

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO**



**ACOPLAMIENTO EXCITACIÓN-METABOLISMO:
DESDE LA DESPOLARIZACIÓN DE LA MEMBRANA
CELULAR A LOS CAMBIOS EN LA FUNCIÓN
MITOCONDRIAL EN MÚSCULO ESQUELÉTICO ADULTO**

ALEXIS RODRIGO DÍAZ VEGAS

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS
BIOMEDICAS**

Directores de Tesis: Dr. Enrique Jaimovich – Dr. Ariel Contreras

2018

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO

**INFORME DE APROBACION TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS
BIOMEDICAS**

Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina, que la Tesis de Doctorado en Ciencias Biomédicas presentada por el candidato

ALEXIS RODRIGO DÍAZ VEGAS

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de **Doctor en Ciencias Biomédicas** en Examen de Defensa de Tesis rendido el día 27 de marzo del 2018.

Prof. Dr. Enrique Jaimovich P.

Director de tesis

Prof. Dr. Ariel Contreras F.

Director de Tesis

COMISION INFORMANTE DE TESIS

PROF. DR. MARIO CHIONG

PROF. DR. FELIPE BARROS

PROF. DRA. LISETTE LEYTON

PROF. DR. JULIO CESAR CÁRDENAS

Presidente Comisión de Examen

Dedicada a mi familia y amigos.

A Daniela, mi amor, gracias por acompañarme, escucharme, aconsejarme y compartir conmigo cada instante de este camino.

“Quién no sabe lo que busca, no entiende lo que encuentra”

Claude Bernard

AGRADECIMIENTOS

Gracias al Dr. Ariel Contreras, por apoyarme durante el desarrollo de este trabajo y por tomarte el tiempo de enseñarme desinteresadamente desde los aspectos más básicos del laboratorio hasta aquellos más complejos. Gracias por confiar en mí y permitirme crecer, tanto en lo científico así como en lo personal.

Gracias al Dr. Enrique Jaimovich por abrirme las puertas de su laboratorio y ser un guía permanente durante el desarrollo de esta tesis. Gracias por las conversaciones y discusiones que hemos tenido, y que han aportado de forma invaluable a mi formación.

Gracias a los miembros del laboratorio, por sus consejos, críticas, enseñanzas, y palabras de apoyo. Ustedes han sido una contribución fundamental para mi desarrollo científico y personal.

FINANCIAMIENTO

- Proyecto CONICYT Beca para Estudios de Doctorado en Chile N° 21150604.
- Proyecto FONDECYT de Iniciación en Investigación N° 11130267
- Proyecto FONDECYT Regular N° 1151293
- Beca de Mejoramiento de la Calidad y la Equidad de la Educación Superior (Mecesus), Ministerio de Educación, Chile 2015.

ÍNDICE

RESUMEN	10
ABSTRACT.....	12
INTRODUCCIÓN:	14
Estructura y función mitocondrial en el músculo esquelético	15
Transitorios de calcio en el músculo esquelético	18
Papel del Ca ²⁺ en el metabolismo mitocondrial	21
Mecanismos que modulan la captación mitocondrial de Ca ²⁺	23
Papel del complejo MCU en el músculo esquelético	26
HIPÓTESIS	28
OBJETIVO GENERAL.....	28
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
MATERIALES Y MÉTODOS	29
Aislamiento de fibras musculares adultas de ratón	29
Protocolo de electroporación	29
Tasa de consumo de oxígeno	30
Imágenes en tiempo real	31
Medición de calcio mitocondrial	32
Medición de calcio citosólico	33

Mediciones del $\Delta\psi_{mt}$	33
Fotoliberación de IP_3 enjaulado	34
Inmunofluorescencia indirecta	34
Western blot.....	35
Análisis de los datos	36
RESULTADOS	37
La despolarización aumenta la tasa de consumo de oxígeno en fibras musculares esqueléticas	37
El IP_3R y el $RyR1$ son necesarios para aumentar el Ca^{2+} mitocondrial posterior a la despolarización.....	40
La activación del $RyR1$ pero no del IP_3R es necesaria para aumentar el consumo de O_2 mitocondrial después de la despolarización	42
Distribución heterogénea de proteínas intramitocondriales y manejo diferencial de Ca^{2+} entre mitocondrias ss e imf.....	44
Manejo heterogéneo del $\Delta\psi_{mt}$ y Ca^{2+} en mitocondrias ss e imf inducido por despolarización.	46
DISCUSIÓN	48
El papel del IP_3R y del $RyR1$ sobre el aumento de	

calcio mitocondrial inducido por despolarización.....	48
El papel de los canales intracelulares de calcio	
en el aumento de OCR después de la despolarización.....	49
Heterogeneidad de poblaciones mitocondriales	
en fibras de músculo esquelético adulto.....	53
Preguntas abiertas.....	57
CONCLUSIÓN	58
BIBLIOGRAFÍA	59

ÍNDICE DE FIGURA

FIGURAS PRINCIPALES	65
Figura 1. La despolarización promueve el consumo de oxígeno en las fibras musculares esqueléticas.	66
Figura 2. Dinámica mitocondrial de Ca^{2+} visualizada con Cepia3mt.	68
Figura 3. El IP_3R y el $RyR1$ participan en el aumento de Ca^{2+} mitocondrial después de la despolarización.	71
Figura 5. Heterogeneidad en las proteínas intramitocondriales y manejo de calcio entre mitocondrias SS e IFM en fibras musculares adultas.	75
Figura 6. $\Delta\psi_m$ parece propagarse desde las regiones superficiales hacia la zona central de la fibra muscular.	77
FIGURAS SUPLEMENTARIAS	78
Fig. S1. La despolarización con K^+ induce una señal transitoria de Ca^{2+} mitocondrial.	78
Fig. S2. La estimulación con K^+ no afecta la generación de transitorios de ca^{2+} citoplasmáticos inducidos por ES.	79
Fig. S3. Dantroleno previene el aumento de Ca^{2+} citoplasmáticos inducido por ES.	80
Fig. S4. Eficiencia de silenciamiento del IP_3R1 en la fibra del músculo esquelético adulto.	81

RESUMEN

Introducción: Es importante dilucidar los mecanismos que vinculan la contracción de la fibra con la síntesis de ATP para comprender la función del músculo esquelético. Las mitocondrias muestran una arquitectura particular en las fibras musculares esqueléticas. Una gran fracción reside entre el sarcolema y las miofibrillas, esta fracción se conoce como mitocondrias subsarcolemales. Una segunda población se encuentra entre las miofibrillas, donde la producción de ATP es esencial para la contracción e interactúa estrechamente con las estructuras de la tríada. Esta segunda población se conoce como mitocondrias intermiofibrilares. Sin embargo, la interacción funcional entre estas poblaciones mitocondriales aún es desconocida. **Objetivo:** Determinar el efecto de la despolarización de la membrana celular sobre el manejo del Ca^{2+} mitocondrial y su relación con la función mitocondrial en fibras musculares esqueléticas adultas. **Métodos:** Se utilizaron fibras musculares aisladas desde el músculo *flexor digitorum brevis* (FDB). Los niveles de Ca^{2+} citoplasmáticos y en la matriz mitocondrial se evaluaron utilizando herramientas moleculares específicas para cada compartimento. El papel de los canales intracelulares de Ca^{2+} se valoró usando tanto inhibidores farmacológicos específicos como herramientas genéticas. El consumo de O_2 y el potencial de membrana mitocondrial se detectaron utilizando SeaHorse System y sondas fluorescentes respectivamente. **Resultados:** En las fibras musculares esqueléticas aisladas, la despolarización aumentó los niveles citoplasmáticos y mitocondriales de Ca^{2+} . La captación mitocondrial de Ca^{2+} requirió de la activación tanto de los canales de Ca^{2+} IP_3R como RyR1. Además, la inhibición de cualquiera de los dos canales disminuyó la

tasa de consumo de O_2 basal, pero solo la inhibición de RyR1 previno el aumento del consumo de O_2 ligado a la síntesis de ATP. Las señales de Ca^{2+} inducidas por despolarización se acompañaron de una reducción en el potencial de membrana mitocondrial en las mitocondrias subsarcolemales; Las señales de Ca^{2+} se propagaron hacia las mitocondrias intermiofibrilares, donde el potencial de membrana mitocondrial aumentó. Los resultados son compatibles con una propagación dependiente de Ca^{2+} del potencial de membrana mitocondrial, desde la superficie hacia el centro de la fibra muscular. **Conclusión:** La despolarización de la fibra muscular esquelética aumenta el consumo mitocondrial de O_2 y los niveles de Ca^{2+} mitocondrial, este último efecto depende tanto de la activación del IP3R así como del RyR1. La activación del RyR1, pero no del IP3R, es necesaria para el aumento del consumo de O_2 inducido por despolarización. La propagación del potencial de membrana mitocondrial desde la superficie hacia el centro de la fibra podría tener un papel crítico en el control del metabolismo mitocondrial, tanto en reposo como después de la despolarización, formando parte de un proceso llamado acoplamiento "excitación-metabolismo" en las fibras del músculo esquelético.

Este mecanismo sería fundamental para mantener la bioenergética del músculo esquelético, manteniendo el equilibrio entre los requerimientos y la síntesis de ATP, permitiendo así sostener la función muscular frente a las demandas ambientales.

ABSTRACT

Introduction: It is important to elucidate the mechanisms that link the contraction of skeletal muscle fiber with the synthesis of ATP to understand the function of skeletal muscle. Mitochondria show a particular architecture in the skeletal muscle fibers. A large fraction resides between the sarcolemma and the myofibrils, this fraction is known as subsarcolemmal mitochondria. A second population is found among the myofibrils, where the production of ATP is essential for contraction and interacts closely with the structures of the triad. This second population is known as intermyofibrillar mitochondria. However, the functional interaction between these mitochondrial populations is still unknown. **Objective:** To determine the effect of depolarization of the cell membrane on mitochondrial Ca^{2+} handling and its relationship with mitochondrial function in adult skeletal muscle fibers. **Methods:** Muscle fibers isolated from flexor digitorum brevis muscle (FDB) were used. Cytoplasmic and Ca^{2+} levels in the mitochondrial matrix were evaluated using specific molecular tools for each compartment. The role of intracellular Ca^{2+} channels was assessed using both specific pharmacological inhibitors and genetic tools. O_2 consumption and mitochondrial membrane potential were detected using SeaHorse System and fluorescent probes respectively. **Results:** In isolated skeletal muscle fibers, depolarization increased the cytoplasmic and mitochondrial Ca^{2+} level. Mitochondrial Ca^{2+} uptake required the activation of both IP_3R and RyR1 Ca^{2+} channels. In addition, the inhibition of either intracellular Ca^{2+} channels decreased the basal O_2 consumption rate, but only the inhibition of RyR1 prevented the increase of O_2 consumption linked to the ATP synthesis. Ca^{2+} signals induced by depolarization

were accompanied by a reduction in mitochondrial membrane potential in subsarcolemmal mitochondria; The Ca^{2+} signals propagated to the intermyofibrillar mitochondria, where the mitochondrial membrane potential increased. The results are compatible with a Ca^{2+} -dependent propagation of the mitochondrial membrane potential, from the surface to the center of the muscle fiber. **Conclusion:** The depolarization of the skeletal muscle fiber increases the mitochondrial O_2 consumption rate and the levels of mitochondrial Ca^{2+} , this latter effect depends both on the activation of the IP_3R as well as the RyR1 . The activation of RyR1 , but not of IP_3R , is necessary for the increase of O_2 consumption induced by depolarization. The propagation of the mitochondrial membrane potential from the surface towards the fiber center could have a critical role in the control of mitochondrial metabolism, both at rest and after depolarization, forming part of a process termed "excitation-metabolism coupling " in the skeletal muscle fibers.

This mechanism would be fundamental to maintain the bioenergetics of the skeletal muscle, maintaining the balance between the requirements and the synthesis of ATP, thus allowing sustaining the muscle function in face of the environmental demands.

INTRODUCCIÓN:

El ejercicio físico representa un reto importante para la homeostasis del organismo. Durante el ejercicio se producen adaptaciones agudas multisistémicas, coordinadas y redundantes, las que permiten minimizar las perturbaciones homeostáticas provocadas por el aumento en la actividad muscular. En general, dichas adaptaciones son producto de la modificación en la función (actividad y/o localización) de las proteínas que conforman cada tejido (1). En el caso de las células musculares esqueléticas, la actividad contráctil y las alteraciones metabólicas producto de ésta, llevan a la activación de diversas proteínas que aumentan la disponibilidad y degradación de sustratos (2). Por ejemplo, el incremento de la relación AMP/ATP y la disminución del contenido de glucógeno muscular inducen la activación de la proteína kinasa dependiente de AMP (AMPK), la que incrementa la captación de glucosa y oxidación de ácidos grasos (3).

A pesar de que durante el ejercicio físico la utilización de trifosfato de adenosina (ATP) por la célula muscular aumenta más de dos veces comparado con el reposo (4), la concentración intracelular de ATP varía extremadamente poco, sugiriendo la activación de diversas vías metabólicas encargadas de la resíntesis de ATP durante la actividad contráctil (5). La mitocondria permite la síntesis de ATP a través del metabolismo oxidativo y su actividad se incrementa durante la contracción muscular (4). A pesar de estos antecedentes, los mecanismos que regulan la actividad mitocondrial durante la activación del músculo esquelético aún no han sido completamente descritos. Además, la pérdida de la función

mitocondrial en el músculo esquelético ha sido asociada con el desarrollo de diversas patologías, tales como resistencia a la insulina (6), atrofia muscular (7), distrofia muscular (8), entre otras, razón por la cual este organelo ha sido sujeto a intensa investigación científica.

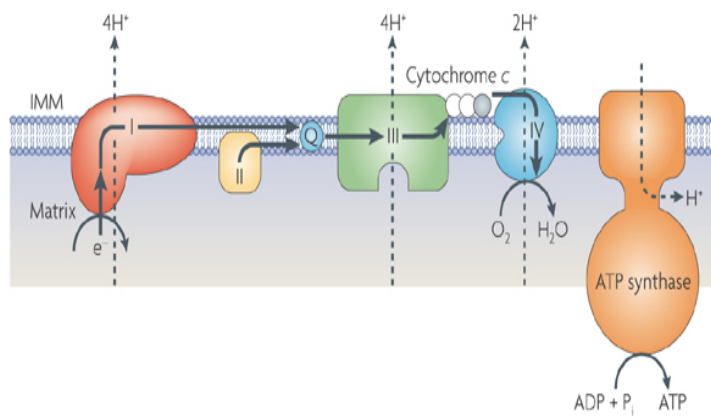
Estructura y función mitocondrial en el músculo esquelético

En las células musculares esqueléticas, y en otros tipos celulares, la mitocondria es la principal fuente de ATP. La mitocondria presenta una doble membrana: una membrana externa (MME), permeable a pequeñas moléculas, y una membrana interna (MMI), mucho más selectiva al paso de solutos. De esta forma, las membranas delimitan dos espacios al interior de las mitocondrias: un espacio intermembrana, de composición similar al citoplasma, y una matriz mitocondrial, de composición muy selecta (9).

En la mitocondria ocurren reacciones metabólicas clave. El acetil-CoA producido en la matriz mitocondrial a partir de diversos sustratos participa en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos o ciclo de Krebs. Durante el ciclo de Krebs, la energía química almacenada en la molécula de acetil-CoA se utiliza para generar poder reductor, en forma de NADH y FADH₂. Posteriormente, en la MMI, ambas moléculas ceden sus electrones de alta energía a una serie de complejos respiratorios conocidos en conjunto como cadena transportadora de electrones (CTE). El paso de los electrones a través de distintas reacciones de óxido-reducción va liberando gradualmente la energía, la cual es usada para bombear protones desde la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembrana a través de

los complejos I, III y IV de la CTE. Los electrones que han transitado por la cadena respiratoria se acoplan a oxígeno molecular como aceptor final, formándose agua en el proceso (Fig. I). Además, se forma una gradiente de protones entre el espacio intermembrana y la matriz mitocondrial, cuya fuerza motriz permite la síntesis de ATP a partir de ADP por el complejo V o ATP sintasa. Finalmente, la gradiente electroquímica generada por la CTE produce una diferencia de potencial en la MMI ($\Delta\Psi_{mt}$) (10). La $\Delta\Psi_{mt}$ es necesaria para diversas funciones mitocondriales, como el importe de proteínas desde el citoplasma (11), mitofagia (12), entre otras.

Es así como la mitocondria se transforma en una fuente eficiente de ATP, necesario para alimentar bombas de transporte iónico, eventos de señalización, procesos mecánicos mediados por motores moleculares, síntesis y plegamiento de macromoléculas, entre otros.



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Figura I. Esquema de la distribución de la cadena transportadora de electrones y ATP sintetasa en la membrana mitocondrial interna. Se

observa que los diferentes complejos mitocondriales (I, II, III y IV) interactúan funcionalmente entre sí para mover H^+ desde la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembrana, a través

de la membrana mitocondrial interna (IMM), generando un gradiente electroquímico utilizado por la ATP sintasa para la síntesis de ATP.

Según su localización subcelular, el músculo esquelético adulto presenta dos poblaciones mitocondriales: 1) Las mitocondrias subsarcolemales (SS), ubicadas entre el sarcolema y las miofibrillas; y 2) Las mitocondrias intermiofibrilares (IMF), ubicadas entre las miofibrillas de la fibra muscular (13). Estas poblaciones mitocondriales presentan diferencias estructurales y funcionales entre ellas. Por ejemplo, las mitocondrias SS exhiben mayor producción de superóxido comparado con las mitocondrias IMF (14). Interesante, mientras que el complejo IV de la CTE se encuentra enriquecido en las mitocondrias SS, la ATP sintasa estaría enriquecida en las mitocondrias IMF (Fig. II) (15). Esto implica la necesidad de una red interconectada entre las subpoblaciones mitocondriales con el objetivo de mantener la bioenergética y función celular.

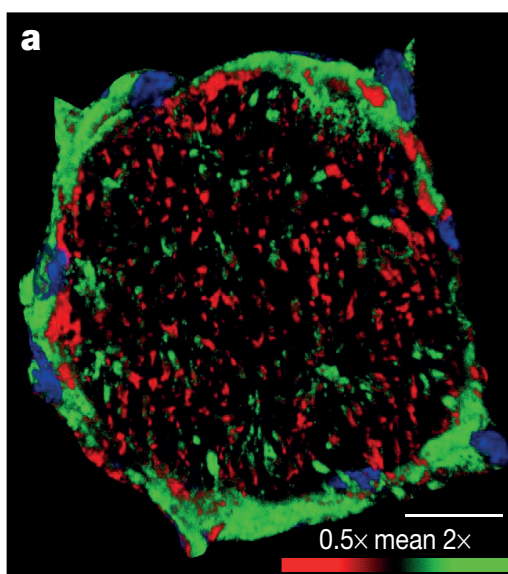


Figura II. Reconstrucción 3D de la fibra muscular esquelética. Se observa la localización subcelular del complejo IV (verde) y del complejo V (rojo) mediante inmunofluorescencia indirecta. En azul se observan los núcleos de la célula. Mientras el complejo IV de la CTE se encuentra preferencialmente en las mitocondrias SS, el complejo V está enriquecido en las mitocondrias IMF. Barra de escala 15 µm (15).

