), and then, we performed sequential injections of substrate–uncoupler–inhibitor–titration for key parameters of mitochondrial respiration. As shown in Figure 7B, routine respiration of control fibroblasts was higher than IPF fibroblasts (***) $p < 0.01$, which was suppressed by oligomycin, a specific inhibitor of mitochondrial ATP synthase and oxidative phosphorylation. The proton leak

was slightly increased in the IPF fibroblasts, but the difference against control fibroblasts was not significant ($p = 0.06$). The maximal respiration of fibroblasts was determined after the uncoupling of mitochondria with CCCP. The results showed that IPF fibroblasts had a decreased maximal respiration compared with the control group (** $p < 0.01$). Finally, respiratory control (RC) was calculated by the difference between basal respiration and proton leak. The results showed that IPF fibroblasts exhibited lower RC than normal fibroblasts (** $p < 0.01$). Together, our findings indicate impaired respiration in IPF fibroblasts. We evaluated the oxygen consumption in permeabilized fibroblasts to determine whether the modification of respiration in IPF fibroblasts was associated with an alteration in complex I and II of the electron transport chain. We determined the electron transport chain activity using specific substrates to complex I (glutamate/malate) and complex II (succinate). A representative trace is shown in Figure 7C. The electron transport chain activity was decreased in IPF fibroblasts when it was stimulated through complex I (** $p < 0.01$) or complex II (* $p < 0.05$) (Figure 7D).

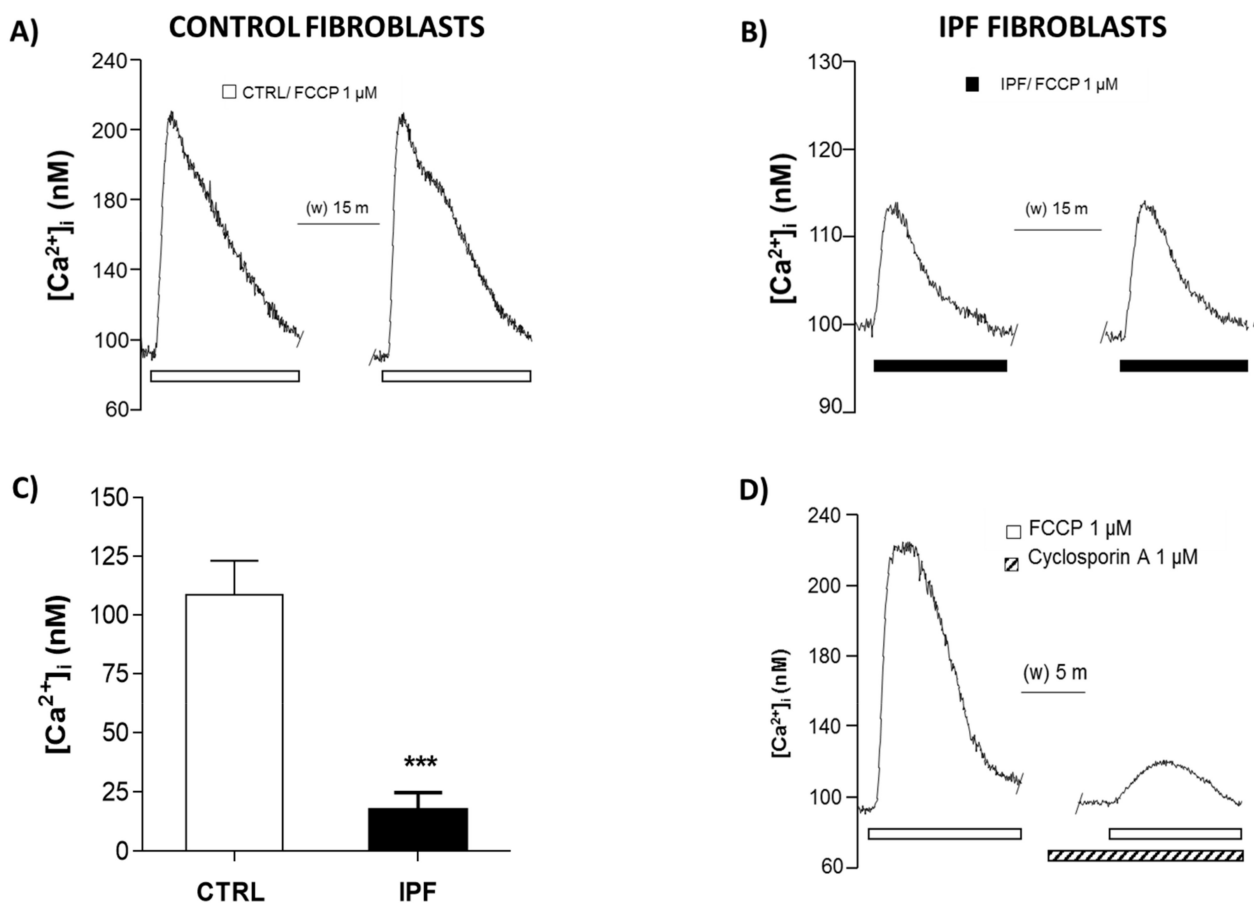


Figure 5. Typical recordings of simultaneous intracellular calcium concentration assay ([Ca²⁺]_i) control fibroblasts and IPF. Two pulses of FCCP were applied with an interstimulus interval of 15 min to determine the response reproducibility (A,B respectively) (CTRL $n = 2$; IPF $n = 2$). Six fibroblasts were evaluated for each experimental condition. (C) Data are shown as media \pm SEM and were compared by Student's t -test, *** $p < 0.01$. (D) Ca²⁺ increase induced by FCCP was blocked by cyclosporin A ($n = 2$).

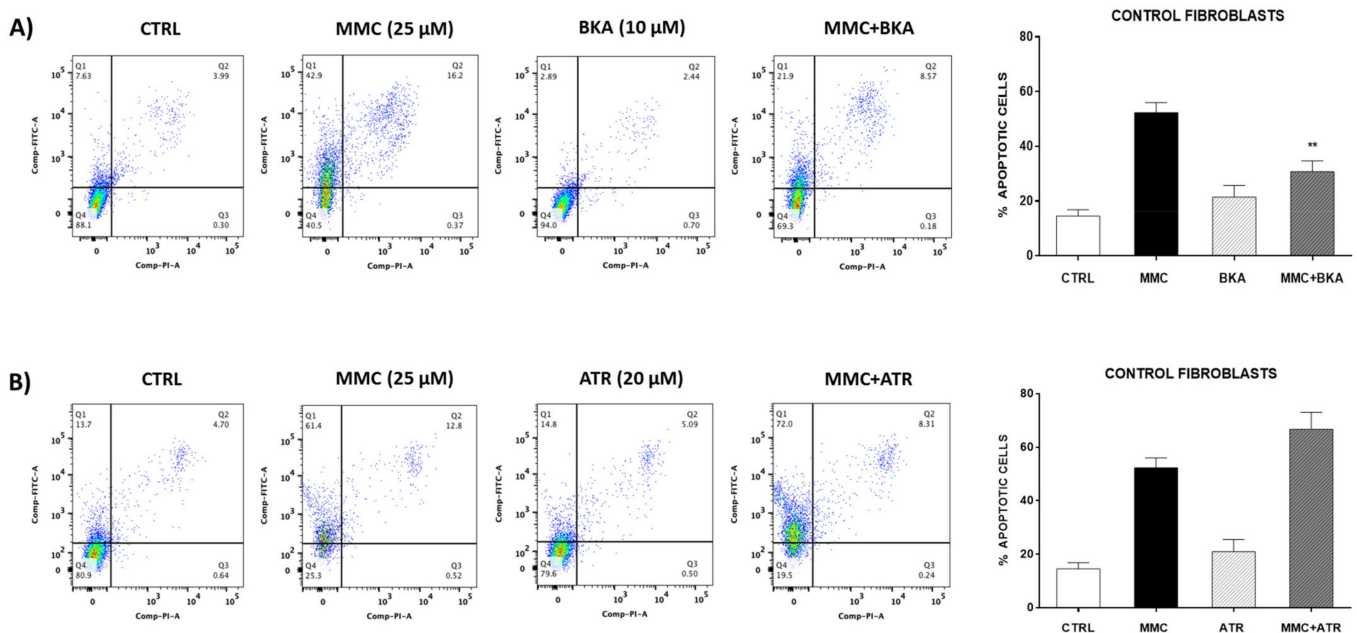


Figure 6. Control fibroblasts show resistance to apoptosis induced by mitomycin C in the presence of bongkreikic acid (BKA) without changes with atractyloside (ATR). (A) Representative image of dot plot analysis by flow cytometry. Cell apoptosis rates were analyzed using the Annexin V-FITC/PI double-staining method. (B) Fibroblasts were stimulated with BKA (10 μM) for 6 h, and then, we incubated fibroblasts with mitomycin C MMC (25 μg/mL) for 24 h. Fibroblasts were stimulated with ATR (20 μM) for 1 h, and then, we incubated fibroblasts with (25 μg/mL) for 24 h. The results are expressed as the mean ± SEM. The differences were analyzed using one-way ANOVA followed by the Bonferroni multiple comparisons test, ** $p < 0.01$ vs. control. CTRL ($n = 3$).

