



Revista Chilena de Nutrición

ISSN: 0716-1549

sochinut@tie.cl

Sociedad Chilena de Nutrición, Bromatología y
Toxicología
Chile

Ramírez, Luisa Maria; Dávila -Vera, Delsy; Palacios-Prü, Ernesto
METABOLISMO MITOCONDRIAL Y ULTRAESTRUCTURA DE MÚSCULO ESQUELÉTICO DE
RATÓN CON RESTRICCIÓN CALÓRICO PROTEICA
Revista Chilena de Nutrición, vol. 33, núm. 1, abril, 2006
Sociedad Chilena de Nutrición, Bromatología y Toxicología
Santiago, Chile

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=46914634007>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica
Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal
Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

ARTÍCULOS ORIGINALES

METABOLISMO MITOCONDRIAL Y ULTRAESTRUCTURA DE MÚSCULO ESQUELÉTICO DE RATÓN CON RESTRICCIÓN CALÓRICO PROTEICA

MITOCHONDRIAL METABOLISM AND ULTRAESTRUCTURE OF MICE'S SKELETAL MUSCLE WITH CALORIC PROTEIC RESTRICTION

Luisa Maria Ramírez, Delsy Dávila -Vera, Ernesto Palacios-Prü

Centro de Microscopía Electrónica. Facultad de Medicina, Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela.

RESUMEN

Para estudiar el metabolismo mitocondrial en este trabajo se utilizó el método de permeabilización del tejido muscular mediante saponina, la cual destruye el sarcolema, manteniendo las mitocondrias "in situ". Para crear un modelo de patología mitocondrial se produjo restricción calórico-proteica (RCP) en ratones adultos con un 50% de la dieta de los ratones alimentados "ad libitum" durante un período de 15 días. Se efectuaron estudios del consumo de oxígeno, relación ADP/O, así como la actividad enzimática de los Complejos I y II de la cadena respiratoria y la determinación de proteínas. Para evaluar el efecto de la saponina sobre el tejido muscular en presencia y ausencia de restricción calórico-proteica se observaron muestras del mismo al microscopio electrónico de transmisión. Los resultados revelaron en los animales una pérdida de peso, disminución en el consumo de oxígeno y de la relación ADP/O en presencia de glutamato y de succinato, por otra parte se obtuvo una disminución evidente de la actividad del Complejo I, sin modificación del Complejo II. Las observaciones obtenidas con el microscopio electrónico demuestran que la RCP en ratas tiene efecto directo sobre el aparato contráctil de las fibras musculares, produciendo desorganización de las estructuras sarcoméricas y reducción importante de los miofilamentos. La saponina, por otra parte afecta todo el sistema de citomembranas.

Palabras claves: Restricción alimentaria; mitocondria; saponina.

ABSTRACT

In this work, the method of permeabilization of muscular tissue with saponin was employed, which destroyed the sarcolemma but maintained the mitochondria "in situ". To create a model of mitochondrial pathology, a caloric-protein restriction (CPR) was produced in adult mice by reducing 50% the diet to fed animals for 15 days. Determinations of oxygen

consumption, ADP/O ratio, total proteins, as well as enzymatic activities of respiratory chain Complexes I and II were performed. To evaluate the effect of saponin on muscular tissues under normal or CPR conditions, electron microscopy observations were done. Results of the study showed that the animals in CPR group had loss of weight, reduced total proteins, diminished oxygen consumption, lower ADP/O ratio in the presence of glutamate and succinate, and a notable decrement in the activity of Complex I but without modifications of that of Complex II. Electron microscopic observations demonstrates direct effects of CPR over the contractile apparatus of muscle fibers, such as, disorganization of sarcomeric structures and an important reduction of the myofilaments. On the other hand, saponin affected all cytomembranous systems.

Key words: *Nutritional restriction; mitochondrial metabolism; muscle fiber ultrastructure; mouse.*

INTRODUCCIÓN

La búsqueda de un método para el diagnóstico de enfermedad mitocondrial ha tomado importancia en los últimos años debido a que diversas patologías, muchas de ellas de carácter genético, con desacoplamiento de la fosforilación oxidativa (1-10) y que cursan clínicamente con acidosis láctica. Afectan el músculo y el cerebro dando origen a diversas encefalomiopatías que parecen tener como origen una alteración primaria de las mitocondrias.

