



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD MITOCONDRIAL DE LA RETINA:  
EFECTO DE LA HIPERGLUCEMIA.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

Ixchel Osorio Paz

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Rocío Salceda Sacanelles  
[Instituto de Fisiología Celular](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Ana Brígida Clorinda Arias Álvarez  
[Instituto de Investigaciones Biomédicas](#)

Dr. Salvador Uribe Carvajal  
[Instituto de Fisiología Celular](#)

Ciudad de México. Febrero, 2016



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.

## RECONOCIMIENTOS

Esta tesis se realizó bajo la tutoría de la Dra. Rocío Salceda Sacanelles, en el laboratorio AL-102, del Departamento de Neurodesarrollo y Fisiología en el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

El jurado de examen estuvo constituido por:

PRESIDENTE	Dr. Edmundo Chávez Cossío, Instituto Nacional de Cardiología.
VOCAL	Dr. José Pedraza Chaverri, Facultad de química, UNAM.
VOCAL	Dra. Ana Cecilia Zazueta Mendizábal, Instituto Nacional de Cardiología.
VOCAL	Dr. Alejandro Zentella Dehesa, Instituto de Investigación Biomédica, UNAM.
SECRETARIO	Dra. María Cristina Regina Fernández Mejía, Instituto de Investigación Biomédica, UNAM.

El comité tutorial que asesoró el desarrollo de este trabajo estuvo conformado por:

Dra. Ana Brígida Clorinda Arias Álvarez	Instituto de Investigación Biomédica, UNAM.
Dr. Salvador Uribe Carvajal	Instituto de Fisiología Celular, UNAM.
Dra. Rocío Salceda Sacanelles	Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

Se reconoce la colaboración, asesoría y asistencia al Biólogo Gustavo Sánchez Chávez, técnico del laboratorio AL-102 en el Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

Se reconoce el apoyo de César A. Bolaños Vidal, Auxiliar del laboratorio AL-102 en el Instituto de Fisiología Celular; Leticia García Gutiérrez, Asistente de procesos en el programa de Ciencias Bioquímicas de la UNAM; Adelina González Pérez, Asistente de procesos en el programa de Ciencias Bioquímicas de la UNAM; Sara Noguero Solano, Secretario ejecutivo de la coordinación de enseñanza en el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

La alumna recibió una beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), número de beca 23959 y número de CVU 263808; así como el apoyo del Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) para la asistencia a congresos nacionales e internacionales; y apoyo del programa *The Euro-Latin American Network on Diabetic Microangiopathy* (EULAMDIMA) para la realización de una estancia corta internacional.

Este trabajo fue apoyado por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico/Programa de Apoyo de Investigación e Innovación Tecnológica UNAM/DGAPA/PAPIIT IN202813.

1.	RESUMEN.....	4
2.	LISTA DE ABREVIATURAS.....	7
3.	INTRODUCCIÓN.....	9
	3.1 Diabetes.....	9
	3.2 Glucotoxicidad.....	11
	3.2.1 Glicación no enzimática.....	11
	3.2.2 Vía del sorbitol.....	13
	3.2.3 Activación de la proteína cinasa C (PKC).....	14
	3.2.4 Estrés oxidante.....	15
	3.3 La mitocondria.....	17
	3.3.1 Regulación de la fosforilación oxidativa.....	19
	3.3.2 Generación de superóxido.....	21
	3.3.3 Proteína desacoplante 2 (UCP2).....	24
	3.4 La retina: estructura y función.....	26
	3.5 Retinopatía diabética.....	30
	3.6 Antecedentes.....	31
4.	HIPÓTESIS.....	35
5.	OBJETIVOS.....	36
6.	MÉTODOS.....	37
	6.1 Modelo de diabetes.....	37
	6.2 Contenido de nucleótidos de adenina (ATP/ADP/AMP).....	37
	6.3 Extracción de mitocondrias.....	38
	6.3.1 Microscopía electrónica.....	38
	6.3.2 Integridad de la membrana externa mitocondrial.....	39
	6.4 Actividad mitocondrial.....	39
	6.4.1 Consumo de oxígeno.....	39
	6.4.2 Actividad de los complejos respiratorios.....	39
	6.4.3 Potencial transmembranal de la mitocondrial.....	41
	6.4.4 Actividad de ATP sintasa.....	41
	6.5 Estrés oxidante.....	42
	6.5.1 Generación de superóxido mitocondrial.....	42
	6.5.2 Niveles de superóxido en la retina.....	42
	6.5.3 Actividad de aconitasa.....	42
	6.5.4 Peroxidación de lípidos mitocondriales.....	43
	6.6 Expresión de proteínas COX y UCP2 (Western blot).....	43
	6.7 Efecto del GDP.....	44
	6.7.1 Efecto del GDP sobre el potencial mitocondrial.....	44
	6.7.2 Efecto del GDP sobre la generación de superóxido mitocondrial.....	44
	6.8 Efecto del H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en el consumo de oxígeno mitocondrial.....	44
	6.9 Determinación de proteínas.....	44
	6.10 Análisis estadísticos.....	44
7.	RESULTADOS.....	45
	7.1 Modelo de diabetes.....	45
	7.2 Contenido de nucleótidos de adenina (ATP/ADP/AMP).....	45
	7.3 Microscopía electrónica.....	46
	7.4 Actividad mitocondrial.....	47
	7.4.1 Consumo de oxígeno.....	46
	7.4.2 Actividad de los complejos respiratorios.....	50
	7.4.3 Potencial transmembranal de la mitocondrial.....	52
	7.4.4 Actividad de ATP sintasa.....	54
	7.5 Estrés oxidante.....	55
	7.5.1 Generación de superóxido mitocondrial.....	55
	7.5.2 Niveles de superóxido en la retina.....	55
	7.5.3 Actividad de aconitasa.....	56
	7.5.4 Peroxidación de lípidos mitocondriales.....	57
	7.6 Expresión COX y UCP2 (Western blot).....	58
	7.7 Efecto de GDP.....	59
	7.7.1 Efecto del GDP sobre el potencial mitocondrial.....	59
	7.7.2 Efecto del GDP sobre la generación de superóxido mitocondria.....	59
	7.8 Efecto del H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en el consumo de oxígeno mitocondrial.....	61
8.	DISCUSIÓN.....	63
9.	CONCLUSIONES.....	71
10.	REFERENCIAS.....	72

## 1. RESUMEN.

La retina requiere una gran cantidad de energía proporcionada principalmente por el consumo de glucosa; además, la retina es el tejido con mayor dependencia de oxígeno, por lo que la fosforilación oxidativa representa una fuente substancial de energía. A pesar de ello, existe poca información sobre las características particulares de la actividad mitocondrial en la retina. Las alteraciones en la actividad mitocondrial han sido fuertemente relacionadas con diversas patologías en la retina, tales como la retinopatía diabética. Por lo que el estudio y la caracterización de la actividad mitocondrial resultan de crucial importancia. En este trabajo se desarrolló un micro-método de centrifugación diferencial, que permitió la obtención de una fracción mitocondrial, de retinas de ratas, con características óptimas para el estudio de sus funciones y así poder profundizar en su regulación y en los posibles cambios atribuidos en diferentes patologías, específicamente la retinopatía diabética. Asimismo evaluamos el consumo de oxígeno a través de un método polarográfico, la actividad de los diferentes complejos respiratorios por métodos espectrofotométricos y su potencial transmembranal por la fluorescencia de safranina, en mitocondrias de retinas de ratas normales y diabéticas. Las mitocondrias aisladas de retinas de ratas normales, presentan en reposo, un consumo de oxígeno de  $14,6 \pm 1,1$  natgO (prot. min.mg)<sup>-1</sup> y un control respiratorio de 4.0. En las mitocondrias de ratas diabéticas de 7, 20 y 45 días, aumentó el consumo de oxígeno en el estado de reposo, así como la actividad de los complejos, aunque la síntesis de ATP no se modificó; asimismo, en condiciones de diabetes, el potencial transmembranal de la mitocondria disminuyó. El GDP, un inhibidor de las proteínas desacoplantes, aumentó el potencial de membrana mitocondrial en las mitocondrias de animales controles y diabéticos de 45 días. Paralelamente, la producción de superóxido mitocondrial se incrementó en presencia de GDP en las

mitocondrias de los controles y diabéticos de 45 días. Los resultados indican que en la fase temprana de la diabetes, las mitocondrias de la retina despliegan adaptaciones que les permiten mantener sus capacidades energéticas y prevenir el estrés oxidante. El estrés oxidante observado a tiempos largos de la hiperglucemia sugiere que en estados crónicos estos mecanismos de adaptación pueden perderse.

## **ABSTRACT.**

The retina requires a high amount of energy, which is provided mainly by high glycolytic rate; in addition, the retina possess the highest respiration rate compared to any other tissue tested. Therefore oxidative phosphorylation represents an important source of energy for this tissue. Despite this, there is little information on mitochondrial efficiency in the retina. Furthermore the alterations in mitochondrial activity are strongly related to various retinal diseases such as diabetic retinopathy. Consequently the study and characterization of mitochondrial activity of the retina are of crucial importance. This work presents a micro-method for differential centrifugation, allowing optimal retrieval of a mitochondrial fraction from rat retinas, with suitable morphological and functional characteristics to perform their bioenergetics activity, thus to deepen in its function and possible changes in diabetic retinopathy. Thus we evaluate the oxygen consumption via polarographic method, the activity of respiratory complexes by spectrophotometric methods and their transmembrane potential by safranin fluorescence in mitochondria from normal and streptozotocin-diabetic rats. Isolated mitochondria from normal rat retinas showed a resting oxygen consumption rate of  $14.6 \pm 1.1$  natgO (min.mg prot) <sup>-1</sup> and a respiratory control of 4. Mitochondria from 7, 20 and 45 days-diabetic rats, showed an increase of oxygen consumption rate, as well as rise in the activity of the electron transport complexes, and a decrease of

mitochondrial membrane potential. Despite this, the synthesis of ATP was unchanged. GDP, an inhibitor of UCPs proteins, increased mitochondrial membrane potential as well as superoxide production in mitochondria of control and 45 days diabetic animals. The results indicate that at early diabetes stages, retinal mitochondria undergo adaptations leading to maintain energy requirements and prevent oxidative stress, suggesting that these adapting mechanisms are disrupted at long periods of diabetes.

## 2. LISTA DE ABREVIATURAS.

AGE	productos de glucosilación avanzada (advanced glycation end-product).
ANT	transportador de nucleótidos de adenina.
AR	aldosa reductasa.
CCCP	carbonilcianuro-m-clorofenilhidrazona.
CR	control respiratorio.
DAG	diacil glicerol.
DCPIP	diclorofenolindofenol.
DHA	dihidroxiacetona.
E3	estado activo o estado 3.
E4	estado de reposo o estado 4.
EPR	epitelio pigmentario de la retina.
ERO	especies reactivas de oxígeno.
FMN	flavín mononucleótido.
GDP	nucleótido de guanosín difosfato.
GADPH	gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa.
G6PDH	glucosa 6 fosfato deshidrogenasa.
G3P	gliceraldehído 3 fosfato
HK	hexocinasa.
KCN	cianuro de potasio.
LDH	lactato deshidrogenasa.
ME	medio de extracción.
MME	membrana mitocondrial externa.
MMI	membrana mitocondrial interna.



natg O	nanoatomos gramo de oxígeno.
NBT	nitro 6 azul de tetrazoleo.
NOS	sintasa de óxido nítrico.
PDE	fosfodiesterasa.
PK	piruvato cinasa.
PKC	proteína cinasa C.
PPTM	poro de permeabilidad transitoria mitocondrial.
RET	transporte reverso de electrones.
RI	receptor de insulina.
SDH	sorbitol deshidrogenasa.
SOD	superóxido deshidrogenasa.
STZ	estreptozotocina.
TMPD	tetrametil-p-fenilenediamina
UCP 2	proteína desacoplante 2 (uncoupling protein 2).
VEGF	factor endotelial de crecimiento vascular.
$\Delta\psi_m$	potencial de membrana mitocondrial

## 3. INTRODUCCIÓN

### 3.1 Diabetes mellitus.

La diabetes es un problema de salud pública que establece un alto impacto económico y social. Según datos de la Federación Internacional de Diabetes, se estima que en México existen alrededor de 13 millones de diabéticos ([www.idf.org](http://www.idf.org)), de los cuales solo la mitad han sido diagnosticados. Las diversas complicaciones patológicas como consecuencia de esta enfermedad, adicional al deterioro inherente del paciente, causan efectos económicos importantes en la sociedad.

Esta enfermedad se caracteriza principalmente por la presencia de elevados niveles de glucosa en sangre. La glucosa es el sustrato energético más importante para las células; en el hombre, la concentración de glucosa en el plasma (glucemia) se mantiene alrededor de 100 mg/dl (5.6 mM) debido al balance entre la ingesta de alimentos, la utilización de los nutrientes y la producción de glucosa endógena. Los niveles plasmáticos de glucosa, son finamente regulados por un sistema complejo de señales parácrinas y autócrinas dentro de las cuales la acción de la insulina tiene una función preponderante (Anexo 2).

Durante el período postprandial, la entrada de glucosa a las células de los tejidos periféricos, tales como el músculo y tejido adiposo, está regulada por la insulina. Esta hormona es secretada por las células  $\beta$  pancreáticas en respuesta a la ingesta de alimentos, sus efectos son mediados por su receptor (RI), localizado en la membrana celular. La unión de la insulina a su receptor, inicia una cadena de señalización que desemboca en la disminución de glucosa en sangre; de manera general: 1. La insulina estimula la entrada de glucosa a los tejidos periféricos por la transferencia del

transportador de glucosa tipo GLUT4 a la membrana celular. 2. En el hígado, promueve el almacenamiento de glucosa en forma de glucógeno e inhibe la gluconeogénesis y 3. La insulina inhibe la secreción de glucagón de las células  $\alpha$  pancreáticas, lo cual evita la producción de glucosa hepática.

En el periodo de ayuno, la secreción de glucagón, epinefrina, cortisol, hormona de crecimiento, entre otras hormonas contra reguladoras, antagonizan los efectos de la insulina y restablecen los niveles de glucosa en el plasma [1] favoreciendo la glucogenólisis y la gluconeogénesis. En la diabetes esta homeostasis se ve alterada.

La diabetes, se clasifica de manera general en diabetes tipo 1 cuando por la destrucción auto inmune de las células  $\beta$  existe una disminución en los niveles de insulina; y diabetes tipo 2 cuando la respuesta celular a la insulina está alterada. La diabetes tipo 2 se presenta en la mayoría de los casos clínicos, y es frecuente que los pacientes presenten hiperglucemia sin que esta sea detectada, lo que aumenta el riesgo del desarrollo de diversas complicaciones a nivel micro y macrovascular, afectando principalmente el corazón, cerebro, extremidades, riñón, retina y nervios periféricos. Estas complicaciones repercuten de manera importante en la vida productiva y calidad de ésta en los pacientes que la padecen [2].

Existe un gran número de estudios que apuntan a la hiperglucemia constante como el principal factor causal de las diferentes complicaciones de la diabetes [3, 4]. La exposición de las células a altos niveles de glucosa, causa cambios agudos en el metabolismo celular, cuando esta exposición es constante y prolongada, se propician cambios irreversibles en la estabilidad de las macromoléculas, provocados por la glicación de proteínas, peroxidación de lípidos y oxidación de ácidos nucleicos [5].

En la diabetes, se encuentran disminuidos los sustratos de la segunda fase de la glucólisis: fosfoglicerato y piruvato, en aquellos tejidos en los que la glucosa entra de manera independiente de insulina, tales como el cerebro y el riñón. Mientras que los sustratos de la primera fase de la glucólisis: hexosas y triosas fosfato se acumulan [6, 7]; la acumulación de estos sustratos ha sido ligada al daño ocasionado por la hiperglucemia. Entre los mecanismos sugeridos, a través de los cuales la hiperglucemia genera las consecuentes alteraciones vasculares, se encuentran: 1) el aumento de la glucosilación no enzimática (glicación); 2) el incremento en la vía de los polioles; 3) activación de la proteína cinasa C (PKC); y 4) el estrés oxidante; siendo esta última la hipótesis más apoyada recientemente [8].

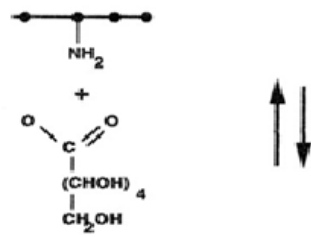
## **3.2 Glucotoxicidad.**

### **3.2.1 Glicación no enzimática.**

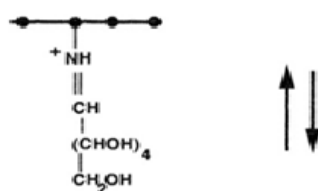
La glicación es la reacción de un grupo amino con el carbonilo de un azúcar reductor [9], esta reacción denominada reacción de Maillard ocurre de manera natural en todos los tejidos y aumenta de manera proporcional con la edad del organismo [10]. La glucosa es el azúcar reductor más abundante en el organismo, sin embargo, cualquier azúcar que posea un grupo carbonilo libre puede reaccionar con los grupos amino primarios de las proteínas para formar bases de Schiff. Esta molécula es estable por un corto tiempo, luego del cual se inicia un proceso de reordenamiento de los enlaces químicos, que da lugar a un producto más estable denominado producto de Amadori [11]. Los productos de Amadori poseen un grupo carbonilo que puede seguir reaccionando con otros grupos amino, durante esta etapa se forman compuestos altamente reactivos que poseen dos grupos carbonilo y que actúan como propagadores de la reacción. Luego de varios meses o inclusive años de contacto con la glucosa, aún

las proteínas de bajo recambio, como por ejemplo el colágeno, originan los productos de glicación avanzada (AGE, del inglés advanced glycosilation end products) (Figura 1) [12].

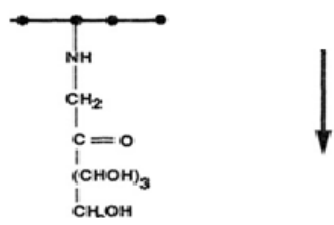
Unión de un azúcar reductora a una proteína



Base Schiff



Producto Amadori



Producto de glucosilación avanzada

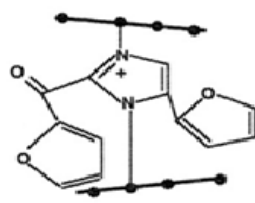


Figura 1. Proceso de glicación de proteínas. Modificada de Bierhaus, et al (1998). [13].

La acumulación de AGEs propicia la alteración de las proteínas, lo que modifica su estructura y función; y aunque la formación de AGEs intracelular es mucho más rápida que en el medio extracelular, debido a que los productos intermediarios del metabolismo de la glucosa tales como la glucosa 6 fosfato (G6P) y el gliceraldehído 3 fosfato (G3P), son mucho más reactivos que la glucosa misma, éste tipo de alteraciones se han demostrado también en las proteínas constituyentes de la matriz extracelular, lo que provoca interferencia en las interacciones matriz-matriz, matriz-célula y célula-célula.

### **3.2.2 Vía del sorbitol.**

El destino de la glucosa dentro de las células, no es solo la glucólisis, un porcentaje de ésta se dirige a la vía del sorbitol mediada por la aldosa reductasa (AR), enzima inicial y limitante de esta vía que cataliza la reducción de una gran variedad de compuestos carbonílicos [14].

La AR tiene baja afinidad por la glucosa por lo que en condiciones normales el porcentaje de glucosa reducido por esta vía es muy pequeño, sin embargo en condiciones de hiperglucemia la conversión enzimática de glucosa a sorbitol se incrementa en algunos tejidos [8]. El sorbitol es una molécula que no difunde fácilmente a través de las membranas celulares, por lo que su concentración podría generar estrés osmótico; sin embargo las concentraciones intracelulares de sorbitol en los diferentes tejidos varían y en ocasiones están muy por debajo de poder generar dicho estrés. A pesar de que la vía del sorbitol ocurre de manera normal en la mayoría de los tejidos, no se conoce su función exacta; se le ha relacionado con funciones de protección osmótica, detoxificación celular y recientemente se le adjudica una función importante mediando los procesos de señalización de citocinas [15].

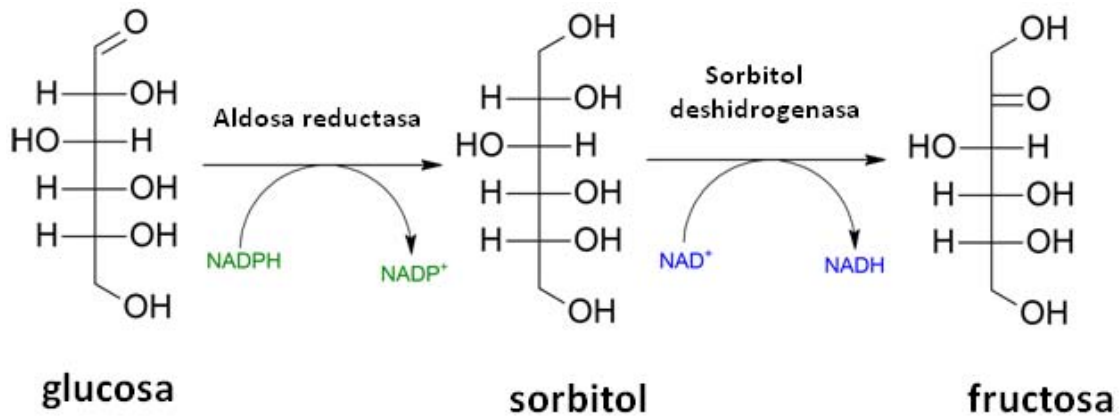


Figura 2. Esquema general de la vía del poliol.

Como se puede observar en la figura 2, en el segundo paso de la vía de los polioles, el sorbitol se oxida a fructosa por acción de la enzima sorbitol deshidrogenasa (SDH), la cual es totalmente dependiente de  $\text{NAD}^+$  como aceptor de equivalentes reductores. La disminución del  $\text{NAD}^+$ , provoca la inhibición de la actividad de la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), frenándose con ello la glucólisis, causando un aumento en la concentración de G3P lo cual se acompaña de un aumento de los niveles de triosas fosfato y dihidroxiacetona fosfato (DHAP), compuestos altamente reactivos, que pueden glicar proteínas y generar estrés oxidante. Por otro lado ya que la AR requiere NADPH, su sobre activación disminuiría los niveles de esta molécula necesaria para la regeneración del GSH, un importante antioxidante, por lo que la disminución de éste favorecería el desarrollo de estrés oxidante en los tejidos [8].

### 3.2.3 Activación de la proteína cinasa C (PKC).

La PKC pertenece a la familia de las serinas/ treoninas cinasas y presenta, por lo menos 11 isoformas codificadas por genes distintos [16] y están involucradas en múltiples eventos de transducción celular. Se clasifica en tres subfamilias distintas de acuerdo a su dependencia por diferentes activadores: 1. PKC convencionales ( $\alpha$ ,  $\beta$  I,  $\beta$  II,  $\gamma$ ) activadas por fosfatidil serina, por diacilglicerol (DAG) y  $\text{Ca}^{++}$ ; 2. PKC nuevas ( $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$ ,

θ) se activan por PS y DAG, pero no dependen de  $\text{Ca}^{++}$ ; y 3. PKC atípicas ( $\lambda$  /  $\iota$ ,  $\zeta$ ) las cuales son insensibles tanto a DAG como al  $\text{Ca}^{++}$  [17].

Se propone que la hiperglucemia, genera un aumento en los niveles de DAG debido al incremento en su síntesis de novo a partir de intermediarios glucolíticos, en particular la DHAP y de su precursor G3P [18].

La sobre activación de PKC (se desconoce la isoforma) se ha implicado en las complicaciones microvasculares, principalmente en las células endoteliales, en las que regula: 1. La expresión de la sintasa del óxido nítrico endotelial (eNOS). 2. El aumento en la síntesis de la endotelina-1 (ET-1), lo cual provoca vasoconstricción e hipoxia tisular. 3. La estimulación de la expresión del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), del factor de crecimiento transformante- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1), del inhibidor 1 del activador del plasminógeno (PAI-1), y la activación del factor nuclear  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B), todo lo cual contribuye a la angiogénesis, al aumento de la expresión de moléculas de adhesión y a la acumulación de proteínas de la matriz extracelular tales como la fibronectina y colágena [19].

### **3.2.4 Estrés oxidante.**

Los radicales libres son moléculas o regiones de macromoléculas que contienen uno o más electrones no apareados en sus orbitales atómicos, dichos electrones, le confieren a la molécula un alto grado de reactividad. Los radicales que derivan del oxígeno llamados especies reactivas de oxígeno (ERO), representan la clase más importante de radicales generados en los sistemas vivos [19, 20]. El oxígeno molecular tiene una configuración electrónica única y es en sí mismo un radical, la adición de un electrón al oxígeno, forma al anión radical superóxido. El anión superóxido, se considera la principal ERO, debido a que al interactuar con otras moléculas genera ERO secundarias



[20, 21]. Las ERO se generan de manera normal como productos secundarios durante el metabolismo oxidativo y tienen una función dual dentro de las células: los niveles moderados de dichas moléculas se relacionan con la inducción y mantenimiento de diversas vías de señalización que incluyen el crecimiento y diferenciación celular [21, 22]; mientras que un exceso en la concentración de estas moléculas puede generar estrés oxidante, el cual tiene efectos citotóxicos.

La célula cuenta con un sistema antioxidante capaz de controlar la sobre producción de ERO, dicho sistema incluye a los sistemas primarios o preventivos y los secundarios o rompedores de cadena. Dentro de los sistemas preventivos se encuentran enzimas antioxidantes tales como la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa, la peroxidasa, glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6PDH) entre otras, así como moléculas no enzimáticas tales como el glutatión (GSH), el  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E) y ácido ascórbico (vitamina C), que permiten el control continuo de los niveles de ERO. Vías como la de las pentosas fosfato a su vez garantizan el amortiguamiento del sistema redox celular a través de la reducción de equivalentes NADPH, necesario para la reducción del glutatión. Por otro lado los sistemas secundarios son capaces de reparar o eliminar los productos que resultan del daño a proteínas, lípidos y DNA, dentro de los que se incluyen oxidorreductasas, proteasas y fosfolipasas.

El estrés oxidante se define entonces como el desequilibrio entre la formación y eliminación de las ERO [22, 23]. La pérdida en el control de los niveles de las ERO, se ha relacionado también con diversas patologías como el cáncer y enfermedades neurodegenerativas.

La mitocondria es considerada la principal fuente de ERO. Datos obtenidos in vitro, sugieren que cerca del 2% del oxígeno consumido en estado en reposo se debe a la formación de superóxido [23, 24, 25]. La alteración en la actividad mitocondrial se

relaciona con una alta producción de ERO. Asimismo, se ha observado que en los tejidos con una alta demanda energética y consumo de oxígeno como el corazón, músculo esquelético y tejido nervioso, presentan una mayor incidencia de alteraciones en la función mitocondrial.

### **3.3 La mitocondria.**

Las mitocondrias se localizan en el citoplasma de todas las células eucariontes, varían de manera considerable en tamaño y forma, dependiendo del tipo celular y estado metabólico; típicamente son elipsoides, de aproximadamente 0.5  $\mu\text{m}$  de diámetro y 1  $\mu\text{m}$  de longitud. En los últimos años se identificó que dependiendo de las condiciones metabólicas las mitocondrias se pueden fusionar o fisiónar formando una red dinámica [25, 26]. Están involucradas en diversos procesos esenciales para la sobrevivencia y función celular, incluyendo la producción de energía, control del estado redox y la homeostasis de calcio [14]. Adicionalmente, la producción de EROs les confiere un papel preponderante en mecanismos de señalización y muerte celular [25, 26]. Este organelo contiene dos compartimentos delimitados por una membrana externa y una interna. La membrana externa es permeable a iones y metabolitos pequeños, mientras que la membrana interna es totalmente impermeable al paso de iones; presenta invaginaciones denominadas crestas, las cuales varían con la actividad respiratoria de las células debido a que contiene las proteínas que median la fosforilación oxidativa. El compartimento mitocondrial interno consiste en una sustancia de apariencia densa, denominada matriz mitocondrial, en la cual están contenidas enzimas solubles del metabolismo oxidativo (ciclo de Krebs y oxidación de ácidos grasos), así como sustratos, iones inorgánicos y cofactores nucleotídicos, además de la maquinaria genética mitocondrial que incluye DNA, RNA y ribosomas, [14].

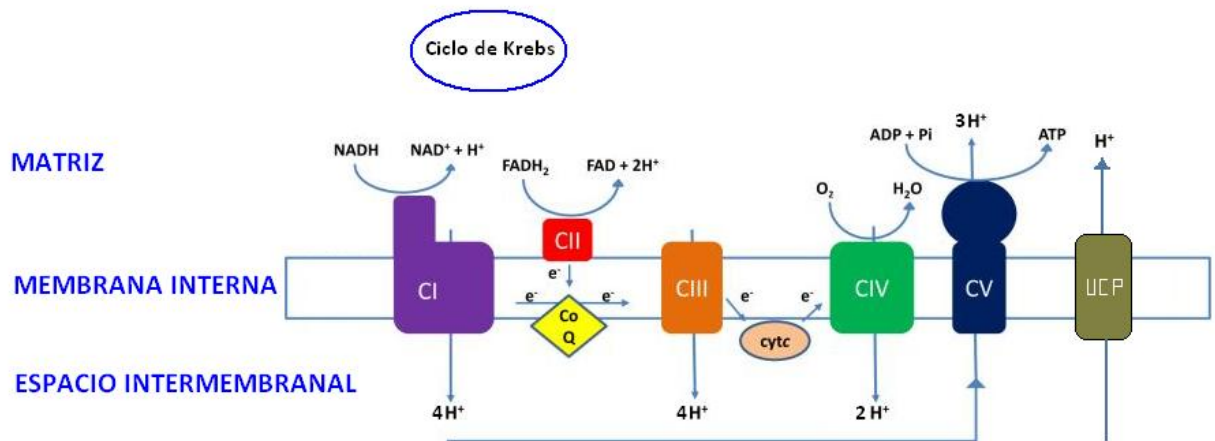
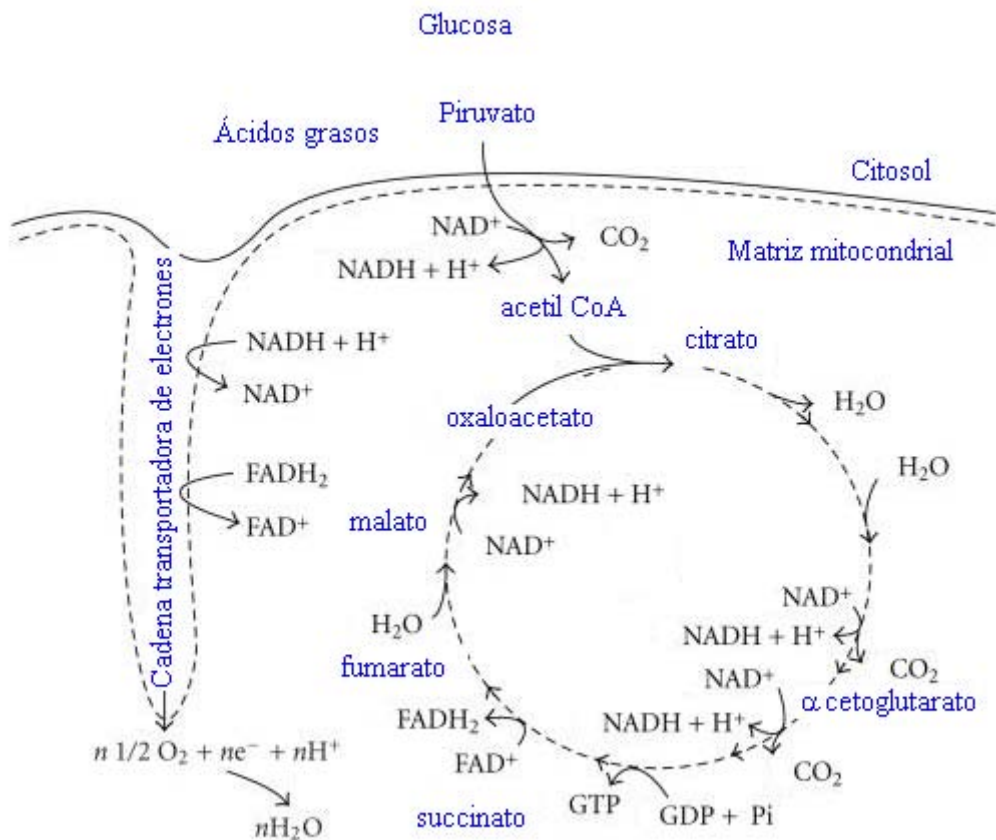


Figura 3. Esquema general de la respiración mitocondrial. Los sustratos provienen de la glucosa y ácidos grasos, estos se oxidan durante el ciclo de Krebs generando NADH y FADH que alimentan la fosforilación oxidativa. Complejo I, II, III, IV y V (CI, CII, CIII, CIV y CV); citocromo C (Cyt C); Coenzima Q (CoQ) y proteína desacoplante (UCP). Imágenes modificadas de [27, 28].

