

LOS DESACOPLADORES DE LA FOSFORILACIÓN OXIDATIVA MITOCONDRIAL COMO ALTERNATIVA PROMETEDORA PARA EL TRATAMIENTO DE LA DIABETES.

Eilyn Herrera-Pérez¹, Javier Marín-Prida¹, Roberto Fernández Acosta², Gilberto L. Pardo-Andreu^{1*}

¹Centro de Estudios para las Investigaciones y Evaluaciones Biológicas, ² Departamento de Farmacia. Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de La Habana.

*email: gpardo@ifal.uh.cu

Resumen

La prevalencia de la diabetes Mellitus tipo 2 se incrementa a nivel mundial. Esta enfermedad se caracteriza por la combinación de la resistencia a la insulina y la incapacidad de la célula β del páncreas de mantener una adecuada secreción de insulina. La vía señalizadora dependiente de la AMPK se considera una de las claves terapéuticas para tratar la resistencia a la insulina y las enfermedades metabólicas asociadas. Un activador indirecto de esta vía es la metformina, reconocido fármaco antidiabético que actúa como un inhibidor del transporte mitocondrial de electrones y la síntesis de ATP. Esta forma de activar AMPK genera reacciones adversas tales como acidosis metabólica e intolerancia gastrointestinal. Alternativamente, la activación indirecta de la AMPK puede ser inducida por desacopladores de la fosforilación oxidativa, una forma de interferir con la síntesis de ATP sin inhibir la cadena de transporte electrónico. Los desacopladores presentan una serie de ventajas respecto a los inhibidores pues protegen contra la generación de radicales libres, y no están sujetos a las limitaciones estructurales de estos; solo dependen de las características ácidas y las propiedades fisicoquímicas propicias para la difusión a través de las membranas mitocondriales. Estos requerimientos químicos relativamente simples hacen que exista una amplia gama de compuestos naturales con potencialidades desacopladoras. Por otro lado, los inhibidores incrementan la generación de radicales libres y requieren arreglos estructurales específicos para inhibir el flujo de electrones a nivel de alguno de los componentes de la cadena de transporte electrónico mitocondrial. En este trabajo revisamos diferentes estudios que reflejan el potencial terapéutico de los desacopladores de la fosforilación oxidativa para el tratamiento de la DMT2 y que abren la posibilidad para el desarrollo de nuevos fármacos con mayor eficacia que la metformina.

Palabras clave: desacopladores de la fosforilación oxidativa, diabetes, metformina

Uncouplers of mitochondrial oxidative phosphorylation, promising alternatives for diabetes treatment

Abstract

The prevalence of type 2 diabetes mellitus (T2DM) is increasing worldwide. The disease is characterized by the combination of the insulin resistance and the inability of the β -cells from pancreas to sustain an appropriate secretion of insulin. The AMPK is considered a therapeutic key to treat the insulin resistance and the associated metabolic diseases. An indirect activator of this signaling pathway is the drug metformin, well-known antidiabetic drug that inhibits mitochondrial electron transport and ATP synthesis. This mode of AMPK activation can cause metabolic acidosis and gastrointestinal intolerance. Indirect activation of the AMPK-mediated cascade can also be induced by mitochondrial uncouplers of oxidative phosphorylation, which interfere with ATP homeostasis without inhibiting mitochondrial electron transport chain. Uncouplers present a series of advantages when comparing with inhibitors. They protect against the generation of free radicals and do not have the structural limitations of the latter, since their uncoupling properties depend mainly on their physicochemical properties and abilities to insert/cross mitochondrial membranes. These simple chemical requirements may justify the occurrence of plethora of natural compounds with uncoupling potentials. On the other side, the inhibitors may contribute to free radical generation and require specific structural arrangement to inhibit electrons flow at the mitochondrial electron transport chain components. Here we revised different studies documenting the therapeutic potential of uncouplers of oxidative phosphorylation for DMT2 treatment. We also discussed the possibility for the development of new uncoupler drugs more effective than metformin.

Keywords: uncouplers of oxidative phosphorylation, diabetes, metformin

Introducción

La diabetes mellitus es una epidemia a nivel mundial. La Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Federación Internacional de Diabetes (IDF) indican que el número de pacientes diabéticos en el mundo se sitúa entre 194 y 246 millones, y podría aumentar hasta 380 millones de individuos en 2025.^{1,2,3} Según las estadísticas nacionales, en Cuba, la diabetes se encuentra entre las diez primeras causas de muerte y más de medio millón de la población padece esta enfermedad.⁴ Aproximadamente el 95 % de la población diabética padece de diabetes mellitus tipo 2 (DMT2).⁵ La DMT2 se caracteriza por una deficiencia mitocondrial y la afectación del metabolismo de la glucosa y de los lípidos.^{6,7,8} Los estudios muestran que las alteraciones mitocondriales están estrechamente asociadas con el sedentarismo y composición de la dieta de los sujetos diabéticos. El ejercicio puede

revertir la deficiencia mitocondrial, mejorar el metabolismo y aumentar la sensibilidad a la insulina en los pacientes con DMT2.^{9,10,11}

Existen agentes terapéuticos para el tratamiento de la DMT2. La metformina es uno de los más empleados, por disminuir los niveles de glucosa en plasma y ser más potente que otros agentes orales disponibles en el mercado.¹² Sin embargo, además de una inadecuada eficacia, este medicamento provoca acidosis metabólica e intolerancia gastrointestinal.^{13,14,15} A la vez, hay una necesidad urgente de desarrollar nuevas modalidades para el tratamiento de la diabetes y disminuir la incidencia de esta epidemia mundial.