2.7. The Mitochondrial Transmembrane Potential Is Similar in IPF and Control Fibroblasts

As we detected alterations in oxygen consumption, we turned our attention toward the mitochondrial membrane potential: the electrochemical force that modulates the kinetics of proton re-entry to the matrix through ATP synthase. Using confocal microscopy, we measured the $\Delta\Psi_m$ of control and IPF fibroblast stained with JC-1 (4 μM). JC-1 is a cationic fluorescent dye that exhibits potential-dependent accumulation in mitochondria (Figure 8A). We did not find significant differences in the JC-1 fluorescence signal between control and IPF fibroblasts (Figure 8B). To ensure that dye is equally loaded and that the JC-1 signal is not auto-quenched, we compared JC-1 fluorescence in control and IPF fibroblasts following oligomycin or FCCP treatment. Oligomycin, an inhibitor of ATP synthase, induces hyperpolarization of mitochondria and increases JC-1 fluorescence, whereas FCCP dissipates transmembrane potential (Figure 8B).

2.8. IPF Fibroblasts Display Decreased ATP Levels but Do Not Show a Change in ADP/ATP Ratio

Diverse studies have proposed the participation of ATP synthase in the formation of mPTP. For this reason, we evaluated the levels of expression of ATP synthase by Western blot in control and IPF fibroblasts, and no differences were found (Figure 8C). Furthermore, we evaluated the ADP/ATP ratio in control and IPF fibroblasts, and also, no significant differences were observed, suggesting no changes in ATP synthase activity (Figure 8D).

ATP production in IPF and control fibroblasts was determined quantitatively through a luminescence assay. The results showed that IPF fibroblasts had a lower ATP total concentration than the control group (** $p < 0.01$). In addition, decreased mitochondrial respiration in IPF fibroblasts was correlated with a decrease in ATP production (Figure 8E).

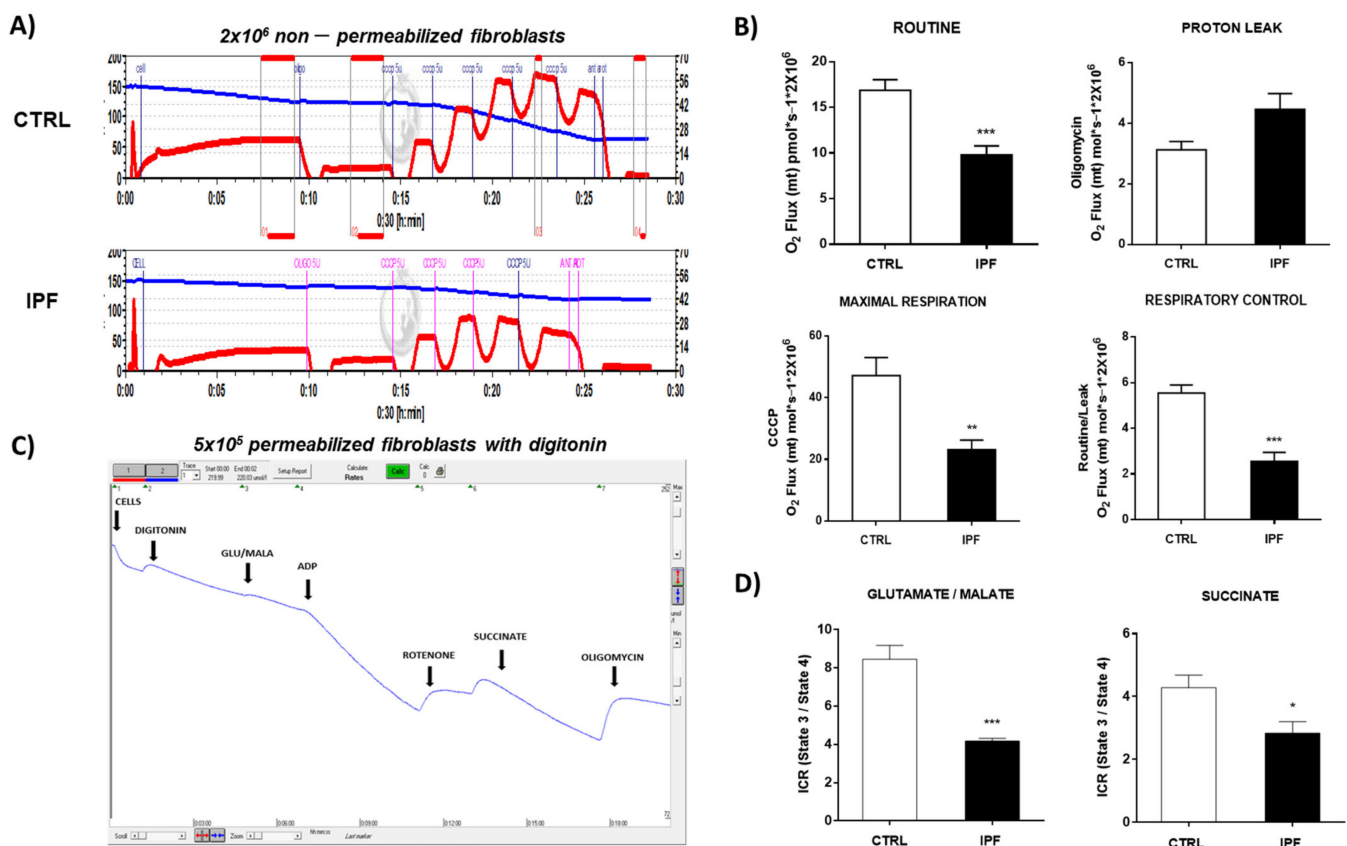


Figure 7. Oxygen consumption in idiopathic pulmonary fibrosis and control fibroblasts with and without induction of permeability. Intact fibroblasts were placed in a 2 mL chamber at a final concentration of 2×10^6 cells/mL. Measurement of oxygen consumption was performed at 37°C in high-resolution oxygraphy (Oxygraph-2k Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria). Proton leak was induced by oligomycin ($5\ \mu\text{M}$), and titrations of $1\ \mu\text{M}$ CCCP induced the maximum uncoupled respiration. Finally, we inhibit the OXPHOS with rotenone and antimycin. **(A)** Representative traces of oxygen consumption in control and IPF fibroblasts. **(B)** Graphs of different parameters of mitochondrial respiration (Routine, Proton Leak, Maximal Respiration, and Respiratory Control). The results are expressed as the mean \pm SEM. The differences were analyzed using an unpaired *t*-test, ** $p < 0.05$, *** $p < 0.01$ vs. control. CTRL ($n = 2$) and IPF ($n = 4$). **(C)** Representative traces of oxygen consumption using different substrates for complex I and II. **(D)** Graphs of respiratory control index (ICR) using glutamate/malate ($10\ \text{mM}/5\ \text{mM}$) and succinate ($5\ \text{mM}$). Respiration inhibition was carried out in the presence of rotenone ($0.5\ \mu\text{M}$) by complex I and oligomycin ($5\ \mu\text{M}$) complex II. The results are expressed as the mean \pm SEM. The differences were analyzed using an unpaired *t*-test, * $p < 0.05$, *** $p < 0.01$ vs. control. CTRL ($n = 3$) and IPF ($n = 2$).

2.9. IPF Fibroblasts Display Abnormal Mitochondrial Structure

In order to evaluate the mitochondrial structure, we analyzed IPF and control fibroblasts by fluorescence and transmission electron microscopy (TEM). As shown in the fluorescence micrograph with MitoTracker, we observed a mitochondrial network fragmented and accumulation of mitochondria in IPF compared to control fibroblasts. Moreover, fibroblasts from control lungs showed branched, elongated, and lengthwise organized mitochondria with a typical appearance; the cristae were electrodense and compact. In contrast, in IPF fibroblasts, the mitochondria were scarce, thinned, and disordered; the cristae showed a lesser electron density than control fibroblasts (Figure 9A). As shown in the frequency histogram, control fibroblasts mitochondria have a size of around $600\ \text{nm}^2$, while mitochondria from patients with IPF have a much smaller size of about $250\ \text{nm}^2$ (Figure 9B). We also evaluated the mitochondrial elongation by the length of mitochondria mean per image using the ImageJ software. The IPF mitochondria exhibited lower elongation than mitochondrial control (Figure 9C).