### 3.3.1 Regulación de la fosforilación oxidativa.

La mitocondria es el principal sitio de generación de energía en condiciones aeróbicas. La oxidación de la glucosa, comienza con la glucólisis en el citoplasma en donde se genera NADH y piruvato. El NADH citosólico, puede donar sus equivalentes reductores al transporte de electrones mitocondrial a través de los sistemas de transporte de malato/aspartato y glicerol fosfato. El piruvato se transporta a la mitocondria donde es oxidado mediante las reacciones del ciclo de Krebs, generándose agua, CO<sub>2</sub>, 4 moléculas de NADH y una de FADH<sub>2</sub>, sustratos indispensables para la producción de ATP durante el proceso de la fosforilación oxidativa (Figura 3). Este proceso se lleva a cabo por una cadena transportadora de electrones compuesta por 5 complejos multiproteicos, localizados en la membrana interna mitocondrial. El flujo de electrones ocurre debido a la organización de estos complejos de acuerdo con su potencial redox, lo que favorece su oxidación / reducción en cadena. Los electrones son cedidos por las moléculas de NADH y FADH<sub>2</sub> producidas en el citosol y el ciclo de Krebs. El NADH dona electrones a la NADH:ubiquinona oxidoreductasa (Complejo I), la cual transfiere electrones a la ubiquinona, reduciéndola a ubiquinol. La ubiquinona puede, además, ser reducida por los electrones donados por varias deshidrogenasas, incluyendo la succinato:ubiquinona oxidoreductasa (Complejo II) y la glicerol 3 fosfato deshidrogenasa (G3PDH). Los electrones reductores de la ubiquinona se transfieren a la ubiquinol citocromo c oxidoreductasa (Complejo III) por el radical ubisemiquinona. El transporte de electrones continúa del citocromo C a la citocromo C oxidasa (complejo IV) y finalmente al oxígeno molecular con la consecuente formación de agua. La transferencia de electrones a través de los complejos I, III y IV se acompaña de la translocación de protones (H<sup>+</sup>) de la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembranal, lo que genera la fuerza protón motriz ( $\Delta p$ ); ésta tiene dos

componentes: el potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ) y el gradiente de pH entre la matriz y la membrana interna mitocondrial ( $\Delta pH$ ). Bajo la mayoría de las condiciones la fuerza protón motriz depende primordialmente del  $\Delta\psi_m$ ; este potencial, se estima en de -150 mV a -180 mV (negativo en la matriz) e influye en todas las funciones mitocondriales [29, 30].

La ATP sintasa (complejo V), es capaz de aprovechar la fuerza protón motriz, acoplando la difusión facilitada de los protones a través de la membrana mitocondrial interna, a la síntesis de ATP, fenómeno denominado acoplamiento de la fosforilación oxidativa.

Por lo tanto, la actividad bioenergética de la mitocondria está regulada por: (1) La disponibilidad de sustratos del citoplasma, (2) el recambio del ATP/ADP, (3) el ambiente iónico del citoplasma, particularmente el  $Ca^{2+}$ , y (4) el estado redox de la célula. Cambios en estos parámetros ocurren de manera normal en respuesta a la demanda energética, y se han observado alterados en ciertas patologías, particularmente en células excitables tales como el músculo y el cerebro [29, 30].

La primera aproximación para evaluar la regulación de la actividad respiratoria mitocondrial es a través del registro del consumo de oxígeno en las mitocondrias aisladas [30, 31, 32]. El coeficiente de control respiratorio (CR), es el índice del acoplamiento de la actividad mitocondrial respiratoria y la síntesis de ATP, dicho de otra manera, el valor del CR expresa el grado de dependencia del consumo de sustratos oxidables para la síntesis de ATP. Los estados respiratorios se determinan experimentalmente valorando el comportamiento respiratorio de mitocondrias aisladas durante la incubación en un medio isotónico; así, se define como respiración en estado 4 o estado de reposo, a la tasa de consumo de oxígeno en ausencia de ADP y como el estado 3 o estado activo, el que se promueve por la adición de ADP que se acompaña de

un incremento en el consumo de oxígeno. El consumo de oxígeno en el estado 3 es más grande que el 4 cuanto mayor sea el grado de acoplamiento (síntesis de ATP), por lo tanto, el cociente entre estado 3 y 4 nos da el valor de CR (Figura 4).

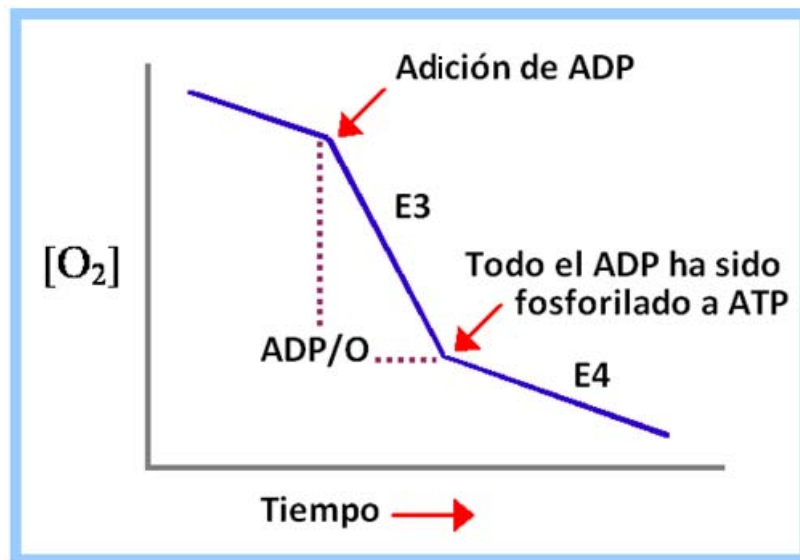


Figura 4. Ejemplo del consumo de oxígeno y estimación del control respiratorio de mitocondrias aisladas, evaluadas con el uso de un oxímetro. Modificada de: <https://www.rpi.edu/dept/bcbp/molbiochem/MBWeb/mb1/part2/oxphos.htm>

### 3.3.2 Generación de superóxido mitocondrial.

El oxígeno molecular es el aceptor final de los electrones en la cadena respiratoria; los diferentes complejos pueden catalizar la transferencia de uno o dos electrones por lo que la reducción incompleta del oxígeno puede ocurrir a cualquier nivel de la cadena respiratoria (principalmente en los complejos I y el III), con la consiguiente generación de superóxido [32]. La generación de superóxido en la mitocondria depende del  $\Delta\psi_m$ , que regula el estado redox de los componentes de la cadena respiratoria. Cuando la diferencia del potencial **electroquímico** generada por el gradiente de protones es alta, se

produce una disminución en la velocidad del flujo de electrones a través de la cadena respiratoria, lo que favorece el aumento en el tiempo en el que los transportadores intermediarios (flavinas-deshidrogenasas, coenzima Q, citocromo b y hierro-proteínas) permanecen reducidos, suscitando la producción de superóxido [24, 25, 32, 33]. Por lo tanto, un aumento en la disponibilidad de sustratos oxidables, como ocurriría en condiciones de hiperglucemia [34, 35, 36], estimularía el flujo a través de la cadena respiratoria y el  $\Delta\psi_m$ , lo que a su vez favorecería la formación de superóxido.

La producción mitocondrial de ERO depende entonces, principalmente del estado redox de los centros donadores de electrones de los complejos I y III, el centro flavin mono nucleótido (FMN), centros Fe-S y sitios de unión a ubiquinona. Dentro del complejo I se genera superóxido en la región del sitio de unión al NADH: N1a y N2 [29, 30]. La formación de superóxido por el complejo II ocurre en condiciones en las que el succinato es el sustrato principal del ciclo de Krebs, entonces la mayoría de los electrones fluyen a través de los complejos III y IV al oxígeno, generando suficiente fuerza protón motriz para conducir una proporción del flujo de electrones de manera inversa, es decir hacia el complejo I, proceso denominado transporte reverso de electrones (RET por sus siglas en inglés reverse electron-transport) (Figura 5) [29, 30]. Algunos autores consideran que la generación de ERO a través del RET es mucho más significativa que la formación de ERO ligada a los sustratos del complejo I [36, 37].

Evidentemente cualquier aceleración en el flujo de electrones, suprime la generación de superóxido, al menos en el complejo III y durante RET. El paso de los electrones a través de la cadena respiratoria, se incrementa generalmente al disminuir el potencial transmembranal y como consecuencia la generación de superóxido se reduce. Esta aceleración del flujo de electrones ocurre durante la síntesis de ATP, cuando el flujo de

protones a través de la ATP sintasa induce un aumento en el consumo de oxígeno, o a través de la actividad desacoplante de proteínas en la membrana interna mitocondrial tales como: las proteínas desacoplantes (UCPs), el transportador de adenin nucleótidos (ANT) y el poro de permeabilidad transitoria mitocondrial (PPTM).

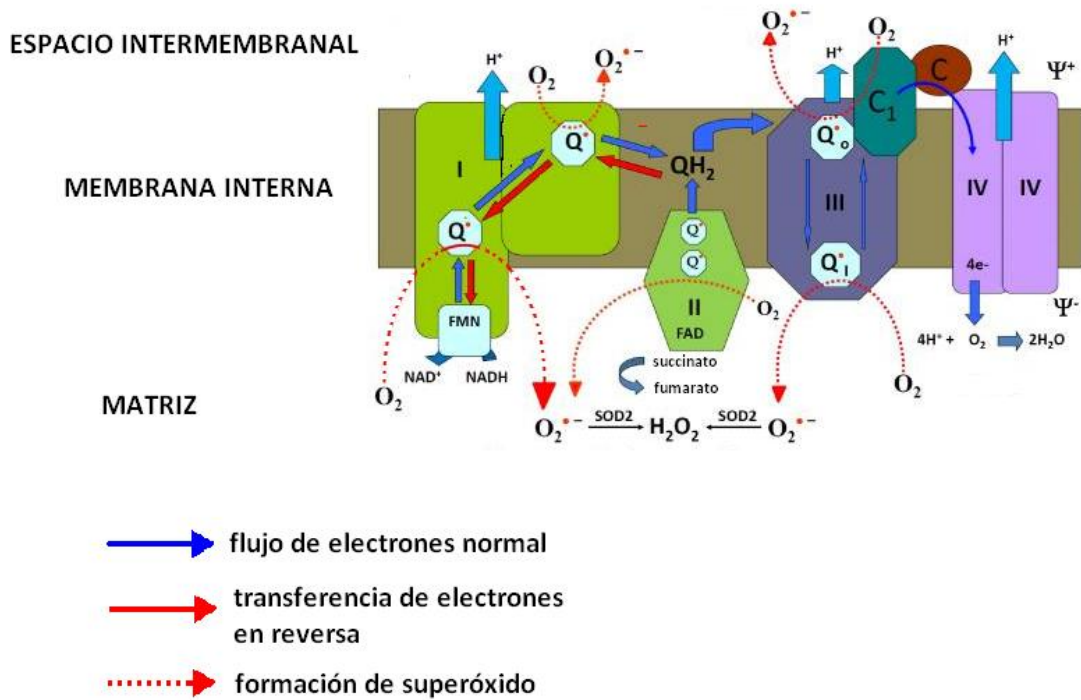


Figura 5. Generación de superóxido en la cadena transportadora de electrones. Modificado de Dikalov, S. 2011 [37, 38].

Además de la cadena respiratoria, una cantidad considerable de ERO puede producirse por otras proteínas mitocondriales tales como la  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa, la monoamina oxidasa (MAO) y el factor iniciador de la apoptosis (AIF) entre otras [38, 39,40].



### 3.3.3 Proteína desacoplante 2 (UCP2).

El término “desacoplamiento” se introdujo para definir el consumo de oxígeno mitocondrial sin que ocurra la síntesis de ATP. El desacoplamiento conlleva a diferentes consecuencias a nivel mitocondrial y celular: 1) La disminución del potencial de membrana mitocondrial, 2) la aceleración del consumo de oxígeno mitocondrial, 3) la disminución de la relación ATP/ADP, 4) la disminución en la relación NADH/NAD y 5) el decremento en la producción de superóxido mitocondrial [40, 41].

Skulachev y colaboradores propusieron la existencia de un mecanismo especial de “desacoplamiento moderado” que previniera la inhibición de la respiración y la acumulación de los reductores de oxígeno en el estado 4 y por tanto la generación de superóxido. El mecanismo en cuestión debería ser apagado cuando los niveles de ADP aumentaran, y encendido cuando los niveles de ADP disminuyeran. La operación de tal sistema resultaría en un aumento en el consumo de protones y oxígeno en el estado 4 [41-43]. Posteriormente se demostró que las proteínas UCP cumplen con estas funciones. El “desacoplamiento moderado”, implica un aumento limitado en la permeabilidad de los protones a través de la membrana interna mitocondrial, sin afectar la síntesis de ATP.

Las UCPs pertenecen a una subfamilia de proteínas de la membrana interna mitocondrial, que transportan aniones, dentro de las que se incluyen el ANT y el transportador de fosfato inorgánico. Su principal característica es tener una estructura compuesta por tres dominios repetidos, cada uno con dos hélices alfa transmembranales [26, 27]. La proteína desacoplante canónica (UCP1) se descubrió en el tejido adiposo y es considerada el principal generador de calor en mamíferos. Esta proteína disipa el gradiente de protones generado por la cadena respiratoria, sin que ocurra la fosforilación de ADP, con la consecuente liberación de calor. Posteriormente se describieron 5

proteínas similares en mamíferos (UCP1-UCP5), de las cuales las UCP1, 2 y 3 presentan un 60%-70% de identidad en su secuencia. La UCP1 se expresa principalmente en el tejido adiposo marrón y la UCP3 en músculo y tejido adiposo, mientras que la UCP2 se ha encontrado en varios tejidos tales como el riñón, páncreas, células inmunológicas y el cerebro. La amplia distribución de UCP2 supone su participación en una gran variedad de procesos tales como la formación de ERO, control del consumo de alimentos, secreción de insulina e inmunidad.

La regulación de UCP es compleja y ocurre a varios niveles, diversos estudios describen un incremento en su expresión a través de la acción de varios factores de transcripción, tales como PPAR  $\alpha$  y  $\gamma$  (peroxisome proliferator-activated receptors) y FOXA2 (forkhead box protein A2) [43, 44], asimismo su actividad se promueve por ácidos grasos y se inhibe por nucleótidos de purina, siendo los más potentes el GDP y el GTP. Adicionalmente, el incremento en los niveles de ERO mitocondrial se ha relacionado con la inducción en la expresión y actividad de la UCP2 en diversos tipos celulares, en este sentido existe evidencia de interacciones directas de la UCP2 con el superóxido así como con productos de la lipoperoxidación, tales como el 4-hidroxi 2-nonenal [44, 45], por lo que se le considera al desacoplamiento mitocondrial producido por esta proteína un mecanismo de respuesta rápida y transitoria que reduce la formación de ERO.

Recientemente, diversos autores sugieren que la UCP2 actúa como un “switch” (interruptor) metabólico que favorece el metabolismo de los ácidos grasos y glutamina sobre el metabolismo de la glucosa [45, 46]. A pesar de los múltiples esfuerzos por entender la relevancia de la actividad de estas proteínas sigue siendo tema de gran controversia.

### 3.4 La retina: estructura y función.

La retina de los vertebrados es el tejido nervioso localizado en el fondo del ojo, encargado de transducir la señal luminosa y transmitirla al cerebro. Estructuralmente está compuesta por el epitelio pigmentario (EPR) y la retina neural.

El EPR es un componente esencial en el sistema visual, forma parte de la barrera hematorretiniana, está compuesto por una monocapa de células neuroepiteliales localizadas entre los capilares de la coroides y la retina neural; muestra una amplia variedad de funciones, incluyendo la fagocitosis de los segmentos externos de bastones y conos, la absorción y metabolismo del retinol en el ciclo visual, la secreción de componentes de su matriz extracelular, la detoxificación de fármacos, la síntesis de la melanina, la absorción de la luz y transporte de sustratos entre los fotorreceptores y la coroides [46, 47].

La retina neural, es una capa de tejido nervioso transparente que se encuentra entre el EPR y el humor vítreo; su función es capturar los fotones y transformar la señal en una respuesta eléctrica que se envía al cerebro para la formación de imágenes. La retina está compuesta de 6 diferentes tipos celulares organizados en tres capas que contienen los cuerpos neuronales y 2 capas de interacciones sinápticas denominadas plexiformes. La capa nuclear externa que se forma por las células fotorreceptoras, conos y bastones, cuyos segmentos externos están en contacto directo con el EPR; la capa nuclear interna formada por los somas de células bipolares, horizontales, amacrinas e interplexiformes, y la capa de somas de las células ganglionares cuyos axones forman el nervio óptico. Además de las neuronas, en la retina existen tres tipos de células gliales, la microglía, los astrocitos y las células de Müller. Las células de Müller son las más abundantes y se extienden desde la capa de células ganglionares, hasta rodear los segmentos internos de

los fotorreceptores y tienen una función crucial en el soporte metabólico para las neuronas (Figura 6).

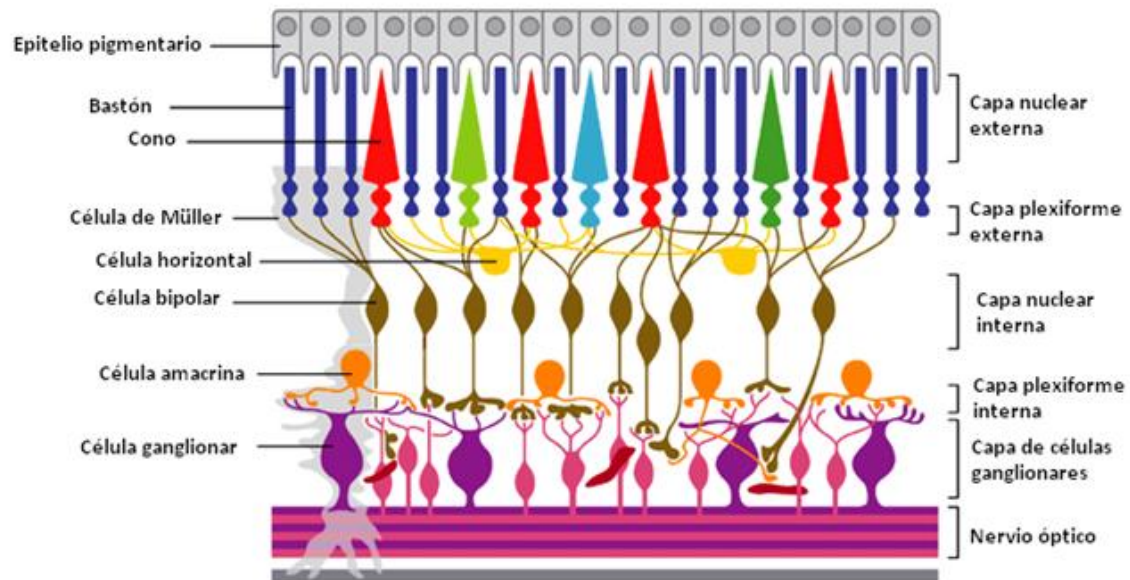


Figura 6. Estructura de la retina de vertebrados.

La fototransducción es la conversión de la señal luminosa en impulsos nerviosos (eléctricos), este proceso comienza cuando la luz alcanza los segmentos externos de los fotorreceptores; estas células responden a la luz gracias a que contienen rodopsina, el pigmento visual. Esta proteína transmembranal llamada opsina, está unida al cromóforo retinal derivado de la vitamina A. En la oscuridad, el retinal se encuentra en la forma *cis*, la absorción de un fotón por la rodopsina, causa la isomerización del retinal a la forma *trans*, produciéndose un cambio conformacional de la rodopsina el cual promueve el intercambio de los nucleótidos GDP por GTP de una proteína G denominada transducina, la cual consta de 3 subunidades (alfa, beta y gama), siendo la subunidad alfa ( $T\alpha$ -GTP) la que activa a otra enzima denominada fosfodiesterasa (PDE). Como consecuencia, la activación de la fosfodiesterasa lleva a la degradación de

GMPC. En condiciones de oscuridad el contenido de GMPC es alto y permite la apertura constante de los canales de  $\text{Na}^+$  en el segmento externo del fotorreceptor, originándose de esta forma la denominada corriente oscura que da como resultado la despolarización del fotorreceptor (potencial de membrana de  $-40 \text{ mV}$ ) lo que permite la liberación continua del principal neurotransmisor inhibitorio de la retina: el glutamato (Figura 7).

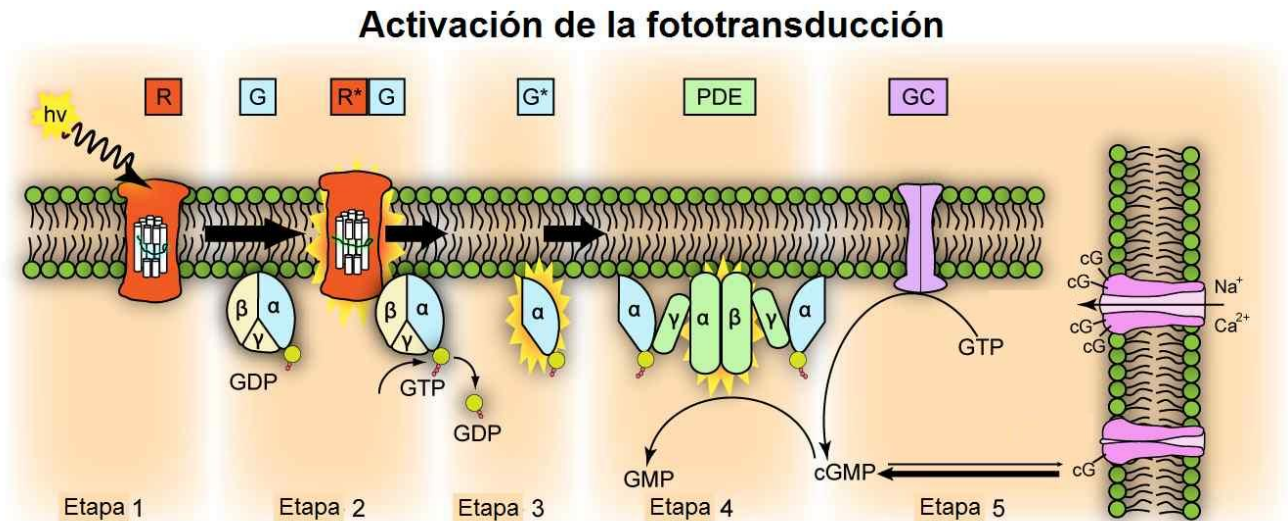


Figura 7. Activación de la fototransducción. Rodopsina (R), rodopsina activada ( $R^*$ ), Proteína G transducina (G), transducina activada ( $G^*$ ), fosfodiesterasa (PDE), guanilato ciclasa (GC).

En condiciones de iluminación, los niveles de GMPC disminuyen, ocasionando el cierre de los canales de  $\text{Na}^+$ , y el fotorreceptor se hiperpolariza. Este cambio en el potencial de membrana conduce al cierre de los canales de calcio dependientes de voltaje que conlleva a la disminución de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ . El resultado final es una disminución de la secreción del neurotransmisor glutamato por parte de los fotorreceptores [47, 48]. Los fotorreceptores transmiten la información recibida en forma de impulsos nerviosos a las células bipolares; esta señal es modulada por las células horizontales en la capa plexiforme externa. En la capa plexiforme interna la información que proviene de las

células bipolares pasa a las células ganglionares y se modula por las células amacrinas. Los axones de las células ganglionares constituyen el nervio óptico. La transmisión sináptica y la fototransducción que ocurren en la retina requieren una gran cantidad de energía, lo que hace de ese tejido uno de los más activos metabólicamente [48, 49].

Dentro de la retina los vasos sanguíneos constituyen alrededor del 5%. Las capas internas de la retina reciben oxígeno y nutrientes a través de los capilares de la arteria central de la retina, en tanto que las células fotorreceptoras reciben los nutrientes de la circulación coroidea, que corresponde al 65-85% del flujo sanguíneo que llega a la retina.

La glucosa es la principal fuente de energía del sistema nervioso y particularmente de la retina, cerca del 60% de la glucosa que ingresa a la retina, proviene a través del EPR [49, 50]. Asimismo, la demanda de oxígeno tanto en el EPR como en la capa de células fotorreceptoras es de las más altas [49-51], de hecho el 80% del oxígeno total consumido en la retina ocurre en esta capa [51, 52]. Tanto en el EPR como en los segmentos internos de los fotorreceptores existe una gran cantidad de mitocondrias, indicando la importancia de este organelo como proveedor de energía para el tejido [52, 53].

En este sentido resulta relevante el que una amplia gama de retinopatías se ha asociado a daños en la función mitocondrial [53, 54]; la neuropatía óptica hereditaria de Leber (LHON), es el primer ejemplo de neuropatías ópticas mitocondriales, se genera por la herencia materna de mutaciones específicas en el ADN mitocondrial (ADNmt), asimismo la reciente identificación de mutaciones en el gen nuclear OPA1 como el factor causal en la atrofia óptica dominante (DOA, tipo Kjer) trajo el hallazgo inesperado de que este gen codifica para una proteína mitocondrial, lo que sugiere que ambas enfermedades pueden estar unidas por patogénesis similares, los polimorfismos

en este mismo gen además se asocian con el glaucoma de tensión normal, lo que podría ser considerado como una neuropatía óptica determinada genéticamente que muestra similitudes con las anteriores [53, 54]. A pesar de la descripción de estas alteraciones no existe información suficiente relacionada con la actividad mitocondrial y su regulación en condiciones normales o fisiológicas en este tejido.

### **3.5 Retinopatía diabética.**

La retinopatía diabética en México, presenta una prevalencia del 40-50% en pacientes diabéticos tipo 2 y es mayor en los pacientes tipo 1 [54, 55]. Es una de las 3 primeras causas de ceguera en el mundo, se caracteriza principalmente por alteraciones vasculares tales como el aumento en la permeabilidad vascular, formación de exudados duros y edema macular. Estos síntomas se acompañan de la pérdida de células endoteliales y pericitos, la oclusión de capilares, lo que genera zonas de isquemia y la formación de microaneurismas y hemorragias retinianas. Las zonas isquémicas, se sugiere, estimulan la producción del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) que induce la neovascularización de capilares estructuralmente anormales y propensos a sangrar, provocando desprendimiento de la retina y ceguera [55, 56]. Adicionalmente, se han descrito alteraciones neurales de la retina incluso antes de que se presenten las alteraciones vasculares antes mencionadas. Tales alteraciones en la retina neural se manifiestan con cambios en el electroretinograma, pérdida de la visión nocturna y falta de sensibilidad a los colores [51,52, 56, 57]. El reconocimiento de dichas alteraciones ha generado controversia y sobre todo un nuevo enfoque en el estudio de la patogénesis de la retinopatía diabética. Aunque la causa de estas alteraciones se desconoce, numerosas investigaciones indican que la hiperglucemia constante contribuye al desarrollo del daño vascular y neural en la retinopatía diabética [57-59].

### 3.6 Antecedentes directos

La retinopatía diabética es una de las principales complicaciones causadas por la diabetes y la primera causa de ceguera en los adultos, se caracteriza por alteraciones progresivas en la microvasculatura, precedidas por daños en las células gliales y neuronales [51]. Los daños en la retina se presentan en el 25% de los pacientes con diabetes tipo 1 en los primeros años (1-5) de diagnosticada la enfermedad; la incidencia se incrementa al 60% después de 5 años y al 80% después de los 15 a 20 años [59, 60]. Actualmente el tratamiento para este padecimiento se reduce al uso de fármacos y/o cirugía para subsanar o prevenir los daños vasculares y únicamente el estricto control de la glucemia puede reducir el riesgo de presentar la retinopatía diabética. A pesar de la extensa investigación en el campo, las bases moleculares y celulares que inician la retinopatía diabética, no han sido esclarecidas. Por lo que el estudio de los mecanismos por los cuales la diabetes afecta a la retina es necesario para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas.

En diferentes modelos animales y en tejidos de pacientes diabéticos, se ha observado que la hiperglucemia crónica favorece diversas alteraciones metabólicas dentro de las cuales se sugiere que la generación de estrés oxidante por la mitocondria antecede y favorece las demás [8].

En los mamíferos, el genoma mitocondrial codifica alrededor de 1,100 proteínas, dentro de las cuales, las proteínas asociadas a procesos clave como la fosforilación oxidativa, dinámica y biogénesis del organelo, comprenden solamente una tercera parte de su proteoma; asimismo, el proteoma mitocondrial entre dos tipos celulares puede variar entre el 20 y 30%, reflejando la especialización de la función y actividad de este organelo, dentro de cada tipo celular [60, 61]. A pesar de esta gran diversidad del



genoma mitocondrial que existe entre los diferentes tipos celulares, así como las particularidades metabólicas de cada tejido, se propone que las alteraciones observadas en la actividad mitocondrial de tejidos afectados por la diabetes tales como el corazón y riñón, ocurren también en la retina.