La inhibición transitoria de la transducción de la energía mitocondrial perturba la homeostasis energética en las células del músculo esquelético y el hígado. A la vez, la perturbación de la homeostasis energética puede producir efectos de relevancia para el control de la hiperglucemia a través de la activación de la proteína quinasa dependiente monofosfato de adenosina, conocida por sus siglas en inglés como AMPK. La AMPK se considera una clave terapéutica para tratar la resistencia a la insulina y las enfermedades metabólicas asociadas.^{16,17} Un activador indirecto de este complejo enzimático es la metformina, pues actúa como un inhibidor de la fosforilación oxidativa afectando la síntesis de ATP.¹⁸ Esta activación también puede ser inducida por desacopladores débiles de la fosforilación oxidativa, una forma menos radical de activar la vía y que al mismo tiempo incrementa el metabolismo mitocondrial.¹⁹ Por tanto, en esta revisión se discutirán las propiedades de los desacopladores mitocondriales como alternativa más eficaz que la metformina para el tratamiento de la DMT2.

Aspectos fisiopatológicos de la DMT2.

La DMT2 es el resultado de la interacción de factores genéticos y ambientales.²⁰ La susceptibilidad genética es una de las claves para el desarrollo de la resistencia a la insulina. Se ha descrito en niños y adolescentes con familiares diabéticos una disminución de la sensibilidad a la insulina, lo que confirma el papel de los factores genéticos en el desarrollo de la resistencia a la insulina.^{21,22,23} No obstante, la expresión de la DMT2 está determinada por factores ambientales, entre los que se puede señalar la obesidad, la inactividad física, los malos hábitos alimentarios (aumento de consumo de alimentos con alta densidad energética y la disminución del consumo de fibra dietética). Los factores antes señalados contribuyen a aumentar la resistencia a la insulina, elemento esencial en la patogenia de la DMT2.

La DMT2 se caracteriza por la combinación de la resistencia a la insulina y la incapacidad de la célula β del páncreas de mantener una adecuada secreción de insulina. La resistencia a la insulina se ha relacionado con la progresión de la glucemia normal a la intolerancia a la glucosa, y por último a la

DMT2.^{22, 23} El estado de resistencia a la insulina se caracteriza por disminuir la habilidad de la insulina para estimular la utilización periférica de la glucosa (músculo y tejido adiposo) y la supresión en la producción y liberación de la glucosa por el hígado.²²

La resistencia a la insulina es una anomalía primaria y precoz en la DMT2. En una primera etapa es compensada por el aumento de la secreción de insulina, pero con el transcurso del tiempo esta disminuye y se observa un déficit marcado en la primera fase de la secreción de insulina en respuesta al estímulo de la glucosa.²⁴ La hiperglucemia crónica afecta gradualmente la función de las células β y origina una mayor resistencia a la insulina e hiperglucemia. Las células β pierden su capacidad de compensación, lo que deriva en una reducción de las concentraciones de insulina, a pesar de la presencia de hiperglucemia. La incapacidad de las células β para seguir secretando insulina es el elemento que subyace a la transición entre la resistencia insulina y la DMT2.²⁵ Este proceso pudiera ser reversible, pues se ha observado que cuando se logra un buen control glucémico, mejora tanto la secreción de insulina como su sensibilidad.

