



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

**FISIOLOGÍA DEL TECNESIO-99-MIBI EN LA TRANSICIÓN DE LA
PERMEABILIDAD MITOCONDRIAL EN MIOCITOS
DIFERENCIADOS.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**MÉDICO ESPECIALISTA EN CARDIOLOGÍA
CLÍNICA**

P R E S E N T A:

Dr. Héctor Emilio Montes Isunza.

Facultad de Medicina



**DIRECTOR DE TESIS:
Dra. María del Carmen Martínez Escobar.**

Ciudad Universitaria, CD. MX., 2018.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

A mi Padre, quien siempre creyó en mí.

A mi Madre, quien nunca dejó de alentarme.

A mi Abuelo Salvador, el sabio de la montaña.

A Daniela, sin ti no habríamos llegado tan lejos.

A mi Hermano Sebastián quien lleva un viaje paralelo al mío, motivo por el cual me sabe escuchar.

A la Dra. Martínez quien me contagia constantemente de entusiasmo.

Al Dr. Merino, maestro y amigo.

Al Dr. Di Silvio quien confió en que estas ideas llegarían a lograrse.

A Jaime Miguel Treviño mi hermano de otra madre.

A la V. M. Guillermina, guía incansable.

ÍNDICE

| | |
|---|-----------|
| 1. RESUMEN..... | 4 |
| 2. ABREVIATURAS..... | 6 |
| 3. MARCO TEÓRICO..... | 8 |
| 3.1. Implicaciones de la Fisiología Mitocondrial en la Cardiopatía Isquemica..... | 8 |
| 3.2. La Mitocondria..... | 9 |
| 3.3. La Fosforilación Oxidativa..... | 10 |
| 3.4. Concepto de corto circuito eléctrico y desacoplantes mitocondriales... .. | 14 |
| 3.5. El Canal Inespecífico Mitocondrial o Poro de Transición de la Permeabilidad Mitocondrial..... | 17 |
| 3.6. El daño por Isquemia Reperfusión..... | 21 |
| 3.7. El modelo biológico..... | 22 |
| 3.8. Fisiología del Tecnecio 99 MIBI..... | 23 |
| 4. ANTECEDENTES..... | 25 |
| 4.1. Experimentos previos..... | 25 |
| 5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA..... | 29 |
| 6. JUSTIFICACIÓN..... | 30 |
| 7. HIPOTESIS..... | 31 |
| 8. OBJETIVOS GENERALES..... | 32 |
| 9. OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 33 |
| 10. MATERIAL Y MÉTODOS..... | 34 |
| 10.1. Diseño de Estudio..... | 34 |
| 10.2. Población de estudio y universo de trabajo..... | 34 |
| 10.3. Definición de grupos..... | 35 |

| | |
|---|-----------|
| 10.3.1. Células Mesenquimales..... | 35 |
| 10.3.2. Mitocondrias miocárdicas de rata Wistar..... | 36 |
| 10.4. Ensayo de células mesenquimales..... | 37 |
| 10.5 Obtención de mitocondrias de miocardio (rata Wistar)..... | 38 |
| 10.6. Medición de potencial transmembranal en citometría de flujo..... | 40 |
| 10.7. Análisis estadístico..... | 43 |
| 11. IMPLICACIONES ÉTICAS..... | 44 |
| 12. BIOSEGURIDAD..... | 45 |
| 13. RESULTADOS..... | 46 |
| 13.1. Modelo de células mesenquimales..... | 46 |
| 13.2. Mitocondrias de miocardio de ratas Wistar..... | 48 |
| 14. DISCUSIÓN..... | 60 |
| 15. CONCLUSIONES..... | 62 |
| 16. APÉNDICES..... | 63 |
| 16.1. Bibliografía..... | 63 |
| 16.2. Agradecimientos..... | 69 |

1. RESUMEN

La transición de la permeabilidad mitocondrial, es un proceso posterior a la isquemia, tras el cual se desacopla la cadena respiratoria mitocondrial.

Con este proceso abierto, es decir, al existir un poro de transición de la permeabilidad mitocondrial, se genera el daño por isquemia reperfusión. La hipótesis propuesta es la incapacidad de un amortiguador de frenado de la cadena respiratoria y transporte de electrones que generan radicales libres.

El estudio de la fisiología mitocondrial mediante tecnecio 99 MIBI, parte del hecho de que el MIBI se incrusta en la membrana interna mitocondrial por diferencia de cargas, es decir cuando la mitocondria levanta su potencial transmembranal dependiente de sustrato.

En la presente tesis se tituló Tc-99-MIBI por número de células mesenquimales (ensayos de 1 200 000 células por ensayo) debido a que no fue posible diferenciar las mismas a miocitos por falta de recursos materiales. Las células mesenquimales son incapaces de captar Tc-99-MIBI con una emisión nula de radiación. Esto podría explicarse por el uso de vías alternas a la respiración aerobia en esta etapa de embriogénesis como el efecto Warburg.

Por otra parte se aislaron mitocondrias de miocardio de ratas Wistar para evaluar la reversibilidad de la transición de la permeabilidad mitocondrial a diferentes concentraciones de calcio. El método para valorar la transición de la permeabilidad mitocondrial fue la citometría de flujo con tinción a base de DioC.

Después de 5 minutos de exposición a calcio 50 μM se quela con calcio la mitocondria revirtiendo la transición de la permeabilidad mitocondrial observado por citometría de flujo directo. La repetición de experimentos fue con una n de 3, siendo estadísticamente significativa la máxima despolarización y la reversibilidad de la transición de la permeabilidad a un 66% ($p < 0.05$).

En esta tesis observamos que la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial podría tener un efecto fisiológico como amortiguador oxidativo en casos de alta carga energética, donde a diferencia de lo observado en levaduras, el sensor metabólico serían las concentraciones de calcio.

La apertura del poro de transición de la permeabilidad mitocondrial es reversible.

2. ABREVIATURAS

ADP: Adenosín difosfato.

anti MHC: Anticuerpo de fluorescencia anti heavy chain myosin (anti cadena pesada de miosina).

ATP: Adenosín trifosfato.

Ca: Calcio.

CCCP: (m-clorocarbonilcianuro fenilhidrazona).

CMN: Centro Médico Nacional.

Cyp D: Ciclofilina D.

DioC 2 (3): 3,3 dietilcarbocianina de yodo.

EDTA: Ácido etilen diamino tetra-acético (quelante bivalente).

H⁺: Hidrogenión.

ISSSTE: Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado.

IPSC: Células pluripotentes inducidas.

MIBI: metoxi isobutil isonitrilo.

Na: Sodio.

PTPm: Poro de transición de la permeabilidad mitocondrial.

UCP: Proteínas desacoplantes mitocondriales.

Vmax: Concentración de un sustrato a la cual la actividad enzimática es mayor.

3. MARCO TEÓRICO

3.1. Implicaciones de la Fisiología Mitocondrial en la Cardiopatía Isquémica.

Las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte en nuestro país, si se toma en cuenta el registro y las complicaciones como parte del nicho epidemiológico de la diabetes mellitus en México. El infarto es una enfermedad incapacitante que aqueja a la población mexicana cuyo costo en los sistemas de salud es muy alto. El tamaño del infarto determina el grado de discapacidad así como la mortalidad [Braunwald, E 1989].

La terapia de reperfusión es mandatoria en pacientes con infarto agudo al miocardio y elevación del segmento ST, es decir, en pacientes con oclusión total epicárdica aguda, sin embargo, el tiempo de ventana y las distintas estrategias implementadas de manera internacional, no son suficientes para mitigar por completo el daño por reperfusión. La reperfusión (necesaria para la supervivencia del paciente) causa daño irreversible, ocasionante del 30 a 40% del daño permanente en pacientes cardiópatas. El daño establecido en pacientes reperfundidos incrementa el riesgo de dilatación así como de remodelación miocárdica.

Existen caracterizaciones y experimentación animal que ubica la transición de la permeabilidad mitocondrial como un eslabón inicial en este proceso [Stat, P y cols 2005, Thibault H y cols 2008]. El proceso de isquemia reperfusión tras la transición de la permeabilidad desencadena generación de radicales libres pues

impide a la cadena respiratoria acoplar el gradiente electroquímico y potencial redox a la síntesis de ATP.

3.2. La Mitocondria.

La mitocondria es un organelo celular eucarionte complejo. Una de las teorías más aceptadas del origen de las mitocondrias es la endosimbiótica. Al ser engullida una eubacteria aerobia capaz de utilizar al oxígeno en la obtención de energía química, incrementó la eficiencia energética de la célula huésped, mientras que la eubacteria a cambio recibió refugio y alimento [VestegM,cols, 2011]. Este evento biológico puede situarse aproximadamente hace 1.5 mil millones de años, cuando en la atmósfera terrestre incrementó la presión de oxígeno [Margulis L, 1967, 1975] hecho que favoreció el uso del oxígeno como aceptor final de electrones para el binomio.

Las mitocondrias son de tamaño similar al de una bacteria, además contienen un genoma único de estructura circular, sus propios ribosomas (diferentes a los de la maquinaria eucarionte) su propio ARN de transferencia y un código genético en donde algunos codones tienen una asignación diferente a la del código nuclear [DesmondE,cols, 2011].

Dentro de la fisiología celular, la mitocondria lleva a cabo varias reacciones químicas. Algunas de ellas son: el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, la beta oxidación y la 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 a bombeo de protones y síntesis de ATP. Este

proceso es la principal fuente de energía química en la mayor parte de los organismos eucariontes.

Hasta el momento nuevas funciones se le han atribuido a la mitocondria como la apoptosis. Aun así, es probable que estemos lejos de conocer en su totalidad el papel de la mitocondria en un sistema complejo como lo son los organismos eucariontes.

3.3. La Fosforilación Oxidativa.

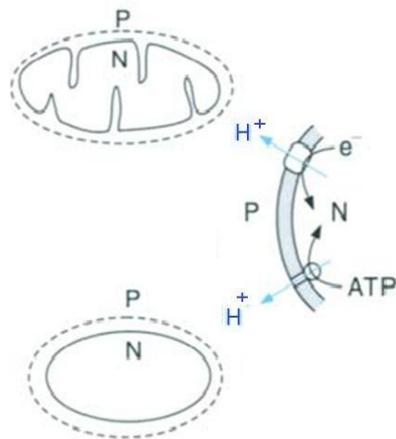
Se le conoce como fosforilación oxidativa a la cascada de reacciones químicas redox, en donde ocurre una transferencia de electrones siempre hacia moléculas con potenciales redox menores (más negativos). El último aceptor de electrones es el oxígeno, el cual es reducido a H₂O. Los diferentes complejos respiratorios realizan la transferencia de electrones entre sí. Algunos de estos complejos funcionan como bombas de protones [Hunte C, cols, 2003].

El complejo I o NADH-Ubiquinona-Oxidorreductasa, cataliza la transferencia de electrones del NADH a la ubiquinona o coenzima Q (CoQ). El complejo II o succinato-ubiquinonareductasa, transfiere los electrones del succinato a la coenzima Q. El ubiquinol, el cual es el aceptor de electrones tanto del complejo I como II, transfiere sus electrones al complejo III o ubiquinol-citocromo C oxidorreductasa. Finalmente el complejo IV o citocromo C oxidasa transfiere los electrones del citocromo C al oxígeno para reducirlo a H₂O [Bunoust X, cols, 2005; Boyer P, 2002; Richter, O, Ludwig B, 2003; Yagi T, cols, 2003].

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, el cual, de acuerdo a la teoría quimiosmótica acopla la cadena respiratoria. Al disiparse el gradiente de protones a través del complejo V mitocondrial o ATP sintasa, este funciona como un rotor, dentro del cual se lleva a cabo la reacción:



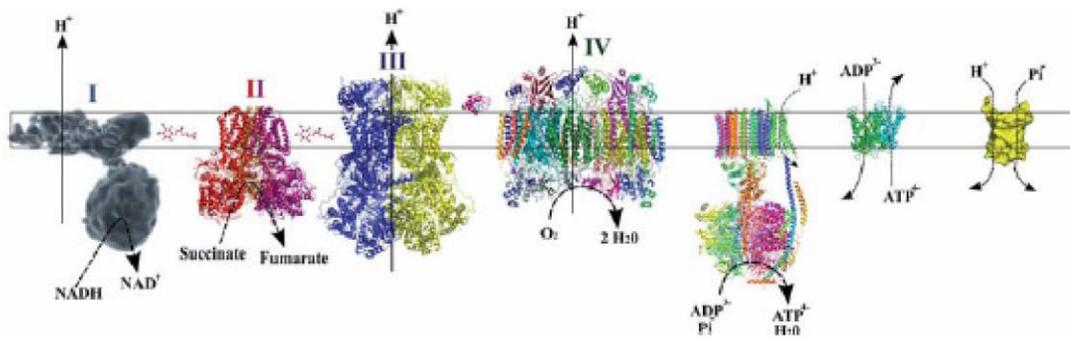
La ATP sintasa o complejo V, se encuentra embebida en la membrana interna mitocondrial de organismos eucariontes y en la membrana celular de bacterias. La ATP sintasa contiene dos dominios: F1 es un complejo periférico mientras que F0 es una proteína de membrana por donde ocurre el flujo de protones. 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 [Boyer P, 2002].