Existen suficientes evidencias que indican que la hiperglucemia constante es un factor importante para el desarrollo del daño vascular y neural en la retina durante la diabetes. Como se explicó anteriormente, se han descrito diversas alteraciones metabólicas generadas por la hiperglucemia (aumento en la vía de los polioles, activación de la PKC, aumento de la glicación de proteínas y estrés oxidante); la importancia de tales anomalías en el desarrollo de la retinopatía diabética se apoya con base a los resultados obtenidos en otros tejidos de pacientes diabéticos y en modelos experimentales. Sin embargo, estos resultados no han sido consistentes, por ejemplo, la inhibición de la aldosa reductasa en perros diabéticos previene la generación de la neuropatía diabética, pero no la retinopatía [61, 62]; asimismo varios ensayos clínicos han demostrado la ineficacia de los inhibidores de la aldosa reductasa para prevenir daños en la retina en humanos [62-64]. De igual manera, aunque existen diversas evidencias de la acumulación de AGE en los pericitos, vasos y neuroglia de la retina durante la progresión de la diabetes [64, 65], existen otros estudios que demuestran que no existe dicha correlación [65-67]. Lo más importante es que estas alteraciones se observaron en estados avanzados de la enfermedad, por lo que no pueden considerarse la causa de ésta. En este sentido, Brownlee y colaboradores observaron en cultivos de células endoteliales de la aorta con altas concentraciones de glucosa, la disminución en la actividad de la GAPDH asociada al estrés oxidante, con la consecuente acumulación de los sustratos de la primera fase de la glucólisis y la activación de por lo menos tres de los mecanismos propuestos: aumento de AGE, la activación de PKC y la vía del

sorbitol [67, 68]. Asimismo la sobre-expresión de SOD2 y UCP revirtió tal efecto, sugiriendo que la producción de ERO por la mitocondria es la causa principal de la inhibición de dicha enzima y por lo tanto el proceso iniciador de las patologías vasculares ocasionadas por la diabetes [68, 69].

El estrés oxidante generado en la mitocondria durante la diabetes, supone el aumento en el  $\Delta\psi_m$ , tras la acumulación de sustratos (NADH y FADH), tal aumento en el potencial mitocondrial generaría una disminución en la velocidad de la cadena respiratoria favoreciendo el escape de electrones y así un incremento en la generación de ERO; el estrés oxidante generado afectaría la actividad de diversas enzimas tales como GAPDH, y como consecuencia el aumento en los sustratos de la primera fase de la glucólisis y por tanto de la vía del poliol, activación de PKC y concentración de AGE. Por otro lado, las primeras macromoléculas afectadas por las ERO serían las propias de la mitocondria, lo cual favorecería la salida del citocromo C y por tanto muerte celular por apoptosis [8].

Muchos esfuerzos se han enfocado en estudiar las alteraciones mitocondriales y la consecuente generación de estrés oxidante en los diferentes tejidos afectados por la diabetes incluyendo a la retina; a pesar de eso, los mecanismos moleculares a través de los cuales el estrés oxidante contribuye al desarrollo de la retinopatía diabética permanecen ocultos.

La retina se considera un tejido altamente susceptible al daño por estrés oxidante debido a su alta demanda de oxígeno, su gran actividad metabólica y su constante exposición a la luz. Puesto que la mitocondria es la principal fuente de ERO el estudio de este organelo se vuelve un asunto relevante. En este sentido existen diversos estudios que muestran la presencia de alteraciones en la actividad mitocondrial en la retinopatía tales como estrés oxidante, disminución de la actividad de los complejos respiratorios y

salida del citocromo C, daños en el DNA mitocondrial y en su maquinaria de reparación, en las retinas de animales experimentales después de 2-8 meses de inducida la diabetes [69-72]. La incubación de células endoteliales, pericitos y neuronas de la retina con altas concentraciones de glucosa muestran también generación de ERO y muerte celular [72, 58]. Estos resultados parecen indicar que el estrés oxidante es un factor importante en el desarrollo de la retinopatía diabética, sin embargo dado que las alteraciones en la función retiniana manifestadas en el electroretinograma así como la muerte de células ganglionares se han reportado a tiempos menores, entre 2 y 4 semanas después de inducida la diabetes [56,57,73,74], el inicio y la progresión de las alteraciones en la retina ocurridas durante la diabetes, permanecen indefinidos. Asimismo aún no es claro si efectivamente el estrés oxidante es la causa principal de la patología y todavía más importante, no se han identificado las alteraciones ocurridas en la actividad mitocondrial que propicien dicho estrés. A la fecha son pocos los estudios realizados en la evaluación de la actividad mitocondrial de este tejido; como se ha mencionado previamente, la retina no solo es un tejido altamente susceptible al estrés oxidante, sino que además tiene una elevada tasa de consumo de oxígeno y es uno de los tejidos metabólicamente más activos, por lo que consideramos que el reconocimiento en las particularidades de la función mitocondrial así como su regulación, proveerá las herramientas necesarias que permitirán la identificación de las alteraciones en condiciones de diabetes y de muchas otras patologías retinianas [53, 54].

## 4. HIPÓTESIS

Si en efecto el estrés oxidante es el factor determinante de la patogénesis de la retinopatía diabética y éste es ocasionado por la actividad mitocondrial, entonces alteraciones en la actividad mitocondrial que generen un aumento en la producción de superóxido deberán observarse a tiempos cortos de inducida la hiperglucemia.

## 5. OBJETIVOS

### Objetivo principal.

1. Identificar si existen alteraciones en la actividad mitocondrial que generen estrés oxidante en la retina a 7, 20 y 45 días después de la inducción de la diabetes.

### Objetivos particulares.

1. Establecer un método para la obtención de mitocondrias intactas de la retina de la rata que puedan reflejar su actividad in vivo.
2. Evaluar la actividad de las mitocondrias aisladas de la retina de ratas normales y diabéticas: el consumo de oxígeno, control respiratorio, potencial transmembranal, actividad de los complejos respiratorios, síntesis de ATP y generación de superóxido.
3. Definir si existen diferencias en la actividad respiratoria mitocondrial durante la hiperglucemia, que lleven a un estrés oxidante que a su vez pueda iniciar la patología.

## 6. MÉTODOS

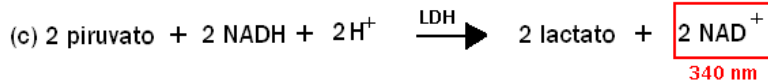
### 6.1 Modelo de diabetes.

Se usaron ratas adultas de la cepa Long-Evans con un peso de 170-200 g. La diabetes se indujo por la inyección intraperitoneal de 98 mg/kg de estreptozotocina (STZ). La glucosa en plasma se determinó con un medidor instantáneo de glucemia marca ROCHE al momento del sacrificio (7, 20 y 45 días después de la administración de STZ) y se consideraron diabéticas si los niveles de glucosa en sangre fueron iguales o mayores a 300 mg/dl. Este procedimiento se considera un modelo experimental de diabetes tipo1, ampliamente utilizado [74].

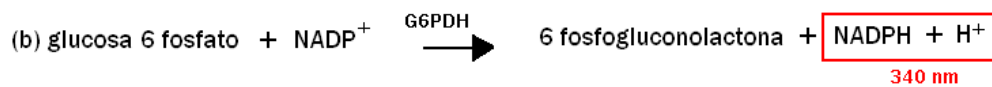
### 6.2 Contenido de ATP, ADP y AMP.

Para la determinación del contenido de adenin-nucleótidos, se homogenizaron 2 retinas en HClO<sub>4</sub> al 6%, se sedimentaron las proteínas por centrifugación y el pH del sobrenadante se neutralizó con KOH-KHCO<sub>3</sub>. El contenido de AMP y ADP (Esquema 1.1) se determinó a partir de la disminución de NADH a 340 nm ( $\epsilon = 6.3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), en una mezcla de reacción que contenía: TEA 430 mM, pH 7.5; MgCl<sub>2</sub>, 100 mM; KCl, 1.8M; NADH 320  $\mu\text{M}$ , fosfoenolpiruvato, 0.7 mM; miocinasa (MK), 1.8 U/ml; piruvato cinasa (PK), 2 U/ml; y lactato deshidrogenasa (LDH) 24 U/ml. Para determinar los niveles de ATP (Esquema 1.2) se monitoreó la disminución de NADPH a 340 nm, en un medio con (TEA, 50 mM, pH7.5; MgCl<sub>2</sub>, 100 mM, NADP, 350  $\mu\text{M}$ ; G6PDH, 0.5 U/ml; glucosa, 50 mM; HK, 2 U/ml) [75, 76].

### 1.1 Determinación de ADP y AMP



### 1.2 Determinación de ATP



## 6.3 Extracción de mitocondrias.

Se homogenizaron de 6 a 10 retinas en 1 ml de medio de extracción (ME): HEPES, 2 mM pH 7.4; manitol 220 mM; sacarosa 10 mM; EDTA 1 mM; taurina 10 mM y albúmina IV deslipidada 1%. La extracción mitocondrial se realizó por centrifugación diferencial; el homogenado se centrifugó a 650g durante 10 min a 4°C, el sobrenadante se centrifugó a 8200g 15 minutos, el pellet (fracción mitocondrial) fue resuspendido en 100µl del mismo ME.

### 6.3.1 Microscopía electrónica.

La fracción mitocondrial se fijó en una solución de glutaraldehído al 3% en amortiguador de cacodilato, pH 7.2 por 2 horas a 4°C, se post-fijó en 2% (v/v) de tetraóxido de osmio, se deshidrató en alcohol etílico y finalmente se embebió en resina epoxi. Se obtuvieron secciones ultrafinas en un microtomo Sorval MT6000, se contrastó con acetato de uranilo y la muestra se examinó con un microscopio electrónico JEOL JEM 12000 EII.

### **6.3.2 Integridad de la membrana mitocondrial externa (MME).**

La integridad de la membrana mitocondrial externa se evaluó midiendo la actividad de la citocromo oxidasa en presencia y ausencia de n-dodecil- $\beta$ -D-maltósido, utilizando el método de ensayo de oxidasa del citocromo c de Sigma. Encontramos 42% de integridad de la membrana mitocondrial externa, similar a la descrita para las mitocondrias de otros tejidos [76, 77].

## **6.4 Actividad respiratoria mitocondrial.**

### **6.4.1 Consumo de oxígeno.**

El consumo de oxígeno se evaluó empleando un electrodo tipo Clark, Warner/Strath Kelvin. Se incubaron 50  $\mu$ g de proteína mitocondrial a 30°C en una cámara con 100 $\mu$ l de ME adicionado con Pi, 2 mM; KCl, 20 mM; MgCl<sub>2</sub>, 1 mM y glutamato/malato 10 mM, el estado activo (E3) se indujo por la adición de 100  $\mu$ M de ADP.

### **6.4.2 Actividad de los complejos respiratorios.**

La fracción mitocondrial se rompió por congelación y descongelación. La determinación de la actividad de los complejos respiratorios (I, II y III) se realizó con el método de Birch-Machin y Turnbull [77, 78], registrando la oxidación y reducción de diferentes sustratos (Figura 8), utilizando un lector de microplacas a temperatura constante de 30°C, en un volumen final de 300  $\mu$ l.

Complejo I. La actividad de este complejo se determinó agregando al medio: albúmina IV 2 mg/ml, antimicina A 2  $\mu$ g/ml, KCN 2 mM, NADH 130  $\mu$ M y decil-ubiquinona 65



$\mu\text{M}$ . La reacción se inició con 50  $\mu\text{g}$  de proteína. Se registró la oxidación del NADH por su absorbancia a 340 nm.

Complejo II. Se incubaron 10  $\mu\text{g}$  de proteína mitocondrial con succinato 20 mM, durante 10 minutos. Posteriormente se agregó: 2,4-diclorofenolindofenol (50  $\mu\text{M}$ ), antimicina A 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , rotenona 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  y KCN 2 mM; la reacción se inició con decilubiquinona (65  $\mu\text{M}$ ), registrándose la reducción de la sal por su absorbancia a 600 nm.

Complejo III. Determinamos la actividad de este complejo agregando al medio de incubación albúmina 2 mg/ml, dodecyl- $\beta$ -D- maltósido 600  $\mu\text{M}$ , rotenona 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , KCN 2 mM y ubiquinol 35  $\mu\text{M}$ . La reacción se inició con la adición de las mitocondrias (300  $\mu\text{g}$  de proteína), detectando la reducción de citocromo C (15  $\mu\text{M}$ ) por absorbancia a 550 nm.

Complejo IV. La actividad de este complejo se determinó evaluando el consumo de oxígeno; se incubaron las mitocondrias frescas (100  $\mu\text{g}$  de proteína) a 30°C en 100  $\mu\text{l}$  de buffer fosfatos 25 mM pH 7.2, tetrametil-p-fenilenediamina (TMPD) 50  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de antimicina A, ascorbato 5 mM y KCN 1 mM.

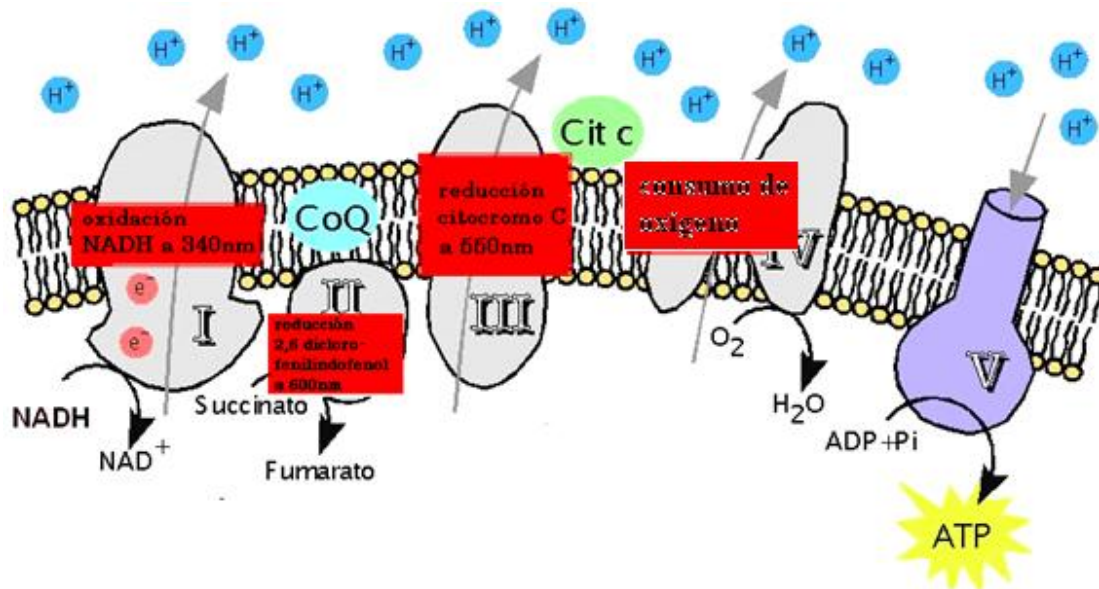


Figura 8. La actividad de los complejos respiratorios, se determinó a través del registro espectrofotométrico de la oxidación y reducción de diferentes substratos. NADH, 2,6 diclorofenolindofenol, citocromo C y consumo de oxígeno para los complejos I, II, III y IV respectivamente.

#### 6.4.3 Potencial transmembranal mitocondrial.

El potencial transmembranal de la mitocondria ( $\Delta\psi_m$ ), se determinó por la fluorescencia de safranina-O a 586 nm/495nm (em-ex), utilizando un espectrofluorómetro (DW2C Aminco Ollis) [22]. Se incubaron 50  $\mu\text{g}$  de proteína mitocondrial en un volumen total de 200 $\mu\text{l}$  de ME adicionado con Pi, 2 mM; KCl, 20 mM;  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM y safranina, 10 mM. Para determinar la fluorescencia máxima se adicionó carbonilcianuro-m-clorofenilhidrazona (CCCP) 6  $\mu\text{M}$ .

#### 6.4.4 Actividad de ATP sintasa.

Las mitocondrias (20  $\mu\text{g}$  proteína) se incubaron a 30°C en un volumen final de 300  $\mu\text{l}$  de ME adicionado con: 50 mM glucosa, 0.5 U/ml G6PDH, 350  $\mu\text{M}$  NADP, 1.8 U/ml

HK, 2 mM Pi, 20 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub> 10 mM glutamato/malato. La reacción se inició con 100 μM ADP y la síntesis de ATP se siguió por la absorbancia del NADPH a 340 nm ( $\epsilon = 6.3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). En paralelo, una muestra se incubó con oligomicina (10 μg/mg proteína) y los valores obtenidos fueron restados al valor total para obtener la actividad específica de la ATP sintasa.

## **6.5 Estrés oxidante.**

### **6.5.1 Generación de superóxido mitocondrial.**

Para determinar la generación de superóxido mitocondrial, se incubaron 50 μg de proteína de la fracción mitocondrial a 30°C en 300 μl volumen final de ME, adicionado con: 2 mM Pi, 20 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM glutamato/malato, and 200 μM NBT. La producción de superóxido se determinó midiendo la reducción de nitro 6 azul de tetrazoleo (NBT) a 550 nm, usando de referencia una curva estándar obtenida con el sistema xantina-xantina oxidasa [78, 79].

### **6.5.2 Niveles de superóxido en la retina.**

Se homogenizó una retina en 200 μl de solución Ringer Krebs. 50 μg de proteína se incubaron durante 10 min a 30°C en un medio que contenía 200 μM de NBT. La formación de formazan (producto de la reducción de NBT) se registró a 550 nm.

### **6.5.3 Actividad de aconitasa**

Se homogenizó una retina en medio KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 25 mM, Tx-100 0.05%. La actividad de la aconitasa se determinó espectrofotométricamente detectando la aparición de NADPH a 340 nm ( $\epsilon = 6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). La reacción se realizó en presencia de MnCl<sub>2</sub>, 250 mM;

citrato de sodio, 50 mM; NADP, 20 mM; isocitrato deshidrogenasa (IDH) 0.5 U/ $\mu$ l [79,80].

#### **6.5.4 Peroxidación de lípidos.**

La extracción de lípidos de la fracción mitocondrial de retinas controles y diabéticas de 20 días, se realizó con una mezcla de cloroformo:metanol 2:1, se agitó y se centrifugó a 200g durante 10 minutos a 4°C. La fase orgánica se evaporó en un baño seco a 45°C. El remanente se disolvió en ciclohexano y determinamos la presencia de dienos conjugados por la absorbancia a 233 nm, utilizando como blanco ciclohexano ( $\epsilon = 2.52 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1}$ ).

#### **6.6 Expresión de UCP2 y COX (Western blot).**

El tejido se digirió (1 retina) en 100 $\mu$ l de buffer de lisis (1:3 (p/v): RIPA-Tris buffer (2 mM EGTA; 316 mM NaCl; 20 mM Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>; 50 mM NaF; 20 mM Tris-HCl; 100 mM PMSF and 100 mM EDTA; 0.1% leupeptina y 0.1% aprotinina; 0.2% SDS y 2% Triton-X100) y se mantuvo en constante agitación durante 1 h a 4°C. Las proteínas se separaron en un gel SDS/PAGE al 12 % y se transfirieron a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF). La membrana se bloqueó con leche deslipidada al 5% (P/V) en TBS-Tween (Trizma 20 mM, NaCl 136 mM, Tween-20 0.1%, pH 7.6) durante dos horas, la membrana se incubó con los anticuerpos primarios: anti-COX (1:1000, Cell signaling), anti-UCP2 (1:1000, Alpha diagnostic) y anti-actina (1:25,000, Chemicon) toda la noche a 4°C. La inmuno-reactividad fue detectada por incubación con un anticuerpo secundario (anti-conejo 1:10,000 y anti-ratón 1:20,000) conjugado con peroxidasa de rábano; las bandas de proteína se visualizaron por quimioluminiscencia. La intensidad de la señal fue revelada en Hyperfilm ECL (GE Healthcare Ltd.) y se digitalizó con el programa DigiDoc Rt Alfa (Alpha INNOTECH). La cuantificación

basada en la densidad óptica relativa se realizó con el programa Alpha Ease FC Stand Alone.

## **6.7 Efecto de GDP**

El potencial mitocondrial y producción de superóxido mitocondrial se determinaron como se detalla en las secciones 6.4.3 y 6.5.1, respectivamente, adicionando a los medios desde el inicio de la incubación, GDP 1 mM (inhibidor de UCP2).

## **6.8 Efecto del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el consumo de oxígeno mitocondrial.**

El consumo de oxígeno en estado 3 y 4 se determinó como se detalla en la sección 6.4.1, adicionando desde el inicio del registro diferentes concentraciones (50, 100, 200 y 300  $\mu$ M) de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al medio de incubación.

## **6.9 Determinación de proteínas.**

La cantidad de proteína total de las muestras se determinó por el método de Lowry con un kit de Bio Rad utilizando BSA como estándar.

## **6.10 Análisis estadísticos.**

Los resultados se analizaron en el programa *GraphPad prism 5*, con una prueba de T student y ANOVA seguido de una prueba de Tukey. Los valores se consideraron estadísticamente significativos si el valor de  $p \leq 0.05$ .

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Modelo de diabetes

Los animales se sacrificaron a los 7, 20 y 45 días después de administrada la estreptozotocina (7D, 20D y 45D), sus niveles de glucosa en plasma siempre fueron mayores a 300 mg/dl en el momento del sacrificio.

### 7.2 Niveles de ATP/ADP/AMP

Dado que la principal función de la mitocondria es la síntesis de ATP, como un paso inicial para identificar su funcionamiento, evaluamos el contenido de ATP en las retinas de ratas normales y diabéticas. Los valores de ATP obtenidos en las retinas de animales control fueron de  $5.8 \pm 0.37$  nmol/mg prot, valores similares a los informados previamente [80, 81]; asimismo, los niveles de ADP y AMP fueron de 0.028 y 0.023 nmol/mg prot respectivamente. Los niveles de ADP y AMP fueron similares en las retinas de animales diabéticos (Tabla 1), mientras que el ATP tuvo un incremento significativo a los 45 días de diabetes. Los valores de carga energética no se modificaron.

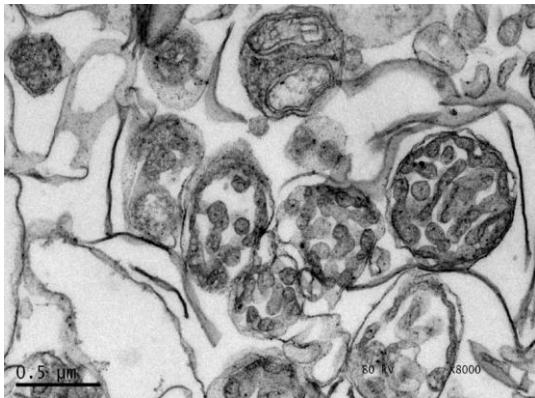
Tabla 1. Niveles de nucleótidos de adenina en retinas completas normales y diabéticas de 7, 20 y 45 días. Los valores están expresados en nmol/mg prot, y corresponden al promedio de los valores  $\pm$  SEM de al menos 3 experimentos, \* $p < 0.05$ .

	<b>ATP</b>	<b>ADP</b>	<b>AMP</b>	<b>E.C</b>
<b>Normal</b>	$5.8 \pm 0.3$	$0.03 \pm 0.003$	$0.023 \pm 0.002$	$0.99 \pm 0.0006$
<b>7D</b>	$4.9 \pm 0.9$	$0.02 \pm 0.004$	$0.026 \pm 0.004$	$0.98 \pm 0.003$
<b>20D</b>	$5.7 \pm 0.8$	$0.03 \pm 0.008$	$0.016 \pm 0.003$	$0.99 \pm 0.001$
<b>45D</b>	$9.6 \pm 2^*$	$0.02 \pm 0.004$	$0.033 \pm 0.01$	$0.99 \pm 0.002$

### 7.3 Microscopía electrónica.

Como se observa en la Figura 8 se obtuvo una fracción con un alto contenido mitocondrial. Las mitocondrias observadas en las fracciones obtenidas tanto de animales normales como diabéticos de 20 días, presentaron una morfología semejante a la observada por otros autores en cortes histológicos de retina [99]. Asimismo, la permeabilidad de la membrana externa mitocondrial, determinada por la oxidación de citocromo C, correspondió al 42%, valor semejante al obtenido para otros tejidos [76, 77].

A



B



Figura 9. Microscopía electrónica. Fracción mitocondrial de retinas normales (A) y de mitocondrias de retinas normales y diabéticas (20 días) (B).

## 7.4 Actividad mitocondrial.

### 7.4.1 Consumo de oxígeno.

La actividad mitocondrial de la retina de ratas normales reveló una tasa de consumo de oxígeno en el estado 4 (en reposo) de  $14.6 \pm 1 \text{ natgO}(\text{min}\cdot\text{mg prot})^{-1}$  y de  $56.53 \pm 6 \text{ natgO}(\text{min}\cdot\text{mg prot})^{-1}$  en el estado 3 (estado activo) mostrando un control respiratorio (CR) de 4 (Figura 10), lo que indica que las mitocondrias presentan un adecuado grado de acoplamiento. El consumo de oxígeno de las mitocondrias en el estado 4, se incrementó significativamente desde los 7 días de diabetes; mientras que el consumo de oxígeno en el estado 3 solo aumentó a los 20 días dónde encontramos una disminución significativa del CR. Los valores del consumo de oxígeno en ambos estados, así como el CR se restablecieron a los valores normales después de 45 días de diabetes (Figura 11).



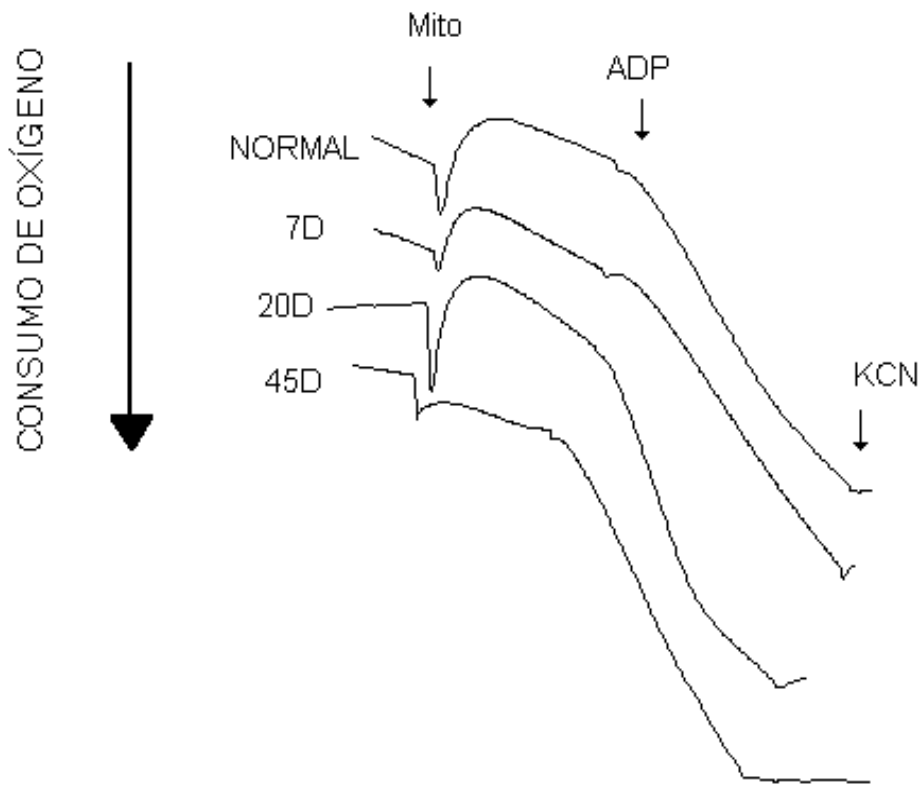


Figura 10. Trazos representativos del consumo de oxígeno de las mitocondrias (Mito) de retinas normales y diabéticas de 7, 20 y 45 días. Estado 4 en presencia de sustratos oxidables, glutamato/malato, la adición de ADP inicia el estado 3. Adición de cianuro de potasio (KCN) para detener el consumo de oxígeno por la citocromo oxidasa.

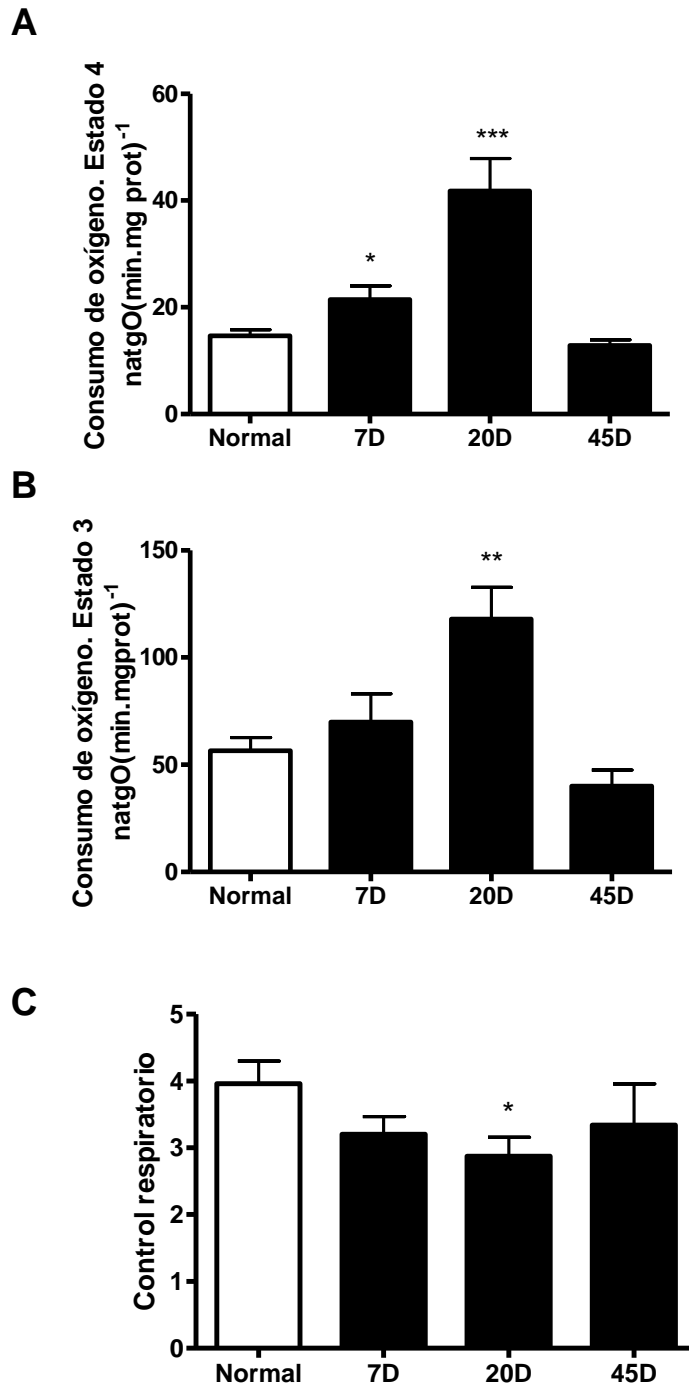


Figura 11. Consumo de oxígeno y control respiratorio de mitocondrias aisladas de retinas normales y diabéticas (7, 20 y 45 días). Promedio de 4-6 experimentos independientes  $\pm$  el error estándar. Valor de  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.005$ ; \*\*\*  $p < 0.0005$ .

#### 7.4.2 Actividad de los complejos respiratorios.

La actividad de los complejos respiratorios de las mitocondrias aisladas de la retina de animales normales presentaron valores de  $2.80 \text{ nmol (min.mg prot)}^{-1}$ ;  $11.95 \text{ nmol (min.mg prot)}^{-1}$ ;  $3.8 \text{ nmol (min.mg prot)}^{-1}$ ; y  $58 \text{ natgO (min.mg prot)}^{-1}$  para los complejos I, II, III y IV respectivamente. En los animales diabéticos de 7 días, la actividad del complejo III incrementó significativamente, mientras que a los 20 días se encontró un aumento en la actividad de los complejos I, II y III; sin embargo la actividad de estos complejos (I y III) regresó a sus valores normales a los 45 días, mientras que la actividad de los complejos II y IV aumentó significativamente (Figura 12).

