



<https://doi.org/10.24245/mim.v42id.10995>

Fisiología de la reversibilidad de la transición de la permeabilidad mitocondrial en la isquemia reperusión

Mitochondrial permeability transition reversibility. Theoretical and experimental approaches in the ischaemia reperfusion physiology.

Emilio Montes Isunza,^{2,5} Marco V José,² María del Carmen Martínez Escobar,¹ Roxana Olguín,³ Joaquín David Morales Solís,⁵ Rodrigo Gopar Nieto⁴

Resumen

OBJETIVO: Demostrar que la transición de la permeabilidad mitocondrial es un proceso fisiológico y reversible y un potencial blanco terapéutico en la isquemia reperusión.

MATERIALES Y MÉTODOS: Se aislaron mitocondrias de miocardio de ratas Wistar y de *Saccharomyces cerevisiae* mediante centrifugación diferencial y se evaluó su funcionalidad con oximetría por electrodo de Clark. El potencial transmembranal mitocondrial se midió por citometría de flujo (mitometría) usando DiOC2(3) en un citómetro CytoFLEX S (excitación 488 nm). Para inducir la transición de permeabilidad se expusieron mitocondrias a Ca^{2+} 50 μM y posteriormente se evaluó la reversibilidad mediante quelación con ácido etilendiaminetetraacético (EDTA) (equimolar) al cabo de 5 minutos. Además, se realizaron mediciones con safranina en espectrofotometría y análisis teórico con el método de distribución de afinidades.

RESULTADOS: La exposición a 50 μM de calcio produjo una caída del potencial transmembranal compatible con apertura del poro-estado de transición de permeabilidad, y la adición de ácido etilendiaminetetraacético revirtió de forma significativa este fenómeno. En el análisis global se reporta una reversibilidad del 66% del proceso al término de 5 minutos de exposición, con significación estadística ($p < 0.05$) al comparar mitocondrias expuestas a calcio en comparación con quelación.

CONCLUSIONES: La transición de la permeabilidad mitocondrial (PTPm/MPTP) se comporta como un proceso dinámico y reversible en condiciones experimentales, quizá con un papel fisiológico como mecanismo de defensa ante altos potenciales transmembranales. En levadura, el fenómeno se interpreta en términos de carga energética/estado de fosforilación, mientras que en el corazón el “lenguaje” subcelular predominante se relaciona con calcio. Los hallazgos apoyan a la transición de la permeabilidad mitocondrial como blanco terapéutico potencial para atenuar el daño por isquemia-reperusión, y sugieren que la modulación del manejo del calcio (p. ej., quelación experimental) puede favorecer el cierre del poro.

PALABRAS CLAVE: Infarto del miocardio; isquemia-reperusión; fisiología mitocondrial; transición de permeabilidad mitocondrial; biología teórica; mitometría de flujo; citometría de flujo; envejecimiento celular; Alzheimer; calcio; levosimendan; reversibilidad.

Abstract

OBJECTIVE: This investigation aims to demonstrate that the mitochondrial permeability transition is a physiological, reversible process and a promising therapeutic target in ischemia-reperfusion scenarios.

METHODS AND MATERIALS: Mitochondria were isolated from the myocardium of Wistar rats and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* using differential centrifugation. Functional evaluation was conducted using Clark electrode oximetry. The transmem-

¹Departamento de Cardiología, Centro Médico Nacional 20 de Noviembre, Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado (ISSSTE), Ciudad de México.

²Biología teórica, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México.

³Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México.

⁴Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, Ciudad de México.

⁵Hospital Ángeles Pedregal, Ciudad de México.

ORCID

<https://orcid.org/0000-0001-5461-3505>
<https://orcid.org/0000-0001-8497-6681>
<https://orcid.org/0000-0001-8374-1733>
<https://orcid.org/0000-0003-2976-3370>
<https://orcid.org/0000-0002-4865-4869>
<https://orcid.org/0009-0008-6463-7103>

Recibido: enero 2026

Aceptado: febrero 2026

Correspondencia

Héctor Emilio Montes Isunza
milomontes@gmail.com

Este artículo debe citarse como:

Montes-Isunza E, Marco VE, Martínez-Escobar MC, Olguín R, Morales-Solís JD, Gopar-Nieto R. Fisiología de la reversibilidad de la transición de la permeabilidad mitocondrial en la isquemia reperusión. Med Int Méx 2026; 42: e10995.

brane potential was measured using flow cytometry (mitometry) with DiOC2(3) staining on a CytoFLEX S cytometer with an excitation wavelength of 488 nm. The permeability transition was triggered by applying 50 μM Ca^{2+} , and reversal was determined by introducing an equimolar concentration of EDTA after five minutes. These measurements were supplemented by safranin-based spectrophotometry, and a theoretical analysis was performed using the affinity distribution method.

RESULTS: Administration of 50 μM Ca^{2+} induced a reduction in transmembrane potential, indicating pore opening and initiation of the permeability transition state. The addition of EDTA led to significant recovery of this potential. A detailed analysis revealed a 66% restoration after five minutes of calcium exposure, which was statistically significant ($p < 0.05$) compared to mitochondria treated with chelation.

CONCLUSIONS: Under these experimental conditions, the mitochondrial permeability transition (PTPm/MPTP) exhibits dynamic and reversible properties that may play a role in protecting against excessive transmembrane potentials. In yeast mitochondria, these dynamics are linked to energy demand and phosphorylation status. In cardiac tissue, however, they are principally governed by calcium homeostasis. These results support the potential of mPTP modulation as a strategy to improve ischemia-reperfusion injury and suggest that interventions targeting Ca^{2+} regulation, such as chelation therapy, may promote closure of the mitochondrial permeability transition pore.

KEYWORDS: Myocardial infarction; ischaemia-reperfusion; mitochondrial physiology; mitochondrial permeability transition; theoretical biology; flow mitometry; flow citometry; celular ageing; alzheimer; calcium; levosimendan; reversibility.

ANTECEDENTES

La mitocondria es un organelo celular eucariote complejo cuyo origen se remonta a 1500 millones de años cuando la presión de oxígeno se incrementó en la tierra; a cambio de energía, el ser eucariote proporcionó refugio y alimento.^{1,2,3}

Como parte de la fisiología celular, la mitocondria lleva a cabo varias reacciones químicas: ciclo de los ácidos tricarboxílicos, beta oxidación, apoptosis y fosforilación oxidativa acoplada a la síntesis de ATP. La fosforilación oxidativa, con la maquinaria embebida en la membrana interna mitocondrial, acopla la energía del potencial redox al bombeo de protones y síntesis de ATP. Este proceso es la principal fuente de energía química en la mayor parte de los organismos eucariontes.

La fosforilación oxidativa es la cascada de reacciones químicas redox en la que ocurre una transferencia de electrones siempre hacia las moléculas con potenciales redox menores (más negativos). El último aceptor de electrones es el oxígeno, que es reducido a H_2O . Los diferentes complejos respiratorios efectúan la transferencia de electrones entre sí. Algunos de estos complejos funcionan como bombas de protones.⁴

La energía neta de potencial redox puede calcularse con la ecuación:

$$\Delta G^{\circ'} = -n F \Delta E_0'$$

Donde n indica el número de electrones a donar, F el Faraday (23 062 cal) y $\Delta E_0'$ la diferencia en volts entre el dador y el aceptor de electrones.

El complejo I transfiere electrones del NADH a la ubiquinona o coenzima Q (CoQ). El complejo II transfiere electrones del succinato a la coenzima Q. La ubiquinona es el aceptor de electrones del complejo I y II que los transfiere al complejo III. Este último transfiere electrones al complejo IV, cuyo último aceptor es el oxígeno, reduciéndolo a H_2O .⁵⁻⁸

Los complejos respiratorios I, III y IV funcionan como bombas de protones con una estequiometría de $4H^+$, $4H^+$ y $2H^+$, respectivamente. Esto genera un gradiente de protones que, de acuerdo con la teoría quimiosmótica,⁹ acopla la cadena respiratoria. Al disiparse el gradiente de protones a través del complejo V mitocondrial o ATP sintasa, funciona como un rotor en el que se lleva a cabo la reacción. **Figura 1**



$$\Delta G^\circ = 7.3 \text{ kcal/mol.}$$

La ATP sintasa, o complejo V, contiene dos dominios: F1 es un complejo periférico mientras que F0 es una proteína de membrana por donde pasa el flujo de protones. F1 contiene los sitios de unión para Pi y ADP. En este dominio es donde se lleva a cabo la síntesis de ATP. La porción F1 aislada cataliza la hidrólisis de ATP, de ahí que al girar en sentido horario este complejo funciona como ATP-asa.¹⁰

La ATP-sintasa es un rotor molecular que gira gracias a la disipación del gradiente de protones a través de la porción F0, mientras que la porción F1 lleva a cabo la síntesis de ATP al rotar en movimientos de 120° . La síntesis de ATP se efectúa al terminar una vuelta en tres pasos: la captación de ADP y Pi, la síntesis de ATP y, finalmente, la liberación de éste en el último tercio de vuelta. En la actualidad se carece de estudios biofísicos que muestren los cambios conformacionales de la ATP-sintasa por distribución de afinidades. En cambio, sí se dispone de estudios que sugieren

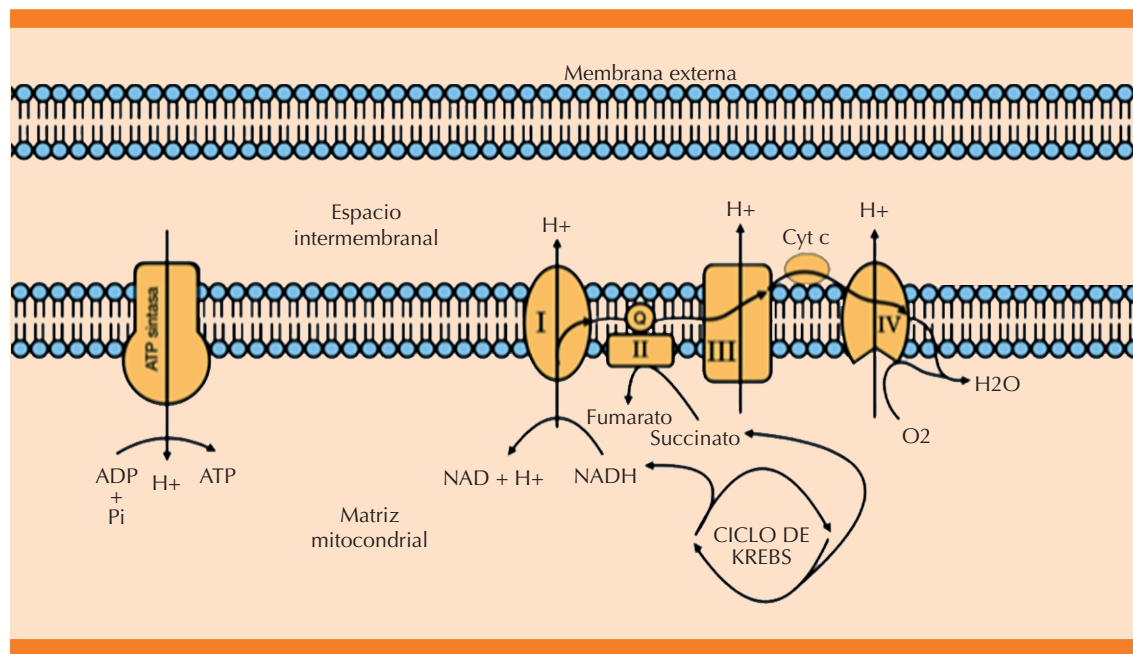


Figura 1. Cadena respiratoria de mamíferos.

que la hidrólisis de ATP es un paso crítico en este proceso reverso.¹¹ Se cree que la estequiometría necesaria para un tercio de vuelta es de tres protones, con la síntesis en el sitio beta de la porción F1 de la ATPasa. El estudio de esta estructura, así como el proceso de acoplamiento a la fosforilación oxidativa, permite entender que la mitocondria está sujeta a cambios metabólicos de manera dinámica. Esos cambios pueden reflejarse en la actividad de la cadena respiratoria de acuerdo con los cambios en las concentraciones de iones o metabolitos, como Mg^{2+} , Ca^{2+} , P_i , ATP y ADP, entre otros.