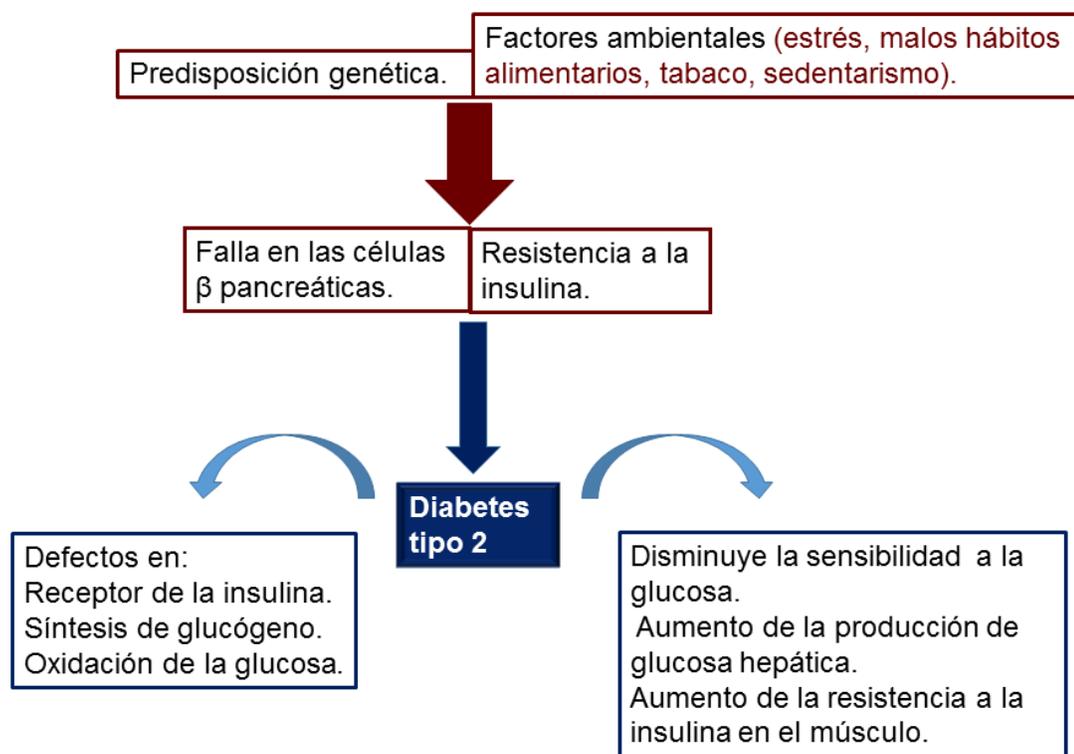


Figura 1. Fisiopatología de la DMT2

Acción de la metformina.

La metformina es un medicamento antidiabético que disminuye la hiperglucemia a través efectos similares a la insulina. A la vez, aumenta la sensibilidad de la misma en el tejido muscular y en el hígado.^{26,27,28} Estos efectos, pueden atribuirse a la activación de la AMPK.²⁹ La AMPK es un complejo que se activa con el incremento en la relación AMP/ATP, por lo que se considera un sensor de la energía celular que contribuye a regular el balance energético y la ingestacalórica.¹⁶ En respuesta a una perturbación de la homeostasis energética, se desencadenan mecanismos correctores agudos que incluyen la reducción del gasto de energía no esencial, y el aumento de la producción de energía a través de la estimulación de captación y oxidación del sustrato. Así como, a nivel de la expresión génica para la protección de efectos homeostáticos contra perturbaciones futuras, incluyendo el aumento de la capacidad de captación de sustrato y de la capacidad oxidativa.³⁰

La metformina no estimula directamente la AMPK. Interfiere en la homeostasis energética a través de la limitación de la fosforilación oxidativa mediante la inhibición del complejo I de la cadena de transporte de electrones, que afecta la síntesis de ATP.^{29,31,32} Cuando la tasa máxima de re-síntesis de ATP se hace insuficiente para satisfacer la demanda celular, entonces disminuye la concentración total de ATP, eliminándose de este modo la inhibición intrínseca que este ejerce sobre la activación de la AMPK. La activación indirecta de la AMPK de manera similar puede ser inducida por otros inhibidores del complejo I,^{33,34} así como por la inhibición de fosforilación oxidativa en varios sitios intermedios del complejo I.^{35,36,37} Sin embargo, la complicación principal asociada con este mecanismo es la acidosis metabólica, resultante de una mayor dependencia del metabolismo anaerobio.^{13,14,15}

Propiedades de los desacopladores de la fosforilación oxidativa

Alternativamente, la activación indirecta de la AMPK puede ser inducida por el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa.¹⁹ Teniendo en cuenta que el desacoplamiento mitocondrial parcial puede ser bien tolerado por las células de los mamíferos.^{38,39}

Conforme a la teoría quimiosmótica de la fosforilación oxidativa,⁴⁰ los complejos I, III y IV actúan como bombas de protones que crean un gradiente de protones (H^+) a través de la membrana interna mitocondrial. La fuerza motriz de protones generada, impulsa la síntesis de ATP conforme los protones fluyen de regreso hacia la matriz por medio de la enzima F_1F_0 ATP sintasa (Figura 2A). Los desacopladores colapsan el gradiente de protones al permitir el paso de los H^+ hacia la matriz sin transitar por la ATP sintasa. De esta forma se desacopla el flujo de electrones a través de los complejos respiratorios, de la síntesis de ATP (Figura 2B). Esta disminución en la eficiencia metabólica, reduce la capacidad de síntesis de ATP.