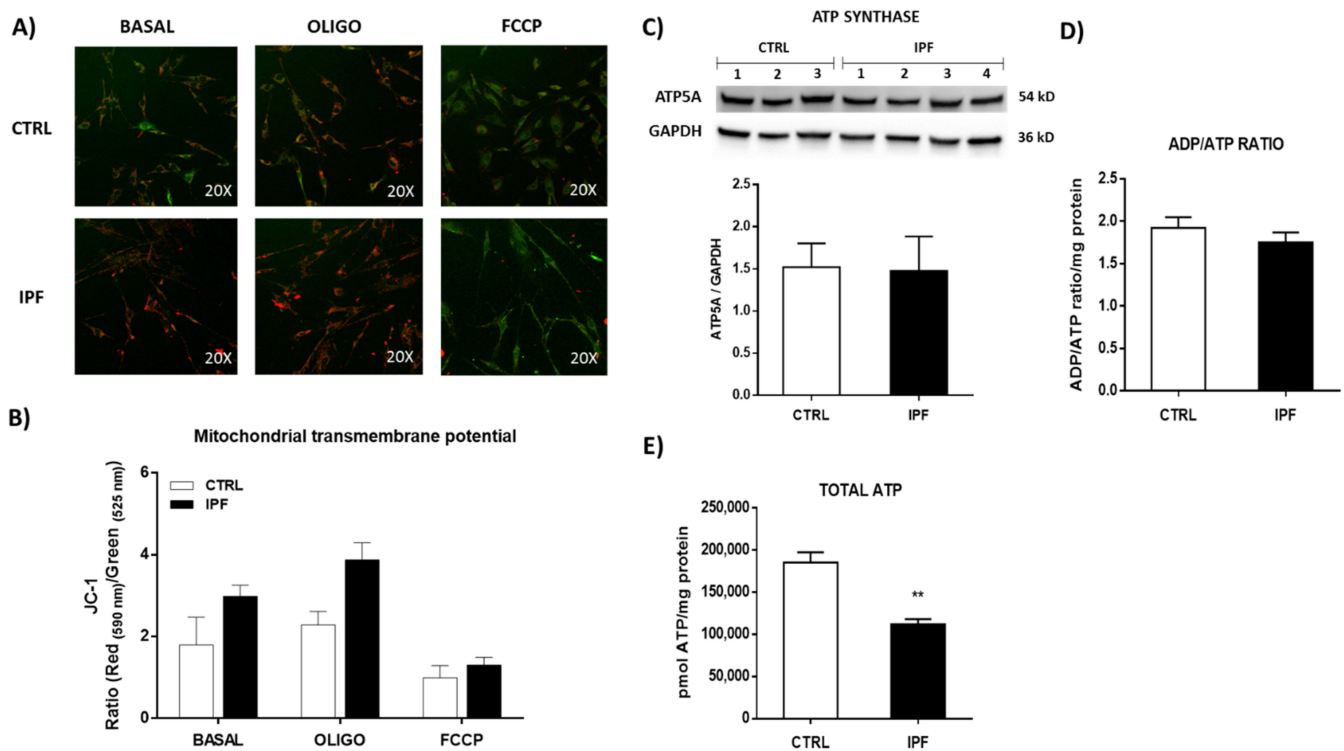


Figure 8. IPF fibroblasts do not modify the mitochondrial transmembrane potential or the ADP/ATP ratio but decrease the total levels of ATP. **(A)** Representative fluorescence microscopic image of control and IPF fibroblasts after staining with JC-1 (4 μM) in the presence or absence of oligomycin (1 μM) or FCCP (10 μM). The intensity of JC-1 reflects the level of mitochondrial transmembrane potential. **(B)** The bar graph shows the quantification of JC-1 signals in control and IPF fibroblasts in the presence or absence of oligomycin and FCCP using fluorescence microscopy. The results are expressed as the mean ± SEM. CTRL ($n = 1$) and IPF ($n = 2$) **(C)** Expression levels of ATP synthase in the lysate of control and IPF fibroblasts were determined via Western blot analysis. The expression levels of GAPDH were used as a loading control CTRL ($n = 3$) and IPF ($n = 4$) from three independent experiments. **(D)** ADP/ATP ratio was quantified by a luciferin/luciferase-based luminescence assay. The results are expressed as the mean ± SEM. The differences were analyzed using an unpaired *t*-test. CTRL ($n = 4$) and IPF ($n = 4$). **(E)** ATP production was quantified by luminescence assay in control and IPF fibroblasts. The results are expressed as the mean ± SEM. The differences were analyzed using an unpaired *t*-test. ** $p < 0.01$ vs. control. CTRL ($n = 3$) and IPF ($n = 3$).

We also determined by confocal microscopy, through a Z-stack analysis, the mean fluorescence intensity of the MitoTracker in whole cells in control and IPF fibroblasts. In addition, sections were made throughout the entire cell to indirectly assess whether there were changes in mitochondrial mass. Our results show no significant change in the fluorescence of the mitochondrial marker MitoTracker between control and IPF fibroblasts, suggesting that there are no significant differences in the number of mitochondria (Figure 10). In addition, previous studies have shown that there are no differences in the amount of mitochondrial DNA between normal lung and IPF fibroblasts [5].

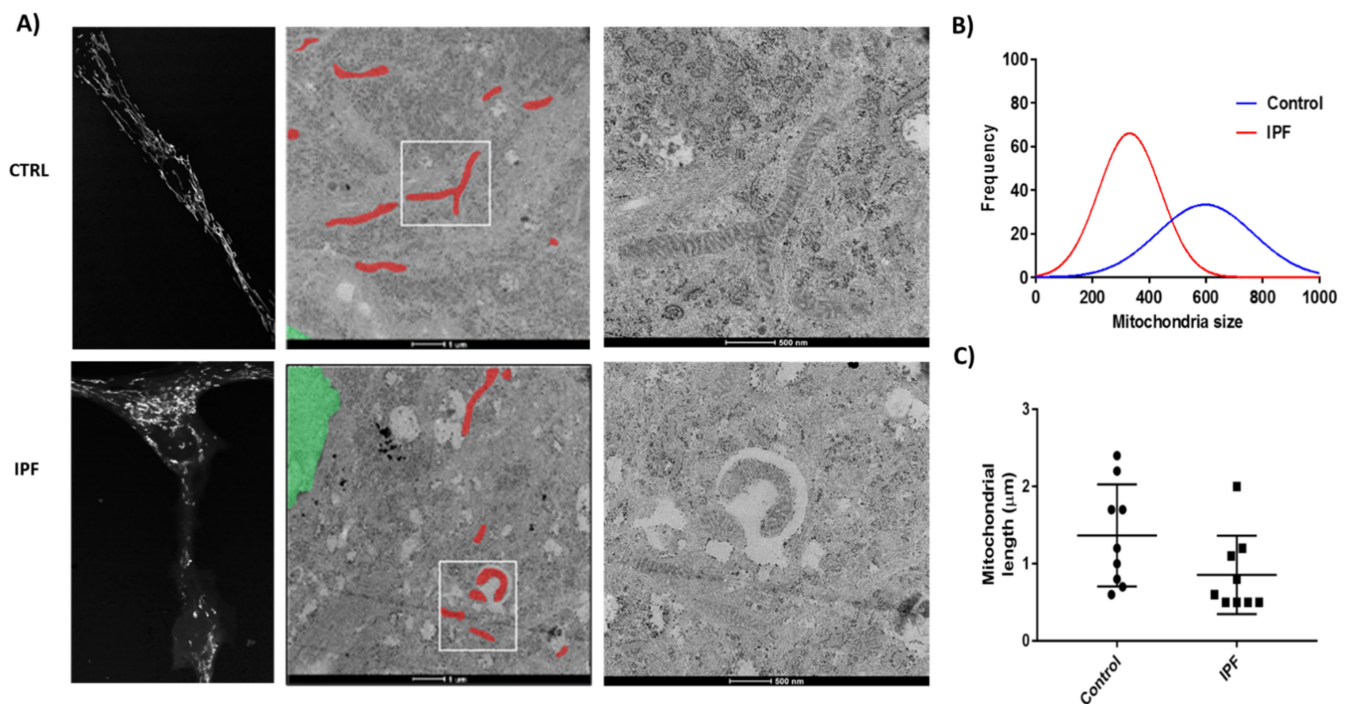


Figure 9. Number and morphology of lung fibroblasts mitochondria from healthy donors and idiopathic pulmonary fibrosis patients. (A) Representative confocal and transmission electron microscopy of mitochondrial morphology of lung fibroblasts derived from healthy donors and IPF patients. Two different magnifications of the same cell are shown, and mitochondria are highlighted in red. (B) Frequency histogram of mitochondria size (nm²) $n > 100$, using at least five different cells of each condition CTRL ($n = 2$) and IPF ($n = 2$). (C) Images were semi-automatic analyzed using the ImageJ software. The length of mitochondria was used to determine mitochondrial elongation mean per image; at least 70 mitochondria per condition were measured.

