



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**DINÁMICA MITOCONDRIAL EN LAS CÉLULAS GLIALES DE
MÜLLER, EFECTO DE LAS ALTAS CONCENTRACIONES DE
GLUCOSA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

BRENDA ITZEL HERNÁNDEZ VIDAL



**DIRECTORA DE TESIS:
DRA. ROCÍO SALCEDA SACANELLES**

Ciudad Universitaria, Cd. Mx. 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

1. Datos del alumno

Hernández

Vidal

Brenda Itzel

56 92 74 30

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

311143834

2. Datos del tutor

Dra.

Rocío

Salceda

Sacanelles

3. Datos del sinodal 1

Dr.

Luis Felipe

Jiménez

García

4. Datos del sinodal 2

Dr.

Jorge Antonio

García

Alvarez

5. Datos del sinodal 3

Dra.

Rocío

Salceda

Sacanelles

6. Datos del sinodal 4

M. en C.

Beatriz

King

Díaz

7. Datos del sinodal 5

Dr.

Felipe

Alcántara

Sánchez

8. Datos del trabajo escrito

Dinámica mitocondrial en las células gliales de Müller, efecto de las altas concentraciones de glucosa

40 p.

2018

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Dra. Rocío Salceda Sacanelles por la experiencia académica que me brindo en la realización del presente trabajo y la oportunidad de trabajar con ella.

A mis sinodales quienes le dedicaron su tiempo a la revisión escrito:

Dr. Luis Felipe Jiménez García

Dr. Jorge Antonio García Alvarez

M. en C. Beatriz King Díaz

Dr. Felipe Alcántara Sánchez

Agradezco al Biólogo Gustavo Sánchez Chávez por el apoyo técnico y asesoría para la realización del presente trabajo.

Este trabajo contó con el apoyo de programa PAPIIT/DGAPA I6200216 para su elaboración.

A mis padres:

Con amor y cariño por creer en mí y en mis decisiones, brindándome todo su apoyo incondicional. Nunca lo hubiera logrado sin ellos. Los amo.

A mi hermana Gloria:

Con amor y cariño, por todo lo que has hecho por mí. Te amo sis.

A mi madrina Blanca Estela Rivas:

Por ser parte importante en mis primeros años de formación, sus cuidados y su cariño.

A mis nuevos amigos...

...Y compañeros de laboratorio: Gabriela Ramírez, Gustavo Sánchez, Elena Morales, Silvestre Albert, Erick Torres y Alejandra Ramírez, por su cariño, apoyo y amistad. A Gabriela Espinosa por los consejos, los buenos momentos, por su amistad y cariño.

A mis amigos de siempre:

Zyanya, Daniel, César y Ricardo. Por compartir momentos increíbles dentro y fuera de la carrera. Espero conservar su amistad por siempre.

A Óscar Omar:

Por todo el tiempo juntos y por compartir el mismo ímpetu. No espero encontrar mejor compañero en la vida. Te amo.

ÍNDICE

1. Lista de Abreviaturas	1
2. Resumen y Abstract	2
3. INTRODUCCIÓN.....	3
3.1La Retina.....	3
3.1.1Las Células Gliales de Müller.....	4
3.1.2 Funciones Mitocondriales.....	5
3.2La Mitocondria.....	6
3.2.1 Cadena respiratoria.....	7
3.2.2 El potencial mitocondrial.....	9
3.3El Estrés Oxidante y la actividad la Mitocondria.....	10
3.4Dinámica Mitocondrial.....	13
3.5Retinopatía diabética.....	15
4. Antecedentes.....	17
5. Hipótesis.....	18
6. Objetivo general.....	18
7. Objetivos particulares	18
8. MÉTODOS	19
8.1Cultivo de células gliales de Müller.....	19
8.2Conteo celular.....	20
8.3Tratamientos.....	20
8.4Determinación de la cantidad y potencial mitocondrial.....	21
8.5Análisis de la morfología mitocondrial.....	22
8.6Análisis de imágenes.....	23
8.7Estadística.....	23
9. Resultados.....	24
10. Discusión.....	31
11. Conclusiones.....	35
12. Perspectivas	35
13. Referencias.....	36

1. Lista de Abreviaturas

$^1\text{O}_2$	Oxígeno singulete
4-HNE	4-hydroxynonenal
8-OHdG	8-hydroxy-2-deoxiguanosina
ADP	Adenosín difosfato
ATP	Adenosín trifosfato
CG	Capa de células Ganglionares
CNE	Capa Nuclear Externa
CNI	Capa Nuclear Externa
Co	Coroides
CoQ	Coezima Q
CPE	Capa plexiforme Externa
CPI	Capa Plexiforme Interna
CTE	Cadena transportadora de electrones
Cu/Zn-SOD	Superóxido dismutasa Cu/Zn
DMEM-SFB 10%	Medio DMEM adicionado con suero fetal bovino al 10%
DNA	Ácido desoxirribonucleico
Drp1	Proteína relacionada a dinamina
EP	Epitelio Pigmentario de la Retina
EROs	Especies reactivas de oxígeno
GABA	Ácido gamma aminobutírico
GFAP	Proteína fibrilar ácida de astrocitos
GPx	Glutación peroxidasa
GR	Glutación reductasa
H_2O_2	Peróxido de hidrógeno
MDA	Malondialdehído
Mff	El factor de fisión mitocondrial
Mn-SOD	Superóxido dismutasa Mn
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
NO	Nervio Óptico
$\text{O}_2^{\cdot-}$	Anión superóxido
$\text{OH}\cdot$	Radical hidroxilo
RE	Retículo endoplasmático
SFB	Suero Fetal Bovino
SE	Segmentos Externos
$\Delta\Psi$	Potencial mitocondrial

2. Resumen

La retina es un tejido que se encuentra organizado en capas celulares muy bien definidas, atravesando todas las capas se encuentra la Glía de Müller. La Glía de Müller realiza funciones metabólicas gran importancia y participa en la formación de barrera hemato-retiniana. La barrera hemato-retiniana, así como la retina se ven comprometidas en pacientes con diabetes mellitus lo que genera complicaciones oculares como la retinopatía diabética, en donde la hiperglucemia es considerada un signo característico de la enfermedad. Una teoría aceptada es que la hiperglucemia conlleva a la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ERO's). La mitocondria es una de las mayores fuentes de producción de superóxido, y se sabe que la dinámica mitocondrial juega un papel en procesos de inflamación y muerte celular asociados a estrés oxidante. En este estudio se analizó la dinámica mitocondrial de la Glía de Müller, en donde la cantidad de mitocondrias no se modificó en condiciones de altas concentraciones de glucosa (25 mM); sin embargo, resulta interesante que el tamaño de las mitocondrias disminuyó significativamente. Además se observó una disminución en el potencial mitocondrial, sin embargo, con presencia de fluctuaciones, lo que podría sugerir que la mitocondria más que estar dañada presenta una respuesta adaptativa que evita el exceso en la producción de EROs y mantiene los requerimientos de ATP.

Abstract

The retina is a tissue organized in defined cell layers, crossing all layers is the Muller's Glia which one performs metabolic functions such as the formation of hemato-retinal barrier. The hemato-retinal barrier, as well as the retina are compromised in patients with diabetes mellitus, generates ocular complications such as diabetic retinopathy, where hyperglycemia is considered a characteristic sign of the disease. One accepted theory is that hyperglycemia leads to overproduction of reactive oxygen species (ROS). The mitochondria are one of the major sources of superoxide production, and it is known that mitochondrial dynamics play a role in inflammation and cell death processes associated with oxidative stress. In this study I analyzed the mitochondrial dynamics of the Muller's Glia, the amount of mitochondria did not change under conditions of high glucose concentrations (25 mM); however, is interesting that the size of the mitochondria decreased significantly. In addition, a decrease in mitochondrial potential was observed, however, with the presence of fluctuations, which could suggest that the mitochondria more than being damaged presents an adaptive response that avoids the excess in the production of EROs and maintains the ATP requirements.

3. INTRODUCCIÓN

3.1 La Retina

El ojo de los vertebrados presenta varias capas de tejido, la parte más externa es la esclerótica, en la parte anterior se encuentra la córnea; la capa intermedia o coroides, que se encarga de irrigar al ojo y origina al iris, que es el tejido que da coloración a los ojos y es en donde se ajusta el cristalino, además de que proporciona actividad contráctil que regula el diámetro de la pupila y la entrada de luz (Fanjul, et al., 1998).

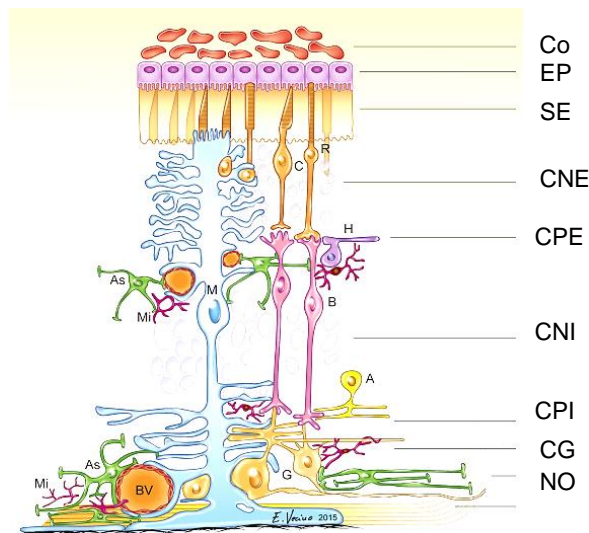


Figura 1. Esquema de la retina (tomado y modificado de Vecino, et al., 2016). Co=Coroides, EP= Epitelio Pigmentario de la Retina, SE= Segmentos Externos, CNE= Capa Nuclear Externa, CPE= Capa Plexiforme Externa, CNI= Capa Nuclear Interna, CPI= Capa Plexiforme Interna, CG= Capa de células Ganglionares y NO= Nervio Óptico.