Modificado de Bioenergetics 3 Nichols and Fergusson. Figura 1. En la que se muestra el acoplamiento de la transferencia de electrones con el bombeo de protones del espacio N (negativo) al espacio P (positivo) del espacio inter-membranal mitocondrial y en la membrana externa de una bacteria. Nótese que la hidrólisis del ATP por la ATP asa o ATP sintasa en mitocondria genera una diferencia de cargas y por tanto un $\Delta\Psi$.

La ATP sintasa es un rotor molecular cuyos giros se realizan 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 lleva a cabo al terminar una vuelta en tres pasos: la captación de ADP y Pi, la síntesis de ATP y finalmente la liberación de este en el último tercio de vuelta. Actualmente no hay estudios biofísicos que muestren los cambios conformacionales de la ATP sintasa por distribución de afinidades. Sin embargo existen estudios que sugieren que la hidrólisis de ATP es un paso crítico en este proceso reverso [Syberg, cols, 2012]. Se cree que la estequiometria necesaria para un tercio de vuelta es de tres protones, llevando a cabo 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 nos permite entender que la mitocondria está sujeta a cambios metabólicos de manera dinámica. Dichos cambios pueden reflejarse en la actividad de la cadena respiratoria de acuerdo a cambios de concentraciones de iones o metabolitos como pueden ser Mg^{2+} , Ca^{2+} , P_i , ATP y ADP entre otros.



Tomado de Molecular SystemsBioenergetics: Energy for life. SaksValdur. Figura 2. En la que se muestra la cadena respiratoria de mamíferos junto con el translocador de nucleótidos de adenina y el acarreador de fosfato.

3.4. Concepto de corto circuito eléctrico y desacoplantes mitocondriales

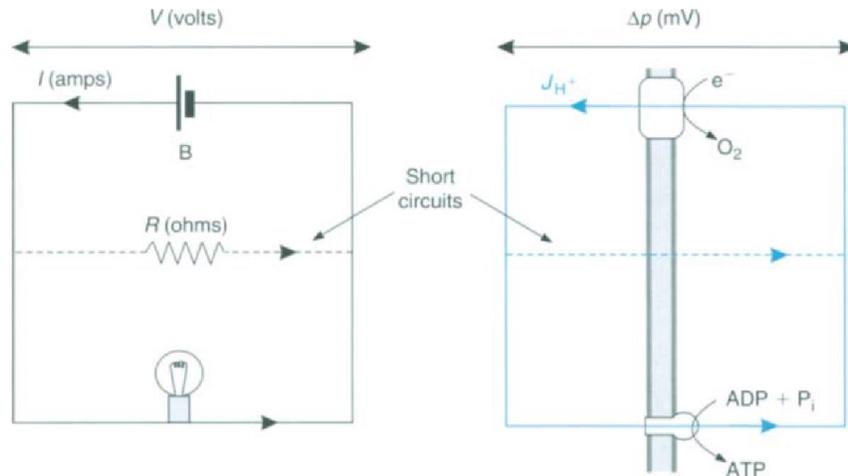
A continuación enunciaremos las partes que componen un circuito eléctrico y la definición de corriente eléctrica. Para entender el concepto de corriente eléctrica, consideremos un alambre de cobre cortado transversalmente. A temperatura ambiente sin fuerzas externas aplicadas dentro de este alambre de cobre se presenta un movimiento aleatorio de electrones libres, esto se da principalmente por la energía térmica adquirida del medio ambiente. Pero en el momento en que los átomos pierden sus electrones los átomos adquieren una carga neta positiva, convirtiéndose en iones positivos. Los electrones libres, se encuentran listos para moverse, dentro de estos iones positivos. Es decir, los electrones circularán a través del alambre de cobre u otro conductor sólido de electricidad, generando la corriente eléctrica. Sin embargo, en ausencia de fuerzas externas aplicadas, el flujo neto de carga en un conductor hacia cualquier dirección es cero [Boylestad R, 2004]. Si se conecta una batería que genere una diferencia de cargas (voltaje), habrá movimiento de electrones (corriente eléctrica). Al pasar a través de una resistencia, la energía química de la pila es convertida (si la resistencia se encuentra en una cámara de argón) en energía luminosa. Si previo al camino esperado por la corriente cerramos el circuito con un alambre con mayor conductancia, generaremos un corto circuito en el cual, la corriente circulará por el nuevo alambre y la energía se disipará en calor.

Nicholls y Ferguson en 2001 hicieron una analogía en la cual comparan el circuito de protones mitocondrial con un circuito eléctrico. Aunque es un circuito no

óhmico, el comportamiento es similar, y nos permite entender cómo se lleva a cabo la síntesis de ATP gracias a un gradiente de protones.

En la mitocondria el alambre de cobre es reemplazado por los compartimentos mitocondriales: matriz mitocondrial y espacio inter-membranal. 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 llevará a cabo 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.



Modificado de Bioenergetics 3 Nichols and Fergusson. Figura 3. Analogía entre el circuito eléctrico y el circuito de protones mitocondrial. Al igual que en un alambre, en la mitocondria circulan cargas. La diferencia es que el $\Delta\Psi$ transmembranal hará circular los protones a través de la ATP sintasa para generar energía química en lugar de energía luminosa. Si se abre un camino de mayor conductancia, los protones circularán por el corto circuito acelerando el consumo de O_2 , sin embargo, la energía se disipará en calor, al igual que en el circuito eléctrico. La apertura del canal inespecífico mitocondrial o poro de transición de la permeabilidad mitocondrial, genera un corto circuito a nivel mitocondrial.

3.5. El Canal Inespecífico Mitocondrial o Poro de Transición de la Permeabilidad Mitocondrial.

En diversas especies se ha encontrado un canal inespecífico mitocondrial el cual permite el paso inespecífico de solutos, así como la despolarización del organelo y la muerte celular. Un ejemplo de esto es el canal inespecífico mitocondrial (o poro de transición de la permeabilidad mitocondrial) el cual se abre en miocardiocitos al ser sometidos a daño por isquemia-reperfusión [Baines CP, 2009; 2010] ocasionando la muerte celular. Aún al reestablecer el aporte de oxígeno en pacientes con diagnóstico de infarto agudo al miocardio, el daño por isquemia-reperfusión no permite una evolución favorable en estos pacientes.

En algunas especies el canal inespecífico mitocondrial es controlado por diferentes efectores como la concentración de ciertos solutos; por ejemplo K^+ o Na^+ en *D. Hansenii* [Gutierrez-Aguilar M, cols, 2007; Cabrera O A , cols, 2010].

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. Dicha estructura al abrirse funciona como un corto-circuito mitocondrial, desacoplando la cadena respiratoria.

Se dice que la cadena respiratoria mitocondrial se encuentra desacoplada cuando la energía del potencial redox no puede ser utilizada para la síntesis de ATP. Dicho proceso se puede ver en el control respiratorio, el cual se obtiene al dividir estado 3 de consumo de oxígeno mitocondrial entre el estado 4 de consumo de

oxígeno mitocondrial. El estado 3 de consumo de oxígeno se acelera en un ensayo experimental en condiciones óptimas, al agregar ADP.

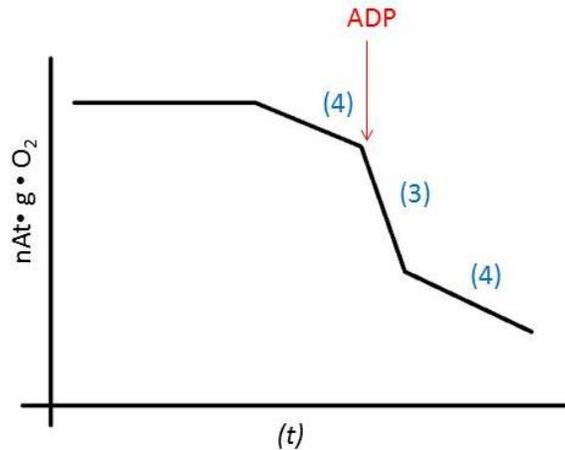


Figura 4. En la que se ejemplifican las pendientes de consumo de oxígeno en un ensayo con electrodo de Clark. Donde inicia la pendiente 4 se agrega la proteína o mitocondrias obtenidas para experimento. Se indica con flecha roja qué sucede cuando se agrega ADP. La pendiente de consumo de oxígeno se acelera 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).

Hecho esto ocurre un corto-circuito mediado por la ATP sintasa. A través de la membrana interna mitocondrial sólo existe un estado cerca al equilibrio termodinámico que no puede perpetuarse más allá de ciertos valores. Dicha diferencia es conocida como potencial transmembranal mitocondrial. El movimiento de menos de 1 nmol de un ion cargado por mg de proteína, es más que suficiente para crear una diferencia mayor a 200 mV. Dicho de esta manera, el circuito de protones, y la diferencia transmembranal nunca puede exceder los

1000 nmol de H^+ $min^{-1} mg$ proteína⁻¹-. De ahí que al agregar ADP al ensayo de consumo de oxígeno, para reestablecer el potencial transmembranal, la mitocondria acelera la cadena respiratoria y por 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, pues la relación entre la velocidad de consumo de oxígeno en estado 3 y 4 es cercana a 1. Dicho de esta manera podemos entender que el desacoplamiento puede darse por un corto circuito de protones en la membrana interna mitocondrial. Este corto circuito, forzosamente deberá tener mayor conductancia que la ATP sintasa.

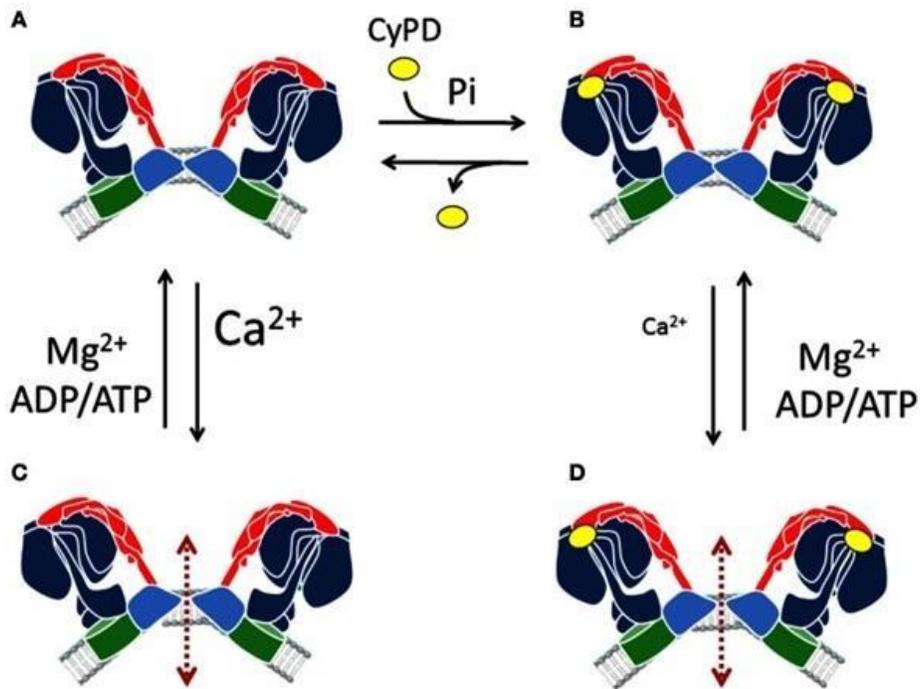


Figura 5. Modificada de Bernardi P, 2013. Modelo propuesto para la transición de la permeabilidad mitocondrial en mamíferos. Las flechas en rojo indican transición de la permeabilidad mitocondrial. Cuando el Calcio prevalece sobre la concentración del Magnesio, se favorece la transición de la permeabilidad mitocondrial. Al unirse CypD (ciclofilina D) proceso favorecido por la presencia Pi, incrementa la accesibilidad a los sitios de unión a metales, permitiendo la transición de la permeabilidad mitocondrial a concentraciones menores de Calcio.

El modelo de isquemia reperfusión nos permite dilucidar la fisiología de concentraciones crecientes de Calcio así como el punto máximo de no reversibilidad de cierre. Proponemos que el cierre del poro es posible, sin embargo para obtenerlo, debemos titular concentraciones de EDTA equimolares de calcio dependientes de tiempo de exposición a calcio.