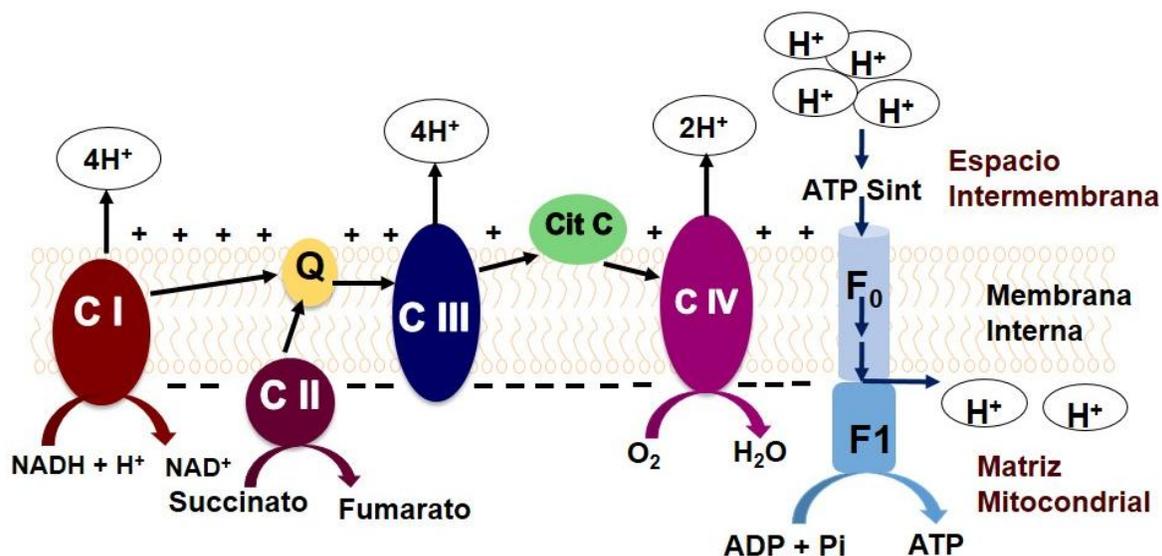


Figura 2A. Producción de ATP mediante el acoplamiento de la fosforilación oxidativa con la oxidación de sustratos.

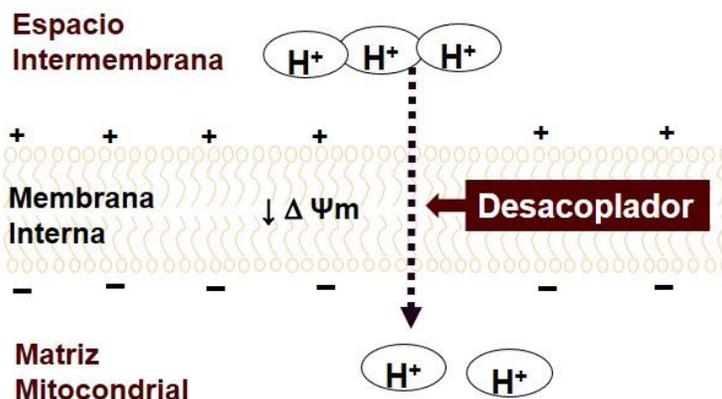


Figura 2B. Acción de los desacopladores de la fosforilación oxidativa

El desacoplamiento puede ser la hipótesis para perturbar la homeostasis energética, sin provocar el estrés metabólico que se manifiesta con la inhibición del transporte de electrones.³⁰ De hecho, cualquier incremento en la fuga de protones a través de la membrana mitocondrial interna se compensa con el aumento de flujo a través del transporte de electrones, a fin de proteger o compensar la fuerza motriz de protones. El incremento del flujo de electrones y todas las reacciones del ciclo de Krebs y anapleróticas que lo respaldan, no se traduce en un aumento de la re-síntesis de ATP, lo que representa un gasto neto de energía. Tal aumento en el consumo de ATP con una limitada capacidad de re-síntesis se puede esperar que resulte en un aumento de la producción de AMP, vía adenilato quinasa, y de esta forma se puede activar AMPK aun sin disminuciones marcadas en los niveles de ATP. Esta potencial distinción se puede explotar para minimizar el riesgo

de complicaciones metabólicas asociadas a la inhibición.³⁰ Esto puede ser de particular importancia en el músculo esquelético. Debido a que la capacidad máxima oxidativa en este tejido es mucho mayor que la necesaria para satisfacer la demanda energética basal, afectar la homeostasis energética (y por tanto mejorar la sensibilidad a la insulina vía activación de la vía AMPK) vía inhibición puede ser más difícil que en otros tipos de células.³⁰ La baja eficacia de la metformina en el músculo esquelético en relación con el hígado apoya esta noción.⁴¹ Los desacopladores podrían ser más efectivos en este tipo de tejido. Otra ventaja que presenta el desacoplamiento sobre la inhibición es que el aumento del flujo de electrones a través de la cadena de transporte estimulado por desacoplamiento, protege contra la generación de radicales libres asociada con bajo flujo y alto potencial de membrana mitocondrial^{42,43} una condición que, junto con la acumulación intracelular de lípidos,^{44,45} puede causar resistencia a la insulina.^{41,46} De hecho, el desacoplamiento es un importante mecanismo para controlar el estrés oxidativo, regulado fisiológicamente por un grupo de proteínas de desacopladoras (*uncoupling proteinns_UCPs*, en inglés).⁴⁷ Es casi una regularidad para algunas formas de inhibición del transporte de electrones, el incremento en la generación/acumulación de radicales libres.⁴⁸ Finalmente, mientras que un inhibidor debe interactuar directamente con un componente específico de la fosforilación oxidativa, los desacopladores, en su forma más simple, son pequeños compuestos lipofílicos que cíclicamente trasladan protones a través de la membrana interna mitocondrial, sin interactuar con las proteínas integrales de la membrana.⁴⁵⁻⁴⁹ Por lo tanto, mientras que la actividad inhibidora requiere una estructura tridimensional específica, la actividad de desacoplamiento no está sujeta a las limitaciones estructurales de tipo llave - cerradura. El desacoplamiento depende, en lugar de sólo una combinación apropiada, de las características ácidas y de las propiedades fisicoquímicas que favorezcan la difusión transmembrana.³⁰ Esto se traduce en un amplio espacio químico y una gran flexibilidad para el diseño de fármacos. La naturaleza puede avalar este razonamiento, al presentarnos una amplia gama de potenciales desacopladores versus un limitado número de inhibidores.