La biopsia muscular es necesaria en estos casos para el diagnóstico diferencial de estas enfermedades. La técnica es aparentemente eficiente en el caso de deficiencias de la cadena respiratoria, en las cuales se requiere estudiar su actividad usando medidas polarográficas, mediante el aislamiento de las mitocondrias por sucesivas centrifugaciones; sin embargo se han expuesto razones que señalan las ventajas de utilizar otro método, tal como el de la permeabilización, utilizando saponina, la cual destruye las membranas ricas en colesterol, especialmente el sarcolema, manteniendo las mitocondrias "in situ" (8,9).

Por eso en el presente trabajo estudiamos el metabolismo mitocondrial diseñando un modelo de patología del músculo esquelético y sus mitocondrias, mediante la restricción calórico proteica (RCP), ya que se ha demostrado que la restricción de alimentos causa alteraciones en el metabolismo y la morfología de las mitocondrias (11,12), y en algunos componentes de la cadena respiratoria, particularmente el Complejo I, el cual se modifica en la desnutrición, como se ha observado en animales de experimentación y en humanos (13,14). Adicionalmente en este trabajo evaluamos el efecto de la saponina sobre las membranas y sobre la integridad de los tejidos mediante observaciones al microscopio electrónico de transmisión.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para el presente trabajo se utilizaron ratones NMR con pesos entre 18 y 24 g, obtenidos en el Bioterio Central de la Universidad de Los Andes. Los animales fueron mantenidos durante 8 días en jaulas individuales, previo al inicio del proceso experimental. Al cabo de ese período se dividieron en dos grupos: grupo control (GC), el cual fue alimentado "ad libitum", y el

grupo con restricción calórico proteica (RCP), el cual recibió la misma dieta del grupo control, pero con un 50% menos del consumo diario. Este proceso fue realizado durante 15 días. Después de este periodo ambos grupos fueron usados para obtener muestras para medidas polarográficas, enzimáticas y muestras para microscopía electrónica de transmisión.

Permeabilización de las fibras musculares y mediciones polarográficas

El proceso de permeabilización se realizó según los procedimientos descritos por Veksler y cols. (8) y Lettelier y cols. (9). Las fibras permeabilizadas fueron usadas para medir el consumo de oxígeno mitocondrial con un electrodo tipo Clark (Gilson). La cámara para respiración fue mantenida a 37 °C y el volumen final fue de 2 ml. Como medio de respiración se utilizó el tampón B descrito por Lettelier y cols. (9). Las velocidades respiratorias fueron determinadas en los haces de fibras, usando glutamato, malato y succinato en agitación continua como sustratos respiratorios. El 100% de oxígeno fue calculado a 460 nanogramos átomos/ml. La relación ADP/O y el consumo de oxígeno en el estadio 3, fueron medidos de acuerdo al procedimiento de Chance y Williams (15). La concentración de proteínas fue determinada por el procedimiento de Lowry y cols. (16) y las determinaciones de los Complejos I y II se efectuaron según la metodología descrita por Hatefi y Stiggal (17).

Preparación de las muestras para microscopía electrónica de transmisión (MET)

Las muestras para MET se obtuvieron de ratones del grupo control y del grupo RCP con 15 días de tratamiento. Los ratones fueron anestesiados con vapores de éter y las muestras fueron tomadas de una de las extremidades inferiores. Se tomaron pequeñas secciones de tejido y fueron sumergidas inmediatamente en una mezcla al 3% glutaraldehído y 3% formaldehído en tampón cacodilato 0,1 M; pH 7,2 y procesadas de acuerdo a la metodología descrita por Palacios-Prü y Mendoza (18). Estas muestras fueron identificadas como GC y RCP, indicando que se trata de un grupo control y un grupo con restricción calórica-protéica. Adicionalmente pequeñas secciones de tejido fueron sumergidas en el fijador, luego de haber sido permeabilizadas con saponina. Estas muestras fueron identificadas como GCS y RCPS, lo cual significa grupo control en saponina y grupo con restricción alimentaria en saponina. Los cortes de 2 µm se colorearon con Azur II y los cortes ultrafinos (90 nm) se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo usando, las técnicas de Watson (19) y Reynolds (20), modificadas. Las observaciones fueron realizadas con un microscopio electrónico de transmisión, Hitachi H-7000.

Métodos estadísticos: La evaluación de los datos se llevó a cabo aplicando el test de Student S para la diferencia entre los promedios y considerando el valor de $p < 0,05$ como significativo .

