

Prediabetes y Componentes del Complejo Mitocondrial de Oxidación de Lactato

Conejo Sánchez, Zaira D. 1, Gallardo Manjarrez, Andrea V. 2, Garibaldi Ríos, Asbiel F. 3, Ortiz Velázquez, Jaime F. 4, Pérez-Vázquez, Victoriano 5, Vargas-Ortiz, Katya 6*.

1Departamento de Ciencias Médicas, División de Ciencias de la Salud, Campus León, Universidad de Guanajuato. [zdc0623@gmail.com]

2Licenciatura en Químico Farmacéutico Biólogo, Departamento de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Guanajuato. [av.gallardomanjarrez@ugto.mx]

3Licenciatura en Biomedicina, Universidad Autónoma de Sinaloa. [f_gr17s@hotmail.com]

4Licenciatura Médico Cirujano, División de Ciencias de la Salud, Campus León, Universidad de Guanajuato. [jf.ortizvelazquez@ugto.mx]

5 Departamento de Ciencias Médicas, División de Ciencias de la Salud, Campus León, Universidad de Guanajuato. [vicpe@yahoo.com]

6* Investigador a cargo del proyecto. Departamento de Ciencias Médicas, División de Ciencias de la Salud, Campus León, Universidad de Guanajuato. [kavati75@hotmail.com]

Resumen

El lactato es una importante fuente de energía, el principal precursor gluconeogénico y es considerado como una lactohormona (por su función de molécula señalizadora). Esta molécula se oxida a través del complejo de oxidación del lactato mitocondrial (mLOC) localizado en la membrana interna mitocondrial, compuesto por cuatro proteínas: lactato deshidrogenasa mitocondrial (mLDH), citocromo oxidasa IV (COX IV), proteína chaperona (CD147) y transportador de monocarboxilatos 1 (MCT1). Dichas proteínas tienen la función de oxidar el lactato y transformarlo a piruvato para posteriormente incluirlo en el ciclo del ácido tricarbóxico. Sin embargo, en la diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) el contenido de MCT1 se encuentra disminuido. En este proyecto se determinó el contenido de los componentes del mLOC en pacientes con prediabetes para conocer si desde etapas previas a la DMT2 hay desregulación de dichas proteínas. Se realizó un estudio transversal comparativo, se obtuvieron biopsias del músculo

esquelético vasto lateral para cuantificar mediante la técnica de Western Blot el contenido proteico del mLOC. El contenido de la mayoría de los componentes del mLOC fue similar entre los pacientes con prediabetes y los sujetos control; sin embargo, el contenido de MCT1 fue significativamente menor en pacientes con prediabetes.

Abstract

Lactate is an important source of energy, the main gluconeogenic precursor and is considered a lactohormone (due to its function as a signaling molecule). This molecule is oxidized in the mitochondrial inner membrane through the mitochondrial lactate oxidation complex (mLOC) composed of four proteins: mitochondrial lactate dehydrogenase (mLDH), cytochrome oxidase IV (COX IV), Chaperone Protein (CD147) and monocarboxylate transporter 1 (MCT1). These proteins have the function of oxidizing the lactate and transforming it into pyruvate to later include it

in the tricarboxylic acid cycle. However, in type 2 diabetes mellitus (T2DM) the content of MCT1 is diminished. In this project, the content of the mLOC components in patients with prediabetes was measured to determine whether these proteins are deregulated from stages prior to T2DM. A comparative cross-sectional study was performed, biopsies of the vastus lateralis muscle were obtained to quantify the protein content of mLOC by Western Blot technique. Content of most mLOC components were similar between patients with prediabetes and control subjects; However, MCT1 was significantly lower in patients with prediabetes.

Introducción

Anteriormente se creía que el lactato era una molécula de desecho del metabolismo anaeróbico de la glucólisis, actualmente se sabe que es una importante fuente de energía, el principal precursor gluconeogénico y se ha considerado como lactohormona por su función de molécula de señalización. En los procesos de transporte entre sitios de producción y eliminación, el lactato ejerce importantes efectos sobre el metabolismo de lípidos y carbohidratos (1).