Estudios de desacopladores en el tratamiento de diabetes.

El desacoplador químico mitocondrial más conocido es 2,4-dinitrofenol (DNP). Fue un fármaco aprobado para el tratamiento de la obesidad en 1930.⁵⁰ Aumenta la tasa metabólica en los seres humanos, lo que lleva a la pérdida efectiva de grasa corporal. No obstante, el DNP tiene un índice terapéutico estrecho debido a la hipertermia en dosis altas, y fue retirado del mercado. El efecto potencial de DNP para el tratamiento de diabetes tipo 2 en los seres humanos no se investigó adecuadamente en el momento. Sin embargo, se ha demostrado que un derivado del DNP dirigido al hígado, promueve la oxidación de la grasa hepática, reduce la esteatosis en este órgano, y la resistencia a la insulina en ratas diabéticas alimentadas con una dieta alta en grasas; todo esto con

un incremento de 50 veces en el índice terapéutico en comparación con DNP.⁵¹ En otro estudio se evaluó la capacidad de once compuestos fenólicos, de origen natural con actividad desacopladora, para mejorar la captación de glucosa en células diferenciadas del músculo esquelético y la supresión de actividad de la glucosa-6-fosfatasa (G6Pasa) en hepatocitos. El efecto de la buteína 4'-hidroxichalcona en la captación basal de glucosa fue 6 veces mejor que la metformina. Además cuatro 4'-hidroxichalconoides suprimieron la actividad de G6Pasa en los hepatocitos, con mayor eficacia que la metformina.³⁰ Otra sustancia con un potencial anti-diabético es el fenetil éster del ácido cafeico (Caffeic acid phenethyl ester, CAPE por las siglas en inglés). Se ha demostrado que el CAPE estimula la captación de glucosa en células diferenciadas del músculo esquelético a través de la activación indirecta de la AMPK, debido a su actividad desacopladora.^{52,53} Celik y col. evaluaron la actividad hipoglucemiante y hepatoprotectora del CAPE en ratas con diabetes inducida por estreptozotocina (STZ). El CAPE aumentó el nivel de glucógeno hepático y duplicó el nivel de insulina en plasma. También disminuyó significativamente los niveles en sangre de glucosa, alanina aminotransferasa, colesterol, y triglicéridos en ayunas inducidos por la diabetes.⁵⁴ Por otra parte, el potencial terapéutico del CAPE es compensado por su alto potencial tóxico. En el año 2010, Eid y col. analizaron veinte compuestos activos de origen natural derivados del ácido cafeico, para evaluar su relación de actividad-toxicidad, y dilucidar su relación estructura-actividad. Además del CAPE, cuatro de ellos mostraron una fuerte actividad desacopladora en mitocondrias aisladas de hígado de rata y estimularon la captación de glucosa en células musculares C2C12. Se reportó que para lograr dicha actividad se requiere que la estructura del ácido cafeico permanezca intacta y que el compuesto no contenga un grupo fuertemente ionizado. Además se encontró que la actividad y la toxicidad estaban bien correlacionadas con la lipofilia predicha. Sin embargo, dos compuestos exhibieron poca toxicidad, mientras la estimulación de la captación de glucosa fue de 65-72%.⁵³

Niclosamida es un medicamento antihelmíntico aprobado por la FDA,⁵⁵ que desacopla las mitocondrias de gusanos parásitos,^{56,57} con un excelente perfil de seguridad, y poca toxicidad para los seres humanos.^{58,59} Un estudio reciente demostró que la niclosamida etanolamina (NEN), una forma de sal de la niclosamida, desacopla las mitocondrias de mamíferos con una potencia moderada. La NEN, aumenta el gasto energético y la oxidación de lípidos, y mejora dramáticamente la esteatosis hepática. Es eficaz en la prevención y el tratamiento de síntomas de la diabetes desarrollados en los ratones obesos inducidos por una dieta alta en grasas. También es eficiente en el tratamiento de la hiperglucemia en los ratones db / db, ralentiza la progresión de la enfermedad, y reduce los niveles de HbA1C glicosilada en más de 20%. Por otra parte, la NEN no eleva la temperatura corporal. Tampoco presenta riesgos de acidosis metabólica, ya que reduce los niveles de lactato en plasma en ratones tratados con NEN.⁶⁰

Nuestro grupo ha descubierto un grupo de moléculas presentes en el propóleo marrón cubano con potentes propiedades desacopladoras. La nemorosona, la clusianona y el propio propóleo desacoplan por mecanismos protonofóricos^{61,62,63}, mientras que la gutiferona-A lo hace mediante una permeabilización directa de las membranas del organelo⁶⁴. En estos momentos centramos nuestra atención en la nemorosona por su potencia desacopladora (actúa en un rango de concentración nanomolar), es el componente mayoritario del propóleo marrón (tipo de propóleo más abundante en Cuba) y su relativa facilidad de obtención. Estudios aun sin publicar han mostrado una efectividad desacopladora en músculo, superior al DNP a dosis de 1 mg/kg de peso (vía ip., administrado durante 15 días), un incremento en el gasto metabólico (VO_2/VCO_2) y una reducción marcada del peso corporal en ratones obesos. Todos son indicios de potenciales efectos metabólicos beneficiosos, incluido el posible efecto sensibilizador a la insulina, que en la actualidad intentamos demostrar. Estos resultados preclínicos reflejan el potencial terapéutico que presentan los desacopladores de la fosforilación oxidativa para el tratamiento de la DMT2 y otras enfermedades metabólicas. Sin embargo, el éxito de los desacopladores queda aún por demostrarse en las fases clínicas. Considerar a la mitocondria como un importante blanco farmacológico para combatir la diabetes le abre las puertas a todos aquellos compuestos mito-activos y en particular a los desacopladores de origen natural para su escrutinio científico como moduladores del metabolismo energético y potenciales agentes anti-diabéticos.