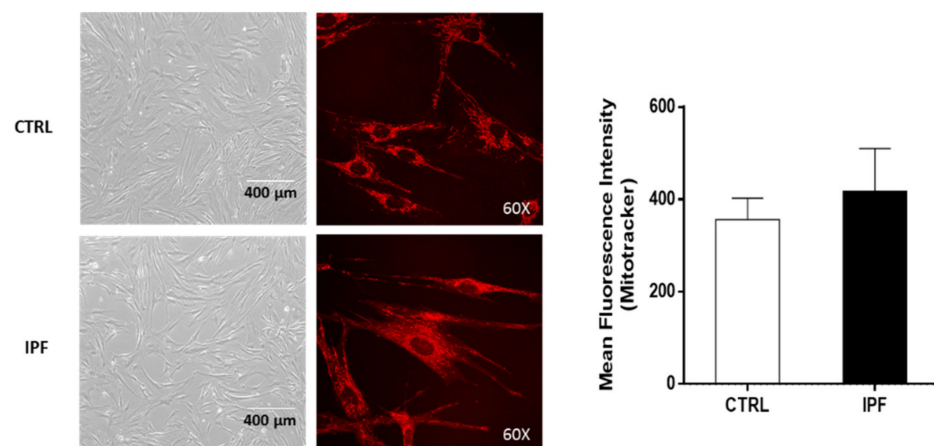


Figure 10. Idiopathic pulmonary fibrosis fibroblasts do not show differences in mean fluorescence intensity of MitoTracker compared to control fibroblasts (whole cells). To determine indirectly if IPF fibroblasts had a lower number of mitochondria than control fibroblasts, using a confocal microscope, we performed an analysis of the mean total fluorescence intensity of MitoTracker in a Z-stack of complete fibroblasts. The results are expressed as the mean \pm SEM. The differences were analyzed using an unpaired *t*-test, * $p < 0.05$ vs. control. CTRL ($n = 2$) and IPF ($n = 2$).

3. Discussion

A growing body of evidence demonstrates that IPF fibroblasts are resistant to apoptosis [7–10]. The mechanisms are unclear, but evidence indicates the participation of the extrinsic pathway of apoptosis, such as the inhibition of Fas-mediated apoptotic cell

death [8]. However, no studies have investigated the role of the critical intrinsic pathway of apoptosis mediated by mitochondria. In this context, our study demonstrates that IPF fibroblasts show resistance to mPTP opening, low cytochrome c levels, mitochondrial dysfunction, and a fragmented mitochondrial network. Recently, mitochondrial dysfunction has been reported in IPF fibroblasts associated with the induction and maintenance of the senescent phenotype [27], but its specific role in the apoptosis of these cells is uncertain. Mitochondria-induced apoptosis arises from various internal cell stresses, resulting in the release of cytochrome c toward the cytosol. The above is a crucial process in the intrinsic apoptosis pathway and is related to the mPTP opening. Once in the cytosol, cytochrome c activates the apoptosome formation, which is a cytosolic multiprotein complex composed of cytochrome c, Apaf-1, and ATP. This complex induces the caspase 9 activation, triggering the effector caspases activation that provokes cell death [28]. Therefore, in the fibrotic process, the dysregulation of cytochrome c release can result in the accumulation of apoptosis-resistant fibroblasts, excessive extracellular matrix deposition, and disruption of the lung architecture.

In this work, we demonstrated that IPF fibroblasts presented a marked decrease in basal cytochrome c levels and its release after stimulation with mitomycin C. cytochrome c is a crucial signaling molecule during apoptosis, but it also plays an essential role in oxidative phosphorylation by transferring electrons from complex III to complex IV of the electron transport chain [29]. A substantial portion of cytochrome c is cardiolipin-associated, embedded in mitochondrial cristae, while the remaining cytochrome c is free in the intramembrane space. The release of cytochrome c from mitochondria is carried out during the early apoptosis stages and requires a two-step process. First, the solubilization of cytochrome c involves a breaking of the electrostatic and hydrophobic forces that it usually maintains with cardiolipin. Second, the mitochondrial permeability transition is sufficient to release cytochrome c into the cytosol [30]. Thus, the decrease in basal cytochrome c levels observed in fibroblasts from patients with IPF may be related to decreased electron transfer, oxygen consumption, and ATP synthesis. In this context, various studies have reported that the lack of cytochrome c disrupts the assembly and stability of respiratory complexes I and IV in fibroblasts [31].

Interestingly, embryonic fibroblasts derived from mice deficient in the somatic isoform of cytochrome c are resistant to apoptosis by agents known to trigger the intrinsic apoptotic pathway. This effect was associated with respiratory chain defects [32]. The mitochondrial apoptosis pathway is regulated mainly by changes in the permeability of the mitochondrial membrane or by alterations in its function. Mitochondrial outer membrane permeabilization is the ultimate step of apoptotic signal transduction pathways, which converge on mitochondria. mPTP is one of the representative systems proposed to be responsible for mitochondrial outer membrane permeabilization [33]. Although the concept of the mPTP is still evolving, mounting evidence indicates that the mPTP is directly responsible for cytochrome c release. For this reason, it is considered a strategic regulator of cell death. The mPTP is a non-specific conductance channel in the inner mitochondrial membrane that allows the flux of metabolites with a molecular weight of up to 1.5 kDa.

Induction of the mPTP leads to mitochondrial depolarization, inhibition of ATP synthesis, Ca^{2+} uptake, respiratory inhibition, generation of ROS, mitochondrial swelling, and potentially the rupture of the outer mitochondrial membrane leading to release of mitochondrial apoptogenic proteins such as cytochrome c, Smac/DIABLO, endonuclease G, and AIF. Therefore, it is not surprising that studies of the mPTP attract substantial attention. However, despite significant effort, the exact molecular composition of the mPTP is still a matter of debate.

The mPTP opening can be induced by high concentrations of mitochondrial Ca^{2+} , oxidative stress, and Pi and can be inhibited by cyclosporin A, adenine nucleotides, Mg^{2+} , acidic pH, and reducing agents in the cells [16]. The mPTP has been implicated in several diseases, but to our knowledge, no studies had been performed on IPF fibroblasts. We demonstrated for the first time that IPF fibroblasts are resistant to ionomycin-induced mPTP

opening; this is an intriguing finding, because high basal ROS production by IPF fibroblasts has been reported [34], and an mPTP opening should be expected as a consequence of high mitochondrial ROS production. However, a similar effect has been reported in cancer cells. For example, Norman et al. demonstrated that mPTP inhibition by cyclosporin A promotes skin cancer in transplanted patients by allowing keratinocyte survival under conditions of genotoxic stress, highlighting the critical role of mPTP inhibition in tumor development [35].

On the other hand, different factors can influence this resistance to ionomycin-induced mPTP opening, such as the expression of protein components. Recently, it has been proposed that in addition to the ANT, VDAC, cyclophilin D, the ATP synthase is part of the mPTP [17,18].

However, this idea has been questioned in recent studies, where some authors showed that mPTP persists in the absence of several subunits of ATP synthase [19,20]. We analyzed the expression levels of ATP synthase by WB and did not find significant differences between control and IPF fibroblasts, suggesting that the content of ATP synthase cannot influence the function of mPTP. Interestingly, when we analyzed the expression of ANT, we found that this protein shows decreased levels in IPF fibroblasts, which could suggest its participation in the mPTP inhibition observed in IPF fibroblasts.

Diverse studies show that drugs that stabilize the conformation of ANT in the cytosol enhanced mPTP opening, whereas others that stabilize ANT in the matrix inhibited mPTP opening by decreasing the sensitivity to $[Ca^{2+}]$. When the ANT is stabilized in the cytosolic conformation by carboxyatractyloside, it provides a structural basis for mPTP formation by increasing sensibility to $[Ca^{2+}]$. While on the other hand, bongkreikic acid, an inhibitor of ANT that stabilizes the matrix conformation, inhibits mPTP opening by decreasing the sensitivity to $[Ca^{2+}]$ [36]. This effect was observed in our results when using atractyloside or bongkreikic acid in the control lung fibroblasts. We observed an increase in apoptosis when stimulated fibroblasts with atractyloside and inhibition with bongkreikic acid.

Other factors that influence the opening of the mPTP may be related to cytochrome c interaction with lipids of the inner mitochondrial membrane or the capacity to accumulate calcium in the mitochondria, as calcium is a well-established mPTP activator. The reduction of mitochondrial calcium release induces mPTP inhibition.

Inhibition of the mPTP augments Ca^{2+} accumulation in mitochondria, stabilizes mitochondrial membrane potential, and defers Ca^{2+} dysregulation [36].

Interestingly, our results on mitochondrial calcium quantification show a marked decrease in mitochondria calcium release in patients with IPF, confirming that mPTP activity decreases in these cells. In addition, we did not observe mitochondrial potential membrane changes, which support that mPTP is inhibited in IPF fibroblasts.

Opening of the mPTP might also stimulate autophagy to eliminate abnormal mitochondria. Thus, the mitochondrial outer membrane recruits the autophagy proteins ATG5 and LC3, not only for mitophagy but also for the anchorage and share of the lipid moieties required for the elongation of the initial phagophore [37]. Interestingly, we have previously found that IPF fibroblasts show a decrease in autophagy caused by activation of the mechanistic target of rapamycin complex 1 (mTORC1) pathway, contributing to the resistance to cell death [38].

As mentioned, we also showed that stimulus with BKA inhibited the mitomycin-induced cell death in control fibroblasts, while the mPTP inductor ATR renders the cell more susceptible to cell death. BKA prevents acidification and is a ligand for the ANT that can inhibit apoptosis. Our results concur with Lui et al., who demonstrated that inhibition of mPTP by cyclosporine A (CsA) and BKA affected p53 translocation in mitochondria, leading to protection against the loss of mitochondrial membrane potential and complex I activity and eventually suppression of apoptosis [39].

We also found that IPF fibroblasts show mitochondrial dysfunction, as evidenced by decreased oxygen consumption and decreased ATP production, although we did not observe significant changes in the ratio ADP/ATP and mitochondrial membrane potential.