En la parte interna, cubriendo el fondo del ojo, se encuentra la retina, que es la capa más interna del globo ocular de los vertebrados, tejido nervioso que está organizado en capas celulares Figura 1.

La capa más externa, en contacto con la coroides es el epitelio pigmentario de la retina, seguida de las células de retina neural propiamente dicha es decir, los fotorreceptores en la capa nuclear externa; la capa en donde hacen sinapsis los fotorreceptores y la células horizontales y bipolares, se conoce con el nombre de capa plexiforme externa. En la capa nuclear interna, se encuentran los somas de las células bipolares, amacrinas y horizontales, en la capa plexiforme interna se localizan las sinapsis entre las células bipolares, amacrinas y las células ganglionares, y la capa más interna corresponde a los somas de las células ganglionares seguidas en contacto con el humor vítreo (Fanjul et al. 1998). Atravesando todas estas capas, desde la superficie del vítreo hasta los segmentos internos de los fotorreceptores, se localizan las células gliales de Müller (Berman, 1991).

3.1.2 Las Células Gliales de Müller

En la retina se presenta una tasa alta de glucolisis aerobia y anaerobia y una activa producción de lactato. La retina neural tiene una alta tasa de respiración y oxidación de la glucosa que cualquier otro tejido examinado *in vitro* (Berman, 1991; Cohen y Noell, 1960). El mayor sustrato para llevar a cabo la respiración en la retina es la glucosa, que es convertida a ATP. Otros sustratos pueden ser utilizados para la producción de ATP en la retina, incluyendo piruvato, lactato y glutamina, así como glutamato, además de los intermediarios del ciclo de Krebs como malato y succinato (Berman, 1991; Cohen y Noell, 1960).

Las células de Müller son el tipo celular macroglial principal de la retina de los vertebrados, son células gliales radiales especializadas que abarcan todo el grosor

de la retina neural, desde la capa de células ganglionares en contacto con los vasos y el vítreo, hasta los fotorreceptores (Reichenbach y Bringmann, 2013).

La glía de Müller además de proveer de soporte mecánico a las neuronas, una de sus principales funciones es su participación en la barrera hemato-retiniana interna (Meza Ruiz, 1995; Tout, et al., 1993), transportando nutrientes, productos de desecho, iones, agua y otras moléculas entre los vasos retinianos y las neuronas (Reichenbach y Bringmann, 2013).

Una función particular de la glía de Müller es la toma de glutamato (un neurotransmisor excitatorio) lo que controla la neurotransmisión y evitando la excitotoxicidad del mismo. El glutamato se transforma en glutamina por medio de la glutamina sintetasa y ésta es incorporada por las neuronas y convertida en los neurotransmisores glutamato y ácido gamma aminobutírico (GABA) (Reichenbach y Bringmann, 2013).

3.1.3 Funciones Mitocondriales

La mitocondria es un organelo intracelular dinámico que está involucrada en múltiples procesos celulares que van desde funciones metabólicas a homeostasis celular. Su función más importante es la de suministrar energía química en forma de ATP. El número de mitocondrias varía de cientos a miles dependiendo la demanda energética de la célula. Un alto contenido de mitocondrias se ha encontrado en tejidos con alta demanda de energía, como en el sistema nervioso y muscular, y por lo tanto son altamente susceptibles a daño por falta de energía como consecuencia de falla en la actividad mitocondrial. Estas observaciones llaman la atención, ya que en pacientes con retinopatía diabética, glaucoma y

degeneración macular relacionada a la edad, se ha observado daño mitocondrial (Gueven, et al., 2017; Jarret et al., 2010).

3.2 La Mitocondria

La mitocondria está presente en todas las células eucariontes miden alrededor 1-5 μm de largo con un diámetro de 0.5 μm (Fortoul van der Goes 2017). En la mayoría de las células se encuentran dispersas en el citoplasma, localizadas en sitios de mayor requerimiento energético, por ejemplo, en células de musculo, las mitocondrias se encuentra localizadas en mayor medida en las zonas de contracción (regiones sarcómero), mientras que en espermatozoides se encuentran en la zona del undulipodio. Además las mitocondrias se pueden fusionar y formar redes tubulares, distribuidas en el citoplasma. Estas redes son dinámicas, de tal forma que se mantienen en una continua fusión y fisión (Alberts, 2014).

La mitocondria consiste de dos membranas, una interna y una externa, cada una conformada de una bicapa de fosfolípidos con una amplia variedad de proteínas integrales (Fortoul van der Goes 2017). Ambas membranas crean dos compartimentos: uno interno, matriz y el externo, llamado espacio intermembranal (Alberts, 2014).

La membrana externa es permeable a solutos presentes en el citosol ya que en ella se encuentran diversas proteínas transmembranales entre ellas las porinas, las cuales forman canales acuosos por los que pasan libremente iones y moléculas de hasta 5KDa (Fortoul van der Goes 2017). Estas moléculas hacen al espacio intermembranal químicamente equivalente al citosol con respecto al contenido de la mitocondria (Alberts, 2014).

La membrana interna se encuentra plegada formando crestas, que delimitan microdominios (Fortoul van der Goes 2017). Esta membrana es impermeable al paso de iones y a la mayoría de moléculas, excepto en sitios donde existen proteínas de transporte específicas, que permiten el paso de moléculas, como piruvato y ácidos grasos que pueden ser oxidados en la matriz mitocondrial (Alberts, 2014). Embebidas en la membrana interna se encuentran las proteínas que forman la cadena transportadora de electrones (CTE) y la ATP sintasa (Fortoul van der Goes 2017). En el espacio intermembranal, se encuentran las enzimas que utilizan ATP generado en la membrana interna, entre ellas, la creatina cinasa, adenilato ciclasa y el citocromo C (Fortoul van der Goes 2017).

La matriz mitocondrial es donde se encuentra el DNA mitocondrial, el RNA mensajero, ribosomal y de transferencia, además de las enzimas del ciclo de Krebs y las enzimas que participan en la β -oxidación de ácidos grasos. Los productos de estas reacciones generan el NADH que es sustrato de la CTE (Fortoul van der Goes 2017).

3.2.1 Cadena respiratoria

La cadena transportadora de electrones (CTE) o también llamada cadena respiratoria se encuentra en múltiples sitios de la membrana interna mitocondrial. Cada cadena respiratoria contiene hasta 40 proteínas agrupadas en enormes complejos enzimáticos (Fortoul van der Goes 2017).

Cada complejo contiene metales como Cu^{+2} y grupos hemo que varían su estado de oxidación de Fe(II) a Fe(III) durante el paso de los electrones (Voet y Voet, 2006).

Este movimiento de electrones a su vez es acompañado por el bombeo de protones de la matriz al espacio intermembranal, por lo que cada complejo es referido como una bomba de electrones (Fortoul van der Goes 2017).

Los cuatro complejos enzimáticos, en el orden en que reciben electrones son:

- Complejo I NADH deshidrogenasa.
- Complejo II Succinato-coenzima Q oxidoreductasa
- Complejo III Citocromo C reductasa.
- Complejo IV Citocromo C oxidasa.

El primer complejo, NADH deshidrogenasa toma los electrones del NADH, y son tomados en forma de ion hidruro H^- , los cuales entonces son convertidos a un protón y dos iones altamente energéticos, por medio de la reacción $H^- \rightarrow H^+ + 2e^-$. Los electrones pasan al siguiente complejo, la succinato-coenzima Q oxidoreductasa (Fortoul van der Goes 2017).

La succinato-coenzima Q oxidoreductasa, traslada los electrones desde el succinato hasta la coenzima Q (CoQ). La energía libre para la transferencia de electrones desde estos dos puntos es suficiente para impulsar la producción de ATP. Sin embargo, este complejo no trasloca H^+ , sino que permite que los electrones de relativamente alto potencial entren a la cadena por medio de su desvío al complejo I (Voet y Voet, 2006).

El siguiente complejo, la citocromo c oxidoreductasa, pasa electrones desde la CoQ reducida hacia el citocromo c. El citocromo c es un transportador de energía soluble, siendo así una proteína de membrana periférica, que desvía los electrones del complejo III al IV en la superficie externa de la membrana mitocondrial interna (Voet y Voet, 2006).

El último complejo, la citocromo c oxidasa, cataliza la oxidación de cuatro moléculas de citocromo c y simultáneamente la reducción de cuatro electrones del O_2 convirtiéndolo en $2H_2O$:

$4 \text{ citocromo c (Fe}^{2+}) + 4H^+ + O_2 \longrightarrow 4 \text{ citocromo c (Fe}^{3+}) + 2H_2O$ (Voet y Voet, 2006).

La fosforilación oxidativa, también ocurre dentro de la mitocondria, y es la síntesis de ATP a partir de ADP y P_i catalizada por la ATP sintasa (también llamada complejo V) que se impulsa por el proceso del transporte de electrones mediante la formación de un gradiente de protones por el transporte de electrones a través de los complejo I, III y IV (Voet y Voet, 2006).

Además de la producción de energía química, bajo condiciones donde existe una alteración en la función normal, la mitocondria se sabe es productora de especies reactivas de oxígeno (EROs), si esta producción de EROs es excesiva, el resultado es conocido como estrés oxidante (Nita y Grzybowski, 2016), lo que deriva en un daño a las membranas, proteínas y DNA no solo mitocondriales sino de toda la célula. Estos eventos se piensa que están presentes en diferentes patologías, entre las que se incluyen aquellas que llevan a la pérdida de la visión (Jarrett et al. 2010).

3.2.2 El potencial mitocondrial

La diferencia de cargas de iones que pasan a través de una membrana, produce una diferencia de potencial eléctrico entre el interior y el exterior de un compartimento celular, a esto se le conoce como potencial de membrana (Fanjul et al. 1998).