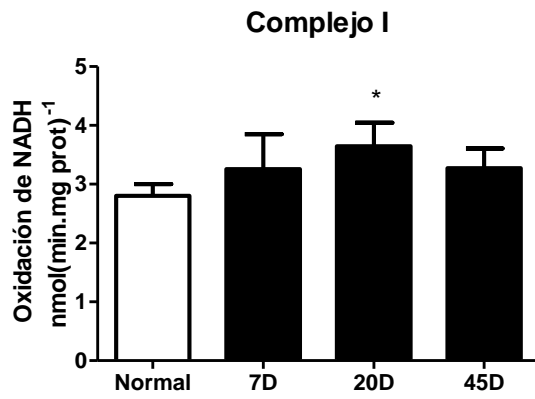
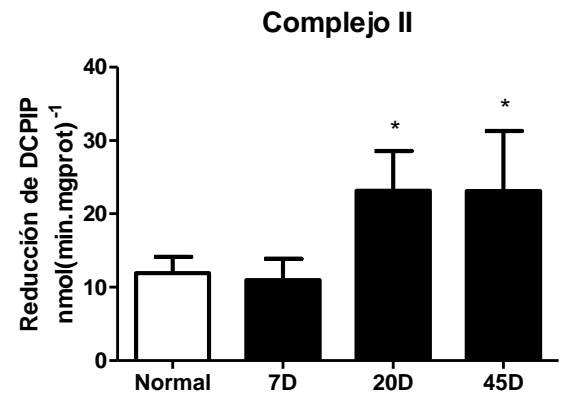
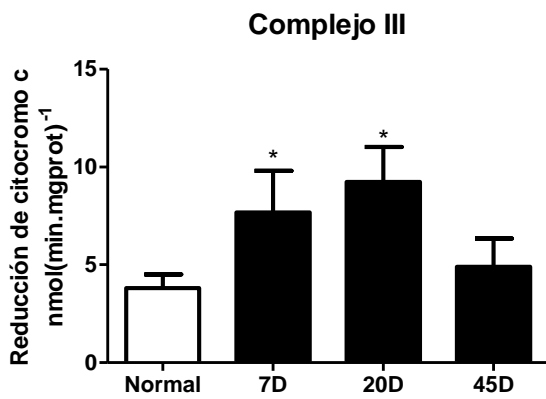
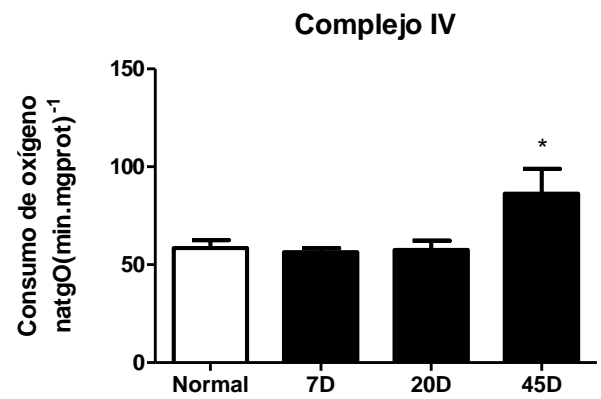
**A****B****C****D**

Figura 12. Actividad de los complejos mitocondriales. Promedio de 4-6 experimentos independientes  $\pm$  el error estándar. Valor de \* $p < 0.05$ . DCPIP (diclorofenol indofenol).

### 7.4.3 Potencial transmembranal mitocondrial.

El potencial de membrana de mitocondria de animales normales, determinado por la fluorescencia de safranina se muestra en la figura 13, en ésta se observa la disminución de la fluorescencia de safranina en las mitocondrias en estado 4, así como el aumento en la fluorescencia en presencia del desacoplante CCCP. En las mitocondrias de animales hiperglucémicos, el potencial transmembranal disminuyó progresivamente desde los 7 días de inducida la diabetes (Figura 14).

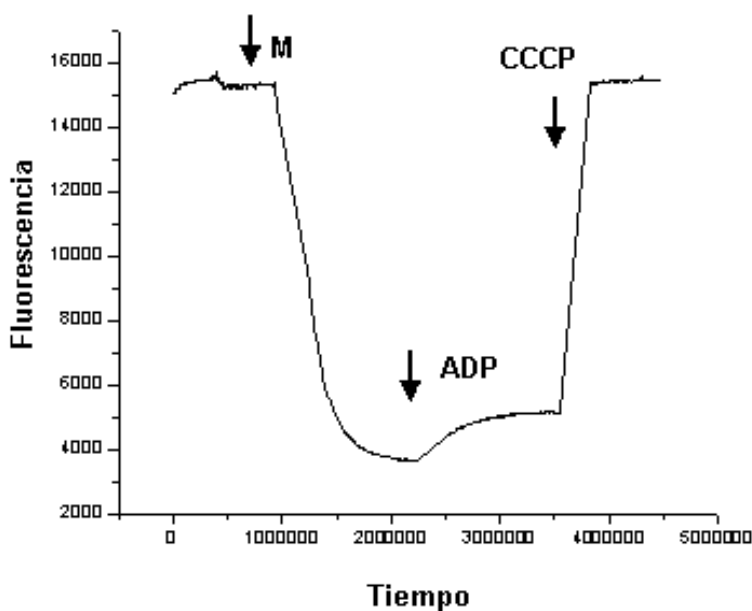


Figura 13. Trazo representativo que muestra la fluorescencia de safranina de mitocondrias aisladas de la retina de ratas normales. La fluorescencia es inversamente proporcional al potencial transmembranal mitocondrial. M, mitocondrias.

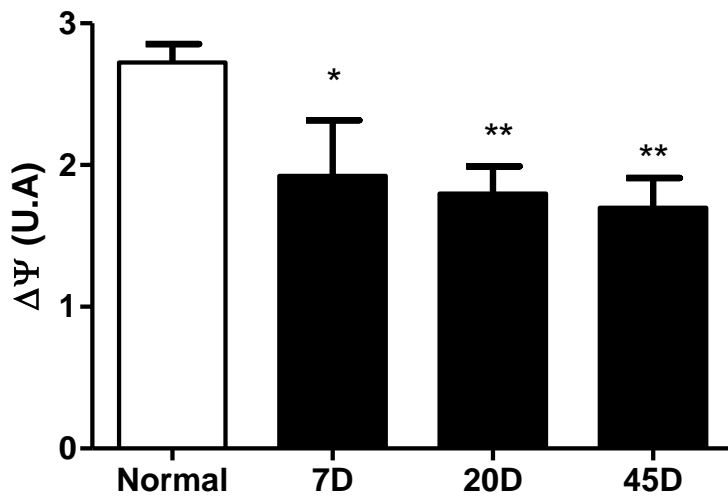
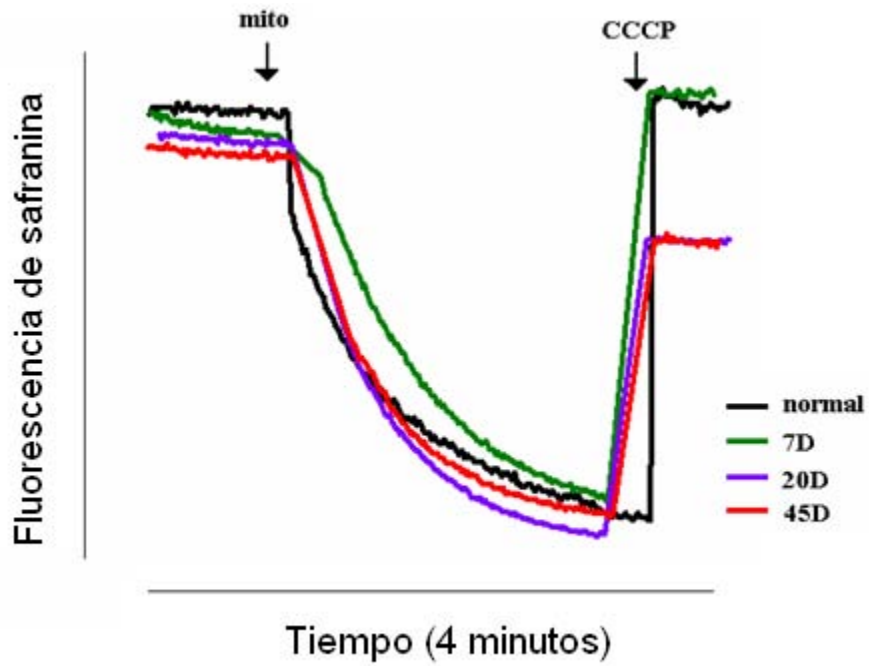


Figura 14. Potencial mitocondrial de ratas normales y diabéticas de 7, 20 y 45 días. Promedio de 4-6 experimentos independientes  $\pm$  el error estándar. Valor de \* $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.005$ .

#### 7.4.4 Actividad de ATP sintasa.

La disminución observada en el potencial mitocondrial, sugiere que la síntesis de ATP está alterada, por lo que se evaluó en condiciones óptimas la capacidad de las mitocondrias para sintetizar ATP (actividad de ATP sintasa); ésta se determinó en presencia de glutamato/malato, Pi y ADP, como se describe en la sección de métodos. En estas condiciones, las mitocondrias de las retinas de animales normales sintetizaron  $15.2 \pm 1.8$  nmol(min.mg prot)<sup>-1</sup> de ATP. La actividad de la ATP sintasa de las mitocondrias de retina de animales diabéticos presentaron los mismos valores que la de los animales control (Figura 15).

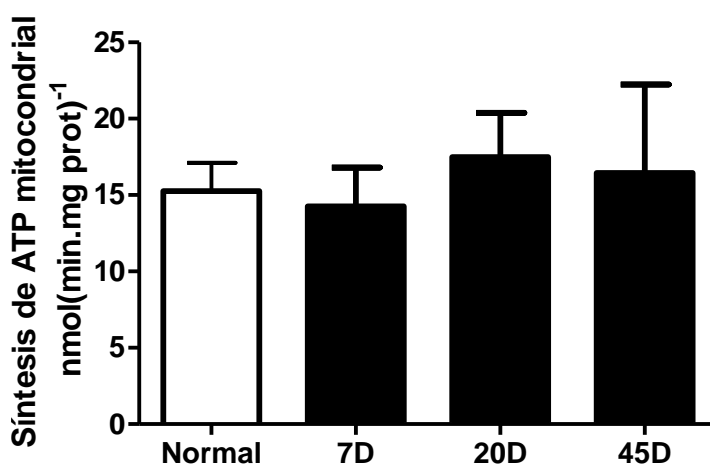


Figura 15. Síntesis de ATP en mitocondrias aisladas de retinas normales y diabéticas de 7, 20 y 45 días. Promedio de 4-6 experimentos independientes  $\pm$  el error estándar.

## 7.5 Estrés oxidante.

### 7.5.1 Generación de superóxido mitocondrial.

Los niveles de superóxido producidos por las mitocondrias de animales normales, incubadas en condiciones de estado 4, presentaron valores de  $55.3 \pm 6.3$  nmol (min.mg prot)<sup>-1</sup>. De manera sorprendente estos valores fueron semejantes a los observados en las mitocondrias de ratas diabéticas (Figura 16).

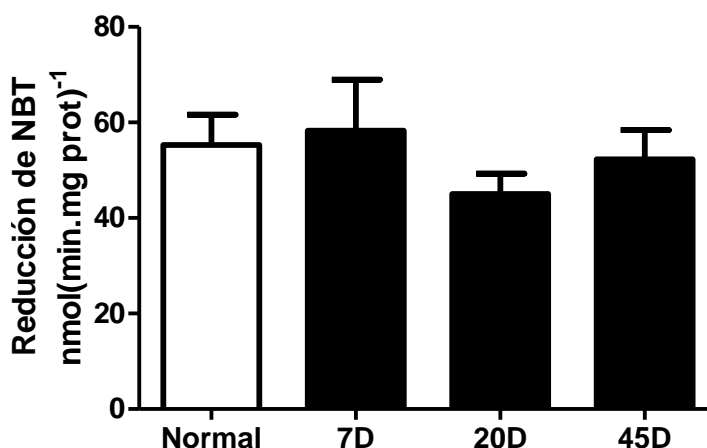


Figura 16. Superóxido formado en mitocondrias en estado 4, aisladas de retinas normales y diabéticas de 7, 20 y 45 días, promedio de al menos 3 experimentos  $\pm$  error estándar.

### 7.5.2 Niveles de superóxido en la retina.

Adicional a la actividad mitocondrial, en las células, existen otras fuentes de producción de superóxido, particularmente la NADPH oxidasa. Con el fin de explorar si este sistema se activa en la retina en condiciones de hiperglicemia se determinaron los niveles de superóxido en homogenados de la retina completa de animales normales y diabéticos. En las retinas de animales normales, la producción de superóxido alcanzó valores de  $3.5 \pm 0.4$



nmol.mg prot; mientras que las retinas de animales diabéticos se observaron niveles de superóxido menores a los observados en los animales normales, sin embargo éstos no fueron estadísticamente significativos (Figura 17).

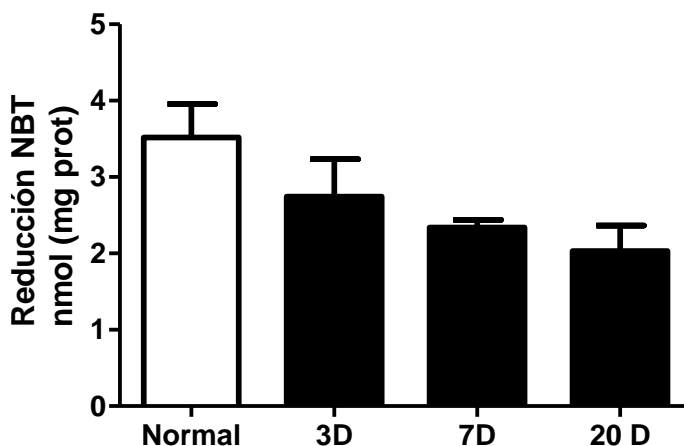


Figura 17. Niveles de superóxido en homogenados de la retina completa. Promedio de 2-6 experimentos  $\pm$  error estándar.

### 7.5.3 Actividad de aconitasa.

Se sabe que la actividad de la aconitasa se afecta por la presencia de superóxido por lo que ha sido utilizada como un indicador de los niveles de este radical. Como parte de la evaluación de la presencia de estrés oxidante en las retinas de animales diabéticos, determinamos la actividad de esta enzima en homogenados del tejido completo. La actividad de aconitasa en la retina de ratas normales presentó una actividad de  $35.7 \pm 2.2$   $\mu\text{mol (min.mgprot)}^{-1}$ , esta actividad se redujo un 22% a los 20 días de diabetes y se restableció a los niveles normales a los 45 días de inducida la diabetes (Figura 18).

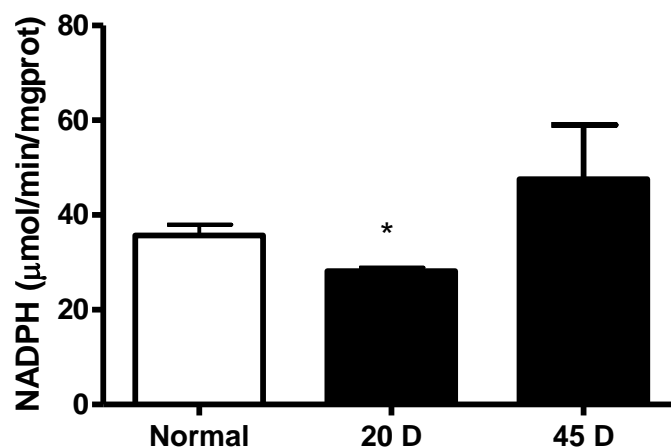


Figura 18. Actividad de aconitasa, en la retina de ratas normales y diabéticas. Los valores son el promedio de al menos 3 experimentos  $\pm$  error estándar. \* $p < 0.05$ .

#### 7.5.4 Peroxidación de lípidos.

Por otro lado la peroxidación de lípidos se analizó a través de la determinación de los dienos conjugados tanto en las mitocondrias aisladas como en el tejido completo. Los valores de dienos conjugados en la retina completa de animales normales fueron de  $376.2 \pm 5.8 \mu\text{mol.mg prot}$ ; estos valores disminuyeron 13% en las retinas a los 20 días de inducida la diabetes. En las mitocondrias aisladas de la retina de ratas normales, los niveles de peroxidación de lípidos fueron de  $25.4 \pm 7.2 \mu\text{mol.mg prot}$  y a los 20 días de diabetes se dicha peroxidación presentó una disminución significativa del 80% (figura 19).

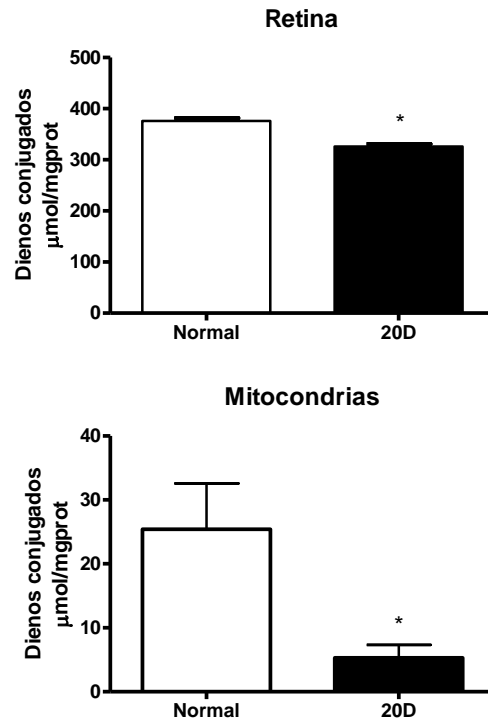


Figura 19. Peroxidación lipídica. A) retina completa y B) fracción mitocondrial. Promedio de de 3 experimentos  $\pm$  error estándar. \* $p < 0.05$ .

## 7.6 Expresión de UCP2 (Western blot).

La expresión de la proteína UCP2 determinada por western blot, no presentó cambios en las retinas de animales diabéticos. Asimismo, la expresión de la citocromo oxidasa no se modificó durante la diabetes (Figura 20).

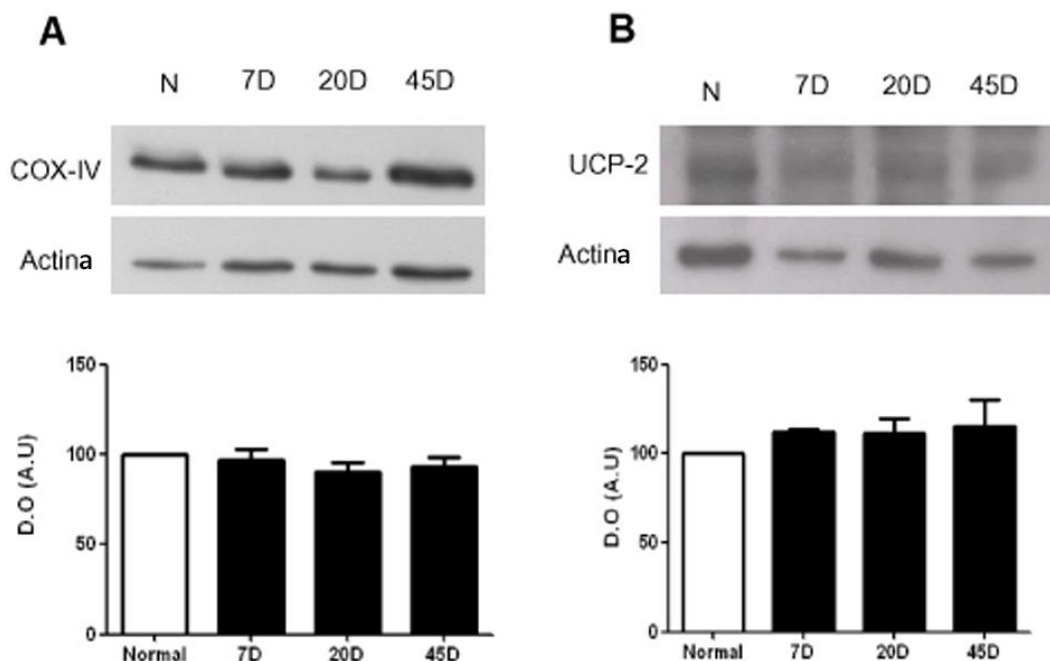


Figura 20. Expresión de las proteínas citocromo oxidasa (COX IV) y proteína desacoplante UCP2, en retinas completas de animales normales y diabéticos. Los valores representan el promedio de 3 experimentos diferentes  $\pm$  error estándar.

### 7.7 Efecto de GDP.

La incubación de las mitocondrias aisladas en presencia de GDP (1 mM), inhibidor de la UCP2, no modificó el potencial a 7 y 20 días; sin embargo, en las mitocondrias de los animales normales y diabéticos de 45 días (Figura 21 A) la presencia de GDP causó un aumento del 50% en el  $\Delta\psi_m$ . De igual forma, la presencia de GDP aumentó la producción de superóxido en las normales y diabéticas de 45 días, sin modificar aquellos a 7 y 20 días de diabetes (Figura 21 B).

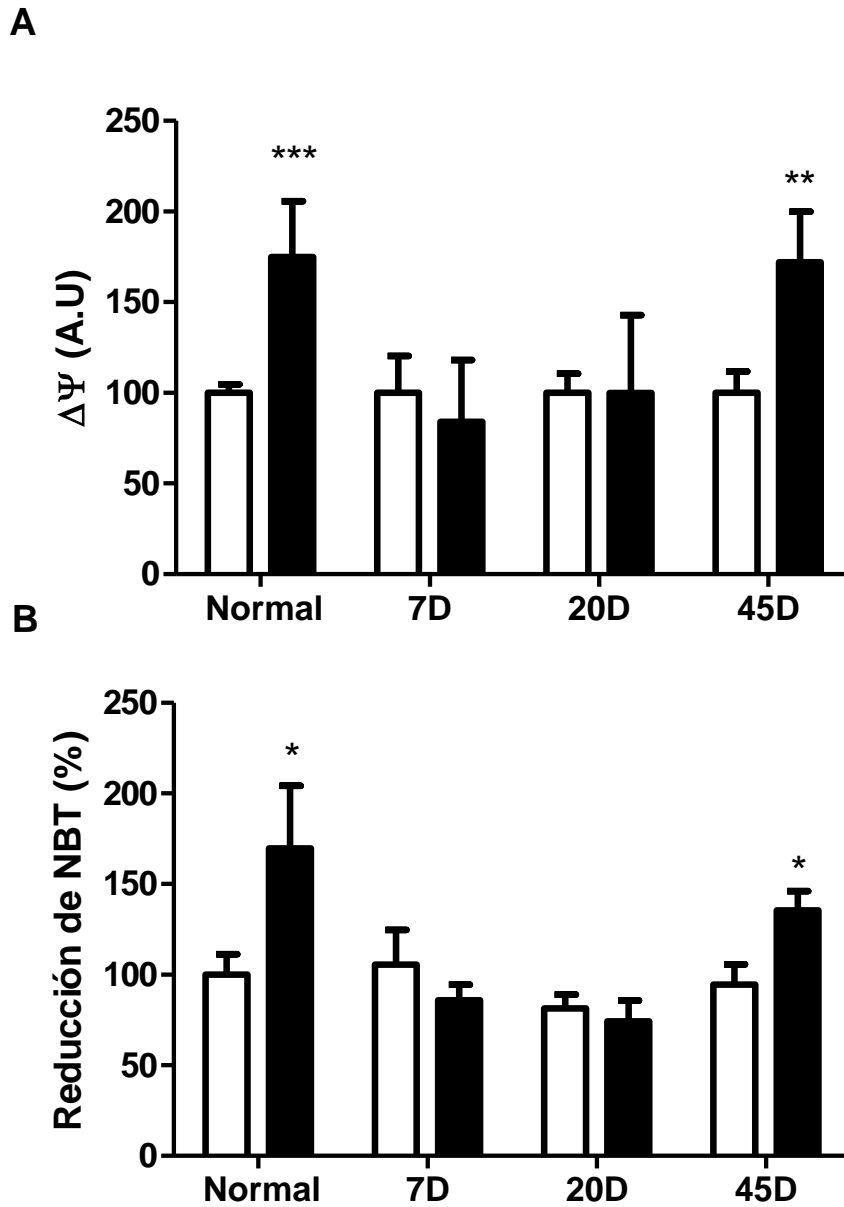


Figura 21. Efecto del GDP, sobre el  $\Delta\psi_m$  y generación de superóxido en mitocondrias de animales normales y diabéticos. La incubación se realizó en condiciones de estado 4. Barras blancas incubación sin GDP, barras negras con GDP. Promedio de 4-6 experimentos independientes  $\pm$  el error estándar. Valor de \* $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.005$ , \*\*\*  $p < 0.0005$ .

## 7.8 Efecto del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre el consumo de oxígeno mitocondrial.

Se determinó el efecto del peróxido de hidrogeno sobre la actividad respiratoria de las mitocondrias aisladas. Las mitocondrias de los animales normales mantuvieron su consumo de oxígeno estable en presencia de hasta 200  $\mu\text{M}$  de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pasando esa concentración se observó una disminución de 40% en el consumo de oxígeno tanto en el estado 4 como en el estado 3. Por otro lado, las mitocondrias aisladas de las retinas de animales diabéticos de 7 y 20 días presentaron mayor susceptibilidad al efecto del peróxido, en estas mitocondrias el consumo de oxígeno se redujo 50%, respecto a los valores normales (estado 3 y 4), en presencia de 100 $\mu\text{M}$  de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Las mitocondrias de los animales de 45 días de diabetes, presentaron la misma capacidad de tolerancia al peróxido mostrada en las mitocondrias de los animales normales (Figura 22).

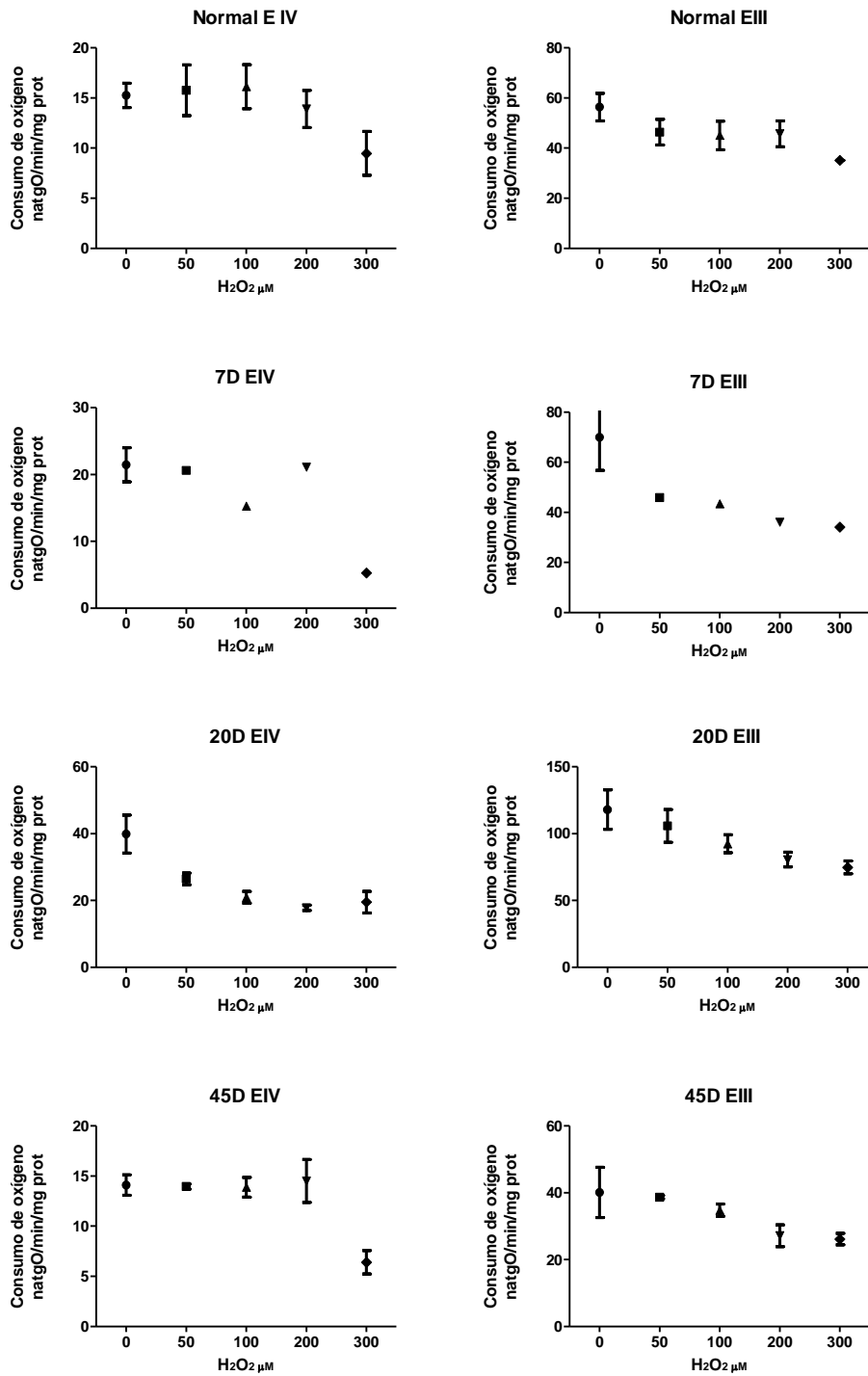


Figura 22. Efecto del  $H_2O_2$  en el consumo de oxígeno de mitocondrias normales y de 7, 20 y 45 días de diabetes.

## 8. DISCUSIÓN.

Aún cuando se ha descrito una amplia gama de neuropatías ópticas determinadas por daños en la función mitocondrial [53, 54], y se han sugerido modificaciones en su actividad en retinas afectadas por la luz, hipoxia y enfermedades hereditarias [56, 60, 81-85], existen pocos estudios dirigidos a la caracterización de la actividad mitocondrial en la retina que permitan la identificación de alteraciones en las diferentes patologías. En cuanto a la retinopatía diabética, el estrés oxidante observado en la retina de animales a tiempos largos (2 meses en adelante) de iniciada la diabetes ha sido relacionado con alteraciones en la función mitocondrial [85, 86]. Sin embargo, el panorama sigue siendo incierto, pues aún no es claro si realmente esta relación existe, y de ser así no se conoce la causa de la patología, ya que las primeras alteraciones neuronales, así como la muerte de neuronas en la retina descritas en modelos diabéticos, ocurren a tiempos más tempranos (2 semanas) [56, 73, 74]. Por lo tanto el objetivo de nuestro trabajo fue caracterizar la actividad de las mitocondrias aisladas de retinas de animales normales y compararlas con las de aquellas de animales en etapas tempranas de diabetes, con el fin de definir las alteraciones en la función mitocondrial y determinar si en efecto éstas pudieran iniciar la patología. Los datos fisiológicos, histológicos y bioquímicos han revelado que en la retina de mamíferos, las mitocondrias se encuentran con mayor abundancia (50-60%) en los segmentos internos de los fotorreceptores, región en la cual se informan además las tasas más altas de consumo de oxígeno de la retina [86-91]. Uno de los principales retos a los que se han enfrentado los investigadores al intentar caracterizar la función de este organelo en la retina, es la cantidad y tamaño del tejido [91, 92]. El primer objetivo de este trabajo fue mejorar la obtención y calidad de estas fracciones mitocondriales.