La cadena respiratoria de *Saccharomyces cerevisiae* (modelo utilizado para el estudio de la carga energética) difiere de la cadena respiratoria de mamíferos porque carece del complejo I. En su lugar cuenta con dos deshidrogenasas externas (Nde1p, Nde2p) y una deshidrogenasa interna (Nd1p).¹²

Si bien es un circuito no óhmico, la mitocondria tiene un comportamiento similar que permite entender cómo se lleva a cabo la síntesis de ATP gracias a un gradiente de protones.

Separados por la membrana mitocondrial interna, circularán los protones entre compartimentos. La batería o energía química es el gradiente de protones establecido por los complejos I (en el caso de mamíferos) III y IV. La resistencia será la ATP-sintasa en donde se realizará la síntesis de ATP. La energía cambia de un potencial redox a energía química almacenada en ATP.

Al abrir un corto circuito (un paso de protones con mayor conductancia) la energía se disipa en calor y la cadena respiratoria se desacopla, no hay síntesis de ATP. El corto circuito puede abrirse mediante proteínas desacoplantes (UCPs), dinitrofenol o mediante la apertura del canal inespecífico mitocondrial. Este ocasiona la despolarización del organelo al permeabilizar las dos membranas mitocondriales.

En diversas especies se ha encontrado un canal inespecífico mitocondrial o poro de transición de la permeabilidad mitocondrial (PTPm) que permite el paso inespecífico de solutos y la despolarización del organelo y la muerte celular. El PTPm se abre en los miocardiocitos dañados por la isquemia-reperfusión que ocasiona la muerte celular.^{13,14} Al restablecer el aporte de oxígeno en pacientes con diagnóstico de infarto agudo de miocardio, el daño por isquemia-reperfusión no permite una evolución favorable e, incluso, puede extender el infarto.

El estudio de esta estructura y su función puede ayudar a dilucidar la fisiopatología del daño por isquemia-reperfusión, el fenómeno de lavado enzimático, las arritmias de perfusión y la extensión de un infarto agudo de miocardio.

El poro de transición de la permeabilidad (como su nombre lo indica) es una estructura que, al abrirse, permite el paso de solutos de hasta 1.5 kDa sin ser selectivo; es decir, funciona como un cortocircuito mitocondrial, desacoplando la cadena respiratoria. Esta se desacopla cuando la energía del potencial redox no puede utilizarse para la síntesis de ATP. Este proceso puede verse en el control respiratorio, que se obtiene al dividir el estado 3 entre el 4 de consumo de oxígeno mitocondrial (**Figura 2**). En un ensayo experimental en condiciones óptimas el estado 3 de consumo de oxígeno se acelera, al agregar ADP. Hecho esto ocurre un cortocircuito mediado por la ATP sintasa. A través de la membrana interna mitocondrial solo existe un estado cercano al equilibrio termodinámico que no puede perpetuarse más allá de ciertos valores. Esa diferencia se denomina potencial transmembranal mitocondrial.

El movimiento de menos de 1 nmol de un ion cargado de 1 mg proteína es más que suficiente para crear una diferencia mayor a 200 mV. Es decir, que el circuito de protones y la diferencia transmembranal nunca puede exceder los 1000

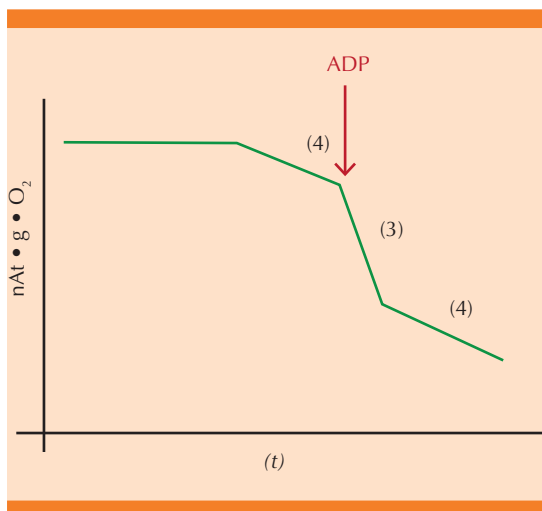


Figura 2. Ejemplificación de las pendientes de consumo de oxígeno en un ensayo con electrodo de Clark. Donde inicia la pendiente 4 se agrega la proteína o mitocondrias obtenidas para experimento. La flecha roja indica qué sucede cuando se agrega ADP. La pendiente de consumo de oxígeno se acelera por caída del potencial transmembranal mitocondrial (3). Al depletarse el ADP por la reacción de fosforilación acoplada, la pendiente retorna a su valor de consumo de oxígeno basal.⁴

nmol de H^+ $\min^{-1}$ mg proteína⁻¹. De ahí que al agregar ADP al ensayo de consumo de oxígeno, para restablecer el potencial transmembranal, la mitocondria acelera la cadena respiratoria y, por lo tanto, el consumo de oxígeno.

A mayor acoplamiento, mayor será el control respiratorio. Cuando el poro de transición de la permeabilidad mitocondrial se encuentra abierto o semiabierto, el cociente respiratorio disminuye porque la relación entre la velocidad de consumo de oxígeno en estado 3 y 4 es cercana a 1. Por lo tanto, el desacoplamiento puede darse por un corto circuito de protones en la membrana interna mitocondrial. Este cortocircuito, forzosamente, deberá tener mayor conductancia que la ATP-sintasa. La existencia de cortocircuitos irreversibles dentro de la mitocondria invariablemente desequilibrará al sistema, o mejor

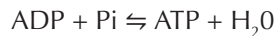
dicho, alcanzará el equilibrio termodinámico del sistema mitocondrial. El modelo cibernético celular de Sodi Pallares (1967) es aplicable al modelo mitocondrial en donde el demonio de Maxwell mitocondrial es la cadena respiratoria y la compuerta (como concepto equívoco según Sodi Pallares) corresponde al canal inespecífico mitocondrial. En el modelo de Bernardi (2014), en el que el poro es la misma ATP-asa, el modelo mencionado se acerca más a la realidad.

Las mitocondrias de *S cerevisiae* tienen un poro de transición de permeabilidad mitocondrial que, al abrirse, permite el transporte de solutos y metabolitos de manera inespecífica, lo que origina la despolarización del organelo.^{15,16} Éste, es sensible a los moduladores ATP, ADP y carboxilatractilósido, lo que sugiere, en algunas teorías, que el translocador de nucleótidos de adenina (ANT) es uno de los componentes de este canal en la membrana interna mitocondrial. El PTPm es sensible a las concentraciones de P_i , Ca^{2+} , Mg^{2+} , decavanadato y alquilguanidinas que se cree interaccionan con el acarreador de fosfato (P_iC) y el canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC), respectivamente.^{15,17,18} Esta evidencia haría suponer que los componentes del PTPm son el VDAC, el ANT y el P_iC . Sin embargo, los nuevos estudios sugieren que el poro de transición de la permeabilidad mitocondrial está formado por dímeros de ATP-asa mitocondrial. En los mamíferos, esos dímeros pueden ser estabilizados por la ciclofilina.¹⁹

Se ha propuesto que, a altos potenciales transmembranales, el PTPm podría funcionar para disiparlos y evitar la formación de radicales libres al disminuir la velocidad de transferencia electrónica en el paso de ubiquinol para formar semiquinona.^{20,21} Cuando esta última es inestable favorece la creación de radicales libres. Al existir una compuerta abierta (PTPm) a altos potenciales transmembranales a manera de “mitowinks” o aperturas espontáneas, se acelera el transporte de electrones y se evita el escape de radicales

semiquinona y superóxido.

El estado de fosforilación es un medio de control para la síntesis de ATP, que es equivalente para la constante acción de masa de la reacción:



Si bien Atkinson propone el nivel energético para la síntesis de ATP como punto de control, el estado de fosforilación es una aproximación al punto de control fundamentado en la relación de los sustratos:

$$\Gamma = \frac{[\text{ATP}]}{[\text{ATP}] [\text{Pi}]}$$

El estado de transición de permeabilidad mitocondrial puede desempeñar un rol en el desacoplamiento fisiológico, como se demuestra más adelante.

Por lo anterior el objetivo del estudio fue: demostrar que la transición de la permeabilidad mitocondrial es un proceso fisiológico y reversible, además de ser un potencial blanco terapéutico en la isquemia reperfusión.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se aislaron mitocondrias de miocardio de ratas Wistar y de *Saccharomyces cerevisiae* mediante centrifugación diferencial y se evaluó su funcionalidad con oximetría por electrodo de Clark. En un medio de cultivo (40 g/L) Kloett estéril se sembraron levaduras. A las 8 horas se ayunaron mediante lavado de las células y volvieron a suspenderse en agua destilada durante 16 horas.²²

Enseguida, las células se lavan en dos ocasiones en centrifugación a 5000 rpm. Las células de levadura se resuspenden en medios de homogeneización (MES .005M, manitol 0.6M y albúmina al 1%). Posteriormente se rompen por medio

mecánico en tres ciclos de 20 x 40 segundos de descanso en cuarto frío en el *Bead Beater*. Las perlas de vidrio tienen 0.45 mm de diámetro. Las mitocondrias se obtienen por centrifugación diferencial. La cuantificación de proteínas se efectúa por medio del método de Biuret.

Aislamiento de mitocondrias de miocardio de ratas Wistar. Para abolir el sufrimiento se les administraron dosis altas de éter. Para obtener solo tejido del ventrículo izquierdo, a continuación se procedió a la disección anatómica del miocardio ventricular. Para el aislamiento de mitocondrias de corazón de rata Wistar, se homogeneizaron células de miocardio ventricular en solución de sacarosa (0.10 mM Tris (pH 7.4), 250 mM sacarosa, 1 mM EDTA) durante 15 minutos a 0 grados centígrados con homogeneizador de vidrio Potter. Enseguida de la homogeneización se centrifugaron a 1000 G durante 5 minutos para obtener la fracción microsomal de la solución sobrenadante. A continuación se centrifugaron 3 veces a 10,000 G durante 10 minutos para obtener la fracción cruda y después de cada una se resuspendió con solución de sacarosa. En la última se utilizó solución de sacarosa (10 mM Tris [pH 7.4], 250 mM sacarosa, 20 µM EDTA) aproximadamente 200 mL para la resuspensión. Para determinar la concentración de proteína por mililitro promedio obtenido de la solución con ensayo blanco a 520 nm se utilizó el método de Biuret.²³

Oximetría por electrodo de Clark. Con electrodo de Clark, en un volumen final de 2 mL de medio de homogenización, se midió el consumo de oxígeno. Si el cociente respiratorio es mayor a 2 se utilizan mitocondrias para ensayos de potencial transmembranal mitocondrial.