El potencial mitocondrial ($\Delta\Psi$) es el resultado del gradiente electroquímico de protones a través de la membrana mitocondrial interna, y sirve como un intermediario del almacenaje de energía, el cual es usado para la síntesis de ATP (Mitchell, P., 1966).

En condiciones normales, las células mantienen niveles estables de ATP y por lo tanto un potencial mitocondrial estable, esta asociación, se piensa que es un requisito para el funcionamiento normal de la célula y que puede cambiar debido a la actividad fisiológica de cada célula, pero la perturbación de este estado normal puede comprometer la energía celular, llevando a consecuencias patológicas (Zorova et al. 2017).

La determinación del potencial mitocondrial puede emplearse como una herramienta para identificar el daño mitocondrial.

3.3 El Estrés Oxidante y la actividad de la Mitocondria

En condiciones normales se producen especies reactivas de oxígeno (EROs) debido a la parcial reducción del oxígeno molecular principalmente en la mitocondria. Las EROs como el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el radical hidroxilo (OH^{\cdot}), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el oxígeno singulete (1O_2), pueden aumentar por diversos factores como un producto de la cadena transportadora de electrones mitocondrial (CTE). El superóxido se genera por la reducción directa del oxígeno para posteriormente ser dismutado a peróxido de hidrógeno, éste tiene la capacidad de atravesar membranas y genera el radical hidroxilo, la forma más

reactiva del oxígeno por la vía de reacción de Fenton ($\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \text{OH}\cdot$) (Nita y Grzybowski, 2016). Una fuga de electrones de los complejos respiratorios I y III da como resultado la formación de superóxido, el $\text{O}_2^{\cdot-}$ que puede convertirse fácilmente en H_2O_2 ya sea espontáneamente o mediante una reacción de dismutación que involucra superóxido dismutasa de manganeso (Mn-SOD), residente en la matriz mitocondrial (Konigsberg Fainstein, 2008).

Las células eucariontes han desarrollado mecanismos de defensas antioxidantes; bajo condiciones fisiológicas, hay un balance entre la producción de EROs y la disminución de las mismas, este balance es mediado por enzimas o moléculas no proteicas que son antioxidantes. Existen cinco principales enzimas antioxidantes: superóxido dismutasa Cu/Zn en el citosol (Cu/Zn-SOD, SOD1), superóxido dismutasa Mn en la matriz mitocondria (Mn-SOD, SOD2), catalasa, glutatión peroxidasa (GPx) y glutatión reductasa (GR) (Nita y Grzybowski, 2016).

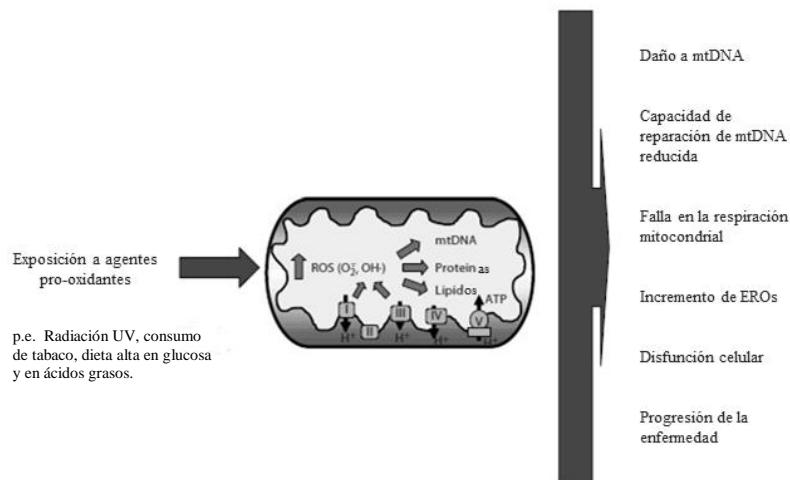


Figura 2. El incremento de las EROs está asociada con daño mitocondrial y enfermedad (Tomada y modificada de Jarrett et al., 2010).

El estrés oxidante es resultado de un exceso en la producción de EROs, además la disfunción mitocondrial, falla en la respuesta antioxidante o la combinación de todos estos factores contribuyen al mismo fenómeno (Nita y Grzybowski, 2016). El exceso de EROs, puede generar daño a DNA, lípidos y proteínas celulares (figura 2). Siendo los marcadores de daño oxidante: 8-hydroxy-2-deoxiguanosina (8-OHdG) de DNA, grupos carbonilos de proteínas (oxidación de proteínas), malondialdehído (MDA), y 4-hydroxynonenal (4-HNE) de lípidos (oxidación de lípidos) (Nita y Grzybowski, 2016).

Las EROs que se generan en las mitocondrias de células dañadas, lleva a la inducción de la apoptosis, por el daño al DNA y en los centros Fe-S de proteínas mitocondriales, como las de la CTE, que además produce un aumento en la permeabilidad de la membrana mitocondrial. La muerte celular provocada por el estrés oxidante además, está involucrada en los mecanismos de muchas patologías neurodegenerativas, entre ellas enfermedades oftalmológicas (Nita y Grzybowski, 2016).

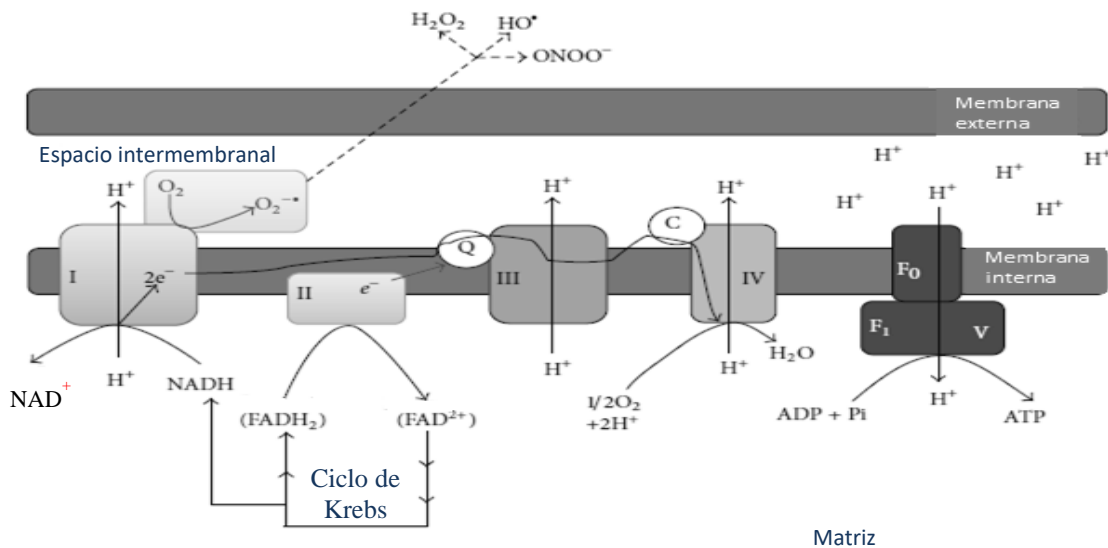


Figura 3. Oxidación por el complejo 1 en la CTE. (Tomada y modificada de Yan, 2014).

Bajo condiciones de hiperglucemia, se piensa que una mayor cantidad de glucosa es conducida a la vía glicolítica lo que produce piruvato, que entra a la mitocondria donde se produce acetil-CoA, llevando a mayor producción de NADH, que contribuye de electrones al complejo I causando una aceleración en la cadena transportadora de electrones (Figura 3) por otra parte en el complejo IV los electrones están siendo transferidos al oxígeno molecular, el cual puede ser rápidamente reducido por el complejo I, debido a que existe una fuga constante de electrones ya que no alcanza a estabilizarse el sistema, generando un incremento de superóxido (Figura 3) (Yan 2014).

3.4 Dinámica Mitocondrial

Se tiene documentado que la estructura mitocondrial dentro de las células, está bajo constantes tasas de eventos de fusión y fisión (Esposito, et.al., 1999; Friedman, 2014; Lackner, 2014). La fusión es importante para mezclar contenidos mitocondriales y así, mantener una población homogénea de organelos (Ishihara et al., 2009), así como para trasladar a lugares lejanos de la célula los metabolitos que ésta requiere (ATP), para llevar a cabo sus funciones (Hayakawa et al., 2016).

Por lo tanto, en un inicio se postuló que la fisión, era necesaria para que la cantidad de estos organelos estuviera disponible para las células hijas que se producen durante la mitosis. Sin embargo, las células que tienen bloqueada la fisión continúan su proceso de división celular y no se afecta su viabilidad. Además no todas las células se dividen (por ejemplo, las neuronas) y aun así, las mitocondrias siguen bajo tasas de fisión-fusión. Por lo que se plantean funciones adicionales para este mecanismo, uno de ellos es el de producir organelos más pequeños que puedan ser transportados de forma más fácil, a través del citoesqueleto de las células (Ishihara et al., 2009).

Las mitocondrias pequeñas, resultado de la fisión, son más fáciles de ser engullidas por la maquinaria que involucra la autofagia, mientras que las mitocondrias interconectadas (redes) se encuentran protegidas (Gomes y Benedetto, 2011; Rambold y Lippincott-Schwartz, 2011). Defectos en la fisión, como mutaciones en las GTPasas de dinamina (de las que mencionaré más adelante), pueden generar un aumento en el daño oxidativo que conduce a la muerte neuronal (Kageyama, Zhang y Roda, 2012). Por lo que se puede señalar la fusión como un mecanismo de protección.

Durante la fisión, las GTPasas de dinamina, constriñen la mitocondria y esto conduce a la fisión. Esta GTPasa que participa en la fisión de la mitocondria se denomina Drp1 (Smirnova, et al., 2001). Es una GTPasa de aproximadamente 80 kDa y se encuentra principalmente en el citosol y es reclutada a la membrana externa mitocondrial para llevar a cabo la fisión (Smirnova et al. 2001).