Los estudios bioquímicos y de microscopía electrónica revelaron una alta concentración y calidad de las mitocondria obtenidas en este estudio, por lo que ésta preparación representa una excelente herramienta para los objetivos del mismo y estudios futuros. Los resultados revelaron un patrón morfológico similar al descrito en estudios histológicos de la retina [91-93], su membrana externa se encontró íntegra así como la interna, cuyas crestas revelaron la forma ortodoxa mitocondrial, es decir con crestas definidas pero no condensadas, esta forma se ha identificado tradicionalmente en mitocondrias de otros tejidos en estado de reposo. De manera interesante, observamos que las crestas mitocondriales en las fracciones obtenidas mostraron en su mayoría crestas tubulares, algunas con la apariencia de vesículas aisladas de la membrana externa mitocondrial; esta morfología se ha descrito en otros tejidos como la corteza adrenal, cerebro y en cortes histológicos de la retina [86, 87, 93, 94] y puede explicarse por la composición lipídica de las membranas, así como la existencia de proteínas especializadas en la formación de las crestas. La topología de la membrana mitocondrial interna, la forma y tamaño de las crestas tienen una gran importancia dentro de la función mitocondrial ya que generan entre otras cosas compartimentos aislados que proporcionan una poza para los diferentes sustratos necesarios durante las reacciones de fosforilación oxidativa, por lo que el número, y forma (diámetro y longitud) pueden regular la tasa de síntesis de ATP; aunque en este trabajo no se profundizó en el estudio morfológico de las fracciones, observamos que a los 20 días de iniciada la diabetes las mitocondrias presentaron una morfología similar a las normales, lo que en principio sugería que no había grandes cambios en su función. Sin embargo, valorar el consumo de oxígeno y su control respiratorio proporcionó mayor información sobre la calidad de la fracción mitocondrial obtenida, necesarios para este estudio.

Las mitocondrias obtenidas de las retinas de animales normales presentan un consumo de oxígeno que es en gran medida mayor al observado en las mitocondrias del hígado y cerebro (datos no presentados), lo cual es congruente con la elevada tasa metabólica que la caracteriza, de la misma manera el menor control respiratorio, podría sugerir la presencia de cierta actividad desacoplante. En las mitocondrias de animales diabéticos de 20 días, la tasa del consumo de oxígeno en estado 3 y 4 aumentó significativamente y el control respiratorio disminuyó; tanto el consumo de oxígeno como el CR, se restablecieron después de 45 días de hiperglucemia. Estos datos sugieren una respuesta temprana en la actividad de este organelo frente al aumento de la glucosa plasmática.

Adicionalmente determinamos la actividad óxido-reductora, de los complejos respiratorios. Encontramos que ésta aumenta en las muestras de animales diabéticos, que es congruente con el aumento en el consumo de oxígeno; ambos resultados indican un aumento en la actividad mitocondrial respiratoria, este aumento podría desembocar en cambios importantes en el  $\Delta\psi_m$ , que entre otras cosas a su vez podría o no favorecer la generación del estrés oxidante, por lo que el siguiente paso fue determinar el  $\Delta\psi_m$ .

La determinación del  $\Delta\psi_m$  confirió además un dato más específico sobre el grado de acoplamiento de las mitocondrias, esta evaluación se realizó utilizando como herramienta la fluorescencia de safranina. Las mitocondrias obtenidas de animales normales, presentaron un patrón en la fluorescencia de safranina muy similar al observado en las mitocondrias de hígado (datos no mostrados); el  $\Delta\psi_m$  se observó más negativo en condiciones de estado 4 y asimismo se pudo observar la disminución del potencial en presencia de ADP, debido a la traslocación de protones que ocurre de manera normal durante la síntesis de ATP. Fue interesante observar que a pesar del aumento en la actividad de la cadena respiratoria, en las

muestras de animales diabéticos, el  $\Delta\psi_m$  disminuyó de manera paulatina con la situación de hiperglucemia a lo largo del tiempo. Este resultado también puede explicar el aumento en la actividad respiratoria del tejido, por el control respiratorio que ejerce el potencial transmembranal, sin embargo también pudiera significar una disminución en la síntesis de ATP mitocondrial.

Como una primera aproximación al estado energético de la célula, se determinaron los valores de ATP, ADP, AMP y la carga energética en el tejido completo, estos no se vieron disminuidos por la diabetes, lo cual indica que el estado energético del tejido no se perturba durante los primeros días de hiperglucemia, y por tanto la mitocondria como principal productor de energía podría no tener alteraciones en su función, sin embargo la retina es un tejido altamente glucolítico, por lo que los niveles de ATP podrían sustentarse gracias a esta vía. El estudio de la actividad de las mitocondrias aisladas nos permitió discernir entre las dos principales fuentes de ATP (glucólisis y fosforilación oxidativa). La capacidad de las mitocondrias aisladas para sintetizar ATP fue equivalente en los animales normales y diabéticas en todos los tiempos estudiados, lo que indica que la disminución en el  $\Delta\psi_m$  se debe a la existencia de una regulación en la actividad mitocondrial en respuesta a la hiperglucemia que no comprometió el estado energético del tejido y que a su vez podría constituir un sistema de adaptación rápida que permita el control de la producción de radicales libres.

Las modificaciones en la actividad mitocondrial, tales como: el consumo de oxígeno, la actividad de complejos, el  $\Delta\psi_m$ , la síntesis de ATP y los niveles de superóxido se han relacionado con cambios en la cantidad de proteína mitocondrial (biogénesis mitocondrial) [94-96]. Evaluamos esta posibilidad a través de la determinación de la expresión de la

COX. Los resultados no revelan cambios significativos en la cantidad de esta proteína durante los tiempos de diabetes estudiados lo que sugiere que los cambios observados en la actividad de los complejos respiratorios y potencial de membrana mitocondrial, no se deben a cambios en la proteína mitocondrial o en su biogénesis.

Como se explicó previamente la generación de superóxido durante el transporte de electrones en la cadena respiratoria ocurre de manera normal y es regulado principalmente por el potencial de membrana mitocondrial. El escape de los electrones ocurre con mayor facilidad cuando el potencial de la mitocondria es elevado y el transporte de electrones en la cadena respiratoria es lento; cuando hay una disminución en el  $\Delta\psi_m$ , el flujo de electrones se acelera y el escape de los electrones hacia la generación de superóxido disminuye de manera significativa. Cuando se analizó la formación de superóxido en las mitocondrias aisladas, solo fue posible observarla en el estado 4, y no se observaron cambios durante la diabetes. En este sentido, se ha encontrado la presencia de un “desacoplamiento moderado” en mitocondrias de diversos tejidos, como una respuesta preventiva a la formación de ERO [33, 34]. Particularmente la actividad de la UCP2 se ha involucrado en este fenómeno y no interfiere con la capacidad de síntesis de ATP mitocondrial [96, 97], por lo que decidimos estudiar la presencia y actividad de esta proteína en las retinas.

Los niveles de expresión de UCP2 no sufrieron ninguna modificación durante los tiempos de diabetes estudiados, resultados que están de acuerdo con una variedad de evidencias que indican que la regulación de su actividad no necesariamente afecta su expresión en los tejidos [97]. Así, se realizó la evaluación de su actividad a través de las modificaciones en el  $\Delta\psi_m$  y formación de superóxido, en presencia de su principal inhibidor, el GDP.

Efectivamente, en presencia de GDP tanto la formación de superóxido como el  $\Delta\psi_m$  presentaron un aumento significativo en la retina de animales normales y diabéticos de 45 días, demostrando la función de UCP2. Por otro lado, a los 7 y 20 días, la regulación del  $\Delta\psi_m$  y formación de superóxido no se modificó por la presencia de GDP, lo que sugiere que la UCP2 se encuentra inhibida y / ó existe otro mecanismo de regulación, como el traslocador de nucleótidos (ANT) o el poro de transición mitocondrial [97, 98].

Estos resultados indican que las mitocondrias de las retinas de animales normales se encuentran en un estado de “desacoplamiento moderado” como parte de su función normal, lo que prevendría la sobre producción de superóxido, asimismo aunque con otro tipo de regulación, la mitocondria de las retinas de animales diabéticos, no generaron mayores niveles de superóxido.

Adicional a la mitocondria, existen en las células otros mecanismos por los cuales se puede generar estrés oxidante. Para explorar si en la retina de animales diabéticos estos mecanismos participan en la generación de estrés oxidante, determinamos la actividad de la enzima aconitasa, la cual se conoce responde a cambios en el estado redox, específicamente por la presencia de superóxido [79, 80]. Si bien, la actividad de esta enzima, presentó una disminución en su actividad a los 20 días de inducida la diabetes, ésta se restableció a los 45 días. Esta disminución transitoria puede deberse a un cambio en la actividad del ciclo de Krebs por modificación de los sustratos, como se postula que ocurre en la mitocondria, efecto que además se sugiere puede ser mediado por la UCP2 [45, 46].

Adicionalmente, el hecho de que los niveles de lipoperoxidación en las mitocondrias aisladas y en la retina completa, fueran similares en los animales normales y diabéticos de

20 días, indican que no existe estrés oxidante. Por el contrario, observamos una disminución drástica en la peroxidación lipídica de las membranas mitocondriales, cambios que pudieran ejercer influencia en su permeabilidad y, por tanto, relacionarse con la disminución del potencial y aumento en el consumo de oxígeno observado. La presencia y actividad de la UCP2 como se ha mencionado anteriormente, está relacionada a un mecanismo de defensa antioxidante, con el fin de evaluar esta hipótesis, incubamos a las mitocondrias aisladas en presencia de diferentes concentraciones de un agente oxidante, en este caso  $H_2O_2$ . En este sentido se ha descrito la inhibición del consumo de oxígeno en respuesta al  $H_2O_2$  tanto en mitocondrias de levadura como en mitocondrias de cerebro de rata [98]. Nuestros resultados revelaron una resistencia al efecto del  $H_2O_2$  en las mitocondrias de animales normales y diabéticas de 45 días, en las cuales la UCP2 está activa; mientras que las mitocondrias de animales diabéticos de 7 y 20 días presentaron una mayor susceptibilidad al  $H_2O_2$  lo cual se observó por la disminución en el consumo de oxígeno. Estos resultados indican que la actividad de UCP2 confiere una protección contra el estrés oxidante, sin embargo ésta protección parece perderse parcial y transitoriamente a los 7 y 20 días de diabetes.

Aunque no definimos el mecanismo que acelera el consumo de oxígeno y disminuye el  $\Delta\psi_m$  en los animales diabéticos de 7 y 20 días, es posible sugerir que la sensibilidad de la respiración mitocondrial al del  $H_2O_2$ , puede estar involucrada en procesos de señalización celular, que en condiciones con alto riesgo de estrés oxidante tales como la hiperglucemia permita encender procesos como la muerte celular apoptótica [68].

La retina está expuesta constantemente a cambios en la cantidad de glucosa en plasma, particularmente durante la diabetes; por tanto, los cambios observados a tiempos cortos de

hiperglucemia en la actividad mitocondrial (Tabla 2), parecen representar una respuesta compensatoria que permite mantener los niveles de ATP sin aumentar los de ERO y así preservar la función de la retina. Nuestros resultados sugieren que el estrés oxidante observado a tiempos largos de diabetes podría deberse a la pérdida de esta capacidad regulatoria del tejido, causada por un estado crónico de hiperglucemia.

Tabla 2. Resumen de resultados. Efecto de la hiperglucemia sobre la actividad mitocondrial, comparación con respecto a la normal.

	<b>Diabéticas 7D</b>	<b>Diabéticas 20D</b>	<b>Diabéticas 45D</b>
<b>consumo de oxígeno</b>	↑	↑	=
<b>actividad de complejos</b>	↑	↑	=
<b>potencial transmembranal</b>	↓	↓	↓
<b>síntesis de ATP</b>	=	=	=
<b>estrés oxidante</b>	no	no	no

## 9. CONCLUSIONES.

- 1) El método montado para este trabajo nos permitió aislar mitocondrias de la retina de la rata con características funcionales y morfológicas adecuadas para su análisis.
- 2) Las mitocondrias de retina en condiciones normales, presentan una alta actividad respiratoria acoplada a la síntesis de ATP; el  $\Delta\psi_m$  es regulado por la actividad de UCP2, que puede representar un mecanismo preventivo contra la generación de superóxido.
- 3) Las mitocondrias de animales diabéticos a tiempos cortos aumentan su actividad respiratoria (consumo de oxígeno y actividad de complejos respiratorios) y disminuyen su  $\Delta\psi_m$ .
- 4) Estas mitocondrias no generan estrés oxidante ni alteran su capacidad para sintetizar ATP.
- 5) Los cambios observados en los animales diabéticos se relacionan con la actividad de la UCP2.
- 6) Los cambios observados en la actividad mitocondrial a tiempos cortos de diabetes, constituyen una respuesta adaptativa que mantiene la homeostasis energética del tejido y evita la generación de estrés oxidante.



## 10. REFERENCIAS.

1. Thorens, B., *Brain glucose sensing and neural regulation of insulin and glucagon secretion*. Diabetes Obes Metab, 2011. **13 Suppl 1**: p. 82-8.
2. Russell, N.D. and M.E. Cooper, *50 years forward: mechanisms of hyperglycaemia-driven diabetic complications*. Diabetologia, 2015.
3. Kohner, E.M., et al., *United Kingdom Prospective Diabetes Study, 30: diabetic retinopathy at diagnosis of non-insulin-dependent diabetes mellitus and associated risk factors*. Arch Ophthalmol, 1998. **116**(3): p. 297-303.
4. Kohner, E.M., et al., *Relationship between the severity of retinopathy and progression to photocoagulation in patients with Type 2 diabetes mellitus in the UKPDS (UKPDS 52)*. Diabet Med, 2001. **18**(3): p. 178-84.
5. Chiu, C.J. and A. Taylor, *Dietary hyperglycemia, glycemic index and metabolic retinal diseases*. Prog Retin Eye Res, 2011. **30**(1): p. 18-53.
6. Spiro, R.G., *Role of insulin in two pathways of glucose metabolism: in vivo glucosamine and glycogen synthesis*. Ann N Y Acad Sci, 1959. **82**: p. 366-73.
7. King, G.L., et al., *Biochemical and molecular mechanisms in the development of diabetic vascular complications*. Diabetes, 1996. **45 Suppl 3**: p. S105-8.
8. Brownlee, M., *Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications*. Nature, 2001. **414**(6865): p. 813-20.
9. Stitt, A.W., *The maillard reaction in eye diseases*. Ann N Y Acad Sci, 2005. **1043**: p. 582-97.
10. Monnier, V.M., et al., *Maillard reaction-mediated molecular damage to extracellular matrix and other tissue proteins in diabetes, aging, and uremia*. Diabetes, 1992. **41 Suppl 2**: p. 36-41.
11. Thorpe, S.R. and J.W. Baynes, *Maillard reaction products in tissue proteins: new products and new perspectives*. Amino Acids, 2003. **25**(3-4): p. 275-81.
12. Lyons, T.J., et al., *Role of glycation in modification of lens crystallins in diabetic and nondiabetic senile cataracts*. Diabetes, 1991. **40**(8): p. 1010-5.
13. Bierhaus, A., et al., *AGEs and their interaction with AGE-receptors in vascular disease and diabetes mellitus. I. The AGE concept*. Cardiovasc Res, 1998. **37**(3): p. 586-600.
14. Voet, D.V., Judith C. , *Bioquímica*. Ed. OMEGA. S.A., 1992: p. 1315.
15. Petrash, J.M., *All in the family: aldose reductase and closely related aldo-keto reductases*. Cell Mol Life Sci, 2004. **61**(7-8): p. 737-49.
16. Mellor, H. and P.J. Parker, *The extended protein kinase C superfamily*. Biochem J, 1998. **332 ( Pt 2)**: p. 281-92.
17. Mehta, K.D., *Emerging role of protein kinase C in energy homeostasis: A brief overview*. World J Diabetes, 2014. **5**(3): p. 385-92.
18. Craven, P.A., C.M. Davidson, and F.R. DeRubertis, *Increase in diacylglycerol mass in isolated glomeruli by glucose from de novo synthesis of glycerolipids*. Diabetes, 1990. **39**(6): p. 667-74.
19. Miller, D.M., G.R. Buettner, and S.D. Aust, *Transition metals as catalysts of "autoxidation" reactions*. Free Radic Biol Med, 1990. **8**(1): p. 95-108.
20. Valko, M., H. Morris, and M.T. Cronin, *Metals, toxicity and oxidative stress*. Curr Med Chem, 2005. **12**(10): p. 1161-208.
21. Valko, M., et al., *Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease*. Int J Biochem Cell Biol, 2007. **39**(1): p. 44-84.

22. Sies, H., *Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine*. Redox Biol, 2015. **4C**: p. 180-183.
23. Sohal, R.S. and U.T. Brunk, *Mitochondrial production of pro-oxidants and cellular senescence*. Mutat Res, 1992. **275**(3-6): p. 295-304.
24. Korshunov, S.S., V.P. Skulachev, and A.A. Starkov, *High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria*. FEBS Lett, 1997. **416**(1): p. 15-8.
25. Skulachev, V.P., *Mitochondrial filaments and clusters as intracellular power-transmitting cables*. Trends Biochem Sci, 2001. **26**(1): p. 23-9.
26. Echtay, K.S., *Mitochondrial uncoupling proteins--what is their physiological role?* Free Radic Biol Med, 2007. **43**(10): p. 1351-71.
27. Irwin, M.H., K. Parameshwaran, and C.A. Pinkert, *Mouse models of mitochondrial complex I dysfunction*. Int J Biochem Cell Biol, 2013. **45**(1): p. 34-40.
28. Baker, J.S., M.C. McCormick, and R.A. Robergs, *Interaction among Skeletal Muscle Metabolic Energy Systems during Intense Exercise*. J Nutr Metab, 2010. **2010**: p. 905612.
29. Nichols, D.F., SJ., *Bioenergetics*. Academic Press, 2013. **4th Edition**.
30. Chance, B. and G.R. Williams, *Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. I. Kinetics of oxygen utilization*. J Biol Chem, 1955. **217**(1): p. 383-93.
31. Chance, B. and G.R. Williams, *The respiratory chain and oxidative phosphorylation*. Adv Enzymol Relat Subj Biochem, 1956. **17**: p. 65-134.
32. Boveris, A. and B. Chance, *The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen*. Biochem J, 1973. **134**(3): p. 707-16.
33. Skulachev, V.P., *Uncoupling: new approaches to an old problem of bioenergetics*. Biochim Biophys Acta, 1998. **1363**(2): p. 100-24.
34. Brown, G.C., P.L. Lakin-Thomas, and M.D. Brand, *Control of respiration and oxidative phosphorylation in isolated rat liver cells*. Eur J Biochem, 1990. **192**(2): p. 355-62.
35. Nobes, C.D., W.W. Hay, Jr., and M.D. Brand, *The mechanism of stimulation of respiration by fatty acids in isolated hepatocytes*. J Biol Chem, 1990. **265**(22): p. 12910-5.
36. Hansford, R.G., B.A. Hogue, and V. Mildaziene, *Dependence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formation by rat heart mitochondria on substrate availability and donor age*. J Bioenerg Biomembr, 1997. **29**(1): p. 89-95.
37. Dikalov, S., *Cross talk between mitochondria and NADPH oxidases*. Free Radic Biol Med, 2011. **51**(7): p. 1289-301.
38. Jezek, P. and L. Hlavata, *Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in cell, tissues, and organism*. Int J Biochem Cell Biol, 2005. **37**(12): p. 2478-503.
39. Miramar, M.D., et al., *NADH oxidase activity of mitochondrial apoptosis-inducing factor*. J Biol Chem, 2001. **276**(19): p. 16391-8.
40. Bouillaud, F., *UCP2, not a physiologically relevant uncoupler but a glucose sparing switch impacting ROS production and glucose sensing*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1787**(5): p. 377-83.
41. Skulachev, V.P., *Role of uncoupled and non-coupled oxidations in maintenance of safely low levels of oxygen and its one-electron reductants*. Q Rev Biophys, 1996. **29**(2): p. 169-202.
42. Skulachev, V.P., *Bioenergetics: the evolution of molecular mechanisms and the development of bioenergetic concepts*. Antonie Van Leeuwenhoek, 1994. **65**(4): p. 271-84.
43. Chan, C.B. and M.E. Harper, *Uncoupling proteins: role in insulin resistance and insulin insufficiency*. Curr Diabetes Rev, 2006. **2**(3): p. 271-83.

44. Murphy, M.P., et al., *Superoxide activates uncoupling proteins by generating carbon-centered radicals and initiating lipid peroxidation: studies using a mitochondria-targeted spin trap derived from alpha-phenyl-N-tert-butyl nitron*. J Biol Chem, 2003. **278**(49): p. 48534-45.
45. Vozza, A., et al., *UCP2 transports C4 metabolites out of mitochondria, regulating glucose and glutamine oxidation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(3): p. 960-5.
46. Strauss, O., *The retinal pigment epithelium in visual function*. Physiol Rev, 2005. **85**(3): p. 845-81.
47. Cuenca, M.L.R.E.C.M.N., *La transducción visual*. Annals de Oftalmología, 2010. **18**(3): p. 130-136.
48. Eshaq, R.S., W.S. Wright, and N.R. Harris, *Oxygen delivery, consumption, and conversion to reactive oxygen species in experimental models of diabetic retinopathy*. Redox Biol, 2014. **2**: p. 661-6.
49. Coffe V, C.R., Salceda R., *Glucose metabolism in rat retinal pigment epithelium*. Neurochemical research, 2006. **31**(1): p. 103-108.
50. Miceli, M.V., D.A. Newsome, and G.W. Schriver, *Glucose uptake, hexose monophosphate shunt activity, and oxygen consumption in cultured human retinal pigment epithelial cells*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1990. **31**(2): p. 277-83.
51. Antonetti, D.A., et al., *Diabetic retinopathy: seeing beyond glucose-induced microvascular disease*. Diabetes, 2006. **55**(9): p. 2401-11.
52. Kaur, C., W.S. Foulds, and E.A. Ling, *Blood-retinal barrier in hypoxic ischaemic conditions: basic concepts, clinical features and management*. Prog Retin Eye Res, 2008. **27**(6): p. 622-47.
53. Carelli, V., F.N. Ross-Cisneros, and A.A. Sadun, *Mitochondrial dysfunction as a cause of optic neuropathies*. Prog Retin Eye Res, 2004. **23**(1): p. 53-89.
54. Rodríguez Villalobos Elvia, R.B.É.J., Cervantes Aguayo Fernando, Vargas Salado Enrique, Ávalos Muñoz María Elena, *Incidencia y progresión de la retinopatía diabética en diabetes mellitus 2 a 6 años* Diabet Hoy Med Sal 2004. **5**(4): p. 1262-1271.
55. Cheung, N., P. Mitchell, and T.Y. Wong, *Diabetic retinopathy*. Lancet, 2010. **376**(9735): p. 124-36.
56. Li, Q., et al., *Early retinal damage in experimental diabetes: electroretinographical and morphological observations*. Exp Eye Res, 2002. **74**(5): p. 615-25.
57. Santiago, A.R., et al., *High glucose induces caspase-independent cell death in retinal neural cells*. Neurobiol Dis, 2007. **25**(3): p. 464-72.
58. Gillies, M.C., et al., *Effect of high glucose on permeability of retinal capillary endothelium in vitro*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1997. **38**(3): p. 635-42.
59. Wu, Y., L. Tang, and B. Chen, *Oxidative stress: implications for the development of diabetic retinopathy and antioxidant therapeutic perspectives*. Oxid Med Cell Longev, 2014. **2014**: p. 752387.
60. Mannella, C.A., W.J. Lederer, and M.S. Jafri, *The connection between inner membrane topology and mitochondrial function*. J Mol Cell Cardiol, 2013. **62**: p. 51-7.
61. Engerman, R.L., T.S. Kern, and M.E. Larson, *Nerve conduction and aldose reductase inhibition during 5 years of diabetes or galactosaemia in dogs*. Diabetologia, 1994. **37**(2): p. 141-4.
62. Hammes, H.P., et al., *Aminoguanidine treatment inhibits the development of experimental diabetic retinopathy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(24): p. 11555-8.
63. *A randomized trial of sorbinil, an aldose reductase inhibitor, in diabetic retinopathy. Sorbinil Retinopathy Trial Research Group*. Arch Ophthalmol, 1990. **108**(9): p. 1234-44.

64. Gardiner, T.A., H.R. Anderson, and A.W. Stitt, *Inhibition of advanced glycation end-products protects against retinal capillary basement membrane expansion during long-term diabetes*. J Pathol, 2003. **201**(2): p. 328-33.
65. Sugiyama, S., et al., *Plasma levels of pentosidine in diabetic patients: an advanced glycation end product*. J Am Soc Nephrol, 1998. **9**(9): p. 1681-8.
66. Wagner, Z., et al., *N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine levels in patients with type 2 diabetes: role of renal function*. Am J Kidney Dis, 2001. **38**(4): p. 785-91.
67. Du, X., et al., *Inhibition of GAPDH activity by poly(ADP-ribose) polymerase activates three major pathways of hyperglycemic damage in endothelial cells*. J Clin Invest, 2003. **112**(7): p. 1049-57.
68. Brownlee, M., *The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism*. Diabetes, 2005. **54**(6): p. 1615-25.
69. Kowluru, R.A. and S.N. Abbas, *Diabetes-induced mitochondrial dysfunction in the retina*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2003. **44**(12): p. 5327-34.
70. Zhong, Q. and R.A. Kowluru, *Diabetic retinopathy and damage to mitochondrial structure and transport machinery*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2011. **52**(12): p. 8739-46.
71. Tewari, S., et al., *Mitochondria DNA replication and DNA methylation in the metabolic memory associated with continued progression of diabetic retinopathy*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2012. **53**(8): p. 4881-8.
72. Cui, Y., et al., *Expression modification of uncoupling proteins and MnSOD in retinal endothelial cells and pericytes induced by high glucose: the role of reactive oxygen species in diabetic retinopathy*. Exp Eye Res, 2006. **83**(4): p. 807-16.
73. Barber, A.J., et al., *Neural apoptosis in the retina during experimental and human diabetes. Early onset and effect of insulin*. J Clin Invest, 1998. **102**(4): p. 783-91.
74. Schnedl, W.J., et al., *STZ transport and cytotoxicity. Specific enhancement in GLUT2-expressing cells*. Diabetes, 1994. **43**(11): p. 1326-33.
75. Trautschold, I.L., W. & Schweitzer, G, *Adenosine 5'triphosphate. UV-Method with hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase*. Bergmeyer. Enzymatic Methods, 1988. **VII**: p. 346-357.
76. Wojtczak, L., et al., *Assay for the intactness of the outer membrane in isolated mitochondria*. Acta Biochim Pol, 1972. **19**(3): p. 227-34.
77. Birch-Machin, M.A. and D.M. Turnbull, *Assaying mitochondrial respiratory complex activity in mitochondria isolated from human cells and tissues*. Methods Cell Biol, 2001. **65**: p. 97-117.
78. Liu, R.-h., et al., *General Spectroscopic Protocol to Obtain the Concentration of the Superoxide Anion Radical*. Industrial & Engineering Chemistry Research, 2009. **48**(20): p. 9331-9334.
79. Gardner, P.R., *Aconitase: sensitive target and measure of superoxide*. Methods Enzymol, 2002. **349**: p. 9-23.
80. Winkler, B.S., et al., *Glucose dependence of glycolysis, hexose monophosphate shunt activity, energy status, and the polyol pathway in retinas isolated from normal (nondiabetic) rats*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1997. **38**(1): p. 62-71.
81. Lasansky, A. and E. De Robertis, *Electron microscopy of retinal photoreceptors. The use of chromation following formaldehyde fixation as a complementary technique to osmium tetroxide fixation*. J Biophys Biochem Cytol, 1960. **7**: p. 493-8.
82. Def Webster, H. and A. Ames, *Reversible and Irreversible Changes in the Fine Structure of Nervous Tissue during Oxygen and Glucose Deprivation*. J Cell Biol, 1965. **26**(3): p. 885-909.

83. Fox, D.A. and L.W. Chu, *Rods are selectively altered by lead: II. Ultrastructure and quantitative histology*. Exp Eye Res, 1988. **46**(4): p. 613-25.
84. Edward, D.P., et al., *Amelioration of light-induced retinal degeneration by a calcium overload blocker. Flunarizine*. Arch Ophthalmol, 1991. **109**(4): p. 554-62.
85. Madsen-Bouterse, S.A. and R.A. Kowluru, *Oxidative stress and diabetic retinopathy: pathophysiological mechanisms and treatment perspectives*. Rev Endocr Metab Disord, 2008. **9**(4): p. 315-27.
86. Medrano, C.J. and D.A. Fox, *Substrate-dependent effects of calcium on rat retinal mitochondrial respiration: physiological and toxicological studies*. Toxicol Appl Pharmacol, 1994. **125**(2): p. 309-21.
87. Ross, C.D. and D.A. Godfrey, *Distributions of aspartate aminotransferase and malate dehydrogenase activities in rat retinal layers*. J Histochem Cytochem, 1985. **33**(7): p. 624-30.
88. Chen, E., P.G. Soderberg, and B. Lindstrom, *Activity distribution of cytochrome oxidase in the rat retina. A quantitative histochemical study*. Acta Ophthalmol (Copenh), 1989. **67**(6): p. 645-51.
89. Alder, V.A., J. Ben-Nun, and S.J. Cringle, *PO<sub>2</sub> profiles and oxygen consumption in cat retina with an occluded retinal circulation*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1990. **31**(6): p. 1029-34.
90. Buono, R.J. and J.B. Sheffield, *Changes in distribution of mitochondria in the developing chick retina*. Exp Eye Res, 1991. **53**(2): p. 187-98.
91. Medrano, C.J. and D.A. Fox, *Oxygen consumption in the rat outer and inner retina: light- and pharmacologically-induced inhibition*. Exp Eye Res, 1995. **61**(3): p. 273-84.
92. Stone, J., et al., *The locations of mitochondria in mammalian photoreceptors: relation to retinal vasculature*. Brain Res, 2008. **1189**: p. 58-69.
93. Frey, T.G. and C.A. Mannella, *The internal structure of mitochondria*. Trends Biochem Sci, 2000. **25**(7): p. 319-24.
94. Duarte, F.V., et al., *Regulation of Mitochondrial Function and its Impact in Metabolic Stress*. Curr Med Chem, 2015.
95. Vafai, S.B. and V.K. Mootha, *Mitochondrial disorders as windows into an ancient organelle*. Nature, 2012. **491**(7424): p. 374-83.
96. Boudina, S., et al., *Mitochondrial energetics in the heart in obesity-related diabetes: direct evidence for increased uncoupled respiration and activation of uncoupling proteins*. Diabetes, 2007. **56**(10): p. 2457-66.
97. Cardoso, S., et al., *UCP2 and ANT differently modulate proton-leak in brain mitochondria of long-term hyperglycemic and recurrent hypoglycemic rats*. J Bioenerg Biomembr, 2013. **45**(4): p. 397-407.
98. Cortes-Rojo, C., et al., *Electron transport chain dysfunction by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is linked to increased reactive oxygen species production and iron mobilization by lipoperoxidation: studies using Saccharomyces cerevisiae mitochondria*. J Bioenerg Biomembr, 2011. **43**(2): p. 135-47.
99. Perkins, G. A., et al., *Three-dimensional analysis of mouse rod and cone mitochondrial cristae architecture: bioenergetic and functional implications*. Mol. Vis, 2003. **11**(9): p. 60-73.

