



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, EL INSTITUTO DE FISIOLÓGIA CELULAR Y EL INSTITUTO DE  
INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS  
BIOLOGÍA TEÓRICA

BIOFÍSICA DE LA UNIÓN DE LIGANDOS A RECEPTORES

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

P R E S E N T A:

M. C. HÉCTOR EMILIO MONTES ISUNZA

TUTOR O TUTORES PRINCIPALES

DR. MARCO ANTONIO JOSÉ VALENZUELA  
Instituto de Investigaciones Biomédicas

CIUDAD UNIVERSITARIA Cd.Mx. 2019



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 Marco quien literalmente me abrió las puertas cuando estaba en la calle.***

***A mi Padre, mi motor.***

***A mi Madre creadora de sueños.***

***A mi hermano y amigo Sebastián., artista y matemático., crítico de mi trabajo.***

***A Pepino, Duba, Gopar y Emilia.***

***† A Saloma donde quiera que estés, Maestro.***

***† Al Capitán Fijapelo quien realizó su último viaje antes de que concluyera esta tesis.***

***A mi Abuelo Salvador, sabiduría de Occidente, creador de personajes como “el médico”.***

***A Sara por darme sustento bajo el ala maternal de la Facultad.***

***Al Dr. Merino, amigo y maestro.***

***Corpora non agunt nisi ligata.***

**-Paul Ehrlich.-**

# ÍNDICE

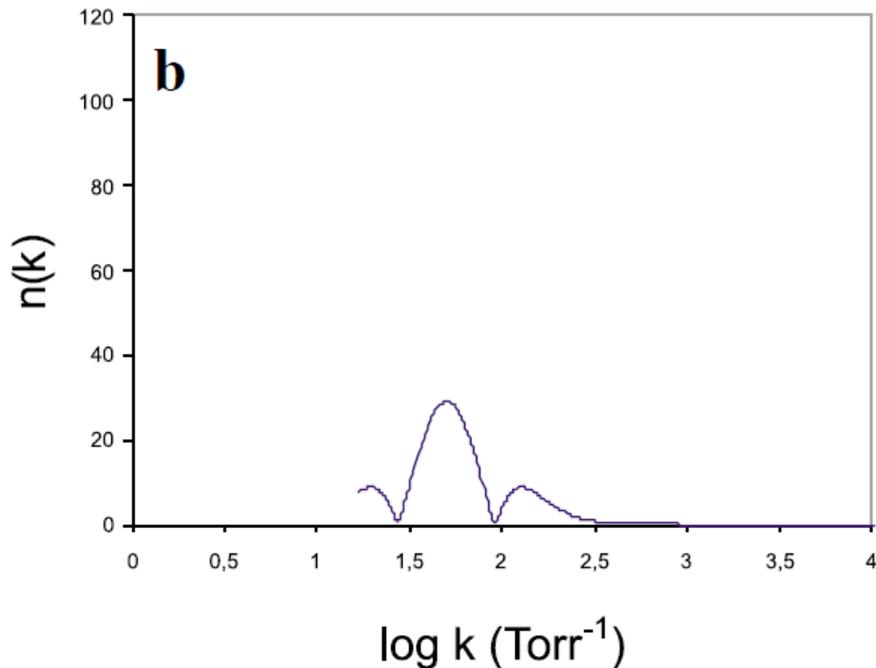
INTRODUCCIÓN.....	4
Unión de Ligandos a Receptores.....	4
La Mitocondria.....	6
La Fosforilación Oxidativa.....	7
Concepto de corto circuito eléctrico y sistemas desacoplantes mitocondriales.....	10
El Canal Inespecífico Mitocondrial o Poro de Transición de la Permeabilidad Mitocondrial.....	12
HIPÓTESIS.....	17
OBJETIVOS.....	18
MATERIAL Y MÉTODOS.....	19
Evaluación de la Transición de la Permeabilidad Mitocondrial a partir de la literatura.....	20
Efecto del Mg <sup>2+</sup> en la respiración mitocondrial.....	20
Efecto del ATP sobre la transición de la permeabilidad mitocondrial.....	22
RESULTADOS.....	27
Evaluación de la Transición de la Permeabilidad Mitocondrial a partir de la literatura.....	27
Efecto del Mg <sup>2+</sup> en la respiración mitocondrial.....	27
Efecto del ATP sobre la transición de la permeabilidad mitocondrial.....	30
Efecto de la síntesis de ATP dependiente de ADP.....	35
DISCUSIÓN.....	37
CONCLUSIONES.....	42
BIBLIOGRAFÍA.....	43

## **INTRODUCCIÓN**

### **Unión de Ligandos a Receptores**

La unión de ligandos a receptores es un fenómeno fundamental en todos los procesos biológicos. La unión de ligandos gaseosos a la hemoglobina, de un neurotransmisor a su receptor post-sináptico, de la reacción enzima-sustrato, de hormona-receptor, antígeno-anticuerpo, son sólo algunos ejemplos de este fenómeno. Los biólogos moleculares y bioquímicos han tratado de descifrar los códigos moleculares de la estructura-función, en los que un conjunto de reglas da como resultado las múltiples combinaciones de elementos estructurales simples en fenómenos complejos de la función biológica. La transducción de señales biológicas ocurre en todo proceso biológico y es un problema fundamental de la biofísica molecular y la bioquímica.

El estudio de los cambios conformacionales que sufre una macromolécula biológica durante la saturación de su ligando tiene una historia que inicia desde hace más de un siglo [Strebhardt K., Ullrich A., 2008]. El concepto de que a partir de la estructura cristalina de un receptor se pueden dilucidar todos los cambios conformacionales sigue aún vigente. Sin embargo, la predicción de interacciones positivas y negativas entre los sitios de fijación de una macromolécula multivalente fue propuesta hace varios años [José M.V., Larralde C., 1982]. A partir de estas distribuciones de afinidad, es posible determinar los cambios conformacionales que sufre un receptor durante su saturación por su ligando. Se ha demostrado que es posible dilucidar a partir de las isotermas de fijación (curvas dosis-respuestas) la distribución de afinidades de una población heterogénea de receptores con o sin interacciones entre sus sitios de fijación [José M.V., 1985; José M.V., José J.V., 1998; Hernández M.M., José M.V., 2003]. Así, por ejemplo, la hemoglobina presenta 3 estados conformacionales en su unión con O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>; el estado antena, el transportador y el liberador (Figura 1) [Hernández M.M., José M.V., 2003]. Este resultado es consistente con estudios experimentales [Mills F.C., cols, 1976].



**Figura 1. Distribución de afinidades de la Hb con CO, tomado de Hernández MM, José MV 2003. De izquierda a derecha: estado antena, transportador y liberador.**

Aunque este método es general para analizar la unión de ligandos a sistemas de receptores multivalentes con interacciones positivas y/o negativas o sin interacciones [José M.V., Larralde C., 1982; José M.V., 1985; José M.V., José J.V., 1998; Hernández M.M., José M.V., 2003; Mills F.C., cols, 1976; José M.V., José J.V., 2001], este método no se ha aplicado a moléculas que pueden mostrar diferentes cambios conformacionales dependiendo del ligando, ni a canales dependientes de ligando. El objetivo de la presente tesis, es aplicar el método señalado tanto a cambios conformacionales dependientes de ligando (ATP sintasa) y al canal conocido como poro de transición de la permeabilidad mitocondrial.

## 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 asociarse una eubacteria aeróbica capaz de utilizar al oxígeno en la obtención de energía química con el eucarionte primitivo, la célula huésped incrementó su eficiencia energética, mientras que la eubacteria a cambio recibió protección y sustratos [Vesteg M., cols, 2011]. Este evento evolutivo, el origen de Eukarya, puede situarse aproximadamente hace 1.5 mil millones de años, cuando 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 de simbiote-huésped.

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

Dentro de la célula, 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 transforma la energía del potencial redox a bombeo de protones y a su vez, el gradiente se utiliza para la síntesis de ATP. Este proceso es la principal fuente de energía para la mayor parte de los organismos eucariontes.

Hasta el momento nuevas funciones se le han atribuido a la mitocondria como la apoptosis y/o la necroptosis. 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.

## La Fosforilación Oxidativa

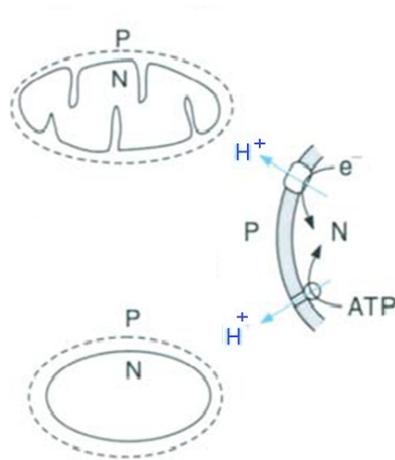
Se le conoce como fosforilación oxidativa al acoplamiento de reacciones químicas redox, en donde ocurre una transferencia de electrones siempre hacia moléculas con potenciales redox menores (más negativos). El último receptor de electrones es el oxígeno, el cual es reducido a H<sub>2</sub>O o radicales libres. 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 NADH-Ubiquinona-Oxidorreductasa o complejo I, presente en mamíferos, 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 donde convergen ambos sistemas. El ubiquinol, el cual es el receptor 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 H<sub>2</sub>O dentro de la cascada principal de reacciones siempre y cuando no exista oxidación reversa [Bunoust X., cols, 2005; Boyer P., 2002; Richter O., Ludwig B., 2003; Yagi T., cols, 2003].

Los complejos respiratorios I, III y IV son bombas de protones con una estequiometría de 4H<sup>+</sup>, 4H<sup>+</sup> y 2H<sup>+</sup>, respectivamente. Esto genera un gradiente de protones, el cual, de acuerdo a la teoría quimiosmótica [P. Mitchell 1971] (la diferencia entre potenciales electroquímicos de los iones de hidrógeno se debe a la energía liberada durante la actividad de una cadena de enzimas de óxido-reducción y es, asimismo, los sustratos de energía para la síntesis de ATP a partir de ADP y de fosfato inorgánico) acopla la fosforilación oxidativa en la cadena respiratoria. Al disiparse el gradiente de protones cuesta abajo 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 asa o complejo V, se encuentra embebida en la membrana interna mitocondrial y en la membrana celular de bacterias. La ATP asa contiene dos dominios: F1 es un complejo periférico mientras que F0 es una proteína de membrana que funciona como canal 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, al girar en sentido horario este complejo funciona como ATP-asa [Boyer P, 2002].