Como todas las dinaminas, los monómeros de Drp1 se oligomerizan y forman anillos contráctiles (De Vos, et al., 2005; Korobova y Ramabhadran, 2013; Kraus y Ryan, 2017). La hidrólisis de GTP genera cambios conformacionales en las hélices de Drp1, causando la reducción del diámetro del anillo, facilitando la constricción de la membrana (Zhang, 2001).

Otra proteína importante en la fisión es el factor de fisión mitocondrial (Mff, por sus siglas en inglés) que actúa como un adaptador en la membrana mitocondrial externa, que recluta y ensambla a Drp1, en sitios donde se generan los anillos de constricción, las líneas celulares que presentan el “knockout” de Mff contienen mitocondrias altamente alargadas (Kraus y Ryan, 2017).

La dinámica mitocondrial también está vinculada al estado metabólico de las células. Las mitocondrias más alargadas, se ha reportado que presentan tasas de respiración altas, mientras que las mitocondrias con tasa respiratoria baja son conducidas a fisión y posiblemente eliminadas (Kraus y Ryan, 2017).

En el proceso de fisión se requieren de múltiples proteínas (como la Drp1 y Mff) y estructuras celulares, donde se coordinan para que se lleve a cabo este mecanismo. Estudios de microscopia electrónica han demostrado que existen regiones del retículo endoplasmático (RE), alrededor de la mitocondria, que junto con la actina y miosina constituyen la maquinaria de fisión (Friedman et al., 2014).

3.5 Retinopatía diabética

La diabetes mellitus es una enfermedad neurodegenerativa crónica y progresiva que se caracteriza por la presencia de altos niveles de glucosa en sangre (hiperglucemia). Los niveles de glucosa normales en sangre son de 5.55 mmol/L, cuando hay niveles altos de glucosa de manera crónica en la sangre, se generan daños a los sistemas macro y microvasculares, causando daño en múltiples órganos, en un efecto conocido como glucotoxicidad (Yan, 2014).

Durante el tiempo de diabetes, todas las células están expuestas a los altos niveles de glucosa, sin embargo, el daño por estos, ocurre en tejidos específicos, como son: la retina, nervios periférico y riñón (Nita y Grzybowski, 2016).

El exceso de glucosa en sangre genera altas niveles de especies reactivas de oxígeno a nivel celular, lo que conlleva a un estrés oxidante en la mayoría de los sistemas, incluyendo la retina (Nita y Grzybowski, 2016).

La retinopatía diabética es una de las complicaciones de la diabetes, es caracterizada por alteraciones graduales y progresivas en la microvasculatura retinal. Estos daños comprometen a la barrera hemato-retiniana, lo que genera un aumento de la permeabilidad vascular e isquemia, debido principalmente a la alteración de las uniones estrechas endoteliales, pérdida de tejido celular y debilidad de la pared capilar (Zhang, Al-Shabrawey y Caldwell, 2011). Estas alteraciones son el resultado de la muerte de células endoteliales y pericitos, acompañada de daños en células gliales y neuronas.

La glicación y glicooxidación de proteínas, ocurre en la diabetes; en el primer proceso, las proteínas sufren de modificaciones postraduccionales debido a azúcares reducidos, mientras que en el segundo caso, la glucosa produce especies reactivas de oxígeno, que modifican a las proteínas, lo que conlleva a pérdida celular de pericitos y células endoteliales. Además conduce a una deficiencia en proteínas como colágena que modifican a la matriz extracelular, generando una afinidad de unión baja a las integrinas, impidiendo el anclaje correcto de las células, aumento del grosor de la membrana basal y proteólisis (Nita y Grzybowski, 2016).

A tiempos largos de diabetes se han observado diversos cambios en la glía Müller y en astrocitos de la retina, tales como la producción de EROs, el aumento en la proteína fibrilar ácida de astrocitos (GFAP), el aumento en los niveles de glutamato (falla en el transportador de glutamato) lo que contribuye indirectamente con la excitotoxicidad de las neuronas (Nathan, Bayless y Cleary, 2013).

Asimismo, se considera que las alteraciones generadas por los EROs se mantienen, aun cuando los niveles sanguíneos de glucosa son controlados, por lo que la retinopatía diabética sigue avanzando y las anormalidades son irreversibles (Wu, Jin, y Yan, 2017), generando un círculo vicioso que actúa independiente del nivel de hiperglucemia en estados tardíos de la diabetes, fenómeno que se le conoce como “memoria metabólica”.

Aunque se presentan alteraciones en las mitocondrias de pacientes con diabetes, no se conoce si son la causa o efecto de la enfermedad, ya que a tiempos cortos de inducida la diabetes, no se han demostrado alteraciones en la actividad mitocondrial (Osorio-Paz, Uribe-Carvajal, y Salceda, 2015).

4. Antecedentes

La mitocondria es una de las mayores fuentes de producción de superóxido por la actividad los complejos I y III de la cadena transportadora de electrones; la alteración de la actividad mitocondrial conlleva al incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno (Wu, Jin, y Yan, 2017b), que podrían llevar a un estrés oxidante. Asimismo existe evidencia de que los cambios en la dinámica mitocondrial juegan un papel sobresaliente en procesos de inflamación y muerte celular asociados al estrés oxidante (Lerner, Sundar, y Rahman, 2016). La fragmentación de la red mitocondrial se ha observado en células endoteliales y pericitos incubadas en presencia de altas concentraciones de glucosa (Trudeau, et al., 2010) y en las mitocondrias de músculo esquelético de pacientes con diabetes mellitus tipo 2 (Kelley, et. al., 2002).

5. Hipótesis

Las altas concentraciones de glucosa ocasionarán alteraciones en la dinámica mitocondrial de células gliales de la retina en cultivo.

6. Objetivo general

Caracterizar la dinámica mitocondrial en células gliales de Müller cultivadas en condiciones normales y en presencia de altas concentraciones de glucosa.

7. Objetivos particulares

- Caracterizar la dinámica mitocondrial de células de Müller en cultivo.
- Analizar el curso temporal de la dinámica mitocondrial en células de Müller incubadas con altas concentraciones de glucosa.

8. MÉTODOS

8.1 Cultivo de células gliales de Müller

Se utilizaron ratas de la cepa Long Evans de 7 días post-natales, a las cuales se les extrajeron los ojos y se dejaron en medio DMEM sin suero (Sigma Aldrich D-6546) adicionado con 5.5 mM de glucosa, anfotericina B 2.5 µg/ml, penicilina U/ml y L-glutamina 2 mM durante toda la noche (aproximadamente 18 horas) a temperatura ambiente.

Posteriormente se realizó el cultivo de acuerdo al método de Hicks y Courtois (1990). Los ojos se cambiaron a solución salina de Hanks libre de calcio y magnesio (HBSS-CMF Sigma Aldrich H-4641) adicionado con tripsina al 2% durante 30 minutos.

Se cortó la parte anterior del ojo y se desprendió la retina de la copa óptica, para posteriormente en 3 ml de medio DMEM adicionado con SFB (suero fetal bovino) inactivado al 10% (DMEM-SFB 10%) en un tubo de vidrio, se homogenizó con una pipeta Pasteur de vidrio. Se dejó en reposo 20 segundos, lapso en el que se forma un sedimento formado por restos de tejido conectivo o retina no dissociada, el sobrenadante conteniendo las células dissociadas se pasó a otro tubo con 3 ml de medio DMEM- SFB 10%. Todo el material de vidrio se siliconizó para evitar que las células queden adheridas al mismo y éste se esterilizó previamente antes de usar. En estas condiciones se obtienen alrededor de 5,000,000 de células por mililitro.

Las células (38,888 células/mm³ en cajas de 24 pozos y 166,666 células/mm³ en cajas de 6 pozos) se cultivaron con 1 ml de medio DMEM-SFB 10%. A los 4 días, el medio se cambió por DMEM durante 6 horas para inducir muerte neuronal, y se regresaron a DMEM-SFB 10% (Sigma Aldrich D-2429 10x, con 100mg/L, glutamina, anfotericina, penicilina). Las neuronas se eliminaron por agitación del medio con una pipeta Pasteur y el medio se cambió cada tercer día, obteniendo a los 13-15 días una confluencia del 80% (Hicks y Courtois, 1990).

8.2 Conteo celular

Una muestra (100 µl) de la suspensión de células se diluyó 1:5 con DMEM-SFB 10%, de ésta se tomaron 100 µl y se colocaron en una cámara de Neubauer para realizar el conteo celular (Freshney, 2010).

8.3 Tratamientos

A los 11-15 días cuando se obtiene un 80% de confluencia del cultivo, el medio de cultivo se cambió por uno fresco y en la condición experimental, el medio contenía una concentración alta de glucosa (25mM) (Albert-Garay, 2015), las células se incubaron a tiempos cortos de: 15, 30, 45 minutos, y/o 2, 5, 6, 12, 24 y 48 horas. Al final de la incubación las células se procesaron de acuerdo a los distintos análisis.

8.4 Determinación de la masa y potencial mitocondrial

Al final del tratamiento correspondiente, las células se lavaron dos veces con PBS para retirar el exceso de medio y se incubaron en 1 ml Buffer Fosfatos (PBS) MitoTracker Green™ FM (80nM) o MitoTracker Red™ FM (50nM) a 37°C durante 30 minutos en completa oscuridad, se lavaron dos veces con PBS para retirar el exceso de reactivo, se montaron con PBS en una laminilla y observaron en un microscopio de epifluorescencia con un objetivo de 20X y las imágenes se tomaron con una cámara Nikon DMX 1200.