Referencias bibliográficas

-
- ¹OMS. Diabetes mellitus. Hoja de datos N° 138, Abril 2002. Diabetes: El coste de la diabetes. Hoja de datos N° 236, Sept. 2002. www.who.int/mediacentre/factsheets.
 - ²Diabetes Atlas. Quinta Edición, Federación Internacional de Diabetes, 2011.
 - ³Wild S, Roglic G, Freen A, Sicree R, King H. Predominio global de la diabetes. *Diabetes Care* 2004; 27:1047–1053.
 - ⁴Anuario de estadístico de salud República de Cuba, MINSAP, La Habana, 2015.
 - ⁵Berends LM, Ozanne SE. Early determinants of type-2 diabetes. *Best Practice and Research in Clinical Endocrinology and Metabolism* 2012; 26:569–580.
 - ⁶Cheng Z, Ristow M. Mitochondria and metabolic homeostasis. *Antioxidant & Redox Signaling* 2013; 19: 240–242.
 - ⁷Szendroedi J, Phielix E, Roden M. The role of mitochondria in insulin resistance and type 2 diabetes mellitus. *Nature Reviews Endocrinology* 2012; 8: 92–103.
 - ⁸Patti ME, Corvera S. The role of mitochondria in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Endocrine Reviews* 2010; 31: 364–395.

-
- ⁹van Tienen FH, Praet SF, de Feyter HM, van den Broek NM, Lindsey PJ, Schoonderwoerd KG, de Coo IF, Nicolay K, Prompers JJ, Smeets HJ, van Loon LJ. . Physical activity is the key determinant of skeletal muscle mitochondrial function in type 2 diabetes. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2012; 97: 3261–3269.
- ¹⁰Meex RC, Schrauwen-Hinderling VB, Moonen-Kornips E, Schaart G, Mensink M, Pielix E, van de Weijer T, Sels JP, Schrauwen P, Hesselink MK. Restoration of muscle mitochondrial function and metabolic flexibility in type 2 diabetes by exercise training is paralleled by increased myocellular fat storage and improved insulin sensitivity. *Diabetes* 2010; 59: 572–579.
- ¹¹ Muoio DM, Neufer PD. Lipid-induced mitochondrial stress and insulin action in muscle. *Cell Metabolism* 2012; 15: 595–605.
- ¹²DeFronzo RA, Goodman AM. Efficacy of metformin in patients with non-insulin dependent diabetes mellitus. The Multicenter Metformin Study Group. *New England Journal of Medicine* 1995; 333: 541–549.
- ¹³Nathan DM, Buse JB, Davidson MB, Ferrannini E, Holman RR, Sherwin R, Zinman B. Medical management of hyperglycemia in type 2 diabetes: a consensus algorithm for the initiation and adjustment of therapy: a consensus statement of the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetes Care* 2009; 32:193–203.
- ¹⁴ Lalau JD, Race JM. Metformin and lactic acidosis in diabetic humans. *Diabetes, Obesity and Metabolism* 2000; 2:131–137.
- ¹⁵ Lalau JD, Race JM. Lactic acidosis in metformin therapy: searching for a link with metformin in reports of metformin-associated lactic acidosis. *Diabetes, Obesity and Metabolism* 2001; 3:195-201.
- ¹⁶ Misra P. AMP activated protein kinase: a next generation target for total metabolic control. *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 2008; 12: 91–100.
- ¹⁷ Viollet B, Lantier L, Devin-Leclerc J, Hebrard S, Amouyal C, Mounier R, Foretz M, Andreelli F. Targeting the AMPK pathway for the treatment of Type 2 diabetes. *Frontiers in Bioscience* 2009; 14: 3380–3400.
- ¹⁸ Suwa M, Egashira T, Nakano H, Sasaki H, Kumagai S. Metformin increases the PGC-1alpha protein and oxidative enzyme activities possibly via AMPK phosphorylation in skeletal muscle in vivo. *Journal of Applied Physiology* 2006; 101: 1685–1692.
- ¹⁹ Hayashi T, Hirshman MF, Fujii N, Habinowski SA, Witters LA, Goodyear LJ. Metabolic stress and altered glucose transport: activation of AMP-activated protein kinase as a unifying coupling mechanism. *Diabetes* 2000; 49: 527–531.