3.6. El daño por Isquemia Reperfusión.

Al existir isquemia aguda en una oclusión coronaria el miocito corrige la acidosis láctica mediante el intercambiador Na^+/H^+ con posterior activación del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ de manera reversa e incrementar la concentración de Ca^{2+} . Ante un abrupto arranque de la cadena respiratoria mitocondrial con altos potenciales transmembranales y transición de la permeabilidad, ocurre un desacoplamiento que conlleva el daño por isquemia reperfusión a partir de generación de radicales libres así como señalización mitocondrial [Crompton M 1999, Halestrap y cols 2002]. La generación de radicales libres tiene que ver con el proceso de aceleración de la respiración celular. Al haber un canal de alta conductancia abierto en la mitocondria, el estado 4 de respiración se acelera. No habrá una estructura que frene el paso de electrones, nosotros hipotetizamos que esta estructura es capaz de disipar energía en calor mediante aperturas espontáneas sensibles a calcio. El calcio es el lenguaje evolutivo de la mitocondria miocárdica, de esta manera a altas concentraciones de calcio, se desacopla. No hay reportado en la literatura el cierre reversible en miocardio del poro de transición de la permeabilidad mitocondrial.

3.7. El modelo biológico.

Dada la dificultad para modelar enfermedades cardiovasculares en células humanas obtenidas directamente de biopsias de pacientes, usualmente se recurre a modelos animales que puedan de alguna manera reproducir los fenómenos ocurridos en humanos. Sin embargo, en muchos casos la extrapolación de resultados obtenidos de estos modelos animales no logra ajustarse a los mecanismos que ocurren en el paciente. De hecho, en algunas ocasiones los modelos animales han mostrado respuestas irreproducibles en humanos [Siller R y cols 2013] lo cual ha provocado que las medidas para validar los experimentos preclínicos publicados con el uso de animales sean cada vez más estrictos. Esto ha llevado a la necesidad de generar nuevos modelos in vitro que se apeguen a los fenómenos que suceden en el paciente y que permitan el rápido desarrollo de nuevas terapias que ayuden a prevenir el desarrollo de la patología.

Las células troncales pluripotentes son células capaces de auto-renovarse de manera indefinida y diferenciarse hacia todos los linajes celulares del organismo. Estas células pueden ser obtenidas de manera paciente específico gracias a la técnica de reprogramación celular desarrollada por los investigadores Shinya Yamanaka y Kasutoshi Takahashi [Dhillon P 2016, Takahashi K y cols 2006]. En el laboratorio del proponente se cuenta con líneas de células pluripotentes embrionarias y células pluripotentes inducidas (iPSC) para el desarrollo del presente proyecto. Estas células han sido caracterizadas por su potencial de diferenciación hacia linajes celulares de las 3 capas embrionarias. Debido a este potencial, ya desde hace algunos años en laboratorios del extranjero se están

aplicando estas células para el modelamiento de enfermedades y el análisis de fármacos. Enfermedades como el Alzheimer, la retinitis pigmentosa o enfermedades hepáticas están siendo modeladas con el uso de células troncales pluripotentes con el fin de descubrir fármacos que pudieran prevenir o corregir la enfermedad. En este sentido, la presente propuesta tiene como objetivo el modelar el daño por isquemia-reperfusión utilizando cardiomiocitos humanos como una alternativa a los modelos en animales. Dado que no se conoce con precisión los mecanismos por los cuales esta patología se origina a nivel molecular, la generación de cardiomiocitos humanos es una gran oportunidad para determinar posibles participantes o mediadores de la enfermedad en células humanas o incluso en células del mismo paciente.

3.8. Fisiología del Tecnecio 99 MIBI.

La manera de evaluar la actividad mitocondrial en células diferenciadas, es mediante tecnecio-99-mibi, incubado en miocitos diferenciados para valorar la actividad. A partir del centelleo se midió en gamacámara clínica del Centro Médico Nacional 20 de Noviembre, para marcar la isoterma de fijación. El tecnecio-99-MIBI es atraído por las cargas internas de la mitocondria al haber potenciales transmembranales, los potenciales transmembranales, por otra parte, se pierden al ocurrir la transición de la permeabilidad mitocondrial, evento clave en la injuria por isquemia reperfusión. Al titular diferentes concentraciones de calcio en microambiente celular, se simulara isquemia-reperfusión por isotermas de fijación. La recaptura de calcio se realiza con EDTA, un quelante de calcio. Proponemos la transición de la permeabilidad mitocondrial como un proceso dinámico y reversible

el cual mediremos con isotermas de calcio y valoraremos su reversibilidad y el punto de quiebre al cual la carga energética mitocondrial no permitirá el reacoplamiento mitocondrial.

Se pretende sentar las bases para el descubrimiento de blancos terapéuticos así como el diseño y la validación de posibles estrategias terapéuticas de una manera directa y eficiente. Ejemplo de medicamentos a utilizar son el Levosimendan, el cual aumenta la sensibilidad de Calcio por la Troponina C, disminuyendo su afinidad hacia la mitocondria y la ciclosporina, la cual ha mostrado en algunos estudios disminuir el daño por isquemia reperusión, sin embargo valoraremos su actividad directa a través de Tc 99 mibi [Baines CP y cols 2005] .

4. ANTECEDENTES

4.1. Experimentos previos.

Se muestran a continuación experimentos previos en los cuales se observa la reversibilidad de la transición de la permeabilidad mitocondrial mediada por el cociente de la carga energética en levadura (*Saccharomyces cerevisiae*). Esta serie de experimentos se realizó en el Instituto de fisiología celular en un modelo para la reversibilidad en mediciones de potencial transmembranal mitocondrial (por el mismo autor). Se observa que en esta especie, la concentración de ATP media la apertura del poro de transición de la permeabilidad mitocondrial. Sin embargo a concentraciones exactas observadas, se reestablece el potencial de manera fisiológica con un cierre mediado por la hidrólisis de ATP y la interacción de ADP y Pi con el Poro.

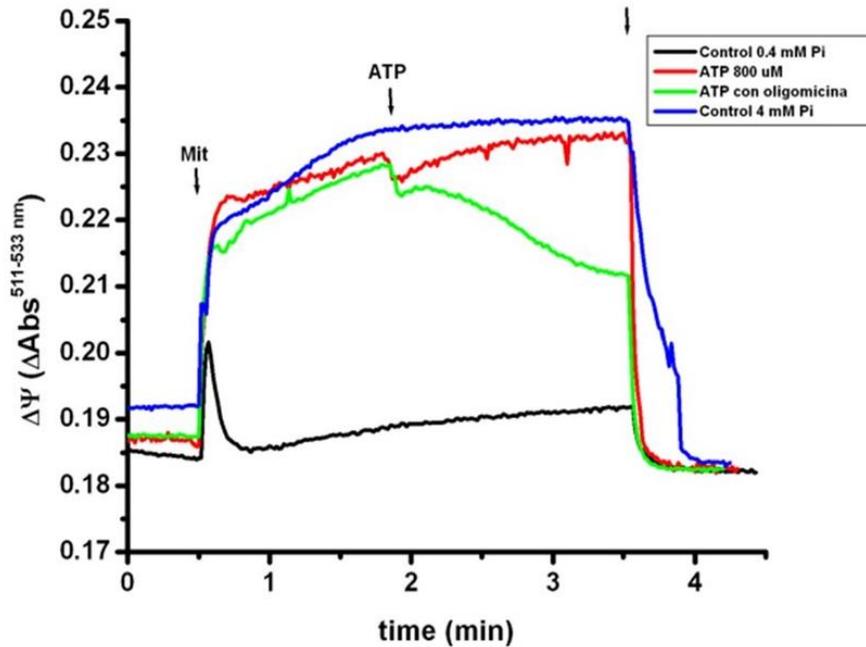


Figura 6. Ensayo de potencial transmembranal mitocondrial con Safranina en espectrofotómetro dual 511 y 533 nm. Se energizan las mitocondrias con etanol. Trazo azul: Control a 4 mM de Pi, se tira potencial con CCCP. Trazo negro: poro abierto a bajas concentraciones de Pi. Trazo rojo: Se agregan 800 μM de ATP, a esta concentración ocurre la transición de la permeabilidad mitocondrial; para reestablecer el potencial, la ATPasa gira en contrasentido, hidrolizando ATP en ADP y Pi, los cuales cierran el PTPm. Trazo verde: Al agregar la Oligomicina, se pierde el efecto de la ATPasa y no existe hidrólisis de ATP.

Tomando curvas de experimentación de la literatura para síntesis de ATP y basándonos en el método de distribución de afinidades de José MV y cols 1985, 2001, calculamos la distribución de afinidades de la ATPasa. Donde se ven cambios de afinidad en conformeros asumiendo 6 sitios de fijación. Se pueden observar distribuciones de afinidades que sugieren la reversibilidad de la síntesis de ATP.

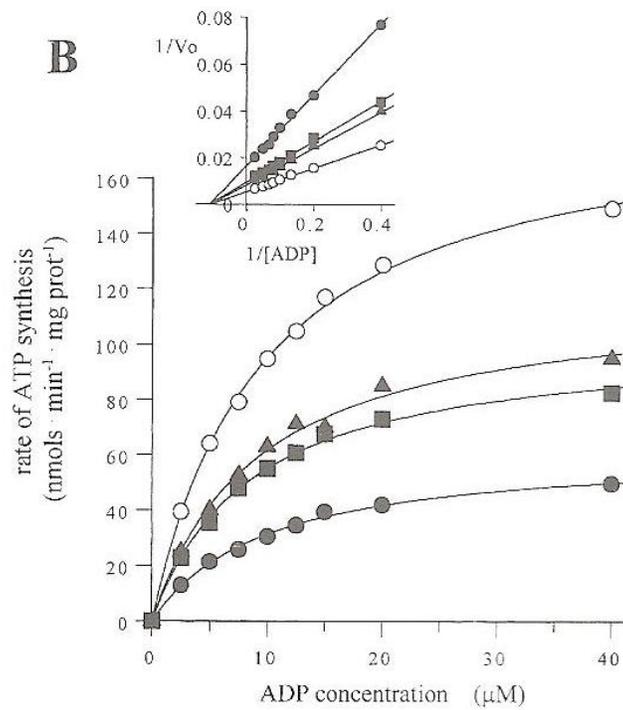


Figura 7. Tomado de Cortés P y cols (2000). Se observa síntesis de ATP a diferentes concentraciones de ADP. Se toma la gráfica con círculos vacíos el cual es el control a una concentración de fosfato de 1 mM. La síntesis de ATP fue medida por la reducción de NADP⁺ a 340-390 nm en espectrofotometro DW2000 en un ensayo de acoplamiento enzimático. El buffer contiene 0.6 M manitol, 5mM MES, albúmina sérica bovina al 0.1 % y pH de 6.8.

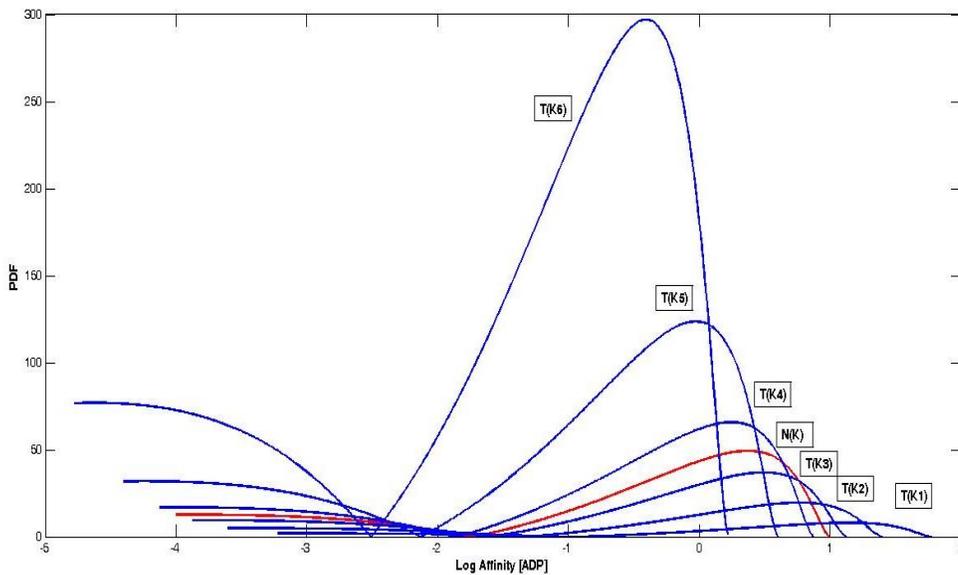


Figura 8. (Tomado de tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas del mismo autor, actualmente en revisión) Valores esperados del promedio de las distribuciones termodinámicas de afinidad por pasos de fijación [José MV, José JV, 1998]. Cálculos basados en isotermas de fijación para síntesis de ATP. Distribución de afinidades de dos ATP asas mitocondriales. En ellas coexisten estados de antena al recibir ADP y Pi, que en la síntesis muestran alta afinidad. Sin embargo al pasar de estado de antena a rotación, la distribución de afinidades del primer estado de síntesis de ATP disminuye con la coexistencia simultánea de múltiples estados, esto quiere decir que en los últimos pasos de síntesis, al haber alta carga energética disminuye la afinidad, de esta manera la rotación puede ser favorable en sentido contrario para contrarrestar la carga energética.