Existen numerosos mecanismos a través de los cuales diferentes poblaciones mitocondriales interactúan física y funcionalmente entre ellas, incluyendo fenómenos de fusión/fisión mitocondrial (16) y la formación de nanotúneles intermitocondriales (17). Sin embargo, aún se desconoce cuál o cuáles de estos mecanismos podrían mediar la interacción entre las mitocondrias SS e IMF en el músculo esquelético adulto.

Transitorios de calcio en el músculo esquelético

El calcio (Ca^{2+}) es un segundo mensajero que regula diversos eventos celulares, tales como transcripción génica (18), síntesis de proteínas (19), metabolismo energético (20), entre otras. Estos fenómenos son modulados por una interacción dinámica entre los mecanismos que aumentan la concentración de Ca^{2+} citosólico y aquellos que remueven este ion desde el citosol. El efecto final de los transitorios de Ca^{2+} está determinado por su frecuencia, amplitud, duración y localización subcelular (21).

La despolarización del músculo esquelético genera dos señales transitorias de Ca^{2+} , las cuales son independientes entre ellas. La primera señal transitoria de Ca^{2+} es mediada por la isoforma 1 del canal de Ca^{2+} receptor de rianodina (RyR1) y es necesaria para el acoplamiento excitación-contracción. La segunda señal es mediada por el canal de Ca^{2+} receptor de inositol 1,4,5- trifosfato (IP_3R) y participa en el acoplamiento excitación-transcripción (22, 23). El RyR1 y el IP_3R se diferencian entre sí en su mecanismo de activación, el tamaño de las

corrientes de Ca^{2+} generadas y su distribución subcelular. El RyR1 presenta un mecanismo de activación rápido, dependiente de su interacción física con el canal de Ca^{2+} receptor de dihidropiridina ($\text{Ca}_v1.1$ o DHPR); una elevada tasa de liberación de Ca^{2+} desde el RSP ($\approx 200 \mu\text{moles/ms}$) y se encuentra principalmente en la membrana de la cisterna terminal del retículo sarcoplasmático (RSP) (24). El IP_3R exhibe un mecanismo de activación dependiente de ligando (IP_3); una baja tasa de liberación de Ca^{2+} desde el RSP, el IP_3R y se encuentra enriquecido en el segmento subsarcolemal del RSP (25). La señal transitoria de Ca^{2+} asociada al acoplamiento excitación-contracción requiere de la propagación de un potencial de acción hacia la profundidad de la fibra muscular, a través de los túbulos transversales. Esto permite la subsecuente activación de la subunidad $\alpha 1\text{S}$ del canal de Ca^{2+} tipo L receptor de dihidropiridina, el que posteriormente interactúa alostéricamente con el RyR1 presente en la cisterna terminal del RSP, induciendo la liberación masiva de Ca^{2+} ($\approx 1 \mu\text{M}$) desde este organelo hacia el citosol, lo que finalmente produce contracción muscular (26).

La vía de señalización que induce la activación del IP_3R también inicia con la activación de la subunidad $\alpha 1\text{S}$ del $\text{Ca}_v1.1$. La activación del $\text{Ca}_v1.1$ induce la liberación de ATP, desde el interior de la fibra muscular hacia el medio extracelular, a través de los hemicanales de Panexina tipo 1 (Panx1). El ATP extracelular y sus metabolitos pueden actuar en forma auto y paracrina, activando los receptores nucleotídicos acoplados a proteína G, los que activan a la proteína fosfatidil inositol 3 kinasa (PI3K) y con ello la enzima fosfolipasa C (PLC) con la consecuente producción intracelular del segundo mensajero inositol

1,4,5 trifosfato (IP_3) (18, 27, 28). Posteriormente, el IP_3 se une a su receptor en la membrana del RSP y en la envoltura nuclear, aumentando con ello la concentración citosólica y nuclear de Ca^{2+} , lo que finalmente modula la transcripción de genes (22, 23).

En el músculo esquelético adulto, mientras las mitocondrias SS se encuentran cercanas al IP_3R , las mitocondrias IMF se encuentran próximas a la cisterna terminal del RSP, flanqueando las líneas Z del sarcómero (13). Es de hacer notar que la liberación de Ca^{2+} desde el RSP en respuesta a la despolarización de la membrana celular se asocia con aumentos en la concentración de Ca^{2+} en la matriz mitocondrial (29). Por ejemplo, la estimulación eléctrica (ES) tetánica incrementa la concentración de Ca^{2+} mitocondrial en fibras musculares esqueléticas aisladas, fenómeno emulado al estimular las células con un medio alto en potasio (7, 29).

En diversos modelos celulares, incluyendo el músculo esquelético, existe una asociación física y funcional entre las mitocondrias y el RSP (Fig. III) (30). Debido a la velocidad de difusión del Ca^{+2} , la presencia de proteínas amortiguadoras de Ca^{+2} en el citoplasma y la baja afinidad de la mitocondria por este ion (30), esta asociación sería necesaria para el aumento de Ca^{2+} mitocondrial en respuesta a la despolarización de la fibra muscular. Finalmente, en miotubos de ratón, tanto el transitorio de Ca^{2+} inducido por la activación del RyR1, así como el dependiente de IP_3R median el aumento de Ca^{2+} mitocondrial inducido por despolarización (31).

A pesar de estos antecedentes, aún es desconocida la contribución del RyR1 y del IP₃R al aumento de Ca²⁺ mitocondrial inducido por despolarización de fibras musculares esqueléticas adultas.

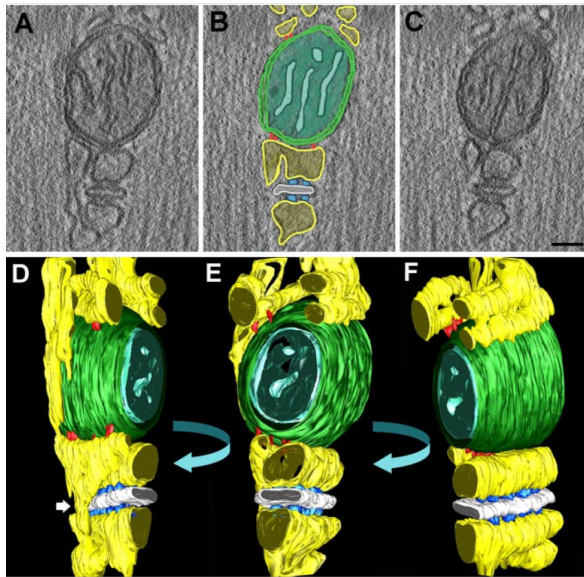


Figura II. Interacción entre RSP y mitocondria en músculo esquelético. A, B y C muestran en cortes seriados la localización de las mitocondrias (verde) y del RSP (amarillo) a través de microscopía electrónica de transmisión. Se observa una estrecha interacción entre el RSP y las mitocondrias (rojo)

(en gris se muestra el túbulo transversal). D, E y F corresponde a la reconstrucción tridimensional de cortes seriados obtenidos desde la microscopía electrónica (30).

Papel del Ca²⁺ en el metabolismo mitocondrial

Como se mencionó previamente, los requerimientos energéticos del músculo esquelético aumentan durante la actividad contráctil. Esto necesita de un incremento en la velocidad de síntesis de ATP, manteniendo el equilibrio entre el requerimiento y la producción de esta molécula (4).

En diversos modelos celulares la mitocondria es la principal fuente de ATP y su función es modulada por diversas sustancias, tales como adenosina difosfato (ADP), adenosina monofosfato (AMP), Ca^{2+} , entre otros (32). Sin embargo, numerosos trabajos han demostrado que la acumulación de Ca^{2+} en la matriz mitocondrial y los aumentos de Ca^{2+} extramitocondriales serían el principal estímulo para incrementar la función de este organelo (33-38).

La acumulación de Ca^{2+} en la matriz mitocondrial es clave en la regulación de tres deshidrogenasas del ciclo de Krebs (piruvato, α -cetoglutarato e isocitrato deshidrogenasa), estas enzimas son limitantes para la formación de poder reductor y, en consecuencia, para el suministro de electrones a la CTE (35, 38). A pesar de que las tres enzimas aumentan su actividad en presencia de Ca^{2+} , sus mecanismos de activación son diferentes: Mientras que la enzima piruvato deshidrogenasa (PDH) depende de la desfosforilación de su subunidad catalítica por la fosfatasa sensible a Ca^{2+} piruvato deshidrogenasa fosfatasa 1 (35), las enzimas α -cetoglutarato e isocitrato deshidrogenasa son activadas tras unir Ca^{2+} directamente en su estructura (38). En consecuencia, la acumulación de Ca^{2+} en la matriz mitocondrial aumentaría la actividad de estas tres enzimas y con ello la generación de compuestos reducidos, los que posteriormente alimentarían la CTE, conduciendo a un aumento en la síntesis de ATP y en el consumo mitocondrial de oxígeno (34). Sin embargo, estas enzimas también pueden ser reguladas por otras moléculas, por ejemplo, la enzima PDH es modulada alostéricamente por NADH, ATP, piruvato y el pH de la matriz mitocondrial (34). Finalmente, el control del metabolismo mitocondrial por Ca^{2+} no está limitado solo a las deshidrogenasas mitocondriales. Las proteínas de la MMI, ATP sintasa y

aralar 1 (intercambiador glutamato/aspartato), son estimuladas por aumentos en la concentración de Ca^{2+} en la matriz y espacio intermembrana respectivamente (39, 40). Esto implica que frente a aumentos de Ca^{2+} citosólico, la mitocondria debe generar una respuesta coordinada entre las diferentes proteínas sensibles a este ion, con el objetivo de mantener el suministro celular de ATP.

Los transitorios de Ca^{2+} generados durante la contracción muscular pueden ser suficientes para activar el ingreso de Ca^{2+} a la matriz mitocondrial, aumentando con ello la síntesis de ATP y el consumo mitocondrial de O_2 , manteniendo de esta forma la homeostasis energética celular.

Mecanismos que modulan la captación mitocondrial de Ca^{2+}

La acumulación de Ca^{2+} en la matriz mitocondrial depende principalmente de 1) la magnitud del transitorio de Ca^{2+} , 2) la duración del transitorio de Ca^{2+} , 3) la localización subcelular del transitorio de Ca^{2+} (aumentos locales o general en el citosol), 4) la fuente que genera los transitorios de Ca^{2+} (participación del medio extracelular o de canales intracelulares de Ca^{2+}), 5) la presencia de proteínas transportadoras de Ca^{2+} en la MMI y 6) la diferencia de potencial en la MMI (20). Es interesante notar que la localización subcelular de las mitocondrias en sitios cercanos al retículo endoplasmático (o RSP) y/o a la membrana plasmática generaría “*hot spots*” facilitaría la captación de Ca^{2+} por la mitocondria en células vivas (41-43).

Debido a la baja permeabilidad de la MMI, el ingreso de Ca^{2+} a la matriz mitocondrial requiere de proteínas transportadoras. El uniportador mitocondrial de

Ca^{2+} (MCU, previamente denominado CCDC109A) sería la principal proteína que regula la captación mitocondrial de Ca^{2+} (44, 45). A pesar de que proteínas como Lempt1 (leucine zipper-EF-hand-containing transmembrane protein 1) (46), el canal de Ca^{2+} receptor de rianodina (RyR) (47) o las proteínas desacoplantes UCP 2/3 (48) han sido propuestas como responsables del influjo de Ca^{2+} a la matriz mitocondrial, su contribución real a la acumulación de Ca^{2+} por la mitocondria necesita ser corroborada. Además, la ausencia de corrientes de Ca^{2+} en mitoplastos obtenidos desde células KO para MCU sugiere a esta proteína como la principal responsable de la captación mitocondrial de Ca^{2+} (49).

MCU es una proteína transmembrana localizada en la MMI y presenta una alta selectividad por calcio, realizando un transporte electrogénico del ion desde el espacio intermembrana a la matriz mitocondrial. MCU presenta dos dominios transmembrana – TM1 y TM2 – unidos por un asa corta de aminoácidos orientada hacia el espacio intermembrana (44, 45). Además, MCU está asociado a diferentes proteínas regulatorias que modulan su actividad (50).

A la fecha se han descrito numerosas proteínas reguladoras de MCU, incluyendo a la familia MICU (Mitochondrial Calcium Uptake 1, la que incluye MICU 1, 2 y 3) (20), MCUb (Mitochondrial Calcium Uniporter b) (51), MCUR (MCU Regulator 1) (52), EMRE (Essencial MCU REgulator) (53), entre otras. MCU más sus proteínas reguladoras generan un complejo macromolecular, llamado complejo MCU, cuya composición puede variar de acuerdo al tipo y función celular (54).

Los principales componentes del complejo MCU expresados en músculo esquelético adulto son MCU, EMRE, MICU1 y MICU2 (Fig. IV) (55).

EMRE es una proteína transmembrana de 10 kDa localizada en la MMI que permitiría el ensamblaje del complejo MCU en célula de mamíferos (53, 56). En estudios electrofisiológicos Vais et al (57) demostró que EMRE regularía el ingreso de Ca^{2+} a la matriz mitocondrial, previniendo la sobrecarga de Ca^{2+} en este organelo. A pesar de estos hallazgos, el papel de EMRE en músculo esquelético adulto es completamente desconocido.

La captación de Ca^{2+} por las mitocondrias exhibe una cinética sigmoidea (52). Esta cinética estaría determinada por proteínas que regularían la actividad de MCU, por ejemplo MICU1 y MICU2. MICU1 es una proteína soluble localizada en el espacio intermembrana que inhibe a MCU cuando la concentración de Ca^{2+} en el citoplasma es baja ($\approx 100\text{nM}$) (58-60). Así, el silenciamiento de MICU1 en células endoteliales genera sobrecarga de Ca^{2+} mitocondrial y reduce la eficiencia de captación de Ca^{2+} vía MCU (59). Por otro lado, MICU2 también se ubica en el espacio intermembrana y formaría un heterodímero obligado con MICU1, siendo este dímero el real responsable de evitar la sobrecarga mitocondrial de Ca^{2+} en reposo (61). Además, disminución de MICU1 reduce la estabilidad de MICU2, sugiriendo que la acumulación de Ca^{2+} en mitocondrias carentes de MICU1 estaría asociada a una reducción del dímero MICU1/2 (61). Sin embargo, recientemente se ha descrito que cuando las concentraciones de Ca^{2+} en citoplasma están entre 100 y 500 nM MICU1 controlaría el ingreso de Ca^{2+} a la mitocondria, independiente de la presencia de MICU2 (62).

A pesar de que la abundancia de los componentes del complejo MCU es relevante, la razón de expresión entre estas proteínas parece tener mayor significancia fisiológica. Por ejemplo, la razón MICU1/MCU afecta la captación

mitocondrial de Ca^{2+} (54). Mientras que esta razón es elevada en tejidos como cerebro e hígado, el músculo esquelético presenta la menor relación MICU1/MCU (54), sugiriendo un control diferencial del contenido de Ca^{2+} mitocondrial en diferentes tejidos.

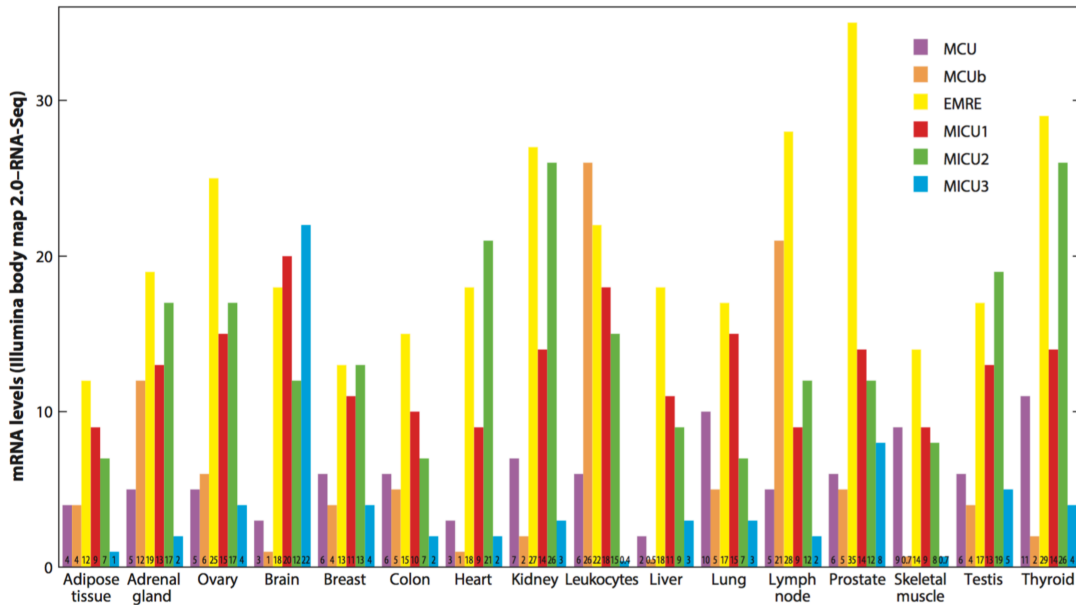


Figura IV. Expresión de los componentes de MCU según tejido. Cuantificación por RNA-Seq de los niveles de RNA mensajero de MCU, MCUb, EMRE, MICU1, MICU2 y MICU3 en diferentes tejidos (humano) (20).

Papel del complejo MCU en el músculo esquelético

Comparados con otros tejidos, el músculo esquelético adulto presenta grandes diferencias en la captación de Ca^{2+} mitocondrial (54), por ejemplo, comparado con el corazón, el músculo esquelético exhibe un mayor flujo de entrada de Ca^{2+}

mitocondrial, el que podría ser explicado por una menor razón MICU1/MCU (54); una menor expresión del dominante negativo de MCU, MCUb (51); o por la presencia del splicing alternativo de MICU1, MICU1.1 (el que confiere menor umbral de activación de MCU frente a aumentos de Ca^{2+} citosólicos) (63). Es interesante que, animales KO para MCU exhiben menor rendimiento físico y una reducción tanto en el contenido de Ca^{2+} mitocondrial así como en su consumo de oxígeno, además de un aumento de la fosforilación en la subunidad catalítica de PDH, sugiriendo una menor actividad de la enzima (49).

Estos antecedentes fortalecen la hipótesis de que la acumulación de Ca^{2+} en la matriz mitocondrial vía MCU es necesaria para el aumento de la función mitocondrial durante la activación muscular, manteniendo el balance entre los requerimientos y la síntesis de ATP en músculo esquelético adulto.