-
- ²⁰ Malacara JM. El Enigma de las Causas de la Diabetes Mellitus Tipo 2. *Acta Universitaria* 2003; 13(1):5–17.
- ²¹ Arslanian SA. Type 2 diabetes mellitus in children: pathophysiology and risk factors. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism* 2000; 13 (6):1385–1394.
- ²² Sinha R, Fisch G, Teague B. Prevalence of impaired glucose tolerance among children and adolescents with marked obesity. *New England Journal of Medicine* 2002; 34:254–262.
- ²³ Liu I, Hironata K, Pihoker C. Type 2 diabetes in youth. *Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care* 2004; 34: 254–272.
- ²⁴ Porto D. Jr. Banting Lecture 1990: β cells in type II diabetes mellitus. *Diabetes* 1991; 40:166-80.
- ²⁵ Islam-Zwart K, Cawston A. Investigation of factors contributing to diabetes risk in American Indian/Alaska native youth. *American Indian and Alaska Native Mental Health Research* 2008; 14: 45–58.
- ²⁶ Wollen N, Bailey CJ. Metformin potentiates the antigluconeogenic action of insulin. *Diabetes and Metabolism* 1988;14: 88–91.
- ²⁷ De Fronzo RA, Barzilai N, Simonson DC. Mechanism of metformin action in obese and lean noninsulin-dependent diabetic subjects. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1991; 73: 1294–1301.
- ²⁸ Johnson AB, Webster JM, Sum CF, Heseltine L, Argyraki M, Cooper BG, Taylor R. The impact of metformin therapy on hepatic glucose production and skeletal muscle glycogen synthase activity in overweight type II diabetic patients. *Metabolism* 1993; 42:1217–22.
- ²⁹ Hardie DG. AMPK: a key regulator of energy balance in the single cell and the whole organism. *International Journal of Obesity* 2008; 32: (Suppl. 4) S7–S12.
- ³⁰ Martineau LC. Large enhancement of skeletal muscle cell glucose uptake and suppression of hepatocyte glucose-6-phosphatase activity by weak uncouplers of oxidative phosphorylation. *Biochimica et Biophysica Acta* 2012;1820: 133–150.
- ³¹ El-Mir MY, Nogueira V, Fontaine E, Averet N, Rigoulet M, Leverve X. Dimethylbiguanide inhibits cell respiration via an indirect effect targeted on the respiratory chain complex I. *Journal of Biological Chemistry* 2000; 275: 223–228.
- ³² Owen MR, Doran E, Halestrap AP. Evidence that metformin exerts its antidiabetic effects through inhibition of complex I of the mitochondrial respiratory chain. *Biochemical Journal* 2000; 348 (3): 607–14.
- ³³ Hayashi T, Hirshman MF, Fujii N, Habinowski SA, Witters LA, Goodyear LJ. Metabolic stress and altered glucose transport: activation of AMP-activated protein kinase as a unifying coupling mechanism. *Diabetes* 2000; 49: 527–531.

- ³⁴ Turner N, Li JY, Gosby A, To SW, Cheng Z, Miyoshi H, Taketo MM, Cooney GJ, Kraegen EW, James DE, Hu LH, Li J, Ye JM. Berberine and its more biologically available derivative, dihydroberberine, inhibit mitochondrial respiratory complex I: a mechanism for the action of berberine to activate AMP-activated protein kinase and improve insulin action. *Diabetes* 2008; 57:1414–1418.
- ³⁵ Jing M, Ismail-Beigi F. Critical role of 5'-AMP-activated protein kinase in the stimulation of glucose transport in response to inhibition of oxidative phosphorylation. *American Journal of Physiology* 2007; 292:C477–C487.
- ³⁶ Park CE, Kim MJ, Lee JH, Min BI, Bae H, Choe W, Kim SS, Ha J. Resveratrol stimulates glucose transport in C2C12 myotubes by activating AMP-activated protein kinase. *Experimental and Molecular Medicine* 2007; 39: 222–229.
- ³⁷ Eid HM, Martineau LC, Saleem A, Muhammad A, Vallerand D, Benhaddou- Andaloussi A, Baldea L, Afshar A, Arnason JT, Haddad PS. Stimulation of AMPK and enhancement of basal glucose uptake in muscle cells by quercetin and quercetin glycosides, active principles of the antidiabetic medicinal plant *Vaccinium vitis-idaea*. *Molecular Nutrition and Food Research* 2010; 54: 991–1003.
- ³⁸ Amara CE, Shankland EG, Jubrias SA, Marcinek DJ, Kushmerick MJ, Conley KE. Mild mitochondrial uncoupling impacts cellular aging in human muscles in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007; 104:1057–1062.
- ³⁹ Maragos WF, Korde AS. Mitochondrial uncoupling as a potential therapeutic target in acute central nervous system injury. *Journal of Neurochemistry* 2004; 91:257–262.
- ⁴⁰ Nicholls DG. Bioenergetics. An Introduction to the Chemiosmotic Theory. Academic Press, London, 1982.
- ⁴¹ Radziuk J, Bailey CJ, Wiernsperger NF, Yudkin JS. Metformin and its liver targets in the treatment of type 2 diabetes. *Current Drug Targets* 2003; 3:151–169.
- ⁴² Jezek P, Hlavata L. Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in cell, tissues, and organism. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 2005; 37: 2478–2503.
- ⁴³ Nakamura S, Takamura T, Matsuzawa-Nagata N, Takayama H, Misu H, Noda H, Nabemoto S, Kurita S, Ota T, Ando H, Miyamoto K, Kaneko S. Palmitate induces insulin resistance in H4IIEC3 hepatocytes through reactive oxygen species produced by mitochondria. *Journal of Biological Chemistry* 2009; 284: 14809–14818.
- ⁴⁴ Petersen KF, Shulman GI. Etiology of insulin resistance. *American Journal of Medicine* 2006; 119:10–16.
- ⁴⁵ Timmers S, Schrauwen P, de Vogel J. Muscular diacylglycerol metabolism and insulin resistance. *Physiology and Behavior* 2008; 94: 242–251.