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

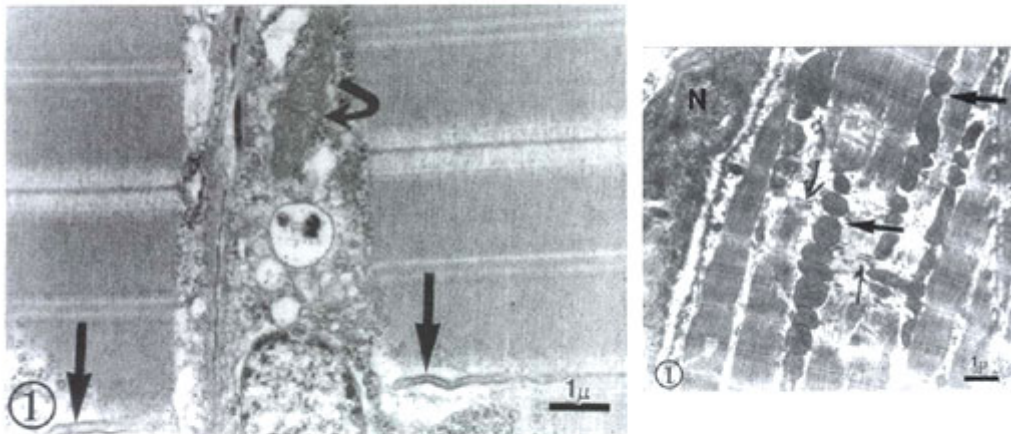
El primer aspecto a destacar en los resultados de este trabajo es el efecto de la restricción de alimentos, la cual fue evaluada mediante la pérdida de peso y la disminución de las proteínas musculares en los animales con RCP, tal como se muestra en el gráfico 1. En cuanto a los cambios metabólicos a nivel de las mitocondrias destaca la disminución del Complejo I en los animales con RCP demostrable con las mediciones polarográficas (Tabla 1) donde se observó una disminución significativa de la relación ADP/O de $3,43 \pm 0,84$ a $2,18 \pm 0,6$ utilizando Glutamato + Malato como sustratos, lo cual sugiere que se deja de producir una molécula de ATP a través de esta vía. Esto fue coherente con las mediciones espectrofotométricas, ya que se evidenció una disminución significativa de la actividad del Complejo I, desde 10,61 en el GC hasta 5,66 en el grupo RCP (gráfico 2). Estos resultados son coherentes con los obtenidos

por otros autores (13,14), quienes refieren una disminución del Complejo I en células mononucleares obtenidas de pacientes con desnutrición. Otros autores sugieren un vínculo entre las alteraciones del Complejo I y la enfermedad de Parkinson y el Alzheimer (21, 22) En cuanto al Complejo II, no se observaron cambios significativos con las determinaciones espectrofotométricas, lo cual podría explicarse por una escasa sensibilidad del método utilizado o a sus características funcionales, ya que tiene una subunidad unida a la membrana, y otra es soluble, poseyendo ambas actividad catalítica (23).

TABLA 1				
Determinaciones polarográficas en el grupo control y con restricción calórico-proteica				
	GC		RCP	
	Glutamato+Malato	Succinato	Glutamato+Malato	Succinato
Relación ADP/O	3,43 ± 0,84	2,51 ± 0,09	2,18 ± 0,6 *	1,26 ± 0,4*
Velocidad de consumo de O ₂ en el estadio 3	0,34 ± 0,09	0,25 ± 0,01	0,22 ± 0,07	0,12 ± 0,1
Determinaciones polarográficas, en presencia de 20 ul de 0,1 M Glutamato+Malato y de 20 ul de 0,1M Succinato. El tampón respiratorio corresponde a 2 ml de la solución B. La velocidad de consumo de oxígeno en el estadio 3 se expresa en nanoátomos de oxígeno por mg de tejido (n=6). *significativo con respecto al grupo control, p< 0,05. Grupo control (GC): grupo con restricción calórico-proteica (RCP).				