El lactato se forma en el músculo esquelético de manera constante e incrementa su producción durante el ejercicio, parte del lactato producido es transportado al hígado o al corazón y otra parte es oxidada en el mismo músculo (2,3) a través del complejo de oxidación del lactato mitocondrial (mLOC) localizado en la membrana interna mitocondrial, compuesto por cuatro proteínas: lactato deshidrogenasa mitocondrial (mLDH), citocromo C oxidasa IV (COX IV), proteína chaperona (CD147) y transportador de monocarboxilatos 1 (MCT1)

(4,5). Dichas proteínas tienen la función de oxidar el lactato y transformarlo a piruvato para posteriormente incluirlo en el ciclo del ácido tricarboxílico (6).

En enfermedades metabólicas como la obesidad, la resistencia a la insulina, la diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) y la prediabetes se presenta disfunción mitocondrial (1), la cual se caracteriza por un número reducido de mitocondrias y las proteínas que expresan se encuentran alteradas, debido a la glucotoxicidad y lipotoxicidad causadas por la resistencia a la insulina (7).

En la DMT2 la resistencia a la insulina inhibe la oxidación del piruvato impidiendo la formación de acetil-CoA, así la LDH produce a partir de piruvato, lactato que debería oxidarse de manera adecuada por el mLOC, pero se ha reportado que MCT1 está disminuido en pacientes con DMT2, ocasionando complicaciones como la acidosis láctica. Estos cambios se correlacionan con mayor concentración de lactato y glucosa en ayuno (8,9).

En el mundo hay aproximadamente 318 millones de personas que padecen prediabetes y cada año en México 7 de cada 10 pacientes con prediabetes progresan a DMT2 (10). La prediabetes, según la American Diabetes Association (ADA) es diagnosticada cuando la concentración de glucosa en sangre en ayuno está entre 100-125 mg/dL y/o entre 140-199 mg/dL posterior a 2 h de prueba de tolerancia oral a glucosa (11,12). A diferencia de la DMT2 la prediabetes es reversible.

Actualmente se desconoce si existe alguna alteración en el contenido del mLOC en pacientes con prediabetes, por lo que el objetivo de esta investigación fue comparar el contenido de los componentes del mLOC en músculo

esquelético de pacientes sedentarios con prediabetes respecto a sujetos sanos; estos resultados fortalecerán los conocimientos actuales sobre los eventos fisiopatológicos y moleculares presentes en la prediabetes.

Material y métodos

Se realizó un estudio transversal comparativo en 18 sujetos varones sedentarios de 30-55 años divididos en dos grupos de 9 integrantes cada uno: grupo de prediabetes (GPD), sujetos con prediabetes de recién diagnóstico y en el grupo control (GC) sujetos sin alteración en el metabolismo de glucosa; en ambos grupos los participantes debían estar exentos de otras patologías relacionadas con el metabolismo de la glucosa. A cada participante se le determinaron sus características antropométricas y metabólicas (concentraciones de glucosa, lactato, perfil de lípidos, área bajo la curva durante la prueba de tolerancia oral a glucosa) y consumo de oxígeno máximo ($VO_{2\text{pico}}$). Se tomó una biopsia de músculo vasto lateral para cuantificar, mediante la técnica de Western Blot, el contenido de las proteínas que conforman el mLOC (LDH, COX, CD147, MCT1). Este protocolo fue autorizado por el comité institucional de bioética en la investigación de la Universidad de Guanajuato (CIBIUG) con el código: CIBIUG-P41-2018; además, todos los participantes firmaron un consentimiento informado.

Preparación de las muestras. La extracción de proteínas de músculo vasto lateral se realizó empleando el Sample Grinding Kit (GE Healthcare life sciences), el tejido fue homogenizado con la resina del kit utilizando como disolvente el buffer de Laemli (Tris HCl 0.5 M pH 6.8, 25% glicerol y 2% SDS), en

seguida se centrifugaron a 16,000 RPM/10 min, el sobrenadante se utilizó para determinar la concentración de proteína total por el método de Bradford modificado (13).