Potencial transmembranal mitocondrial con safranina. Se utiliza un espectrofotómetro de doble haz en modo dual, con una concentración 9.6 µM de safranina a 511 nm y 533 nm.²⁴ Enseguida de incubar las concentraciones fisiológicas de Pi, se agrega ATP a diferentes concentraciones.



Potencial transmembranal por citometría de flujo (mitometría de flujo). El reactivo utilizado para medir el potencial transmembranal mitocondrial es DiOC2(3). Antes de comenzar el experimento se colocan los reactivos de DiOC2(3) y CCCP a temperatura ambiente. Se prepararon ensayos con diferentes concentraciones máximas de calcio para transición de permeabilidad, máximos con quelante de calcio y 3 controles (CCCP, DiOC2(3), energizado sin DiOC2(3)).

Para cada ensayo se suspendieron 0.25 mg/mL de proteína (mitocondrias), 7.5 μ L de DiOC2(3), 10 μ L de succinato. El volumen requerido de medio de respiración (120 μ M KCl, 1 μ M KH₂PO₄, 10 μ M Tris [pH 7.4], 20 μ M EDTA) se filtró a través de una membrana con un tamaño de poro de 0.22 μ m. Se prepara la cantidad suficiente para diluir el cultivo en 500 μ L de la suspensión mitocondrial en tubos de citometría de flujo para cada experimento de tinción. Se preparan dos tubos adicionales para un control despolarizado, un control sin tinción y otro con CCCP. Las muestras a 37°C se incuban durante 30 minutos. Enseguida se hace el lavado de las mitocondrias mediante centrifugación a 10,000 G por 10 minutos. Se resuspende sacudiendo suavemente los tubos. Se retira el sobrenadante y se añaden 500 μ L de medio de respiración (120 μ M KCl, 1 μ M KH₂PO₄, 10 μ M Tris [pH 7.4], 20 μ M EDTA) por tubo.

Se utiliza un citómetro de flujo CytoFLEX S con excitación a 488 nm, con filtros de emisión apropiados para el colorante Alexa Fluor® 488 (FL1, GC) y el colorante Texas Red® (FL3, RC). Enseguida se hacen los ajustes para detectar partículas relativamente pequeñas, como las mitocondrias. Para evitar la contaminación de los datos por ruido electrónico, se recurre a un procedimiento para ajuste del instrumento.

Con la muestra de control no teñida se localizan las poblaciones mitocondriales en los canales de dispersión hacia adelante y hacia los lados.

Las señales se adquieren con los amplificadores configurados en amplificación logarítmica. La dispersión lateral se adecua como parámetro para ajustar el gatillo de adquisición. Se establece la amplificación de las señales de dispersión frontal y lateral para las mitocondrias que se encuentren en el medio del espacio de datos. Para minimizar el ruido electrónico que aparece en el monitor se ajusta el nivel de disparo.

Luego del ajuste del citómetro de flujo se aplica la muestra de control despolarizado, usando dispersión frontal *versus* lateral y se ajustan los voltajes del tubo fotomultiplicador de fluorescencia de manera que los valores de intensidad de fluorescencia media (MFI) verde (GC) y rojo (RC) sean, aproximadamente, iguales.

Si bien la cantidad relativa de intensidad de fluorescencia roja y verde variará con el tamaño de la célula y la agregación, la relación de la intensidad de fluorescencia roja a verde puede utilizarse como un indicador independiente del tamaño del potencial de membrana. En citometría de flujo, esta medida se aplica mejor con un parámetro que proporcione estos datos de relación para cada evento. Se calcula de la siguiente manera:

$$\frac{(RC \text{ media}) - (GC \text{ media}) + 1.5}{(\text{cantidad de canales por década})}$$

La cantidad de canales por década, en este caso es de 254. Este cálculo requiere que la fluorescencia roja y verde se recopile con amplificación logarítmica. Incluye, además, un desfase de 1.5 décadas para garantizar que los valores de la relación métrica sean positivos.

En el citómetro de flujo, las mitocondrias se identifican solo con base en su tamaño y capacidad de tinción.

Se efectúan tres ensayos independientes para medición del potencial transmembranal mito-

condrial, dependientes de la concentración de calcio. Posteriormente se agrega EDTA al ensayo de máxima despolarización, para observar la reversibilidad. Esto prueba el cierre del poro de transición de permeabilidad mitocondrial. A concentraciones de 50 μM se obtiene una despolarización aún mayor al control de CCCP por lo que se toma como 0 mV y máxima energización como 180 mV que es el estándar fisiológico. Las condiciones experimentales son: control, CCCP, 50 μM de calcio y 50 μM de calcio con EDTA equimolar después de 5 minutos de incubación con calcio.

Método de distribución de afinidades. Se utiliza para la unión de ligandos a PTPm y ATP-sintasa mitocondrial y para determinar los distintos estados conformacionales de la molécula. La solución aproximada de segundo orden de la distribución acumulada de una isoterma de fijación es:

$$F = v \int_0^{\infty} \frac{N[k]kF}{1 + kF} dk,$$

donde r es la fracción de ligando unido al receptor y F es la concentración de ligando libre, con lo que se obtiene la distribución de afinidades:²⁵

$$N(k) = \left| \frac{r(aF) - r(F/a)}{2 \log_{10} a} - \frac{a}{(a-1)^2} \cdot \frac{[r(a^2F) - r(F/a^2) - 2[r(aF) - r(F/a)]]}{2 \log_{10} a} \right|_{F=1/k}$$

Está demostrado que en un sistema heterogéneo con receptores multivalentes (con v sitios de unión), la distribución de afinidades de sitio de fijación $N(k)$ resulta en el valor esperado del promedio de las distribuciones termodinámicas de afinidad $T(k_i)$ por pasos de fijación:²⁵

$$N(k) = \frac{1}{v} \sum_{i=1}^v dT(K_i)$$

Los datos experimentales se toman de las isothermas de fijación de la bibliografía y se ajusta una curva logística que captura interacciones positivas o negativas. Con esa curva se hace un remuestreo de los datos para construir las distribuciones de afinidad tal y como se hizo en la referencia.²⁶

RESULTADOS

Potencial transmembranal mitocondrial en mitocondrias de *S. cerevisiae*. Se realizaron ensayos para modificar el estado de fosforilación en mitocondrias energizadas de levadura durante la medición del potencial transmembranal. Estos experimentos se llevaron a cabo en solución isosmolar o en un tampón de homogeneización compuesto por MES 0.005 M, manitol 0.6 μM , KCl 20 μM , Pi 4 μM , proteína a 0.5 mg/mL y CCCP 12 μM (añadido al final de cada ensayo). En la **Figura 3** se observa que en condiciones fisiológicas con Pi a una concentración de 4 μM , la adición de ATP a 800 μM produce una reducción parcial, reversible, del potencial transmembranal.

Durante la hidrólisis de ATP, los productos ADP y Pi inducen el cierre del PTPm, restableciendo así el potencial transmembranal mitocondrial ($\Delta\Psi$). Cuando el experimento se repite ante oligomicina, se detecta una caída total del potencial transmembranal debido a la inhibición de la actividad ATPasa. Esto demuestra que ante determinadas cargas energéticas los potenciales transmembranales elevados pueden disiparse mediante el giro reverso de la ATPasa. Se incluyeron controles sin ATP para comparar el comportamiento de $\Delta\Psi$ en condiciones fisiológicas y en situaciones de depleción de Pi.

Además de las concentraciones basales de Pi de 2 μM , se hizo el mismo ensayo ajustando la concentración de ATP a 150 μM . En pulsos subsecuentes la mitocondria no pudo revertir el

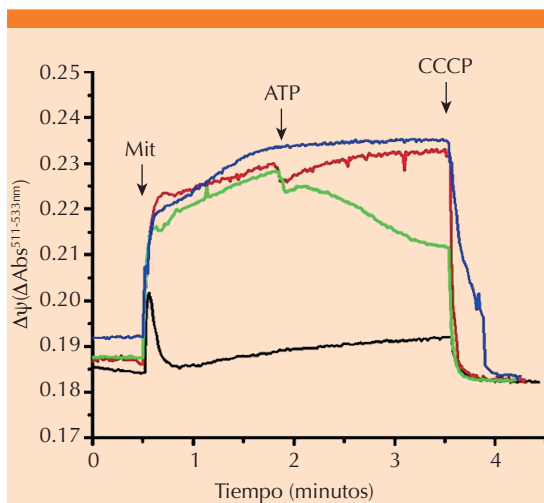


Figura 3. Ensayos de potencial transmembranal mitocondrial en *S. cerevisiae* con 3 repeticiones. El medio de ensayo fue: MES 0.005 μ M, manitol 0.6 μ M, 20 μ M KCl, 4 μ M Pi, proteína a 0.5 mg/ml y CCCP 12 μ M para tirar potencial transmembranal mitocondrial al final de cada ensayo. El trazo azul corresponde al control con Pi a concentración de 4 μ M con posterior caída del potencial a 0 mV por CCCP. El trazo rojo muestra el ensayo de reversibilidad dependiente de ATP, en la que el ATP a concentración de 800 μ M interacciona con el PTPm para despolarizar, parcialmente, la mitocondria, la hidrólisis revierte el proceso y la interacción de ADP y Pi con el PTPm cierra el PTPm. El trazo verde corresponde a mitocondrias incubadas con oligomicina a 120 μ g/mg de proteína (inhibidor de ATPasa). El descenso posterior al haber agregado 800 μ M de ATP se observa al perder el efecto de hidrólisis de ATP. El trazo negro corresponde a concentración 0.4 μ M de Pi con el PTPm abierto.

proceso, aunque luego del primer pulso la reversión fue completa. Considerando la ecuación de estado de fosforilación, la proporción obtenida es comparable. Se asume la cantidad de ADP endógeno como n y $2n$ en equivalencia experimental para 2 y 4 μ M de Pi respectivamente porque su concentración exacta se desconoce. Se presume el doble de reactante cuando Pi está al doble. Para el experimento mostrado en la **Figura 3**, el resultado es 0.1 y para la **Figura 2** es de 0.075; estos valores son similares, con

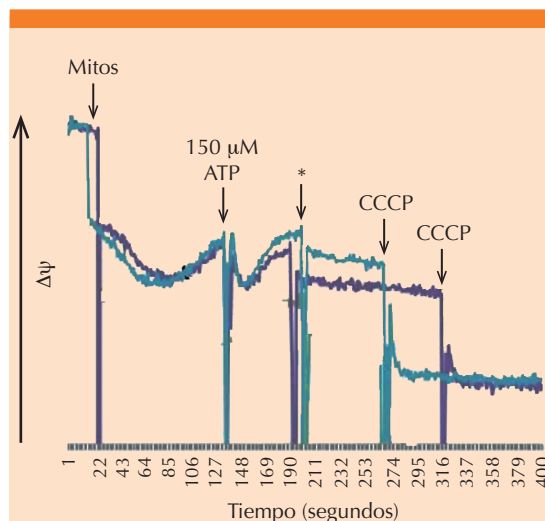


Figura 4. Ensayos de potencial transmembranal mitocondrial en *S. cerevisiae*. El medio de ensayo es: MES 0.005M, manitol 0.6 μ M, 20 μ M KCl, 2 μ M Pi, proteína a 0.5 mg/mL y CCCP 12 μ M para tirar potencial transmembranal mitocondrial al final de cada ensayo. Se observa una caída parcial reversible en ambos trazos a concentración de 150 μ M, segundo pulso en trazo azul de 250 μ M y trazo violeta 500 μ M que no revierte el proceso de la mitocondria.

una variación de 0.025 atribuible quizá a condiciones experimentales. El rango en el que el proceso es reversible en estas condiciones (*in vitro*) va de 0.075 a 0.1 según lo demostrado hasta el momento.