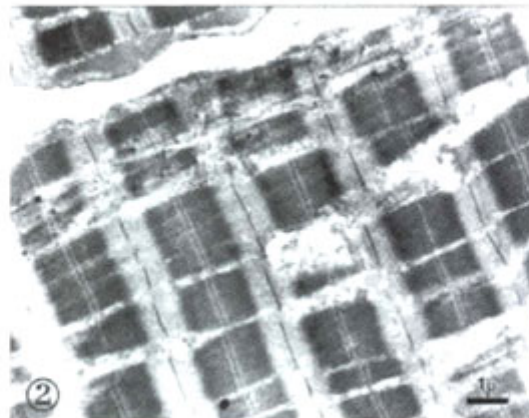
Los resultados obtenidos en el presente estudio con el microscopio electrónico de transmisión nos permiten confirmar, en primer lugar el patrón estructural de las fibras musculares del GC, tal como se muestran en la figura 1, donde se observa claramente las cadenas de mitocondrias intercaladas entre las miofibrillas y por otra parte que la permeabilización con saponina tiene efecto directo sobre el aparato contráctil de las fibras musculares, caracterizado por la desorganización de las estructuras sarcoméricas y una importante reducción de los miofilamentos, como se aprecia en las figuras 2 y 3 del grupo GCS. Así mismo, un hallazgo común en las fibras que han sufrido RCP es el desplazamiento de las mitocondrias de su ubicación normal entre las miofibrillas hacia espacios en los cuales el componente contráctil ha desaparecido, lo cual le permite a las mitocondrias congregarse formando verdaderas lagunas mitocondriales (Figura 4). Finalmente los resultados obtenidos de animales con RCPS muestran como era de esperarse, la combinación de ambos efectos. En estas fibrocélulas musculares pudimos observar fantasmas mitocondriales no edematizados, con lisis de sus membranas, tanto en las crestas como en la membrana externa y además con disminución significativa o lisis de la matriz mitocondrial, así mismo se pudo observar la lisis o reducción importante de los miofilamentos de actina como se ilustra en la figura 5, que ocasiona el importante desarreglo de la banda I de los sarcómeros. Esta disminución de los filamentos de actina y desarreglo de la banda I se acompaña en estos animales con tratamiento combinado, de una microvesiculación (Figura 6) del sistema T y de las cisternas laterales del retículo sarcoplásmico. Es importante destacar el hecho que los filamentos de miosina resisten mejor la acción combinada de la RCP-saponina, mientras que los filamentos de actina mostraron los mayores grados de alteración (Figura 6).

FIGURA 1



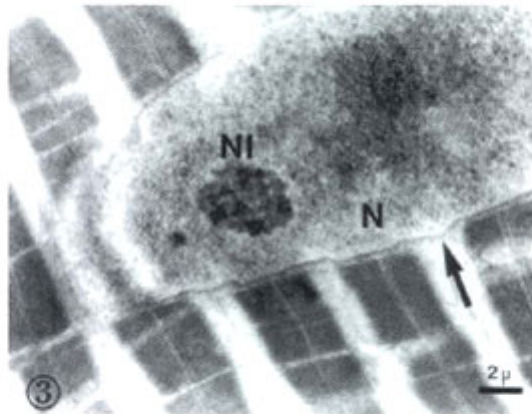
En esta fotografía se ilustra un segmento de una célula muscular, proveniente de un animal control. Nótese las crestas mitocondriales (flecha curva) y los túbulos del sistema T (flechas rectas).

FIGURA 2



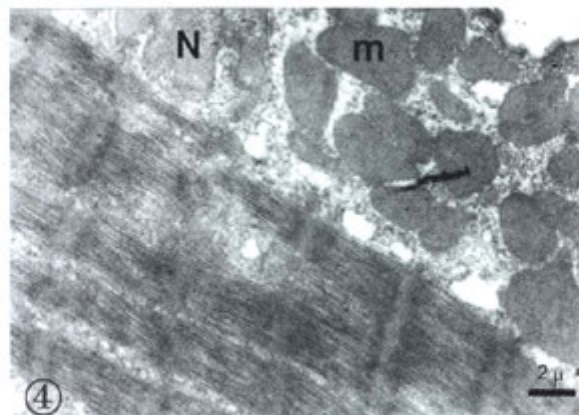
En esta fotografía del músculo de un ratón con saponina (GCS) se observa una importante extinción mitocondrial, aun cuando el aparato contráctil conserva su estructura básica.