HIPÓTESIS

“La despolarización de la membrana celular incrementa el nivel de calcio y la respiración mitocondrial por un mecanismo dependiente de la activación del IP₃R y del RyR1, en fibras musculares esqueléticas de ratón”

OBJETIVO GENERAL

Determinar la participación del IP₃R y del RyR1 sobre los aumentos tanto de los niveles de calcio así como de la respiración mitocondrial, inducidos por despolarización, en fibras musculares esqueléticas de ratón.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar el efecto de la despolarización sobre los niveles de calcio mitocondrial en fibras musculares esqueléticas de ratón.
2. Determinar el papel del IP₃R y del RyR1 sobre los cambios en los niveles de calcio mitocondrial en fibras musculares esqueléticas de ratón.
3. Evaluar el efecto de la despolarización sobre el consumo mitocondrial del oxígeno y el papel del IP₃R / RyR1 sobre este efecto, en fibras musculares esqueléticas de ratón.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento de fibras musculares adultas de ratón

Se utilizaron ratones de la cepa C57/BL6J de 8 a 10 semanas de edad obtenidos del bioterio central de animales de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile, los cuales fueron mantenidos en una habitación con temperatura controlada en un ciclo luz- oscuridad de 12 horas, según el protocolo de bioética CBA#0588, asociado al proyecto FONDECYT N° 11130267 (2014-217). Fibras musculares adultas aisladas del músculo FDB se obtuvieron por digestión enzimática del músculo completo con colagenasa 450-500 unidades/mL por 90 min, seguida por disociación mecánica con pipetas Pasteur de diferentes diámetros. Las fibras aisladas se sembraron en cubre objetos (35 mm) pre-tratados con Matrigel en medio de cultivo (Dulbecco's modified Eagle's medium – DMEM, 10% suero de caballo y 1% penicilina/estreptomicina), la pureza del cultivo superó el 95%.

Protocolo de electroporación

El protocolo de electroporación se realizó como se describió anteriormente (64). Brevemente, luego de ser anestesiados los ratones fueron inyectados con hialuronidasa (10 µl de 2 mg / ml) disueltos en solución salina estéril en el lado ventral de las patas traseras a través de una aguja de calibre 29. Sesenta minutos después de la administración de hialuronidasa se inyectó entre 5 a 10 µg / µl de plasmidio en 10 µl de solución salina estéril. 15 minutos más tarde, se colocaron dos electrodos (agujas de acupuntura de acero inoxidable bañadas en oro) en las líneas

iniciales de la pata y los dedos de los pies, separados por aproximadamente 9 mm. Se aplicaron 20 pulsos de 100 V / cm con duración de 20 ms a 1 Hz. Siete días después, los ratones fueron sacrificados y se extrajeron los músculos FDB para estudios funcionales.

Tasa de consumo de oxígeno

La tasa de consumo de oxígeno (OCR) se evaluó mediante el analizador XF96 Seahorse (Seahorse Biosciences ©). Las fibras obtenidas de 4 ratones se sembraron 12 horas antes del experimento en Seahorse XFe de 96 pocillos. El promedio de estas fibras se consideró como 1 experimento, se realizaron 4 experimentos independientes por condición. La evaluación de OCR se realizó con el kit de prueba Seahorse XFe Cell Mito Stress según el protocolo del fabricante. Las fibras musculares se incubaron a 37°C sin CO₂ durante 2 horas en Seahorse XF Assay Medium que contenía glutamina 1 mM, piruvato 1 mM, glucosa 10 mM, NaCl 145 mM, pH 7,4. Cinco minutos antes del inicio de la prueba de OCR, las fibras musculares se estimularon con medio isotónico con alto K⁺ (65 mM). Para analizar la función mitocondrial, las fibras se trataron secuencialmente con oligomicina (10 mg / ml), carbonil cianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona (FCCP, 500 nM) y rotenona (1 μM). El OCR se registró después de cada inyección. Los valores de OCR se normalizaron con respecto al contenido de proteínas de cada pocillo. Excluimos del análisis aquellos pocillos que contenían menos de 1 μg de proteína.

Imágenes en tiempo real

Todos los experimentos se llevaron a cabo en buffer Krebs Ringer (en mM): 145 NaCl, 5 KCl, 1 CaCl₂, 1 MgCl₂, 5,6 glucosa, 10 HEPES, pH 7,4 a temperatura ambiente en presencia de N-bencil-P-toluenosulfonamida 75 μM (BTS, Sigma-Aldrich) para inhibir la contracción muscular. Los imágenes en tiempo real se realizaron mediante microscopía confocal utilizando Carl Zeiss Pascal 5, LSM con un objetivo de inmersión en aceite PlanApo 64x / 1.4 N.A.; Leica TCS-SP5-II con un objetivo 100x / 1.4 N.A. plan-apochromat equipado con sistema STED, el tamaño del píxel se estableció debajo de 100 nm para cumplir con el criterio de Nyquist. El tamaño del pinhole se estableció en 1 unidad de aire y se adquirieron z-stacks con un tamaño de 130 nm entre cada corte óptico. Las resoluciones laterales y axiales fueron aproximadamente de 230 y 460 nm, respectivamente); microscopio invertido Olympus IX81 con un 40x / N.A. 1.3 objetivo de inmersión en aceite o en un microscopio de disco giratorio (PerkinElmer, Waltham, MA / Zeiss, Oberkochen, Alemania) con objetivo de inmersión en aceite Plan-NEOFLUAR 100x / 1.3 N.A.

La despolarización muscular se realizaron utilizando medio isotónico de alto K⁺ (65 mM) o sometidas a ES (secuencia única de 270 pulsos cuadrados de 0,3 ms de duración a 20 Hz por 14 segundos utilizando electrodos que consisten en una fila de seis alambres de platino intercalados a 0,5 cm) acorde con protocolos previamente publicados (28).

Medición de calcio mitocondrial

La medición mitocondrial de Ca^{2+} se realizó 7 días después de la electroporación in vivo con *Cepia3mt* o *mtGcaMP6m*. La dinámica de Ca^{2+} mitocondrial se evaluó con *Cepia3mt* (65). La fluorescencia *Cepia3mt* se obtuvo utilizando una excitación/emisión a $\lambda 488 / \lambda 510-540$ nm, la ganancia del láser se mantuvo en un 4%, las imágenes fueron adquiridas en los microscopios Carl Zeiss Pascal 5 y Leica TCS-SP5-II para los ejes x,y y x,z,y respectivamente. Los tiempos de adquisición fueron cada un segundo para el microscopio Carl Zeiss Pascal 5 y cada 250 ms para el microscopio TCS-SP5-II. Después de 50 s de adquisición de la línea basal, se aplicó una solución alta en K^+ o ES. Los cambios en los niveles de Ca^{2+} se expresaron como $(\Delta F / F_0) * 100$. El nivel de Ca^{2+} mitocondrial en condición de reposo se evaluó midiendo la fluorescencia de *mtGcaMP6m* en el microscopio invertido Olympus IX81. 7 días después de la electroporación, se aislaron las fibras musculares y se detectó la fluorescencia *mtGcaMP6* usando una longitud de onda de excitación / emisión $\lambda_{exc1}-\lambda_{exc2} / \lambda_{em} = 400-490 / 520$ nm. La relación entre las señales excitadas con 490 y 400 nm se utilizó para determinar el nivel de Ca^{2+} . El ruido en las imágenes se corrigió fotograma a fotograma restando el valor de píxel medio de una región de interés libre de células (ROI) usando el software Fiji de ImageJ (66). El ROI en la célula se determinó después de la proyección de la desviación estándar de la fluorescencia utilizando Fiji (Imagen / Stack / z Project / Desviación estándar), para los análisis se seleccionaron 20 ROIs por fibra muscular.

Medición de calcio citosólico

Las fibras musculares fueron incubadas con el sensor de Ca^{2+} citosólico FLUO4-AM o se aislaron 7 días después de la electroporación in vivo con el indicador citosólico Ca^{2+} GECI (RCamPs) (67). La fluorescencia de RCamPs se detectó usando una longitud de onda de excitación/emisión a $\lambda 545\text{-}\lambda 580 / 590$ nm, manteniendo la ganancia del láser en el 4%, las imágenes se adquirieron cada 1 s en el microscopio Carl Zeiss Pascal 5 en el modo x,y. Después de 50 s de adquisición de línea basal, se aplicó ES. Los cambios en los niveles de Ca^{2+} se expresaron como $(\Delta F / F_0) * 100$. El ruido fue corregido como se mencionó previamente. Adicionalmente, el Ca^{2+} citosólico fue evaluado con la sonda fluorescence Fluo-4-AM. La fluorescencia de Fluo-4 fue detectada utilizando el microscopio Carl Zeiss Pascal, LSM, a una longitud de onda excitación/emisión de 490/520nm.

Mediciones del $\Delta\Psi_{mt}$

El $\Delta\Psi_{mt}$ se midió cargando fibras con tetrametilrodamina 20 nM, éster etílico (TMRE⁺, Life Technologies) durante 40 minutos a 37 ° C. Se detectó la fluorescencia de TMRE⁺ utilizando una excitación/emisión $\lambda 545\text{-}580 / 590$ nm usando el microscopio Carl Zeiss Pascal 5. Para la cinética, las imágenes se adquirieron cada 1 s con un 1% de ganancia y una intensidad de láser inferior al 1%, para evitar el foto-apagamiento y la toxicidad de la molécula fluorescente. Se añadió FCCP (0,5 μM) al final del experimento para inducir el colapso $\Delta\Psi_{mt}$. El $\Delta\Psi_{mt}$ se evaluó como la intensidad de fluorescencia sin procesar de las imágenes corregidas con su fondo, restando el valor medio de la intensidad de fluorescencia después de la administración de FCCP del valor promedio de las primeras 10 adquisiciones (ΔF).

Fotoliberación de IP₃ enjaulado

Las fibras musculares se electroporaron con Cepia3mt y 7 días después se aislaron las fibras del músculo esquelético y se incubaron con el segundo mensajero enjaulado IP₃ (5 μM, D-2-3-O-isopropylidene-6-O- (2-nitro-4,5- dimetoxi) bencil-mio-inositol-trifosfato-hexakis (propionoximetil) éster; Slichem GmbH) durante 45 minutos a 37 °C. Las fibras se colocaron en el microscopio y fueron expuestas a láser UV (Micropoint laser, Andor, Belfast, Irlanda del Norte). Después de adquirir una línea base de 20 s a 10 Hz, se realizó una fotoliberación de IP₃ aplicando un láser UV de 435 nm a 15 Hz en un área de liberación de ~ 3-4 μm de diámetro. Las señales de fluorescencia se registraron a 10 Hz en un microscopio de disco giratorio (PerkinElmer, Waltham, MA / Zeiss, Oberkochen, Alemania). Los resultados se procesaron con la fórmula $(\Delta F / F_0) * 100$. Los ROI en regiones libres de células se usaron para corregir la fluorescencia.

Inmunofluorescencia indirecta

El análisis de inmunofluorescencia se realizó según había sido documentado previamente con modificaciones (7). Brevemente, las fibras de FDB se lavaron con PBS enfriado en hielo, se fijaron en paraformaldehído al 4% en PBS durante 15 min (Electron Microscopy Science, Hatfield, PA, EE. UU.) y se inactivó con NH₄Cl 50 mM en PBS durante 10 min. Las células se lavaron con PBS enfriado, se permeabilizaron durante 20 minutos con Triton X-100 al 1% en PBS y se bloquearon en PBS-BSA al 4% (p / v) durante 45 minutos. Las fibras se incubaron en PBS-BSA al 2% (p / v) con anticuerpo contra TOM20 (Santa Cruz, Conejo) 1: 100; Cytochrome C (Bioscience, Mouse) 1: 100; complejo IV (Subunidad I, life technology, Mouse) 1: 100; ATP sintasa

(subunidad ATP5a, ABCAM) 1:100; MCU (Sigma, Conejo) 1:50 y MICU1 (Sigma, Conejo) 1:50 durante toda la noche a 4°C. Finalmente, las células se lavaron tres veces con PBS durante 5 minutos cada vez y se incubaron con anticuerpo secundario anti-ratón y anti-conejo conjugados Alexa Fluor 488 / Alexa Fluor 546 según corresponda, y los cubreobjetos se montaron con el reactivo ProLong Gold Antifade (Life Technologies). Las imágenes se tomaron adquiridas en los ejes x,y,z utilizando el microscopio Leica TCS-SP5-II equipado con 40x, 1.25 N.A., Plan-apochromat objetivo, en configuración STED. El pinhole se configuró en 1,0 unidad de aire y el tamaño de píxel se estableció en 48,88 nm. La deconvolución y el procesamiento de imágenes se realizaron utilizando Fiji de ImageJ.

Western Blot

Una semana después de la electroporación con shIP₃R1-mCherry o LUC-mCherry, los músculos FDB se aislaron y homogeneizaron usando un homogeneizador eléctrico (Fluko, Shanghai, China) en un tampón de lisis que contenía en mM: 20 Tris-HCl (pH 7,5), Triton al 1% X-100, 2 EDTA, 20 NaF, 1 Na₂P₂O₇, 10% glicerol, 150 NaCl, 10 Na₃VO₄, 1 PMSF e inhibidores de proteasa (Complete™, Roche Applied Science). La separación de proteínas se realizó usando SDS-PAGE seguido de transferencia a membranas de PVDF. Se usaron los siguientes anticuerpos primarios: anti-IP3R1 y anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rabanita (Santa Cruz Biotechnology, CA, U.S.A.). Las bandas de proteína en las transferencias se visualizaron con un kit de detección WESTAR Supernova (Cyanagen, Bolonia, Italia) y el sistema ChemiDoc™ MP (Bio-Rad, EE. UU.). La

intensidad de las bandas fue determinada por el análisis de densitometría utilizando ImageJ.

Análisis de los datos

Todos los resultados experimentales se expresaron como medias \pm S.D. Para los datos emparejados y para las comparaciones múltiples usamos la prueba t de Student y el ANOVA de una vía seguido de la prueba posterior de Dunnett, respectivamente. Para múltiples comparaciones emparejadas se realizó ANOVA de una vía seguido de Bonferroni. $P < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo. Se utilizó el software Graph-Pad PRISM versión 5.0 (GraphPad Software Inc, LA, EE. UU.). Para las cinéticas representativas se utilizó el promedio de 10 ROI obtenidos de una única fibra muscular. Para los análisis estadísticos se utilizaron de 20 a 25 fibras por condición obtenidos desde 4 a 6 cultivos independientes.

RESULTADOS

La despolarización aumenta la tasa de consumo de oxígeno en fibras musculares esqueléticas

Los requerimientos de energía del tejido muscular esquelético aumentan durante la contracción. Si bien se han realizado mediciones sobre la tasa de consumo de oxígeno (OCR) en fibras musculares esqueléticas adultas, los efectos de la despolarización muscular sobre el OCR en este tipo celular son completamente desconocidos. Para evaluar el efecto de la activación muscular sobre el OCR, 5 minutos antes del ensayo de OCR las fibras musculares esqueléticas fueron expuestas durante un minuto a un medio alto de K^+ (para inducir despolarización) o a un medio control. La despolarización de la membrana celular aumentó el OCR basal desde $82,1 \pm 7,1$ a $130,9 \pm 13,5$ pmol/min/ μ g de proteína (Fig. 1, A y B), lo que corresponde al 24,2% y 37,5% del máximo valor de OCR (obtenido post administración de FCCP) respectivamente (Fig. 1C). Además, la despolarización aumentó el OCR vinculado a la síntesis de ATP (OCR ATP-Linked) desde $38,2 \pm 3,4$ a $78,5 \pm 12,6$ pmol/min/ μ g de proteína (Fig. 1, A y B), lo que corresponde al 11,2% y 22,5% del máximo OCR respectivamente (Fig. 1C). De acuerdo con el aumento en la OCR basal, la despolarización redujo la reserva mitocondrial, desde $154,5 \pm 16,2$ a $66,7 \pm 10,7$ pmol/min/ μ g de proteína, lo que corresponde al 45,5% y 19% del máximo OCR respectivamente (Fig. 1, A, B y C). La despolarización de las fibras musculares no afectó a máximo valor de OCR, la fuga de protones (L_{H^+}) o la OCR no mitocondrial (NM-OCR) (Fig. 1, A, B y C).

El aumento del OCR basal se acompañó con un aumento del OCR ATP-linked pero no a cambios en el L_{H+} o en el NM-OCR, sugiriendo fuertemente que la despolarización de fibras musculares esqueléticas incrementó la síntesis de ATP, induciendo un "estallido metabólico" en las fibras del músculo esquelético en cultivo.

Dinámica mitocondrial de Ca^{2+} utilizando CEPIA3mt.

Como se mencionó previamente, el aumento en los niveles de Ca^{2+} en la matriz mitocondrial activaría diferentes deshidrogenasas sensibles al Ca^{2+} y con ello la síntesis de ATP y consumo mitocondrial de O_2 .

Con el objetivo de determinar los cambios en los niveles de Ca^{2+} en la matriz mitocondrial en respuesta a despolarización, fibras musculares esqueléticas fueron electroporadas *in vivo* con un plasmidio que codifica para una proteína sensible a Ca^{2+} que presenta destinación a la matriz mitocondrial (CEPIA3mt) (65). CEPIA3mt exhibió un alto grado de co-localizado con el marcador general de mitocondrias mtDsREd (Fig. 2A). Las imágenes confocales mostraron más del 95% de colocalización, determinado por el coeficiente de Mander (Fig. 2A, panel derecho), sugiriendo una adecuada compartimentación mitocondrial del indicador molecular CEPIA3mt.

La región de interés (ROI) seleccionada se determinó después de la proyección de la desviación estándar de la fluorescencia en el tiempo (Fig. 2B, panel superior). Para realizar los análisis se seleccionaron 10 ROI por fibra. El promedio de los 10 ROI se consideró como cinética representativa. Se evaluaron 20 a 25 fibras por cultivo y se utilizó el promedio por cultivo para el análisis estadístico.

La despolarización indujo un aumento lento y sostenido de los niveles mitocondriales de Ca^{2+} , alcanzando la fluorescencia máxima 30 s (± 5 s) después de la estimulación; Este incremento de Ca^{2+} mitocondrial fue disipado al adicionar 0,5 μM de FCCP (Figura 2B, panel inferior). La máxima la fluorescencia alcanzada posterior a la despolarización fue del 51% ($\pm 10\%$) (Fig. 2C). Se determinó la duración de la señal mitocondrial de Ca^{2+} con una cinética de larga duración y se observó que la señal mitocondrial de Ca^{2+} retornó a los valores de reposo a los 200 s posteriores a la estimulación (Fig. S1).

Para determinar si la estimulación con K^+ afecta la integridad celular, fibras musculares fueron incubadas con el sensor de Ca^{2+} citoplasmático FLUO-4AM. La ES generó transitorios rápidos de Ca^{2+} citoplasmáticos asociados al acoplamiento excitación-contracción. La estimulación con un medio alto en K^+ (1 min) generó una señal rápida en el citoplasma, la cual presentó una menor amplitud (40% inferior al ES) y una mayor duración (10 s) comparada con la señal inducida por ES. 110 s posteriores a la estimulación con K^+ , las células respondieron adecuadamente a la ES, sugiriendo que la estimulación con un medio alto en K^+ no afecta irreversiblemente la excitabilidad celular, la integridad de membrana celular, ni la liberación de Ca^{2+} asociada al acoplamiento excitación-contracción (Fig. S2).