5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿La fisiología del Tecnecio-99-MIBI se ajusta a cinética enzimática clásica?

¿El calcio en el modelo de isquemia reperfusión disminuye la captación de tecnecio 99 MIBI?

¿La transición de la permeabilidad es un proceso reversible?

6. JUSTIFICACIÓN

El estudio de la transición de la permeabilidad mitocondrial intracelular no se realiza por la dificultad para la cinética mitocondrial, nosotros proponemos un modelo con Tc 99 MIBI para evaluar la fisiología celular.

La reversibilidad de la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial, sienta las bases para el estudio de nuevos blancos terapéuticos en el proceso de isquemia-reperfusión.

7. HIPOTESIS

La fisiología del tecnecio ^{99m}Tc MIBI en células mesenquimales estudiado en gammacámara respóndera a cinética enzimática clásica con K_m y V_{max} .

La transición de la permeabilidad mitocondrial dependiente de calcio es un proceso dinámico y reversible dependiente de la quelación del ión.

8. OBJETIVOS GENERALES

Demostrar que la transición de la permeabilidad mitocondrial es un proceso reversible al disminuir las concentraciones intracelulares de calcio.

Establecer un modelo para prueba de fármacos en el daño por isquemia reperusión.

9. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Valorar la fisiología mitocondrial dependiente de concentraciones cambiantes de calcio.

Establecer un equivalente de carga energética dependiente de calcio intracelular.

Establecer la carga energética en un modelo dependiente de calcio.

Establecer la reversibilidad de la transición de la permeabilidad mitocondrial.

Establecer un modelo para estudio de fármacos en isquemia reperfusión.

10. MATERIAL Y MÉTODOS

10.1. Diseño de Estudio.

Experimental prospectivo analítico.

10.2. Población de estudio y universo de trabajo.

El estudio es experimental en miocitos diferenciados, en este caso el ensayo se ajustó en emisión a mCuries/células.

Se utilizaron células mesenquimales para el estudio de fisiología por cuestiones de disponibilidad y falta de reactivo para diferenciación a células miocárdicas.

Se realizaron ensayos en mitocondrias obtenidas de corazones de ratas Wistar anestesiadas con éter energizadas con succinato. Sólo se utilizarán mitocondrias acopladas, definidas así como control respiratorio de 2 o más en electrodo de Clark. Las mitocondrias se medirán en citometría de flujo en 1000 eventos por concentración de calcio.

La N experimental necesaria para reportarse en literatura internacional es de 3 experimentos independientes para prueba de concepto.

10.3. Definición de grupos.

10.3.1. Células Mesenquimales.

Control:

Tecnesio 99 MIBI en tubos de ensayo lavando el tubo de ensayo en 3 centrifugaciones a 1200 g paralelo a las células. Esto permite descartar que la emisión de las células sea contaminación de Tc 99 MIBI adherido por capilaridad al tubo de ensayo.

Experimental:

Células mesenquimales, previamente establecidos los controles con titulación de calcio y EDTA.

10.3.2. Mitocondrias miocárdicas de rata Wistar.

Controles:

Mitocondrias energizadas con succinato 0.01 mM y máxima despolarización con CCCP.

Experimentales:

Concentraciones de calcio fisiológicas intracelulares 10 μ M, 30 μ M, 50 μ M y 50 μ M + EDTA equimolar después de 5 minutos de incubación.

Exclusión:

Mitocondrias con controles respiratorios menores a 2.

10.4. Ensayo de células mesenquimales.

A partir de células mesenquimales obtenidas del laboratorio de diferenciación celular, se incubaron a dosis crecientes de tecnecio 99 MIBI. Posteriormente se suspendieron en solución fisiológica 0.9% amortiguada a pH entre 7.35 y 7.45 con HCl y NaOH para no afectar la osmolaridad.

Una vez suspendidas las células, con dosis crecientes de tecnecio 99 MIBI, se procedió a centrifugar a 1000 g, con 3 lavados. Obtenidos los Pellets de células con tecnecio 99 MIBI, se midieron mCuries de emisión en pozo.

Es importante recalcar que todo el experimento a partir de la incubación con radiofármacos, se realizó en el servicio de medicina nuclear.

10.5. Obtención de mitocondrias de miocardio (rata Wistar).

Para 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, 1mM EDTA) durante 15 minutos a 0 grados centígrados con homogeneizador de vidrio Potter. Tras homogeneización se centrifugaron a 1000 G durante 5 minutos para obtener la fracción microsomal de la solución sobrenadante, posteriormente se centrifugaron 3 veces a 10 000 G durante 10 minutos para obtener la fracción cruda y después de cada una se resuspendieron con solución de sacarosa, en la última se utilizó solución de sacarosa (10 mM Tris (pH 7.4), 250 mM sacarosa, 20 μ M EDTA) aproximadamente 200uL para la resuspensión. Se utilizó el método de Biuret para determinar la concentración de proteína por mililitro promedio que se obtuvo de la solución con ensayo blanco a 520 nm [Lowry y cols 1951].

Tras la obtención de mitocondrias se realiza una medición de oximetría en electrodo de Clark estado 3 y estado 4. En caso de obtener cocientes respiratorios menores a 2, se desechan las mitocondrias.



Figura 9. Mitochondrias de corazón de rata Wistar. Observe el color rojo característico del citocromo C.

10.6. Medición de potencial transmembranal en citometría de flujo.

Antes de comenzar el experimento, se pusieron los viales de DiOC2 (3) y CCCP a temperatura ambiente. Se prepararon 7 ensayos, 4 con diferentes concentraciones de calcio y 3 controles (CCCP, DiOC2(3), energizado sin DiOC2(3)).

Para cada ensayo, se suspendió 0.25 mg/ml de proteína (mitocondrias), 7.5µl de DiOC2(3), 10µl de succinato, se filtró el volumen requerido de medio respiración (120mM KCl, 1mM KH₂PO₄, 10mM Tris (pH 7.4), 20µM EDTA) a través de una membrana con un tamaño de poro de 0,22 µm, se preparó lo suficiente para diluir el cultivo en 500 µl de la suspensión mitocondria en un tubo de citometría de flujo para cada experimento de tinción a realizar. Se prepararon dos tubos adicionales para un control despolarizado, un control sin tinción y un control con CCCP. Se incubaron las muestras a 37°C durante 30 minutos. Posteriormente se realizó el lavado de las mitocondrias por centrifugación a 10000 G por 10 minutos. Se resuspendió sacudiendo suavemente los tubos. Se retiró el sobrenadante y se añadieron 500 µL de medio respiración (120mM KCl, 1mM KH₂PO₄, 10mM Tris (pH 7.4), 20µM EDTA) por tubo.

Se usó un citometro de flujo CytoFLEX S con excitación a 488 nm utilizando filtros de emisión apropiados para el colorante Alexa Fluor® 488 (FL1, GC) y el colorante Texas Red® (FL3, RC) al cual se le realizaron los ajustes para detectar partículas relativamente pequeñas, como las mitocondrias. Para evitar la contaminación de los datos por ruido electrónico, se usó el siguiente procedimiento para el ajuste del instrumento:

Con la muestra de control no teñida se localizaron las poblaciones mitocondriales en los canales de dispersión hacia adelante y hacia los lados. Se adquirieron las señales con los amplificadores configurados en amplificación logarítmica. Se adecuó la dispersión lateral como parámetro para ajustar el gatillo de adquisición, estableciendo la amplificación de las señales de dispersión frontal y lateral para que las mitocondrias se encuentren en el medio del espacio de datos, se ajustó el nivel de disparo para minimizar el ruido electrónico que aparece en el monitor.

Después de ajustar el citómetro de flujo como se describió anteriormente, se aplicó la muestra de control despolarizado, usando dispersión frontal versus lateral y se ajustaron 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 se puede utilizar como un indicador independiente del tamaño del potencial de membrana. En citometría de flujo, esta medida se aplica mejor con un parámetro que proporciona estos datos de relación para cada evento, calculado de la siguiente manera:

$$\text{(RC media) - (GC media) + 1.5 (no. de canales por década)}$$

El no. de canales por década: en este caso es de 254

Este cálculo requiere que la fluorescencia roja y verde se recopile con amplificación logarítmica e incluye 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 únicamente en base a su tamaño y capacidad de tinción.

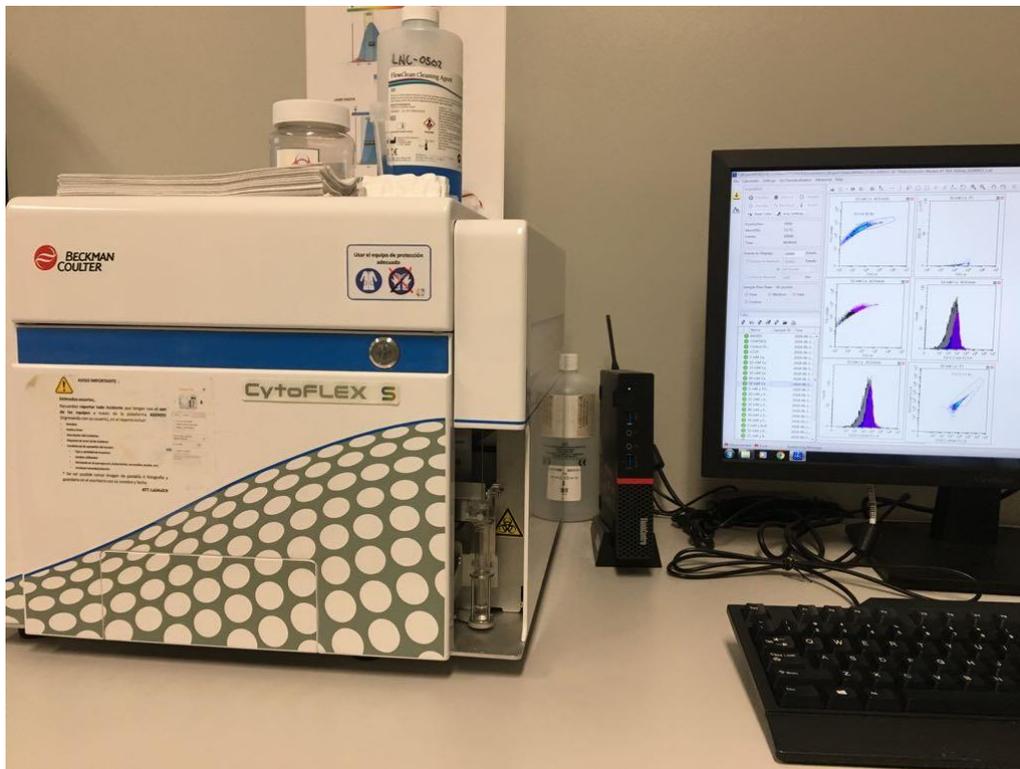


figura 10. Citometro de flujo CytoFLEX S.

10.7. Análisis estadístico:

Se analizaron los datos con el software estadístico STATA SE 12. Se corroboró la normalidad de las variables analizadas por medio de la prueba de ShapiroWilk. Se reportaron como media y desviación estándar por ser paramétricas.

Para el análisis de la diferencia de medias se utilizó la prueba T de Student, Para todos los análisis se utilizó un valor de $p < 0.05$ para considerar la significancia estadística.

11. IMPLICACIONES ÉTICAS

El estudio se ajustó a los lineamientos establecidos por la institución y la Secretaría de salud en materia de investigación clínica. Considerando que el estudio propuesto es experimental, no requiere consentimiento informado.

Las ratas fueron sacrificadas humanamente con éter inhalado.

12. BIOSEGURIDAD

El estudio se ajustará al reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación en Salud", Título segundo, Capítulo 1, Art. 17, referente a una "investigación sin riesgo" ya que se trata de un estudio experimental.

El presente estudio se apegó a los procedimientos del Manual de Seguridad Radiológica del Servicio de Medicina Nuclear vigente, aceptado por la Comisión de Seguridad Nuclear y Salvaguardas donde se establece que los desechos se clasificarán conforme a la Norma "NOM-004-NUCL-2013 Clasificación de los desechos radiactivos" y Reglamento General de Seguridad Radiológica, se depositaran en el almacén temporal del Servicio de Medicina Nuclear y tendrán como destino final el almacén de la empresa proveedora que actualmente proporciona este servicio.

13. RESULTADOS

13.1. Modelo de células mesenquimales.

Tras incubación a dosis de 0.160 μCu , 320 μCu , 640 μCu y 1 mCu por 1 200 000 células. En tres repeticiones con respectivos controles de solución salina para descartar contaminación de Tc 99 MIBI en tubos de ensaye de vidrio (no existió contaminación). En ningún caso, las células captaron el Tc-99-MIBI y se realizaron controles en microscopía para verificar la presencia de células tras la incubación de 10 minutos.