Western Blot. La electroforesis se realizó en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS) al 13%. En cada carril del gel se cargaron 30 μg de proteína para la medición de COX y LDH, 50 μg para CD147 y MCT1; después, las proteínas del gel fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa y bloqueadas con una solución compuesta por TBS (Tris 20 mM, NaCl 500 mM) y leche descremada al 5% durante 1 h. Cada membrana se incubó con un anticuerpo primario específico para cada proteína, anti COX IV (1:4000, Abcam) por 12 h, anti LDH (1:1000) durante 8 h y anti MCT1 (1:1000) por 12 h fabricados por Santa Cruz Biotechnology, Inc; y anti CD147 (1:500, Abcam) durante 24 h. Al término se realizaron tres lavados (10'-5'-5') con TBS-Tween 20. Las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario (1:10 000) por 1:30 h. Se realizaron tres lavados (10'-5'-5') con TBS-Tween 20.

La inmunodetección se realizó mediante quimioluminiscencia (Bio Rad, California, USA), con el Fotodocumentador ChemiDoc™ (Bio Rad, California, USA) se detectaron las bandas de proteína y la cuantificación se realizó con el software Image Lab 6.0.1 (Bio Rad, California, USA).

Resultados

Participaron 18 sujetos divididos en dos grupos: Grupo Control (GC) y Grupo Prediabetes (GPD) con 9 integrantes cada uno, sus características clínicas y metabólicas se muestran en la Tabla 1. Los grupos fueron homogéneos, excepto, como se esperaba, en el GPD fueron mayores las

concentraciones de triglicéridos, glucosa y el área bajo la curva de glucosa durante la prueba de tolerancia a glucosa (Tabla 1).

Tabla 1. Características clínicas y metabólicas.

Variable	Grupo Control (GC)	Grupo Prediabetes (GPD)	Valor p* GC vs GPD
		Basal	
Edad (años)	36,4 ± 5,5	41,6 ± 6,7	ns
IMC (kg/m ²)	30,7 ± 6,1	28,8 ± 5,6	ns
Insulina (μLU/mL)	15,2 ± 9,7	17,8 ± 7,6	ns
Colesterol total (mg/dL)	160,7 ± 28,0	163,0 ± 32,8	ns
LDH (mg/dL)	37,1 ± 5,7	32,4 ± 7,7	ns
Tg (mg/dL)	125,7 ± 44,3	228,5 ± 81,6	p < 0,01
Glucosa (mg/dL)	91,7 ± 7,6	105,0 ± 3,2	p < 0,01
AUC-GLU (mg/dL/120 min)	13750 ± 2200	18205 ± 2895	p < 0,01
Lactato capilar (mmol/L)	1,4 ± 0,6	1,7 ± 0,9	ns
VO ₂ pico (mL/min/kg)	33,4 ± 5,9	33,2 ± 4,2	ns

Los datos se muestran como media ± SD. ns: diferencia no significativa, IMC: Índice de masa corporal, LDH: Lipoproteína de alta densidad Tg: Triglicéridos, AUC-GLU: Área bajo la curva de glucosa, VO₂pico: consumo de oxígeno máximo, p*: prueba T Student para grupos dependientes.

Contenido de los componentes del complejo mLOC en pacientes con prediabetes.

El contenido de la mayoría de los componentes del mLOC fue similar entre los pacientes con prediabetes y los sujetos control (p > 0.05). El contenido de CD147 (0.78 ± 0.28 vs 1, GPD vs GC) y LDH (0.76 ± 0.34 vs 1, GPD vs GC) en músculo de pacientes con prediabetes fue menor que en GC, sin embargo, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (p > 0.05). Por otra parte, el contenido de COX IV fue mayor en GPD en comparación con G (1.26 ± 0.54 vs 1) sin alcanzar diferencia significativa (Figura 1).