The fact that the ADP/ATP ratio does not change suggests that the cell adapts to maintain a minimal mitochondrial activity to supply enough ATP and keep the cell alive with basal transmembrane potential, avoiding cell death through the intrinsic pathway of apoptosis.

These findings agree with those previously reported by Álvarez et al. [40], who found low ATP levels in senescent IPF fibroblasts, which were associated with decreased OCR, diminished glycolytic capacity, and abnormalities in oxidative phosphorylation [28,41].

Considerable evidence indicates that the mitochondrial network organization is associated directly with the bioenergetic function and ROS generation. In this sense, our results showed that IPF fibroblasts exhibited a fragmented mitochondrial network and scarce, thinned, and disordered mitochondria with a few electrodense cristae. Diverse studies have shown that cristae architecture is determined by cristae-shaping proteins and depends on the dimeric state of the ATP-synthase [42]. The formation of mitochondrial cristae increases the mitochondrial surface, locating a higher number of enzyme complexes in the mitochondria, improving oxidative phosphorylation (OXPHOS). Alterations in respiration and changes in ATP levels might be associated with mitochondrial morphology modulators. Benard et al. [43] demonstrated that the silencing of DRP1 in HeLa cells resulted in alterations of the mitochondrial network morphology. This effect was associated with reducing sensitivity to apoptosis inducers, potent inhibition of energy production, abnormal connectivity, and multiple budding areas, which suggested a perturbation of mitochondrial dynamics.

Furthermore, we observed a reduction in coupled respiration and ATP production. Studies with the effect of OXPHOS inhibition on mitochondrial network organization in primary human fibroblasts suggest that it may contribute to these abnormalities. Thus, the formation of vesicles due to the inhibition of complex I by rotenone can be regarded as a direct consequence of impaired OXPHOS function [43]. In general, a highly efficient OXPHOS correlates with a highly interconnected and ramified network and enlarged cristae compartments, whereas low OXPHOS activity and high glycolysis correlate with bulkier, more spherical tubules, and isolated mitochondria, displaying reduced intra-cristae space.

We found alterations in the respiratory chain, but we cannot describe it exactly. Therefore, we propose that it is necessary to study the formation of mitochondrial complexes and respirasomes because there is evidence supporting the fact that cytochrome c can influence the function of the chain. Furthermore, morphology observed in IPF fibroblasts increases the evidence that there are issues with the respiratory chain, since the mitochondrial ridges exhibit lesser electro-density than in control fibroblasts. The relationship between mitochondrial morphology and function has gained significant attention in recent years, and it has been verified that there is a direct relationship between the cristae structure and the respiratory chain.

Mitochondria are very complex organelles that control many diverse functions that, as a whole, define the fate of the cell, and mitochondrial dysfunction is usually understood as an event leading to cell death. However, we found that, on the contrary, mitochondrial dysfunction is associated with resistance to apoptosis in IPF fibroblasts, as it occurs in cancer cells. Therefore, the study of the in-depth mechanisms through which mitochondria dysfunction leads to proliferation or death in different pathologies will be helpful to identify new therapeutic targets against IPF, cancer, or other pathologies.

Tissue fibrosis is likely an evolutionarily conserved adaptive process, and persistent fibrosis almost always accompanies incomplete or unsuccessful regeneration. However, in this case, the underlying mechanisms that contribute to the persistence of myofibroblasts and continuous extracellular matrix accumulation in fibrotic tissues remain poorly understood. A growing body of evidence indicates that one of them is the evasion of apoptosis, which usually occurs during physiological wound healing. However, the molecular pathways that are involved in the apoptosis resistance of myofibroblast in fibrotic tissues are still unclear and may even involve different mechanisms. Some evidence indicates the participation of the extrinsic pathway of apoptosis, but no studies had investigated the role of the intrinsic pathway mediated by mitochondria.

In this context, we thought that changes in the mPTP opening, given its relevance in regulating cell death, could be involved. Our results revealed that mPTP is inhibited in IPF fibroblasts, and that calcium, a well-established activator of mPTP, is decreased and pro-apoptotic proteins such as cytochrome c are released as well. We consider that this finding is relevant to understand some of the biopathological mechanisms that participate in the apoptosis resistance of fibroblasts during progressive fibrosis as in IPF. A better understanding of the molecular composition of the mPTP and apoptosis mechanisms will provide clues for effective and selective therapeutic strategies for the treatment of this devastating disease.

4. Materials and Methods

4.1. Reagents

We purchased the Cell Proliferation Reagent WST-1 (11644807001) from Roche Diagnostics, Mannheim, Germany. The FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit (556547) was from BD Biosciences, San Diego, CA, USA. The Mitochondria Isolation Kit for Cultured Cells (89874), Pierce™ BCA Protein Assay Kit (23225), HRP-anti-goat IgG (611620), and Anti-GAPDH (PA1-987) were from Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA. The Image-IT™ LIVE Mitochondrial Transition Pore Assay Kit (I35103), MitoProbe™ Transition Pore Assay Kit (M34153), ATP Determination Kit (A22066), and tetraethyl benzimidazolyl carbocyanine iodide dye JC-1 (T3168) were from Molecular Probes, Eugene, OR, USA. The ADP/ATP ratio assay kit (MAK135), anti-β-actin (A5441), oligomycin A, rotenone, antimycin A, L-glutamic acid, L(-)-malic acid disodium salt, sodium succinate dibasic hexahydrate, carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazine (FCCP), carbonyl cyanide-3-chlorophenyl hydrazone (CCCP), ethylene glycol-bis (2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA), potassium salt, 4-(2-hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid potassium salt (HEPES), bovine serum albumin (BSA), free fatty acid, magnesium chloride (MgCl₂), potassium phosphate monobasic (KH₂PO₄), cytochrome c, bongkreik acid (BKA), and atractyloside (ATR) were purchased from Sigma-Aldrich from St. Louis, MO, USA. Mitomycin C (sc-3514); anti-VDAC-1 (sc-390996), and anti-caspase-3 (sc-7272) were from Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany. Anti-cytochrome c (612504) and HRP-anti-rabbit IgG (406401) were from BioLegend, San Diego, CA, USA. The anti-caspase-9 (ab32539) was from Abcam Cambridge, MA, USA. HRP-Anti-Mouse IgG (115-035-003) was acquired from Jackson Immuno Research, West Grove, PA, USA.

4.2. Bioethics and Experimental Design

The Bioethics Committee of the Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias approved this research, with ethic approval code B05-21, (20 September 2018). Fibroblasts from IPF patients were obtained from lung biopsies performed for diagnostic purposes; all participants provided informed consent, and their personal and identification data were protected. As controls, healthy lung fibroblasts were obtained by lobectomy from patients without morphological data of interstitial disease, and the commercial human normal fibroblasts line NHLF (Normal Human Lung Fibroblasts CC-2512 Lonza Clonetics) was used. Healthy and IPF lung fibroblasts matched by age were studied under basal conditions and after mitomycin C-induced apoptosis.

4.3. Cell Culture

The fibroblasts were cultured in Ham medium (F-12), supplemented with penicillin (100 U/mL), streptomycin (100 mg/mL), and 10% fetal bovine serum (SFB), and incubated in a humid atmosphere at 37 °C with 5% CO₂, until 80% confluence. Fibroblasts were treated with different doses of mitomycin C (10, 25, or 50 µg/mL) in F-12 medium with 1% SFB at different times (4, 8, 16, and 24 h). Control fibroblasts were incubated in F-12 medium with 1% SFB for the same period. After the treatment, fibroblasts were washed three times with phosphate-buffered saline (PBS) and kept in the F-12 medium for subsequent experiments.

4.4. Cell Viability

Cell viability was assessed using the Cell Proliferation Reagent WST-1 assay following the manufacturer's instructions. Cells were seeded in 96-well plates at a final density of 5×10^3 cells per well in 100 μ L of culture medium. After treatment with mitomycin-C, 10 μ L of WST-1 solution was added to each well, and the cells were incubated for 3 h at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere. The optical density was measured using a multimodal microplate reader (Synergy HTX BioTek, Winooski, VT, USA) at a wavelength of 450 nm.

4.5. Cell Apoptosis

Fibroblasts were stimulated with mitomycin-C for 24 h and stained with Annexin V-IP for flow cytometric analysis. Staurosporine (1 μ M) was used as a positive control. Cells were acquired using a FACSAria flow cytometer (BD Biosciences). Data were analyzed using FlowJo 7.8 software (FlowJo, Ashland, OR, USA, Becton Dickinson and Company).

4.6. Preparation of the Cytosolic and Mitochondrial Fractions

Control and IPF fibroblasts were cultured in a cell culture flask of 175 cm² until 80% confluence (approximately two or three flasks by experimental condition). Fibroblasts were stimulated with mitomycin C (25 μ g/mL) for 4 and 24 h. After treatment with mitomycin C, the cells were washed and trypsinized, and their viability was analyzed by a Trypan Blue exclusion test. For each experimental condition, 1×10^7 viable cells were used.