Para asegurar que el aumento mitocondrial de Ca^{2+} no es generado por un efecto artefactual del medio alto en K^+ , fibras musculares fueron co-electroporadas con el indicador de Ca^{2+} citosólico GEC1 (RCaMP) más CEPIA3mt y sometidas a ES. Como se muestra en la figura 2D, el ES incrementó las señales citoplasmáticas y mitocondriales de Ca^{2+} . ES y el medio alto en K^+ indujeron un aumento similar en el Ca^{2+} mitocondrial, tanto en su perfil cinético de aumento como en la fluorescencia

máxima alcanzada (Fig. 2D y E, respectivamente). La velocidad de decaimiento de la señal fue más lenta en las fibras expuestas a K^+ que en aquellas sometidas a ES.

Los cursos temporales medidos en dos ubicaciones subcelulares del sector subsarcolemal indicaron una propagación intramitocondrial de la fluorescencia de CEPIA3mt compatible con una onda mitocondrial de Ca^{2+} en la región subsarcolemal de las fibras (figura 2F, paneles superior y medio). Esta onda intramitocondrial de Ca^{2+} se observó en un 30% de las fibras observadas y presentó una velocidad de $0,25 \pm 0,02 \mu\text{m/s}$ (Fig. 2F, panel inferior), sugiriendo una onda de Ca^{2+} que se propaga por el interior de la matriz mitocondrial en el sector subsarcolemal de la fibra muscular.

El IP_3R y el RyR1 son necesarios para aumentar el Ca^{2+} mitocondrial posterior a la despolarización.

Los principales canales intracelulares de Ca^{2+} en la fibra muscular esquelética son el RyR1 y el IP_3R . Con el fin de determinar si estos canales intracelulares están implicados en los aumentos mitocondriales de Ca^{2+} inducidos por despolarización, se utilizaron aproximaciones tanto farmacológicas como genéticas.

El aumento mitocondrial de Ca^{2+} inducido por despolarización fue parcialmente impedido por dantroleno ($50 \mu\text{M}$) o por xestospongina B ($10 \mu\text{M}$), inhibidores de la liberación de Ca^{2+} mediada por el RyR1 y por el IP_3R respectivamente. La fluorescencia máxima observada fue 66,2% ($\pm 8,0$) en el control, 29,5% ($\pm 1,3$) en las fibras pretratadas con dantroleno y 33,0% ($\pm 1,9$) en las células pretratadas con xestospongina B (Figura 3A). Además, el aumento mitocondrial de Ca^{2+} inducido por despolarización fue completamente prevenido cuando se usaron ambos inhibidores

simultáneamente (Fig. 3A), (la cuantificación de la fluorescencia máxima se muestra en la Fig. 3B). Por otra parte, el transitorio de Ca^{2+} citosólico inducido por ES fue completamente prevenido al utilizar dantroleno (Fig. S3) la señal de Ca^{2+} mitocondrial solo fue reprimida en un 50%, corroborando el requerimiento de otro canal intracelular de Ca^{2+} para el aumento mitocondrial de este ión. Finalmente, el dantroleno pero no la xestospongina B redujo la pendiente de la fluorescencia de 0.55 ± 0.01 a 0.15 ± 0.12 (dF / dT * s⁻¹). Estos resultados son consistentes con la cinética de activación de RyR1 (rápido) e IP₃R (lento) en fibras musculares. Finalmente, dantroleno pero no xestospongina B redujo la pendiente de aumento de fluorescencia desde $0,55 \pm 0,01$ a $0,15 \pm 0,12$ (dF / dT * s⁻¹). Estos resultados son consistentes con la cinética de activación de RyR1 (rápido) e IP₃R (lento) en fibras musculares

Para evaluar la contribución de IP₃R a los aumentos mitocondriales de Ca^{2+} en respuesta a despolarización, las fibras fueron co-electroporadas con CEPIA3mt más shIP₃R1-mCherry (68). La electroporación con shIP₃R1-mCherry redujo el nivel de IP₃R1 en 80% aproximadamente (Fig. S4). En línea con la aproximación farmacológica, el aumento mitocondrial de Ca^{2+} después de la despolarización se redujo parcialmente en fibras que contenían shIP₃R1-mCherry en comparación con el control; la fluorescencia máxima fue 61% y 26,9% en el grupo control y shIP₃R1-mCherry, respectivamente (Fig. 3C y 3D).

Finalmente, fibras musculares electroporadas con CEPIA3mt fueron preincubadas con el segundo mensajero enjaulado IP₃. Las fibras fueron expuestas a flashes UV para fotoliberar el IP₃ en regiones específicas dentro de la célula muscular. Comparado con el control, la aplicación de 10 flashes de fotoliberación generó un

aumento del 15% ($\pm 3,0\%$) en los niveles de Ca^{2+} mitocondrial (Fig. 3E y 3F). Además se observó un incremento en el porcentaje de células que respondieron a la fotoliberación conforme se aumentaba el número de flashes UV aplicados (1 flash, 7.3%, 5 flashes, 32.3%, 10 flashes, 48.8% del total de las células analizadas) (Fig. 3G).

En conjunto, estos resultados sugieren que tanto la activación del IP_3R así como del RyR1 son necesarios para el aumento de Ca^{2+} mitocondrial inducido por despolarización en fibras musculares adultas en cultivo.

La activación del RyR1 pero no del IP_3R es necesaria para aumentar el consumo de O_2 mitocondrial después de la despolarización

De acuerdo con los resultados detallados anteriormente, planteamos la hipótesis de que tanto IP_3R como RyR1 son necesarios para inducir el “estallido metabólico” causado por la despolarización. Para probar esta hipótesis, se evaluó el OCR después de la despolarización de fibras musculares preincubadas con los inhibidores específicos xestospongina B o dantroleno.

Como se mostró anteriormente, la despolarización aumentó tanto el OCR basal así como el vinculado con la síntesis de ATP (ATP-linked) (Fig. 4, A, B y C). En comparación con el control, el OCR basal se redujo parcialmente en presencia de xestospongina B. El OCR fue de $80,1 \pm 3,2$ pmol/min/ μg para el control y $64,0 \pm 6,3$ pmol/min/ μg para xestospongina B, lo que corresponde a 22,2% y 16,6% del máximo OCR, respectivamente. El OCR vinculado a la síntesis de ATP también se redujo desde el $39,5 \pm 4,2$ al $27,4 \pm 4,2$ pmol/min/ μg en las células pre-incubadas con xestospongina B; estos valores corresponden al 11,8% y al 7,0% del OCR máximo

respectivamente. Además, xestospongina B no afectó el máximo OCR, el L_{H+} o el OCR no mitocondrial. Finalmente, la presencia de xestospongina B no previno el aumento de OCR –ni el basal, ni el asociado a la síntesis de ATP- en respuesta a despolarización (Fig. 4, A, B y C).

Como se observó con xestospongina B, dantroleno redujo parcialmente tanto el OCR basal como el vinculado a la síntesis de ATP. El OCR basal se redujo desde $83,2 \pm 1,2$ pmol/min/ μ g a $66,1 \pm 5,7$ pmol/min/ μ g de proteína en células preincubadas con dantroleno, lo que corresponde al 25,3% y 17,8% del máximo OCR respectivamente (Fig. 4D, E y F). Además, dantroleno también redujo el OCR vinculado con la síntesis a ATP de $40,1 \pm 3,9$ a $22,6 \pm 3,2$ pmol/min/ μ g de proteína (Figuras 4D y E), lo que corresponde al 11,7% y 5,9% del máximo OCR respectivamente (Figura 4F). La presencia de dantroleno no afectó el OCR máximo, L_{H+} , ni el consumo no mitocondrial de oxígeno (Fig. 4D, E y F). Interesante, dantroleno previno completamente el aumento tanto del OCR basal así como del asociado a la síntesis de ATP inducido por despolarización, sin efecto sobre el OCR máximo, L_{H+} y OCR no mitocondrial (Fig. 4D, E y F).

En conjunto, estos resultados sugieren fuertemente que ambos canales intracelulares de Ca^{2+} están implicados en el mantenimiento del OCR basal y del asociado a la síntesis de ATP en condiciones de reposo. Sin embargo, la activación de RyR1 pero no de IP₃R es necesaria para aumentar el consumo de O₂ en respuesta a despolarización.

Distribución heterogénea de proteínas intramitocondriales y manejo diferencial de Ca^{2+} entre mitocondrias SS e IMF.

La captación mitocondrial de Ca^{2+} depende principalmente de la distribución del complejo MCU y del $\Delta\Psi_{\text{mt}}$ (10, 20). Como las fibras musculares poseen diferentes tipos de mitocondrias (13), probamos la distribución de proteínas involucradas en los subcomponentes de la cadena de transporte de electrones y en el complejo MCU entre estas dos poblaciones mitocondriales.

Recientemente, Glancy et al. demostraron que el complejo IV del ETC se localizaba principalmente en la periferia de la fibra muscular (15). En línea con los resultados descritos por Glancy et al., en este trabajo encontramos que el complejo IV se encuentra enriquecido en la periferia de la fibra, mientras que la proteína estructural TOM20 presenta una distribución homogénea a través de las fibras muscular (Fig. 5A). Para determinar si la distribución del complejo IV es un problema de penetración de anticuerpos asociado a la co-inmunofluorescencia, decidimos evaluar la distribución subcelular de MCU más ATP5a. Como se muestra en la figura 5B, ambas proteínas exhibieron una distribución homogénea a través de la fibra. Estos resultados sugieren que la distribución diferencial del complejo IV no está asociada a un problema de penetración del anticuerpo. Además, los ensayos de inmunofluorescencia de Citocromo C (CytC), otra proteína de la cadena de transporte de electrones, mostraron una fuerte colocalización con TOM20 solo en la región subsarcolemal; la inmunotinción de CytC mostró una intensidad de fluorescencia preponderante cerca de la superficie de la fibra, similar al observado con complejo IV (Fig. 5C).

Usando CytC como marcador de las mitocondrias SS se evaluó la distribución de las proteínas MCU y MICU1. Encontramos que MCU presentaba una distribución homogénea dentro de la célula (Fig. 5D) y un alto coeficiente de Mander con CytC ($0,82 \pm 0,05$) (Fig. 6F). Por otro lado, MICU1 exhibió un enriquecimiento en el sector intermiofibrilar (Fig. 5E) y bajo coeficiente de Mander contra CytC (0.22 ± 0.08) (Fig. 5F). Estos resultados fueron consistentes con la reconstrucción tridimensional de las fibras musculares.

Considerando la distribución heterogénea de algunos componentes de la CTE y del complejo MCU, decidimos medir parámetros funcionales como $\Delta\Psi_{mt}$ y Ca^{2+} . No encontramos diferencias en los valores de $\Delta\Psi_{mt}$ entre las mitocondrias SS e IMF en condiciones de reposo (Fig. 5G). Sin embargo, las mitocondrias SS presentaron mayores niveles de Ca^{2+} en condiciones de reposo en comparación con la mitocondrias IMF, evaluado con el sensor ratiométrico de Ca^{2+} mtGCAMP6m (Fig. 5H). mtGCAMP6m presenta una K_d de 167nM y su razón de fluorescencia es válida para una concentración que va hasta 1×10^{-5} M (69).

La despolarización con alto K^+ indujo un aumento sostenido de Ca^{2+} mitocondrial tanto en mitocondrias SS como en IMF. La pendiente del aumento de fluorescencia fue un 20% mayor en SS en comparación con IMF (Fig. 5I). Además, la fluorescencia máxima fue del $55\% \pm 4\%$ en el SS y del $27\% \pm 3\%$ en el IMF (Fig. 5J).

Manejo heterogéneo del $\Delta\Psi_{mt}$ y Ca^{2+} en mitocondrias SS e IMF inducido por despolarización.

Estudios previos han demostrado que las mitocondrias SS están acopladas físicamente a la mayoría de las mitocondrias IMF en fibras musculares (15). Esta característica proporcionaría una posible vía conductora a través del espacio intermembrana y/o a través de la matriz mitocondrial, la cual permitiría un acoplamiento funcional entre las diferentes poblaciones mitocondriales. Por otro lado, el ingreso de Ca^{2+} a la matriz mitocondrial reduce el $\Delta\Psi_{mt}$, atenuando la fuerza motriz que mueve a este ión (70). Nuestra hipótesis es que el ingreso heterogéneo de Ca^{2+} a las dos poblaciones mitocondriales induciría un cambio diferencial del $\Delta\Psi_{mt}$ en las mitocondrias SS e IMF.

Con el fin de probar esta hipótesis, fibras musculares fueron electroporadas con CEPIA3mt y se incubaron con TMRE⁺. Como se muestra en la figura 6A, la despolarización de la membrana celular disminuyó $\Delta\Psi_{mt}$ en las mitocondrias SS, con un efecto máximo a los 60 s (± 3 s) después de la despolarización de la membrana celular; este efecto se correlacionó temporalmente con los aumentos de Ca^{2+} mitocondrial. La reducción $\Delta\Psi_{mt}$ presentó un retraso (10-15 s) en comparación con el aumento mitocondrial de Ca^{2+} . El ES indujo un efecto similar sobre el $\Delta\Psi_{mt}$. ES redujo el $\Delta\Psi_{mt}$ en la región subsarcolemal con un efecto máximo a 45s (± 4 s) post estimulación y este efecto se revirtió después de 10 minutos (Fig. 6B panel izquierdo). Además, la despolarización de la membrana mitocondrial interna fue similar luego de la ES o K^+ . La caída de $\Delta\Psi_{mt}$ fue del $-47\% \pm 8.3$ y $-50\% \pm 12.3$ para ES y K^+ , respectivamente (Fig. 6B panel derecho). La reducción del $\Delta\Psi_{mt}$ después

de la despolarización en la región subsarcolemal se evitó parcialmente con xestospongina B o dantroleno y se anuló completamente cuando se usaron ambos inhibidores al mismo tiempo, sin diferencia en las pendientes de decaimiento del $\Delta\Psi_{mt}$ (Fig. 6C), sugiriendo que tanto el IP_3R así como el $RyR1$ participan en la despolarización del $\Delta\Psi_{mt}$ en la región subsarcolemal después de la despolarización de la membrana celular. Además, la despolarización celular indujo un cambio diferencial del $\Delta\Psi_{mt}$ en las mitocondrias SS comparadas con las IMF. Como se muestra en la figura 6D y 6F, la despolarización indujo una disminución en $\Delta\Psi_{mt}$, particularmente en el segmento subsarcolemal y un aumento en $\Delta\Psi_{mt}$ en el sector intermiofibrilar. Este aumento de $\Delta\Psi_{mt}$ en las mitocondrias IMF ocurrió después de la despolarización de las mitocondrias SS. La reducción del potencial de membrana mitocondrial en las mitocondrias SS se correlacionó con el aumento mitocondrial de Ca^{2+} en esta área (Fig. 6D). Debido a la separación temporal entre los cambios del $\Delta\Psi_{mt}$ que afectan a las mitocondrias SS e IMF es poco probable que estas poblaciones estén eléctricamente acopladas.

Estos resultados sugieren que hay una transferencia de $\Delta\Psi_{mt}$ desde las mitocondrias SS a las IMF y es factible que esta transferencia tenga lugar después de la despolarización de la membrana celular por un mecanismo dependiente de Ca^{2+} .

DISCUSIÓN

El papel del IP₃R y del RyR1 sobre el aumento de calcio mitocondrial inducido por despolarización.

Nuestras observaciones y trabajos previos en músculo estriado (15, 17, 71) sugieren que en las fibras musculares adultas las mitocondrias constituyen una extensa red semipermanente que permitiría la distribución intracelular de energía. Por lo tanto, las mitocondrias SS e IMF podrían trabajar juntas, como un único organelo, para satisfacer los requerimientos energéticos de la fibra muscular adulta. Esta asociación funcional entre las subpoblaciones mitocondriales podría ser mediada por Ca²⁺, siendo este ion clave en el aumento de la función mitocondrial inducida por despolarización.

A pesar de que el aumento de Ca²⁺ mitocondrial inducido por la despolarización de la membrana celular ha sido estudiado ampliamente en fibras musculares adultas aisladas, utilizando ES o medio de alto potasio (7, 29), los canales intracelulares de Ca²⁺ involucrados en este fenómeno han sido poco estudiados. En este trabajo, el aumento mitocondrial de Ca²⁺ inducido por despolarización fue parcialmente mediado por la activación de los canales de Ca²⁺ RyR1 e IP₃R. Otros autores han informado que no hay liberación de Ca²⁺ mediada por IP₃R en fibras musculares esqueléticas adultas (72); hay varias razones por las que tales señales pueden ser difíciles de registrar en músculo adulto, incluido el rango de acción del IP₃ (<5 μm), la distribución de IP₃R funcionales dentro de la célula (73) y la función amortiguadora de la mitocondria frente a transitorios citoplasmáticos de Ca²⁺ (31). En este trabajo

demostramos que el aumento de Ca^{2+} mitocondrial inducido por despolarización fue parcialmente prevenido cuando se inhibió al IP_3R (xestospongina B), cuando se redujo la masa del receptor (shIP3R-mCherry), y que la fotoliberación local de IP_3 aumentó los niveles de Ca^{2+} mitocondrial en el 50% de las células evaluadas. En conjunto, estos resultados sugieren fuertemente que tanto RyR1 así como el IP_3R son necesarios para los incrementos de Ca^{2+} mitocondrial inducidos por despolarización en fibras de músculo esquelético adulto.

El papel de los canales intracelulares de calcio en el aumento de OCR después de la despolarización

El principal mecanismo propuesto para explicar la regulación del metabolismo mitocondrial por Ca^{2+} sugiere que la acumulación de este ion en la matriz mitocondrial estimularía varias enzimas del ciclo de Krebs, proporcionando poder reductor en forma de NADH y FADH_2 , fomentando la fosforilación oxidativa y, en consecuencia, aumentando el consumo mitocondrial de oxígeno y la síntesis de ATP (34, 74). En este trabajo se presentan varias evidencias experimentales que apuntan hacia el papel del Ca^{2+} como regulador de la función mitocondrial en esta dirección. En primer lugar, la despolarización de fibras musculares *in vitro* aumenta el OCR basal y el OCR asociado a la síntesis de ATP. En segundo lugar, el Ca^{2+} mitocondrial se incrementa después de la estimulación eléctrica o de la despolarización inducida por un medio alto en K^+ . En tercer lugar, en condiciones de reposo, el OCR basal y el OCR vinculado a la síntesis de ATP son dependientes tanto del RyR1 así como del IP_3R . En cuarto lugar, la liberación de Ca^{2+} mediada por el canal de Ca^{2+} RyR1 es necesaria para el aumento del OCR inducido por despolarización.