RESEARCH ARTICLE

# In the Early Stages of Diabetes, Rat Retinal Mitochondria Undergo Mild Uncoupling due to UCP2 Activity

Ixchel Osorio-Paz<sup>1</sup>, Salvador Uribe-Carvajal<sup>2</sup>, Rocío Salceda<sup>1\*</sup>

**1** Departamento de Neurodesarrollo y Fisiología, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México Distrito Federal, México, **2** Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México Distrito Federal, México

\* [rsalceda@ifc.unam.mx](mailto:rsalceda@ifc.unam.mx)



## Abstract

In order to maintain high transmembrane ionic gradients, retinal tissues require a large amount of energy probably provided by a high rate of both, glycolysis and oxidative phosphorylation. However, little information exists on retinal mitochondrial efficiency. We analyzed the retinal mitochondrial activity in *ex vivo* retinas and in isolated mitochondria from normal rat retina and from short-term streptozotocin-diabetic rats. In normal *ex vivo* retinas, increasing glucose concentrations from 5.6mM to 30mM caused a four-fold increase in glucose accumulation and CO<sub>2</sub> production. Retina from diabetic rats accumulated similar amounts of glucose. However, CO<sub>2</sub> production was not as high. Isolated mitochondria from normal rat retina exhibited a resting rate of oxygen consumption of 14.6 ± 1.1 natgO (min. mg prot)<sup>-1</sup> and a respiratory control of 4.0. Mitochondria from 7, 20 and 45 days diabetic rats increased the resting rate of oxygen consumption and the activity of the electron transport complexes; under these conditions the mitochondrial transmembrane potential decreased. In spite of this, the ATP synthesis was not modified. GDP, an UCP2 inhibitor, increased mitochondrial membrane potential and superoxide production in controls and at 45 days of diabetes. The role of UCP2 is discussed. The results suggest that at the early stage of diabetes we studied, retinal mitochondria undergo adaptations leading to maintain energetic requirements and prevent oxidative stress.

## OPEN ACCESS

**Citation:** Osorio-Paz I, Uribe-Carvajal S, Salceda R (2015) In the Early Stages of Diabetes, Rat Retinal Mitochondria Undergo Mild Uncoupling due to UCP2 Activity. PLoS ONE 10(5): e0122727. doi:10.1371/journal.pone.0122727

**Received:** September 19, 2014

**Accepted:** February 12, 2015

**Published:** May 7, 2015

**Copyright:** © 2015 Osorio-Paz et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

**Funding:** This work by supported by grant from Dirección General de Asuntos del Personal Académico/Programa de Apoyo de Investigación e Innovación Tecnológica UNAM/DGAPA/PAPIIT IN202813. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. Ixchel Osorio Paz is a CONACYT fellow (263808/221053) enrolled in the Biochemistry PhD Program at UNAM.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

## Introduction

The vertebrate retina possesses the highest respiratory rate of any other tissue examined *in vitro* [1]; this organ requires a large amount of energy, which is primarily used to maintain the ionic gradients across cell membranes. Retina may suffer irreversible damage from large variations in oxygen or glucose concentrations [2]. Mitochondria are the main source of energy in the cell and are considered to be a major source of reactive oxygen species (ROS), the formation of which is unavoidable during oxidative metabolism [3]. In spite of this, relatively few studies on mitochondrial function in retina have been undertaken [4]. In diabetic retinopathy,

mitochondrial activity has been postulated to increase, leading to oxidative stress [5,6]. In rats, changes in mitochondrial activity and DNA damage have been observed after long-time diabetes [3,7]. The mechanism leading to these changes has not been identified. Therefore, to get insight into the role of mitochondria in retinal physiopathology, we isolated mitochondria from normal rat retina and compared their activities with mitochondria from rats in the early stages after diabetes induction.

## Material and Methods

### Animals

Adult Long Evans rats were used in this study. Diabetes was induced with a single intraperitoneal injection of streptozotocin (90mg/Kg), freshly dissolved in citrate buffer pH 4.5. Animals were not treated with insulin; they were maintained at 21°C on a 12h alternating light-dark cycle and allowed food and water *ad libitum*. Animals were considered diabetic when values were equal or higher than 300mg/dl the day after streptozotocin administration. At the moment of sacrifice blood glucose levels varied from 300–600 mg/dl in all groups studied. Normal rats had blood glucose levels of 90–120 mg/dl. Diabetic and control matched animals were sacrificed by decapitation after 7, 20 and 45 days of STZ administration. The enucleated eyes were hemisected and the anterior part was removed; the retinas were gently peeled away using fine forceps. The retinas for one rat were used for each determination, except for mitochondria preparation, in which the retinas from 3–5 rats were used in each experiment.

All procedures were conducted in accordance with the Mexican Institutes of Health Research (DOF. NOM-062-Z00-1999) and the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH publication No. 80–23, revised 1996), as well as the Research Association in Vision and Ophthalmology Statement on the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research. The experimental protocol was approved by the Committee on the Ethics in Animal Experimentation at our Institution. All efforts were made to minimize animal suffering, and to reduce the number of rats used.

### CO<sub>2</sub> production from glucose

The rates of <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> production from <sup>14</sup>C-glucose by retina were determined as described previously [8,9]. Retinas were incubated at 37°C in gassed (95%O<sub>2</sub>-5%CO<sub>2</sub>) Ringer buffer (NaCl, 118mM; KCl, 4.7mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 12mM; MgSO<sub>4</sub>, 1.17mM; NaHCO<sub>3</sub>, 25mM; glucose, 5.6mM or 30mM, pH 7.4), containing 0.25–0.5μCi of [1-<sup>14</sup>C] glucose (58mCi/mmol) or [U-<sup>14</sup>C] glucose (265mCi/mmol), (Amersham, UK). The metabolic activity was stopped by the addition of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Released <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> was trapped in center well containing benzethonium hydroxide and its radioactivity was determined in a liquid scintillation spectrometer. Relative specific activity of <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> was considered as the specific activity of <sup>14</sup>C-glucose in the medium. Accumulated glucose was determined by the radioactivity present in the tissue.

### Adenosine triphosphate content

For ATP content, retinas were rapidly homogenized in cold 6% (w/v) perchloric acid and protein was removed by centrifugation. ATP was determined by an enzyme-coupled reaction to hexokinase (HK) and glucose 6 phosphate dehydrogenase (G6PDH) activities according to Trauttschold *et al.* (1988) [10]. The NADPH decrease was followed at 340nm and the concentration was calculated using  $\epsilon = 6.3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .



## Mitochondria isolation

Mitochondria were isolated by a procedure described before [11], with some modifications. Six to ten retinas were homogenized in 1ml of the isolation medium (IM): 2mM, Hepes pH 7.4; 220mM, mannitol; 10mM, sucrose; 10mM, taurine; 1mM EDTA, and 1% BSA fat-free fraction V. The homogenate was centrifuged at 650g for 10 min, to improve the mitochondrial content, the pellet was rinsed with 1ml of IM and then centrifuged at 650g; joined supernatants were centrifuged at 8200g for 15 min, the pellet (mitochondrial fraction) was gently resuspended in IM. All procedures were carried out at 4°C, and determinations were conducted within 3 hours of mitochondrial isolation.

The integrity of the outer mitochondrial membrane was assessed by measuring cytochrome c oxidase activity in the presence and absence of n-dodecyl  $\beta$ -D-maltoside, using the Cytochrome c Oxidase Assay Kit from SIGMA. We found 42% integrity of the outer mitochondrial membrane, similar to that reported for mitochondria from other tissues [12].

Mitochondrial structure was assessed by electron microscopy. The mitochondrial fraction was fixed in a 3% glutaraldehyde solution dissolved in a cacodylate buffer pH 7.2 for 2 hours at 4°C, post-fixed in 2% (v/v) osmium tetroxide, dehydrated in graded ethyl alcohol and embedded in epoxy resin. Ultrathin sections were obtained with a Sorval MT6000 ultramicrotome, contrasted with uranyl acetate-lead-citrate, and examined with an electron microscope JEOL JEM 12000 EII. Electron microscopy studies revealed a high purity fraction (75–80%) and mitochondrial morphology similar to that observed in histological studies [13]. (S1 Fig). To obtain this preparation 10mM taurine and 1.0% defatted BSA were added to IM. The quality of this preparation allowed us to study mitochondrial activity from normal rat retina and compare to pathological situations.

## Oxygen consumption

Mitochondrial oxygen consumption was measured with a Clark electrode, Warner/Strath Kelvin in a 100 $\mu$ l chamber. The mitochondrial fraction (50 $\mu$ g protein) was incubated at 30°C, in IM plus 2mM inorganic phosphate (Pi), 20mM KCl, 1mM MgCl<sub>2</sub>, and 10mM glutamate/malate, to establish the resting state (state 4). The active state (state 3) was induced by 100 $\mu$ M ADP. 1mM KCN was added to verify the mitochondrial source of oxygen consumption.

## Mitochondrial respiratory complexes activity

Mitochondrial fractions were frozen and thawed to allow substrate uptake and the activity of complexes I, II and III were measured spectrophotometrically as described by Turnbull [14]. Complex I activity was measured by following the absorbance of NADH at 340 nm ( $\epsilon = 6.3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Mitochondria (100 $\mu$ g protein) were incubated in IM in the presence of 13mM NADH, 25mM potassium phosphate, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 2mM KCN, BSA (2.5mg/ml), 65 $\mu$ M ubiquinone and antimycin A (2 $\mu$ g/ml). Complex II activity was determined by following the absorbance of 2,6 dichloroindophenol (DCPIP) at 600nm ( $\epsilon = 19.1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Mitochondria (20 $\mu$ g protein) were incubated for 10 min in IM containing 20mM sodium succinate. 2 $\mu$ g/ml Rotenone, 2 $\mu$ g/ml Antimycin A, and 2mM KCN were added to inhibit complexes I, III and IV, respectively. The reaction was started with the addition of 65 $\mu$ M ubiquinone and 50 $\mu$ M DCPIP. Complex III activity was measured in mitochondria (0.5mg protein) incubated in IM, containing 15  $\mu$ M cytochrome C, 2 $\mu$ g/ml rotenone, 0.6mM dodecyl- $\beta$ -D-maltoside and 35 $\mu$ M ubiquinol. The absorbance of reduced cytochrome C was monitored at 550nm ( $\epsilon = 19.1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). To measure complex IV activity, we followed the rate of oxygen consumption [15]: 100 $\mu$ g of fresh mitochondrial protein were incubated in a potassium phosphate buffer assay (25mM) pH 7.2 containing



50 $\mu$ M tetramethyl phenylenediamine (TMPD), 1 $\mu$ g/ml antimycin A, 5mM ascorbate and 1mM KCN.

### Mitochondrial transmembrane potential

The mitochondrial transmembrane potential ( $\Delta\psi$ ) was estimated using safranin-O fluorescence at 586nm/495nm (em-ex), using an (DW2C Aminco Ollis) spectrofluorometer [16]. Mitochondria (100 $\mu$ g protein) were incubated at 30°C in IM containing 10 $\mu$ M safranin-O, 2mM Pi, 20mM KCl, 1mM MgCl<sub>2</sub>. Addition of 5 $\mu$ M carbonyl cyanide *m*-chlorophenyl hydrazone (CCCP) was used to dissipate the  $\Delta\psi$ . Mitochondria from normal and diabetic rat retinas were performed in parallel and maximal fluorescence was normalized.

### Mitochondrial ATP synthesis

For ATP synthesis, mitochondria (20 $\mu$ g protein) were incubated at 30°C in IM with the following additions: 50mM glucose, 0.5U/ml glucose 6 phosphate dehydrogenase, 350 $\mu$ M NADP<sup>+</sup>, 1.8 U/ml hexokinase, 2mM Pi, 20mM KCl, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM glutamate/malate; the reaction was started with 100 $\mu$ M ADP, and the mitochondrial ATP synthesis was followed by the NADPH absorbance at 340nm ( $\epsilon = 6.3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). A parallel sample was incubated with oligomycin (10  $\mu$ g/mg protein) to inhibit the activity of ATP synthase and values were subtracted to the total absorbance change.

### Superoxide production

Superoxide was measured by reduction of nitroblue-tetrazolium (NBT), using a standard curve of superoxide production by the xanthine-xanthine oxidase system [17]. Mitochondria (50 $\mu$ g protein) were incubated at 30°C in IM containing 2mM Pi, 20mM KCl, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM glutamate/malate, and 200 $\mu$ M NBT. Reduction of NBT was monitored at 550nm.

### COX and UCP2 expression

Western blots were performed as previously described [18]. A retina was transferred into a lysis buffer (1:3 (p/v): RIPA-Tris buffer (2mM EGTA; 316mM NaCl; 20mM Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>; 50mM NaF; 20mM Tris-HCl; 100mM PMSF and 100mM EDTA; 0.1% leupeptine and 0.1% aprotinin; 0.2% SDS and 2% Triton-X100) and maintained under constant shaking for 1 h at 4°C. The sample was resolved on a 10% SDS polyacrilamide gel. Proteins were transferred into PVDF Immobilon membranes (Millipore Corp, Billerica, MA). After being blocked with 5% fat-free milk, the membranes were probed with rabbit anti-uncoupling protein 2 (Alpha Diagnostic Int Inc, San Antonio, TX) or anti-cytochrome C oxidase (COX IV)(1:1000, Cell Signaling Technology, Danvers, MA); followed by horseradish-peroxidase-conjugated secondary antibody (1:10000, Amersham Biosciences Piscataway, NJ). Protein loading was normalized to actin using a monoclonal primary antibody (1:25000, Chemicon, Temecula, CA). The signal was detected by enhanced chemiluminescence using Chemiluminiscent HRP substrate (Millipore Corp, Billerica, MA). Densitometry was performed with an Alpha DigiDoc RT (Alpha Innotech, San Leandro, CA).

### Protein content

Protein content was determined by the Lowry method, using a kit from Bio Rad, with BSA as standard.

**Table 1. Rates of [<sup>14</sup>C] Glucose in Normal and Diabetic Rat Retina.**

Glucose	CO <sub>2</sub> Production (Glucose Oxidized)							
	Glucose Accumulated		[U- <sup>14</sup> C] glucose		[1- <sup>14</sup> C] glucose		PPP	
	Control	Diabetic	Control	Diabetic	Control	Diabetic	Control	Diabetic
5.6	76 ± 7.3	89 ± 16	17 ± 2.5	14 ± 2.	3 ± 0.4	1.9 ± 0.2*	2.8	2.3
30	406 ± 67§	322 ± 79§	66 ± 8.5§	42 ± 4§*	5 ± 0.9§	6 ± 1.2§	11	7

Incubation was carried at 37°C for 20 min in the presence of glucose of different concentrations. The activity of PPP is taken as one sixth of CO<sub>2</sub> produced from [U-<sup>14</sup>C] glucose. The results are expressed in nmol/mg protein. Values are mean ± SEM for at least five experiments.

\*p = 0.02 respect to non diabetic;

§ p ≤ 0.03 respect 5mM.

doi:10.1371/journal.pone.0122727.t001

### Statistical analysis

Results were analysed with the one way ANOVA test followed by Tuckey`s and T student analysis using the GraphPad Prism 5 program. The values were considered statistically significant if p < 0.05.

### Results

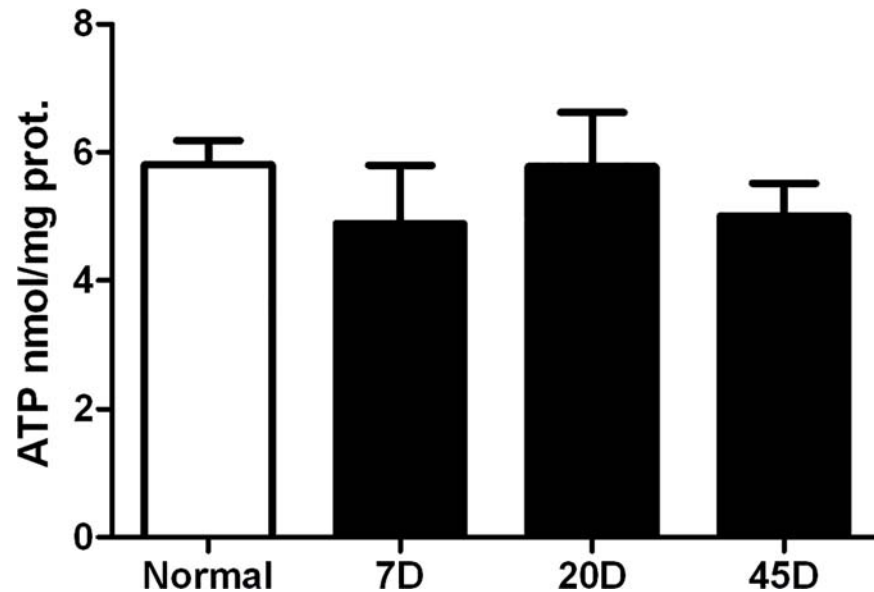
Retinas from normal rats accumulated glucose proportionally to added glucose. As shown in [Table 1](#), increasing glucose concentration from 5.6mM to 30mM caused a four-fold increase in glucose uptake. High levels of glucose (30mM) increased four-fold the levels in CO<sub>2</sub> production from mitochondria. Additionally, the amount of CO<sub>2</sub> produced from [1-<sup>14</sup>C] glucose represents 2–4% of accumulated glucose ([Table 1](#)). As [1-<sup>14</sup>C] glucose is also decarboxylated by glycolysis, the contribution of the pentose phosphate pathway (PPP) was estimated. This was achieved by subtracting one sixth of the CO<sub>2</sub> values obtained. Retinas from 20 day-diabetic rats also accumulated glucose proportionally to glucose concentration in the medium. However 20 day-diabetic retinas from diabetic produced 40% less CO<sub>2</sub> at high glucose (30mM).

The decrease in CO<sub>2</sub> production by diabetic rats suggested that oxidative phosphorylation was less efficient. Therefore, we analyzed the ATP content of normal and diabetic rat retinas. We found ATP levels of 5.8 ± 0.37 nmol/mg protein in normal retina, values which were similar to those reported previously [[19](#)]. In diabetic rat retinas the ATP content was not significantly different to the controls ([Fig 1](#)).

### Mitochondrial activity

The decreased CO<sub>2</sub> release led us to evaluate oxidative phosphorylation in isolated mitochondria. In the presence of glutamate/malate, the resting-state (state 4) rate of oxygen consumption in mitochondria from normal rat retinas was relatively high, 14.6 ± 1.1 natgO(min.mg prot)<sup>-1</sup>, and respiratory control (RC) = 4 ([S2 Fig](#)). In mitochondria from 7 day-diabetic rats the rate of oxygen consumption in both state 4 and state 3 increased mildly, while RC did not decrease significantly. In contrast, in mitochondria from 20 day-diabetic rats, state 4 increased further, leading to a significant decrease in RC ([Fig 2](#)). Interestingly, mitochondria from 45 days diabetic rat retinas exhibited a recovery in the state 4 and state 3 rates of oxygen consumption with the resulting recovery in RC, such that it was similar to control mitochondria.

Subsequently, we determined the activity of the electron transport respiratory complexes. The different mitochondrial respiratory complexes from normal rat retina activities were as follows: complex I, 2.80 nmol(min.mg prot)<sup>-1</sup>; complex II, 11.95 nmol(min.mg prot)<sup>-1</sup>; complex



**Fig 1. ATP content in rat retina, before treatment and after 7, 20 and 45 days of streptozotocin administration.** Values are the mean  $\pm$  SEM for three to six independent experiments.

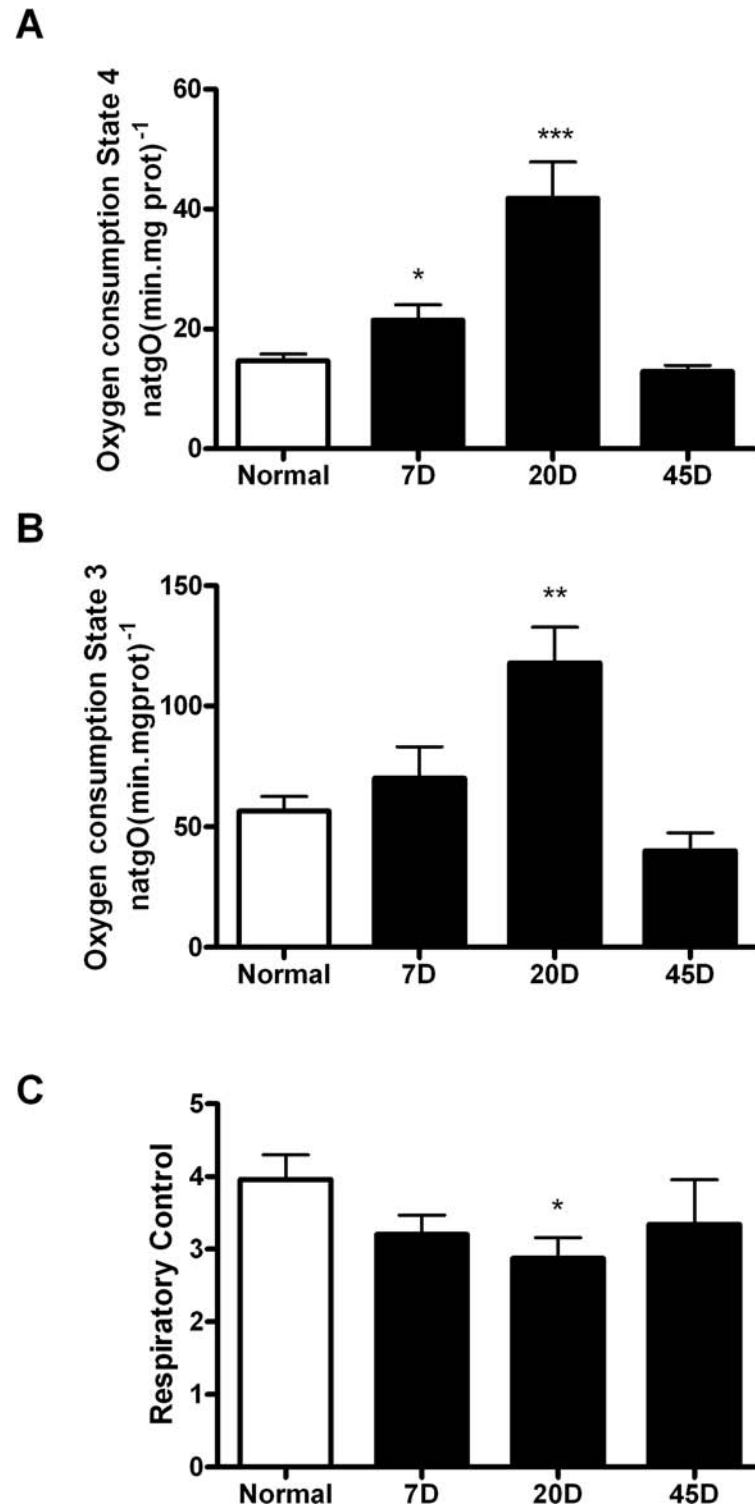
doi:10.1371/journal.pone.0122727.g001

III  $3.8 \text{ nmol}(\text{min}.\text{mg prot})^{-1}$ ; and complex IV  $58.6 \text{ natgO}(\text{min}.\text{mg prot})^{-1}$ . In the 7 day-diabetic samples, only complex III increased its activity. At 20 day-diabetic, mitochondria exhibited an increase in complexes I, II and III. Then at 45 day-diabetic rats complexes I and III activity returned to normal while complex II activity remained high and only at this stage complex IV increased its activity, to  $86.3 \text{ natgO}(\text{min}.\text{mg prot})^{-1}$  (Fig 3).

In spite of the increase in activity of the mitochondrial complexes, it was observed that  $\Delta\psi$  was reduced by 30% to 40% in retinas from all 7, 20 and 45 day-diabetic samples (Fig 4). The result suggested that there might be an uncoupling effect produced by hyperglycaemic conditions. To test this, we decided to measure the rate of synthesis of ATP in mitochondria from each group. Unexpectedly, the rate of ATP synthesis,  $15.3 \pm 2 \text{ nmol}(\text{min}.\text{mg prot})^{-1}$  was similar in mitochondria from all samples, including normal and diabetic rat retinas (Fig 5).

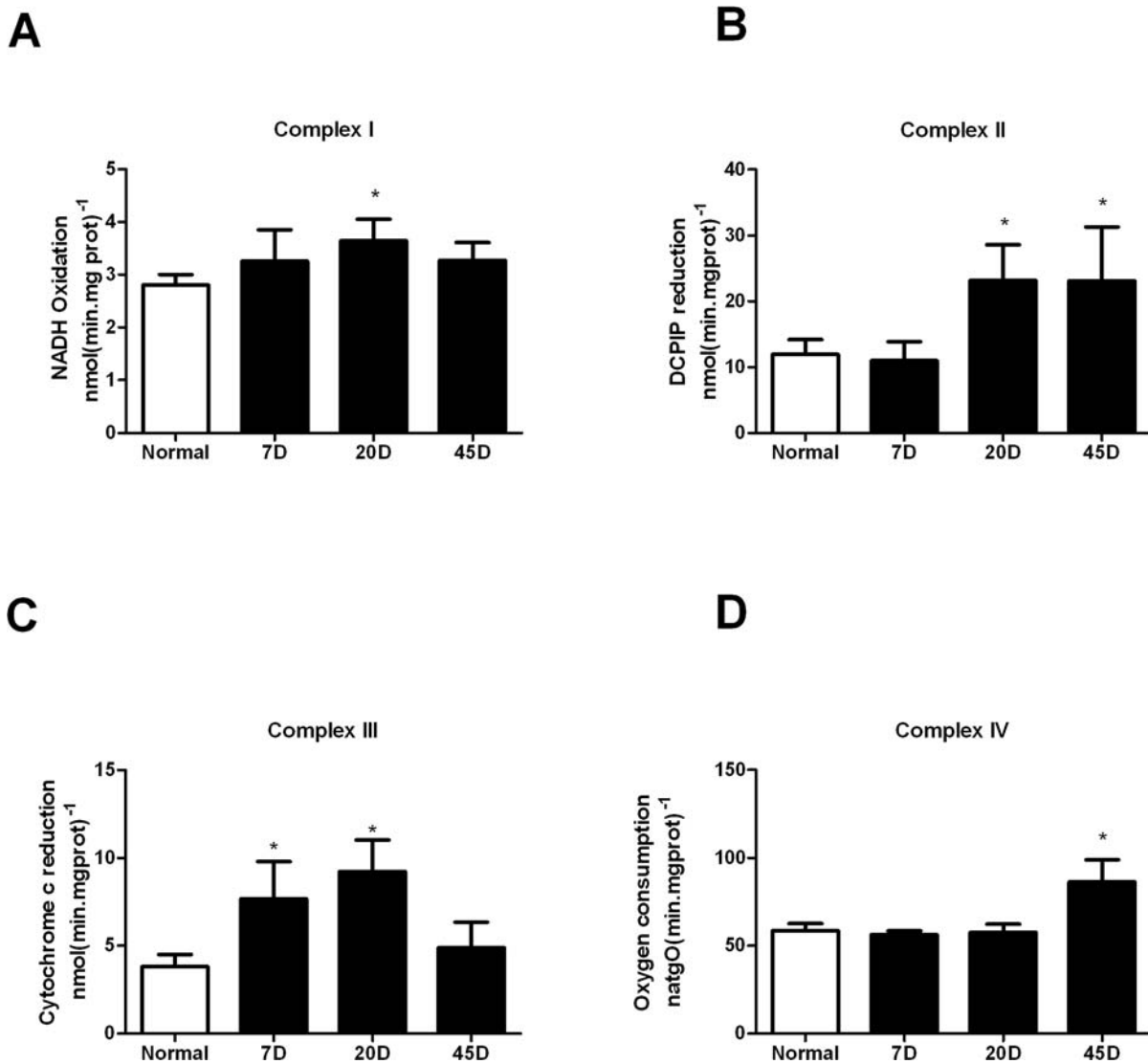
Diabetes led to different adaptations in mitochondria, such as the different activities of the respiratory complexes and a small, but consistent decrease in  $\Delta\psi$ . However, these changes do not seem to reflect damage, as the synthesis of ATP did not change. Thus, we decided to seek for an adaptive response in diabetic mitochondria such as the expression of UCP2. In this regard, it has been reported that, in other tissues UCP2 is expressed in order to prevent ROS overproduction [20]. Indeed, UCP2 expression has been reported to decrease the  $\Delta\psi$  without inhibiting the synthesis of ATP [21]. The activity of UCP2 was tested evaluating the sensitivity of the  $\Delta\psi$  to GDP an UCP2-inhibitor. In control mitochondria, GDP increased the  $\Delta\psi$  by 50%, but it lost its effects in the 7-day and 20-day-diabetic mitochondria (Fig 6). Then, at 45 day-diabetic treatment, mitochondria fully recovered the sensitivity to GDP, indicating that 45 day-diabetic mitochondria fully recovered their UCP2 activity.

To test whether the UCP2 activity correlated with a decrease in ROS production, it was decided to measure superoxide mitochondrial production in each sample in the presence and in the absence of GDP. When we measured the reduction of NBT to yield formazan it was observed that superoxide production in the 7 day and 20 day-diabetic samples was insensitive to GDP. In contrast, in the control and in the 45-day-diabetic sample, GDP induced an increase in ROS production, suggesting that the control UCP2 activity was recovered in the 45 day



**Fig 2. Mitochondrial oxygen consumption.** (A) Oxygen consumption was assessed in isolated mitochondria incubated at 30°C in IM with 10mM glutamate /malate as oxidative substrate in state 4 and (B) in active state (3) (100µM ADP). (C) Respiratory control ratio (RC). Values correspond to natgO/min/mg prot ± SEM of at least six independent experiments. p<0.05; \*\* p<0.005; \*\*\* p<0.0005, respect to the normal.

doi:10.1371/journal.pone.0122727.g002



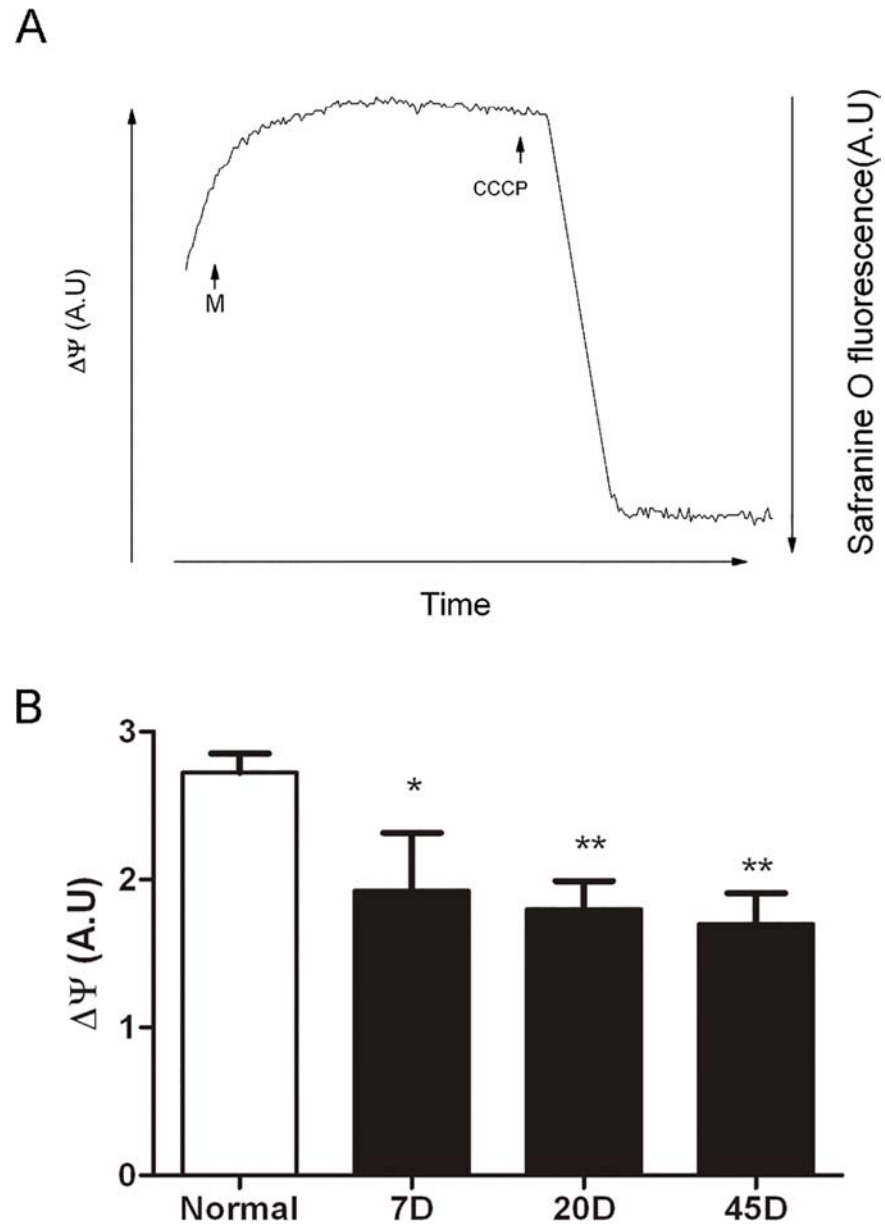
**Fig 3. Activity of the respiratory complexes.** Complexes activities in isolated mitochondria from normal and diabetic rat retina, were determined as described in Methods. Results are the mean  $\pm$  SEM of at least four independent experiments. \* $p < 0.05$ .

doi:10.1371/journal.pone.0122727.g003

sample (Fig 7). This recovery in activity did not seem to reflect changes in the expression of the protein, as neither the expression levels of UCP2 nor COX change under any of the conditions tested (Fig 8). Activation of UCP2 and COX in 45-day diabetic mitochondria seems to be a response to the diabetes process that leads to more efficient handling of ROS.