The isolation of mitochondrial and cytosolic fractions of fibroblast cultures was performed with the Mitochondria Isolation Kit for Cultured Cells, following the manufacturer's instructions. For this assay, we used a Dounce homogenizer to disrupt cells, and subsequently, we separated the fractions by differential centrifugation. The mitochondrial and cytosolic fractions were used for analysis by Western blotting. The mitochondrial pellet was lysed with 50 μ L of 2% detergent 3-(3-cholamidopropyl) dimethylammonio)-1-propane sulfonate (CHAPS) in Tris buffer saline (TBS; 25 mM Tris, 0.15 M NaCl; pH: 7.2). The supernatant contained the soluble mitochondrial protein that was quantified by the Pierce BCA Protein Assay Kit.

4.7. Western Blotting

Cytosolic and mitochondrial fractions and cell lysates were analyzed by Western blot. Cellular lysates from human normal and IPF fibroblasts were prepared using radioimmuno-precipitation assay buffer (RIPA) with phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) and protease inhibitors. The protein concentration was quantified using the Bradford assay. Briefly, 16 μ g of protein were separated by Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide SDS-PAGE (110 V for 1 h at room temperature) and transferred onto a nitrocellulose membrane using a wet chamber blotting system. The nitrocellulose membranes were blocked with 5% skim milk for 1 h and afterwards incubated overnight at 4 °C with the primary antibodies: anti-cytochrome c (1:500); anti-caspase 9 (1:500); anti-VDAC-1 (1:100); anti-Bax (1:100); anti-ATP5A (1:500); anti-ANT1 (1:1000); anti-GAPDH (1:2000); anti- β -actin (1:10,000). The secondary antibodies were incubated for 1 h at room temperature with the following dilutions: anti-mouse (1:10,000), anti-rabbit (1:2500), and anti-goat (1:1000).

4.8. cytochrome c Release

The cytosolic fraction was filtered through a polyvinylidene fluoride membrane PVDF (0.45 μ M), and the cytochrome c content was determined by high-performance liquid chromatography (HPLC) using a 300 Å Delta Pack C4 column with 5 μ M particles (3.9 \times 150 mm; Waters). A gradient of 30% acetonitrile in water with trifluoroacetic acid (0.1% *vol/vol*) to 70% acetonitrile in water with trifluoroacetic acid (0.1% *vol/vol*) over 15 min with a flow rate of 1 mL/min was used as was described elsewhere [44]. cytochrome c was detected at 393 nm, and its concentration was quantified using a standard curve of cytochrome c from bovine heart.

4.9. mPTP Opening

The mPTP opening was assessed by cobalt quenching of calcein-AM fluorescence. After treatment, cells were loaded with calcein-AM (1 μ M, Molecular Probes, Life Technologies) at 37 °C in the dark, CoCl_2 (1 mM) was added, and cells were incubated for another 15 min. Then, the fluorescence of 30,000 cells for each experiment was measured with a flow cytometer (FACS Aria II, BD, San Jose, CA, USA), and the data were processed with the FlowJo software. For imaging experiments, 1×10^4 fibroblasts were cultured on glass-bottom culture dishes. First, cells were loaded with calcein-AM (1 μ M) and MitoTracker Red (150 nM), with or without CoCl_2 (1 mM), in Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) 1X for 15 min at 37 °C. Then, cells were washed three times with HBSS 1X. Live images of the cells were captured with the Olympus FluoView FV1000 Confocal Microscope and analyzed using the ImageJ software version 1.53i (Bethesda, MD, USA).

4.10. Intracellular Calcium Concentration Assay ($[\text{Ca}^{2+}]_i$)

To evaluate $[\text{Ca}^{2+}]_i$ changes induced by trifluoromethoxy carbonyl cyanide phenylhydrazide (FCCP) in control and IPF fibroblasts, cells were plated in round coverslips coated with poly-L-Lysine and cultured for 2 days. Then, cells were loaded with Fura 2-AM (2.5 μ M) in a low concentration of Ca^{2+} (0.1 mM) and at room temperature. Then, fibroblasts were incubated for 1 h at 37 °C under a 5% CO_2 atmosphere. Afterward, cells were transferred to a heated perfusion chamber (37 °C) mounted on an inverted Nikon Diaphot 200 microscope (Nikon, Tokyo, Japan). Cells were recorded under continuous perfusion and carbogen bubbling (to maintain pH at 7–4) at a rate of 2–2.5 mL/min with Krebs–Ringer buffer (NaCl 118 mM, NaHCO_3 25 mM, KCl 4.7 mM, KH_2PO_4 1.2 mM, MgSO_3 1.2 mM, glucose 11 mM, and CaCl_2 2.5 mM) at 37 °C. After the recording of basal fluorescence, cells were exposed to FCCP 1 μ M. Next, fibroblasts loaded with Fura 2-AM were alternately submitted to Xe lamp at 340 nm and 380 nm excitation light, and the emission fluorescence was measured at 510 nm using a microphotometer (model D-104), from Photon Technology International (PTI, Princeton, NJ, USA). Fluorescence was measured at intervals of 0.5 s for 10 min, and the intracellular Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) was calculated according to the Grynkiewicz [45] formula as follows:

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = bKd (R - R_{\min}) / (R_{\max} - R)$$

where Kd is the dissociation constant of Fura-2AM, b is the ratio of fluorescent signals (R) at 380 nm for Ca^{2+} -free and Ca^{2+} -saturated dye, R_{\min} is R in the absence of external Ca^{2+} , and R_{\max} is R in saturating $[\text{Ca}^{2+}]_i$ [46]. These parameters were determined *in vitro*. The mean 340–380 nm fluorescence ratios for R_{\max} (6.06) and R_{\min} (0.39) were obtained by exposing the cells to Ca^{2+} (10 mM) in the presence of ionomycin (10 μ M), and Ca^{2+} free Krebs with EGTA (10 mM), respectively. The fluorescence ratio at 380 nm light excitation in Ca^{2+} free medium and Ca^{2+} saturated cells was 4.23. The Kd of Fura 2-AM was assumed to be 386 nM [46]. To evaluate the Ca^{2+} response to FCCP, cells were perfused with 1 μ M FCCP to stimulate the mitochondrial permeability transition pore (mPTP). To pharmacologically determine if mPTP were involved in this response, a blocker cyclosporin A (CspA) 10 μ M plus ATP was used.

4.11. Cell Respirometry

4.11.1. Respirometry in Non-Permeabilized Cells

The oxygen consumption experiments in intact cells were performed as previously described using a high-resolution respirometry O2 k meter (Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria) [47]. Briefly, measures were made at 37 °C using 2 mL of culture medium. The respiratory parameters were defined as (a) basal respiration, corresponding to the oxygen consumption in the presence only of cells, (b) the leak of the respiration, corresponding to cellular oxygen consumption in the presence of 5 μ M oligomycin, (c) respiratory control corresponding to the ratio basal/leak, (d) the maximum uncoupled respiration was

achieved by titrations of 0.5 μL of 1 μM CCCP. All parameters were normalized by the number of cells and corrected by the non-mitochondrial residual respiration, which was obtained by adding 5 μM rotenone plus 5 μM antimycin A.

4.11.2. Respirometry in Permeabilized Cells with Digitonin

The oxygen consumption in permeabilized fibroblasts was performed as was previously described by Kuznetsov et al. [48]. Control and IPF fibroblasts were seeded in standard conditions, and the trypan blue exclusion test was used to determine cell density. For each experimental condition, 5×10^5 fibroblasts were added, and the system was equilibrated again for 5 min. The reaction was carried out in respiration medium (EGTA 0.5 mM; MgCl_2 3 mM; KH_2PO_4 10 mM; HEPES 20 mM; BSA 1 g; mannitol 110 mM for liter) pH 7.1, adjusted with 5 N KOH. Next, the fibroblasts were permeabilized with digitonin (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and incubated for 5 min at 37 $^\circ\text{C}$. After the addition of digitonin, the respiration rate should markedly decline for 3–5 min. Then, glutamate/malate (10 mM/5 mM) was used as a substrate for complex I activity, ADP was added to induce ATP production, and the respiration was inhibited by 0.5 μM rotenone, which is a specific inhibitor of complex I. Afterward, succinate (10 mM) was used as a substrate to induce complex II supported respiration, ADP was added to induce ATP production, and respiration was inhibited with oligomycin (5 μM) (state 4). Finally, 2 mM ADP was added for maximal (state 3) mitochondrial respiration. The respiratory control ratio (RCR) was calculated by dividing state 3/state 4 respiratory values.

4.12. Mitochondrial Membrane Potential ($\Delta\psi_m$)

Mitochondrial $\Delta\psi$ was measured using JC-1, which is a fluorescent dye that exhibits potential-dependent accumulation in mitochondria. Polarized mitochondria are marked by punctate orange-red fluorescent staining. On depolarization, the orange-red punctate staining is replaced by diffuse green monomer fluorescence. Thus, mitochondrial depolarization is indicated by a decrease in the red/green fluorescence intensity ratio. Briefly, IPF and control fibroblasts were stained with JC-1 in Ham F-12 culture medium for 30 min at 37 $^\circ\text{C}$ in the dark. Then, cells were washed twice with PBS and stimulated with the uncoupling agent FCCP (100 μM) or oligomycin (5 μM). Fibroblasts were observed with a confocal microscope using the 20x objective, and both green (520 nm) and red (572 nm) fluorescence were measured to detect the emission shift. This shift was calculated as the red/green fluorescence intensity ratio. Images were analyzed using ImageJ software.