Curvas de distribución de afinidades. En los estudios de isothermas de fijación efectuados por Chávez acerca de la liberación de calcio inducida por diferentes concentraciones de cloruro de potasio y carboxilatractilósido en riñón de rata,²⁶ se identifican tres estados conformacionales de la molécula responsable de la liberación del calcio. Se observa que el primer y segundo modos coexisten, aunque el segundo estado es fundamental para la apertura del poro. El tercer estado, en cambio, no coexiste con el segundo y podría representar la apertura definitiva del poro para la liberación del calcio matricial. **Figura 5**

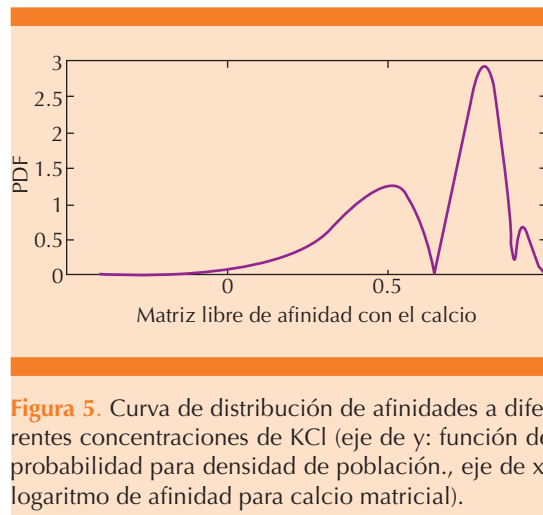


Figura 5. Curva de distribución de afinidades a diferentes concentraciones de KCl (eje de y: función de probabilidad para densidad de población., eje de x: logaritmo de afinidad para calcio matricial).

En la **Figura 6** se muestra el cálculo para dímeros de ATPasa, siguiendo el modelo de Bernardi. Se evidencia la coexistencia teórica de varios estados en un punto específico, descartando algunos casos.²⁷ Cuando existe un tercer estado conformacional de un sitio de unión, este puede coexistir con los tres estados del segundo sitio; sin embargo, los cambios conformacionales del segundo sitio solo ocurren cuando el primero ha alcanzado el tercer estado.

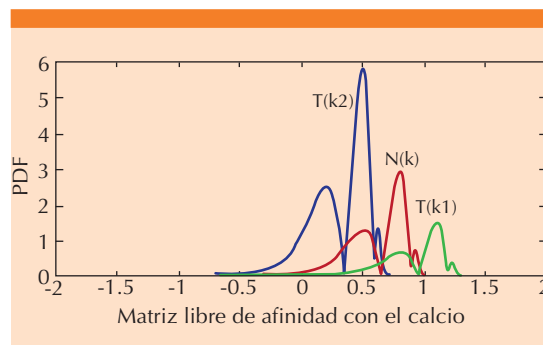


Figura 6. Curva de distribución de afinidades a diferentes concentraciones de KCl para dos sitios de unión de Ca^{2+} inducidas por desplazamiento de cargas (eje de y: función de probabilidad para densidad de población., eje de x: logaritmo de afinidad para calcio matricial).

Las isothermas de fijación de síntesis de ATP, según Cortés y colaboradores, revelan dos estados: uno correspondiente a la síntesis de ATP usando ADP y P_i como sustratos, y otro, situado a la izquierda, relacionado con la liberación de ATP (**Figura 7**).⁸ En la **Figura 8** se aprecia que la rotación de la ATP sintasa permite la coexistencia de los tres estados antes de la liberación del ATP. El paso decisivo para la gráfica de distribución de afinidades es la síntesis de ATP,

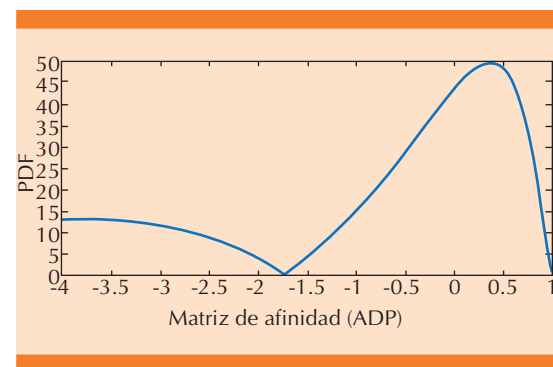


Figura 7. Curva de distribución de afinidades teórica para la síntesis de ATP en *Saccharomyces cerevisiae* (eje de y: función de probabilidad para densidad de población., eje de x: logaritmo de afinidad para ADP).

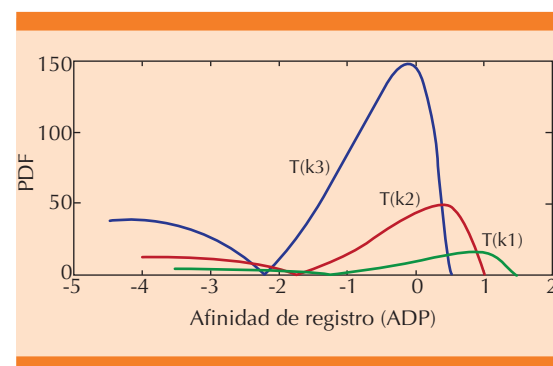


Figura 8. Curva de distribución de afinidades para la síntesis de ATP dependiente de concentraciones de ADP con tres sitios β de unión teóricos, los cuales corresponden a los tres sitios de catálisis de la ATP sintasa mitocondrial (eje de y: función de probabilidad para densidad de población., eje de x: logaritmo de afinidad para ADP).

más que la captación o liberación, ya que este proceso ocurre simultáneamente con la síntesis. Además, la rotación de la ATPasa demuestra cambios conformacionales en distintos tiempos conforme aumentan las concentraciones de ADP, tal como describe nuestro modelo y respalda la bibliografía. El evento crítico en la rotación de la ATP sintasa es la propia síntesis de ATP, lo que coincide con lo reportado previamente.²⁸

En la **Figura 9** se muestran las curvas de distribución de afinidades correspondientes al dímero de ATPasas que conforman el poro. La coexistencia de diversos estados se atribuye a la rotación simultánea de ambas ATPasas. Se identifican seis modos a altas concentraciones de ADP, donde la síntesis de ATP representa el paso crítico. No obstante, la liberación de ATP en el extremo izquierdo de la figura ocurre en distintos pasos, reflejo de la rotación catalítica de la enzima.

Este proceso de rotación está asociado con los cambios conformacionales detectados mediante este método.

Mitometría de flujo. En condiciones fisiológicas, el potencial transmembranal de la membrana mitocondrial alcanza, aproximadamente, 180 mV. En la **Figura 10** se muestra el control energizado teñido con DiOC2(3). Se seleccionan, del control, las mitocondrias con mayor capacidad de fluorescencia. Para minimizar errores se descartan eventos con baja fluorescencia. Asimismo, se define la población 2 (P2) como los eventos que no alcanzan suficiente fluorescencia, lo que permite reducir el porcentaje de error analítico. Esta metodología se aplica, sistemáticamente, en todos los experimentos. En la **Figura 11**, la P2 revela una cantidad elevada de mitocondrias des-polarizadas (con transición de permeabilidad

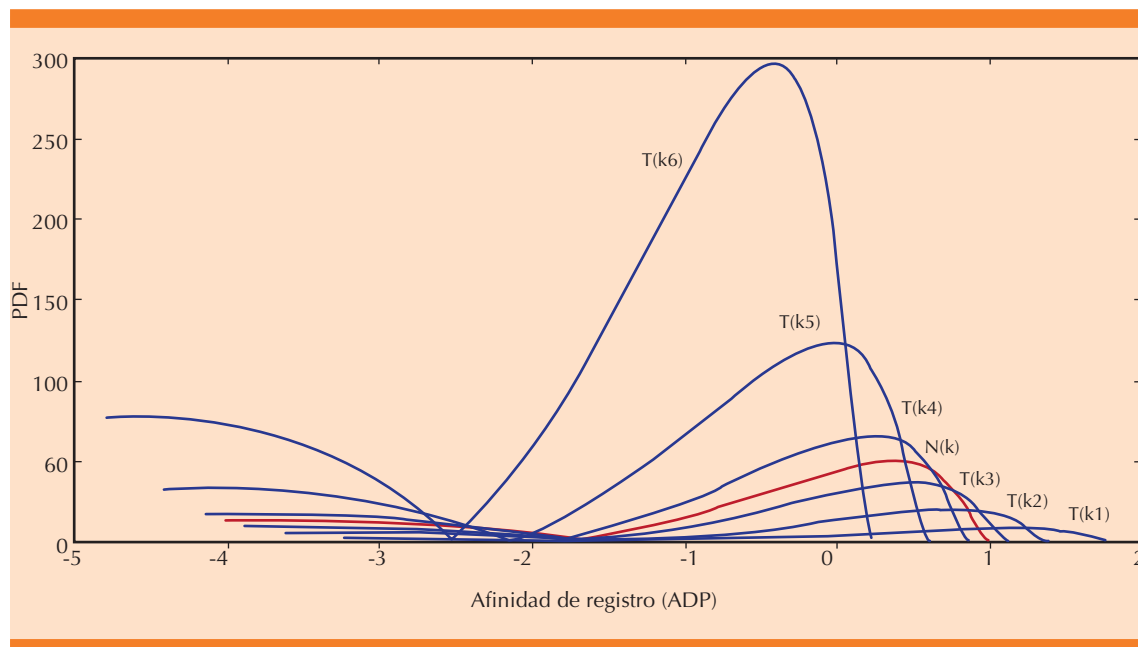


Figura 9. Curva de distribución de afinidades para la síntesis de ATP con 6 sitios β de unión teóricos, correspondientes a los dímeros propuestos por Bernardi para la transición de la permeabilidad mitocondrial. Se justifica debido a que la concentración de fosfato es 1 mM en el ensayo, donde no se logra un acoplamiento máximo debido a una apertura parcial del poro (eje de y: función de probabilidad para densidad de población., eje de x: logaritmo de afinidad para ADP).