### Discussion

Retinal tissue is outstanding because it requires a large amount of energy and exhibits a high rate of respiration, thus it is particularly vulnerable to abnormalities in energy metabolism [22,23]. Hyperglycemia is a determinant factor in the development of diabetic retinopathy [6], which has been related to a high mitochondrial activity leading in high ROS production and oxidative stress [5,24]. Few studies have focused on the mitochondrial bioenergetics of retina, mainly due to the limiting amount of tissue. This inconvenience was eliminated using

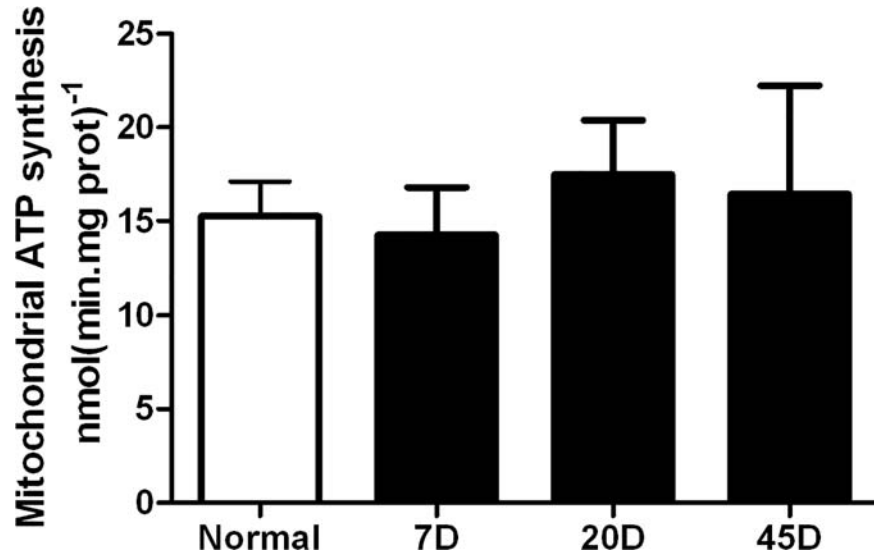


**Fig 4. Mitochondrial membrane potential.** (A) Representative mitochondrial transmembrane potential trace, (M) mitochondria (100 $\mu$ g protein) from normal rat retina were incubated at 30°C, in IM, monitoring the Safranin O fluorescence. The  $\Delta\psi$  was dissipated by the addition of 5 $\mu$ M CCCP, as described in Methods. (B)  $\Delta\psi$  from normal and diabetic (7, 20, 45 days) rat retinas. Values are the mean  $\pm$  SEM from at least four separated experiments. \*  $p < 0.5$ , \*\*  $p < 0.05$ .

doi:10.1371/journal.pone.0122727.g004

microliter assay systems. One of our goals was to isolate enriched retinal mitochondria that allowed us to analyze mitochondrial function: respiratory control, mitochondrial complex activity, ATP synthesis and  $\Delta\psi$ .

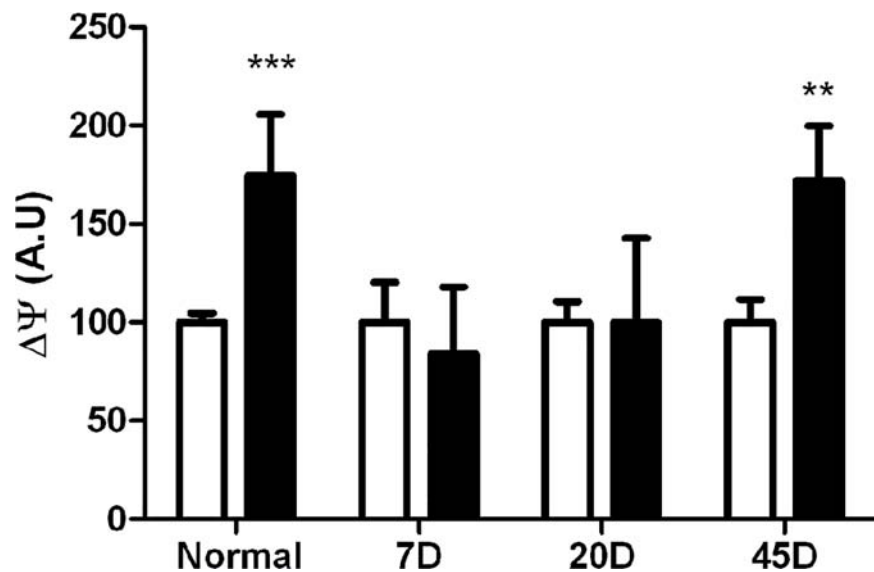
In order to get insight into the normal mitochondrial function and its possible relation with diabetic retinopathy we first evaluated mitochondrial activity in the entire retina by means of glucose oxidation. Our results indicated that all samples of rat retina accumulated glucose proportionally to its extracellular concentration. However, in normal retina,  $\text{CO}_2$  production from



**Fig 5. Mitochondrial ATP synthesis.** Mitochondrial fraction was incubated at 30°C in IM, using glutamate/malate (10mM) as oxidative substrate and 100µM ADP. The ATP production was determined by NADPH reduction by a coupled reaction with HK and G6P-DH enzymes as described in Methods. Incubation was carried out in the absence and presence of oligomycin (10µg/mg prot.) to obtain the specific ATP produced by ATP synthase. Each value is the mean ± SEM of three to five independent experiments.

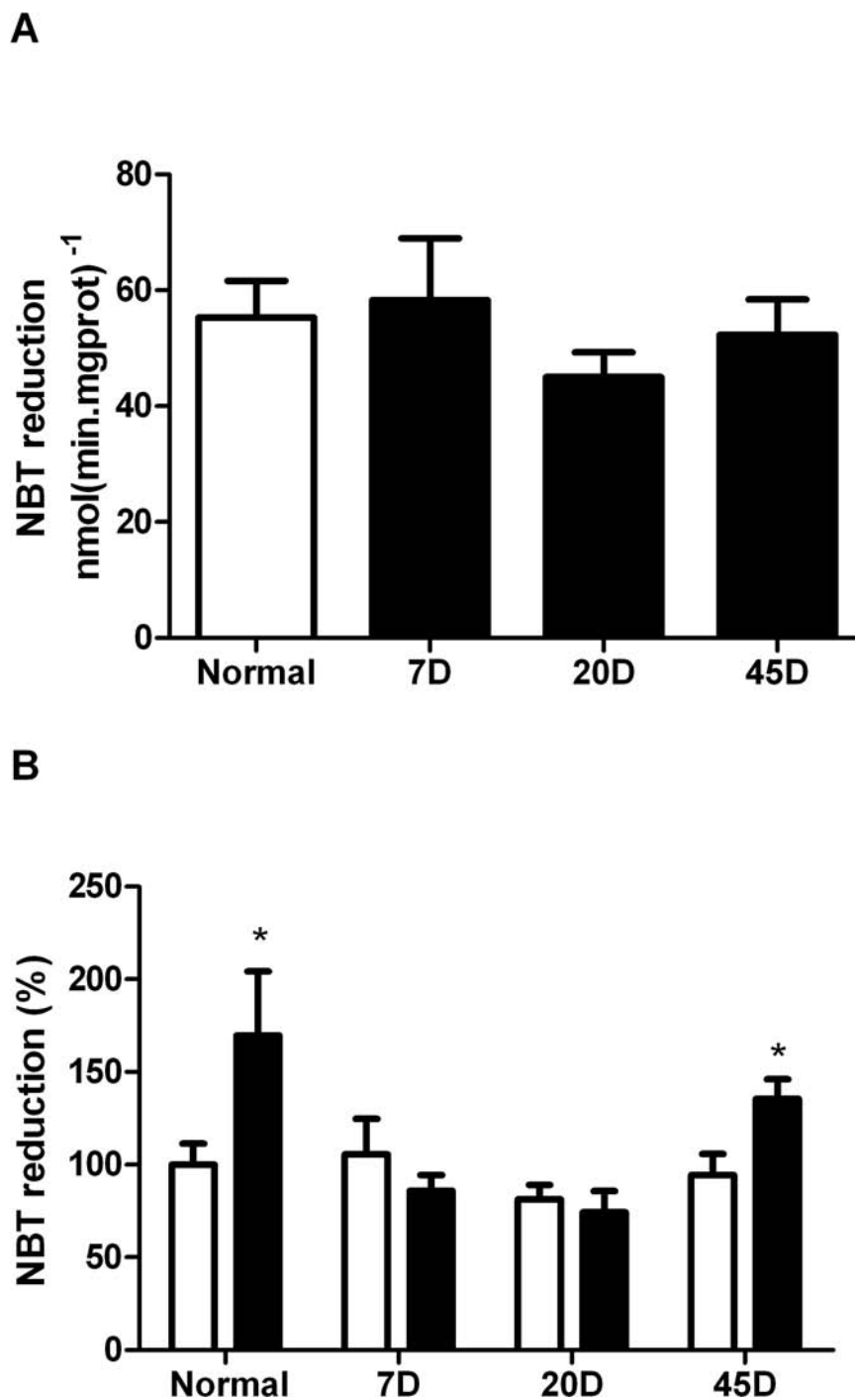
doi:10.1371/journal.pone.0122727.g005

glucose oxidation was proportional to its accumulation, whereas in diabetic rat retina the CO<sub>2</sub> yield was lower. On the other hand CO<sub>2</sub> production by the PPP pathway did not change [19]. The decrease in CO<sub>2</sub> production from glucose mediated by diabetic rat retina, suggests a decrease in mitochondrial glucose oxidation, which was not supported by the normal ATP levels observed in diabetic retina. Then, the normal ATP content found in diabetic retina, most likely represent its high glycolytic activity [1]. In fact, we previously reported a high lactate and



**Fig 6. Effect of GDP on mitochondrial transmembrane potential.** Δψ was determined in the absence (white bars) and presence of 1mM GDP (black bars). Each value corresponds to the average ± SEM of at least three independent experiments.

doi:10.1371/journal.pone.0122727.g006

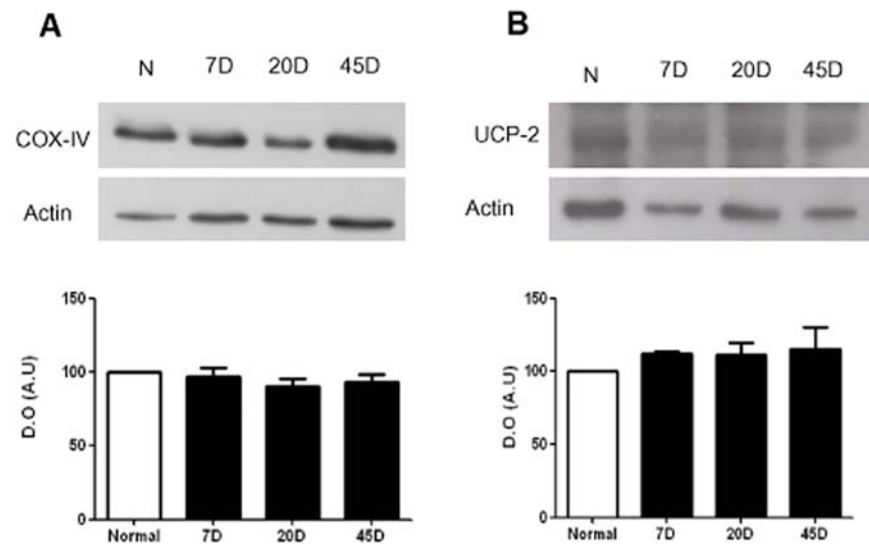


**Fig 7. Superoxide production was determined by the reduction of NBT by incubation of isolated mitochondria at 30° in IM at state 4 conditions.** (A) Superoxide production from normal and diabetic rat retina. (B) Mitochondria were incubated in the absence (white columns) or in the presence of 1mM GDP (black columns). Each value represents the average  $\pm$  SEM of three to six independent experiments \*  $p < 0.05$ .

doi:10.1371/journal.pone.0122727.g007

glycogen content in diabetic rat retina [25,26]. In this respect, retinal endothelial cells incubated in high glucose concentrations, decrease oxygen consumption and increase extracellular acidification [27]. However, utilization of glucose may vary among different type of cells, since





**Fig 8. Uncoupling UCP2 and COX expression levels in retina.** Western blot of (A) COX-IV and (B) UCP2 in normal, 7, 20 and 45 days after diabetes induction. Upper part, a representative western blot experiment; lower part, densitometric analysis of three to five independent experiments.

doi:10.1371/journal.pone.0122727.g008

retinal pericytes incubated in high glucose concentrations, decrease both oxygen consumption and acidification [28].

Interesting, recent studies showed that UCP2 activity decreases mitochondrial glucose oxidation, favoring aerobic glycolysis and promotes oxidation of fatty acids and glutamine by exporting C4 metabolites from mitochondria to the cytosol [29–31]. In fact, in spite of the lower rate of glucose oxidation in the diabetic rat retina, we observed increased activity of all mitochondrial respiratory complexes plus a more active respiratory chain. The higher state IV respiration rate resulted in a RC below normal at 20 days of diabetes. The increase in the rate of oxygen consumption and the activities of each respiratory complex was not due to changes in total mitochondrial content, since the expression levels of COX-IV and UCP2 were not modified at any time, supporting the idea of a metabolic switch for substrates oxidation.

We observed a  $\Delta\psi$  decreased at all times of diabetes, indicative of mitochondrial uncoupling. The variations in  $\Delta\psi$  could be a sign of mitochondrial potential heterogeneity, as has been reported in cultured cells in high glucose conditions [27,28]. In fact, we would expect heterogeneity, since our mitochondria preparations are obtained from the different retinal cell types. Still, the decrease in  $\Delta\psi$  we observed represents significant modifications in mitochondrial retinal activity as a whole. Nevertheless, the mitochondrial ATP synthesis was not modified by the diabetic condition, meaning that at these early stages, the energetic of retinal cells were not compromised.

The  $\Delta\psi$  increased in response to GDP in both the normal and the 45 day-diabetes, signifying that mitochondria from normal retina have an active UCP2, which was recovered at the 45 day-diabetic stage. Even though we did not find changes in ROS production between mitochondria from normal and diabetic rat retinas, a tendency to regulate this production in the control and the 45 day-diabetic samples was observed. In agreement with these results, UCP2 activity has been involved in the “mild uncoupling” preventing superoxide production [32]. Then, the increase of COX and UCP2 activities result in retinal mitochondria adaptations leading to the decrease production of ROS.

Nonetheless, although UCP2 expression was not change, GDP did not modify  $\Delta\psi$  at 7 and 20 days of diabetes, implying that UCP2 is not active and that other mechanisms participate in  $\Delta\psi$  modulation, perhaps the permeability transition pore and/or adenosine nucleotide translocator (ANT). In this respect, similar results were found in the mitochondria from heart and brain long-term hyperglycemic rats, which showed a  $\Delta\psi$ -enhanced susceptibility to the ANT modulation, even in the absence of changes in UCP2 expression [32–34].

In spite of the uncoupling UCP2 activity, and the growing evidence of its role regulating the flux of metabolites into the tricarboxylic acid cycle, its precise function in normal cellular physiology is still unclear [35]. Our results might indicate that UCP2 specific activity would vary depending of the physiological situation. The broad effects on coupling efficiency, ROS production and metabolic switch of UCP2 imply its complicated regulation activity in the different tissues.

Retina is constantly exposed to changes in blood glucose supply; thus, changes in  $\Delta\psi$  and/or the presence of a metabolic switch, may allow a compensatory response to maintain mitochondrial physiology and thus preserve retinal function. Our results suggest that hyperglycemia decreases both glucose oxidation and the mitochondrial  $\Delta\psi$  thus leading to maintain metabolic energetic requirements while avoiding oxidative stress. Although mitochondrial activity has been proposed to induce oxidative stress in diabetic rat retina [3,5,6], it has been reported that oxidative stress occurs after 45 days of diabetes in rats [7]. The same authors demonstrated that initial activation of NADPH oxidase (NOX) leads to ROS production that in turn lead to mitochondrial alterations [36]. Hence, the mitochondrial alterations observed at long-standing diabetes [5,37], most likely correspond to disease-related damage [38]. Our results open new perspectives for understanding the UCP2-modulating mechanisms of mitochondrial activity in normal retina, as well as in retinal disease.

## Supporting Information

**S1 Fig. Mitochondrial ultrastructure.** Low magnification of mitochondrial fraction from normal retina. (A, B) Mitochondria from normal and 20 days diabetic rats. (TIF)

**S2 Fig. Oxygen consumption by retina mitochondria.** A representative trace of oxygen consumption, 50 $\mu$ g mitochondria protein (M) were incubated at 30°C, with inorganic phosphate, (Pi) 6mM; KCl, 2mM; MgCl<sub>2</sub>, 1mM; glutamate/malate, 1mM (state IV). State III (active) was induced by the addition of ADP, (100 $\mu$ M). KCN was added to probe the specificity of oxygen consumption by cytochrome oxidase. (TIF)

## Acknowledgments

The authors would like to thank Mr Gustavo Sánchez-Chávez and Dr Sergio Guerrero-Castillo for technical assistance, Ernesto Hernández- Ramírez for helping in superoxide determination, Rodolfo Paredes of the Unidad de Imagenología for assistance in the microscopy studies, and to the Animal Facilities Unit.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: IOP SUC RS. Performed the experiments: IOP RS. Analyzed the data: IOP SUC RS. Contributed reagents/materials/analysis tools: SUC RS. Wrote the paper: IOP SUC RS.

## References

1. Graymore CN (1970) Metabolic survival of the isolated retina. *Br Med Bull* 26: 130–133. PMID: [4911765](#)
2. Antonetti DA, Barber AJ, Bronson SK, Freeman WM, Gardner TW, et al. (2006) Diabetic retinopathy: seeing beyond glucose-induced microvascular disease. *Diabetes* 55: 2401–2411. PMID: [16936187](#)
3. Korshunov SS, Skulachev VP, Starkov AA (1997) High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS Lett* 416: 15–18. PMID: [9369223](#)
4. Medrano CJ, Fox DA (1995) Oxygen consumption in the rat outer and inner retina: light- and pharmacologically-induced inhibition. *Exp Eye Res* 61: 273–284. PMID: [7556491](#)
5. Kowluru RA, Abbas SN (2003) Diabetes-induced mitochondrial dysfunction in the retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44: 5327–5334. PMID: [14638734](#)
6. Brownlee M (2001) Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 414: 813–820. PMID: [11742414](#)
7. Tewari S, Santos JM, Kowluru RA (2012) Damaged mitochondrial DNA replication system and the development of diabetic retinopathy. *Antioxid Redox Signal* 17: 492–504. doi: [10.1089/ars.2011.4333](#) PMID: [22229649](#)
8. McKenna MC1 TJ, Stevenson JH, Huang X (1996) New insights into the compartmentation of glutamate and glutamine in cultured rat brain astrocytes. *Developmental Neuroscience* 18: 380–390. PMID: [8940609](#)
9. Coffe V CR, Salceda R. (2006) Glucose metabolism in rat retinal pigment epithelium. *Neurochemical research* 31: 103–108. PMID: [16475003](#)
10. Trautschold IL, Schweitzer G (1988) Adenosine 5′triphosphate. UV-Method with hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Bergmeyer Enzymatic Methods VII*: 346–357.
11. Uribe SAR, Peña A (1984) Effects of p-Pinene, a Nonsubstituted Monoterpene, on Rat Liver Mitochondria. *Pesticide Biochemistry And Physiology* 22: 43–50.
12. Wojtczak L, Zaluska H, Wroniszewska A, Wojtczak AB (1972) Assay for the intactness of the outer membrane in isolated mitochondria. *Acta Biochim Pol* 19: 227–234. PMID: [4347175](#)
13. Perkins GA, Ellisman MH, Fox DA (2003) Three-dimensional analysis of mouse rod and cone mitochondrial cristae architecture: bioenergetic and functional implications. *Mol Vis* 9: 60–73. PMID: [12632036](#)
14. Birch-Machin MA, Turnbull DM (2001) Assaying mitochondrial respiratory complex activity in mitochondria isolated from human cells and tissues. *Methods Cell Biol* 65: 97–117. PMID: [11381612](#)
15. Uribe SR, Peña A (1985) Effects of P-Pinene on Yeast Membrane Functions.. *Journal of bacteriology* 161: 1195–1200 PMID: [3156123](#)
16. Akerman KE, Wikstrom MK (1976) Safranin as a probe of the mitochondrial membrane potential. *FEBS Lett* 68: 191–197. PMID: [976474](#)
17. Liu R-h Fu S-y, Zhan H-y Lucia LA (2009) General Spectroscopic Protocol to Obtain the Concentration of the Superoxide Anion Radical. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 48: 9331–9334.
18. Osorio-Paz I, Sanchez-Chavez G, Salceda R (2012) Control of glycogen content in retina: allosteric regulation of glycogen synthase. *PLoS One* 7: e30822. doi: [10.1371/journal.pone.0030822](#) PMID: [22363495](#)
19. Winkler BS, Arnold MJ, Brassell MA, Sliter DR (1997) Glucose dependence of glycolysis, hexose monophosphate shunt activity, energy status, and the polyol pathway in retinas isolated from normal (non-diabetic) rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38: 62–71. PMID: [9008631](#)
20. Mailloux RJ, Harper ME (2011) Uncoupling proteins and the control of mitochondrial reactive oxygen species production. *Free Radic Biol Med* 51: 1106–1115. doi: [10.1016/j.freeradbiomed.2011.06.022](#) PMID: [21762777](#)
21. Echtay KS, Winkler E, Frischmuth K, Klingenberg M (2001) Uncoupling proteins 2 and 3 are highly active H(+) transporters and highly nucleotide sensitive when activated by coenzyme Q (ubiquinone). *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 1416–1421. PMID: [11171965](#)
22. Wong-Riley MT (2010) Energy metabolism of the visual system. *Eye Brain* 2: 99–116. PMID: [23226947](#)
23. Winkler BS, Dang L, Malinoski C, Easter SS Jr (1997) An assessment of rat photoreceptor sensitivity to mitochondrial blockade. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38: 1569–1577. PMID: [9224285](#)
24. (1997) Association for Research in Vision and Ophthalmology 1997 annual meeting. Fort Lauderdale, Florida, May 11–16 Abstracts. Part I. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38: S1–677. PMID: [9088172](#)

25. Salceda R, Vilchis C, Coffe V, Hernandez-Munoz R (1998) Changes in the redox state in the retina and brain during the onset of diabetes in rats. *Neurochem Res* 23: 893–897. PMID: [9580389](#)
26. Sanchez-Chavez G, Hernandez-Berrones J, Luna-Ulloa LB, Coffe V, Salceda R (2008) Effect of diabetes on glycogen metabolism in rat retina. *Neurochem Res* 33: 1301–1308. doi: [10.1007/s11064-007-9583-7](#) PMID: [18274898](#)
27. Trudeau K, Molina AJ, Guo W, Roy S (2010) High glucose disrupts mitochondrial morphology in retinal endothelial cells: implications for diabetic retinopathy. *Am J Pathol* 177: 447–455. doi: [10.2353/ajpath.2010.091029](#) PMID: [20522647](#)
28. Trudeau K, Molina AJ, Roy S (2011) High glucose induces mitochondrial morphology and metabolic changes in retinal pericytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52: 8657–8664. doi: [10.1167/iops.11-7934](#) PMID: [21979999](#)
29. Vozza A, Parisi G, De Leonardis F, Lasorsa FM, Castegna A, et al. (2014) UCP2 transports C4 metabolites out of mitochondria, regulating glucose and glutamine oxidation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: 960–965. doi: [10.1073/pnas.1317400111](#) PMID: [24395786](#)
30. Kukat A, Dogan SA, Edgar D, Mourier A, Jacoby C, et al. (2014) Loss of UCP2 attenuates mitochondrial dysfunction without altering ROS production and uncoupling activity. *PLoS Genet* 10: e1004385. doi: [10.1371/journal.pgen.1004385](#) PMID: [24945157](#)
31. Koziel A, Woyda-Ploszczyca A, Kicinska A, Jarmuszkiewicz W (2012) The influence of high glucose on the aerobic metabolism of endothelial EA.hy926 cells. *Pflugers Arch* 464: 657–669. doi: [10.1007/s00424-012-1156-1](#) PMID: [23053476](#)
32. Skulachev VP (1998) Uncoupling: new approaches to an old problem of bioenergetics. *Biochim Biophys Acta* 1363: 100–124. PMID: [9507078](#)
33. Boudina S, Sena S, Theobald H, Sheng X, Wright JJ, et al. (2007) Mitochondrial energetics in the heart in obesity-related diabetes: direct evidence for increased uncoupled respiration and activation of uncoupling proteins. *Diabetes* 56: 2457–2466. PMID: [17623815](#)
34. Cardoso S, Santos MS, Moreno A, Moreira PI (2013) UCP2 and ANT differently modulate proton-leak in brain mitochondria of long-term hyperglycemic and recurrent hypoglycemic rats. *J Bioenerg Biomembr* 45: 397–407. doi: [10.1007/s10863-013-9503-2](#) PMID: [23504111](#)
35. Cannon B, Shabalina IG, Kramarova TV, Petrovic N, Nedergaard J (2006) Uncoupling proteins: a role in protection against reactive oxygen species—or not? *Biochim Biophys Acta* 1757: 449–458. PMID: [16806053](#)
36. Kowluru RA, Kowluru A, Veluthakal R, Mohammad G, Syed I, et al. (2014) TIAM1-RAC1 signalling axis-mediated activation of NADPH oxidase-2 initiates mitochondrial damage in the development of diabetic retinopathy. *Diabetologia* 57: 1047–1056. doi: [10.1007/s00125-014-3194-z](#) PMID: [24554007](#)
37. Madsen-Bouterse SA, Kowluru RA (2008) Oxidative stress and diabetic retinopathy: pathophysiological mechanisms and treatment perspectives. *Rev Endocr Metab Disord* 9: 315–327. doi: [10.1007/s11154-008-9090-4](#) PMID: [18654858](#)
38. Santos JM, Tewari S, Kowluru RA (2012) A compensatory mechanism protects retinal mitochondria from initial insult in diabetic retinopathy. *Free Radic Biol Med* 53: 1729–1737. doi: [10.1016/j.freeradbiomed.2012.08.588](#) PMID: [22982046](#)

# CONTROL HORMONAL DE LA HOMEOSTÁSIS ENERGÉTICA: DE LA CÉLULA AL CEREBRO\*

Ixchel Osorio Paz y Rocío Salceda Sacanelles

División de Neurociencias. Departamento de Neurodesarrollo y Fisiología, Instituto de Fisiología Celular, UNAM. Circuito Exterior S/N Ciudad Universitaria, Coyoacán, 04510 México D. F. Correo E: ixchelo@email.ifc.unam.mx

## RESUMEN

El contenido de glucosa, tanto en las células como en el organismo completo, depende de su ingreso, síntesis y consumo. Este flujo se encuentra regulado por señales que son generadas en respuesta a los cambios del estado energético. A nivel orgánico, la sensación de hambre y saciedad, modulada por el hipotálamo, desemboca en la producción de neuropéptidos que estimulan a órganos como el páncreas, intestino y tejido adiposo, que responden y promueven la producción de hormonas, como la insulina y el glucagón, cuyos receptores generan a nivel celular el aumento o disminución del metabolismo de la glucosa. Esta regulación a nivel celular incluye la activación de factores de transcripción de diferentes enzimas, así como su fosforilación, lo que lleva a un control de su actividad. La fina regulación energética del organismo es un ejemplo claro de la compleja función de la homeostasis celular.

## ABSTRACT

The glucose content in cells and in the whole organism, depends on its input and consumption. This flow is regulated by signals that are generated in response to changes in its energetic state. At the organic level, hunger and satiety directed by the hypothalamus results in the production of neuropeptides that stimulate organs like the pancreas, intestine and adipose tissue, which in turn produce hormones; among the most important, insulin and glucagon which generate the activation and inactivation of the enzymes that regulate metabolic pathways in the cells. At the cellular level, this regulation occurs by activation of transcription factors that influence the increase or decrease of the enzymes, as well as its regulation by phosphorylation. The precise body energy regulation is a clear example of the complex role of cell homeostasis.

## INTRODUCCIÓN

Los organismos vivos son sistemas abiertos, que intercambian materia y energía con el medio que les rodea. Estos sistemas son capaces de mantener una estabilidad interna que les permite llevar a cabo sus funciones, a este proceso se le conoce como homeostasis. La mayoría de los organismos utilizan la glucosa como principal fuente de energía para realizar sus procesos, el contenido de esta molécula dentro del organismo debe también permanecer estable. La concentración de glucosa en sangre (glucemia) se mantiene alrededor de 100 mg/dl (5.6 mM) debido al balance entre la ingesta de alimentos y la utilización de los nutrientes.

Esta regulación se ejerce sobre diferentes niveles del organismo y es fácil intuir que es la propia molécula de glucosa la iniciadora de este proceso homeostático.