La cantidad de mitocondrias se determinó con el reactivo MitoTracker Green™ FM (TermoFisher M7514) éste compuesto contiene grupos clorometilos que reaccionan con los grupos sulfhídricos dentro de la célula, donde se oxida, lo que le permite entrar libremente a la mitocondria produciendo una fluorescencia verde, aun cuando la mitocondria presenta un potencial bajo, el reactivo se mantiene; razón por la cual se conoce que su actividad es independiente del potencial de la mitocondria (Buckman et al. 2001). Por lo que es un reactivo ideal para la observación de la mitocondria y de la morfología mitocondrial.

El potencial mitocondrial se determinó con el reactivo MitoTracker Red™ FM (TermoFisher M22425) el cual también entra a la célula y debido a que está cargado positivamente con derivados de rodamina, es rápidamente tomado por las mitocondrias que normalmente presentan carga negativa (Buckman et al. 2001). El reactivo se acumula de manera dependiente del voltaje mitocondrial que produce una fluorescencia en rojo, una mayor fluorescencia corresponde a un aumento en el potencial mitocondrial y viceversa.

Se analizó la intensidad de la fluorescencia total por medio de las imágenes recolectadas con un microscopio de epifluorescencia con un objetivo de 20X donde fueron tomadas con una cámara Nikon DMX 1200.

Las imágenes contienen una profundidad de pixel de 16 bits (65,536 niveles de gris). El campo de la imagen, además de contener a las células para realizar el posterior análisis, debe de contener un fondo que no presente fluorescencia. Esta señal de fondo se debe restar de la señal recogida en presencia de luz para obtener una salida verdaderamente proporcional a la intensidad de fluorescencia. A continuación, se calcula un valor de píxel promedio para todos los píxeles de cada imagen, así como del fondo utilizando las herramientas del software digital en IMAGEJ. Este valor de la fluorescencia total (porcentaje) de las imágenes se obtiene por medio de la siguiente ecuación que calcula CTCF (*corrected total cell fluorescence*):

CTCF = Densidad Integrada - (Área de la célula seleccionada X fluorescencia promedio de las lecturas del fondo sin fluorescencia)

8.5 Análisis de la morfología mitocondrial

Para determinar cambios en la dinámica de la red mitocondrial, se realizó el marcaje de las mismas con MitoTracker Green FMTM y se analizaron las imágenes por medio de la herramienta de “skeletonize” del programa IMAGEJ, la cual señala solo los píxeles dentro de una imagen de forma neutra, es decir, sin importar la cantidad de fluorescencia, recibe ese nombre porque el aspecto de la imagen es como si solo se observara el “esqueleto” de la misma, además se midieron las

partículas analizadas en rangos de 0-5 μm para los organelos de tamaño pequeño o punteado, y $>5 \mu\text{m}$ para los organelos fusionados (redes) o de mayor tamaño. El programa además puede señalar con códigos de colores (verde largos, rojo pequeños) con los cuales los diferentes organelos son destacados y nos arroja una tabla con el conteo mitocondrial.

8.6 Análisis de imágenes

En todos los casos para el análisis de resultados se tomaron 5 células de tres imágenes de tres diferentes experimentos para cada una de las condiciones. Las imágenes se procesaron por medio del programa IMAGEJ y el análisis estadístico se realizó con el programa GraphPad Prism 6.

8.7 Estadística

Los valores se presentan como el promedio \pm error estándar de 3 experimentos independientes llevados a cabo por duplicado y a los que se realizó una prueba de t de student y/o ANOVA, se consideraron estadísticamente significativos los valores con un valor de $p \leq 0.05$.

9. Resultados

Para el estudio de la dinámica mitocondrial en las células de Müller, inicialmente se estandarizaron los métodos para el uso de MitoTracker Green FM™ y MitoTracker Red FM™, para ello se emplearon distintas concentraciones de cada uno de estos reactivos.

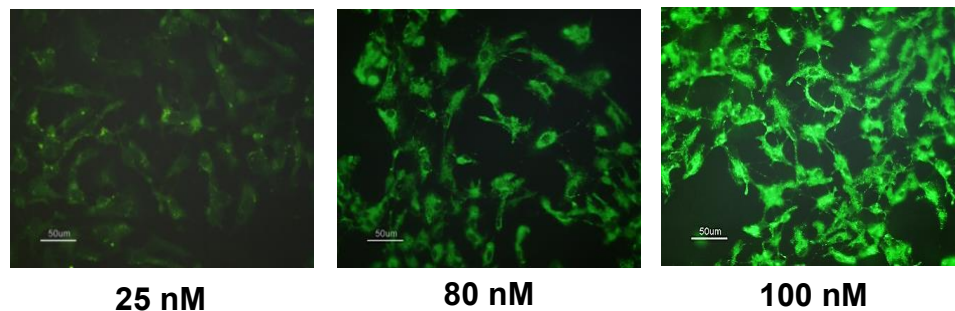


Figura 1. Mitocondrias marcadas con MitoTracker Green FM™ (20X). Células de Müller incubadas con MitoTracker Green FM™, se observa la fluorescencia de éste a distintas concentraciones.

Para MitoTracker Green FM™ se probaron concentraciones de 25nM, 80 nM y 100nM (figura 1). Considerando los resultados, se decidió usar una concentración de 80 nM, con la que se obtuvo la mejor resolución de las mitocondrias.

De igual manera, se obtuvo la concentración óptima para determinar el potencial mitocondrial con el reactivo MitoTracker Red FM™ (figura 2).

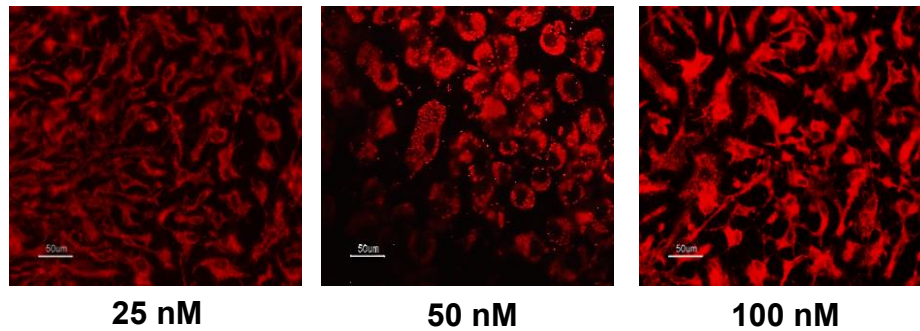


Figura 2. Fluorescencia del MitoTracker Green FMTM en células de Müller (20X). Se emplearon distintas concentraciones de MitoTracker Green FM™. Las pruebas fueron hechas de una mínima concentración (25 nM) hasta la máxima correspondiente al protocolo de uso del reactivo (100 nM).

El efecto de las altas concentraciones de glucosa en la dinámica mitocondrial se analizó con el uso del MitoTracker Green FM™. Como se observa en la figura 3 y en el análisis estadístico de las imágenes (figura 4), la fluorescencia del MitoTracker Green FM™ fue similar en células incubadas con 5.5 o 25 mM de glucosa, tanto a tiempos cortos (15-45 minutos) como a tiempos relativamente largos (1-48 horas).

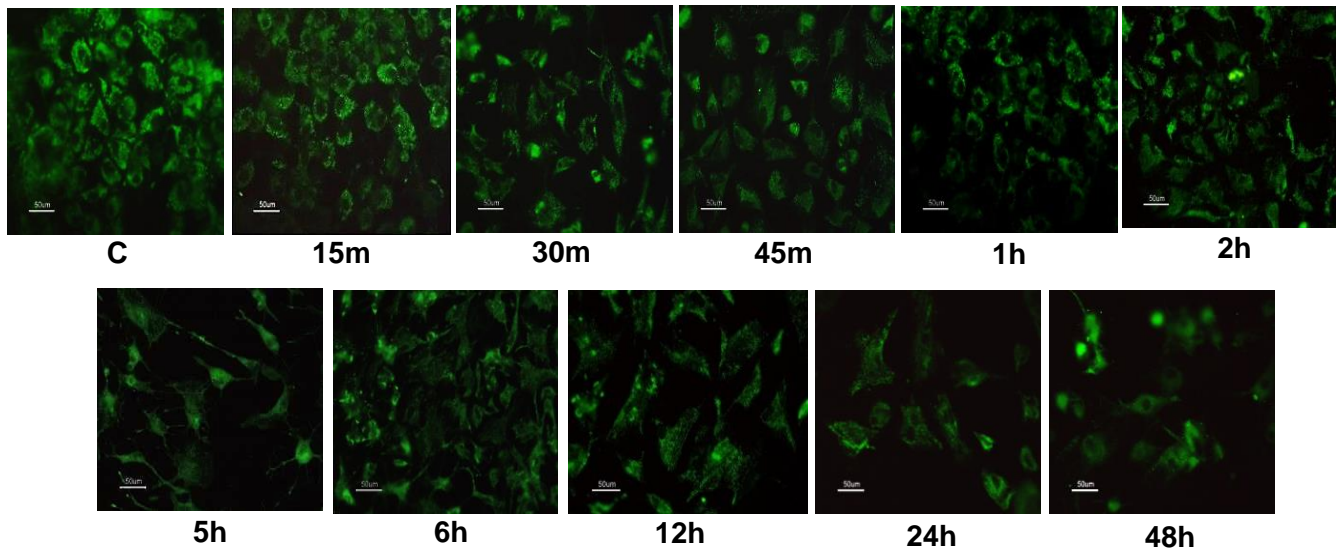


Figura 3. Mitochondrias en la Glía de Müller (20X). Las mitocondrias se detectaron con MitoTracker Green FMTM (80 nM) a distintos tiempos de incubación en presencia de altas concentraciones de glucosa (25 mM) C= control (5.5 mM de glucosa); m=minutos; h= horas.