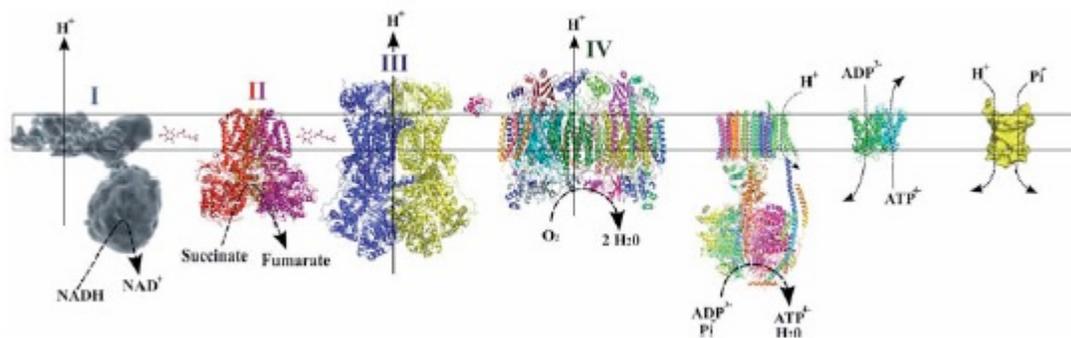
**Modificado de Bioenergetics 3 Nichols and Fergusson 2001.**

**Figura 2. 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 impulsado por el 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 éste 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, F. cols, 2012]. Se cree que la estequiometría 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.

La fisiología subcelular es diferente según el organismo que se trate o incluso el tejido. Sin embargo, el proceso de acoplamiento propuesto por la teoría quimiosmótica y la transición de la permeabilidad mitocondrial (de lo cual hablaremos más adelante) se ven en casi todos los organismos eucariontes [Azzolin L, cols, 2010]. La cadena respiratoria de *Saccharomyces cerevisiae*, por ejemplo, difiere de la cadena respiratoria de mamíferos pues no cuenta con complejo I. En su lugar cuenta con dos deshidrogenasas externas (Nde1p, Nde2p) y una deshidrogenasa interna (Nd1p) [Bunoust O., cols, 2005]. Probablemente *Saccharomyces* sea uno de los organismos más estudiados desde el punto de vista bioenergético debido a la facilidad para cultivar y extraer mitocondrias del mismo.



Tomado de Molecular Systems Bioenergetics: Energy for life. Valdur-Saks 2007.

Figura 3. Cadena respiratoria de mamíferos junto con el translocador de nucleótidos de adenina y el acarreador de fosfato.

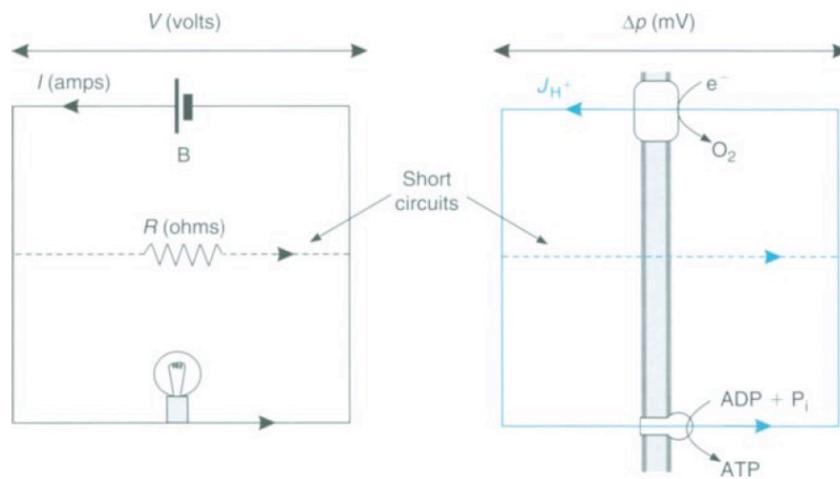
## **Concepto de corto circuito eléctrico y sistemas desacoplantes mitocondriales**

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 (2001) hicieron una analogía en la cual comparan el circuito de protones mitocondrial con un circuito eléctrico (Figura 4). 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 2001.

**Figura 4. 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.**

## **El Canal Inespecífico Mitocondrial o Poro de Transición de la Permeabilidad Mitocondrial**

En diversas especies se ha encontrado un poro de transición de permeabilidad o canal inespecífico mitocondrial el cual permite el paso de solutos de manera inespecífica, así como la despolarización del organelo y la muerte celular. Un ejemplo de esto, es el poro o canal inespecífico mitocondrial el cual se abre en miocardiocitos al ser sometidos a daño por isquemia-reperfusión [Baines C.P., 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 e incluso extiende el tamaño del infarto.

El estudio estructural y funcional nos puede ayudar a dilucidar la fisiopatología del daño por isquemia-reperfusión, el fenómeno conocido como lavado enzimático, las arritmias de reperfusión y la extensión de un infarto agudo al miocardio.

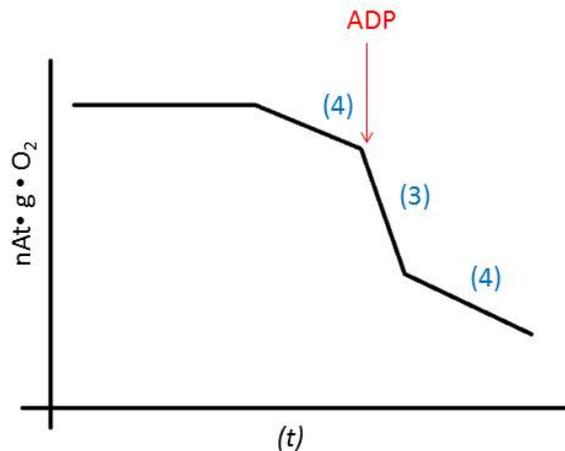
En algunas especies el poro de transición de permeabilidad mitocondrial es controlado por diferentes efectores como la concentración de ciertos solutos; por ejemplo  $K^+$  o  $Na^+$  en *D. Hansenii* [Gutierrez-Aguilar M., cols, 2007; Cabrera O.A., cols, 2010].

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 de manera eficiente en la síntesis de ATP. Dicho proceso se puede ver en el control respiratorio, el cual se obtiene al dividir la pendiente del estado 3 de consumo de oxígeno mitocondrial entre la pendiente del estado 4 de consumo de oxígeno mitocondrial (figura 5). El estado 3 de consumo de oxígeno se acelera en un ensayo experimental en condiciones óptimas, al agregar ADP, favoreciendo la caída de gradiente de protones. 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.

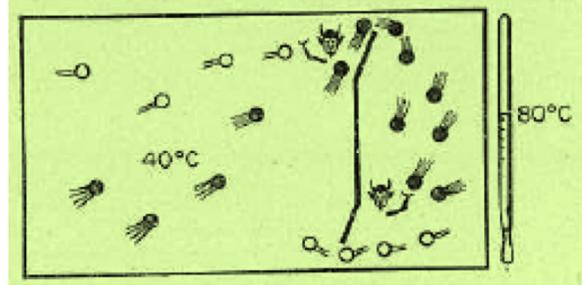
El cociente respiratorio en el manejo del paciente en estado crítico es una aproximación al proceso intracelular, calculado de manera gruesa en el paciente. Se calcula al medir el anhídrido carbónico producido entre el consumo de oxígeno. Un cociente respiratorio menor de 0.8 incluso indica un estado catabólico o consumo de proteínas marcador de gravedad en terapia intensiva. En dichos pacientes se puede observar una tasa de extracción de O<sub>2</sub> elevada pero mediada por desacoplamiento de fosforilación oxidativa. La eficiencia del sistema está disminuida. El desenlace de pacientes sépticos con choque (por ejemplo) con tasa de extracción elevada, es muchas veces fatal.



**Figura 5. 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).**

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 dentro de la mitocondria. Es decir, que el circuito de protones, y la diferencia transmembranal nunca puede exceder los 1000 nmol de  $H^+$   $min^{-1}$  mg proteína<sup>-1</sup>. De ahí que al agregar ADP al ensayo de consumo de oxígeno, para reestablecer el potencial transmembranal, la mitocondria acelera la cadena respiratoria de manera transitoria 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. Por lo tanto, 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 para que se prefiera el camino de protones al de la ATPasa. La existencia de cortos circuitos irreversibles dentro de la mitocondria, invariablemente desequilibrará al sistema, o mejor dicho, alcanzará el equilibrio termodinámico del sistema mitocondrial sin embargo se teoriza del verdadero rol fisiológico de este desacoplamiento. El modelo cibernético celular de Sodi Pallares (1967) es aplicable, al modelo mitocondrial en la que el demonio de Maxwell mitocondrial es la cadena respiratoria y la compuerta (como concepto equívoco de acuerdo a Sodi Pallares) corresponde al canal inespecífico mitocondrial (Figura 6). Sin embargo, en el modelo de Bernardi (2014), en el que el poro es la misma ATP-asa, el modelo antes mencionado se acerca más a la realidad.



**Figura 6. Modificada de Sodi Pallares D. (1967). El demonio de Maxwell teórico. Una compuerta selectiva para moléculas de gases a diferentes velocidades sin uso de energía. Visto desde el punto de vista entrópico violaría las leyes de la termodinámica.**

Las mitocondrias de *S. cerevisiae* presentan un canal inespecífico que al abrirse permite el transporte de solutos y metabolitos de manera inespecífica, originando con esto la despolarización del organelo [Jung D.W., cols, 1997; Prieto S., cols, 1992]. Este es sensible a moduladores como ATP, ADP y carboxilatractilósido, sugiriendo en algunas teorías que *el translocador de nucleótidos de adenina (ANT)* es uno de los componentes de este canal en la membrana interna mitocondrial. Por otra parte el  $s_c$ MUC (canal inespecífico mitocondrial de *Saccharomyces cerevisiae*) 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 [Roucouy X., cols, 1995; 1997; Gutierrez-Aguilar M., cols, 2007; Perez Vázquez., cols, 2003]. Esta evidencia, sugeriría que los componentes del  $s_c$ MUC son el VDAC, el ANT y el  $P_iC$ . Sin embargo, nuevos estudios sugieren que el poro de transición de la permeabilidad mitocondrial, está formado por dímeros de ATP-asa mitocondrial. Dichos dímeros pueden ser estabilizados por ciclofilina en mamíferos [Bernardi P., 2013]. Nosotros tomamos este modelo propuesto por Bernardi (Figura 7) como apoyo a los resultados obtenidos en el presente trabajo.