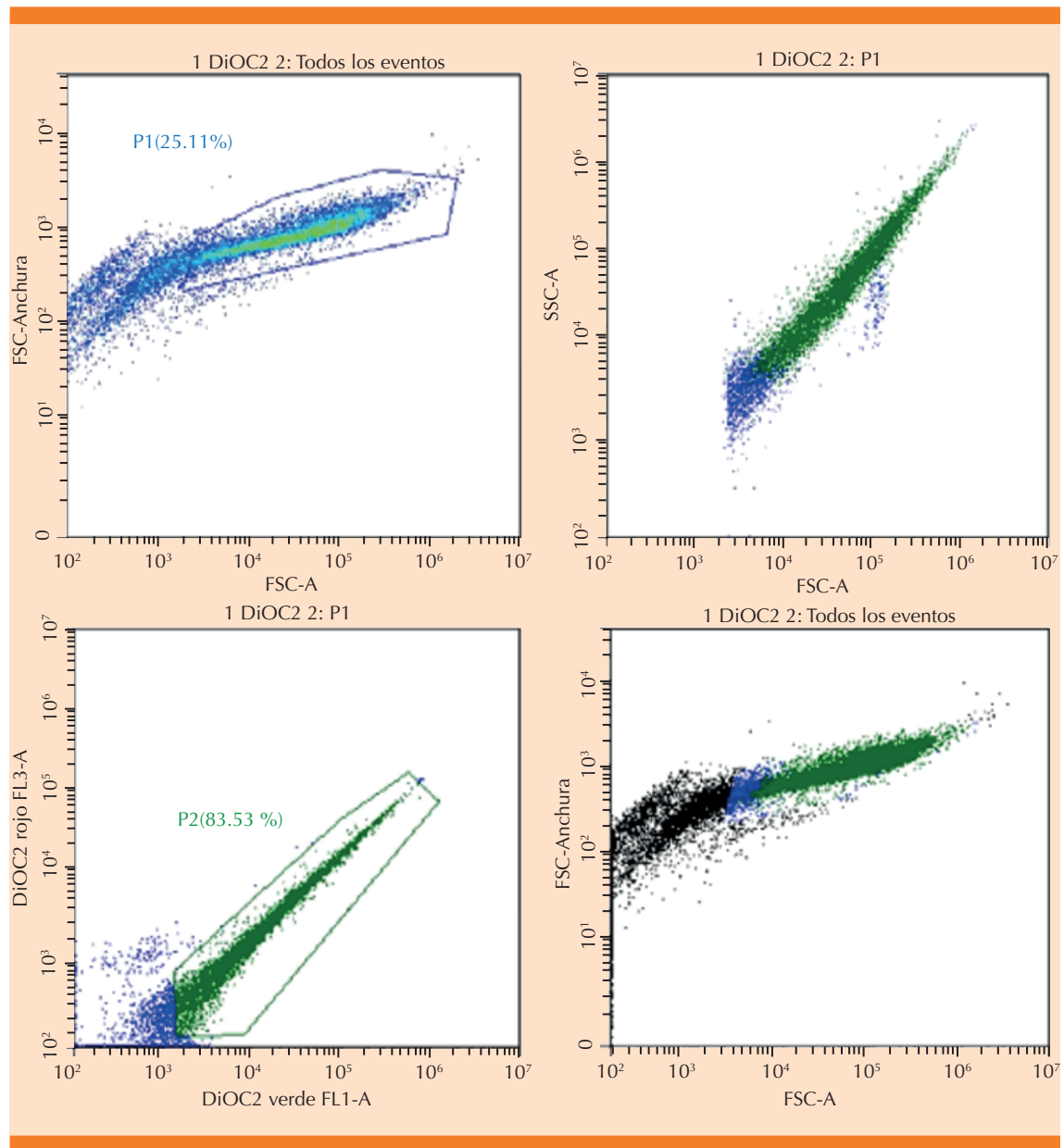


Figura 10. Control energizado y teñido. En el recuadro 1 se observa la complejidad de las mitocondrias en el eje de las ordenadas medida en anchura (FSC-Width), en el eje de las abscisas la complejidad por capacidad de tinción (FSC-A) y se realiza la selección de la población 1 (P1) a partir de las que tienen mejor capacidad de fluorescencia. En el recuadro 2 se observa el diagrama de puntos en complejidad versus tamaño. En el recuadro 3 en el eje de las ordenadas se observa la fluorescencia en rojo (FL3-A) y en el eje de las abscisas la que fluoresce en verde (FL1-A). En el recuadro 4 se observan todas las poblaciones en relación con su anchura y capacidad de tinción.

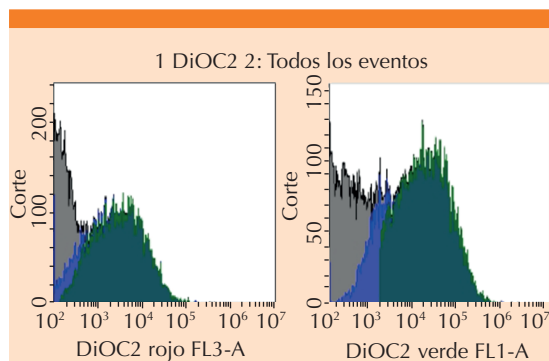


Figura 11. Control energizado y teñido. Se observan los histogramas para las poblaciones seleccionadas en la figura 10, en gris se observa la cantidad total de eventos, en azul se encuentra la población P1 y en verde la población P2, se evalúa la cantidad de eventos contra su fluorescencia, FL3-A para rojo y FL1-A para verde.

mitocondrial), y su evaluación con la fórmula previamente descrita arroja una $\Delta\Psi$ media de -287.061 (**Cuadro 1**) en los experimentos 2 y 3. Para el experimento 1, se registra una $\Delta\Psi$ media de 142.348 (**Cuadro 1**). Normalmente, el $\Delta\Psi$ de la membrana mitocondrial equivale a 180 mV, tomando el control energizado como referencia máxima para evaluar alteraciones en el $\Delta\Psi_m$.

Los anticuerpos antipéptido cíclico citrulinado (CCCP) actúan como desacopladores de la cadena respiratoria mitocondrial, disociando la oxidación de la fosforilación y, consecuentemente, inhibiendo la síntesis de ATP. En la **Figura 12** se expone la selección de poblaciones, siguiendo el procedimiento previamente descrito. Según la **Figura 13**, la cantidad de mitocondrias despolarizadas es considerablemente menor puesto que los eventos negativos superan a los de fluorescencia significativa. La relación entre las fluorescencias roja y verde proporciona una $\Delta\Psi$ media negativa de -514.704 (**Cuadro 1**) en los experimentos 2 y 3, mientras que en el experimento 1 se obtiene una $\Delta\Psi$ media de -18.695 (**Cuadro**

1). Como era previsible en virtud de la función desacoplante conocida del CCCP, estos resultados cumplen con las expectativas. El coeficiente de la $\Delta\Psi$ media disminuye ante elevadas concentraciones de calcio, aspecto que se analizará más adelante.

El calcio activa el poro de transición mitocondrial. Existe un antiportador calcio-hidrogenión cuya saturación disminuye su actividad, y provoca un decremento en el $\Delta\Psi$. La **Figura 14** ilustra la selección de las poblaciones en estudio siguiendo el mismo método previamente descrito. Utilizando concentraciones elevadas de calcio extramembranal, se observa una disminución en la cantidad de mitocondrias despolarizadas y una caída del $\Delta\Psi$. En la **Figura 15** se ejemplifica el comportamiento de la membrana con una concentración de 50 μM de calcio, considerando la población P2. En experimentos 2 y 3, la fluorescencia para la $\Delta\Psi$ media es de -554.672, mientras que en el experimento 1 es de -18.695 (**Cuadro 1**). Esto indica que la cantidad de mitocondrias despolarizadas es superior a la del control negativo en los experimentos 2 y 3, estableciéndose el valor mínimo para la evaluación de resultados como 0 mV. En el experimento 1 el valor coincide con el control negativo, que también es el valor 0 mV.

El EDTA, un agente quelante de calcio, disminuye los efectos de este ion en la membrana cuando se utiliza en proporción equimolar, revirtiendo la caída del $\Delta\Psi$. Las poblaciones se seleccionaron según el procedimiento de los controles, definiendo P1 y P2 para usar P2 como población de estudio. El calcio satura el antiportador y provoca un descenso en el $\Delta\Psi$, obteniendo mitocondrias desacopladas. Al añadir EDTA, este agente quela el calcio e impide el desacoplamiento mitocondrial, eleva el $\Delta\Psi$ hacia valores cercanos al control energizado, lo que evidencia la reversibilidad del proceso. En la **Figura 17**, los eventos relacionados con la fluorescencia roja superan a los de fluorescencia

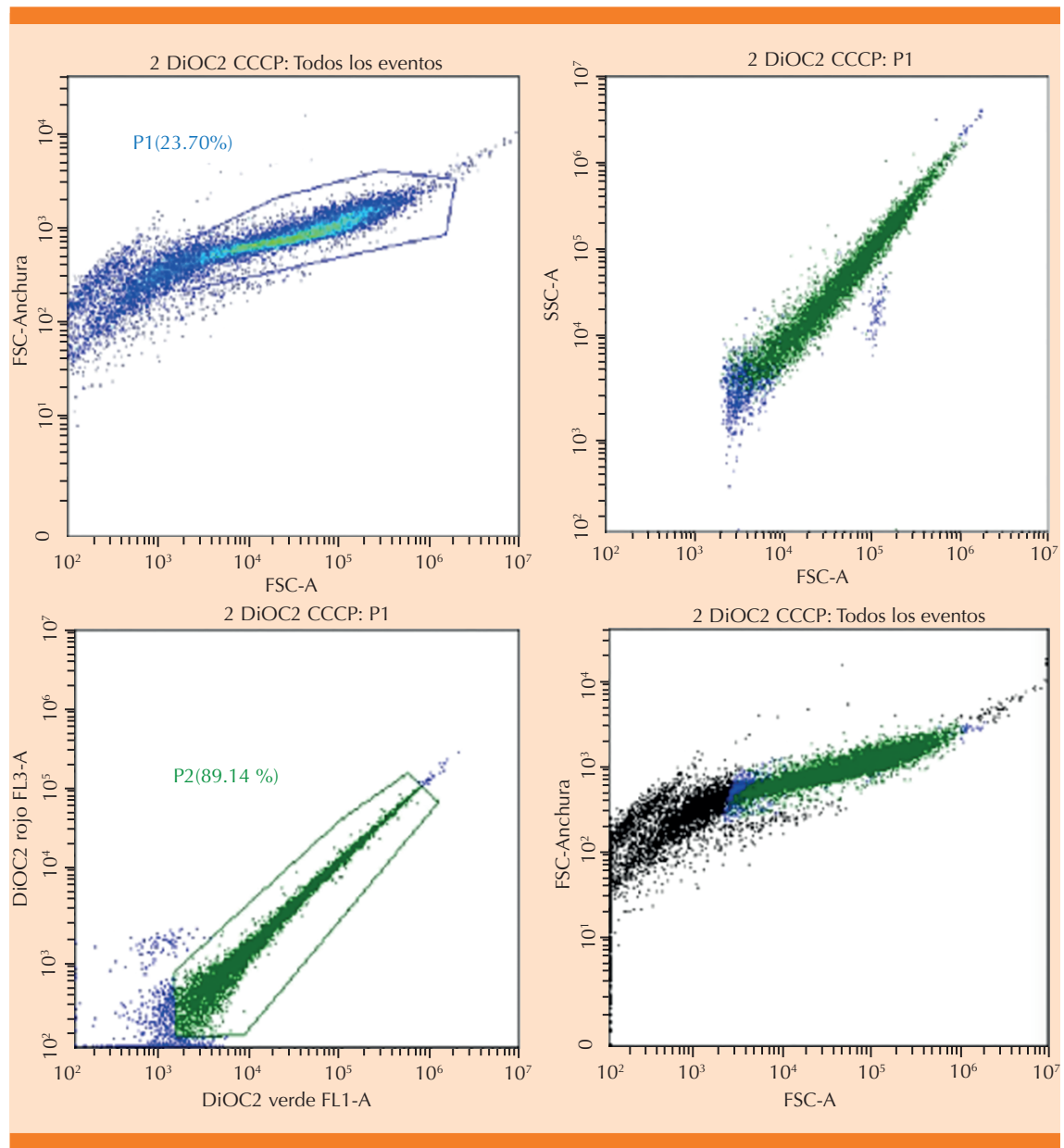


Figura 12. Control negativo (CCCP) y teñido. En el recuadro 1 se observa la complejidad de las mitocondrias en el eje de las ordenadas medida en anchura (FSC-Width), en el eje de las abscisas la complejidad por capacidad de tinción (FSC-A) y se realiza la selección de la población 1 (P1) a partir de las que tienen mejor capacidad de fluorescencia. En el recuadro 2 se observa el diagrama de puntos en complejidad versus tamaño. En el recuadro 3 en el eje de las ordenadas se observa la fluorescencia en rojo (FL3-A) y en el eje de las abscisas la que fluoresce en verde (FL1-A). En el recuadro 4 se observan todas las poblaciones en relación con su anchura y a su capacidad de tinción.