Cabe resaltar que en tubos de de poliestireno, el Tc-99-MIBI se pega por cargas al tubo, contaminándolo, siendo imposible realizar ensayos en este material.

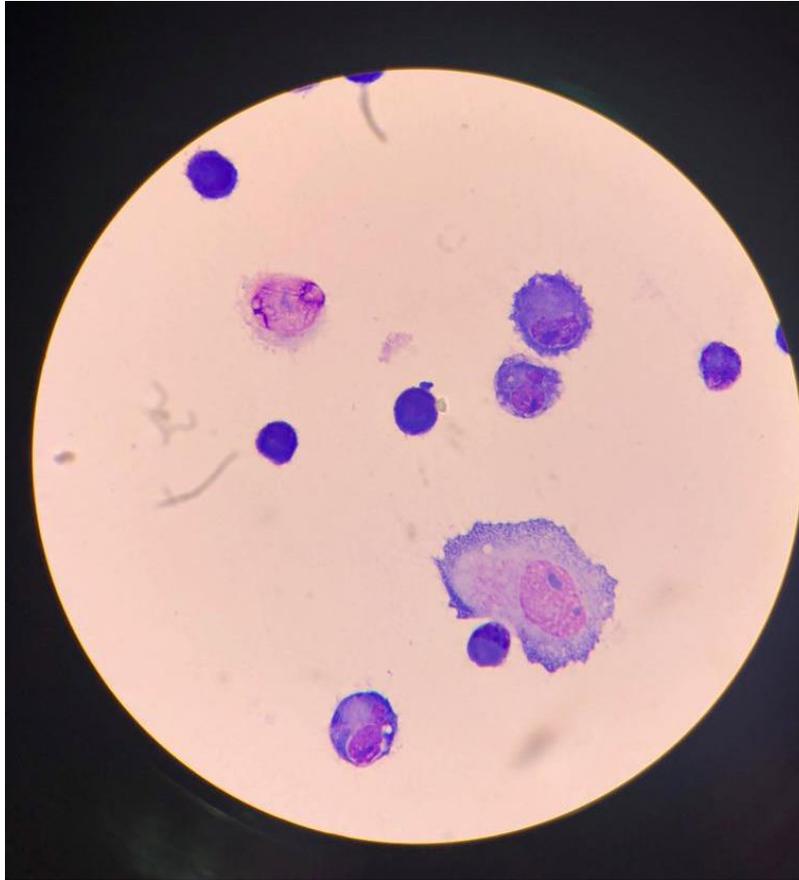
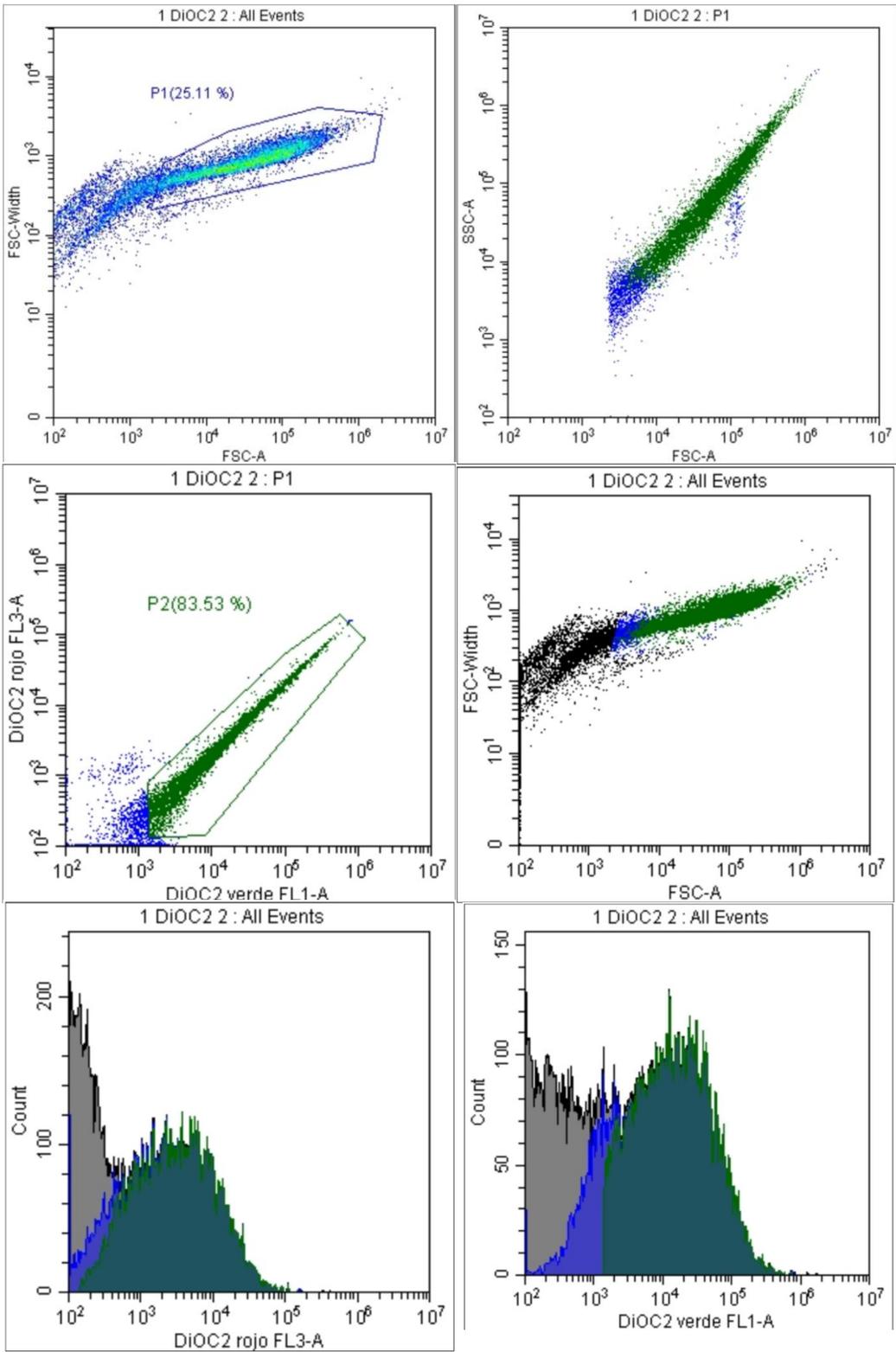


Figura 11 obtenida por técnica de gota gruesa como control en microscopia óptica. Se observan las células teñidas Giemsa a 100x y aceite de inmersión. Las células mesenquimales no captan el Tc-99-MIBI.

13.2. Mitocondrias de miocardio de ratas Wistar

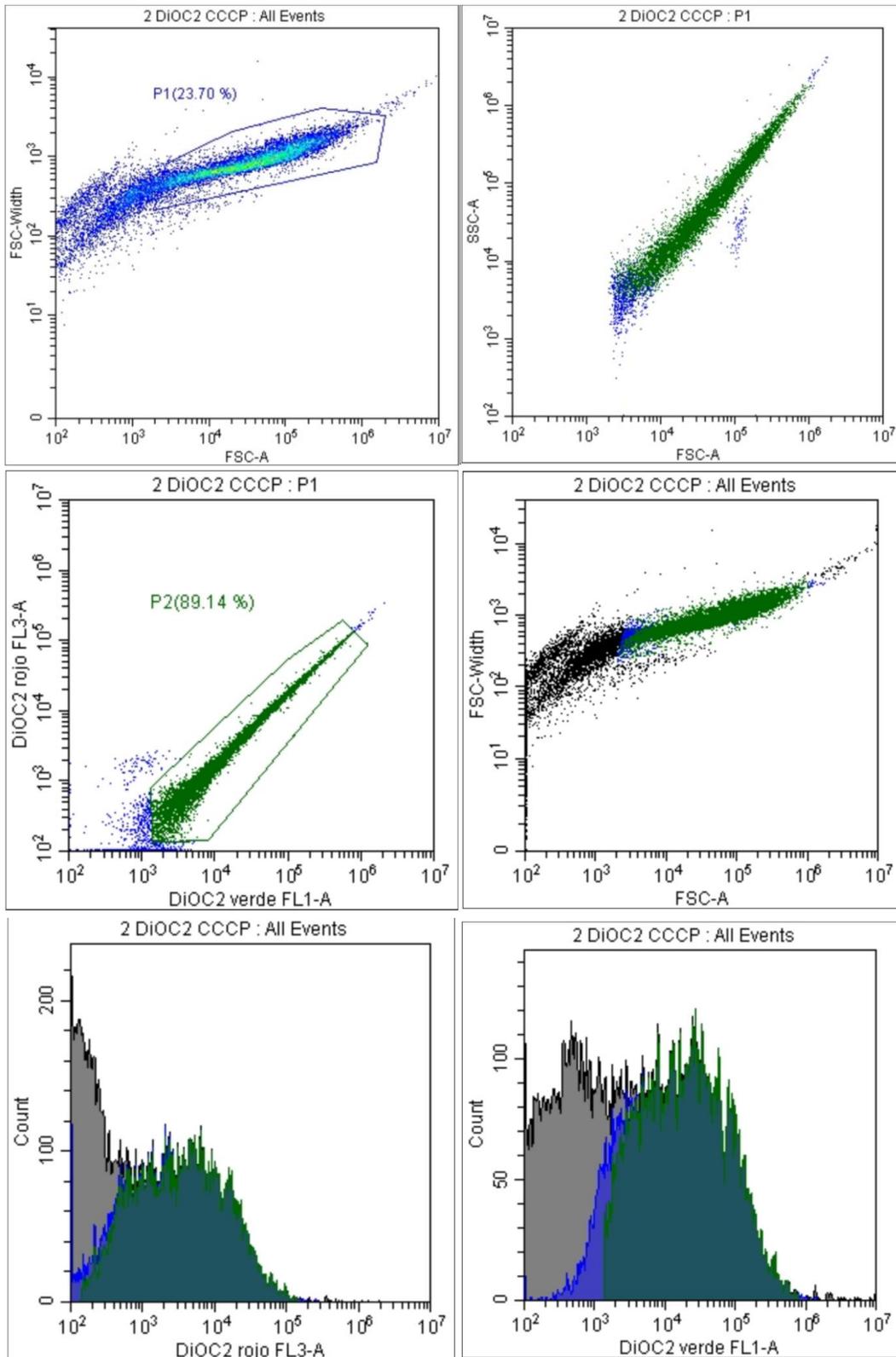
Se realizaron tres ensayos independientes para medición de potencial transmembranal mitocondrial. Se obtiene la curva de caída de potencial transmembranal a dosis crecientes de calcio. Posteriormente se agrega EDTA al ensayo de máxima despolarización, se observa reversibilidad lo que prueba el cierre del poro de transición de permeabilidad mitocondrial. A concentraciones de 50 μm se obtiene una despolarización aun mayor al control de CCCP por lo que se toma como 0 mV y máxima energización como 180 mV que es el estándar fisiológico.

Figura 12.