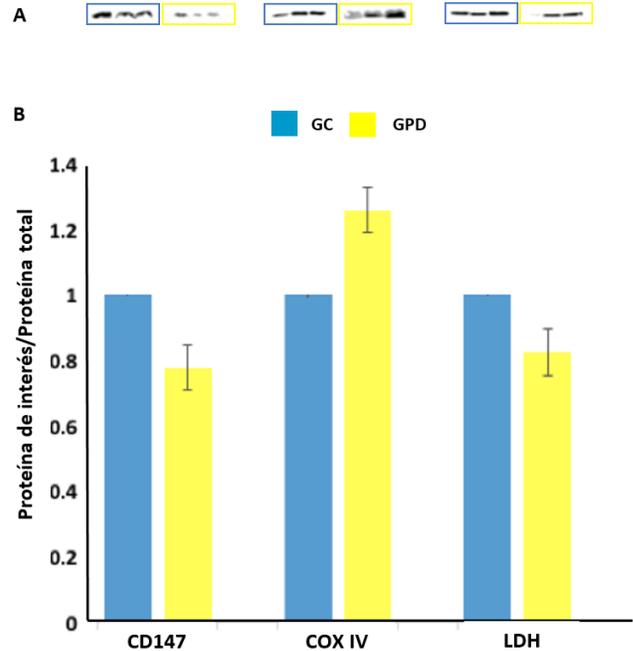


Figura 1. A. Western Blot representativo de CD147, COX y LDH respectivamente. B. Contenido de CD147, COX IV y LDH. Datos representados como media ± EE, n=9 para COX y LDH y n= 6 para CD147. GC, Grupo Control; GPD, Grupo Prediabetes.

El contenido de MCT1 fue significativamente menor en el GPD respecto al GC (0.79 ± 0.15 vs 1) (Figura 2).

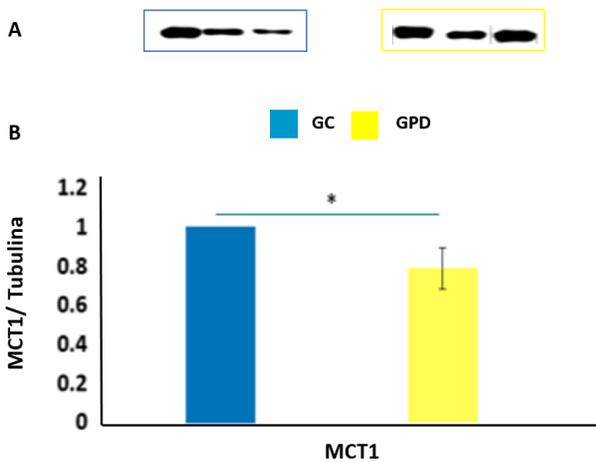


Figura 2. A. Western Blot representativo de MCT1. B. Contenido de MCT1. Datos representados como media \pm EE n=9, GC, Grupo Control; GPD, Grupo Prediabetes. * Diferencia significativa entre GC y GPD ($p < 0.05$), prueba T Student para grupos independientes.

Discusión

Las células metabólicamente activas dependen de altos índices en la eliminación de lactato y H^+ para mantener su pH y por lo tanto su flujo glucolítico; fisiopatológicamente en pacientes con diabetes y obesidad. La concentración de lactato en sangre aumenta y se correlaciona positivamente con la resistencia a la insulina (2,7,8). En este proyecto se determinó el contenido de los componentes del mLOC y uno de los hallazgos más sobresalientes es que el contenido de MCT1 en pacientes con prediabetes es menor ($p < 0.05$) en comparación con los sujetos control, lo cual es similar a los hallazgos de Juel y col. quienes en 2004 reportaron que el contenido de MCT1 en pacientes con DMT2 está disminuido en comparación con sujetos sanos (9).

Por otro lado, el contenido de COX se encuentra elevado en pacientes con prediabetes, sin embargo, estas diferencias no resultaron significativas, probablemente por la amplia

desviación estándar. El lactato induce la sobre expresión de genes como MCT1 y COX IV, incrementando la cantidad de estas proteínas (4); por lo que inferimos que en prediabetes hay mecanismos compensatorios para disminuir las concentraciones de lactato, pero al haber disfunción mitocondrial, estos mecanismos son alterados; además, el gen de COX IV y la expresión de su proteína podrían ser más sensibles que el gen MCT1 a los cambios de concentración de la lactohormona. También existe la posibilidad de que, aunque haya mayor contenido de COX IV en el GPD, ésta no tenga una función eficiente, aspecto que tendrá que investigarse.

En varios ensayos se determinó que el MCT1 está disminuido de manera significativa en pacientes con DMT2 (7, 14), y ahora por nuestros resultados, sabemos que también en prediabetes, lo que es congruente también con el menor contenido de CD147 encontrado, al considerar que CD147 es la proteína chaperona para MCT1 (4) y es necesaria para el funcionamiento de éste (4,15).

Conclusión

Los resultados de este proyecto muestran que desde etapas previas a DMT2 se presentan cambios en el contenido de los componentes del mLOC; proteínas como CD147, LDH y MCT1 están disminuidas, mientras que el contenido de COX IV es mayor en sujetos con prediabetes respecto a sujetos control, sin embargo, cabe mencionar que sólo MCT1 alcanzó diferencia estadísticamente significativa.