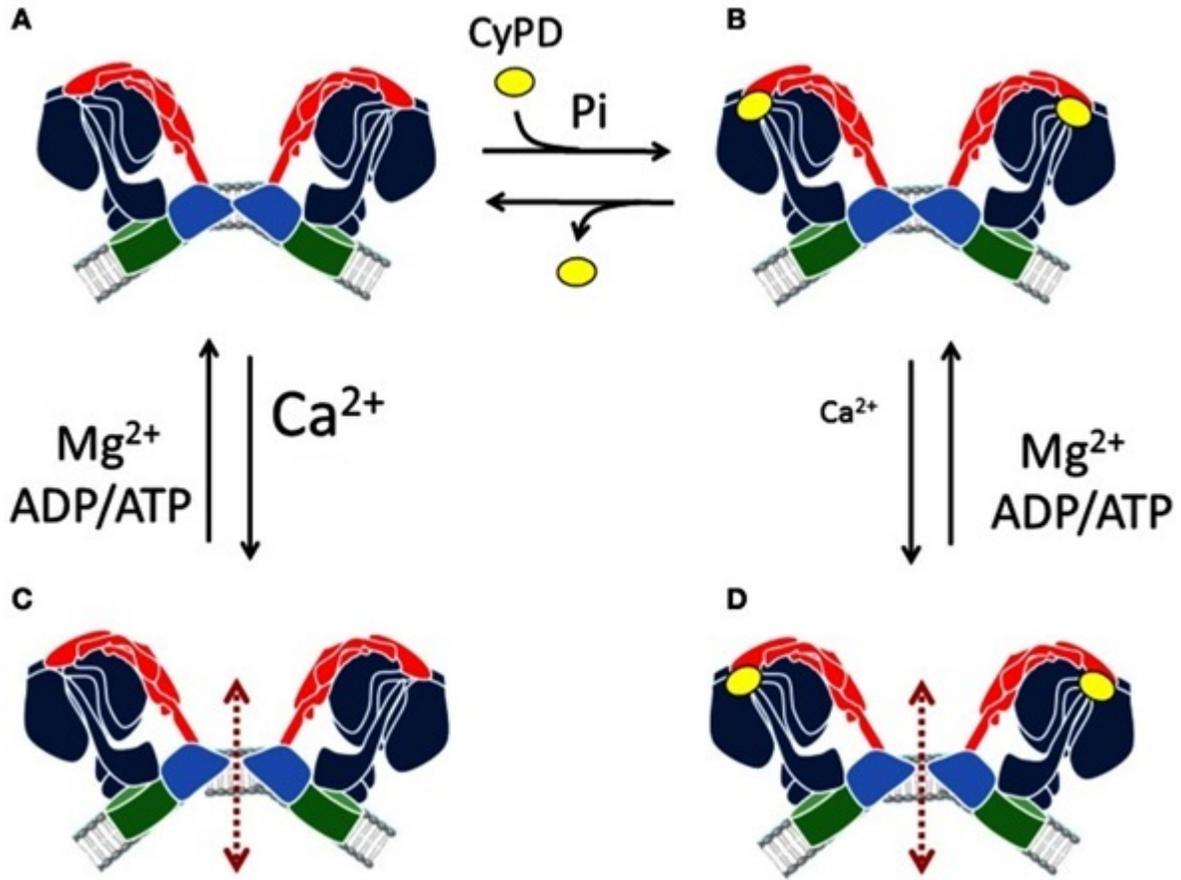


Figura 7. Modificada de Bernardi P, 2013. Modelo propuesto para la transición de la permeabilidad mitocondrial en mamíferos. Las flechas en rojo indican transición de la permeabilidad mitocondrial. Cuando el calcio prevalece sobre la concentración del magnesio, se favorece la transición de la permeabilidad mitocondrial. Al unirse CypD (ciclofilina D) proceso favorecido por la presencia  $\text{Pi}$ , incrementa la accesibilidad a los sitios de unión a metales, permitiendo la transición de la permeabilidad mitocondrial a concentraciones menores de calcio.

## **HIPÓTESIS**

El método de obtención de distribución de afinidades a partir de isotermas de fijación, nos permitirá estudiar los distintos estados conformacionales de canales.

En particular, el método de obtención de distribución de afinidades, podrá revelarnos el si hay cambios conformacionales de la ATP-asa mitocondrial y su o sus ligandos y en el poro de transición de la permeabilidad mitocondrial PTPm.

Como hipótesis nula, planteo que en caso de que no haya interacciones positivas o negativas entre los sitios de unión de la ATP-asa y su(s) ligandos, entonces se espera observar una distribución de afinidades gaussiana bajo el logaritmo de la afinidad [Hernández MM, José MV, 2003].

La apertura del poro de transición de la permeabilidad mitocondrial media un desacoplamiento fisiológico dinámico y reversible.

## **OBJETIVOS**

El objetivo de este proyecto es determinar los distintos tipos de cambios conformacionales que pueden presentar las macromoléculas en su unión con distintos ligandos.

Este método se utilizará para determinar los cambios conformacionales de canales, específicamente el poro de transición de la permeabilidad mitocondrial PTPm\* y la ATP-asa mitocondrial asociada en dímeros.

\*También conocido como canal inespecífico mitocondrial o MUC.

## MATERIAL Y MÉTODOS

En particular se aplica este método a la unión del ligandos a PTPm y ATP-sintasa mitocondrial 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:  $r = \nu \int_0^{\infty} \frac{N(k)kF}{1+kF} dk$ , donde  $r$  es la fracción de ligando unido al receptor y  $F$  es la concentración de ligando libre, nos da la distribución de afinidades [José M.V., José J.V., 1998]:

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

Se ha demostrado [José M.V., José J.V., 1998; José M.V., José J.V., 2001] que en el caso de un sistema heterogéneo con receptores multivalentes (con  $\nu$  sitios de unión), la distribución de afinidades de sitio de fijación  $N(k)$  resulta ser el valor esperado del promedio de las distribuciones termodinámicas de afinidad  $T(K_i)$  por pasos de fijación [José M.V., José J.V., 1998]:

$$N(k) = \frac{1}{\nu} \sum_{i=1}^{\nu} diT(K_i).$$

Se tomaron datos experimentales de las isotermas de fijación de estas macromoléculas usando el software público Datathief [Tummers B., 2006]. Se ajustó una curva logística que captura interacciones positivas y/o negativas y con esa curva se hizo un remuestreo de los datos para construir las distribuciones de afinidad tal y como se hizo en la referencia [Hernández M.M., José M.V., 2003].

### Evaluación de la Transición de la Permeabilidad Mitocondrial a partir de la literatura.

Se tomaron como base resultados reportados en la literatura de isothermas de fijación para el estudio de la transición de la permeabilidad mitocondrial siempre en función de respuesta efectora en consumo de oxígeno o acoplamiento respiratorio.

### Efecto del $Mg^{2+}$ en la respiración mitocondrial.

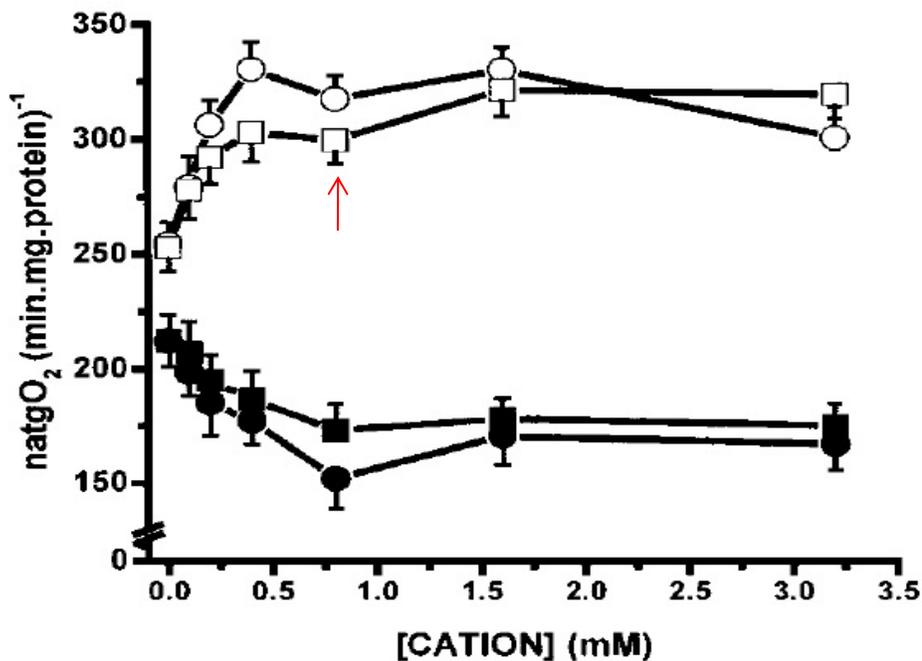


Figura 8. Tomada de Perez-Vazquez y cols., 2003.

La gráfica señalada corresponde al estado 3 de respiración mitocondrial en *Saccharomyces cerevisiae* a concentraciones crecientes de magnesio. La gráfica con cuadrado relleno corresponde al estado 4 mitocondrial a concentraciones crecientes de magnesio. Note como a incrementos en la concentración de magnesio, el consumo de  $O_2$  se acelera en estado 3 y ocurre lo contrario en estado 4. Medio de respiración: 0.6 M manitol, 5 mM MES, pH 6.8, 1ul/ml etanol, 20 mM KCl, y 0.4 mM  $PO_4$ . En estado 3 se agrega 150 uM de ADP.

Se tomó la curva señalada en la Figura 8 con ajuste computacional en Lenvenberg-Marquadt para análisis de isoterma por distribución de afinidades. Se decidió tomar estado 3 que al incrementar la concentración de magnesio en la solución de ensayo reportado en la literatura, nota un incremento en el consumo de oxígeno, es decir, un cierre de canal de alta conductancia, preservando la fuga de protones por la ATPasa mitocondrial.

En la Figura 9, se puede observar la curva estudiada en la presente tesis que corresponde al control respiratorio. A incrementos de control respiratorio, mayor acoplamiento mitocondrial y cierre de canal de alta conductancia. Se utiliza esta isoterma para el estudio de la cinética indirecta de la ATPasa.