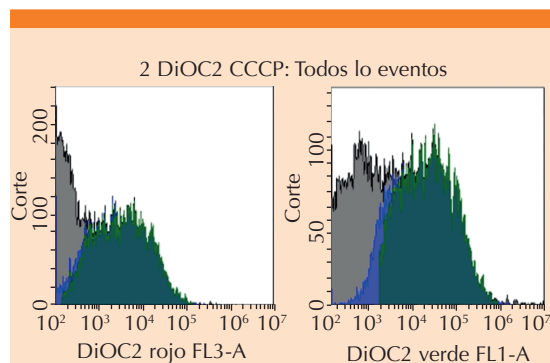


Figura 13. Control negativo (CCCP) y teñido. Se observan los histogramas para las poblaciones seleccionadas en la figura 12. En gris se observa la cantidad total de eventos, en azul la población P1 y en verde la población P2, se evalúa el número de eventos contra su fluorescencia, FL3-A para rojo y FL1-A para verde. En este caso gran número de mitocondrias no tiene actividad y el resto tienen poca o nula actividad.

verde, lo que genera una $\Delta\Psi$ media de 107.237, que, comparado con el caso de 50 μM de calcio en este experimento, demuestra que el proceso se revierte casi por completo.

La comparación de medias mediante la prueba t de Student arroja una $p < 0.05$ entre el potencial transmembranal de mitocondrias expuestas a calcio y las queladas, lo que indica una diferencia estadísticamente significativa.

DISCUSIÓN

El magnesio y el calcio citosólico inhiben la apertura del poro de transición de la permeabilidad mitocondrial mediante su interacción con el canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC) en *Saccharomyces cerevisiae*, según lo descrito por diversos autores.²⁹ Sin embargo, las teorías recientes sugieren que esta interacción hace partícipes a los dímeros de la ATP-sintasa mitocondrial.³⁰ En mamíferos, el calcio matricial favorece la apertura del poro, mientras que en

S. cerevisiae el aumento de la concentración de calcio citosólico parece inducir su cierre. Esto se debe a la ausencia de un uniportador de calcio, lo que limita el efecto del catión a ciertas concentraciones. Además, la coexistencia de un antiportador calcio-hidrogenión podría causar la saturación de las curvas de fijación y la consecuente disminución de la actividad.³¹⁻³⁵ El magnesio tiene, principalmente, un efecto inhibitorio.

El acoplamiento es el uso de la fuerza proton-motriz para la síntesis de ATP. Cuando la cadena respiratoria pierde acoplamiento, el cociente estado 3-estado 4 (control respiratorio) disminuye: en tales circunstancias, el estado 3 disminuye y el estado 4 aumenta. En este estudio se observaron pulsos de apertura del poro a elevadas cargas energéticas, dependientes de la concentración de ATP. Es posible que, ante altos potenciales transmembranales, la apertura del poro facilite la disipación de energía en forma de calor; es así como se evita la formación de radicales libres. Las observaciones efectuadas en levadura ofrecen una aproximación relevante para entender los eventos que ocurren durante la isquemia-reperfusión; no obstante, en mamíferos, el proceso está más regulado por el calcio que por el ATP.

Por primera vez se ha aplicado el método de distribución de afinidades para el estudio de canales. A diferencia de las curvas de isotermas de fijación, que no proporcionan información fisiológica de manera aislada, las distribuciones de afinidad ofrecen una perspectiva más detallada de la funcionalidad del canal. Incluso sin la disponibilidad de estudios cristalográficos, este enfoque permite inferir modificaciones conformacionales. Es relevante destacar que, en el canal mitocondrial, pese a existir un único sitio de fijación, se identifican diferentes modos en la distribución y no una curva gaussiana, como cabría esperar. Este modelo resulta adecuado para dilucidar la fisiología de los canales mitocondriales.

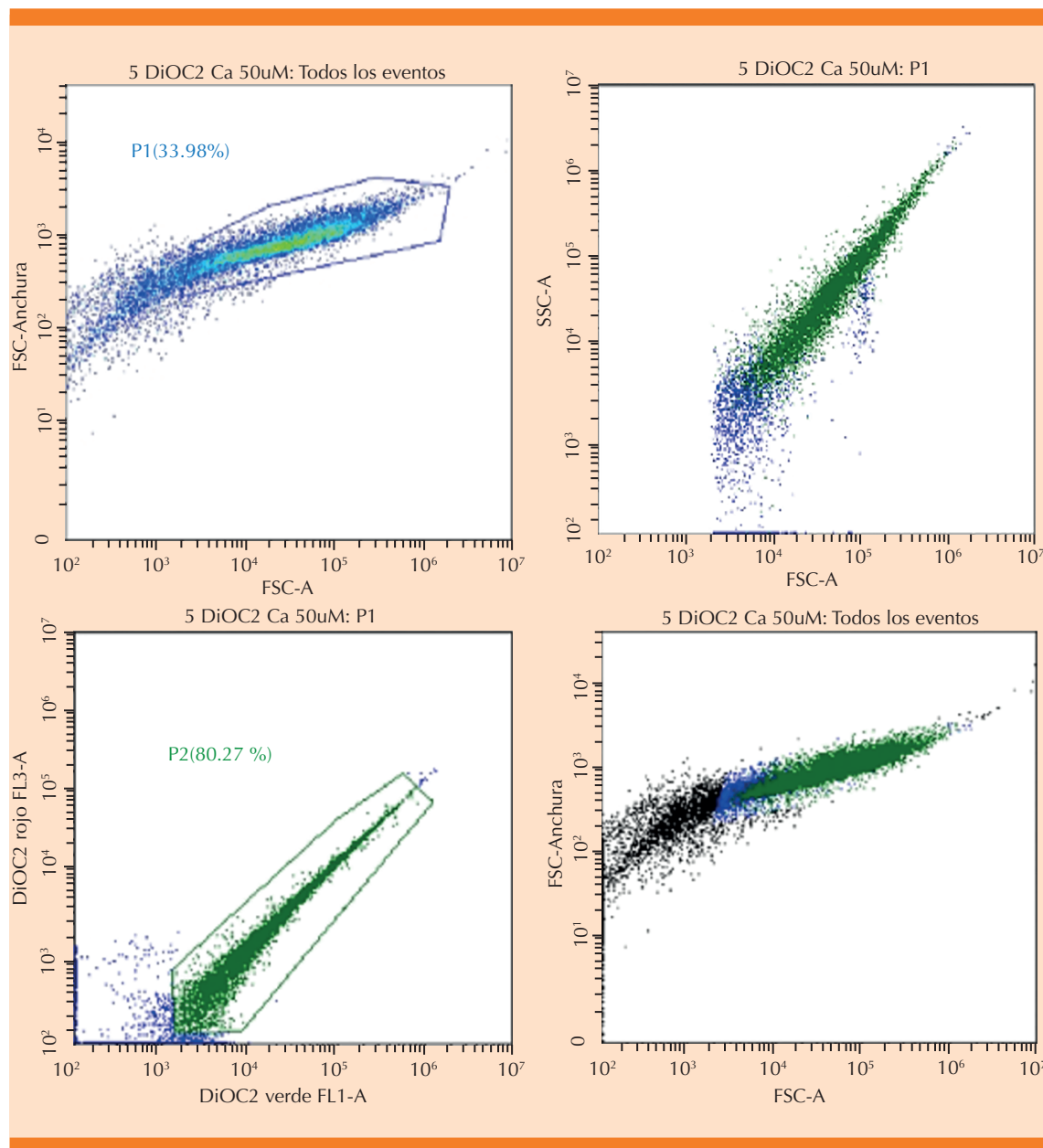


Figura 14. Caso con 50 μ M de calcio. En el recuadro 1 se observa la complejidad de las mitocondrias en el eje de las ordenadas medida en anchura (FSC-Width), en el eje de las abscisas la complejidad por capacidad de tinción (FSC-A)). La selección de la población 1 (P1) se efectúa a partir de las que tienen mejor capacidad de fluorescencia. En el recuadro 2 se observa el diagrama de puntos en complejidad versus tamaño. En el recuadro 3 en el eje de las ordenadas se observa la fluorescencia en rojo (FL3-A) y en el eje de las abscisas la que fluoresce en verde (FL1-A). En el recuadro 4 se observan todas las poblaciones en relación con su anchura y su capacidad de tinción.

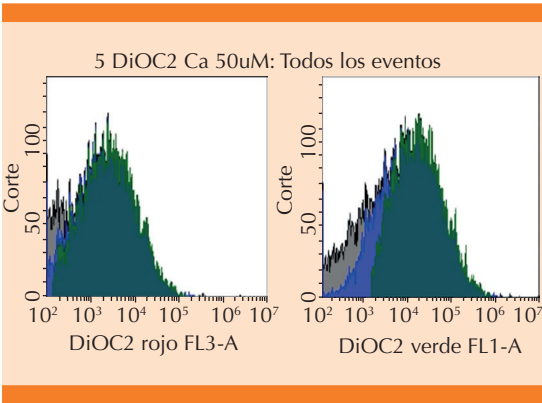


Figura 15. Caso con 50 μ M de calcio. Se observan los histogramas para las poblaciones seleccionadas en la figura 14, en gris se observa la cantidad total de eventos, en azul se encuentra la población P1 y en verde la población P2. Se evalúa el número de eventos contra su fluorescencia, FL3-A para rojo y FL1-A para verde.

La transición de la permeabilidad mitocondrial posee un papel fisiológico fundamental. Se postula que la apertura y el cierre del poro de transición tengan fases reversibles e irreversibles, dependiendo de la respuesta mitocondrial ante estímulos energéticos o daños, como pueden ser la isquemia y la isquemia-reperfusión. Asimismo, cuando hay un exceso de ATP, la interacción de ese nucleótido con ANT o ATP sintasa (dependiente de clarificación respecto al ligando específico) puede conducir al desacoplamiento de la cadena respiratoria, regulando así la síntesis energética y la velocidad de fosforilación oxidativa, evaluada experimentalmente mediante el consumo de oxígeno. Un proceso contrarregulador impide el desacoplamiento permanente: ante exceso de ATP, la ATPasa mitocondrial podría hidrolizarlo para producir Pi y ADP, compuestos

Cuadro 1. Experimentos de mitometría de flujo en unidades de absorbancia arbitrarias y normalización amV.