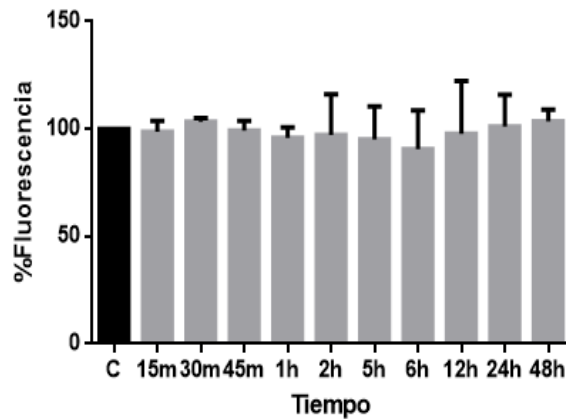


Figura 4. Fluorescencia de MitoTracker Green FMTM. Se presenta el porcentaje total de fluorescencia del MitoTracker Green FMTM (80 nM) observado en presencia de 5.5 mM o 25 mM de glucosa, a diferentes tiempos de tratamiento. La intensidad de la fluorescencia se analizó con el programa IMAGEJ, como se describe en la sesión de métodos. C= control; m= minutos; h= horas.

Posteriormente se analizó el potencial mitocondrial en las células de Müller incubadas con diferentes concentraciones de glucosa. La fluorescencia del MitoTracker Red FMTM en las células incubadas en medio normal (5.5 mM de glucosa) se consideró como el 100%. Las altas concentraciones de glucosa, causaron un incremento del 50% en la fluorescencia del MitoTracker Red FMTM a los primeros 30 minutos de incubación. Ésta disminuyó notablemente a las dos horas de incubación con respecto al control (50%); a partir de este tiempo, se observaron continuas fluctuaciones en la fluorescencia que indican cambios drásticos en el potencial mitocondrial (figuras 5 y 6).

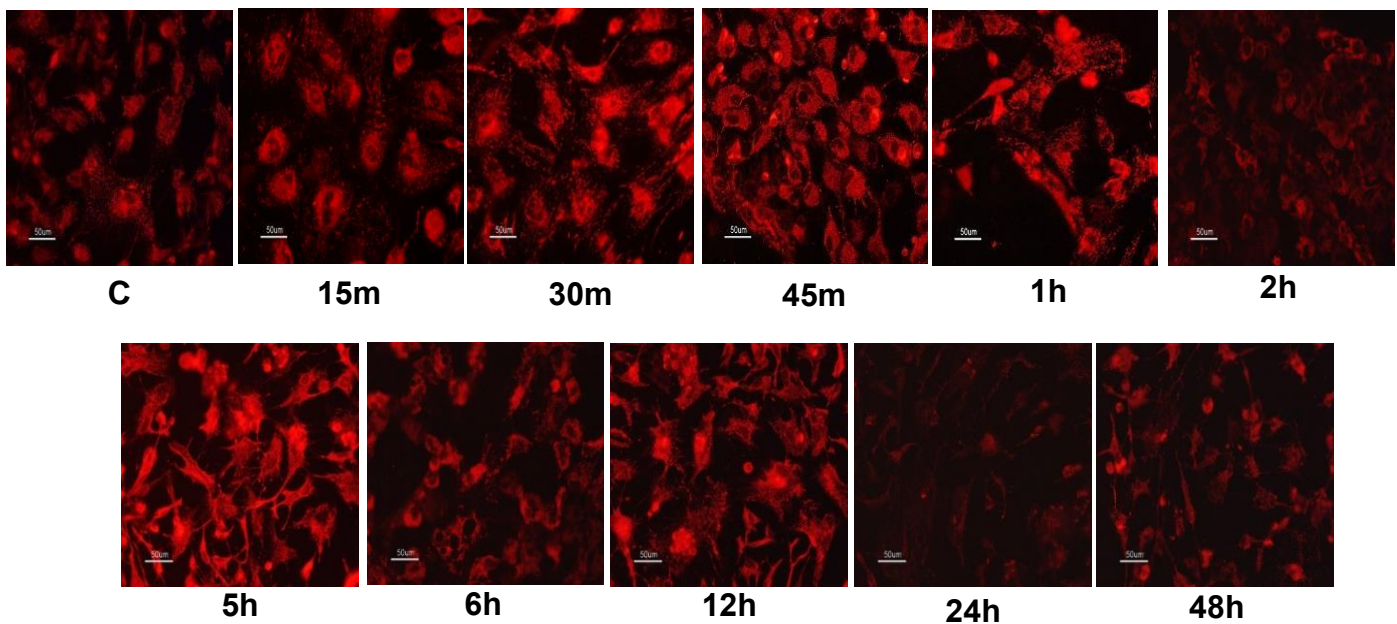


Figura 5. *Potencial mitocondrial en la Glía de Müller (20X). El potencial mitocondrial se identificó con MitoTracker Red FMTM (50 nM) a distintos tiempos de incubación en presencia de altas concentraciones de glucosa (25 mM). C= control (5.5 mM de glucosa); m=minutos; h= horas.*

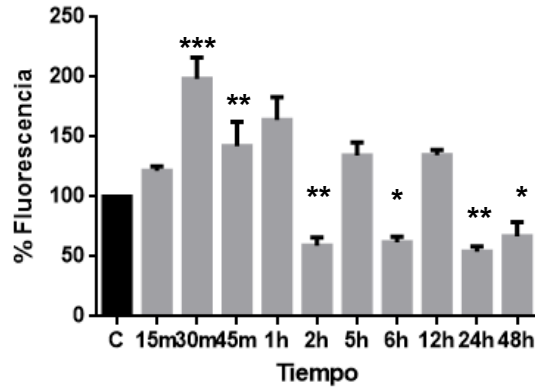


Figura 6. Potencial mitocondrial en las células de Müller. Los valores son el promedio \pm el error estándar del porcentaje total de fluorescencia del MitoTracker Red FMTM (80 nM) observado en presencia de 25 mM de glucosa, respecto al control (5.5 mM de glucosa) en los diferentes tiempos de tratamiento. La intensidad de la fluorescencia se analizó con el programa IMAGEJ, como se describe en la sesión de métodos. C= control; m= minutos; h= horas. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.0001$ (ANOVA).

La morfología mitocondrial se analizó a partir de las imágenes de las figuras 3, 7 y 8, utilizando el programa IMAGEJ (ver métodos). En las células incubadas en medio normal, se observó una heterogeneidad en el tamaño de las mitocondrias, en estas condiciones las mitocondrias formaron redes (mitocondrias de tamaño mayor a 5 μ m) (figura 7), lo que representó el 3.4% del total de las mitocondrias. En presencia de altas concentraciones de glucosa, aunque la heterogeneidad se mantuvo, las mitocondrias de un tamaño menor de 5 μ m aumentaron, es decir el porcentaje de mitocondrias formando redes disminuyó al 1.07% del total a las 48 horas de tratamiento (figura 8).

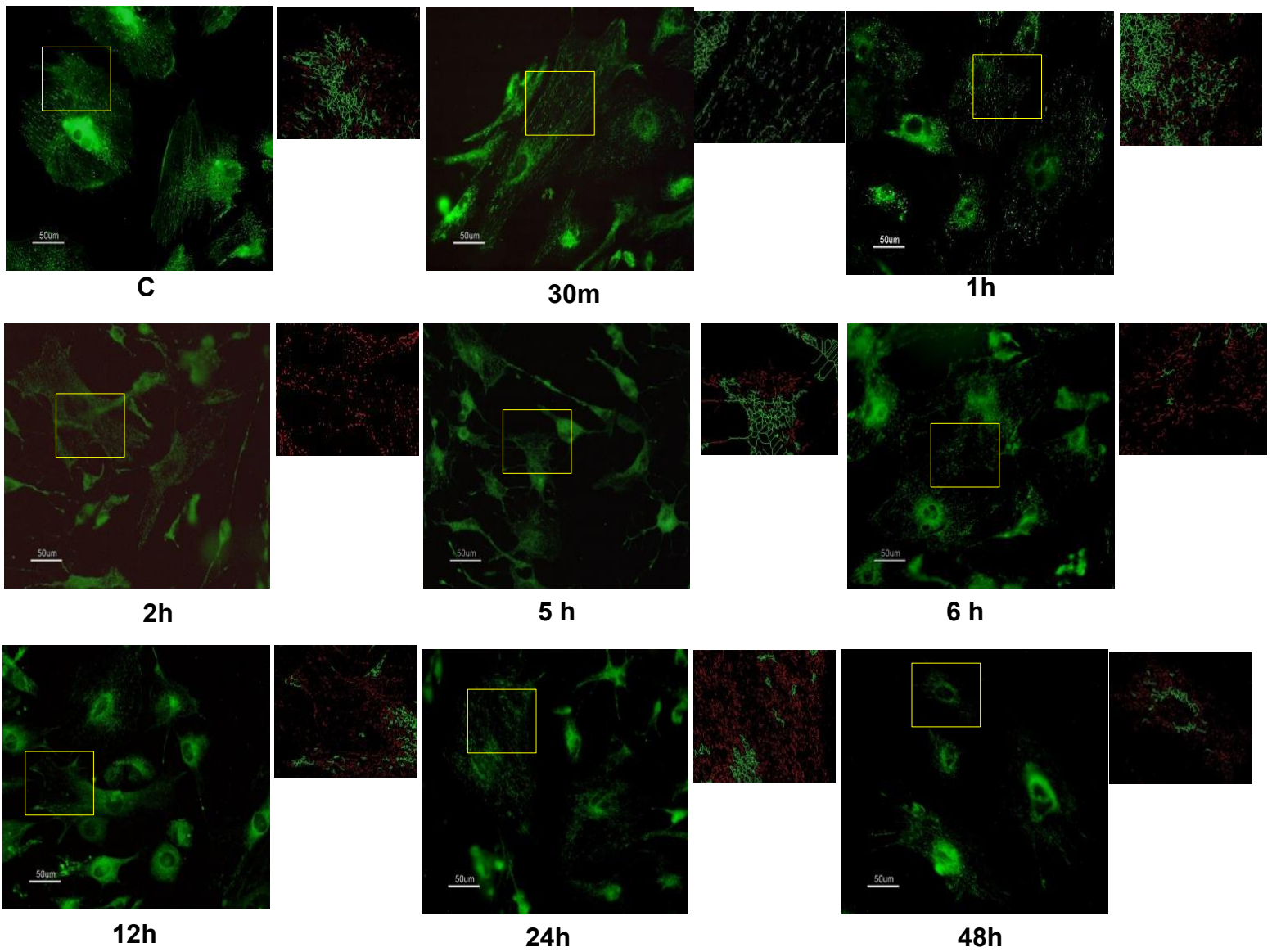


Figura 7. Análisis de morfología mitocondrial con el programa IMAGEJ (20X). A la derecha de cada tratamiento con alta glucosa, se presenta la ampliación del área enmarcada en amarillo. Se muestran las mitocondrias de 0-5 µm (rojo) y >5 µm (verde). C= control; m= minutos; h= horas.