Si bien los aumentos del consumo de oxígeno y los requerimientos de ATP aumentan más de dos veces durante el ejercicio físico, en el presente trabajo observamos que la despolarización incrementó el OCR solo en un 54% sobre su reposo. Una probable explicación a esta diferencia es la temporalidad de los estímulos. Mientras que durante la realización de ejercicio físico las fibras musculares son excitadas sostenidamente, en este trabajo las fibras musculares fueron despolarizadas con K^+ durante un minutos en solo una oportunidad previo a la medición de OCR. Es posible que una mayor duración del estímulo y/o un estímulo más fisiológico lleven a las células a un incremento mayor de su OCR. Además, no es posible descartar las interacciones funcionales que ocurren durante el ejercicio físico, en donde estímulos endocrinos, mecánicos y eléctricos coexisten para incrementar la demanda energética y en consecuencia la función mitocondrial. Tonkogi y Shalin demostraron, en músculo esquelético intacto, que bajo ejercicio físico el consumo de O_2 aumenta entre 2 y 5 veces más que el observado en fibras musculares aisladas o en fracciones enriquecidas en mitocondrias (75). Esto sugiere la activación de vías paralelas que permitan la regulación de la función mitocondrial durante la transición reposo/activo del músculo esquelético adulto (76).

A pesar del hecho de que tanto el RyR1 así como el IP_3R participan en el aumento mitocondrial de Ca^{2+} producido por despolarización; solo RyR1 media el aumento de OCR después de la despolarización, lo que sugiere un papel crítico de RyR1 en el metabolismo mitocondrial durante los ciclos de acoplamiento excitación-contracción. De acuerdo con nuestras observaciones, Brieni et al. demostraron que la sobreexpresión de un RyR1 mutado (asociado a hipertermia maligna -RyR1-MH-) en células HEK-293 eleva los niveles de Ca^{2+} mitocondrial (77). Además, las

mitocondrias del músculo esquelético de ratones heterocigotos que expresan la mutación MH / CCD RyR1 R163C humana exhiben un mayor nivel de Ca^{2+} en la matriz mitocondrial comparados con el tipo silvestre (78). Teniendo en cuenta que la captación mitocondrial de Ca^{2+} depende en parte de la magnitud y la duración del transitorio citoplasmático Ca^{2+} (70), especulamos que después de la despolarización, el rápido y enorme transitorio de Ca^{2+} mediado por el RyR1 podría ser suficiente para incrementar la función mitocondrial en músculo esquelético adulto. Sin embargo, el papel fisiológico del aumento de Ca^{2+} mitocondrial dependiente del canal de Ca^{2+} IP_3R en fibras de músculo esquelético adulto permanece sin explicación.

A pesar de que en este trabajo nosotros demostramos que los canales intracelulares de Ca^{2+} regulan el OCR mitocondrial, aún no sabemos si esta regulación es exclusivamente por acumulación de Ca^{2+} directamente en la matriz mitocondrial o intervienen otros mecanismos, como por ejemplo la acumulación de Ca^{2+} en el espacio intermembrana o en el citoplasma. Es importante considerar que la inhibición del RyR1 previno completamente el aumento del OCR inducido por despolarización aun cuando el aumento de Ca^{2+} mitocondrial fue parcialmente prevenido. Esto sugiere que la función mitocondrial no sería necesariamente controlada por la acumulación de Ca^{2+} en la matriz mitocondrial sino por mecanismos extramitocondriales. Por ejemplo, la despolarización de la membrana celular induce la liberación masiva de Ca^{2+} a través del RyR1 aumentando con ello la actividad de la isoforma 1 de la bomba de Ca^{2+} del retículo sarcoplasmático (SERCA1) (79). Esta bomba aumentaría la utilización de ATP y con ello incrementarían la concentración de metabolitos intermediarios los cuales pueden ingresar a la matriz mitocondrial, activando las deshidrogenasas del ciclo de Krebs, aumentando con ello el OCR. Por

otro lado, el Ca^{2+} en el espacio intermembrana podría activar transportadores de la membrana mitocondrial interna, como por ejemplo el transportador aspartato/glutamato (40). Mientras que la activación de las deshidrogenasas mitocondriales requiere aumentos en la concentraciones de Ca^{2+} en el rango de los micromolar (34), los transportadores de la membrana mitocondrial interna requieren menores aumentos de Ca^{2+} , por ejemplo, el transportador aspartato/glutamato presenta un EC_{50} de $324 \pm 57\text{nM}$ (80). Es importante notar que simulaciones computacionales han sugerido la existencia de mecanismos paralelos (intramitocondriales y citoplasmáticos) que permitirían la regulación de la función mitocondrial (76). Es probable que se requiera un equilibrio dinámico entre fenómenos regulados por Ca^{2+} tanto en el citoplasma así como en las mitocondrias, los que en conjunto regulen de forma integrada el OCR mitocondrial en fibras musculares esqueléticas.

Finalmente, es importante notar que, debido a limitaciones técnicas, nosotros no logramos despolarizar las fibras musculares directamente durante la determinación de OCR. Las diferencias temporales entre despolarización y el aumento del OCR ATP-linked generan limitaciones importantes en este trabajo. Futuras investigaciones deberían diseñar un sistema que permita la despolarización y medición en paralelo del OCR, contribuyendo así a un mejor entendimiento de la bioenergética en el músculo esquelético adulto. Además, el papel del Ca^{2+} en la matriz mitocondrial sobre el aumento del OCR en respuesta a despolarización aún necesita ser evaluado.

Heterogeneidad de poblaciones mitocondriales en fibras de músculo esquelético adulto.

Las mitocondrias SS son diferentes de las IMF en su ubicación, función y organización espacial (13, 15). Recientemente, Glancy et al. ha demostrado que los elementos de la CTE se distribuyen diferencialmente entre las mitocondrias SS e IMF; en particular, comparado con el complejo V, el IV estaría enriquecido en las mitocondrias SS (15). A diferencia de Glancy, nosotros no encontramos diferencias en la distribución del complejo IV en las diferentes poblaciones mitocondriales. Una probable explicación para esta diferencia es que nosotros utilizamos una co-inmunofluorescencia, marcando toda la red mitocondrial con TOM20. Debido a que Glancy no utilizó un marcador general de mitocondrias es posible que el enriquecimiento observado en la zona subsarcolemal sea debido a que en esa región existe una mayor densidad mitocondrial, lo que justificaría el enriquecimiento observado en las mitocondrias SS. Además, no es posible descartar que las diferencias observadas se deban al tipo de músculo utilizado –mientras Glancy utilizó músculo tibial anterior (músculo mixto) nosotros utilizamos fibras del músculo FDB (músculo rápido)-.

En este estudio observamos que el citocromo C, otro componente de la CTE, se encuentra principalmente en las mitocondrias SS. Por el contrario, la importina TOM20 presenta una distribución homogénea en la célula muscular, lo que sugiere una compartimentación específica de diferentes proteínas mitocondriales entre las subpoblaciones de mitocondrias.

La distribución diferencial de proteínas dentro de las subpoblaciones mitocondriales sugeriría un acoplamiento funcional entre ellas. Una pregunta abierta es cómo las

mitocondrias SS y las IMF están funcionalmente acopladas; informes previos basados en datos estructurales y estrategias de desacoplamiento mitocondrial local sugirieron que las mitocondrias SS y las IMF funcionarían como un sincicio que permitiría compartir la fuerza protón-motriz ($\Delta\Psi$ + gradiente de pH a través de la membrana mitocondrial interna) entre mitocondrias, de esta forma, el $\Delta\Psi_{mt}$ podría diseminarse desde una población mitocondrial hacia otra (15). La presencia de una red permanentemente interconectada entre las subpoblaciones mitocondriales daría origen a cambios rápidos en el $\Delta\Psi_{mt}$ que afectarían casi instantáneamente a ambas poblaciones mitocondriales. En este trabajo tanto los aumentos de Ca^{2+} así como el $\Delta\Psi_{mt}$ cambiaron lenta y heterogéneamente post despolarización entre las mitocondrias SS e IMF, observándose cambios cuánticos de fluorescencia. Nuestros experimentos sugieren un mecanismo lento de transferencia de $\Delta\Psi_{mt}$, haciendo poco probable una interconexión permanente entre las dos subpoblaciones mitocondriales. Las líneas de evidencia que sugieren una interacción funcional entre las subpoblaciones de mitocondrias presentadas en este estudio son: Primero; La distribución de proteínas intramitocondriales en las mitocondrias SS es sustancialmente diferente de las IMF; Segundo, después de la despolarización, $\Delta\Psi_{mt}$ disminuye en el segmento subsarcolemal para aumentar en el intermiofibrilar, siendo compatible con la propagación de una región a otra y este cambio $\Delta\Psi_{mt}$ correlaciona con el aumento de Ca^{2+} mitocondrial. Debido a la lenta cinética del cambio $\Delta\Psi_{mt}$ entre las dos subpoblaciones mitocondriales, es plausible que un proceso de difusión y/o de fusión mitocondrial explique la interacción funcional entre mitocondrias SS e IMF. Un mecanismo fue propuesto por Skulachev et al. (81) en el que los protones podrían viajar a lo largo de las mitocondrias desde la superficie

celular a las regiones intermiofibrilares a través del espacio intermembrana. Como es probable que los protones estén ligados a los lípidos en la membrana mitocondrial (82), es posible especular que los iones de calcio podrían desplazar a los protones de dichos sitios de unión, favoreciendo así la difusión. Por otro lado, recientemente Patel et al. (83) propusieron un mecanismo de transferencia de potencial impulsado por la difusión de iones K^+ y / o Na^+ a través del espacio intermembrana. Acorde a la velocidad de cambio del $\Delta\Psi_{mt}$ entre las mitocondrias es probable que las dos poblaciones mitocondriales no estén permanentemente conectadas, sugiriendo la presencia de mecanismos que regularían la unión entre ellas, como por ejemplo los fenómenos de fusión mitocondrial. Es de notar que los fenómenos de fusión mitocondrial parecen ser necesarios para mantener, desde el punto de vista energético, los ciclos de acoplamiento excitación-contracción en músculo adulto (16). Además, en este trabajo observamos que el nivel de Ca^{2+} intramitocondrial en reposo es más alto en las mitocondrias SS en comparación con las IMF, sin diferencia en el $\Delta\Psi_{mt}$ entre estas dos poblaciones mitocondriales. Este resultado es consistente con el hecho de que MICU1, el "gatekeeper" del canal de calcio MCU [48-50], aparece localizado casi exclusivamente en la región intermiofibrilar, estableciendo la base para la diferencia en las señales de Ca^{2+} observadas entre las dos poblaciones mitocondriales. De la Fuente et al. (41) mostraron recientemente, en cardiomiocitos adultos de rata, que algunos componentes del complejo MCU podrían estar enriquecidos en poblaciones de mitocondriales cercanas al RSP creando "Hot Spots" para la transferencia de Ca^{2+} desde el RSP hacia las mitocondrias, apoyando la idea de que la composición del complejo MCU podría variar en subpoblaciones de mitocondrias.

La despolarización de mitocondrias después de la estimulación eléctrica de la membrana celular depende de ambos canales intracelulares de Ca^{2+} , sugiriendo que la caída del $\Delta\Psi_{\text{mt}}$ en respuesta a la despolarización de la membrana de la fibra muscular depende de los transitorios de Ca^{2+} citosólicos. Podemos especular que después de la despolarización de la membrana celular, las señales de calcio desencadenan la diseminación del $\Delta\Psi_{\text{mt}}$ hacia las mitocondrias intermiofibrilares, mejorando el consumo de O_2 asociado a la síntesis de ATP. La elevada magnitud de Ca^{2+} mediado por la activación del RyR1 después de la despolarización explicaría por qué la inhibición de IP_3R afecta exclusivamente el OCR basal, mientras que la inhibición del RyR1 previene completamente el aumento del OCR inducido por despolarización.

En condiciones de reposo, la producción de ATP en el músculo esquelético es relativamente baja y aumenta más de dos órdenes de magnitud en las condiciones de ejercicio (4); el mecanismo que estamos visualizando aquí correspondería a la generación de una vía de señalización mediada por Ca^{2+} , la cual permitiría a la célula muscular esquelética mantener el equilibrio entre los requerimientos y la síntesis de ATP. Podemos llamar a este proceso "acoplamiento excitación-metabolismo" porque establece una conexión entre la despolarización de la membrana celular, que normalmente ocurre con el potencial de acción del músculo esquelético y el aumento de la actividad metabólica que se ha relacionado con el ejercicio y la contracción muscular. Este mecanismo sería fundamental para mantener la bioenergética del músculo esquelético y con ello, permitiría a este tejido enfrentarse a las diferentes demandas ambientales a las cuales se expone.

Preguntas abiertas

Este estudio abre una serie de preguntas sobre la respuesta metabólica del músculo esquelético. En primer lugar, ¿cómo se controla el nivel de Ca^{2+} de las mitocondrias en ausencia de MICU1 en el segmento SS? Recientemente, Dong et al (84) demostraron que MCU presenta una cisteína altamente conservada (Cys-97) la cual es sensible a oxidación desde la matriz mitocondrial regulando así la función del complejo MCU. Teniendo en cuenta que las mitocondrias SS producen más especies reactivas de oxígeno que las IMF (14) es probable que en el sector subsarcolemal la captación de Ca^{2+} sea controlada por un mecanismo dependiente de señales redox, tanto en condiciones de reposo como de estimulación. Por otro lado, otras proteínas co-reguladoras de MCU como EMRE (57) o MCUB (51) podrían distribuirse heterogéneamente entre las mitocondrias SS e IMF. En todo caso, la regulación de la captación mitocondrial de Ca^{2+} en el sector subsarcolemal, su base molecular y su importancia funcional requiere de futuras investigaciones. En segundo lugar y discutido más arriba ¿Cómo la despolarización puede inducir la propagación $\Delta\Psi_{mt}$ dentro de las mitocondrias?, lenta cinética de transferencia de $\Delta\Psi_{mt}$ sugiere la presencia de mecanismo activos, como fenómenos de fusión mitocondrial, que permitirían la transferencia de potencial. Es probable que estos fenómenos sean mediados por aumentos mitocondriales y/o citoplasmáticos de Ca^{2+} . La tercera pregunta no resuelta es cómo el mecanismo involucrado en la transferencia de $\Delta\Psi_{mt}$ entre las mitocondrias se altera en diferentes condiciones tales como distrofias musculares, atrofia muscular y envejecimiento, condiciones en donde se han descrito disfunciones mitocondriales (8). Recientemente, Lavorato et al. mostraron en cardiomiocitos adultos que el contenido de la matriz mitocondrial puede

intercambiarse a largas distancias por protuberancias tubulares delgadas, llamadas nanotúneles, que permiten el contacto entre mitocondrias individuales a distancias relativamente largas (17). Una red mitocondrial interconectada en la fibra muscular es un requisito previo para que se produzca dicha interacción y, sin embargo, dicha interconexión aún no está plenamente demostrada en el músculo esquelético adulto.

CONCLUSIÓN

Los datos presentados en esta tesis sugieren que la activación de RyR1 conecta la despolarización de la superficie celular (sarcolema y túbulo T) con el metabolismo mitocondrial en un nuevo mecanismo que denominamos acoplamiento "Excitación-Metabolismo"; este mecanismo podría ser esencial para mantener la homeostasis bioenergética de las fibras del músculo esquelético adulto. Además, las mitocondrias SS e IMF exhiben una distribución de proteína mitocondrial heterogénea y un manejo de Ca^{2+} mitocondrial diferencial, sugiriendo una red interconectada entre la subpoblación de mitocondrias, la que podría ser esencial para la homeostasis bioenergética en fibras de músculo esquelético adulto.

BIBLIOGRAFÍA

1. Booth FW, Laye MJ. Lack of adequate appreciation of physical exercise's complexities can pre-empt appropriate design and interpretation in scientific discovery. *The Journal of physiology*. 2009;587(Pt 23):5527-39.
2. Hawley JA, Hargreaves M, Joyner MJ, Zierath JR. Integrative biology of exercise. *Cell*. 2014;159(4):738-49.
3. Jorgensen SB, Richter EA, Wojtaszewski JF. Role of AMPK in skeletal muscle metabolic regulation and adaptation in relation to exercise. *The Journal of physiology*. 2006;574(Pt 1):17-31.
4. Weibel ER, Hoppeler H. Exercise-induced maximal metabolic rate scales with muscle aerobic capacity. *The Journal of experimental biology*. 2005;208(Pt 9):1635-44.
5. Gaitanos GC, Williams C, Boobis LH, Brooks S. Human muscle metabolism during intermittent maximal exercise. *Journal of applied physiology*. 1993;75(2):712-9.
6. Di Meo S, Iossa S, Venditti P. Skeletal muscle insulin resistance: role of mitochondria and other ROS sources. *The Journal of endocrinology*. 2017;233(1):R15-R42.
7. Mammucari C, Gherardi G, Zamparo I, Raffaello A, Boncompagni S, Chemello F, et al. The mitochondrial calcium uniporter controls skeletal muscle trophism in vivo. *Cell reports*. 2015;10(8):1269-79.
8. Arnould T, Michel S, Renard P. Mitochondria Retrograde Signaling and the UPR mt: Where Are We in Mammals? *International journal of molecular sciences*. 2015;16(8):18224-51.
9. Nunnari J, Suomalainen A. Mitochondria: in sickness and in health. *Cell*. 2012;148(6):1145-59.
10. Mitchell P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature*. 1961;191:144-8.
11. Neupert W, Herrmann JM. Translocation of proteins into mitochondria. *Annual review of biochemistry*. 2007;76:723-49.
12. Chandel NS. Mitochondria as signaling organelles. *BMC biology*. 2014;12:34.
13. Picard M, White K, Turnbull DM. Mitochondrial morphology, topology, and membrane interactions in skeletal muscle: a quantitative three-dimensional electron microscopy study. *Journal of applied physiology*. 2013;114(2):161-71.
14. Crochemore C, Mekki M, Corbiere C, Karoui A, Noel R, Vendeville C, et al. Subsarcolemmal and interfibrillar mitochondria display distinct superoxide production profiles. *Free radical research*. 2015;49(3):331-7.
15. Glancy B, Hartnell LM, Malide D, Yu ZX, Combs CA, Connelly PS, et al. Mitochondrial reticulum for cellular energy distribution in muscle. *Nature*. 2015;523(7562):617-20.
16. Eisner V, Lenaers G, Hajnoczky G. Mitochondrial fusion is frequent in skeletal muscle and supports excitation-contraction coupling. *The Journal of cell biology*. 2014;205(2):179-95.
17. Lavorato M, Iyer VR, Dewight W, Cupo RR, Debattisti V, Gomez L, et al. Increased mitochondrial nanotunneling activity, induced by calcium imbalance, affects

intermitochondrial matrix exchanges. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2017;114(5):E849-E58.