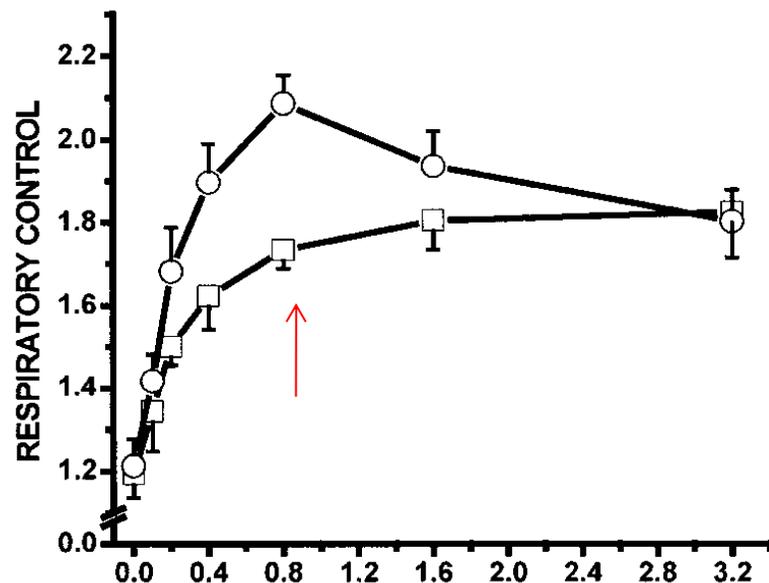


Figura 9. Tomada de Perez-Vazquez y cols. (2003).

La curva señalada corresponde al control respiratorio con concentraciones crecientes de magnesio. Eje de x: Control respiratorio, eje de y: concentración molar del ión. Note como a incrementos en la concentración de magnesio, el CR en mitocondrias de *Sacharomyces cerevisiae* incrementa. Medio de respiración: 0.6 M manitol, 5 mM MES, pH 6.8, 1ul/ml etanol, 20 mM KCl, y 0.4 mM  $PO_4$ . En estado 3 se agrega 150 uM de ADP.

## Efecto del ATP sobre la transición de la permeabilidad mitocondrial

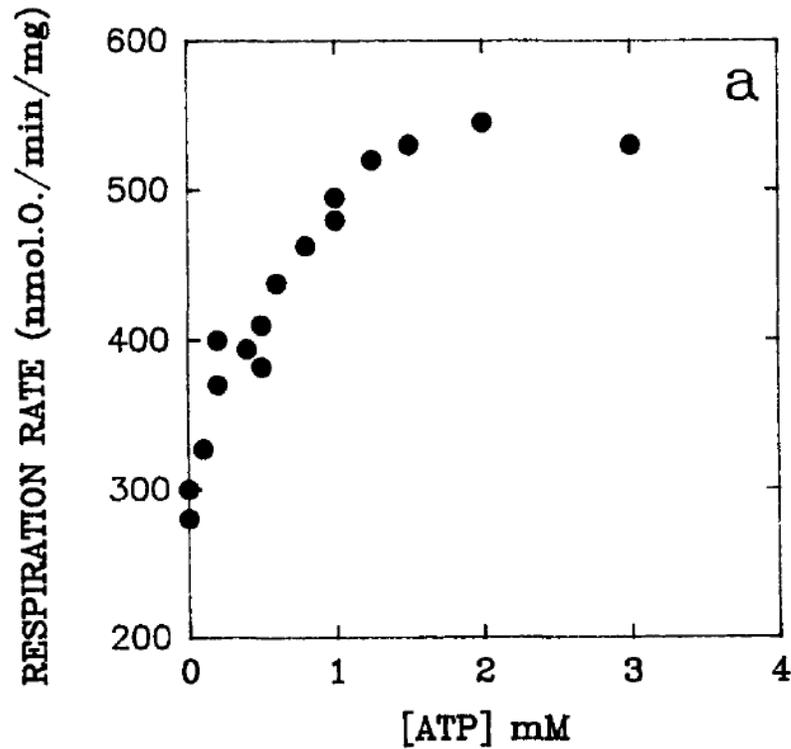


Figura 10. Tomada de Rocou X., Manon S. Guerin M. (1995).

Note como en estado 4, a concentraciones crecientes de ATP, la velocidad de consumo de  $O_2$  incrementa en mitocondrias de *Saccharomyces cerevisiae*. El ATP interacciona con el ANT o la ATP-asa según la teoría tomada, y abre el poro. Medio de respiración: 0.65 M manitol, 0.36 mM EGTA, 10 mM tris-maleato, pH 6.8, 100 mM KCl, 20ug/mg proteína de oligomicina y 0.5 mM  $PO_4$ .

Se analizó la Figura 10, la cual pone de manifiesto que, a incrementos de ATP, el consumo de oxígeno en estado 4 incrementa su velocidad. Se analiza la cinética como apertura de canal de conductancia.

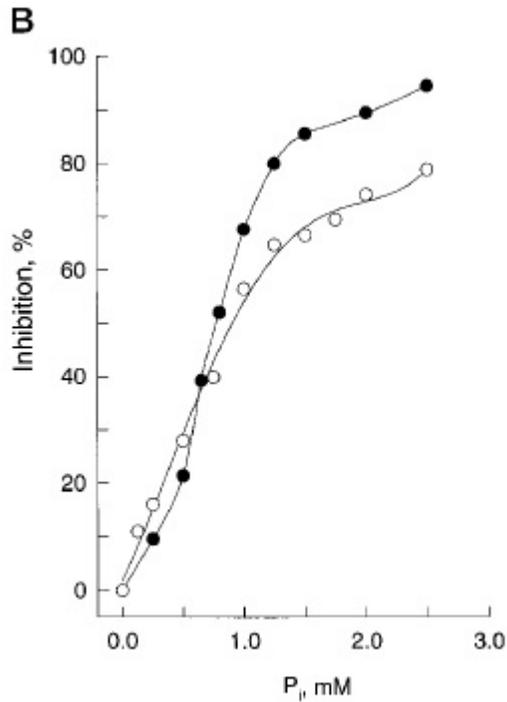


Figura 11. Tomado de Jung y cols. (1997).

Hinchamiento mitocondrial (*Saccharomyces cerevisiae*) a diferentes concentraciones de Pi pero graficado en porcentaje de inhibición. Se toma la gráfica en la que se induce hinchamiento con ATP. Medio de hinchamiento: 230 mM Manitol, 70 mM sucrosa, 10 mM HEPES, pH 7.3, 25  $\mu$ M EGTA, 0.5 mg/ml BSA, 10  $\mu$ g/ml de oligomicina y la respiración fue inducida con 2 mM de ATP en la gráfica señalada.

Se tomo porcentaje de inhibición de hinchamiento dependiente de ATP a diferentes concentraciones de fosfato para analizar el comportamiento de canal dependiente de las concentraciones de fosfato.

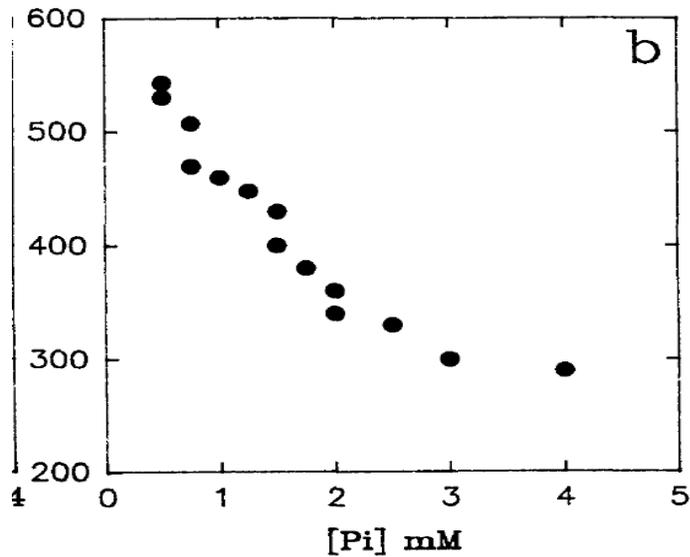


Figura 12. Tomada de Rocou X., Manon S. Guerin M. (1995).

Velocidad de consumo de O<sub>2</sub> en estado 4 a diferentes concentraciones de Pi en *Saccharomyces cerevisiae*. Note como al incrementar la concentración de fosfato, la velocidad de consumo de O<sub>2</sub> disminuye. Medio de respiración: 0.65 M manitol, 0.36 mM EGTA, 10 mM tris-maleato, pH 6.8, 100 mM KCl, 20ug/mg proteína de oligomicina, 0.5 mM PO<sub>4</sub> y 2mM de ATP.

Se tomó la velocidad de consumo en estado 4 con disminución de velocidad dependiente de concentraciones de fosfato, lo que sugiere cierre del canal de alta conductancia.

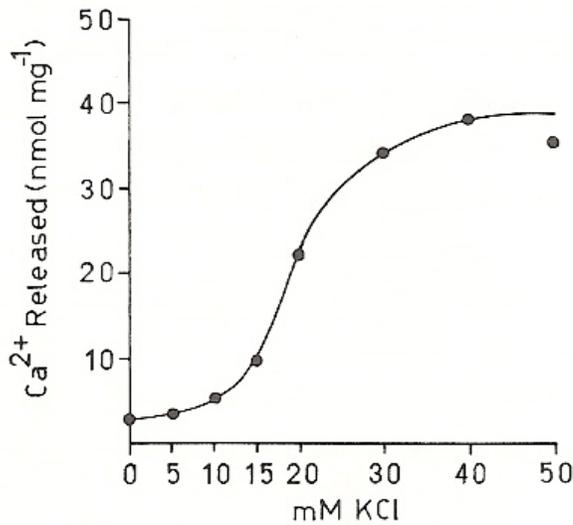


Figura 13. Tomada de Chavez y cols. (1991).

Efecto de concentraciones crecientes de  $K^+$  para la liberación de  $Ca^{2+}$  inducido por CAT (carboxilatractilósido) en mitocondrias de riñón de rata depletadas de  $K^+$ . Se utilizó  $^{45}Ca^{2+}$  y se incrementaron las concentraciones de KCl para cada ensayo. Se induce liberación de  $Ca^{2+}$  por la adición de CAT. El medio de incubación contiene 250 mM de sucrosa, 10 mM succinato, 10 mM HEPES, 1 mM fosfato, 10 mM acetato, 200  $\mu$ M ADP, 10  $\mu$ g de rotenona y 5  $\mu$ g de oligomicina. Se tomó la isoterma de fijación de liberación de calcio dependiente de CAT a partir de diferentes concentraciones de KCl para inducir transición de permeabilidad. De aquí se estudia el comportamiento del canal dependiente de CAT.