Experimento 1				
μ M Ca	Verde	Rojo	$\Delta\Psi$ Media	mV
Control positivo	302.295	63.643	142.348	180
50	483.331	83.636	-18.695	0
CCCP	483.331	83.636	-18.695	0
50+EDTA	580.092	306.329	107.237	141
Experimento 2				
μ M Ca	Verde	Rojo	$\Delta\Psi$ Media	mV
0	787.605	119.544	-287.061	180
50	1082.136	146.464	-554.672	0
CCCP	1049.792	154.088	-514.704	27
50 + EDTA	957.7487	146.318	-430.431	83
Experimento 3				
μ M Ca	Verde	Rojo	$\Delta\Psi$ Media	mV
0	612.88	81.81	-150.072	180
50	704.62	14.11	-309.509	0
CCCP	586.26	81.35	-123.907	10
50 + EDTA	656.940	85.916	-190.024	135

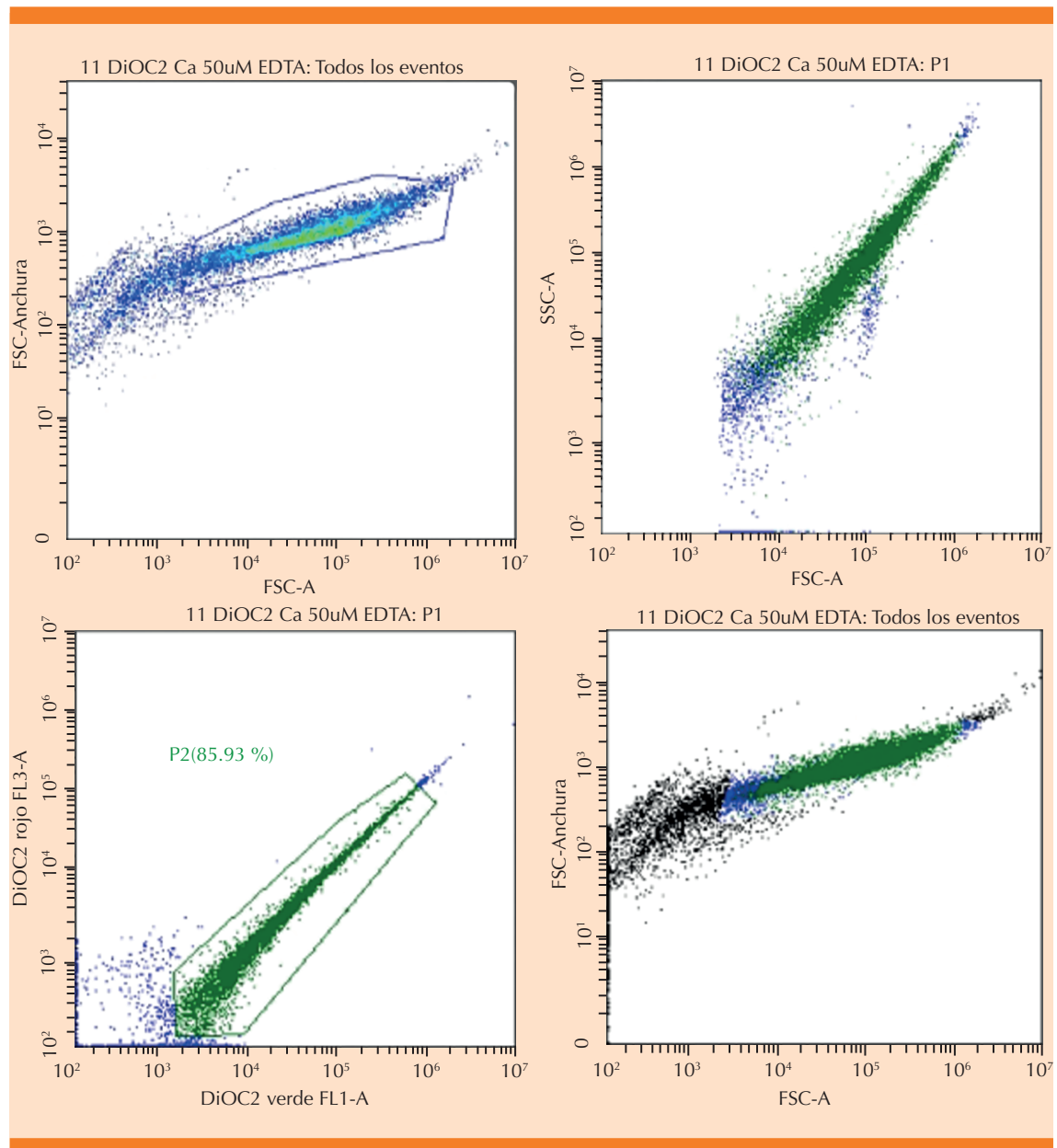


Figura 16. Caso 50 μ M de calcio + EDTA equimolar. En el recuadro 1 se advierte la complejidad de las mitocondrias en el eje de las ordenadas medida en anchura (FSC-Anchura), en el eje de las abscisas la complejidad por capacidad de tinción (FSC-A). Se efectúa la selección de la población 1 (P1) a partir de las que tienen mejor capacidad de fluorescencia. En el recuadro 2 se observa el mapa de puntos en complejidad versus tamaño. En el recuadro 3, en el eje de las ordenadas, se observa la fluorescencia en rojo (FL3-A) y en el eje de las abscisas la que fluoresce en verde (FL1-A). En el recuadro 4 se observan todas las poblaciones en relación con su anchura y a su capacidad de tinción.

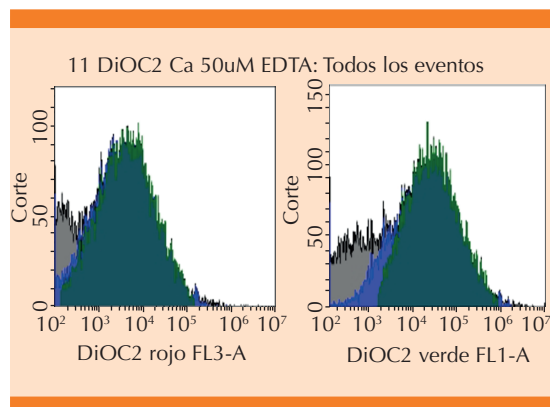


Figura 17. Caso 50 μ M de calcio + EDTA equimolar. En gris se observa la totalidad de eventos, en azul la población P1 y en verde la población P2, ambas se seleccionaron para disminuir el porcentaje de error.

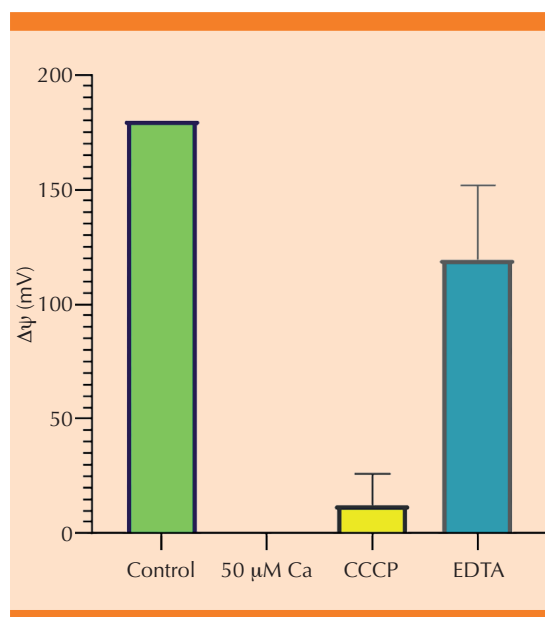


Figura 18. Medias de potencial transmembranal mitocondrial. Verde control, máxima despolarización a exposición de calcio (0 mV), CCCP en color amarillo y reversibilidad con EDTA de 66% con $p < 0.05$ (azul).

que inducen el cierre del PTPm y promueven el acoplamiento de la fosforilación oxidativa, previniendo así la muerte celular. Tanto ADP como Pi contribuyen a cerrar el poro, si bien aún se

requieren estudios para demostrar la hidrólisis de ATP *in vivo* durante la apertura del poro de transición. El fenómeno dependiente de ATP y Pi sigue dos pasos o distribuciones de afinidad previamente documentadas; específicamente, el segundo paso exhibe un modo bajo precedido por un pulso alto de afinidad, lo que sugiere la existencia de un umbral de apertura definido por concentraciones críticas de ATP.

El análisis de la fisiología mitocondrial es fundamental para comprender enfermedades asociadas con la transición de la permeabilidad, como la isquemia, la isquemia-reperfusión y las enfermedades neurodegenerativas, entre ellas el Alzheimer. Incluso, el envejecimiento celular podría estar modulándose indirectamente a través de estos mecanismos.

La síntesis de ATP dependiente de ADP puede procesarse mediante el método descrito por José MV³⁵ observándose distribuciones de afinidad características y coexistencia de distintos estados, en concordancia con el mecanismo rotacional de la ATPasa mitocondrial. En todas las gráficas, la síntesis de ATP representa el paso decisivo, alcanzando un modo predominante, similar a lo observado en el centro ABC de MsdbA,³⁶ un transportador de nucleótidos de *E. coli* con actividad catalítica de ATP. El evento determinante en la hidrólisis de ATP es, precisamente, la reacción enzimática acoplada. El estado final corresponde a la liberación del ATP. Para un dímero de ATPasa con seis sitios activos, el aumento en la concentración de ATP reduce la afinidad y la cantidad de estados, lo que favorece la modalidad sintetizadora previa a la liberación temporal del ATP por la ATPasa mitocondrial.

En mitocondrias de riñón murino, el comportamiento del canal dependiente del desplazamiento iónico mediante KCl (**Figura 6**) indica que el Ca^{2+} matricial, luego de interactuar con el poro, determina tres estados conformacionales depen-

diendo de su concentración, evidenciados por las tres modalidades diferentes en la distribución de afinidades para la liberación de calcio.

Además, se utilizó citometría de flujo directa en mitocondrias, empleando DioC 2-3 como marcador de potencial transmembrana y apoptosis. Las mediciones consideraron la energización con succinato (complejo II), calibrando el citómetro para bacterias. La curva de titulación de calcio se ajustó a valores fisiológicos (180 mV). Se evidenció que los incrementos de calcio a 50 μM y su reversibilidad mediante EDTA son significativos, lo que demuestra la capacidad de cerrar el PTPm con quelación artificial de calcio. Así, en mamíferos, la carga energética referida por Lehninger depende de las concentraciones de calcio y los cambios de afinidad, corroborados en este estudio.

En la célula, las concentraciones de calcio fluctúan entre 10 y 50 μM según el ciclo cardiaco. A mayores concentraciones, el efecto Bowditch disminuye la recaptura de calcio y aumenta la contractilidad, lo que sugiere un desacoplamiento fisiológico. Por tanto, el principal sensor energético para la síntesis de ATP es el calcio intracelular, que regula el canal aniónico dependiente de voltaje en el espacio transmembranal mitocondrial. En esta investigación se muestra que el poro puede abrirse y cerrarse de manera reversible, lo que podría fundamentar el desarrollo de fármacos destinados a mitigar el daño por reperfusión, como el EDTA o levosimendán.

El paralelismo entre calcio, potenciales transmembrana elevados y potencia cardiaca refuerza los mecanismos adaptativos del metabolismo cardiaco. Los resultados demuestran que existen fluctuaciones constantes en la modalidad y afinidad, lo que explicaría los fenómenos observados durante el pre o posacondicionamiento en el infarto. Los pulsos de calcio facilitan la recaptura dependiente de ellos, entendidos como alteraciones en la afinidad. Estas observaciones

ofrecen una explicación subcelular de cómo la mitocondria y el sarcoplasma protegen a la célula frente a necroptosis, mediante una recaptura continua y variaciones de afinidad persistentes, siempre que no se alcance un punto crítico irreversible.

Fisiología de la isquemia reperfusión en el posacondicionamiento. El posacondicionamiento posterior al infarto podría permitir que, durante la reperfusión, las ráfagas de calcio favorezcan el equilibrio de sus concentraciones entre los compartimentos intracelulares, específicamente en el sarcolema, antes de que la mitocondria lo capture y ocurra la transición de permeabilidad mitocondrial. En una reperfusión abrupta, los canales mitocondriales tienen alta afinidad por el calcio, lo secuestran irreversiblemente, promueven su hinchamiento mitocondrial, la ruptura de membranas y la liberación de sustancias: citocromo C y Smac/DIABLO, mediadoras de la muerte celular. Hasta ahora, no se había propuesto una teoría que explique el mecanismo del posacondicionamiento.