FIGURA 3



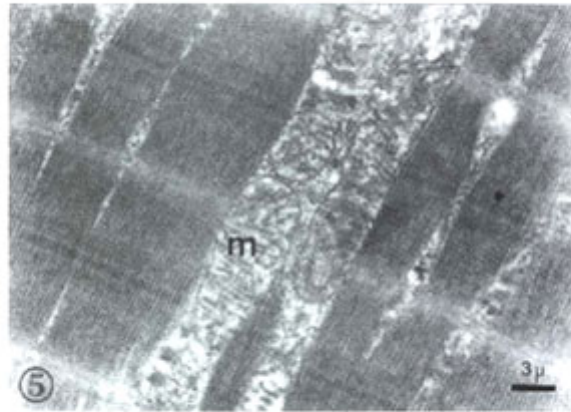
En esta imagen podemos apreciar que la saponina también afecta otras membranas como las pertenecientes a la cisterna perinuclear (flecha), las cuales se hacen muy finas reduciéndose el espacio cisternal (flecha). Los poros nucleares también se reducen o se extinguen. La eucromatina se hace más granular, fina y dispersa. N, núcleo, NI, nucléolo.

FIGURA 4



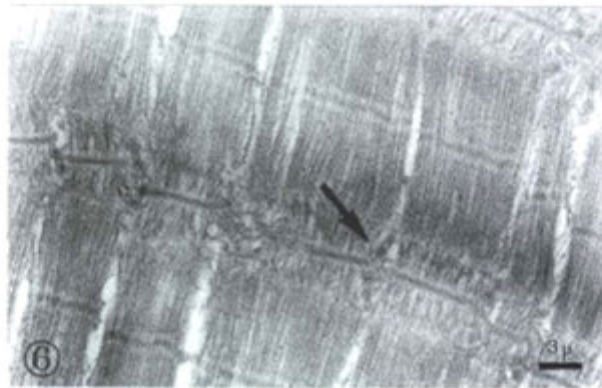
En esta fotografía de RCP, podemos apreciar en las imágenes ultraestructurales, disminución de los filamentos contráctiles, aun cuando se conservan con características normales las mitocondrias (m) las cuales, sin embargo se reagrupan en lagunas mitocondriales. N, núcleo.

FIGURA 5



En esta micrografía de RCPS hay disminución de los filamentos contráctiles como la actina y la aparición de fantasmas mitocondriales (m). Nótese que en los espacios correspondientes a la banda I no se aprecia filamentos contráctiles.

FIGURA 6



En esta fotografía a mayor aumento se aprecia claramente el desarreglo de los filamentos de actina de la banda I y la casi desaparición de los mismos en la banda A, en el caso de las fibras musculares provenientes de animales con RCP, posteriormente infiltradas con saponina. La flecha señala la formación de microvesículas en lugar de las cisternas laterales o terminales del retículo sarcoplásmico.

Los resultados de este trabajo confirman que se puede utilizar la restricción de alimentos como un modelo experimental para estudiar las alteraciones en el funcionamiento de las mitocondrias, como ha sido señalado por otros autores (11,12,22) y han puesto a prueba la utilidad del método de permeabilización, como una herramienta eficaz para el estudio de las medidas polarográficas, evitando la utilización de grandes cantidades de tejido. Ulteriores estudios se requieren para profundizar en los efectos de la saponina sobre las citomembranas y las posibles consecuencias de sus aplicaciones terapéuticas in vivo.

Agradecimientos: Este trabajo fue financiado por el CDCHT de la Universidad de Los Andes con el código M-719-01-03-B. Agradecemos a los técnicos José Sanchez por su colaboración en el cuidado de los animales y la determinación de proteínas, al técnico José Ramírez por el revelado de las fotografías y especialmente a la Dra Leticia Miranda de Contreras por su apoyo logístico en el Laboratorio de Neuroquímica del Centro de Microscopía Electrónica y a la Lic Ibis Cruz del Laboratorio de Andrología.