4.13. ATP Production

ATP production was determined quantitatively in IPF and control fibroblasts using the ATP Determination Kit, which uses a bioluminescent assay. For this assay, 10,000/well cells were plated on a white 96-well microplate with a clear bottom, and the assay was performed following the manufacturer's instructions. The bioluminescence was recorded using a multimodal microplate reader (Synergy HTX BioTek, Winooski, VT, USA) in the luminometer mode.

4.14. ADP/ATP Ratio

The ADP/ATP ratio in IPF and control fibroblasts was measured using the ADP/ATP ratio assay kit. Briefly, IPF and control fibroblasts were plated at a density of 10,000 cells/ cm^2 in a white 96-well microplate with a clear bottom. Following overnight incubation, the ADP/ATP ratio was determined following the manufacturer's guidelines. Next, the bioluminescence was measured using a multimodal microplate reader (Synergy HTX BioTek, Winooski, VT, USA).

4.15. Transmission Electron Microscopy (TEM)

TEM was done with the support of the Center for Advanced Microscopy (Northwestern University). In brief, lung fibroblasts were cultured on Thermanox coverslips placed in

a 24-well plate. After 48 h of incubation, samples were fixed in 0.1 M sodium cacodylate (pH 7.2) containing 2% paraformaldehyde and 2.5% glutaraldehyde and post-fixed with 2% osmium tetroxide and stained with 3% uranyl acetate. Samples were dehydrated in ascending ethanol grades, transitioned with a 1:1 mixture of ethanol and resin, and embedded in the resin mixture of the EMbed-812 kit. Using a Leica Ultracut UC6 ultramicrotome, ultra-thin sections (70 nm) were collected on 200 mesh copper grids and post-stained with 3% uranyl acetate and Reynolds lead citrate. Ultra-thin sections were used to obtain images from each sample with the Tecnai G2 Spirit transmission electron microscope (FEI Company, Hillsboro, OR, USA) at 120 kV. The length of mitochondria was used to determine mitochondrial elongation mean per image; at least 70 mitochondria per condition were measured. Images were analyzed using the ImageJ software.

4.16. Statistical Analysis

All the data were expressed as the mean \pm standard error mean (SEM). Two-way or one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni test assessed the significance of the differences. To analyze the significant differences between the control and IPF group, we used an unpaired *t*-test. *p*-values of less than 0.05 were considered to be statistically significant. Statistical analysis was performed using the GraphPad Prism 5.01 software (San Diego, CA, USA).

Author Contributions: Conceptualization, M.E.H., M.O.-I., A.P. and M.S.; methodology, E.R.L.-G., C.B., O.E.A.-T., Y.R., E.F.-S., C.M.-M.; software, A.S.-A., E.R.L.-G., M.O.-I. and Y.R.; validation, M.S., E.R.L.-G., C.B., J.P.-C. and M.E.H.; formal analysis, M.S., E.R.L.-G., A.P., M.O.-I., V.C.; investigation, E.R.L.-G., C.B., A.S.-A., J.P.-C.; resources, M.M., J.P.-C., A.P. and M.S.; data curation, A.S.-A., O.E.A.-T., E.F.-S. and C.M.-M.; writing—original draft preparation, A.P., M.S., E.R.L.-G., M.O.-I. and M.E.H.; writing—review and editing, A.P., M.S., E.R.L.-G.; visualization, V.C., M.M., J.P.-C.; supervision, A.P., M.S., M.E.H., J.P.-C.; project administration, A.P., M.S.; funding acquisition, A.P., M.S. and M.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and was approved by the Bioethics Committee of Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas” (protocol code (B05-21), 20 September 2018).

Informed Consent Statement: Fibroblasts from IPF patients were obtained from lung biopsies performed for diagnostic purposes; healthy lung fibroblasts were obtained by lobectomy from patients without morphological data of interstitial disease; all participants provided informed consent, and their personal and identification data were protected.

Data Availability Statement: All the data are included in the manuscript.

Acknowledgments: This paper constitutes a partial fulfillment of Erika Rubi Luis-Garcia to obtain the PhD “Doctor en Ciencias del Posgrado en Ciencias Biológicas Experimentales”, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). We thank chemist Damaris Romero Rodriguez (Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas”) for their continuous support and technical assistance in flow cytometry.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Raghu, G.; Remy-Jardin, M.; Myers, J.L.; Richeldi, L.; Ryerson, C.J.; Lederer, D.J.; Behr, J.; Cottin, V.; Danoff, S.K.; Morell, F.; et al. Diagnosis of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. An Official ATS/ERS/JRS/ALAT Clinical Practice Guideline. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2018**, *198*, e44–e68. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. King, T.E.; Pardo, A.; Selman, M. Idiopathic pulmonary fibrosis. *Lancet* **2011**, *378*, 1949–1961. [[CrossRef](#)]
3. Selman, M.; Pardo, A. Revealing the pathogenic and aging-related mechanisms of the enigmatic idiopathic pulmonary fibrosis: An integral model. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2014**, *189*, 1161–1172. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Pardo, A.; Selman, M. The Interplay of the Genetic Architecture, Aging, and Environmental Factors in the Pathogenesis of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2021**, *64*, 163–172. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

5. Bueno, M.; Lai, Y.-C.; Romero, Y.; Brands, J.; Croix, C.M.S.; Kamga, C.; Corey, C.; Herazo-Maya, J.D.; Sembrat, J.; Lee, J.; et al. PINK1 deficiency impairs mitochondrial homeostasis and promotes lung fibrosis. *J. Clin. Invest.* **2015**, *125*, 521–538. [[CrossRef](#)]
6. Darby, I.A.; Zakuan, N.; Billet, F.; Desmoulière, A. The myofibroblast, a key cell in normal and pathological tissue repair. *Cell Mol. Life Sci.* **2016**, *73*, 1145–1157. [[CrossRef](#)]
7. Jiang, C.; Liu, G.; Cai, L.; Deshane, J.; Antony, V.; Thannickal, V.J.; Liu, R.M. Divergent regulation of ATII cell and fibroblast apoptosis by PAI-1 in lung fibrosis. *Am. J. Pathol.* **2021**, *191*, 1227–1239. [[CrossRef](#)]
8. Im, J.; Kim, K.; Hergert, P.; Nho, R.S. Idiopathic pulmonary fibrosis fibroblasts become resistant to Fas ligand-dependent apoptosis via the alteration of decoy receptor 3. *J. Pathol.* **2016**, *240*, 25–37. [[CrossRef](#)]
9. Ramos, C.; Montaña, M.; García-Álvarez, J.; Ruiz, V.; Uhal, B.D.; Selman, M.; Pardo, A. Fibroblasts from idiopathic pulmonary fibrosis and normal lungs differ in growth rate, apoptosis, and tissue inhibitor of metalloproteinases expression. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2001**, *24*, 591–598. [[CrossRef](#)]
10. Sisson, T.H.; Maher, T.M.; Ajayi, I.O.; King, J.E.; Higgins, P.D.; Booth, A.J.; Sagana, R.L.; Huang, S.K.; White, E.S.; Moore, B.; et al. Increased survivin expression contributes to apoptosis-resistance in IPF fibroblasts. *Adv. Biosci. Biotechnol.* **2012**, *3*, 657–664. [[CrossRef](#)]
11. Malsin, E.S.; Kamp, D.W. The mitochondria in lung fibrosis: Friend or foe? *Transl. Res.* **2018**, *202*, 1–23. [[CrossRef](#)]
12. Galluzzi, L.; Zamzami, N.; de La Motte Rouge, T.; Lemaire, C.; Brenner, C.; Kroemer, G. Methods for the assessment of mitochondrial membrane permeabilization in apoptosis. *Apoptosis* **2007**, *12*, 803–813. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Bernardi, P. Mitochondrial Transport of Cations: Channels, Exchangers, and Permeability Transition. *Physiol. Rev.* **1999**, *79*, 1127–1155. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Briston, T.; Selwood, D.; Szabadkai, G.; Duchon, M.R. Mitochondrial Permeability Transition: A Molecular Lesion with Multiple Drug Targets. *Trends Pharmacol. Sci.* **2019**, *40*, 50–70. [[CrossRef](#)]
15. Crompton, M.; Virji, S.; Ward, J. Cyclophilin-D binds strongly to complexes of the voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide translocase to form the permeability transition pore. *JBC J. Biol. Inorg. Chem.* **1998**, *258*, 729–735. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Woodfield, K.; Rück, A.; Brdiczka, D.; Halestrap, A.P. Direct demonstration of a specific interaction between cyclophilin-D and the adenine nucleotide translocase confirms their role in the mitochondrial permeability transition. *Biochem. J.* **1998**, *336*, 287–290. [[CrossRef](#)]
17. Urbani, A.; Giorgio, V.; Carrer, A.; Franchin, C.; Arrigoni, G.; Jiko, C.; Abe, K.; Maeda, S.; Shinzawa-Itoh, K.; Bogers, J.F.M.; et al. Purified F-ATP synthase forms a Ca²⁺-dependent high-conductance channel matching the mitochondrial permeability transition pore. *Nat. Commun.* **2019**, *1*, 4341. [[CrossRef](#)]
18. Pinke, G.; Zhou, L.; Sazanov, L.A. Cryo-EM structure of the entire mammalian F-type ATP synthase. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2020**, *27*, 1077–1085. [[CrossRef](#)]
19. Carroll, J.; He, J.; Ding, S.; Fearnley, I.M.; Walker, J.E. Persistence of the permeability transition pore in human mitochondria devoid of an assembled ATP synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2019**, *116*, 12816–12821. [[CrossRef](#)]
20. He, J.; Carroll, J.; Ding, S.; Fearnley, I.M.; Walker, J.E. Permeability transition in human mitochondria persists in the absence of peripheral stalk subunits of ATP synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2017**, *114*, 9086–9091. [[CrossRef](#)]
21. Bernardi, P.; Di Lisa, F. The mitochondrial permeability transition pore: Molecular nature and role as a target in cardioprotection. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2015**, *78*, 100–106. [[CrossRef](#)]
22. Rasola, A.; Bernardi, P. The mitochondrial permeability transition pore and its adaptive responses in tumor cells. *Cell Calcium* **2014**, *56*, 437–445. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Narita, M.; Shimizu, S.; Ito, T.; Chittenden, T.; Lutz, R.J.; Matsuda, H.; Tsujimoto, Y. Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome c release in isolated mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 14681–14686. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Crompton, M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem. J.* **1999**, *341*, 233–249. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Yan, C.; Kong, D.; Ge, D.; Zhang, Y.; Zhang, X.; Su, C.; Cao, X. Mitomycin C induces apoptosis in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes via a mitochondrial-mediated pathway. *Cell Physiol. Biochem.* **2015**, *35*, 1125–1136. [[CrossRef](#)]
26. Sun, Y.; Ge, Y.; Fu, Y.; Yan, L.; Cai, J.; Shi, K.; Cao, X.; Lu, C. Mitomycin C induces fibroblasts apoptosis and reduces epidural fibrosis by regulating miR-200b and its targeting of RhoE. *Eur. J. Pharmacol.* **2015**, *765*, 198–208. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Schuliga, M.; Pechkovsky, D.; Read, J.; Waters, D.W.; Blokland, K.; Reid, A.; Hogaboam, C.; Khalil, N.; Burgess, J.; Prêle, C.M.; et al. Mitochondrial dysfunction contributes to the senescent phenotype of IPF lung fibroblasts. *J. Cell. Mol. Med.* **2018**, *22*, 5847–5861. [[CrossRef](#)]
28. Cavalcante, G.C.; Schaan, A.P.; Cabral, G.F.; Santana-da-Silva, M.N.; Pinto, P.; Vidal, A.F.; Ribeiro-Dos-Santos, Â. A Cell's Fate: An Overview of the Molecular Biology and Genetics of Apoptosis. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 4133. [[CrossRef](#)]
29. Schug, Z.; Gottlieb, E. Cardiolipin acts as a mitochondrial signalling platform to launch apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) Biomembr.* **2009**, *1788*, 2022–2031. [[CrossRef](#)]
30. Ott, M.; Robertson, J.D.; Gogvadze, V.; Zhivotovsky, B.; Orrenius, S. cytochrome c release from mitochondria proceeds by a two-step process. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 1259–1263. [[CrossRef](#)]