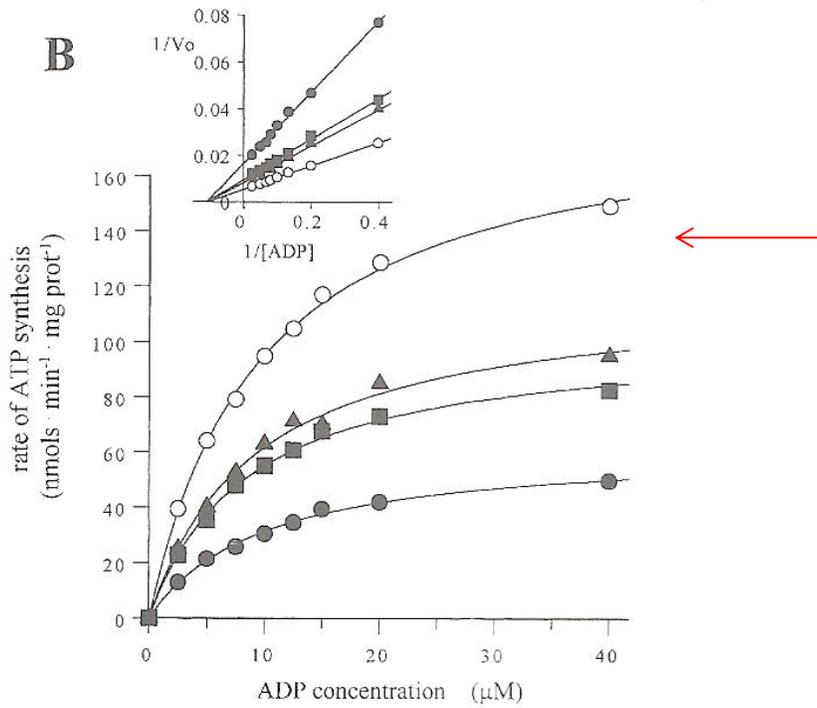


Figura 14. Tomado de Cortés P y cols (2000).

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<sup>+</sup> a 340-390 nm en espectrofotómetro 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.

En cuanto a la síntesis de ATP dependiente de la concentración de ADP se induce cierre y acoplamiento en la especie estudiada. Ergo se estudia la cinética de la síntesis de ATP en la rotación de la ATP asa.

## RESULTADOS

Evaluación de la Transición de la Permeabilidad Mitocondrial a partir de la literatura.

Efecto del  $Mg^{2+}$  en la respiración mitocondrial.

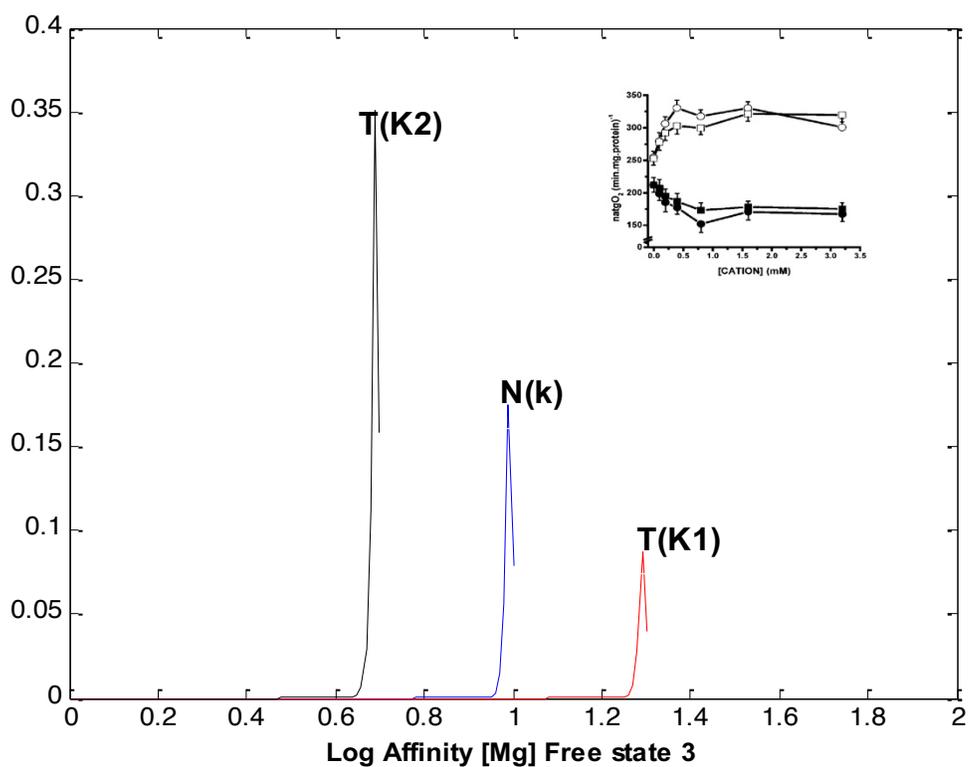
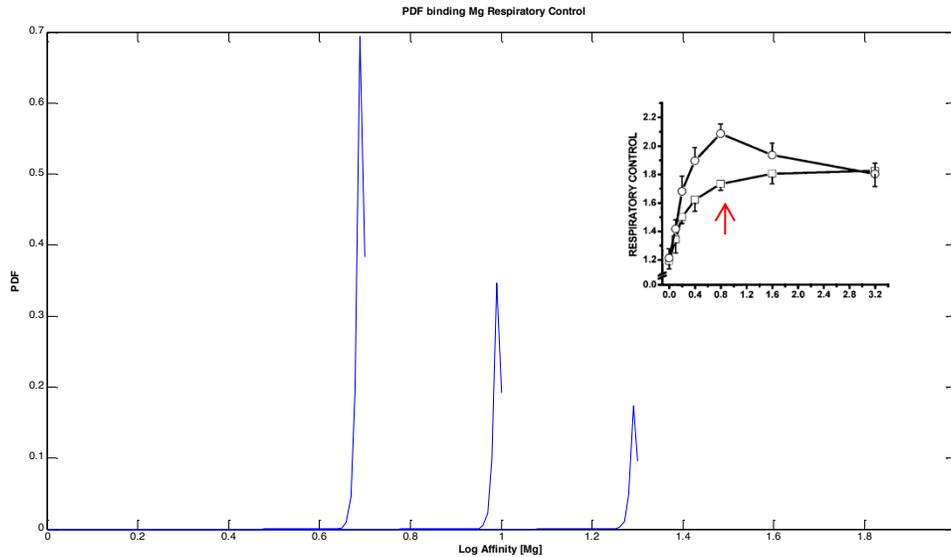


Figura 15. Distribución de afinidades en el eje de las “y” distribución de afinidades (PDF por sus siglas en inglés) y en el eje de las “x” Log de la afinidad del  $Mg^{2+}$ . Es calculada con dos sitios de unión.

Al realizar el cálculo de los estados conformacionales que adquiere el poro de transición de la permeabilidad mitocondrial podemos observar que en las condiciones experimentales, se encuentra abierto. Esto está dado por la disminución en la concentración de  $P_i$  (el cual interacciona con el  $P_iC$  o con la  $ATPasa$  según la literatura revisada [Gutiérrez-Aguilar M.,

cols 2010., Bernardi P., 2013]. A la derecha de la gráfica podemos ver como a bajas concentraciones de  $Mg^{2+}$  existe una moda baja pero un pulso que podría indicar apertura del poro para reestablecer las concentraciones de  $Mg^{2+}$  citosólicas por eflujo mitocondrial de las mismas. Interpretada de izquierda a derecha, se puede observar que al disminuir la concentración de  $Mg^{2+}$  la mitocondria reestablece las concentraciones por eflujo en dos pulsos para cerrar el poro y mantener acoplada la cadena respiratoria por interacción con este ión.

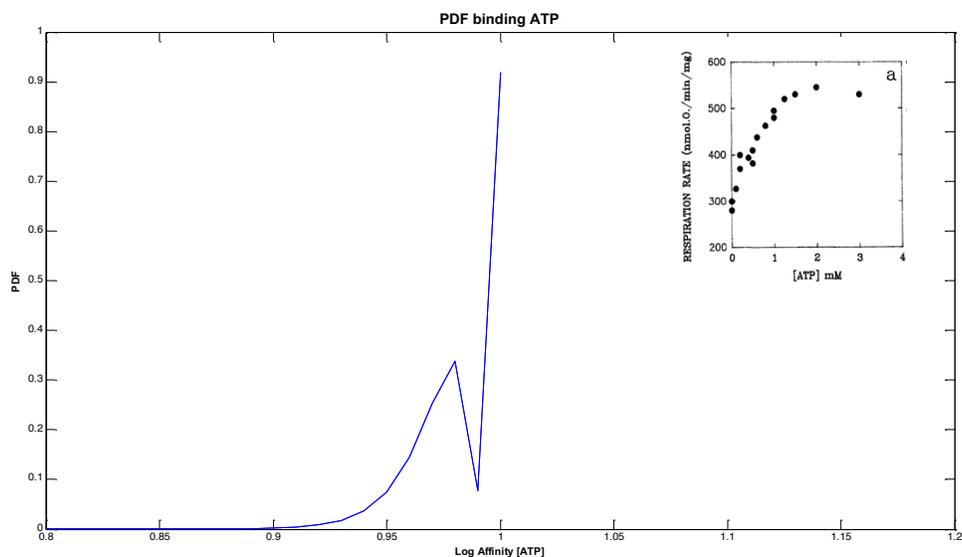
$N(k)$  es la distribución media la cual explica con mecánica estadística, el comportamiento del poro (cualquiera que sea la teoría aceptada). En condiciones fisiológicas un descenso abrupto de las concentraciones de Magnesio establecería una corriente saliente de  $Mg^{2+}$  a través del poro para establecer un equilibrio termodinámico de éste. Si fallara el cierre con un segundo descenso brusco de  $Mg^{2+}$  se induciría una apertura irreversible del poro (gráfica leída de izquierda a derecha), siempre y cuando las concentraciones de  $P_i$  estén disminuidas en el citosol. La apertura irreversible del poro conlleva al desacoplamiento de la cadena respiratoria con subsecuente depleción de ATP y muerte celular. Por el contrario, al incrementar las concentraciones de  $Mg^{2+}$  la corriente de este ión tiende ir hacia dentro de la mitocondria. Al observar  $N(k)$  en su extremo derecho no llega a cero. Esto probablemente pueda indicar un umbral de transporte de  $Mg^{2+}$  antes de que este se active.