La transición de permeabilidad mitocondrial podría desempeñar un papel de estructura capaz de mitigar altas cargas energéticas y potenciales transmembranales elevados para prevenir la fuga de electrones, ya sea reversa o a semiquinona para la generación de radicales libres, lo que contribuiría a disminuir la velocidad de envejecimiento. No obstante, se requieren más estudios en bioenergética para confirmar esta hipótesis.

CONCLUSIONES

La transición de permeabilidad mitocondrial se caracteriza por ser un proceso dinámico y reversible, quizá como una respuesta adaptativa a elevados potenciales transmembranales. En levaduras, la carga energética y el estado de fosforilación constituyen los parámetros clave; en contraste, el calcio es el principal mediador energético a nivel subcelular en el tejido



cardiaco. La reversibilidad del fenómeno, al cabo de cinco minutos de exposición, alcanza el 66%. Este estudio ofrece una aproximación a los mecanismos fisiológicos relacionados con el postacondicionamiento y preacondicionamiento isquémico, propone a la transición de permeabilidad mitocondrial como posible objetivo terapéutico para disminuir el daño producido por la isquemia-reperfusión. Asimismo, la transición de permeabilidad mitocondrial evidencia la reversibilidad cuando se simula la recaptura de calcio mediante el ácido etilendiaminotetraacético, función que en condiciones *in vivo* corresponde al sarcolema. El aumento en la sensibilización inducido por levosimendán sugiere alteraciones en la afinidad al calcio, lo que podría contribuir, teóricamente, a la minimización del daño asociado a la isquemia-reperfusión.

Se plantea la hipótesis de que existen distintas poblaciones de poros, cada una con diferentes umbrales de agresión, capaces de revertir la transición de permeabilidad. Sin embargo, al incrementarse la agresión, permanecen abiertas ciertas poblaciones de poros, lo que obliga a la mitocondria a aumentar la fosforilación oxidativa para mantener los potenciales previamente requeridos. Este mecanismo podría desempeñar un papel relevante en el envejecimiento y en las enfermedades vasculares degenerativas. Por último, la capacidad del *buffer* energético mitocondrial para restaurar completamente el potencial transmembranal podría estar vinculada con la longevidad celular.

DECLARACIONES

Agradecimientos: Manuel Gutiérrez Aguilar.

Financiamientos: Ninguno.

Contribuciones:

Emilio Montes Isunza: Conceptualización, análisis de los datos, análisis formal, investigación, metodología, administración del proyecto.

Marco V José: Conceptualización, análisis de los datos, análisis formal, investigación, validación.

Roxana Olguín Alor: Análisis formal, investigación, recursos, validación.

Rodrigo Gopar Nieto: Conceptualización, análisis formal, metodología.

Joaquín D. Morales Solís: Redacción, revisión y edición

Conflictos de interés:

Los autores declaran no tener conflicto de interés alguno al no haber recibido financiamiento para llevar a cabo la investigación.

REFERENCIAS

1. Margulis L. On the origin of mitosing cells. *J Theor Biol* 1967; 14 (3): 225-74. [https://doi.org/10.1016/0022-5193\(67\)90079-3](https://doi.org/10.1016/0022-5193(67)90079-3)
2. Margulis L. Symbiotic theory of the origin of eukaryotic organelles; criteria of proof. *Symp Soc Exp Biol* 1975; 29: 21-38. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/822529/>
3. Vesteg M, Krajčovič J. The falsifiability of the models for the origin of eukaryotes. *Curr Genet* 2011; 57 (6): 367-90. <https://doi.org/10.1007/s00294-011-0357-z>
4. Hunte C, Palsdottir H, Trumpower BL. Protonmotive pathways and mechanisms in the cytochrome bc1 complex. *FEBS Lett* 2003; 545 (1): 39-46. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)00391-0](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)00391-0)
5. Bunoust O, Devin A, Avéret N, Camougrand N, et al. Competition of electrons to enter the respiratory chain. *J Biol Chem* 2004; 280 (5): 3407-413. [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(20\)76205-8/fulltext](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(20)76205-8/fulltext)
6. Boyer PD. A research journey with ATP synthase. *J Biol Chem* 2002; 277 (42): 39045-9061. [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(19\)72254-6/fulltext](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(19)72254-6/fulltext)
7. Richter OMH, Ludwig B. Cytochrome c oxidase-structure, function, and physiology of a redox-driven molecular machine. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 2003; 147: 47-74. <https://doi.org/10.1007/s10254-003-0006-0>
8. Yagi T, Matsuno-Yagi A. The proton-translocating NADH-quinone oxidoreductase in the respiratory chain: the secret unlocked. *Biochemistry* 2003; 42: 2266-74. <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/bi027158b>
9. Mitchell P, Moyle J. Activation and inhibition of mitochondrial adenosine triphosphatase by various anions and other agents. *Journal of Bioenergetics* 1971; 2 (1): 1-11. <https://doi.org/10.1007/BF01521319>
10. Akerman KE, Wikström MK. Safranin as a probe of the mitochondrial membrane potential. *FEBS Lett*. 1976; 68 (2): 191-97. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(76\)80434-6](https://doi.org/10.1016/0014-5793(76)80434-6)
11. Atkinson DE. Energy charge of the adenylate pool as a regulatory parameter. Interaction with feedback modifiers. *Biochemistry* 1968; 7: 4030-34.

12. Saks V. Molecular System Bioenergetics. Wiley-VCH, 2007.
13. Halestrap AP, McStay GP, Clarke SJ. The permeability transition pore complex: another view. *Biochimie* 2002; 84 (2-3): 153-66. [https://doi.org/10.1016/S0300-9084\(02\)01375-5](https://doi.org/10.1016/S0300-9084(02)01375-5)
14. Crompton M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J*. 1999; 341 (2): 233-49. <https://doi.org/10.1042/bj3410233>
15. Bernardi P. The mitochondrial permeability transition pore: a mystery solved? *Front Physiol* 2013; 4: 95. <https://doi.org/10.3389/fphys.2013.00095>
16. Azzolin L, von Stockum S, Basso E, Petronilli V, Forte MA, Bernardi P. The mitochondrial permeability transition from yeast to mammals. *FEBS Lett* 2010; 584 (12): 2504-509. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014579310002930#:~:text=https%3A//doi.org/10.1016/j.febslet.2010.04.023>
17. Jung DW, Bradshaw PC, Pfeiffer DR. Properties of a cyclosporin-insensitive permeability transition pore in yeast mitochondria. *J Biol Chem* 1997; 272 (34): 21104-112. [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(19\)65729-7/fulltext](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(19)65729-7/fulltext)
18. Bradshaw PC, Jung DW, Pfeiffer DR. Free fatty acids activate a vigorous Ca^{2+} : 2H^{+} antiport activity in yeast mitochondria. *J Biol Chem* 2001; 276 (44): 40502-40509.
19. Cabrera-Orefice A, Guerrero-Castillo S, Luévano-Martínez LA, Uribe-Carvajal S. Mitochondria from the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii* (halophilic organelles?). *J Bioenerg Biomembr* 2010; 42 (1): 11-19. <https://doi.org/10.1007/s10863-009-9264-0>
20. Cabrera-Orefice A, Guerrero-Castillo S, Díaz-Ruiz R, Uribe-Carvajal S. Oxidative phosphorylation in *Debaryomyces hansenii*: physiological uncoupling at different growth phases. *Biochimie* 2014; 102: 124-36. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2014.03.003>
21. Cabrera-Orefice A, Ibarra-García-Padilla R, Maldonado-Guzmán R, Guerrero-Castillo S, et al. The *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial unselective channel behaves as a physiological uncoupling system regulated by Ca^{2+} , Mg^{2+} , phosphate and ATP. *J Bioenerg Biomembr* 2015; 47 (6): 477-91. <https://doi.org/10.1007/s10863-015-9632-x>
22. Chávez E, Moreno-Sánchez R, Zazueta C, Reyes-Vivas H, et al. Intramitochondrial K^{+} as activator of carboxyatractyloside-induced Ca^{2+} release. *Biochim Biophys Acta* 1991; 1070 (2): 461-66. <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-0025987684&doi=10.1016%2f0005-2736%2891%2990087-O&partnerID=40&md5=0d520bc9621b26ef87bb637c86229c97>
23. Cortés P, Castrejón V, Sampedro J, Uribe S. Interactions of arsenate, sulfate and phosphate with yeast mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1456 (2-3): 67-76. [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(99\)00109-7](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(99)00109-7)
24. Gutiérrez-Aguilar M, Pérez-Vázquez V, Bunoust O, Manon S, et al. In yeast, Ca^{2+} and octylguanidine interact with porin (VDAC) preventing the mitochondrial permeability transition. *Biochim Biophys Acta Bioenerg* 2007; 1767 (10): 1245-51. <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-34848881611&doi=10.1016%2fj.bbabi.2007.07.002&partnerID=40&md5=de0b29a24b875b7c06ecd0e4e41d2660>
25. Gutiérrez-Aguilar M, Pérez-Martínez X, Chávez E, Uribe-Carvajal S. In *Saccharomyces cerevisiae*, the phosphate carrier is a component of the mitochondrial unselective channel. *Arch Biochem Biophys* 2010; 494 (2): 184-91. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2009.12.002>
26. Rocou X, Manon S, Guérin M. ATP opens an electrophoretic potassium transport pathway in respiring yeast mitochondria. *FEBS Lett* 1995; 364 (2): 161-64. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(95\)00380-R](https://doi.org/10.1016/0014-5793(95)00380-R)
27. Roucou X, Manon S, Guérin M. Conditions allowing different states of ATP- and GDP-induced permeability in mitochondria from different strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* 1997; 1324 (1): 120-32. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(96\)00215-5](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(96)00215-5)
28. Baines CP. The mitochondrial permeability transition pore and ischemia-reperfusion injury. *Basic Res Cardiol* 2009; 104 (2): 181-88. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021909-135929>
29. Baines CP. The cardiac mitochondrion: nexus of stress. *Annu Rev Physiol* 2010; 72: 61-80. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021909-135929>
30. Boengler K, Heusch G, Schulz R. Mitochondria in postconditioning. *Antioxid Redox Signal* 2011; 14 (5): 863-80. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3309>
31. Fröhlich GM, Meier P, White SK, Yellon DM, et al. Myocardial reperfusion injury: looking beyond primary PCI. *Eur Heart J* 2013; 34 (23): 1714-22. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehd090>
32. Nakagawa T, Shimizu S, Watanabe T, Yamaguchi O, et al. Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death. *Nature* 2005; 434 (7033): 652-58. <https://doi.org/10.1038/nature03317>
33. Minamikawa T, Williams DA, Bowser DN, Nagley P. Mitochondrial permeability transition and swelling can occur reversibly without inducing cell death in intact human cells. *Exp Cell Res* 1999; 246 (1): 26-37. <https://doi.org/10.1006/excr.1998.4290>
34. Lemasters JJ, Theruvath TP, Zhong Z, Nieminen AL. Mitochondrial calcium and the permeability transition in cell death. *Biochim Biophys Acta Bioenerg* 2009; 1787 (11): 1395-401. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2009.06.009>
35. Parra E, Cruz D, García G, Zazueta C, et al. Myocardial protective effect of octylguanidine against the damage induced by ischemia-reperfusion in rat heart. *Mol Cell Biochem* 2005; 269 (1): 19-26. <https://doi.org/10.1007/s11010-005-2989-0>