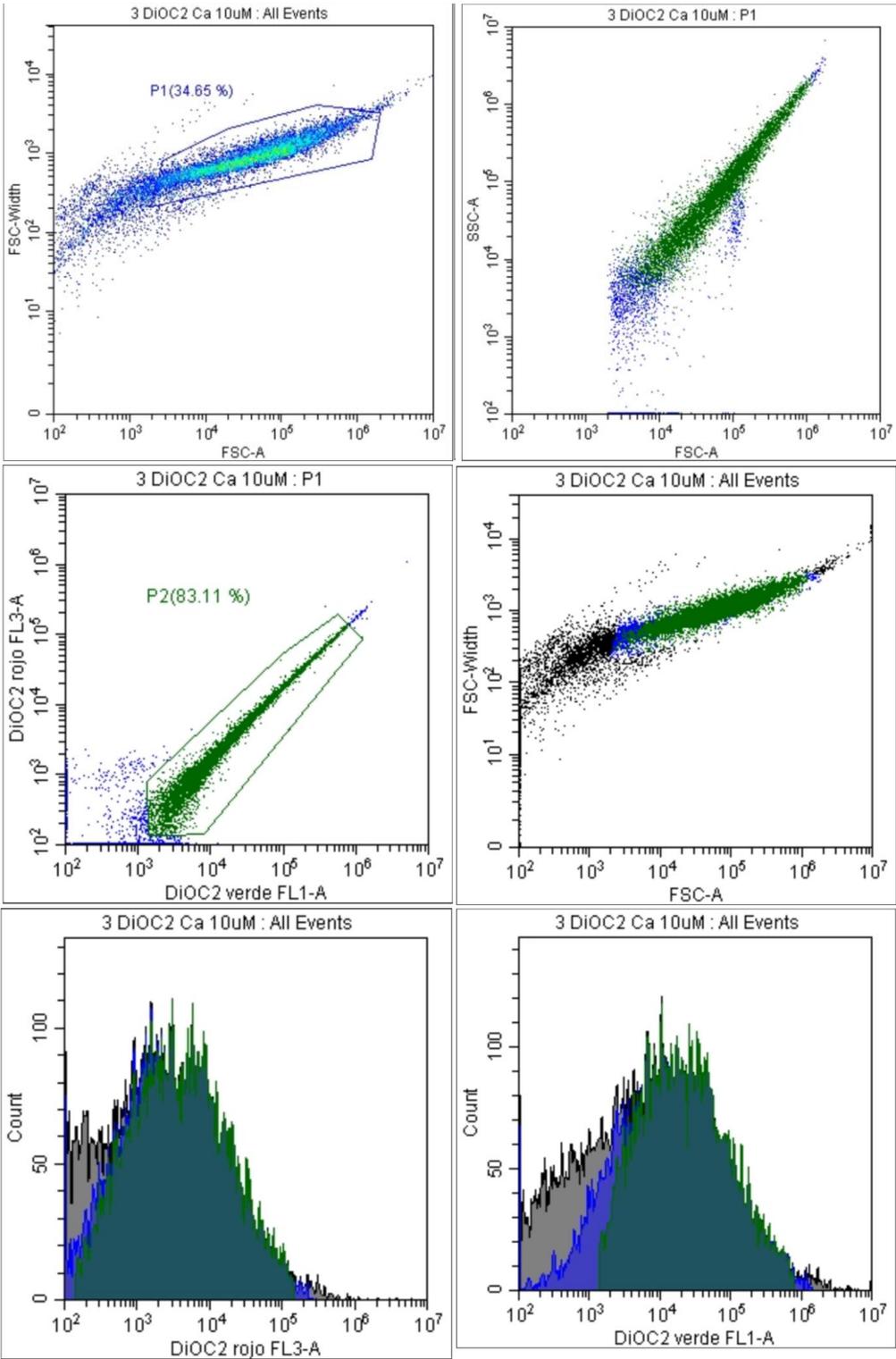
Citometría de flujo control energizado con DiOC2(3). Recuadro 1: Se observa la complejidad en el eje de las ordenadas la complejidad de las mitocondrias medida en anchura (FSC-Width) y en el eje de las abscisas la complejidad por capacidad de tinción (FSC-A). Recuadro 2: Se observa a la población 1 (P1) en un dot plot, complejidad versus tamaño. Recuadro 3: Representa la selección de la población 2 (P2) la cual será la población de estudio. Recuadro 4: Se observa una relación de complejidad tamaño y en color se distinguen P1 en azul, P2 en verde y todos los eventos de color negro. Recuadro 5: Se observa el histograma para las poblaciones que fluorescen en rojo (FL3). Recuadro 6: Representa el histograma para las poblaciones que fluorescen en verde (FL1).

Figura 13.



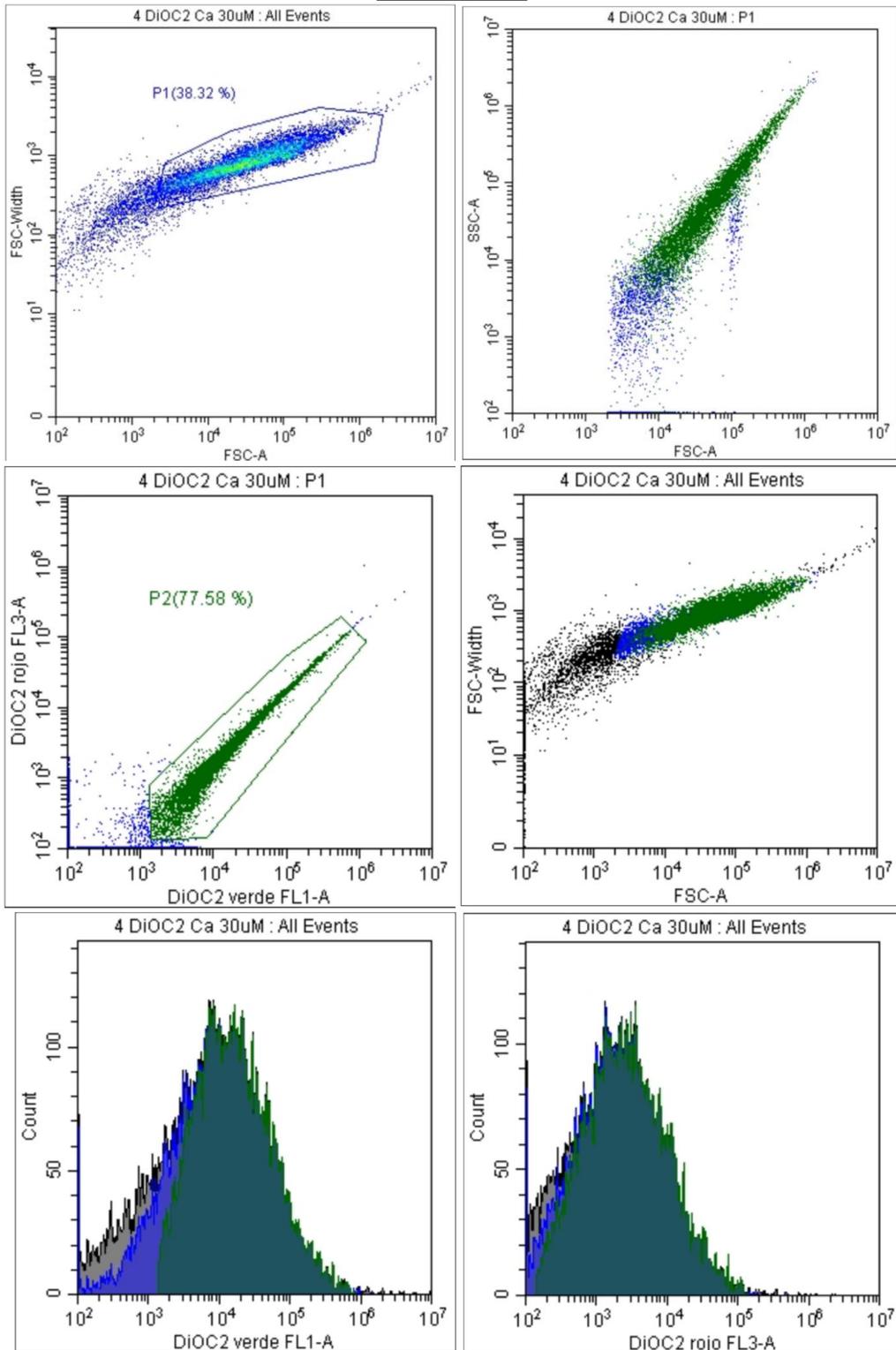
Citometría de flujo control negativo con CCCP. Recuadro 1: Se observa la complejidad en el eje de las ordenadas la complejidad de las mitocondrias medida en anchura (FSC-Width) y en el eje de las abscisas la complejidad por capacidad de tinción (FSC-A). Recuadro 2: Se observa a la población 1 (P1) en un dot plot, complejidad versus tamaño. Recuadro 3: Representa la selección de la población 2 (P2) la cual será la población de estudio. Recuadro 4: Se observa una relación de complejidad tamaño y en color se distinguen P1 en azul, P2 en verde y todos los eventos de color negro. Recuadro 5: Se observa el histograma para las poblaciones que fluorescen en rojo (FL3). Recuadro 6: Representa el histograma para las poblaciones que fluorescen en verde (FL1).

Figura 14.



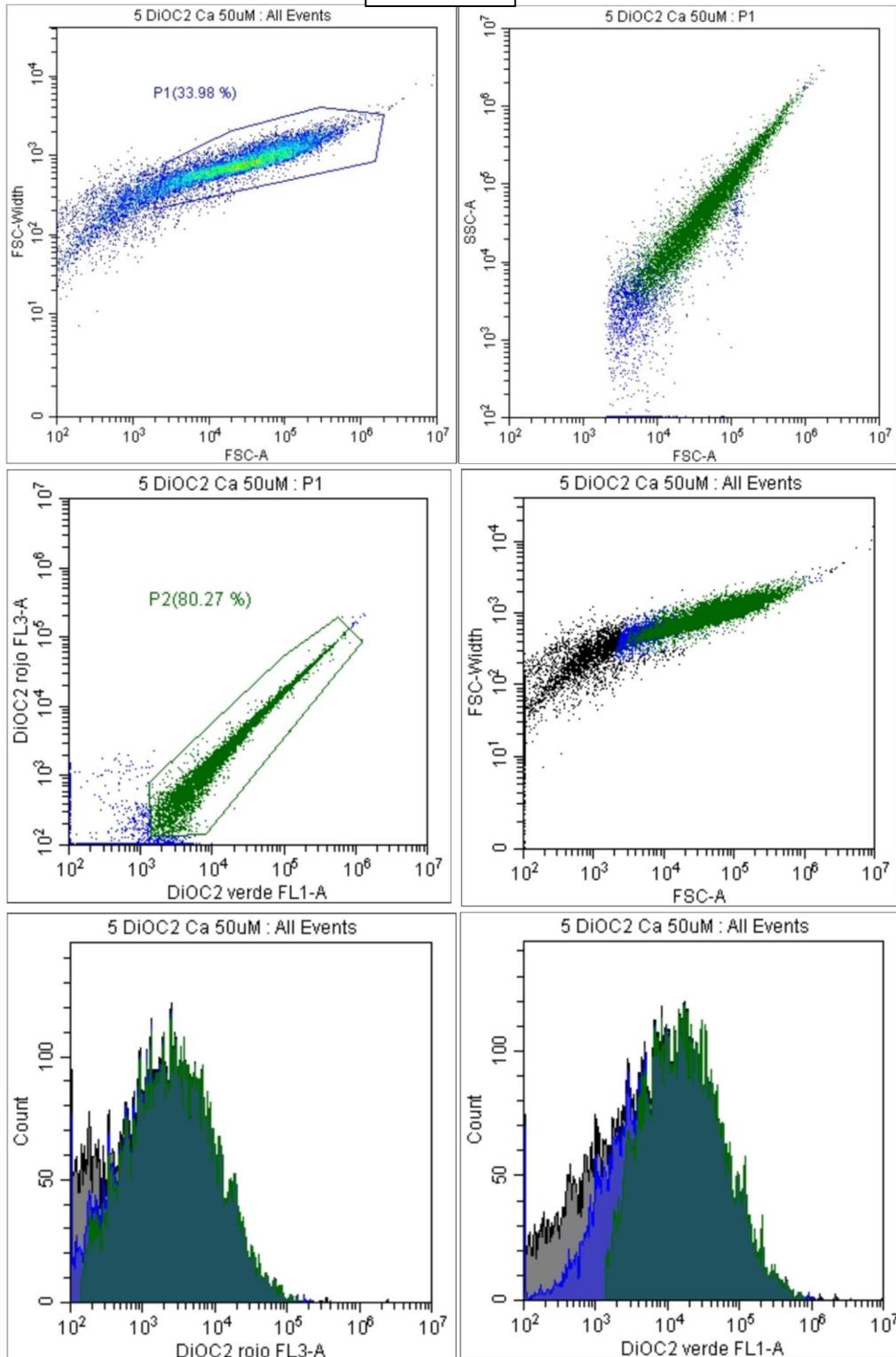
Citometría de flujo a concentración 10 μM de Ca²⁺. Recuadro 1: Se observa la complejidad en el eje de las ordenadas la complejidad de las mitocondrias medida en anchura (FSC-Width) y en el eje de las abscisas la complejidad por capacidad de tinción (FSC-A). Recuadro 2: Se observa a la población 1 (P1) en un dot plot, complejidad versus tamaño. Recuadro 3: Representa la selección de la población 2 (P2) la cual será la población de estudio, en el recuadro 4 se observa una relación de complejidad tamaño y en color se distinguen P1 en azul, P2 en verde y todos los eventos de color negro. Recuadro 5: Se observa el histograma para las poblaciones que fluorescen en rojo (FL3). Recuadro 6: Representa el histograma para las poblaciones que fluorescen en verde (FL1).

Figura 15.