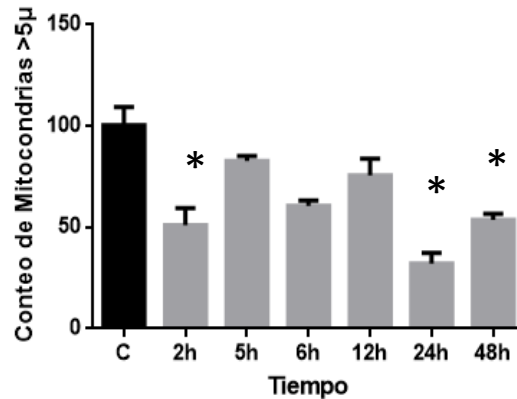


Figura 8. Porcentaje de mitocondrias formando redes. El tamaño de las mitocondrias en medio normal (C) o en presencia de 25 mM de glucosa por diferentes tiempos. Los datos se tomaron de la figura 7. Nótese que el porcentaje de mitocondrias en forma de redes (>5 μm) aunque varían a los distintos tiempos (2-48h) de incubación con altas concentraciones de glucosa, de manera general siempre son menores al control. C= control (5.5 mM de glucosa); h=horas. Prueba de t student= C vs. 2h *p= 0.153. Prueba de ANOVA= C vs. 24h y 48h *p ≤ 0.05.

Más adelante se determinó si la disminución de las mitocondrias formando redes, se asocia con el potencial mitocondrial. Como se observa en la figura 9 la cantidad de mitocondrias menores de 5 μm (redes) disminuyó en presencia de altas concentraciones de glucosa, indicando una asociación directa del tamaño con el potencial mitocondrial ($\Delta\Psi$).

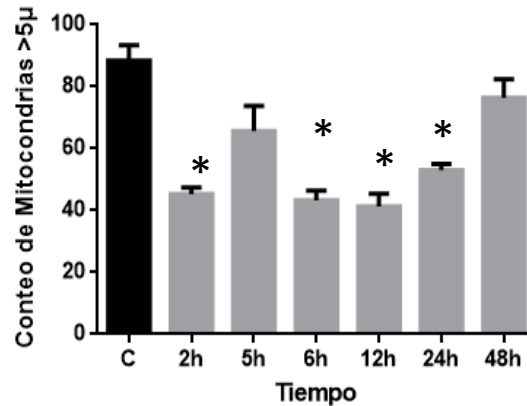


Figura 9. *Potencial mitocondrial y formación de redes. Se presenta el porcentaje de mitocondrias mayores de 5 μm marcadas con MitoTracker Red FMTM. Nótese que las mitocondrias en forma de redes (>5 μm) disminuyen a los distintos tiempos de incubación con altas concentraciones de glucosa. C= control (5.5 mM de glucosa); h=horas. *p ≤ 0.05.*

10. Discusión

Las mitocondrias son los organelos que proporcionan el mayor aporte energético de las células, el tejido nervioso se caracteriza por una alta demanda energética, en este tejido las células gliales se han estudiado poco en comparación a las neuronas. Sin embargo, las células gliales y particularmente las de Müller en la retina, llevan a cabo una variedad de funciones y participan en el metabolismo de distintas moléculas que son tomadas por las neuronas.

En diferentes tejidos se ha observado que las mitocondrias pueden modificar su morfología constituyendo redes o como mitocondrias aisladas; estas últimas, se sabe presentan un potencial bajo y son poco activas, mientras que aquellas que forman redes presentan un potencial normal y alta actividad (Coughlan et al., 2016; Gueven et al., 2017; Trudeau et al., 2010; Zhong y Kowluru, 2011).

Los cambios en la actividad mitocondrial se pueden estudiar en células aisladas con el uso de marcadores fluorescentes como el MitoTracker Green FMTM y MitoTracker Red FMTM que permiten analizar la cantidad y el potencial mitocondrial. El MitoTracker Red FMTM difunde libremente a través de la membrana plasmática y se acumula en la matriz mitocondrial cargada negativamente, el marcaje total depende del potencial de la mitocondria ($\Delta\Psi$), cuando la mitocondria se despolariza (pierde o disminuye su potencial homeostático), el reactivo se libera y pierde su fluorescencia, perdiéndose de vista el organelo (Gilmore y Wilson, 1999).

En el caso del MitoTracker Green FMTM, presenta grupos clorometilos que forman enlaces covalentes con los grupos sulfhídricos de las proteínas, estos mismo les permiten ser retenidos dentro de la mitocondria, aunque presenten un potencial normal o alterado. Para ambos fluoróforos es importante obtener la concentración adecuada para su uso, dependiendo del tipo celular y como consecuencia de sus mitocondrias, por lo que se requiere de una concentración óptima para evitar falsos positivos (Lemasters y Ramshesh, 2007) (figura 1). Por estas características, estos fluoróforos fueron usados para analizar la masa y potencial mitocondrial, así como los cambios en la morfología de la mitocondria.

El comportamiento de las mitocondrias en la retina es poco conocido y aun menor en condiciones de hiperglucemia. Los cambios en la mitocondria, tanto en su potencial como en su morfología, han sido observados en las células endoteliales de la retina de ratas de 6 meses después de inducida la diabetes (Zhong y Kowluru, 2011). Estos estudios demostraron disminución de potencial mitocondrial, así como en el tamaño de las mitocondrias. Resultados similares se observaron en cultivos de células endoteliales y pericitos de la retina en condiciones de alta glucosa (Trudeau et al., 2010; Trudeau, et al., 2011).

Se tiene reportado que una tasa baja en el potencial mitocondrial en concentraciones de alta glucosa es debido a un cambio en la morfología de la mitocondria (Devi, et al., 2017; Trudeau et al., 2010, 2011; Zhong y Kowluru, 2011), este cambio corresponde hacia un tamaño menor de las mitocondrias. De igual manera existe un reporte de una línea celular de Glía de Müller en las que el número de mitocondrias disminuyó considerablemente a los 5 días de exposición a 25 mM de glucosa (Devi et al. 2017) Sin embargo, no se tienen datos de los cambios mitocondriales a tiempos cortos.

En las células gliales de Müller la cantidad de mitocondrias no se modificó en condiciones de altas concentraciones de glucosa (25 mM); sin embargo, resulta interesante que el tamaño de las mitocondrias disminuyó significativamente. Si bien el análisis indica que sólo el 3.4% de las mitocondrias en medio normal se encontró formando redes, estas corresponden a un tamaño mayor de 5 μm , pero estas también forman ramificaciones y el programa las considera como una unidad, lo que indica que el porcentaje está subestimado y a ello se deben las variaciones observadas. A pesar de esto, en condiciones de altas

concentraciones de glucosa la formación de las redes disminuyó significativamente en todos los tiempos de incubación estudiados (50%).

A tiempos cortos de incubación con altas concentraciones de glucosa se observó un incremento en el potencial, lo que podría explicarse en una excesiva producción de acetil-CoA, que puede llevar a la aceleración de la cadena transportadora de electrones mitocondrial, que genera una alta presión de electrones, sin embargo, esta elevada actividad mitocondrial puede producir altos niveles de EROs como el superóxido que conlleva una disminución en el potencial de la mitocondria (Jarrett, et al., 2010), aunado a daños que se pueden generalizar a la célula. Respecto a esto, nuestros resultados indicaron una disminución en la fluorescencia del MitoTracker Red FMTM a partir de las 2 horas de tratamiento con alta glucosa, indicando una clara disminución en el potencial, sin embargo, el potencial presentó fluctuaciones, indicando que la mitocondria más que estar dañada presenta una respuesta adaptativa que evita el exceso en la producción de EROs y mantiene los requerimientos de ATP.

Resulta interesante que la disminución en el potencial mitocondrial de manera fluctuante y cercana a los valores del control se asoció a una disminución en la formación de las redes mitocondriales, lo que sugiere que su fragmentación puede estar asociada o representa una respuesta adaptativa que favorece los requerimientos energéticos de la célula, ya que otros autores (Yu, et al., 2006) han proporcionado evidencia de que estas mitocondrias tienen una tasa de respiración alta en comparación con aquellas que forman redes (alargadas), lo que las hace más activas.

11. Conclusiones

Las altas concentraciones de glucosa generaron cambios a nivel de potencial mitocondrial, pero no en el número de organelos disponibles en las células gliales de Müller. Las altas concentraciones de glucosa 25 mM llevaron a cambios en la dinámica mitocondrial, que no parecen comprometer los requerimientos energéticos y viabilidad celular, sin embargo, no se puede descartar que a tiempos mayores dichos efectos se vean aumentados y/o sean irreversibles.