31. Vempati, U.D.; Han, X.; Moraes, C.T. Lack of cytochrome c in Mouse Fibroblasts Disrupts Assembly/Stability of Respiratory Complexes I and IV. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 4383–4391. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Vempati, U.D.; Diaz, F.; Barrientos, A.; Narisawa, S.; Mian, A.M.; Millán, J.L.; Boise, L.; Moraes, C.T. Role of cytochrome c in Apoptosis: Increased Sensitivity to Tumor Necrosis Factor Alpha Is Associated with Respiratory Defects but Not with Lack of cytochrome c Release. *Mol. Cell. Biol.* **2007**, *27*, 1771–1783. [[CrossRef](#)]
33. Mathupala, S.P.; Ko, Y.H.; Pedersen, P.L. Hexokinase II: Cancer's double-edged sword acting as both facilitator and gate-keeper of malignancy when bound to mitochondria. *Oncogene* **2006**, *25*, 4777–4786. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Bocchino, M.; Agnese, S.; Fagone, E.; Svegliati, S.; Grieco, D.; Vancheri, C.; Gabrielli, A.; Sanduzzi, A.; Avvedimento, E.V. Reactive Oxygen Species Are Required for Maintenance and Differentiation of Primary Lung Fibroblasts in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *PLoS ONE* **2010**, *5*, e14003. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Norman, K.G.; Canter, J.A.; Shi, M.; Milne, G.L.; Morrow, J.D.; Sligh, J.E. Cyclosporine A suppresses keratinocyte cell death through MPTP inhibition in a model for skin cancer in organ transplant recipients. *Mitochondrion* **2010**, *10*, 94–101. [[CrossRef](#)]
36. Brustovetsky, N. The role of adenine nucleotide translocase in the mitochondrial permeability transition. *Cells* **2020**, *12*, 2686. [[CrossRef](#)]
37. Ghavami, S.; Shojaei, S.; Yeganeh, B.; Ande, S.R.; Jangamreddy, J.R.; Mehrpour, M.; Christofferson, J.; Chaabane, W.; Moghadam, A.R.; Kashani, H.H.; et al. Autophagy and apoptosis dysfunction in neurodegenerative disorders. *Prog. Neurobiol.* **2014**, *112*, 24–49. [[CrossRef](#)]
38. Romero, Y.; Bueno, M.; Ramirez, R.; Álvarez, D.; Sembrat, J.C.; Goncharova, E.A.; Rojas, M.; Selman, M.; Mora, A.L.; Pardo, A. mTORC1 activation decreases autophagy in aging and idiopathic pulmonary fibrosis and contributes to apoptosis resistance in IPF fibroblasts. *Aging Cell* **2016**, *15*, 1103–1112. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Liu, J.; Clair, D.K.S.; Gu, X.; Zhao, Y. Blocking mitochondrial permeability transition prevents p53 mitochondrial translocation during skin tumor promotion. *FEBS Lett.* **2008**, *582*, 1319–1324. [[CrossRef](#)]
40. Álvarez, D.; Cárdenas, N.; Sellares, J.; Bueno, M.; Corey, C.; Hanumanthu, V.S.; Peng, Y.; D'Cunha, H.; Sembrat, J.; Nourai, M.; et al. IPF lung fibroblasts have a senescent phenotype. *Am. J. Physiol. Cell. Mol. Physiol.* **2017**, *313*, L1164–L1173. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Bueno, M.; Calyeca, J.; Rojas, M.; Mora, A.L. Mitochondria dysfunction and metabolic reprogramming as drivers of idiopathic pulmonary fibrosis. *Redox Biol.* **2020**, *33*, 101509. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Paumard, P.; Vaillier, J.; Couлары, B.; Schaeffer, J.; Soubannier, V.; Mueller, D.M.; Brèthes, D.; di Rago, J.P.; Velours, J. The ATP synthase is involved in generating mitochondrial cristae morphology. *EMBO J.* **2002**, *21*, 221–230. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Benard, G.; Bellance, N.; James, D.; Parrone, P.; Fernandez, H.; Letellier, T.; Rossignol, R. Mitochondrial bioenergetics and structural network organization. *J. Cell Sci.* **2007**, *120*, 838–848. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Ruiz-Ramírez, A.; Barrios-Maya, M.A.; López-Acosta, O.; Molina-Ortiz, D.; El-Hafidi, M. cytochrome c release from rat liver mitochondria is compromised by increased saturated cardiolipin species induced by sucrose feeding. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2015**, *309*, E777–E786. [[CrossRef](#)]
45. Grynkiewicz, G.; Poenie, M.; Tsien, R.Y. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* **1985**, *260*, 3440–3450. [[CrossRef](#)]
46. Kajita, J.; Yamaguchi, H. Calcium mobilization by muscarinic cholinergic stimulation in bovine single airway smooth muscle. *Am. J. Physiol. Content Lung Cell. Mol. Physiol.* **1993**, *264*, L496–L503. [[CrossRef](#)]
47. Doerrier, C.; Garcia-Souza, L.F.; Krumschnabel, G.; Wohlfarter, Y.; Mészáros, A.T.; Gnaiger, E. High-Resolution Fluorescence Spectrometry and OXPHOS Protocols for Human Cells, Permeabilized Fibers from Small Biopsies of Muscle, and Isolated Mitochondria. *Methods Mol. Biol.* **2018**, *1782*, 31–70.
48. Kuznetsov, A.V.; Veksler, V.; Gellerich, F.N.; Saks, V.; Margreiter, R.; Kunz, W. Analysis of mitochondrial function in situ in permeabilized muscle fibers, tissues and cells. *Nat. Protoc.* **2008**, *3*, 965–976. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]