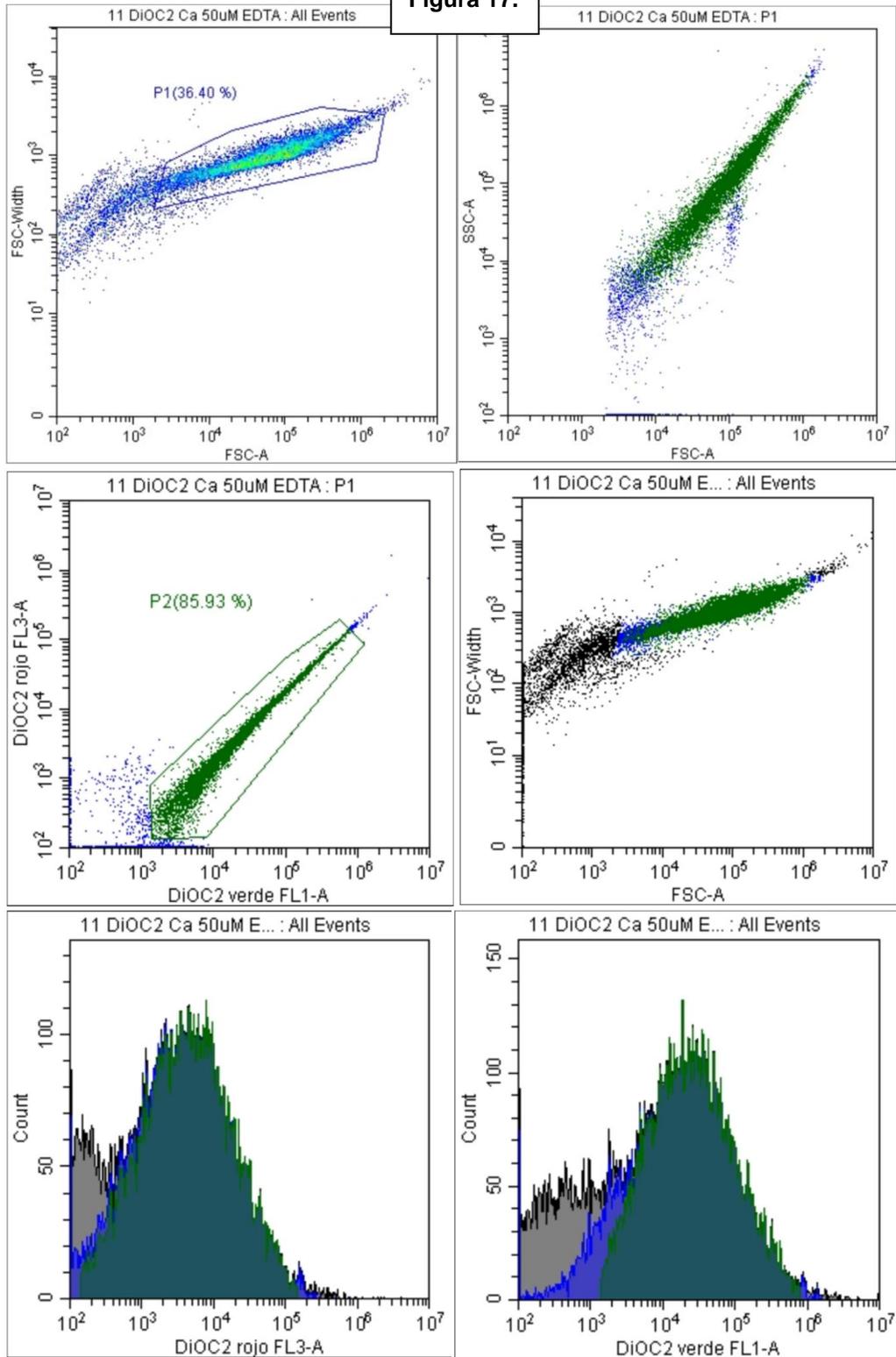
Citometría de flujo a concentración 30 μ M de Ca²⁺. Recuadro 1: Se observa la complejidad en el eje de las ordenadas la complejidad de las mitocondrias medida en anchura (FSC-Width) y en el eje de las abscisas la complejidad por capacidad de tinción (FSC-A). Recuadro 2: Se observa a la población 1 (P1) en un dot plot, complejidad versus tamaño. Recuadro 3: Representa la selección de la población 2 (P2) la cual será la población de estudio. Recuadro 4: Se observa una relación de complejidad tamaño y en color se distinguen P1 en azul, P2 en verde y todos los eventos de color negro. Recuadro 5: Se observa el histograma para las poblaciones que fluorescen en verde (FL1). Recuadro 6: Representa el histograma para las poblaciones que fluorescen en rojo (FL3).

Figura 16.



Citometría de flujo a concentración 50 μ M de Ca2. Recuadro 1: Se observa la complejidad en el eje de las ordenadas la complejidad de las mitocondrias medida en anchura (FSC-Width) y en el eje de las abscisas la complejidad por capacidad de tinción (FSC-A). Recuadro 2: Se observa a la población 1 (P1) en un dot plot, complejidad versus tamaño. Recuadro 3: Representa la selección de la población 2 (P2) la cual será la población de estudio. Recuadro 4: Se observa una relación de complejidad tamaño y en color se distinguen P1 en azul, P2 en verde y todos los eventos de color negro. Recuadro 5: Se observa el histograma para las poblaciones que fluorescen en rojo (FL3). Recuadro 6: Representa el histograma para las poblaciones que fluorescen en verde (FL1).

Figura 17.



Citometría de flujo a concentración 50μM de Ca²⁺ + 50μM EDTA. Recuadro 1: Se observa la complejidad en el eje de las ordenadas la complejidad de las mitocondrias medida en anchura (FSC-Width) y en el eje de las abscisas la complejidad por capacidad de tinción (FSC-A). Recuadro 2: Se observa a la población 1 (P1) en un dot plot, complejidad versus tamaño. Recuadro 3: Representa la selección de la población 2 (P2) la cual será la población de estudio. Recuadro 4: Se observa una relación de complejidad tamaño y en color se distinguen P1 en azul, P2 en verde y todos los eventos de color negro. Recuadro 5: Se observa el histograma para las poblaciones que fluorescen en rojo (FL3). Recuadro 6: Representa el histograma para las poblaciones que fluorescen en verde (FL1).

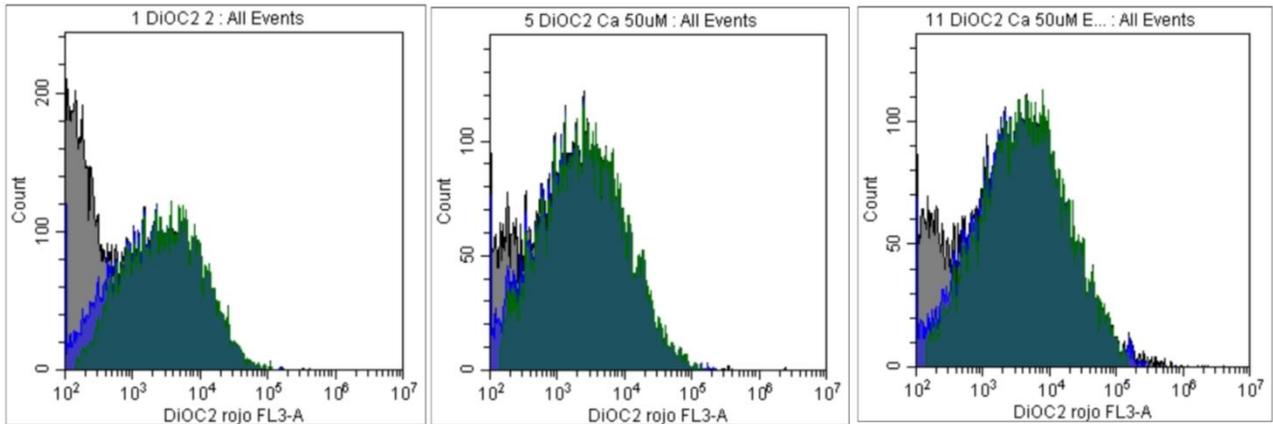


Figura 18. Se observan poblaciones de mitocondrias con emisión de espectro rojo. Estas mitocondrias se encuentran desacopladas, notese en el recuadro 1 energizadas, son pocas las despolarizadas (con transición de permeabilidad mitocondrial), el recuadro 2 muestra mitocondrias con concentración 50 μM de Calcio y el tercer recuadro con EDTA en donde el área bajo la curva es menor por la reversibilidad del proceso.

| $\mu\text{M Ca}$ | Verde | Rojo | $\Delta\Psi$ Media | mV |
|------------------|---------|---------|--------------------|-----|
| 0 | 302.295 | 63.643 | 142.348 | 180 |
| 10 | 586.422 | 308.596 | 103.174 | 136 |
| 30 | 368.183 | 64.932 | 77.749 | 108 |
| 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 |

Tabla 1: Resultados del experimento 1. Emisión en unidades arbitrarias de absorbancia rojas y verdes, cálculo de potencial transmembranal y conversión a mV.

| $\mu\text{M Ca}$ | Verde | Rojo | $\Delta\Psi$ Media | mV | Experimento 3 (mV) |
|------------------|----------|---------|--------------------|-----|--------------------|
| 0 | 787.605 | 119.544 | -287.061 | 180 | 180 |
| 10 | 1049.792 | 144.259 | -524.533 | 20 | 100 |
| 30 | 1031.074 | 143.684 | -506.390 | 32 | 90 |
| 50 | 1082.136 | 146.464 | -554.672 | 0 | 0 |
| CCCP | 1049.792 | 154.088 | -514.704 | 27 | 10 |
| 50 + EDTA | 957.7487 | 146.318 | -430.431 | 83 | 135 |

Tabla 2: Experimentos 2 y 3 (simplificado en mV).

| | Media(DE)[min-max] |
|----------------|---------------------------|
| 0 | 180 (0) [180] |
| 10 | 85.33(56.37)[20-136] |
| 30 | 76.66(39.71)[32-108] |
| 50 | 0(0)[0] |
| CCCP | 12.33(13.65)[0-27] |
| 50+EDTA | 119.66(31.89)[83-141] |

Tabla 3. Análisis descriptivo de la población de tres ensayos a concentraciones crecientes μm de calcio.

| | n | Media | p |
|----------------|----------|--------------|----------|
| 0 | 3 | 180 | 0.10 |
| 10 | 3 | 85.33 | |
| 0 | 3 | 180 | 0.04 |
| 30 | 3 | 76.66 | |
| 10 | 3 | 85.33 | 0.53 |
| 30 | 3 | 76.66 | |
| 30 | 3 | 76.66 | 0.07 |
| 50 | 3 | 0 | |
| 0 | 3 | 180 | 0.00 |
| 50 | 3 | 0 | |
| 50 | 3 | 0 | 0.02 |
| 50+EDTA | 3 | 119.66 | |

Tabla 4. Diferencias entre las poblaciones (T de student).

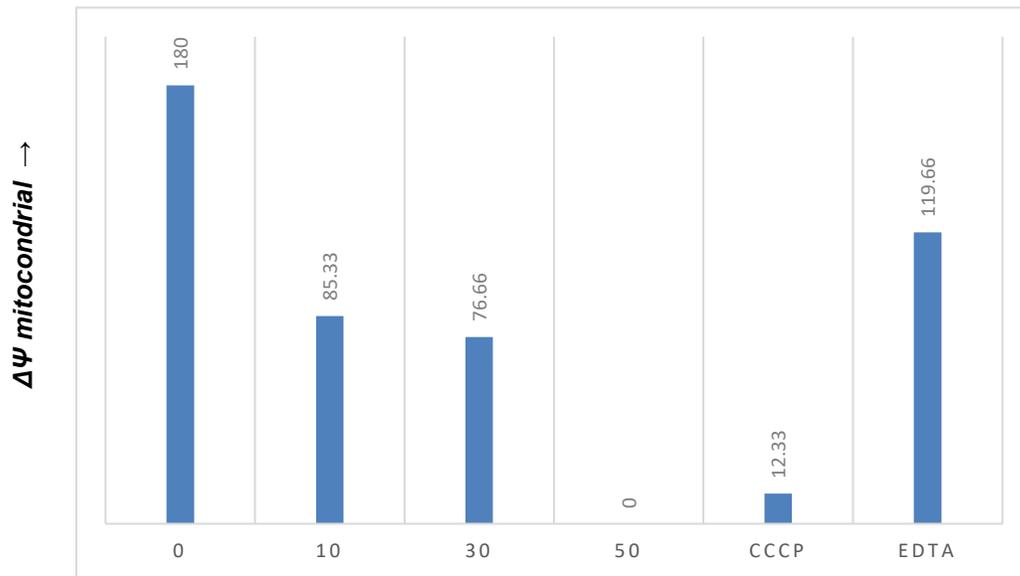


Tabla 5. Potencial transmembranal mitocondrial en medias de experimento triplicado y concentraciones crecientes de calcio. Obsérvese como ocurre la transición de la permeabilidad mitocondrial. Sin embargo, la reversibilidad con EDTA tras incubación es posible en un 66%.

14. DISCUSIÓN.

Podemos observar que las células mesenquimales no son un buen modelo para el estudio de la fisiología mitocondrial, pues al parecer utilizan otras vías metabólicas, tal vez de tipo Warburg. No sabemos si las mitocondrias sufren un proceso de hibernación mediada por el poro en esta etapa embrionaria. Se requieren experimentos ulteriores para conocer el metabolismo, sin embargo, podemos inferir que no es aerobio.