**Figura 16. Se observa el mismo proceso que el explicado en estado 3. Lo que quiere decir que evaluando tanto estado 3 o estado 4, la fisiología mitocondrial es la misma, es decir, el modelo explica lo que sucede tanto en presencia de ADP como en ausencia del mismo.**

Al observar el mismo proceso, podemos notar que acoplada la cadena respiratoria depende del transporte de  $Mg^{2+}$ , el cual al interactuar con la ATP-asa mitocondrial, cierra el poro y acopla la síntesis de ATP como cofactor dentro de la misma. Sin embargo, al rebasar cierto umbral citosólico, el  $Mg^{2+}$  se transporta al interior de la mitocondria tras cerrar el poro. El cierre del poro puede estar dado por varias situaciones de acuerdo a diferentes teorías: La interacción con VDAC o la interacción con la misma ATP-asa. Sin embargo el desplazamiento de otros iones por el  $Mg^{2+}$  en este caso, podrían explicar la transición de la permeabilidad mitocondrial [Chávez E., cols, 1991] sin embargo faltan estudios para determinar que esta última hipótesis es cierta.

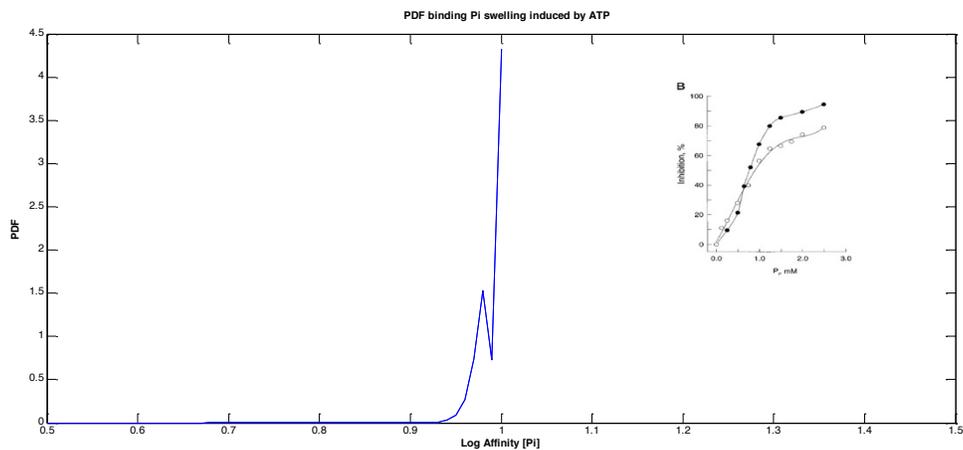
## Efecto del ATP sobre la transición de la permeabilidad mitocondrial



**Figura 17. Distribución de afinidades a diferentes concentraciones de ATP.**

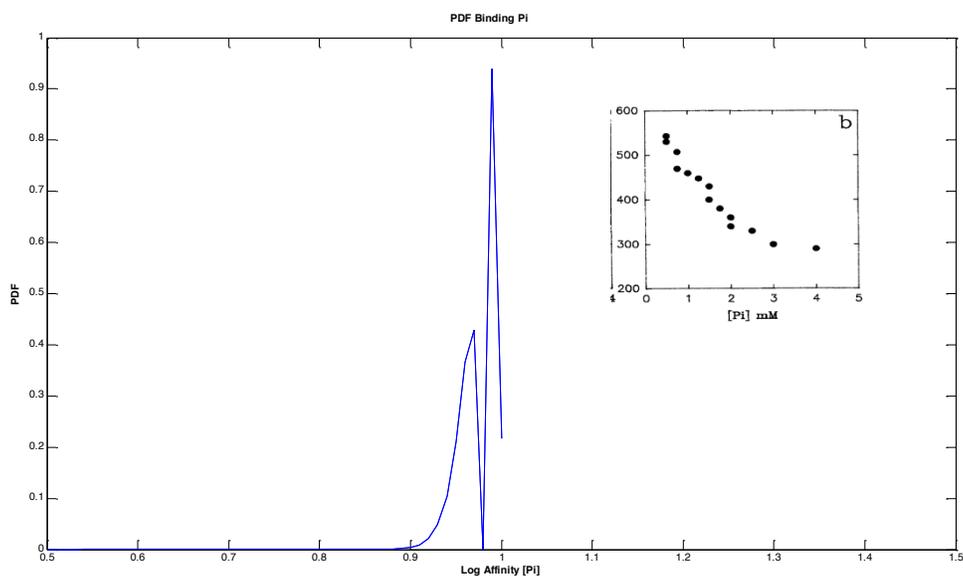
Se puede observar en la Figura 17, que la gráfica indica que el poro se encuentra siempre en un estado cerrado (leído de derecha a izquierda). Conforme se incrementan las concentraciones de ATP existe un estado abrupto de alta afinidad a lo cual disminuye, existiendo otro estado en el cual hay unión de ATP con su ligando. Probablemente a un incremento en las concentraciones de ATP, el poro se abra para evitar que la cadena respiratoria donde electrones a la quinona y forme semiquinona, la cual es precursora de radicales libres. Es probable que esta sea la razón por la que la quinona sea un inhibidor de la apertura del poro [Bernardi P., 2013]. Al incrementar la concentración de ATP, cada vez es más difícil que exista unión de ATP al ligando. Esto se puede deber a que se sature el receptor. Sin embargo, puede existir una reversibilidad en el proceso dependiente de la disminución de ATP. A un incremento aún mayor de la concentración de ATP, no existen estados, probablemente debido a la apertura irreversible del poro. La apertura del poro como un proceso dinámico puede mediar un desacoplamiento fisiológico a concentraciones

elevadas de ATP antes de ser hidrolizadas por la célula. El poro funciona como un desacoplador fisiológico que defiende al huésped de la formación de radicales libres. Esto se da cuando ANT interacciona con ATP, aunque en nuevas investigaciones se cree que el ligando de ATP es la ATP-asa mitocondrial [Bernardi P., 2013]. Al existir un exceso de ATP, la ATP-asa hidroliza ATP para generar ADP y Pi, proceso que podría corresponder al descenso abrupto de distribución de afinidades. El ADP y el Pi cierran el poro, lo cual reestablecería el  $\Delta\Psi$ , el estado estacionario mitocondrial y el acoplamiento de la síntesis de ATP; aun así, determinar que esto sucede es aún muy aventurado, pues nadie ha podido demostrar que el poro opere de manera dinámica.

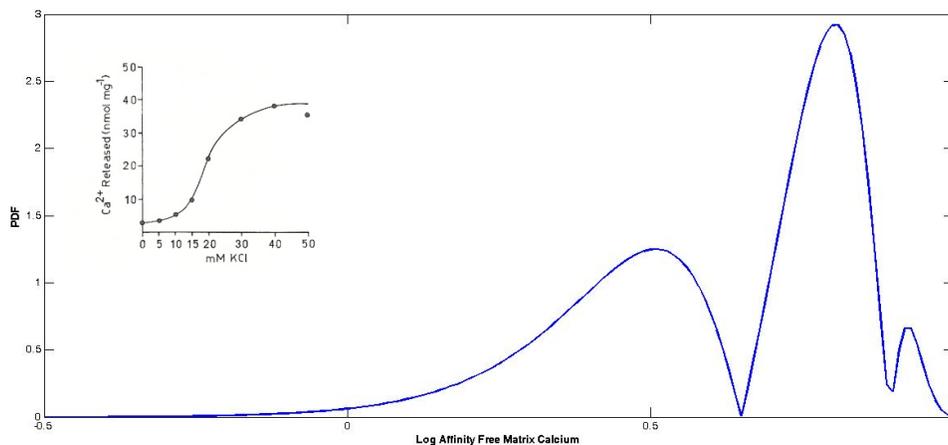


**Figura 18. Distribución de afinidades a diferentes concentraciones de Pi. Aunque el fosfato cierra el poro, se obtiene la misma gráfica que en la figura 17, puesto que observamos porcentaje de inhibición. Es decir al movernos a la derecha de la gráfica observamos apertura y a la izquierda cierre del poro. Note como observamos la misma distribución hecha por el PiC. Esto puede deberse a que dos elementos del poro interaccionan de manera indirecta en un mismo proceso la síntesis e hidrólisis de ATP.**

Se observa la misma distribución de afinidades que la obtenida con la curva de ATP, esto se puede deber a que está involucrado el mismo receptor en la transición de la permeabilidad. Esta va acorde a lo propuesto por Bernardi [2013], en la cual el poro está formado por dímeros de ATP asa mitocondrial.

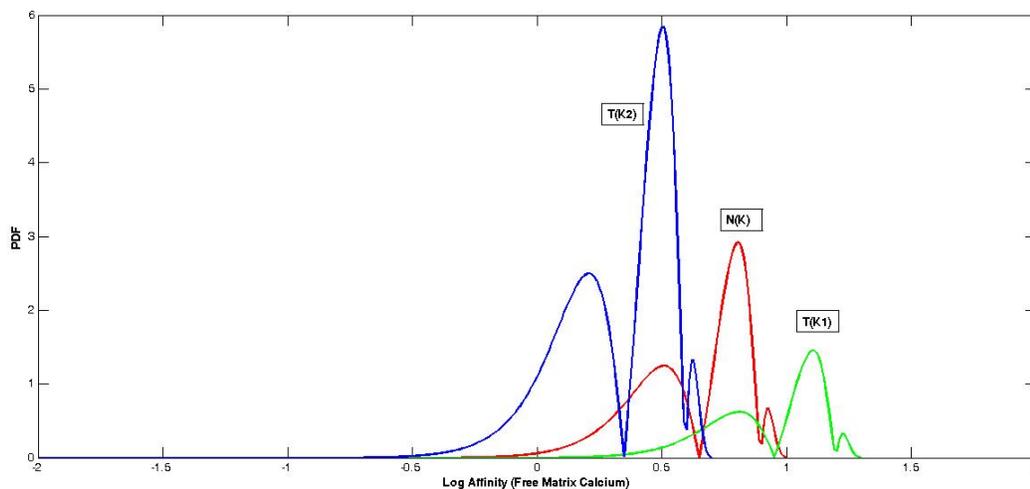


**Figura 19. Distribución de afinidades a diferentes concentraciones de Pi.**



**Figura 20. Curva de distribución de afinidades a diferentes concentraciones de KCl.**

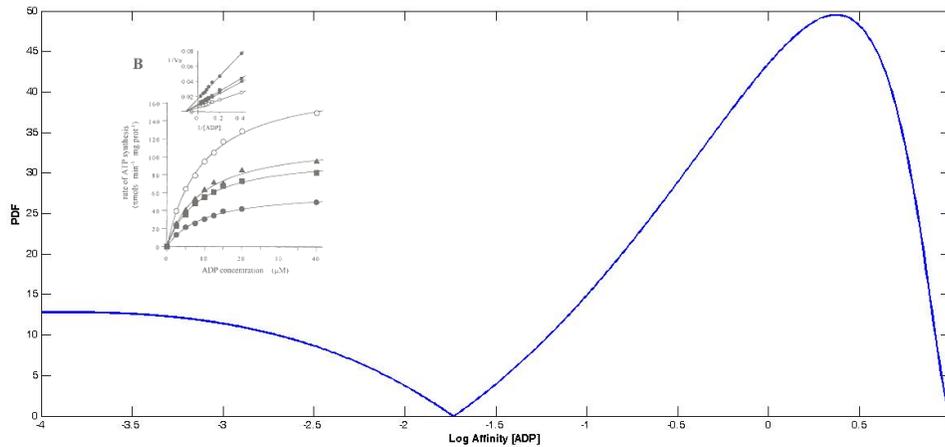
Se observan tres estados o cambios conformacionales que sufre la molécula liberadora de  $\text{Ca}^{2+}$ . En ella se observan tres modas de las cuales el primero y segundo coexisten aun cuando el segundo estado parece ser el más importante en la apertura del poro. El tercer estado no coexiste con el segundo, pudiendo ser este la apertura definitiva del poro para la liberación de calcio matricial.