18. Buvinic S, Almarza G, Bustamante M, Casas M, Lopez J, Riquelme M, et al. ATP released by electrical stimuli elicits calcium transients and gene expression in skeletal muscle. *The Journal of biological chemistry*. 2009;284(50):34490-505.

19. Bustamante M, Fernandez-Verdejo R, Jaimovich E, Buvinic S. Electrical stimulation induces IL-6 in skeletal muscle through extracellular ATP by activating Ca(2+) signals and an IL-6 autocrine loop. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2014;306(8):E869-82.

20. De Stefani D, Rizzuto R, Pozzan T. Enjoy the Trip: Calcium in Mitochondria Back and Forth. *Annual review of biochemistry*. 2016;85:161-92.

21. Berridge MJ. Calcium microdomains: organization and function. *Cell calcium*. 2006;40(5-6):405-12.

22. Casas M, Figueroa R, Jorquera G, Escobar M, Molgo J, Jaimovich E. IP(3)-dependent, post-tetanic calcium transients induced by electrostimulation of adult skeletal muscle fibers. *The Journal of general physiology*. 2010;136(4):455-67.

23. Jaimovich E, Reyes R, Liberona JL, Powell JA. IP(3) receptors, IP(3) transients, and nucleus-associated Ca(2+) signals in cultured skeletal muscle. *American journal of physiology Cell physiology*. 2000;278(5):C998-C1010.

24. Franzini-Armstrong C. Architecture and regulation of the Ca²⁺ delivery system in muscle cells. *Applied physiology, nutrition, and metabolism = Physiologie appliquee, nutrition et metabolisme*. 2009;34(3):323-7.

25. Tjondrokoesoemo A, Li N, Lin PH, Pan Z, Ferrante CJ, Shirokova N, et al. Type 1 inositol (1,4,5)-trisphosphate receptor activates ryanodine receptor 1 to mediate calcium spark signaling in adult mammalian skeletal muscle. *The Journal of biological chemistry*. 2013;288(4):2103-9.

26. Calderon JC, Bolanos P, Caputo C. The excitation-contraction coupling mechanism in skeletal muscle. *Biophysical reviews*. 2014;6(1):133-60.

27. Araya R, Liberona JL, Cardenas JC, Riveros N, Estrada M, Powell JA, et al. Dihydropyridine receptors as voltage sensors for a depolarization-evoked, IP3R-mediated, slow calcium signal in skeletal muscle cells. *The Journal of general physiology*. 2003;121(1):3-16.

28. Jorquera G, Altamirano F, Contreras-Ferrat A, Almarza G, Buvinic S, Jacquemond V, et al. Cav1.1 controls frequency-dependent events regulating adult skeletal muscle plasticity. *Journal of cell science*. 2013;126(Pt 5):1189-98.

29. Rudolf R, Mongillo M, Magalhaes PJ, Pozzan T. In vivo monitoring of Ca(2+) uptake into mitochondria of mouse skeletal muscle during contraction. *The Journal of cell biology*. 2004;166(4):527-36.

30. Protasi F. Mitochondria Association to Calcium Release Units is Controlled by Age and Muscle Activity. *European journal of translational myology*. 2015;25(4):257-62.

31. Eisner V, Parra V, Lavandero S, Hidalgo C, Jaimovich E. Mitochondria fine-tune the slow Ca(2+) transients induced by electrical stimulation of skeletal myotubes. *Cell calcium*. 2010;48(6):358-70.

32. Nunes-Nesi A, Araujo WL, Obata T, Fernie AR. Regulation of the mitochondrial tricarboxylic acid cycle. *Current opinion in plant biology*. 2013;16(3):335-43.

33. Del Arco A, Contreras L, Pardo B, Satrustegui J. Calcium regulation of mitochondrial carriers. *Biochimica et biophysica acta*. 2016;1863(10):2413-21.
34. Denton RM. Regulation of mitochondrial dehydrogenases by calcium ions. *Biochimica et biophysica acta*. 2009;1787(11):1309-16.
35. Denton RM, Randle PJ, Martin BR. Stimulation by calcium ions of pyruvate dehydrogenase phosphate phosphatase. *The Biochemical journal*. 1972;128(1):161-3.
36. Llorente-Folch I, Rueda CB, Pardo B, Szabadkai G, Duchen MR, Satrustegui J. The regulation of neuronal mitochondrial metabolism by calcium. *The Journal of physiology*. 2015;593(16):3447-62.
37. McCormack JG, Halestrap AP, Denton RM. Role of calcium ions in regulation of mammalian intramitochondrial metabolism. *Physiological reviews*. 1990;70(2):391-425.
38. Rutter GA, Denton RM. Regulation of NAD⁺-linked isocitrate dehydrogenase and 2-oxoglutarate dehydrogenase by Ca²⁺ ions within toluene-permeabilized rat heart mitochondria. Interactions with regulation by adenine nucleotides and NADH/NAD⁺ ratios. *The Biochemical journal*. 1988;252(1):181-9.
39. De Marchi U, Thevenet J, Hermant A, Dioum E, Wiederkehr A. Calcium co-regulates oxidative metabolism and ATP synthase-dependent respiration in pancreatic beta cells. *The Journal of biological chemistry*. 2014;289(13):9182-94.
40. del Arco A, Satrustegui J. Identification of a novel human subfamily of mitochondrial carriers with calcium-binding domains. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(23):24701-13.
41. De La Fuente S, Fernandez-Sanz C, Vail C, Agra EJ, Holmstrom K, Sun J, et al. Strategic Positioning and Biased Activity of the Mitochondrial Calcium Uniporter in Cardiac Muscle. *The Journal of biological chemistry*. 2016;291(44):23343-62.
42. Rizzuto R, Pinton P, Carrington W, Fay FS, Fogarty KE, Lifshitz LM, et al. Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca²⁺ responses. *Science*. 1998;280(5370):1763-6.
43. Rizzuto R, Pozzan T. Microdomains of intracellular Ca²⁺: molecular determinants and functional consequences. *Physiological reviews*. 2006;86(1):369-408.
44. Baughman JM, Perocchi F, Girgis HS, Plovanich M, Belcher-Timme CA, Sancak Y, et al. Integrative genomics identifies MCU as an essential component of the mitochondrial calcium uniporter. *Nature*. 2011;476(7360):341-5.
45. De Stefani D, Raffaello A, Teardo E, Szabo I, Rizzuto R. A forty-kilodalton protein of the inner membrane is the mitochondrial calcium uniporter. *Nature*. 2011;476(7360):336-40.
46. Jiang D, Zhao L, Clapham DE. Genome-wide RNAi screen identifies Letm1 as a mitochondrial Ca²⁺/H⁺ antiporter. *Science*. 2009;326(5949):144-7.
47. Beutner G, Sharma VK, Giovannucci DR, Yule DI, Sheu SS. Identification of a ryanodine receptor in rat heart mitochondria. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(24):21482-8.
48. Trenker M, Malli R, Fertschai I, Levak-Frank S, Graier WF. Uncoupling proteins 2 and 3 are fundamental for mitochondrial Ca²⁺ uniport. *Nature cell biology*. 2007;9(4):445-52.
49. Pan X, Liu J, Nguyen T, Liu C, Sun J, Teng Y, et al. The physiological role of mitochondrial calcium revealed by mice lacking the mitochondrial calcium uniporter. *Nature cell biology*. 2013;15(12):1464-72.

50. De Stefani D, Patron M, Rizzuto R. Structure and function of the mitochondrial calcium uniporter complex. *Biochimica et biophysica acta*. 2015.
51. Raffaello A, De Stefani D, Sabbadin D, Teardo E, Merli G, Picard A, et al. The mitochondrial calcium uniporter is a multimer that can include a dominant-negative pore-forming subunit. *The EMBO journal*. 2013;32(17):2362-76.
52. Mallilankaraman K, Cardenas C, Doonan PJ, Chandramoorthy HC, Irrinki KM, Golenar T, et al. MCUR1 is an essential component of mitochondrial Ca(2+) uptake that regulates cellular metabolism. *Nature cell biology*. 2015;17(7):953.
53. Sancak Y, Markhard AL, Kitami T, Kovacs-Bogdan E, Kamer KJ, Udeshi ND, et al. EMRE is an essential component of the mitochondrial calcium uniporter complex. *Science*. 2013;342(6164):1379-82.
54. Paillard M, Csordas G, Szanda G, Golenar T, Debattisti V, Bartok A, et al. Tissue-Specific Mitochondrial Decoding of Cytoplasmic Ca²⁺ Signals Is Controlled by the Stoichiometry of MICU1/2 and MCU. *Cell reports*. 2017;18(10):2291-300.
55. Murgia M, Rizzuto R. Molecular diversity and pleiotropic role of the mitochondrial calcium uniporter. *Cell calcium*. 2015;58(1):11-7.
56. Kovacs-Bogdan E, Sancak Y, Kamer KJ, Plovanich M, Jambhekar A, Huber RJ, et al. Reconstitution of the mitochondrial calcium uniporter in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2014;111(24):8985-90.
57. Vais H, Mallilankaraman K, Mak DO, Hoff H, Payne R, Tanis JE, et al. EMRE Is a Matrix Ca(2+) Sensor that Governs Gatekeeping of the Mitochondrial Ca(2+) Uniporter. *Cell reports*. 2016;14(3):403-10.
58. Antony AN, Paillard M, Moffat C, Juskeviciute E, Correnti J, Bolon B, et al. MICU1 regulation of mitochondrial Ca(2+) uptake dictates survival and tissue regeneration. *Nature communications*. 2016;7:10955.
59. Mallilankaraman K, Doonan P, Cardenas C, Chandramoorthy HC, Muller M, Miller R, et al. MICU1 is an essential gatekeeper for MCU-mediated mitochondrial Ca(2+) uptake that regulates cell survival. *Cell*. 2012;151(3):630-44.
60. Perocchi F, Gohil VM, Girgis HS, Bao XR, McCombs JE, Palmer AE, et al. MICU1 encodes a mitochondrial EF hand protein required for Ca(2+) uptake. *Nature*. 2010;467(7313):291-6.
61. Patron M, Checchetto V, Raffaello A, Teardo E, Vecellio Reane D, Mantoan M, et al. MICU1 and MICU2 finely tune the mitochondrial Ca²⁺ uniporter by exerting opposite effects on MCU activity. *Molecular cell*. 2014;53(5):726-37.
62. Payne R, Hoff H, Roskowski A, Foskett JK. MICU2 Restricts Spatial Crosstalk between InsP3R and MCU Channels by Regulating Threshold and Gain of MICU1-Mediated Inhibition and Activation of MCU. *Cell reports*. 2017;21(11):3141-54.
63. Vecellio Reane D, Vallese F, Checchetto V, Acquasaliente L, Butera G, De Filippis V, et al. A MICU1 Splice Variant Confers High Sensitivity to the Mitochondrial Ca²⁺ Uptake Machinery of Skeletal Muscle. *Molecular cell*. 2016;64(4):760-73.
64. DiFranco M, Quinonez M, Capote J, Vergara J. DNA transfection of mammalian skeletal muscles using in vivo electroporation. *Journal of visualized experiments : JoVE*. 2009(32).
65. Suzuki J, Kanemaru K, Ishii K, Ohkura M, Okubo Y, Iino M. Imaging intraorganellar Ca²⁺ at subcellular resolution using CEPIA. *Nature communications*. 2014;5:4153.

66. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature methods*. 2012;9(7):676-82.
67. Akerboom J, Carreras Calderon N, Tian L, Wabnig S, Prigge M, Tolo J, et al. Genetically encoded calcium indicators for multi-color neural activity imaging and combination with optogenetics. *Frontiers in molecular neuroscience*. 2013;6:2.
68. Powell JA, Carrasco MA, Adams DS, Drouet B, Rios J, Muller M, et al. IP(3) receptor function and localization in myotubes: an unexplored Ca(2+) signaling pathway in skeletal muscle. *Journal of cell science*. 2001;114(Pt 20):3673-83.
69. Chen TW, Wardill TJ, Sun Y, Pulver SR, Renninger SL, Baohan A, et al. Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity. *Nature*. 2013;499(7458):295-300.
70. Wacquier B, Combettes L, Van Nhieu GT, Dupont G. Interplay Between Intracellular Ca(2+) Oscillations and Ca(2+)-stimulated Mitochondrial Metabolism. *Scientific reports*. 2016;6:19316.
71. Glancy B, Hartnell LM, Combs CA, Fenmou A, Sun J, Murphy E, et al. Power Grid Protection of the Muscle Mitochondrial Reticulum. *Cell reports*. 2017;19(3):487-96.
72. Blaauw B, Del Piccolo P, Rodriguez L, Hernandez Gonzalez VH, Agatea L, Solagna F, et al. No evidence for inositol 1,4,5-trisphosphate-dependent Ca²⁺ release in isolated fibers of adult mouse skeletal muscle. *The Journal of general physiology*. 2012;140(2):235-41.
73. Dickinson GD, Ellefsen KL, Dawson SP, Pearson JE, Parker I. Hindered cytoplasmic diffusion of inositol trisphosphate restricts its cellular range of action. *Science signaling*. 2016;9(453):ra108.
74. Das AM, Harris DA. Control of mitochondrial ATP synthase in heart cells: inactive to active transitions caused by beating or positive inotropic agents. *Cardiovascular research*. 1990;24(5):411-7.
75. Tonkonogi M, Sahlin K. Rate of oxidative phosphorylation in isolated mitochondria from human skeletal muscle: effect of training status. *Acta physiologica Scandinavica*. 1997;161(3):345-53.
76. Korzeniewski B. Regulation of oxidative phosphorylation through parallel activation. *Biophysical chemistry*. 2007;129(2-3):93-110.
77. Brini M, Manni S, Pierobon N, Du GG, Sharma P, MacLennan DH, et al. Ca²⁺ signaling in HEK-293 and skeletal muscle cells expressing recombinant ryanodine receptors harboring malignant hyperthermia and central core disease mutations. *The Journal of biological chemistry*. 2005;280(15):15380-9.
78. Boncompagni S, Rossi AE, Micaroni M, Hamilton SL, Dirksen RT, Franzini-Armstrong C, et al. Characterization and temporal development of cores in a mouse model of malignant hyperthermia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106(51):21996-2001.
79. Murray BE, Froemming GR, Maguire PB, Ohlendieck K. Excitation-contraction-relaxation cycle: role of Ca²⁺-regulatory membrane proteins in normal, stimulated and pathological skeletal muscle (review). *International journal of molecular medicine*. 1998;1(4):677-87.

80. Pardo B, Contreras L, Serrano A, Ramos M, Kobayashi K, Iijima M, et al. Essential role of aralar in the transduction of small Ca²⁺ signals to neuronal mitochondria. *The Journal of biological chemistry*. 2006;281(2):1039-47.
81. Skulachev VP. Mitochondrial filaments and clusters as intracellular power-transmitting cables. *Trends in biochemical sciences*. 2001;26(1):23-9.
82. Xu L, Ojemyr LN, Bergstrand J, Brzezinski P, Widengren J. Protonation Dynamics on Lipid Nanodiscs: Influence of the Membrane Surface Area and External Buffers. *Biophysical journal*. 2016;110(9):1993-2003.
83. Patel KD, Glancy B, Balaban RS. The electrochemical transmission in I-Band segments of the mitochondrial reticulum. *Biochimica et biophysica acta*. 2016;1857(8):1284-9.
84. Dong Z, Shanmughapriya S, Tomar D, Siddiqui N, Lynch S, Nemani N, et al. Mitochondrial Ca²⁺ Uniporter Is a Mitochondrial Luminal Redox Sensor that Augments MCU Channel Activity. *Molecular cell*. 2017.

FIGURAS PRINCIPALES

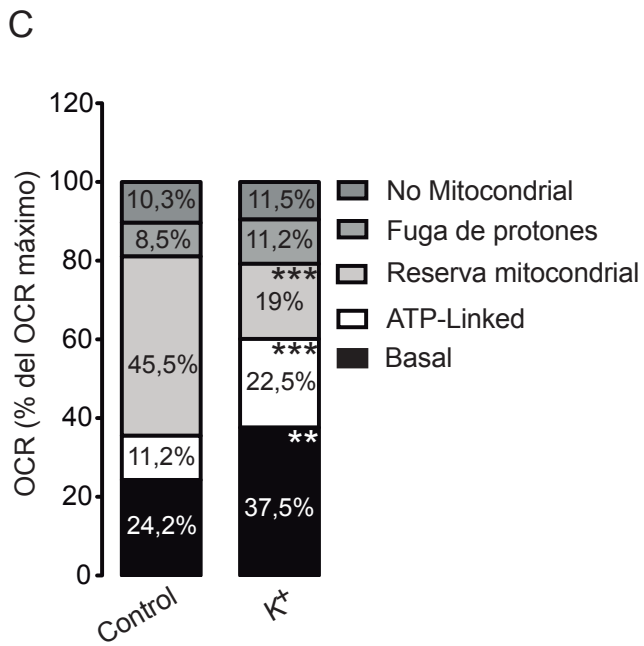
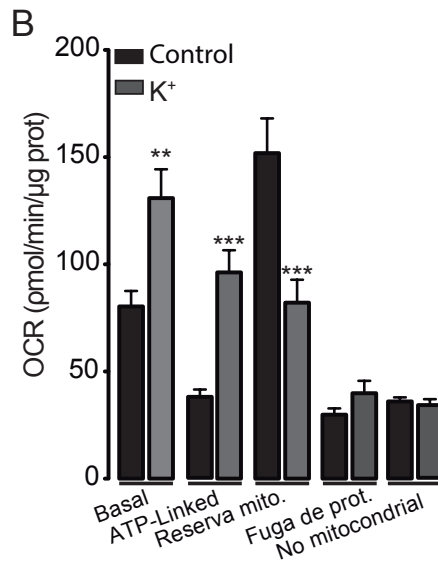
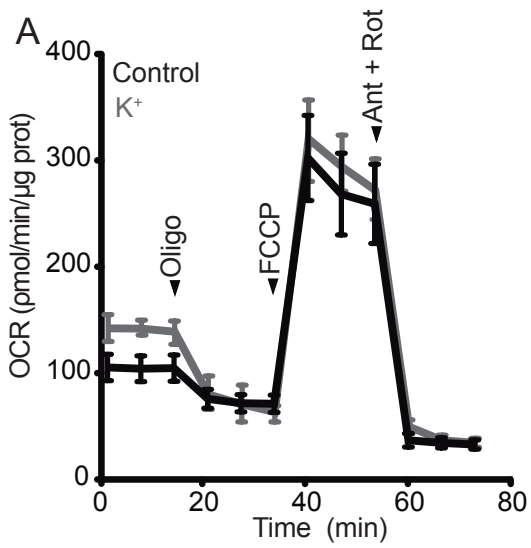


Figura 1. La despolarización promueve el consumo de oxígeno en las fibras musculares esqueléticas.