Agradecimientos

Agradecemos a la Universidad de Guanajuato, al Departamento de Ciencias Médicas y al programa anual de Veranos UG por brindarnos las posibilidades para poder realizar satisfactoriamente este proyecto.

Referencias

1. San-Millán I, Brooks GA. Assessment of metabolic flexibility by means of measuring blood lactate, fat, and carbohydrate oxidation responses to exercise in professional endurance athletes and less-fit individuals. *Sports Medicine*. 2018 Feb 1;48(2):467-79.
2. Ferguson, B. S., Rogatzki, M. J., Goodwin, M. L., Kane, D. A., Rightmire, Z., & Gladden, L. B. (2018). Lactate metabolism: historical context, prior misinterpretations, and current understanding. *European journal of applied physiology*, 118(4), 691-728.
3. Dubouchaud, H., Butterfield, G. E., Wolfel, E. E., Bergman, B. C., & Brooks, G. A. (2000). Endurance training, expression, and physiology of LDH, MCT1, and MCT4 in human skeletal muscle. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*, 278(4), E571-E579.
4. Opitz, D., Lenzen, E., Schiffer, T., Hermann, R., Hellmich, M., Bloch, W., ... & Brinkmann, C. (2014). Endurance training alters skeletal muscle MCT contents in T2DM men. *International journal of sports medicine*, 35(13), 1065-1071.
5. Hashimoto, T., & Brooks, G. A. (2008). Mitochondrial lactate oxidation complex and an adaptive role for lactate production. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, 40(3), 486-494.
6. Hashimoto T, Hussien R, Brooks GA. Colocalization of MCT1, CD147, and LDH in mitochondrial inner membrane of L6 muscle cells: evidence of a mitochondrial lactate oxidation complex. *Am J Physiology Endocrinol Metab* 290: E1237–E1244, 2006.
7. Petersen, K. F. (2003). Mitochondrial Dysfunction in the Elderly: Possible Role in Insulin Resistance. *Science*, 300(5622), 1140–1142. doi:10.1126/science.1082889
8. Española S, Clínica DB, Pérez MM, Segarra XN, Sáez PO, Oujo E, et al. Lactato : utilidad clínica y recomendaciones para su medición. *Soc Española Bioquímica Clínica y Patol Mol* [Internet]. 2010;3:33–7. Available from: <https://elenfermerodelpendiente.files.wordpress.com/2015/12/n-lactato-utilidad-clc3adnica-y-recomendaciones-para-su-medicic3b3n-2010.pdf>
9. Juel, C. , Holten, M. K. and Dela, F. (2004), Effects of strength training on muscle lactate release and MCT1 and MCT4 content in healthy and type 2 diabetic humans. *The Journal of Physiology*, 556: 297-304. doi:10.1113/jphysiol.2003.058222
10. Pre-Diabetes en Números - Federación Mexicana de Diabetes [Internet]. Federación Mexicana de Diabetes. 2019 [cited 17 June 2019]. Available from: <http://fmdiabetes.org/pre-diabetes-numeros>
11. Guasch-Ferré, M., Hruby, A., Toledo, E., Clish, C. B., Martínez-González, M. A., Salas-Salvadó, J., & Hu, F. B. (2016). Metabolomics in Prediabetes and Diabetes: A Systematic Review and Meta-analysis. *Diabetes Care*, 39(5), 833–846. doi:10.2337/dc15-2251
12. American Diabetes Association. STANDARDS OF MEDICAL CARE IN DIABETES — 2018. *Diabetes Care*. 2018;41(January):1–150.
13. Kruger, N. J. (2009). The Bradford method for protein quantitation. In *The protein protocols handbook* (pp. 17-24). Humana Press, Totowa, NJ.
14. Bonen A, McCullagh KJ, Putman CT, Hultman E, Jones NL, and Heigenhauser GJ. Short-term training increases human muscle MCT1 and femoral venous lactate in relation to muscle lactate. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 274: E102–E107, 1998.

15. Muramatsu, T. (2015). Basigin (CD147), a multifunctional transmembrane glycoprotein with various binding partners. *The Journal of Biochemistry*, 159(5), 481-490.