## EFFECTO DIRECTO DE LA GLUCOSA

El metabolismo de la glucosa comienza con su transporte del flujo sanguíneo al interior de las células, esta molécula entra a través de transportadores específicos que pueden ser dependientes o independientes de sodio. El transporte dependiente de sodio es característico de tejidos epiteliales tales como el epitelio intestinal. Los transportadores de glucosa independientes de sodio constituyen una

## PALABRAS

### CLAVE:

Homeostasis de glucosa, hormonas, hipotálamo, órganos periféricos

## KEY WORDS:

Glucose homeostasis, hormones, hypothalamus, peripheral organs



familia de proteínas transmembranales llamadas GLUT, las cuáles se diferencian básicamente en cuanto a su ubicación tisular (1). Una vez dentro de la célula, la glucosa es fosforilada a glucosa 6 fosfato (G6P) por la hexocinasa (HK), entonces es oxidada en la vía glucolítica formando piruvato y ATP; el piruvato es oxidado a  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$  en las mitocondrias, en donde se producen 30 a 32 molas de ATP por molécula de glucosa. Cuando la demanda corporal de glucosa es baja esta molécula es almacenada en forma de glucógeno, principalmente en el hígado y músculo esquelético; en el tejido adiposo se almacena en forma de triacilgliceroles a partir de la acetil CoA proveniente del piruvato.

Entre estos procesos catabólicos y anabólicos existe una gran coordinación y ésta representa el primer nivel regulador del metabolismo energético. Moléculas como el ATP, el  $\text{NADH}+\text{H}^+$  y otras producidas por reacciones catabólicas funcionan como señales que inhiben las vías que las producen. De manera recíproca, un exceso de moléculas como el ADP y el  $\text{NAD}^+$  funcionan como señales de carencia de energía y promueven la activación de vías catabólicas. De esta manera las enzimas reguladoras en las vías metabólicas como la glucólisis, el ciclo de Krebs, y la fosforilación oxidativa responden a la regulación alostérica por ATP, ADP y AMP; esta regulación puede involucrar la fosforilación y desfosforilación de las proteínas (Tabla 1). En 1968 Daniel Atkinson definió la relación  $([\text{ATP}] + 1/2[\text{ADP}]) / ([\text{ATP}] + [\text{ADP}] + [\text{AMP}])$  en la célula como la carga energética (2). El valor de la carga energética es de 1 si el conjunto de nucleótidos de adenina se halla en forma de ATP, y si el valor es 0, los nucleótidos de adenina se hallan solamente en forma de AMP. Normalmente la carga energética de las células es alrededor de 0.9. El cociente de la carga energética es adecuado para interpretar las distintas señales entre los procesos metabólicos que liberan energía y los que la consumen. Las concentraciones relativas de ATP y ADP, no solo controlan la velocidad de la fosforilación oxidativa sino también de la glucólisis.

La proteína cinasa dependiente de AMP (AMPK), fue purificada y secuenciada en 1994, esta proteína heterotrimérica es el ejemplo más claro de activación por la carga energética, es decir, se activa con el incremento de la relación AMP/ATP. Su activación enciende vías catabólicas que favorecen la producción de ATP y la inhibición de los procesos que lo consumen, se ha demostrado su activación e inactivación en células del hipotálamo en condiciones de ayuno y alimentación, respectivamente (3), por lo que se ha sugerido que esta proteína participa en la regulación del apetito. Asimismo, la activación de AMPK en respuesta a varias de las hormonas

revisadas más adelante, tales como la grelina, la colecistocinina y la leptina (4), desencadena cambios en diferentes vías metabólicas actuando sobre factores de transcripción o directamente sobre la actividad de enzimas clave de las diferentes rutas metabólicas.

El organismo cuenta con diferentes sensores de glucosa, uno de los mecanismos más estudiados es la secreción de insulina por las células  $\beta$  del páncreas, que depende del metabolismo de la glucosa y la despolarización celular (Fig. 1). Otro mecanismo es la regulación alostérica de enzimas por la propia glucosa, como la inhibición de la glucógeno fosforilasa (GP) que es la enzima encargada de romper el glucógeno y la activación de la glucógeno sintasa (GS) (5, 6). Asimismo, existen factores de transcripción tales como CREBP (por sus siglas en inglés "Carbohydrate Response Element-Binding Protein"), que en respuesta a la ingesta de carbohidratos, es activada y reconoce elementos de respuesta a carbohidratos dentro de regiones del DNA, promotoras de los genes que inducen la expresión de la proteína gluconeogénica piruvato cinasa (LPK) y las proteínas lipogénicas acetil CoA carboxilasa (ACC) y ácido graso sintasa (FAS) (7). Adicionalmente existen receptores de glucosa, por ejemplo los receptores del sabor dulce T1R1/T1R3, que se encuentran en las papilas gustativas pero que además se han encontrado en el intestino, páncreas, riñón y cerebro, específicamente en el núcleo del tracto solitario por lo que se ha propuesto que están implicados en el proceso de homeostasis energética (8). Todos estos sistemas sensores de glucosa logran adaptar la actividad celular con el estado energético del organismo completo a través de diversas señales que revisaremos en seguida.

## AYUNO Y LIBERACIÓN DE GLUCOSA

Durante el ayuno, el hígado mantiene los niveles de glucosa en sangre por el rompimiento de sus reservas de glucógeno. Si el ayuno es prolongado, es capaz de liberar glucosa por la gluconeogénesis, lo cual permite el abastecimiento de energía al resto del organismo. Esta producción de glucosa hepática es regulada principalmente por el glucagón, liberado de las células  $\alpha$  pancreáticas. Esta hormona se une a un receptor asociado a proteínas G, provocando la estimulación de la enzima adenilato ciclasa (AC), generándose AMPc; el aumento en la producción de AMPc, promueve la gluconeogénesis y glucogenólisis, permitiendo la liberación de la glucosa hepática.

Asimismo, durante el ayuno aumentan los niveles de una hormona llamada grelina, esta hormona

TABLA 1  
Control de las vías metabólicas en el hígado.

Vías catabólicas	Enzimas limitantes	Inhibidores	Activadores
Glucólisis	Fosfofructocinasa	AMPc, ATP, citrato, ácidos grasos, cuerpos cetónicos	Fructosa 2,6 bifosfato, AMP, ADP
Glucogenólisis	Glucógeno fosforilasa	Fosforilación por PKA	AMPc y Ca <sup>++</sup>
Oxidación del piruvato	Piruvato deshidrogenasa	Acetil-CoA, NADH, ATP, ácidos grasos, cuerpos cetónicos y fosforilación por PDK	CoA, NAD, ADP, piruvato
β oxidación		NADH, ATP, Malonil Coenzima-A	Oxalacetato, NAD, ADP
Ciclo de Krebs	Citrato sintasa	ATP	ADP
Cadena respiratoria		NADH+H <sup>+</sup> , FADH <sub>2</sub>	NAD <sup>+</sup> FAD
Fosforilación oxidativa	ATP sintetasa	ATP	ADP
Vías anabólicas			
Gluconeogénesis	Piruvato carboxilasa	ADP	Acetil CoA
Glucogénesis	Glucógeno sintasa	AMPc, Ca <sup>++</sup> y fosforilación por GSK3	
Lipogenesis	Acetil-CoA carboxilasa	Acil Co-A, AMPc	Citrato, ATP, acetil-CoA

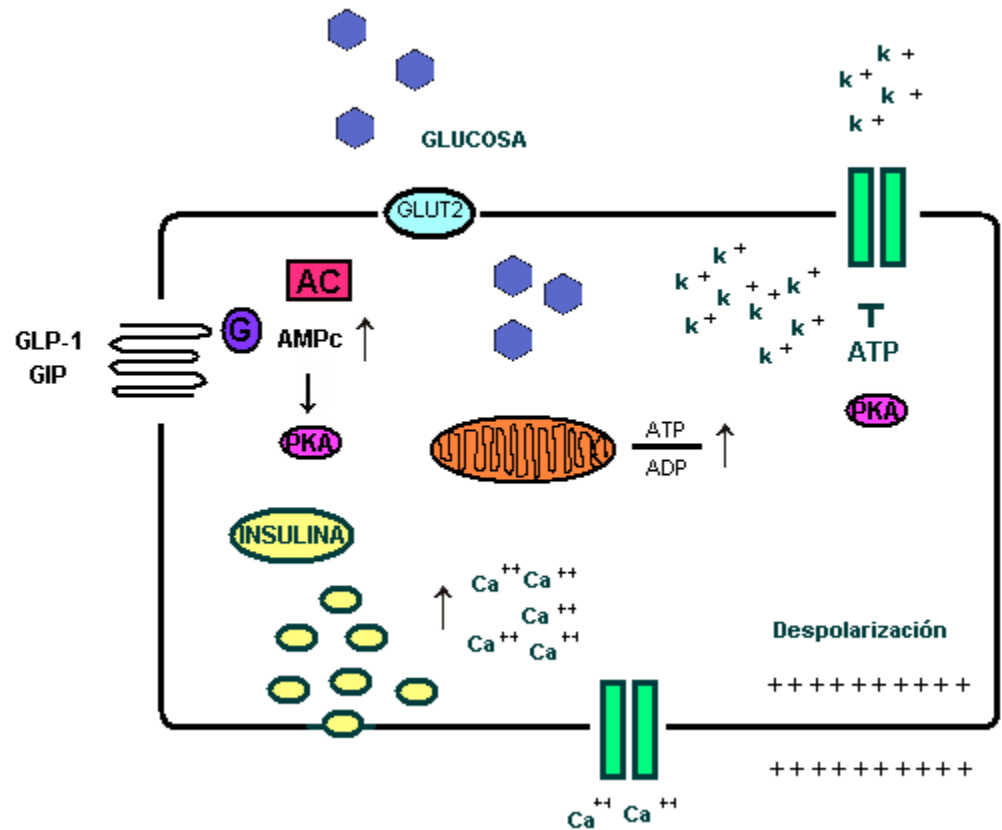
Modificada (de referencia 25). PKA, proteína cinasa A; PDK, piruvato deshidrogenada cinasa; GSK3, glucógeno sintasa cinasa 3.

es un potente estimulante del apetito, es la única hormona hasta ahora conocida que provoca este efecto. Se sintetiza principalmente en el estómago y se libera al torrente sanguíneo cuando el estómago se encuentra vacío; sus efectos se ejercen a través del receptor de moléculas que promueven la liberación de la hormona de crecimiento (GHS-R) (9), presente en el sistema nervioso central, específicamente activando neuronas localizadas en el núcleo arcuato (NArq) del hipotálamo donde se genera la señal que produce hambre.

Los niveles de glucosa en sangre, se pueden elevar en situaciones de emergencia, en las que la corteza suprarrenal libera adrenalina, esta hormona actúa sobre un receptor acoplado a una proteína G que activa a la AC, lo que estimula la gluconeogénesis y glucogenólisis en el hígado y en el músculo. Si la situación de alerta se vuelve crónica, la corteza suprarrenal secreta un grupo de hormonas llamadas glucocorticoides, de las cuales el cortisol es el más importante en humanos. Su

efecto metabólico más conocido consiste en estimular la gluconeogénesis en el hígado, debido principalmente a dos efectos: primero induce la expresión de enzimas gluconeogénicas y segundo, moviliza los aminoácidos de los tejidos extra hepáticos, principalmente del músculo. El cortisol difunde fácilmente a través de la membrana celular, y se une al receptor de glucocorticoides (GR) en el citoplasma, el complejo hormona receptor se traslada al núcleo donde interactúa con secuencias reguladoras específicas (GREs, del inglés "glucocorticoid response elements") del DNA, aumentando la síntesis de proteínas, principalmente gluconeogénicas (10). El cortisol aumenta la glucemia a través de evitar la captura de glucosa ya que reduce la sensibilidad del músculo esquelético y del tejido adiposo a los efectos estimuladores de insulina. El incremento de la tasa gluconeogénica y la reducción moderada de la utilización de glucosa explica el aumento de la glucemia.

**Figura 1.** *Secreción de insulina. La célula  $\beta$  pancreática transporta a la glucosa a través del GLUT 2; el aumento en su metabolismo provoca el incremento en las concentraciones de ATP, el cierre de canales de  $K^+$  sensibles a ATP y la entrada de  $Ca^{++}$ ; la despolarización de la célula promueve la secreción de insulina. Las incretinas GIP y GLP-1 incrementan la eficacia en la respuesta a la glucosa, por la activación de la adenilato ciclasa (AC), la proteína cinasa A (PKA) y aumento en la producción de ATP mitocondrial (26).*



## INGESTA DE ALIMENTOS, APETITO Y SACIEDAD

Después de la ingesta de alimentos, se induce la liberación de la insulina, (Fig. 1) que es la principal reguladora del contenido de glucosa en plasma y lo hace a través de tres mecanismos: 1. Estimula la entrada de glucosa a los tejidos periféricos tales como el músculo esquelético y tejido adiposo por la transferencia del transportador de glucosa tipo GLUT4 a la membrana celular. 2. Promueve el almacenamiento de glucosa en forma de glucógeno en el hígado y 3. Inhibe la secreción de glucagón de las células  $\alpha$  pancreáticas, evitando así la producción de glucosa hepática. Además, la insulina estimula la síntesis de grasa, promueve el almacenamiento de triacilglicérols en las células adiposas y promueve la síntesis de proteínas en el hígado y músculo esquelético (11).

La secreción de insulina se favorece por la secreción de hormonas intestinales denominadas incretinas ("Incretine: INtestine seCRETtion Insulin") (Fig. 1), que son las hormonas responsables de que exista una mayor respuesta a la glucosa administrada vía oral, en comparación con aquella intravenosa. Las incretinas, son sintetizadas y liberadas por el tracto gastrointestinal, éste es considerado el órgano endocrino más grande del

organismo ya que libera más de 20 diferentes hormonas peptídicas que influyen en un gran número de procesos fisiológicos (12). Se encuentra inervado por el sistema nervioso simpático a través del nervio esplácnico que contiene 50% de las fibras nerviosas y por el sistema nervioso parasimpático a través del nervio vago que nace del bulbo raquídeo y aloja alrededor del 75% de las fibras nerviosas parasimpáticas (13). Las incretinas activan circuitos neuronales que comunican con los órganos periféricos incluyendo el hígado, músculo esquelético, tejido adiposo y el páncreas, regulando así la ingesta y asimilación de la glucosa.

Dentro del grupo de las incretinas se encuentran el péptido similar al glucagón (GLP-1) y el polipéptido inhibitor gástrico (GIP) los cuáles son secretados por las células L y K de la pared intestinal, respectivamente, en respuesta a la presencia de alimento. Estos péptidos ejercen su efecto por su unión específica a sus respectivos receptores GPI-R y GLP1-R, los cuales pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G (14). El GLP-1 aumenta la transcripción del gen que codifica para insulina y la secreción de ésta, únicamente en respuesta a un aumento de la glucosa en plasma; además, inhibe la secreción de glucagón durante la alimentación y ayuda a regular la salida de glu-



cosa al torrente sanguíneo retardando el vaciado gástrico. El GIP por su parte, estimula la secreción de insulina dependiente de glucosa, efecto mediado por el aumento en la concentración de AMPc y la inhibición de los canales de potasio sensibles a ATP (15); el GIP además promueve la biosíntesis de insulina, manteniendo la secreción de la insulina. La acción de estos péptidos debe ser rápida ya que en poco tiempo la proteína dipeptidil peptidasa 4 (DDP-4) presente en el plasma sanguíneo rompe dos aminoácidos de su región amino terminal, interrumpiendo su función insulínica (14).

Después de la ingesta de alimentos, el aumento de glucosa en sangre estimula la secreción de amilina de las células  $\beta$  pancreáticas. La amilina evita cambios abruptos de glucosa durante la ingesta de alimentos por su capacidad de regular el vaciado gástrico y controla la secreción de ácidos gástricos y de glucagón (16). Esta hormona activa principalmente neuronas del área postrema en el cerebro, un área medial localizada en la parte caudal del cuarto ventrículo, que carece de barrera hematoencefálica. Una inyección de amilina en el área postrema genera inhibición del apetito y disminución en la ingesta de alimento, por lo que su agonista pramlintida, es usado en el tratamiento de la diabetes. Se ha propuesto al GMPc como segundo mensajero mediador de la acción de la amilina, ya que su concentración en el área postrema aumenta por la administración directa de la hormona; asimismo la inyección de GMPc genera los mismos efectos que la hormona (17). Es interesante el hecho de que los niveles de amilina en sangre son mayores en los sujetos obesos comparados con los de individuos normales (18), lo que sugiere que este mecanismo está alterado en la obesidad.

Durante el proceso de absorción de nutrientes, las células I del intestino delgado, secretan la colecistocinina, su liberación es estimulada principalmente por la ingesta de grasas y proteínas. Esta incretina se ha encontrado además en algunas neuronas del sistema nervioso entérico. La función más conocida de esta hormona es promover la contracción de la vesícula biliar, favoreciendo la liberación de la bilis importante para la digestión; se conoce además que estimula la actividad motora intestinal, la secreción pancreática de amilina e inhibe el vaciado gástrico, efectos logrados por su unión a su receptor CCK1 en el nervio vago. La presencia de receptores de colecistocinina en el cerebro favorece la sensación de saciedad (19).

Otra hormona implicada en la generación de la sensación de saciedad es la leptina (del griego *leptos* que significa delgado), se sintetiza principalmente en el tejido adiposo y también en el estóma-

go, su producción es directamente proporcional a la cantidad de grasa corporal. El descubrimiento de la leptina cambió la manera de ver al tejido adiposo solo como un órgano de reserva, considerándolo actualmente como una glándula endocrina reguladora de la homeostasis energética.

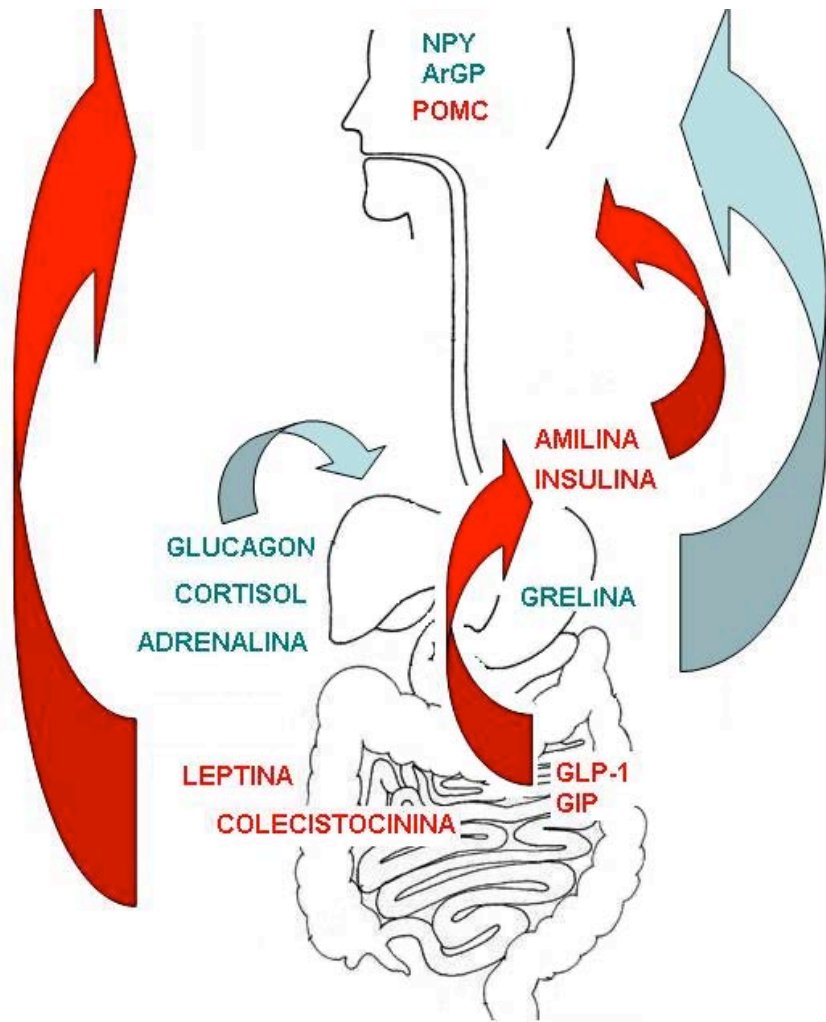
Esta hormona otorga información sobre la cantidad de las reservas energéticas del tejido adiposo directamente a las células del hipotálamo y regula la masa corporal. Aunque el receptor de leptina se encuentra expresado en la mayoría de las células del cuerpo (20), los principales efectos de esta hormona son: inhibir el apetito y aumentar el gasto energético, a través de disminuir la actividad de AMPK e incrementar la actividad de mTOR. Ésta última es una cinasa de proteínas-serina/treonina, altamente conservada, considerada otro importante sensor energético, principalmente de aminoácidos; se encuentra en neuronas de núcleos hipotalámicos específicos, funcionando como transductor de los efectos de la leptina. Se ha reportado la activación de mTOR, por otras hormonas como la insulina, el factor parecido a la insulina (IGF-1) y señales de abundancia energética, su activación promueve la respuesta celular anabólica y los defectos en la señalización río abajo de esta cinasa se han relacionado con patologías como la diabetes, obesidad y cáncer (21).

## REGULACIÓN HIPOTALÁMICA

El hipotálamo constituye menos del 1% de la masa total del encéfalo humano y es el principal centro de control del balance energético de nuestro cuerpo (Fig. 2). El hipotálamo participa en la regulación de una variedad de funciones como la temperatura, sed, balance hormonal, reproducción y los ritmos biológicos. Se encuentra por debajo del tálamo junto a las paredes del tercer ventrículo y está conectado por un tallo a la hipófisis, que cuelga bajo la base del encéfalo justo en el techo de la cavidad oral. Dentro del hipotálamo se han descrito regiones importantes en la regulación de la ingesta de alimentos: la región ventromedial (VMH), denominada centro de la saciedad ya que su estimulación inhibe el deseo de comer y su ablación provoca un apetito insaciable. La VMH está formado por el núcleo ventromedial y el NArq región clave donde se integran las señales periféricas del estatus energético y la cantidad de tejido adiposo del organismo.

La región lateral del hipotálamo (LH) es considerada el centro del apetito, su estimulación eléctrica genera hambre voraz y su eliminación evita los deseos de comer hasta llevar al animal a la completa desnutrición.

**Figura 2.** Control hormonal de la homeostasis energética. En rojo, las señales generadas después de la alimentación, provocan la sensación de saciedad. En azul, las señales presentes en el ayuno que generan el apetito. NPY, neuropéptido Y; ArGP, proteína relacionada con aguti; POMC, pro-opiomelanocortina; GLP-1, péptido similar al glucagon 1; GIP, polipéptido inhibidor gástrico.



Adicionalmente los ocho órganos circumventriculares (OCVs), localizados alrededor del tercero y cuarto ventrículo, carecen de barrera hematoencefálica y son considerados el puente de comunicación entre el flujo sanguíneo, el fluido cerebroespinal y el parénquima cerebral. Dentro de los OCVs, el órgano subfornical (SFO) y el área postrema (AP) expresan el receptor GHS-R, son sensibles a grelina y proyectan terminales nerviosas al núcleo paraventricular y el NArq del hipotálamo.

El NArq del hipotálamo, también carece de barrera hematoencefálica, por lo que se facilita la llegada de diversas señales presentes en la circulación sistémica. Las neuronas localizadas en la zona ventromedial del NArq son orexigénicas (generan señales que promueven la ingesta de alimentos), mientras que las neuronas que se encuentran en la parte ventrolateral son anorexigénicas (provocan señal de saciedad) (22). Dentro de los neurotransmisores más importantes implicados en la producción de hambre y saciedad se encuentran el neuropéptido Y (NPY) que junto con la proteína

relacionada con aguti (AgRP), son los principales neuropéptidos orexigénicos. El más abundante es el NPY, pertenece a la familia de los polipéptidos pancreáticos (PP), activa una gran cantidad de neuronas orexigénicas y anorexigénicas; en el tejido adiposo disminuye la expresión de enzimas lipogénicas, aumenta la acumulación de grasa y disminuye el gasto energético. Por otro lado, el aumento de leptina y colesistocinina, estimulan a las neuronas anorexigénicas del NArq y estimulan la producción de melanocortinas, péptidos derivados de la molécula pro-opiomelanocortina (POMC), con lo cual se inhibe el apetito y aumenta la actividad del sistema nervioso simpático, lo que reduce la secreción basal de insulina y como consecuencia se controla el peso corporal (23).

Además de la respuesta a los péptidos y hormonas circulantes que reflejan el estado energético, el cerebro es capaz de detectar los cambios en los niveles de glucosa en el torrente sanguíneo. En el hipotálamo se han identificado dos poblaciones de neuronas sensibles a glucosa, las neuronas GE

(del inglés "glucose-excited") que incrementan su actividad eléctrica en respuesta a la cantidad de glucosa del medio y aquellas neuronas GI (del inglés "glucose-inhibited") que la disminuyen. Este tipo de neuronas son abundantes en el NArq, aunque se han reportado también en el núcleo solitario, la amígdala, la vena portal, venas mesentéricas y el intestino. Se ha propuesto un mecanismo de sensibilidad a glucosa similar al de las células  $\beta$  del páncreas, debido a la presencia del transportador de glucosa GLUT 2 y canales de potasio dependientes de ATP (Fig. 1) en regiones del hipotálamo (24, 25).

## CONCLUSIONES

Queda claro que el contenido de glucosa, tanto en las células como en el organismo completo, depende de la entrada y el consumo de ésta molécula, flujo que se encuentra regulado por señales que mantienen el estado energético. Preservar los niveles de energía en equilibrio es un proceso

finamente orquestado, que comienza con la generación de señales en el estómago e intestino y que son recibidas y detalladas por el cerebro, para finalmente generar la regulación metabólica celular que se refleja en el organismo completo. La regulación autonómica de la homeostasis energética involucra el esfuerzo coordinado de varias regiones cerebrales interconectadas, incluyendo el hipotálamo, la amígdala y el tallo cerebral. Sin embargo los mecanismos que actúan sobre el sistema nervioso central, el reconocimiento de las hormonas y la liberación de péptidos que permiten el control de esta homeostasis, no es totalmente conocido. El esclarecimiento de estos procesos permitirán entender la fisiología normal del organismo y estados patológicos como la anorexia, bulimia, diabetes y obesidad, enfermedades que aquejan actualmente a nuestra sociedad.

**Agradecimientos.** IOP. es becaria de Conacyt (263808/221053) y RSS contó con el apoyo del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, UNAM (IN207810).

## REFERENCIAS

1. Aufderheide AC, W Salo M, Madden J, Streititz, Mueckeler M (1994) Facilitative glucose transporters. *Eur J Biochem* 219: 713-725.
2. Atkinson DE (1968) Energy charge of the adenylate pool as a regulatory parameter. Interaction with feedback modifiers. *Biochemistry* 7: 4030-4034.
3. Minokoshi Y, Alquier T, Furukawa N, Kim YB, Lee A, Xue B, Mu J, Foulfelle F, Ferré P, Birnbaum MJ, Stuck BJ, Kahn BB (2004) AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus. *Nature* 428, 569-574.
4. Steinberg GR, Kemp BE (2009) AMPK in Health and Disease. *Physiol Rev* 89: 1025-1078.
5. Lorek A, Wilson KS, Sansom MS, Stuart DI, Stura EA, Jenkins JA, Zanotti G, Hajdu J, Johnson LN (1984) Allosteric interactions of glycogen phosphorylase b. A crystallographic study of glucose 6-phosphate and inorganic phosphate binding to di-imidate-cross-linked phosphorylase b. *Biochem J* 218: 45-60.
6. Hanashiro I, Roach PJ (2002) Mutations of muscle glycogen synthase that disable activation by glucose 6-phosphate. *Arch Biochem Biophys* 397: 286-292.
7. Yamashita H, Takenoshita M, Sakurai M, Bruick RK, Henzel WJ, Shillinglaw W, Arnot D, Uyeda K (2001) A glucose-responsive transcription factor that regulates carbohydrate metabolism in the liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 9116-9121.
8. Treesukosol Y, Smith KR, Spector AC (2011) Behavioral evidence for a glucose polymer taste receptor that is independent of the T1R2+3 heterodimer in a mouse model. *J Neurosci* 31: 13527-13534.
9. Howard AD, Feighner SD, Cully DF, Arena JP, Liberatore PA, Rosenblum CI, Hamelin M, Hreniuk DL, Palyha OC, Anderson J, Paress PS, Diaz C, Chou M, Liu KK, McKee KK, Pong SS, Chaung LY, Elbrecht A, Dashkevich M, Heavens R, Rigby M, Sirinathsinghji DJ, Dean DC, Melillo DG, Patchett AA, Nargund R, Griffin PR, DeMartino JA, Gupta SK, Schaeffer JM, Smith RG, Van der Ploeg LH (1996) A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. *Science* 273: 974-977.
10. Zilliaccus J, Dahlman-Wright K, Wright A, Gustafsson JA, Carlstedt-Duke J (1991) DNA binding specificity of mutant glucocorticoid

- receptor DNA-binding domains. *J Biol Chem* 266:3101-3106.
11. Saltiel, RA, Kahn CR (2001) Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414:799-806.
  12. Breen DM, Yang CS, Lam TK (2011) Gut-brain signalling: how lipids can trigger the gut. *Diabetes Metab Res Rev* 27:113-119.
  13. Routh VH (2010) Glucose Sensing Neurons in the Ventromedial Hypothalamus. *Sensors (Basel)* 10:9002-9025.
  14. Yabe D, Seino Y (2011) Two incretin hormones GLP-1 and GIP: comparison of their actions in insulin secretion and  $\beta$  cell preservation. *Prog Biophys Mol Biol* 107:248-256.
  15. Drucker DJ (2007) The role of gut hormones in glucose homeostasis. *J Clin Invest* 117:24-32.
  16. Lutz TA (2010) The role of amylin in the control of energy homeostasis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 298:1475-1484.
  17. Mollet A, Gilg S, Riediger T, Lutz TA (2004) Infusion of the amylin antagonist AC 187 into the area postrema increases food intake in rats. *Physiol Behav* 81:149-155.
  18. Pieber TR, Roitelman J, Lee Y, Luskey KL, Stein DT (1994) Direct plasma radioimmunoassay for rat amylin-(1-37): concentrations with acquired and genetic obesity. *Am J Physiol* 267:156-164.
  19. Bi S, Moran TH (2003) Response to acute food deprivation in OLETF rats lacking CCK-A receptors. *Physiol Behav* 79:655-661.
  20. Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, Richards GJ, Campfield LA, Clark FT, Deeds J, Muir C, Sanker S, Moriarty A, Moore KJ, Smutko JS, Mays GG, Wool EA, Monroe CA, Tepper RI (1995) Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell* 83:1263-1271.
  21. Roa J, Tena-Sempere M (2010) Energy balance and puberty onset: emerging role of central mTOR signaling. *Trends Endocrinol Metab* 21:519-28.
  22. Wang R, Liu X, Hentges ST, Dunn-Meynell AA, Levin BE, Wang W, Routh VH (2004) The regulation of glucose-excited neurons in the hypothalamic arcuate nucleus by glucose and feeding-relevant peptides. *Diabetes* 53:1959-1965.
  23. Murphy KG, Bloom SR (2006) Gut hormones and the regulation of energy homeostasis. *Nature* 444:854-859.
  24. Arluison M, Quignon M, Thorens B, Leloup C, Penicaud L (2004) Immunocytochemical localization of the glucose transporter 2 (GLUT2) in the adult rat brain. II. Electron microscopic study. *J Chem Neuroanat* 28:137-146.
  25. Harvey J, McKenna F, Herson PS, Spanswick D, Ashford ML (1997) Leptin activates ATP-sensitive potassium channels in the rat insulin-secreting cell line, CRI-G1. *J Physiol* 504:527-535.
  25. Laguna J, Piña-Garza E (2002) *Bioquímica de Laguna. El manual moderno, México*, p 649.
  26. Seino S, Shibasaki T, Minami K (2011) Dynamics of insulin secretion and the clinical implications for obesity and diabetes. *J Clin Invest* 121:2118-2125.