Las fibras musculares aisladas se despolarizaron usando K^+ (65 mM). Las fibras musculares fueron despolarizadas durante un minuto, luego fueron lavadas con buffer SeaHorse (acorde a la sección “*materiales y métodos*”) y 5 minutos después se midió el OCR. A) Cinética representativa obtenida de un experimento de OCR en fibras musculares controles (línea negra) o despolarizadas (línea gris). B) Cuantificación del OCR basal, asociado a la síntesis de ATP, fuga de protones y OCR no mitocondrial en fibras controles (barras negras) y despolarizadas (barras grises). C) Se calculó la distribución porcentual del OCR basal, unida a ATP, fuga de protones y OCR no mitocondrial. La OCR máxima (tras la administración de FCCP) se consideró como 100%. La contribución porcentual de cada variable se muestra dentro de cada barra según corresponda. N = 5 experimentos independientes **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$ en comparación con las condiciones de control.

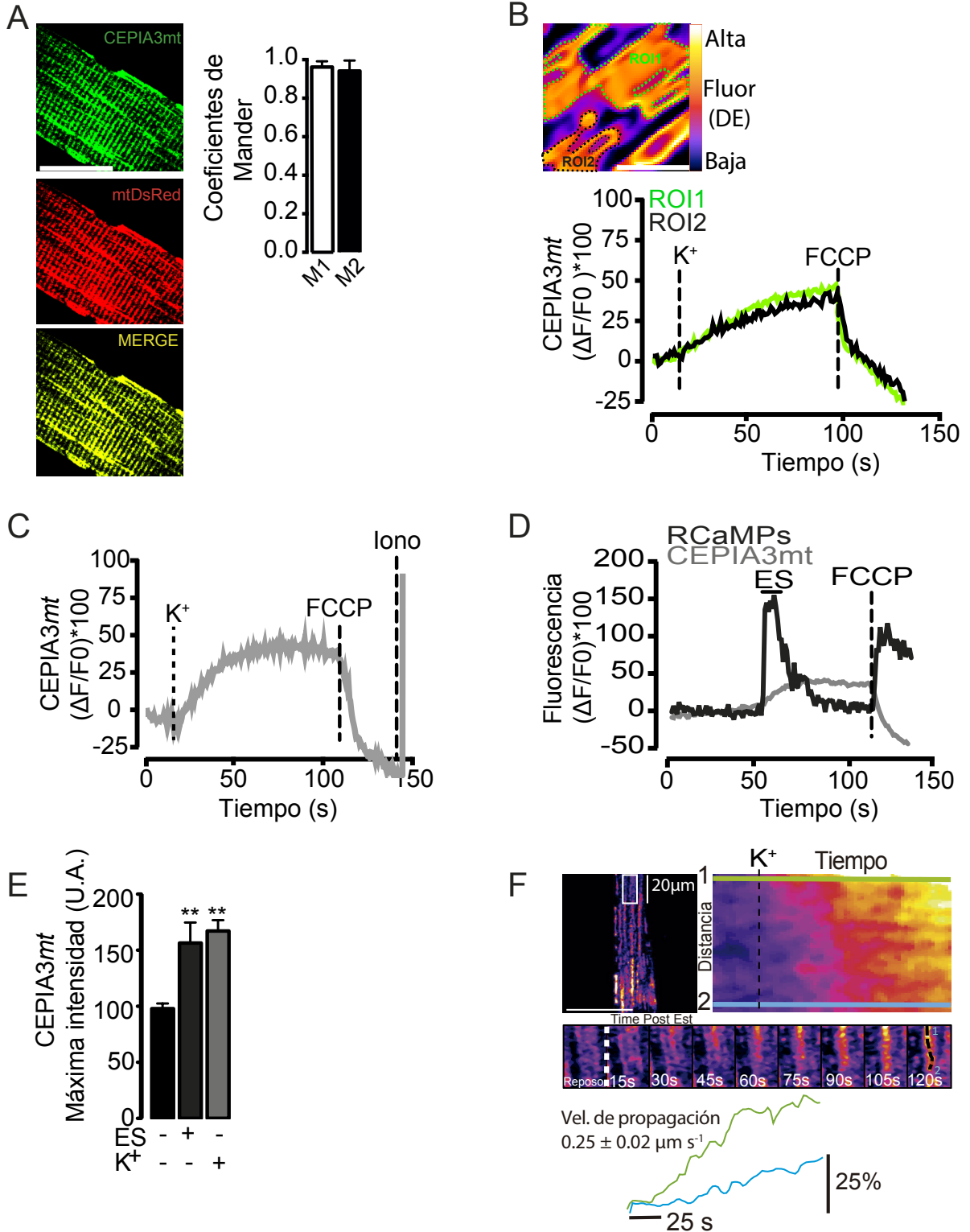


Figura 2. Dinámica mitocondrial de Ca^{2+} visualizada con CEPIA3mt.

El músculo FDB fue electroporado *in vivo* con diferentes sensores y una semana después las fibras musculares fueron aisladas para los diferentes experimentos (acorde a la sección “*materiales y métodos*”) A) Las fibras musculares se co-electroporaron con CEPIA3mt (panel superior izquierdo) y mtDsRed (panel central izquierdo). Se observó el grado de alta co-localización entre ambos sensores (panel inferior izquierdo). Se muestran los coeficientes de Mander (panel derecho) para el canal verde sobre rojo (M1) y para el canal rojo sobre verde (M2), la barra de escala es de 15 μm B) Las fibras se mantuvieron en Krebs Ringer con BTS (10 μM). Luego de 10 segundos de línea basal se estimuló con K^+ . Al término del experimento se utilizó FCCP para desacoplar la mitocondria. Se muestran la desviación estándar de la fluorescencia obtenida a través de ImageJ en un crop de 4 x 4 μm (panel superior) y la cinética representativa (panel inferior) de dos regiones de interés (ROI) específicas (verde y negro). La barra de escala es 2 μm C) Las fibras electroporadas con CEPIA3mt se estimularon con K^+ (65 mM); FCCP (1 μM) se añadió al final de los experimentos para desacoplar las mitocondrias. Se administró ionomicina al término del set experimental. Se muestra la cinética representativa a partir del promedio de 10 ROI determinados en una única fibra muscular. D) Fibras se electroporaron con RCamPs (sensor de Ca^{2+} citosólico, línea negra) y CEPIA3mt (sensor de Ca^{2+} mitocondrial, línea gris) y fueron expuestas a estimulación eléctrica; se muestra la cinética representativa a partir del promedio de 10 ROI determinados en una única fibra. E) La fluorescencia máxima obtenida desde CEPIA3mt luego de la estimulación con K^+ o ES F), Fibras musculares fueron electroporadas con CEPIA3mt. Se observa un corte apical de 2 μm de la fluorescencia en pseudocolor (Panel superior

izquierdo). La propagación de ondas de calcio intramitocondriales en fibras estimuladas con 65 mM de K^+ . Se realizó un pseudo-line scan de un área de 15 μm (panel superior derecho). Panel medio muestra la secuencia foto a foto de la onda intramitocondrial. El panel inferior muestra el perfil de fluorescencia obtenido a partir de dos ROI (verde y azul) seleccionados en el pseudo-line scan. N = 4 experimentos independientes y 25 fibras fueron evaluados en cada caso. **, $p < 0.01$ versus control.

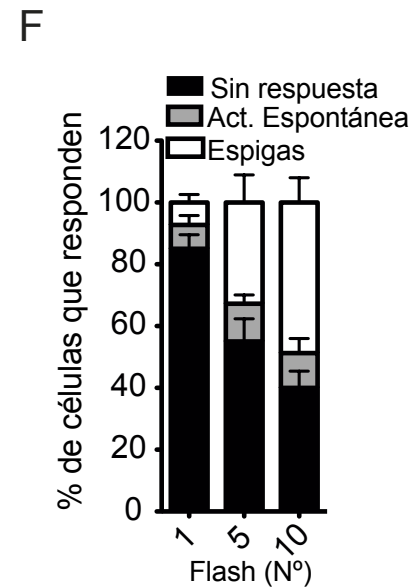
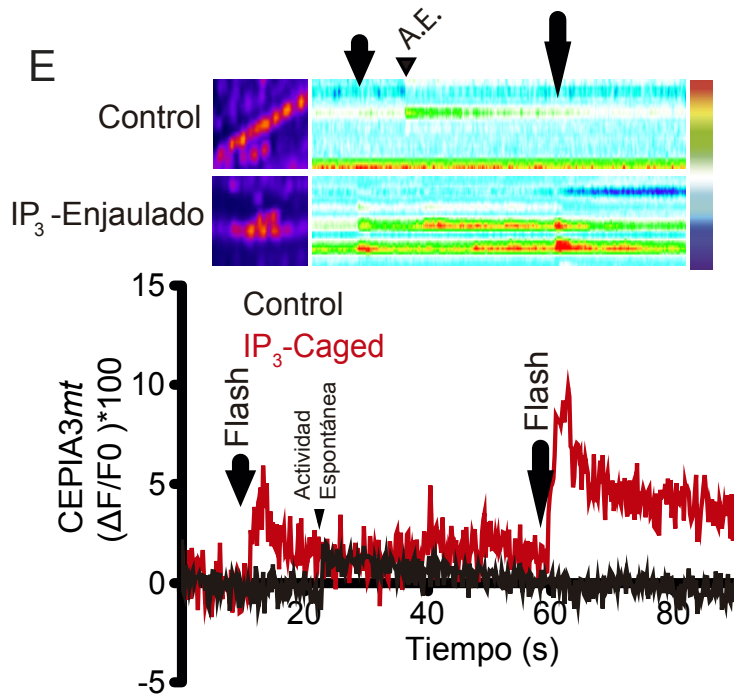
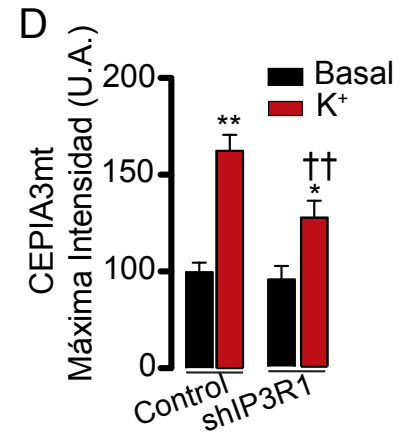
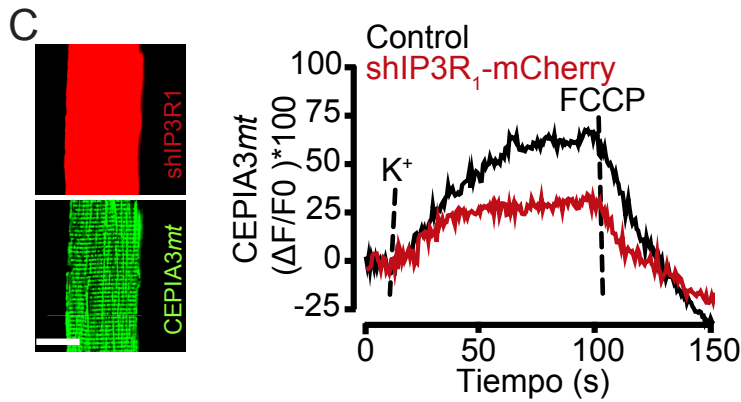
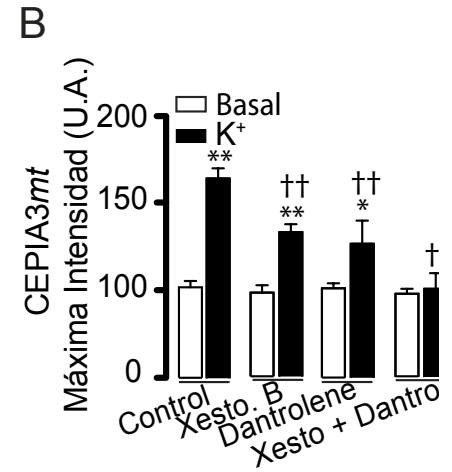
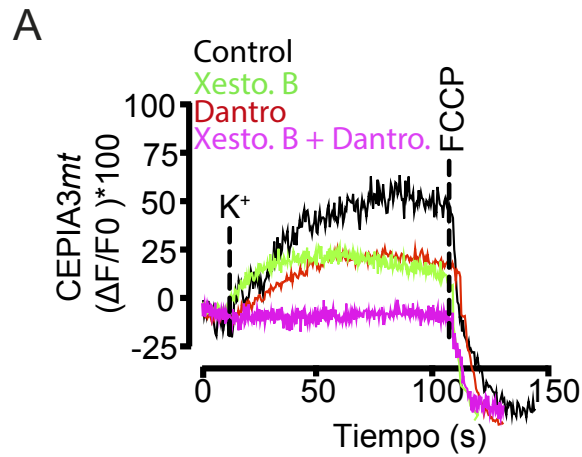


Figura 3. El IP₃R y el RyR1 participan en el aumento de Ca²⁺ mitocondrial después de la despolarización.

El músculo FDB fue electroporado con el sensor de Ca²⁺ mitocondrial CEPIA3mt. La cinética representativa y la fluorescencia máxima se calcularon en cada condición utilizando el promedio de 10 ROI obtenidos desde una única fibra muscular por condición. Las fibras se mantuvieron en Krebs Ringer con BTS (10 μM) y se preincubaron durante 1 h con xestospongina B (10 μM), dantroleno (50 μM) o ambos inhibidores, A muestra las cinéticas representativas y B muestra la máxima fluorescencia observada para cada condición. C y D, fibras fueron co-electroporadas con CEPIA3mt más sh-IP₃R1-mCherry o mCherry. sh-IP₃R1-mCherry redujo parcialmente los aumentos de calcio en respuesta al despolarización. C) Panel izquierdo muestra una fibra muscular que contiene ambos plasmidios junto a su cinética representativa (panel derecho) y la barra de escala es 15μm. D) Muestra máxima fluorescencia alcanzada post depolarización con K⁺ en células controles (barras negras) o células con silenciamiento del IP₃R (barras rojas) E), fibras musculares electroporadas con CEPIA3mt y preincubadas con IP₃ enjaulado. La fotólisis aumentó el nivel de calcio mitocondrial solo en presencia de la jaula de IP₃. Panel izquierdo muestra un crop de 2 x 2 μm. Los cambios de fluorescencia se muestran en pseudo-color. Se aplicaron 5 y 10 pulsos de liberación (primera y segunda flecha negra). Panel inferior muestra la cinética representativa (A.S. Actividad espontánea) F) Se muestra el porcentaje de respuesta a diferente número de flashes UV. Se realizaron N = 6 experimentos y se evaluaron 25 fibras cada vez. *, p <0.05; ** / ††, p <0.01. † Diferencia vs control estimulado con K +. * Diferencia vs basal.

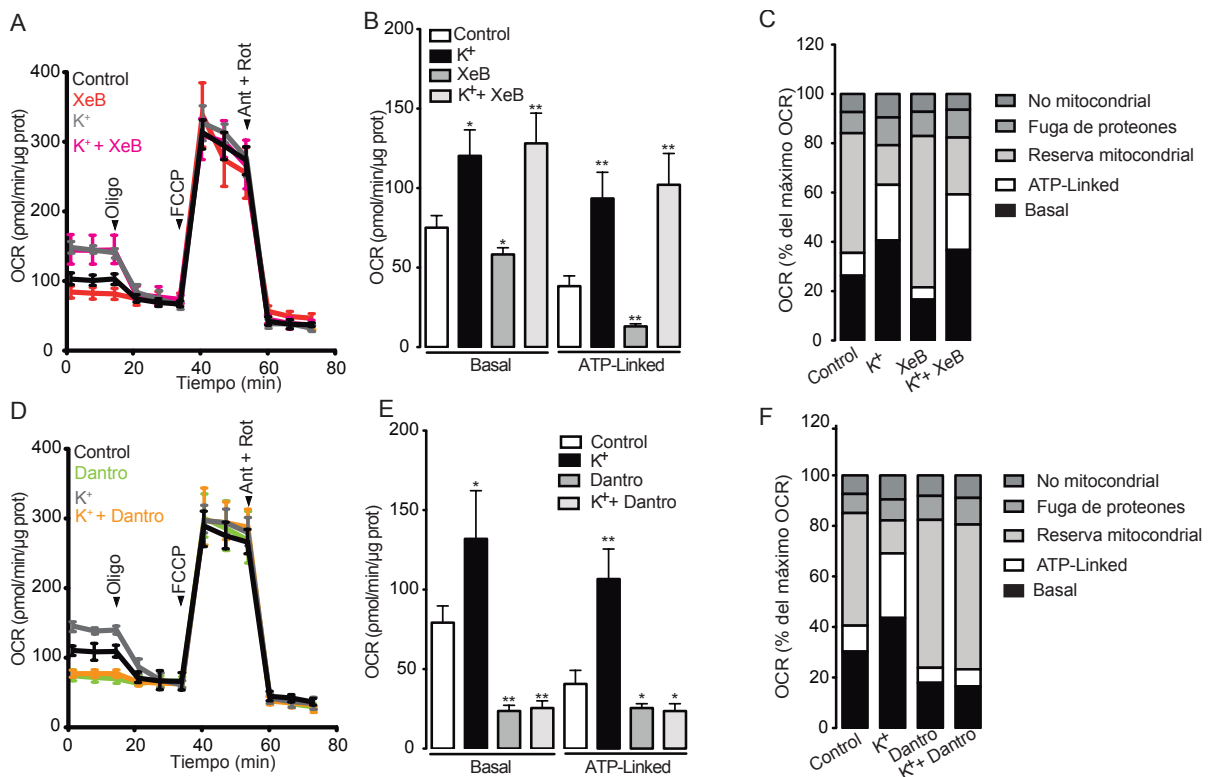
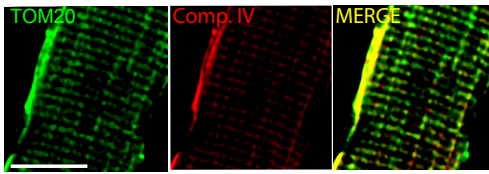


Figura 4. La activación de RyR1 pero no de IP₃R es necesaria para aumentar el consumo de O₂ mitocondrial después de la despolarización.

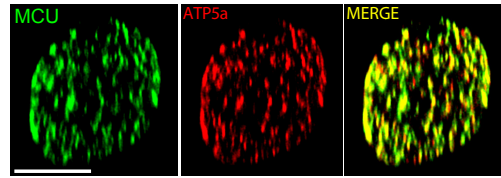
Fibras musculares adultas FDB mantenidas en medio Seahorse con BTS (10 μM) se preincubaron durante 1 h con xestospongina B (10 μM) o dantroleno (50 μM). Las fibras se despolarizaron durante 1 min, lavadas con medio Seahorse y luego de 5 min se procedió con la medición de OCR A) y D) cinética representativa de OCR en fibras controles (negro), en presencia de Xestospongina B (rojo), en presencia de dantroleno (verde), despolarizadas (gris), despolarizadas en presencia de Xestospongina B (fucsia) o despolarizadas en presencia de dantroleno (amarillo) B) y

E) cuantificación de OCR basal y del OCR asociado a la síntesis de ATP en fibras musculares preincubados con xestospongina B o dantroleno, respectivamente. C) y F) Se calculó la distribución porcentual de la OCR basal, asociado a la síntesis de ATP, la fuga de protones y OCR no mitocondrial. La OCR máximo se consideró como 100%. N = 5 experimentos independientes. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$ en comparación con las condiciones de control.