**Figura 21. Curva de distribución de afinidades a diferentes concentraciones de KCl para dos sitios de unión de  $\text{Ca}^{2+}$  inducidas por desplazamiento de cargas.**

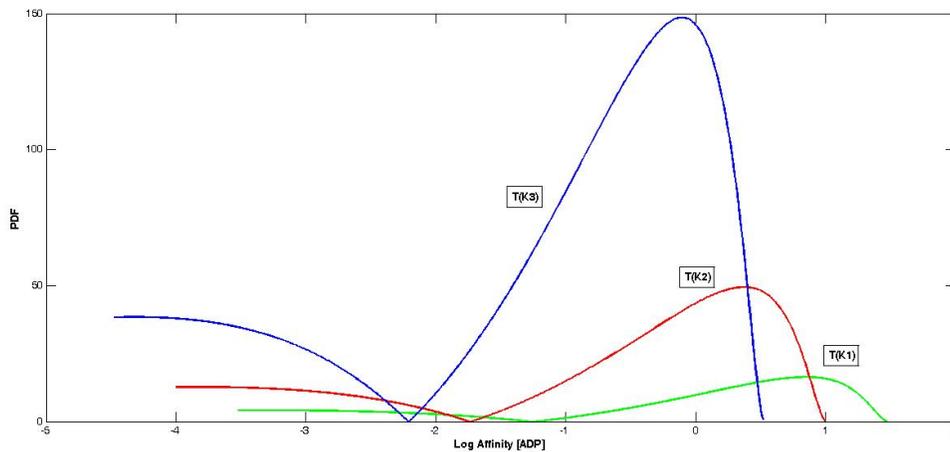
En la cual se pueden observar la coexistencia teórica de varios estados en un punto determinado, excluyendo claro  $N(k)$ . Al haber un tercer estado conformacional de un sitio de unión puede coexistir con el primer, segundo y tercer estado del segundo sitio de unión. Pero sólo se dan los cambios conformacionales del segundo sitio de unión cuando el primer sitio ha alcanzado el tercer estado.

## Efecto de la síntesis de ATP dependiente de ADP.



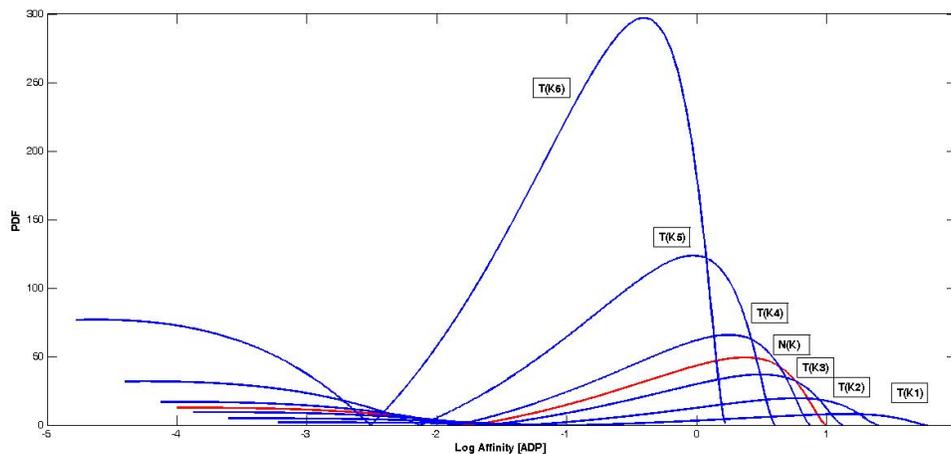
**Figura 22.** Curva de distribución de afinidades teórica para la síntesis de ATP.

Observe como existen dos estados uno que corresponde a la síntesis de ATP tomando como sustrato ADP y Pi y a la izquierda un segundo estado, en el cual se libera el ATP.



**Figura 23.** Curva de distribución de afinidades para la síntesis de ATP dependiente de concentraciones de ADP con tres sitios  $\square$  de unión teóricos, los cuales corresponden a los tres sitios de catálisis de la ATP sintasa mitocondrial

En ella se observan que debido a la rotación de la ATP sintasa coexisten los tres estados antes de liberar el ATP. El paso crucial para la gráfica de distribución de afinidades es la síntesis de ATP más que la captación o liberación. No existe el paso de captación, lo cual indica que es simultáneo al de síntesis. Sin embargo, al rotar la ATPasa podemos ver en diferentes tiempos de acuerdo a concentraciones crecientes de ADP los cambios conformacionales demostrados por nuestro modelo, los cuales van acordes a la literatura. El paso crítico en la rotación de la ATP sintasa es la síntesis misma del ATP al igual que lo demostrado en la literatura [Syberg y cols. 2012].



**Figura 24. Curva de distribución de afinidades para la síntesis de ATP con 6 sitios 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.**

Observe las curvas de distribución de afinidades para el dímero de ATP asas que conforman el poro. Note como coexisten varios estados debido a la rotación de ambas ATP asas. Existen 6 modas a concentraciones altas de ADP con síntesis de ATP como el paso crítico. Sin embargo, la liberación de ATP en el lado izquierdo de la gráfica, se ve en

diferentes pasos debido a la rotación catalítica de la enzima. La rotación de la enzima corresponde a los cambios conformacionales observados con este método.

## DISCUSIÓN

El magnesio y el calcio citosólico cierran el poro de transición de la permeabilidad mitocondrial al interactuar con el canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC) de *Sacharomyces cerevisiae* esto de acuerdo a lo propuesto por varios autores [Gutiérrez-Aguilar M., cols, 2007] nuevas teorías establecen que la interacción se lleva a cabo con dímeros de ATP-sintasa mitocondrial [Bernardi P., 2013]. El calcio matricial abre el poro en mamíferos [Chávez E., cols, 1991; Parra E. y cols 2005] en *Sacharomyces cerevisiae* el incremento de concentración de calcio citosólico ha mostrado cerrarlo [Gutiérrez-Aguilar M., cols., 2007] al no existir un uniportador de calcio se puede observar el efecto del calcio hasta ciertas concentraciones, pues existe un antiportador calcio/hidrogenión [Bradshaw P. C., cols, 2001] el cual podría causar que las curvas de fijación se saturen y posteriormente disminuyan la actividad. Sin embargo, el efecto del magnesio es diferente. Al parecer, este sólo muestra un efecto inhibitor. El efecto inhibitor o de cierre del poro se observa cuando al incrementar la concentración de  $Mg^{2+}$  el estado 3 aumenta y el estado 4 disminuye. Al abrir el poro de transición de la permeabilidad mitocondrial en estado 4 donde hay sustrato respiratorio sin ADP, la pendiente de consumo de  $O_2$  tiende a incrementar, debido a que se genera un cortocircuito con fuga de protones. Al existir una caída del  $\Delta\Psi$  la cadena respiratoria se acelera para restablecer el potencial transmembranal mitocondrial. Es decir, en estado 3 (con presencia de ADP), los protones tienden a fugarse de manera normal a través de la porción  $F_0$  de la ATP sintasa incrementando el consumo de  $O_2$  en relación con el estado 4 siempre que esté acoplada la cadena respiratoria. Hablamos de acoplamiento cuando la fuerza protón motriz se utiliza para la síntesis de ATP. Cuando no está acoplada la cadena respiratoria, el cociente edo.3/edo.4 disminuye (a este cociente se le conoce

como control respiratorio). Si la mitocondria no está acoplada, el estado 3 disminuirá y el estado 4 aumentará. A mayor CR, mayor acoplamiento. Note como en la Figura 8 el estado 4 disminuye mientras que el estado 3 aumenta con el incremento en las concentraciones de  $Mg^{2+}$ . El grado de acoplamiento es directamente proporcional al cierre del poro de transición de la permeabilidad mitocondrial de acuerdo a la teoría quimiosmótica.

Es la primera vez que se utiliza este método para estudiar canales. Las curvas de isotermas de fijación no aportan información de la fisiología del canal de manera aislada a diferencia de las distribuciones de afinidad. Sin estudios cristalográficos podemos establecer cambios conformacionales a partir de este método. Llama la atención que en el canal mitocondrial, al existir un solo sitio de fijación, encontremos diferentes modas y no una distribución gaussiana, lo cual sería esperado para un solo sitio de fijación. Este modelo es adecuado para dilucidar la fisiología del canal mitocondrial.

La transición de la permeabilidad mitocondrial tiene un rol fisiológico. Es probable que la apertura y cierre del poro de transición de la permeabilidad mitocondrial tenga tanto un estado reversible como uno irreversible. Estos estados son producto de la respuesta mitocondrial a las demandas energéticas de la célula o de la mitocondria misma ante un estímulo nocivo (por ejemplo la isquemia y la isquemia-reperfusión). Parte de estos estímulos los podemos estudiar con la distribución de afinidades de acuerdo a concentraciones de  $Mg^{2+}$ , ATP y Pi obtenidos de manera experimental. Exponemos los estados encontrados y su probable rol con la fisiología subcelular a continuación.

Las distribuciones de afinidad de los picos de  $Mg^{2+}$  nos hablan de rangos de afinidades pequeñas. Esto puede traducirse en un canal con dos sitios de fijación como pulsos los cuales traducen corrientes dependientes de la apertura y cierre del canal.