En cuanto al potencial transmembranal por citometría de flujo, es la primera vez que se realiza en mitocondrias de manera directa. El DioC 2-3 se utiliza para medición de potencial transmembranal como marcador de apoptosis en células y en bacterias para medir potencial transmembranal. En la presente tesis decidimos medir potencial transmembranal de manera directa, siempre tomando en cuenta la energización con succinato (complejo II mitocondrial) calibrando el citómetro para bacterias. Se realizó la curva de titulación de calcio, y se ajustó a mV (180 mV fisiológico). Encontramos que los cambios a 50 μ M de Calcio y la reversibilidad con EDTA son significativos. Esto demuestra que el PTPm puede ser cerrado con la quelación artificial de calcio.

A nivel celular, las concentraciones de calcio cambian en el orden de 10 a 50 μ M. dependiendo del ciclo cardíaco, sin embargo se sabe que a concentraciones crecientes de calcio, el efecto Bowditch hace que la recaptura de calcio sea menor, por lo tanto la contractilidad aumenta. Esto implica que puede funcionar como un desacoplante fisiológico. Es decir, el sensor energético para la síntesis

de ATP es el calcio intracelular. El calcio intracelular tiene una interacción directa con el canal aniónico dependiente de voltaje dentro del espacio transmembranal mitocondrial. Lo que podemos observar en este trabajo es la capacidad del poro de abrirse y cerrarse en segundo tiempo. Este proceso reversible como lo observamos, podría sentar las bases para medicamentos que mitigaran el daño por reperfusión como EDTA o Levosimendán.

Fisiología de la isquemia reperfusión en el postcondicionamiento: Es probable que el postcondicionamiento tras el infarto, permita que ráfagas de calcio tras la reperfusión, permitan al aparato del sarcolema equilibrar las concentraciones de calcio de compartimentos intracelulares (sarcoplásmica) antes de que el calcio sea atrapado por la mitocondria y ocurra la transición de permeabilidad mitocondrial. En una reperfusión abrupta, los canales mitocondriales muestran gran afinidad por el calcio, secuestrándolo de manera irreversible tras el cual ocurre hinchamiento mitocondrial y ruptura de membranas con liberación de sustancias como citocromo C y Smac/DIABLO que median la muerte celular. No se había descrito hasta este momento una teoría de cómo el postcondicionamiento funciona.

El PTPm también podría funcionar como una estructura que a altas cargas energéticas mitigaría altos potenciales transmembranales para evitar fuga de electrones ya sea reversa o a semiquinona para generación de radicales libres y con esto disminuir la velocidad de envejecimiento. Sin embargo, hacen falta estudios de bioenergética para poder determinar esto.

15. CONCLUSIONES.

El poro de transición de la permeabilidad mitocondrial media un desacoplamiento fisiológico y reversible en la que la carga energética depende de la concentración de calcio intracelular.

Es posible cerrar de manera artificial el PTPm con EDTA.

La máxima despolarización mitocondrial, se observa a concentraciones 50 μM de calcio, la reversibilidad mostró ser significativa ($p < 0.05$) en 66%.

El modelo de células mesenquimales no es adecuado para el estudio de la isquemia-reperfusión.

16. APÉNDICES.

16.1. BIBLIOGRAFÍA

1. Azzolin A., Von Stockum S., Basso E., Petronilli V., Forte MA., Bernardi P. The mitochondrial permeability transition from yeast to mammals. *FEBS Letters* 584 (2010) 2504-2509.
2. Baines Cristopher P., The mitochondrial permeability transition pore and ischemia-reperfusion injury. *Basic Res Cardiol* (2009) 104:181-188.
3. Baines Cristopher P., The Cardiac Mitochondrion: Nexus of Stress. *Annu. Rev. Physiol.* 2010. 72:61-80.
4. Bradshaw, P. C., Jung, D., and Pfeiffer, D. R. (2001). *J. Biol. Chem.* 276, 40502-40609.
5. Bernardi P., The mitochondrial permeability transition pore: A mystery solved? *Frontiers in Physiology*, May 2013, Vol 4, article 95.
6. Boyer P. D. (2002). A research journey with ATP synthase. *J BiolChem* 277(42): 3905-61.
7. Boylestad R., *Introducción al análisis de Circuitos.*, 20a edición., Pearson educación, México, 2004.
8. Bunoust O., Devlin A., Averet N., Camougrand N y Rigoulet M. (2005). Competition of electrons to enter the respiratory chain, a new regulatory mechanism of oxidative metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *J BiolChem* 280(5): 3407-13.

9. 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 Feb; 42(1):11-9.
10. Chavez E., Moreno Sánchez R., Zazueta C., Reyes Vivas H., Arteaga D. Intramitochondrial K^+ as activator of carboxyatractyloside-induced Ca^{2+} release. *Biochimica et Biophysica Acta* 1070 (1991) 461-466.
11. Cortés P., Castrejón V., Sampedro J.G., Uribe S. Interactions of arsenate, sulfate and phosphate with yeast mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta* 1456 (2000) 67-76.
12. Crompton M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J* 1999;341:233–249. 26.
13. Desmond E., Borchier Armanet C., Forterre P., Gribaldo S. On the last common ancestor and early evolution of eukaryotes: reconstructing the history of mitochondrial ribosomes. *Research in Microbiology*. Vol. 162, Issue 1. January 2011. Pages 53-70.
14. Dhillon P. Using the mouse to model human disease: increasing validity and reproducibility. *Dis Model Mech.* 2016 Feb 1; 9(2): 101–103.
15. Gutierrez-Aguilar M., Perez Vázquez V., Bunoust O., Manon S., Rigoulet S., Uribe S. In yeast, Ca^{2+} and octylguanidine interact with porin (VDAC) preventing the mitochondrial permeability transition, *Biochim. Biophys. Acta* 1767 (2007) 1245-1251.
16. Gutiérrez-Aguilar M, Pérez-Martínez X, Chávez E, Uribe-Carvajal S (2010) In *Saccharomyces cerevisiae*, the phosphate carrier is a component of the

- mitochondrial unselective channel. Archives of Biochemistry and Biophysics 494: 184-191.
17. Halestrap AP, McStay GP, Clarke SJ. The permeability transition pore complex: another view. Biochimie 2002;84:153–166.
 18. Hernández MM, José MV. Positive cooperativity induces multimodal site and thermodynamic affinity distributions in multivalent receptors. Anal. Biochem. 313: 226-233 (2003).
 19. Hunte, C., Protonmotive pathways and mechanisms in the cytochrome bc1 complex. FEBS Lett. 545:39, 2003.
 20. José MV (1985) Ligand binding systems at equilibrium: Specificity, heterogeneity, cross-reactivity and site-site Interactions. Anal. Biochem. 144: 494-503.
 21. José MV, José JV (1998) Probability distributions of thermodynamic affinities for heterogeneous receptor populations. J. Theor. Biol. 190: 85-92.
 22. José MV, José JV (2001) Thermodynamic distributions of heterogeneous receptor populations. In: Drug Receptor Thermodynamics: Introduction and Applications, Ed. Robert B. Raffa. John Wiley & Sons. Chapter 28 pp. 593-601.
 23. José MV, Larralde C (1982) Alternative Interpretation of Unusual Scatchard plots: Contributions of Interactions and Heterogeneity. Math. Biosciences 58: 159-170.
 24. Jung DW., Bradshaw PC., Pfeiffer DR. Properties of a cyclosporine-insensitive permeability transition pore in yeast mitochondria (1997). J. Biol. Chem. 272: 2104-12.

- 25.** Kolisek M, Zsurka G, Samaj J, Weghuber J, Schweyen RJ, Schweigel M (2003) Mrs2p is an essential component of the major electrophoretic Mg²⁺ influx system in mitochondria. *The EMBO Journal* Vol 22 No. 6 pp 1235-1244.
- 26.** Kragh-hansen U (1991) Octanoate binding to the indole- and benzodiazepine-binding region of human serum albumin. *Biochem. J.* 273: 641-644.
- 27.** Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) *J Biol Chem* 193:265-275.
- 28.** Sagan L (Margulis L.), On the origin of mitosing cells. 1967. *J NIH Res.* 1993 Mar;5(3):65-72.
- 29.** Margulis L., Symbiotic theory of the origin of eukaryotic organelles; criteria of proof. *Symp Soc Exp Biol.* 1975;(29):21-38.
- 30.** Mills FC, Johnson ML, Ackers GK (1976) Oxygenation-linked subunit interactions in human hemoglobin: experimental studies on the concentration dependence of oxygenation curves, *Biochemistry* 15: 5350–5362.
- 31.** MitoProbe™ DiOC2 (3) Assay Kit for Flow Cytometry (M34150).
- 32.** Nakagawa T, Shimizu S, Watanabe T, Yamaguchi, Otsu K, Yamagata H et al. Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death. *Nature* 2005;434: 652–657. 37.
- 33.** Nicholls D.G., Ferguson S.J., *Bioenergetics 3.*, 3rd edition., Academic Press., San Diego, California, 2001.
- 34.** Parra E., Cruz D., García G., Zazueta C., Correa F., García N y Chávez E., (2005) Myocardial protective effect of octylguanidine against the damage induced by ischemia reperfusion in rat heart. *Molecular and Cellular Biochemistry* 269: 19-26.

35. Perez-Vazquez., Saavedra-Molina A y Uribe S. In *Saccharomyces cerevisiae*, cations control the fate of energy derived from oxidative metabolism through the opening and closing of the yeast mitochondrial unselective channel. *J. Bioenerg. Biomembr.* 353 (2003) 231-241.
36. Prieto S., Bouillaud F., Ricquier D., Rial E. Activation by ATP of a proton conducting pathway in yeast mitochondria. *Eur. J. Biochem.* 208 (1992) 487-491.
37. Richter, O. M. H. and Ludwig B. Cytochrome c oxidase structure, function and physiology of a redox driven molecular machine. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 147: 47 2003.
38. Rocou X., Manon S. Guerin M. ATP opens an electrophoretic potassium transport pathway in respiring yeast mitochondria (1995) *FEBS Letters* 364: 161-164.
39. Rocou X., Manon S. Guerin M. Conditions allowing different status of ATP and GDP induced permeability in mitochondria from different strains of *S. cerevisiae*. *BiochimBiophysActa* 1324 (1) (1997) 120-32.
40. Siller R, Greenhough S, Park IH, Sullivan GJ. Modelling human disease with pluripotent stem cells. *Curr Gene Ther.* 2013 Apr;13(2):99-110.
41. Sodi Pallares D (1967) Analogía entre la bomba de sodio y el demonio de Maxwell. *Gaceta Médica de México.* Vol 98, No 1.
42. Staat P, Rioufol G, Piot C, Cottin Y, Cung TT, L'Huillier I et al. Postconditioning the human heart. *Circulation* 2005;112:2143–2148. 52.
43. Strebhardt K, Ullrich A (2008) Paul Ehrlich's magic bullet concept: 100 years of Progress. *Nature Rev.* 8: 473-480.

44. Syberg F., Suveyzdis Y., Kötting C., Gerwert K and Hoffman E. Time resolved Fourier Transform Infrared Spectroscopy of the Nucleotide-binding Domain from the ATP-binding Cassette transporter MsbA. *J Biol Chem* 2012; 287 (28):23923-23931.
45. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*. 2006. 126: 663-676.
46. Thibault H, Piot C, Staat P, Bontemps L, Sportouch C, Rioufol G et al. Long-term benefit of postconditioning. *Circulation* 2008;117:1037–1044.
47. Tummers B, DataThiefIII (2006) <<http://datathief.org/>>
48. Valdur Saks., *Molecular System Bioenergetics.*, Wiley-VCH., 2007.
49. Vesteg M., Krajcovic J. The Falsibility of the models for the origin of eukaryotes. *CurrentGenetics*. 2011. Volume 57, Number 6, 367-390.
50. Vorum H, Fisker K, Otagiri M, Pedersen AO, Kragh-Hansen U (1995) Calcium ion binding to clinically relevant modification of human serum albumin. *Clin. Chem*. 41(11): 1654-1661.
51. Yagi, T., and Matsuno Yagi A. The Proton translocating NADH Quinone oxidoreductase in the respiratory chain, the secret unlocked. *Bioch* 42:2266, 2003.

16.2. AGRADECIMIENTOS

Al Laboratorio Nacional de Citometría de Flujo CONACYT y a todo su equipo en especial a la Dra. Andrea Bedoya López.

Al Laboratorio de Biología Teórica del IIB en especial al Dr. Marco Antonio José Valenzuela.

Al Laboratorio de diferenciación celular del IIB y a todos su equipo, en especial al Dr. Ricardo Cevallos Guerra y al Dr. Karlen Gazarian.

Al Dr. Manuel Gutiérrez, experto en bioenergética.

Al Dr. Rodrigo Gopar Nieto con quien he sostenido reflexiones de fisiología.

A Ramón Méndez Franco por siempre brindar su apoyo de manera incondicional.