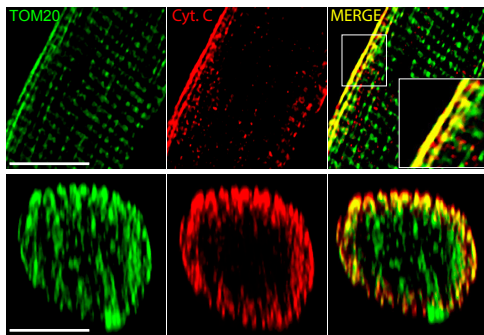
A



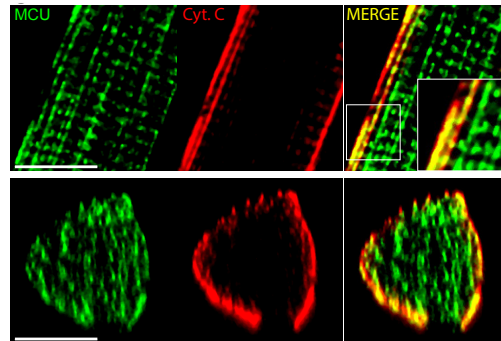
B



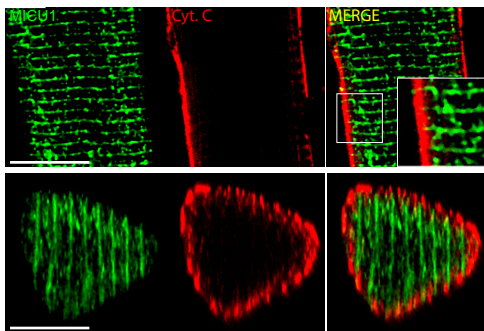
C



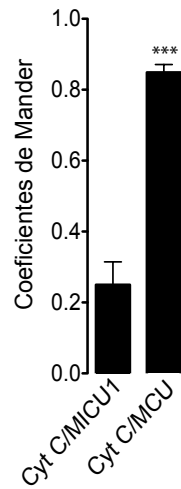
D



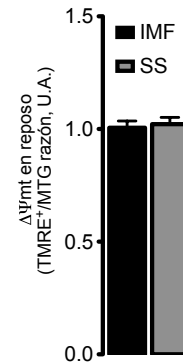
E



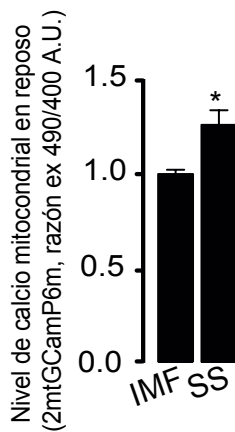
F



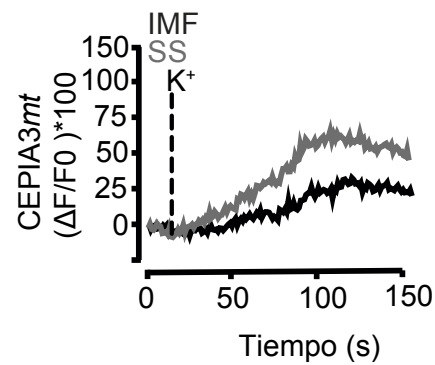
G



H



I



J

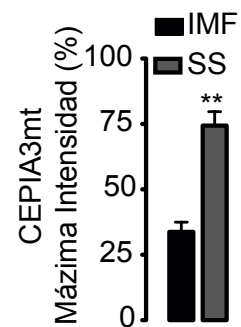


Figura 5. Heterogeneidad en las proteínas intramitocondriales y manejo de calcio entre mitocondrias SS e IFM en fibras musculares adultas.

A) Inmunofluorescencia indirecta de complejo IV de la CTE y TOM20 (importina, marcador general de mitocondrias) en cortes de 1 μm confocales de fibras musculares adultas. B) Reconstrucción 3D de la Inmunofluorescencia de MCU y ATP5a en fibras musculares adultas C) Inmunofluorescencia de citocromo C (CytC) y TOM20 en cortes confocales de 1 μm (panel superior). Se muestra la reconstrucción de la proyección Z de la fibra completa (panel inferior). D-E), Inmunofluorescencia de MCU (D) o MICU1 (E) más CytC. La reconstrucción de la proyección Z se muestra en el panel superior e inferior en cada figura respectivamente. F), los coeficientes de Manders se calcularon evaluando el nivel de co-localización entre CytC y MCU o MICU1. G) Las fibras musculares aisladas del músculo FDB se incubaron durante 30 minutos con TMRE+ más mitotracker green (MTG). Se muestra la cuantificación de fluorescencia TMRE+/MTG. H) Las fibras musculares se electroporaron con el sensor ratiométrico de Ca^{2+} con destinación mitocondrial mtGcamP6m y se evaluó la fluorescencia en el segmento subsarcolemal e intermiofibrilar I - J) El músculo FDB adulto se sometió a electroporación con el sensor de Ca^{2+} CEPIA3mt. I) Se evaluó el cambio de fluorescencia en el eje x, z, t. Se determinó la cinética representativa del área subsarcolemal (primeras 5 μm) o el área intermiofibrilar J) Se calculó la fluorescencia máxima obtenida luego de la despolarización en el área subsarcolemal o intermiofibrilar. N = 6 experimentos independientes y se evaluaron 25 fibras en cada caso. **, p <0.01 vs IMFM, ***, p <0.001 vs cito C / MICU1 coeficiente de Manders.

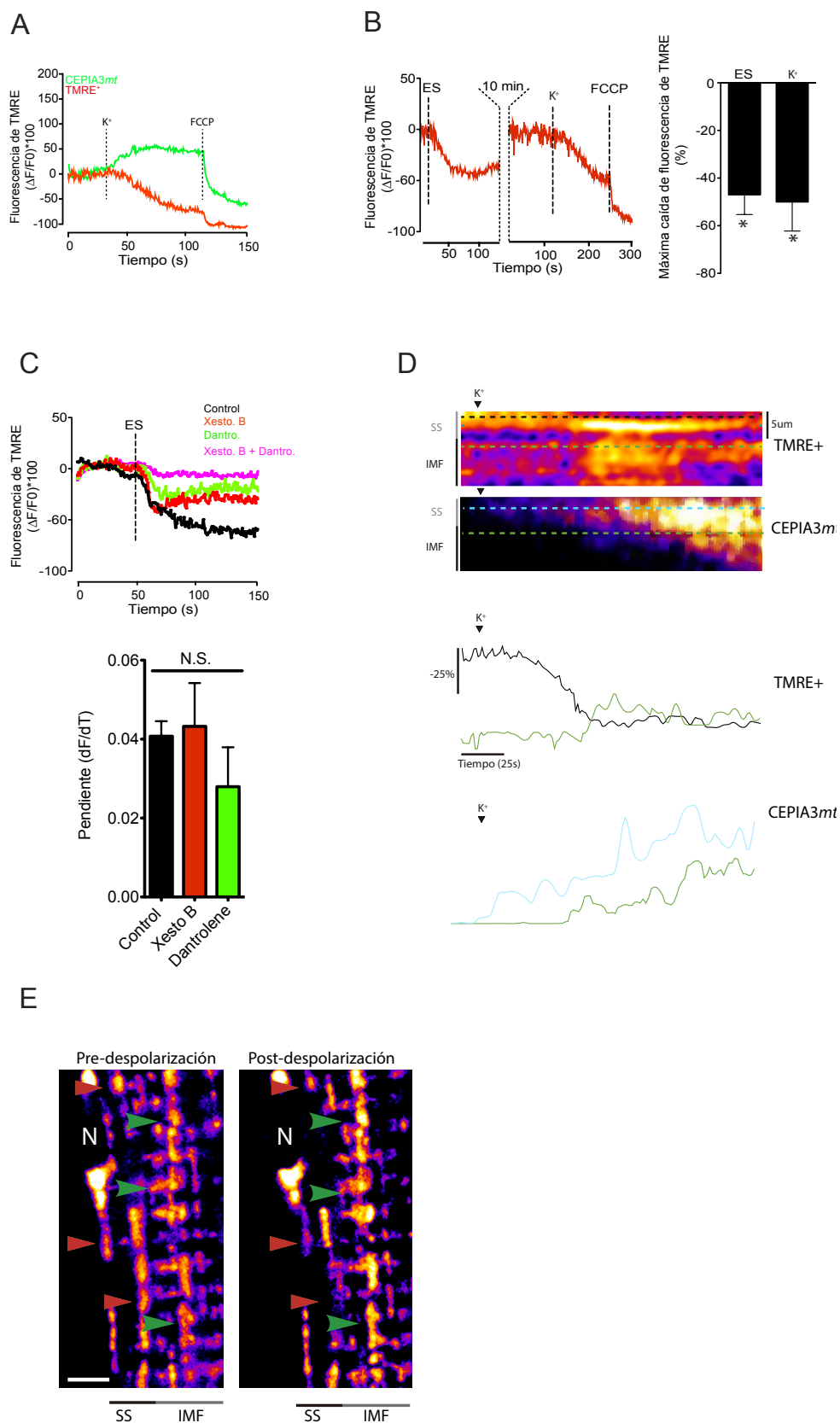


Figura 6. $\Delta\Psi_m$ parece propagarse desde las regiones superficiales hacia la zona central de la fibra muscular.

A) Las fibras musculares se electroporaron con CEPIA3mt y se incubaron con TMRE⁺ (20 nM) durante 30 min. La fluorescencia mitocondrial subsarcolemal se midió después de la despolarización con un medio alto medio K⁺. Se muestran la cinética representativa B), las fibras musculares se incubaron con TMRE + (20 nM) y la fluorescencia en la región subsarcolemal se evaluó después de la estimulación eléctrica o medio alto K⁺. Al final del experimento, se añadió FCCP 0,5 μ M para despolarizar las mitocondrias (panel izquierdo). La cuantificación de la máxima caída de fluorescencia se muestra en el panel derecho. C) Las fibras musculares incubadas con TMRE + (20 nM) se estimularon con ES en presencia de diferentes inhibidores. La cinética representativa se observa en el panel superior. Se muestra la pendiente de la despolarización mitocondrial (panel de inferior). D) Se analizó una línea "scan" de la región subsarcolemal e intermiofibrilar después de la despolarización inducida por K⁺; se muestra la imagen representativa de cambio $\Delta\Psi_m$ y manejo del calcio (panel superior) y cinética representativa (panel inferior). E) Las fibras musculares se incubaron con TMRE + (20 nM) y las imágenes se adquirieron antes y después de la despolarización de con K⁺. Las flechas rojas muestran la reducción de la fluorescencia cerca de la superficie de la fibra y la punta de flecha verde muestran áreas de aumento de la fluorescencia hacia el centro de la fibra. Barra de escala 5 μ m N = 6 experimentos independientes. *, p <0.05

FIGURAS SUPLEMENTARIAS

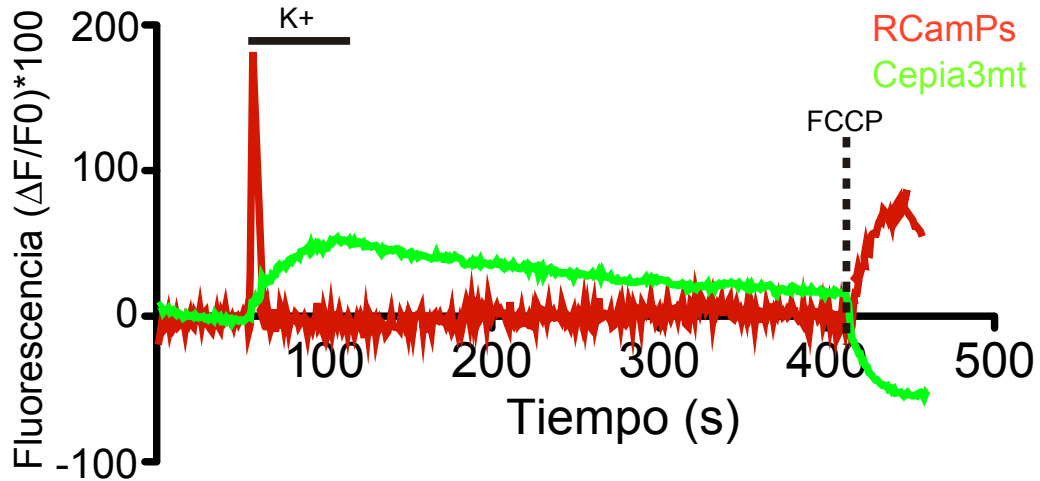


Fig. S1. La despolarización con K^+ induce una señal transitoria de Ca^{2+} mitocondrial.

Fibras musculares fueron co-electroporadas con el sensor de Ca^{2+} mitocondrial CEPIA3mt y con el sensor de Ca^{2+} citosólico RCaMPs. Una semana posterior a la electroporación las fibras fueron aisladas y despolarizadas con un medio alto en K^+ . Se observa la cinética representativa de las fibras obtenidas desde un animal. Al término del experimento se utilizó FCCP para desacoplar las mitocondrias.

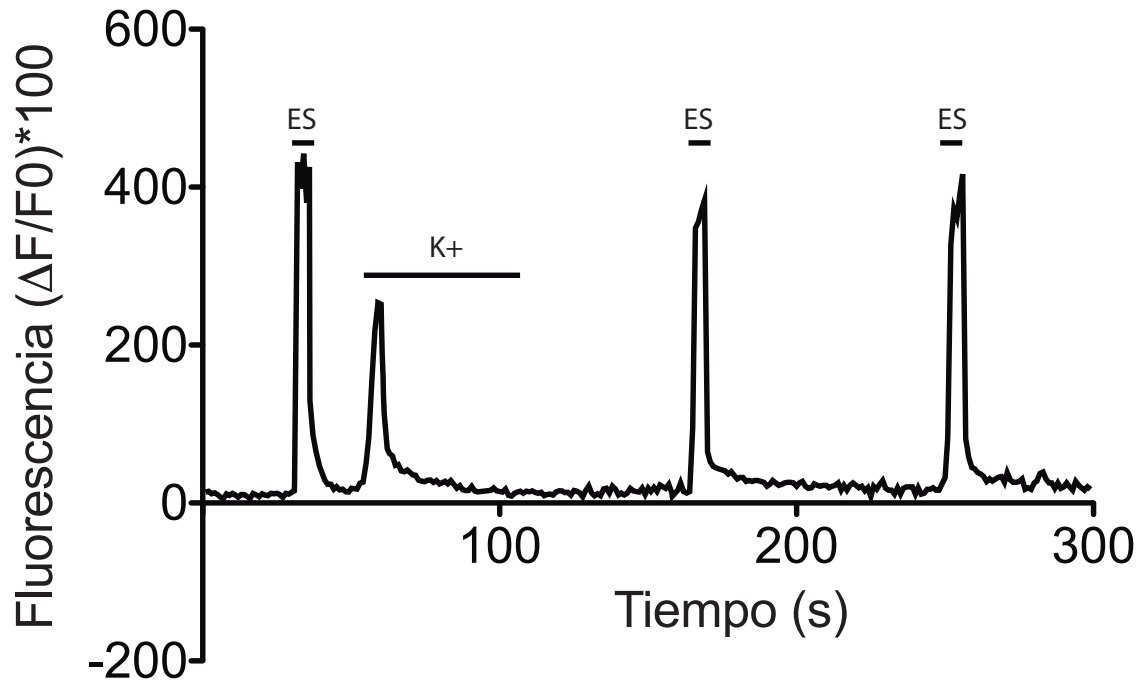


Fig. S2. La estimulación con K^+ no afecta la generación de transitorios de Ca^{2+} citoplasmáticos inducidos por ES.

Fibras musculares fueron incubadas con FLUO-4M durante 30 minutos y sometidas a estímulo eléctrico (ES) o K^+ . Se muestra la cinética representativa de N = 2 animales, *** p < 0.001.

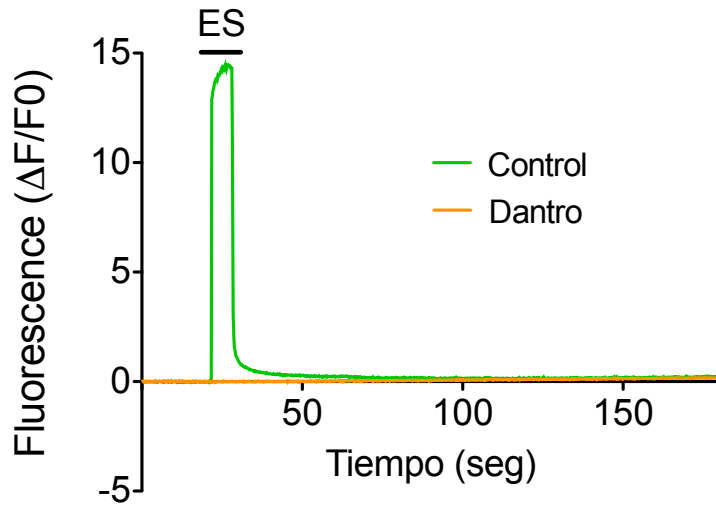


Fig. S3. Dantroleno previene el aumento de Ca^{2+} citoplasmáticos inducido por ES.

Fibras musculares fueron incubadas con FLUO-4M en presencia o ausencia de dantroleno. Las células se sometieron a ES de campo y se determinó los cambios en la fluorescencia citosólica. Se muestra la cinética representativa del 20 fibras evaluadas de un animal.

A

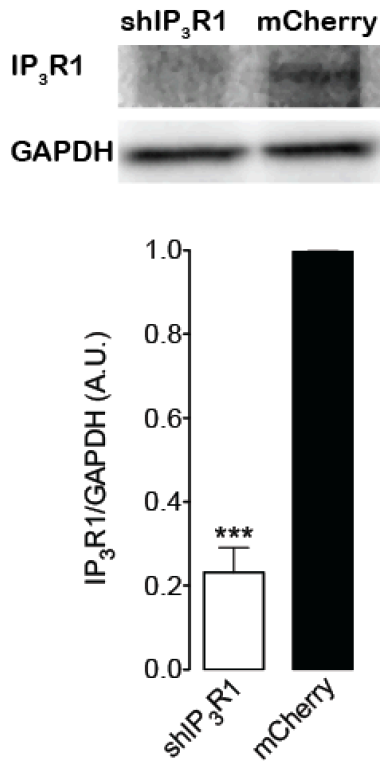


Fig. S4. Eficiencia de silenciamiento del IP₃R1 en la fibra del músculo esquelético adulto.

El músculo FDB se sometió a electroporación con shIP3R1-mCherry o Luc-mCherry y una semana más tarde se evaluaron los niveles de IP₃R1. Los datos fueron normalizados contra el nivel de GAPDH. N = 3 animales, *** p <0.001.