En condiciones fisiológicas un descenso abrupto de las concentraciones de magnesio establecería una corriente saliente de  $Mg^{2+}$  a través del poro para establecer el equilibrio

termodinámico trans-membranal mitocondrial de este ión. Esto es consistente con propuestas del transporte de  $Mg^{2+}$  con cinéticas elevadas [Kolisek M, cols, 2003]. Si a la célula le acontece un descenso brusco de  $Mg^{2+}$  se induce una apertura irreversible (no está claro si el  $PO_4$  puede impedir esta apertura en ausencia de  $Mg^{2+}$ ). La apertura irreversible del poro conlleva al desacoplamiento de la cadena respiratoria con subsecuente depleción de ATP y muerte celular. Las curvas pueden ser interpretadas como una sustitución de los sitios de unión de  $Mg^{2+}$  por  $Ca^{2+}$ , ambos iones compiten por el sitio de unión interno. Sin embargo, ambos iones tienen diferentes transportadores por lo que el comportamiento real es diferente. En medios experimentales el calcio matricial mitocondrial puede competir con el  $Mg^{2+}$ . Teóricamente ante un incremento en la concentración matricial de  $Ca^{2+}$ , la apertura del canal permitiría un influjo de  $Mg^{2+}$  hacia la matriz para competir con el  $Ca^{2+}$  matricial (propuesta que se ajusta al modelo de Bernardi (2013), sin embargo faltan más estudios para determinar el papel del  $Ca^{2+}$ , y su comportamiento biofísico con esta estructura. El comportamiento de la gráfica de  $Ca^{2+}$  no cumple con las características matemáticas para poder ser analizada por este método. Hace falta modificar la ecuación para poder dilucidar el comportamiento de este ion. Sin embargo en mitocondrias de riñón de ratón podemos observar el comportamiento del canal dependiente del desplazamiento de cargas por KCl (Figura 13). En ella podemos observar que el  $Ca^{2+}$  matricial el cual interacciona con el poro para su apertura, confiere dependiendo de su concentración, tres estados conformacionales al poro. Esto lo podemos observar al existir tres modas diferentes en la distribución de afinidades para liberación de calcio.

Por otra parte, cuando la célula cuenta con exceso de ATP, la síntesis de éste será innecesaria, por lo cual, al interaccionar el ATP con el ANT o la ATP sintasa (queda por esclarecer el ligando en este proceso) se desacopla la cadena respiratoria. De esta manera se regula la síntesis de energía y la velocidad de la fosforilación oxidativa (medida experimentalmente con el consumo de  $O_2$ ). Este proceso presenta un fenómeno contra-

regulatorio para impedir el desacoplamiento permanente: La ATP asa mitocondrial, ante un exceso de ATP y una cadena respiratoria desacoplada, podría hidrolizar el ATP innecesario para generar Pi y ADP, los cuales cerrarían  $s_0$ MUC y acoplarán la fosforilación oxidativa, impidiendo de esta manera la muerte celular. Lo único que nos puede ayudar a dilucidar este proceso, es que tanto el ADP como el Pi cierran el poro, pero aún faltan estudios que logren demostrar la hidrólisis de ATP in vivo al abrirse el poro de transición de la permeabilidad mitocondrial. El proceso observado dependiente de ATP y Pi se da en dos pasos o dos distribuciones de afinidad, probadas anteriormente. Cabe mencionar que el segundo paso es muestra una moda baja a la cual le antecede un pulso alto de afinidad. Comportamiento sugerente de un umbral de apertura. Es decir, existe una concentración de ATP a la cual se abre el poro de manera abrupta (aun no podemos esclarecer si el proceso es reversible o irreversible). Lo que sí podemos determinar es que el ligando de Pi y ATP se comportan de manera similar, altamente sugerente de que es el mismo ligando. Si este fuera el caso se ajusta al modelo de Bernardi en el cual el poro de transición de la permeabilidad mitocondrial está formado por dímeros de ATP asas mitocondriales.

El estudio de la fisiología mitocondrial, nos ayuda a entender diversas enfermedades en las que está implicada la transición de la permeabilidad mitocondrial. Tal es el caso de la isquemia, la isquemia reperusión y algunas enfermedades neurodegenerativas. Así mismo, el envejecimiento celular puede estar regulado de manera indirecta por la estructura en estudio. Describir puntualmente la fisiopatología subcelular a nivel cardíaco y cerebral no es posible con los datos arrojados en este estudio, sin embargo, la metodología se puede usar para esclarecer el papel de la mitocondria en estas enfermedades. Cabe señalar que la figura 9 y la figura 12 son obtenidas de distintos experimentos bajo inducción de apertura del canal por medio de ATP. Es decir, observamos el mismo proceso pero con metodología diferente: velocidad consumo de  $O_2$  y el hinchamiento mitocondrial. El hecho de que

observemos curvas similares en dos experimentos diferentes que evalúan el mismo proceso, valida nuestro método para el estudio de la fisiología subcelular en este canal.

La síntesis de ATP dependiente de ADP puede ser estudiada mediante el método propuesto por José M.V. (1998). Se observa la distribución de afinidades de la síntesis de ATP así como la coexistencia de distintos estados lo cual se ajusta al hecho de que la ATP asa mitocondrial tiene un mecanismo rotacional. Observamos que el paso crucial en esta serie de eventos es la síntesis de ATP obteniendo una moda superior a las demás en todas las gráficas. Dicha observación es similar a la observada en el centro ABC de MsdbA [Syberg, cols 2012] un transportador de nucleótidos de *E. coli* con capacidad catalítica de ATP, es decir el paso crítico en la hidrólisis de ATP es la hidrólisis misma acoplada a la reacción enzimática antes que cualquier otro proceso biofísico. Asimismo podemos observar que el estado final libera al ATP. Se realizó el estudio de este proceso para un dímero de ATP asa en el cual se toman 6 sitios. Podemos observar que mientras incrementa la concentración de ATP, decrementa la afinidad y el número de estados, favoreciendo una moda de ATP sintetizado como paso crítico, previo a la liberación en diferentes tiempos de ATP por parte de la ATP asa mitocondrial.

## **CONCLUSIONES**

Este método nos permite calcular distintos estados conformacionales en un canal.

Este método nos permite estudiar los estados conformacionales de la ATP sintasa mitocondrial.

Existe un estado crítico para la síntesis de ATP y un estado de liberación de ATP por la ATP sintasa mitocondrial.

No podemos determinar con la evidencia tomada si la apertura y cierre de este canal es reversible o irreversible.

Los distintos estados conformacionales dependen de la afinidad de algunos ligandos.

La carga energética es un importante regulador de la apertura-cierre del poro de transición de la permeabilidad mitocondrial.

Al estudiar canales con valencia 1 no siempre obtenemos una distribución gaussiana, pues el método nos permite ver la distribución de afinidades y por tanto dilucidar los cambios conformacionales, siempre y cuando existan.

La interacción del calcio matricial mitocondrial con el poro de transición de la permeabilidad mitocondrial en riñón de rata genera tres cambios conformacionales.

## 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 Christopher P., The mitochondrial permeability transition pore and ischemia-reperfusion injury. *Basic Res Cardiol* (2009) 104:181-188.
3. Baines Christopher 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 BioenergBiomembr.* 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. Desmond E., BorchierArmanet 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.
13. 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.
14. 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.
15. Hernández MM, José MV. Positive cooperativity induces multimodal site and thermodynamic affinity distributions in multivalent receptors. *Anal. Biochem.*313: 226-233 (2003).
16. Hunte, C., Protonmotive pathways and mechanisms in the cytochrome bc1 complex. *FEBS Lett.* 545:39, 2003.
17. José MV (1985) Ligand binding systems at equilibrium: Specificity, heterogeneity, cross-reactivity and site-site Interactions. *Anal.Biochem.*144: 494-503.
18. José MV, José JV (1998) Probability distributions of thermodynamic affinities for heterogeneous receptor populations.*J.Theor. Biol.*190: 85-92.

19. José MV, José JV (2001) Thermodynamic distributions of heterogeneous receptor populations. In: Drug Receptor Thermodynamics: Introduction and Applications, Ed. Robert B. Raffa. JohnWiley&Sons. Chapter 28 pp. 593-601.
20. José MV, Larralde C (1982) Alternative Interpretation of Unusual Scatchard plots: Contributions of Interactions and Heterogeneity. *Math.Biosciences*58: 159-170.
21. Jung DW., Bradshaw PC., Pfeiffer DR. Properties of a cyclosporine-insensitive permeability transition pore in yeast mitochondria (1997). *J. Biol. Chem.* 272: 2104-12.
22. Kolisek M, Zsurka G, Samaj J, Weghuber J, Schweyen RJ, Schweigel M (2003) Mrs2p is an essential component of the major electrophoretic Mg<sup>2+</sup> influx system in mitochondria. *The EMBO Journal* Vol 22 No. 6 pp 1235-1244.
23. Kragh-hansen U (1991) Octanoate binding to the indole- and benzodiazepine-binding region of human serum albumin. *Biochem. J.*273: 641-644.
24. Sagan L (Margulis L)., On the origin of mitosing cells. 1967. *J NIH Res.* 1993 Mar;5(3):65-72.
25. Margulis L., Symbiotic theory of the origin of eukaryotic organelles; criteria of proof. *SympSocExp Biol.* 1975;(29):21-38.
26. 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.
27. Mitchell P (1971). Coupling of Phosphorylation to Electron and Hydrogen Transfer by a Chemi-Osmotic type of Mechanism. *Nature* volume 191, pages144–148 (1961).
28. Nicholls D.G., Ferguson S.J., *Bioenergetics 3.*, 3rd edition., Academic Press., San Diego, California, 2001.
29. 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.
30. 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.
31. 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.
32. 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.
33. Rocou X., Manon S. Guerin M. ATP opens an electrophoretic potassium transport pathway in respiring yeast mitochondria (1995) *FEBS Letters* 364: 161-164.
34. 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.
35. Sodi Pallares D (1967) Analogía entre la bomba de sodio y el demonio de Maxwell. *Gaceta Médica de México.* Vol 98, No 1.
36. Strebhardt K, Ullrich A (2008) Paul Ehrlich's magic bullet concept: 100 years of Progress. *Nature Rev.* 8: 473-480.

37. 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.
38. Tummers B, DataThiefIII (2006) <<http://datathief.org/>>
39. Valdur Saks., *Molecular System Bioenergetics.*, Wiley-VCH., 2007.
40. Vesteg M., Krajcovic J. The Falsibility of the models for the origin of eukaryotes. *CurrentGenetics*. 2011. Volume 57, Number 6, 367-390.
41. 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.
42. Yagi, T., and MatsunoYagi A. The Proton translocating NADH Quinone oxidoreductase in the respiratory chain, the secret unlocked. *Bioch* 42:2266, 2003.