12. Perspectivas

En un modelo de cultivo celular, el potencial mitocondrial puede sufrir cambios en la Glía de Müller cuando se les somete a altas concentraciones de glucosa a tiempos relativamente cortos, involucrando cambios en la dinámica mitocondrial. Analizar el papel que desempeñan otras proteínas en la regulación de la dinámica, como las del citoesqueleto puede ser clave para reconocer lo que sucede a tiempos mayores en cultivo celular o incluso en modelos animales.

13. Referencias

- Ahmad, T., Aggarwal, K., Pattnaik, B., et al. (2013). Computational classification of mitochondrial shapes reflects stress and redox state. *Cell Death and Disease*, 4(1): 1–10.
- Alberts, B. (2014). *Essential cell biology*. Garland Science.
- Berman, E. R. (1991). *Biochemistry of the eye*. Plenum Publishing.
- Buckman, J. F., Hernández, H., Kress, G. J., et al. (2001). MitoTracker labeling in primary neuronal and astrocytic cultures: Influence of mitochondrial membrane potential and oxidants. *Journal of Neuroscience Methods*, 104(2): 165–176.
- Cohen, L. H., & Noell, W. K. (1960). Glucose catabolism of rabbit retina before and after development of visual function. *Journal of Neurochemistry*, 5(3): 253–276.
- Coughlan, M. T., Nguyen, T.-V., Penfold, S. A., et al. (2016). Mapping time-course mitochondrial adaptations in the kidney in experimental diabetes. *Clinical Science*, 130(9): 711–720.
- De Vos, K. J., Allan, V. J., Grierson, A. J., & Sheetz, M. P. (2005). Mitochondrial function and actin regulate dynamin-related protein 1-dependent mitochondrial fission. *Current Biology*, 15(7): 678–683.
- Devi, T. S., Somayajulu, M., Kowluru, R. A., & Singh, L. P. (2017). TXNIP regulates mitophagy in retinal Müller cells under high-glucose conditions: implications for diabetic retinopathy. *Cell Death & Disease*, 8(5): 2777.
- Esposito, L. A., Melov, S., Panov, A., et al. (1999). Mitochondrial disease in mouse results in increased oxidative stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(9): 4820–4825.
- Fanjul, M. L., Hiriart, M., & Fernández de Miguel, F. (1998). *Biología funcional de los animales*. Siglo Veintiuno Editores, s.a. de c.v.
- Fortoul van der Goes, T. I. (2017). *Histología y biología celular*. McGraw-Hill Interamericana.

- Freshney, R. (2010). Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications. Chap 20 Quantitation. En Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications. New Jersey, USA. John Wiley & Sons, Inc.
- Friedman, J. & Nunnari, J. (2014) . Mitochondrial form and function. *Nature*, 505(7483): 335-343.
- Gilmore, K., & Wilson, M. (1999). The use of chloromethyl-X-rosamine (mitotracker red) to measure loss of mitochondrial membrane potential in apoptotic cells is incompatible with cell fixation. *Cytometry*, 36(4): 355–358.
- Gomes, L., Benedetto, G. & Scorrano, L. (2011), During autophagy mitochondria elongate, are spared from degradation and sustain cell viability. *Nat Cell Biol*, 13(5): 589-598.
- Gueven, N., Nadikudi, M., Daniel, A., & Chhetri, J. (2017). Targeting mitochondrial function to treat optic neuropathy. *Mitochondrion*, 36: 7–14.
- Hayakawa, K., Esposito, E., Wang, X. & Terasaki, Y. (2016). Transfer of mitochondria from astrocytes to neurons after stroke. *Nature*, 535: 551-555.
- Ishihara, N., Nomura, M., Jofuku, A., et. al. (2009). Mitochondrial fission factor Drp1 is essential for embryonic development and synapse formation in mice. *Nat Cell Biol*, 11: 958-956.
- Jarrett, S. G., Lewin, A. S., & Boulton, M. E. (2010). The importance of Mitochondria in age-related and inherited eye disorders. *Ophthalmic Research*, 44(3): 179–190.
- Kageyama, Y., Zhang, Z., Roda, R., et al. (2012). Mitochondrial division ensures the survival of postmitotic neurons by suppressing oxidative damage. *Journal of Cell Biology*, 197(4): 535.
- Karbowski, M., & Youle, R. J. (2003). Dynamics of mitochondrial morphology in healthy cells and during apoptosis. *Cell Death and Differentiation*, 10(8): 870–880.
- Kelley, D., He, J., He, J., Menshikova, E. & Ritov, V. (2002). Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes. *Diabetes*, 51(10): 2944-2950.

- Konigsberg Fainstein, M. (2008). *Radicales libres y estrés oxidativo : aplicaciones médicas*. Manual Moderno.
- Korobova, F., Ramabhadran, V. & Higgs, H. (2013). An actin-dependent step in mitochondrial fission mediated by the ER-associated formin INF2. *Science*, 339(6118): 464-467.
- Kowluru, R. A., & Abbas, S. N. (2003). Diabetes-Induced Mitochondrial Dysfunction in the Retina. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 44(12): 5327–5334.
- Kraus, F., & Ryan, M. T. (2017). The constriction and scission machineries involved in mitochondrial fission. *Journal of Cell Science*, 130(18): 2953–2960.
- Lackner, L. L. (2014). Shaping the dynamic mitochondrial network. *BMC Biology*, 12(1): 35.
- Lee, S., Van Bergen, N. J., Kong, G. Y., Chrysostomou, V., Waugh, H. S., O'Neill, E. C., Trounce, I. A. (2011). Mitochondrial dysfunction in glaucoma and emerging bioenergetic therapies. *Experimental Eye Research*, 93(2): 204–212.
- Lemasters, J. J., & Ramshesh, V. K. (2007). Imaging of Mitochondrial Polarization and Depolarization with Cationic Fluorophores. *Methods in Cell Biology*, 80(06): 283–295.
- Lerner, C. A., Sundar, I. K., & Rahman, I. (2016). Mitochondrial redox system, dynamics, and dysfunction in lung inflammation and COPD. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 81: 294–306.
- Meza Ruiz, G. (1995). *Neurobiología de los sistemas sensoriales*. UNAM.
- Mitchell, P. (1966). Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. *Wiley Online Library*. 12: 1507-1538
- Nathan, D., Bayless, M., Cleary, P., et. al. (2013). Diabetes control and complications trial/epidemiology of diabetes interventions and complications study at 30 years: advances and contributions. *Diabetes*, 62(12): 3976-3986.
- Nita, M., & Grzybowski, A. (2016). The Role of the Reactive Oxygen Species and Oxidative Stress in the Pathomechanism of the Age-Related Ocular Diseases and Other Pathologies of the Anterior and Posterior Eye Segments in Adults. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1-23.

- 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), 1–15.
- Rambold, A. S., & Lippincott-Schwartz, J. (2011). Mechanisms of mitochondria and autophagy crosstalk. *Cell Cycle*, *10*(23), 4032–4038.
- Reichenbach, A., & Bringmann, A. (2013). New functions of müller cells. *Glia*, *61*(5), 651–678.
- Smirnova, E., Griparic, L., Shurland, D.-L., & van der Bliek, A. M. (2001). Dynamin-related Protein Drp1 Is Required for Mitochondrial Division in Mammalian Cells. *Molecular Biology of the Cell*, *12*(8), 2245–2256.
- Tout, S., Chan-Ling, T., Holländer, H., et al. (1993). The role of Müller cells in the formation of the blood-retinal barrier. *Neuroscience*, *1*: 291-301.
- Trudeau, K., Molina, A. J. A., Guo, W., & Roy, S. (2010). High Glucose Disrupts Mitochondrial Morphology in Retinal Endothelial Cells Implications for Diabetic Retinopathy. *The American Journal of Pathology*, *177*(1), 447–455.
- Trudeau, K., Molina, A. J. A., & Roy, S. (2011). Metabolic Changes in Retinal Pericytes, *52*(12). <https://doi.org/10.1167/iovs.11-7934>
- Vecino, E., Rodriguez, F. D., Ruzafa, N., Pereiro, X., & Sharma, S. C. (2016). Glia-neuron interactions in the mammalian retina. *Progress in Retinal and Eye Research*, *51*(June), 1–40.
- Voet, D., & Voet, J. G. (2006). *Bioquímica*. Editorial Médica Panamericana.
- Wu, J., Jin, Z., & Yan, L. J. (2017a). Redox imbalance and mitochondrial abnormalities in the diabetic lung. *Redox Biology*, *11*(November 2016), 51–59.
- Wu, J., Jin, Z., & Yan, L. J. (2017b). Redox imbalance and mitochondrial abnormalities in the diabetic lung. *Redox Biology*, *11*(November 2016), 51–59.
- Yan, L. J. (2014). Pathogenesis of chronic hyperglycemia: From reductive stress to oxidative stress. *Journal of Diabetes Research*, *2014*.
- Yu, T., Robotham, J. L., & Yoon, Y. (2006). Increased production of reactive oxygen species in hyperglycemic conditions requires dynamic change of mitochondrial morphology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(8), 2653–2658.

- Zhang, P. & Hinshaw, J. (2001). Three-dimensional reconstruction of dynamin in the constricted state. *Nature Cell Biology*, 3: 922-926.
- Zhang, W., Liu, H., Al-Shabrawey, M., & Caldwell, R. (2011). Inflammation and diabetic retinal microvascular complications. *Cardiovasc Dis Res.* 2(2): 96-103.
- Zhong, Q., & Kowluru, R. A. (2011). Diabetic Retinopathy and Damage to Mitochondrial Structure and Transport Machinery. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 52(12), 8739.
- Zorova, L. D., Popkov, V. A., Plotnikov, E. Y. et al. (2017). Mitochondrial membrane potential. *Analytical Biochemistry*, 552(2018): 50-59.