BIBLIOGRAFÍA

1. Robinson BH, De Meirleir L, Glerum M. Clinical presentation of mitochondrial respiratory chain defects in NADH-coenzyme Q reductase and cytochrome oxidase: clues to the pathogenesis of Leigh disease. *J Pediatr* 1987;110: 216-222.
2. Robinson BH, Gleru Chow M, Petrova-Benedict, Lightowlers R, Capaldi R. The use of skin fibroblast cultures in the detection of respiratory chain defects in patients with lactic acidemia. *Pediatr Res*1990; 28:549-555.
3. Wallace D. Diseases of mitochondrial DNA. *Annu Rev Biochem* 1992;61:1175-1212.
4. Wanders RJA, Wijburg FA, Ruiters JPN. Prenatal diagnosis of systemic disorders of the respiratory chain in cultured amniocytes and chorionic villus fibroblasts by studying the formation of lactate and pyruvate from glucose. *J Inher Metab Dis* 1992;15:84-91.
5. Wanders RJA, Ruiters JPN, Wijburg FA. Studies on mitochondrial oxidative phosphorylation in permeabilized human skin fibroblasts: application to mitochondrial encephalomyopathies. *Biochem Biophys Acta* 1993;1181:219-222.
6. Ritov VB, Menshikova EV, He J, Farrell RE, Goopaster BH, Kelley DE. Deficiency of subsarcolemmal mitochondria in obesity and type 2 Diabetes. *Science* 2005;308:8-14.
7. Sjöstrand FS. Molecular pathology of Luft disease and structure and function of mitochondria. *J Submicrosc Cytol Pathol*, 1999;31: 41-50.
8. Veksler VI, Kusnetsov AV, Sharov VG, Kapelko VI, Saks VA. Mitochondrial respiratory parameters in cardiac tissue: A novel methods of assessment by using saponin-skinned fibres. *Biochem Biophys Acta* 1997;992:191-196.
9. Lettelier T, Malgat M, Coquet M, Moretto B, Parrot-Rouland F, Mazat PJ. Mitochondrial myopathy studies on permeabilized muscle fibers. *Pediatr Res* 1992; 32:17-22.
10. Enns GM. The contribution of mitochondria to common disorders. *Mol Genet Metab* 2003;79:1-16.
11. Ramírez LM, Martens-Cook J, Palacios-Prü EL. Ultrastructure of the heart muscle in rats under hypobaric stress and under high NaCl intake. *Ann Nutr Metab* 1994;38: 141-151.
12. Ramírez LM, Martens-Cook J, Palacios-Prü EL. Efecto de la desnutrición calórico-proteica y del stress hipóxico sobre la ultraestructura del músculo cardíaco de rata. *Act Cient Ven* 1998;49:31-37.

13. Briet F, Twomey C, Jeejeebhoy KN. Effect of malnutrition and short-term refeeding on peripheral blood mononuclear cell mitochondrial I activity in humans. *Am J Clin Nutr* 2003;77:1304-11.
14. Briet F, Twomey C, Jeejeebhoy KN. Effect of feeding malnourished patients for 1 mo on mitochondrial complex I activity and nutritional assessment measurements. *Am J Clin Nutr* 2004;5:787-794.
15. Chance B, Williams GR. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation III. The steady state. *J Biol Chem* 1995; 217:409-427.
16. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193:265-275.
17. Hatefi Y, Stiggal DL. In methods in enzymology. Fleischer S, Parker L. (eds). Academic Press, New York 1978;53,p.5.
18. Palacios-Prü EL, Mendoza RV. An unusual relationship between glial cells and neuronal dendrites in olfactory bulbs of *Desmodus rotundus*. *Brain Res* 1972;297:89-100.
19. Watson ML. Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. *J Biophys Biochem Cytol* 1958;4:475.
20. Reynolds E. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain electron microscopy. *J Cell Biol* 1963;17:208-212.
21. Greenamyre JT, Bertabet R, Sherer T. The rotenone models of Parkinson`s disease: genes, environment and mitochondria. *Parkinsonismo and related disorders* 2003;9:S5.
22. Bua E, Mckiernan SH, Aikem JM. Caloric restriction limits the generation but not the progression of mitochondrial abnormalities in aging skeletal muscle. *FASEB J* 2004;18:582-4.
23. Hedestedt L, Onishi T. Progress in succinate: quinone oxidoreductase research In: Ernster L (ed). *Molecular mechanisms in bioenergetics*. Elsevier. Amsterdam 1992,pp163-19.

Dirigir la correspondencia a: Dr. Ernesto Palacios Prü
Centro de Microscopía Electrónica. Apartado Postal 175.Universidad de Los Andes.
Mérida-Venezuela.
Fono: (0274) 240 3160 / 240 3161
Fax: (0274) 240 3156
E-mail: cme@ula.ve

Este trabajo fue recibido el 18 de Agosto de 2005 y aceptado para ser publicado el 7 de Diciembre de 2005.