- ⁴⁶ Anderson EJ, Lustig ME, Boyle KE, Woodlief TL, Kane DA, Lin CT, Price IIIJW, Kang L, Rabinovitch PS, Szeto HH, Houmard JA, Cortright RN, Wasserman DH, Neuffer PD. Mitochondrial H₂O₂ emission and cellular redox state link excess fat intake to insulin resistance in both rodents and humans. *Journal of Clinical Investigation* 2009; 119 (3): 573–581.
- ⁴⁷ Skulachev VP. Uncoupling: new approaches to an old problem of bioenergetics. *Biochimica et Biophysica Acta* 1998; 1363:100–124.
- ⁴⁸ Wallace KB, Starkov AA. Mitochondrial targets of drug toxicity. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 2000; 40:353–388.
- ⁴⁹ Terada H. Uncouplers of oxidative phosphorylation. *Environmental Health Perspectives* 1990; 87: 213-218.
- ⁵⁰ Parascandola J. Dinitrophenol and bioenergetics: an historical perspective. *Molecular and cellular biochemistry* 1974; 5:69–77.
- ⁵¹ Perry RJ, Kim T, Zhang XM, Lee HY, Pesta D, Popov VB, Zhang D, Rahimi Y, Jurczak MJ, Cline GW, Spiegel DA, Shulman GI. Reversal of hypertriglyceridemia, fatty liver disease, and insulin resistance by a liver-targeted mitochondrial uncoupler. *Cell Metabolism* 2013; 18:740–748.
- ⁵² Lee ES, Uhm KO, Lee YM, Han M, Lee M, Park JM, Suh PG, Park SH, Kim HS. . CAPE (caffeic acid phenethyl ester) stimulates glucose uptake through AMPK (AMP-activated protein kinase) activation in skeletal muscle cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2007; 361(4): 854–58.
- ⁵³ Eid HM, Vallerand D, Muhammad A, Durst T, Haddad PS, Martineau LC. Structural constraints and the importance of lipophilicity for the mitochondrial uncoupling activity of naturally occurring caffeic acid esters with potential for the treatment of insulin resistance. *Biochemical Pharmacology* 2010;79(3):444–454.
- ⁵⁴ Celika S, Erdoganb S, Tuzcuc M. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) exhibits significant potential as an antidiabetic and liver-protective agent in streptozotocin-induced diabetic rats. *Pharmacological Research* 2009; 60(4): 270–276.
- ⁵⁵ Frayha GJ, Smyth JD, Gobert JG, Savel J. The mechanisms of action of antiprotozoal and anthelmintic drugs in man. *General Pharmacology* 1997; 28: 273–299.
- ⁵⁶ Sheth UK. Mechanisms of anthelmintic action. *Progress in Drug Research* 1975; 19: 147–157.
- ⁵⁷ Weinbach EC, Garbus J. Mechanism of action of reagents that uncouple oxidative phosphorylation. *Nature* 1969; 221:1016–1018.
- ⁵⁸ Andrews P, Thyssen J, Lorke D. The Biology and Toxicology of Molluscicides, Bayluscide. *Pharmacology and Therapeutics* 1983; 19: 245–295.
- ⁵⁹ Hecht G, Gloxhuber C. Tolerance to 2', 5-dichloro-4-nitrosalicylanilide ethanolamine salt. *Zeitschrift für Tropenmedizin und Parasitologie* 1962; 13: 1–8.

⁶⁰Tao H, Zhang Y, Zeng X, Shulman G I, Jin S. Niclosamide ethanolamine improves blood glycaemic control and reduces hepatic steatosis in mice. *Nature medicine* 2014; 20(11): 1263–1269.

⁶¹Pardo-Andreu GL, Nuñez-Figueroa Y, Tudella VG, Cuesta-Rubio O, Rodrigues FP, Pestana CR, Uyemura SA, Leopoldino AM, Alberici LC, Curti C. The anti-cancer agent nemorosone is a new potent protonophoric mitochondrial uncoupler. *Mitochondrion* 2011; 11(2): 255–263.

⁶²Reis FH, Pardo-Andreu GL, Nuñez-Figueroa Y, Cuesta-Rubio O, Marín-Prida J, Uyemura SA, Curti C, Alberici LC. Clusianone, a naturally occurring nemorosone regioisomer, uncouples rat liver mitochondria and induces HepG2 cell death. *Chemico Biological Interactions* 2014; 212: 20–29.

⁶³Pardo-Andreu GL, Reis FH, Dalalio FM, Nuñez-Figueroa Y, Cuesta-Rubio O, Uyemura SA, Curti C, Alberici LC. The cytotoxic effects of brown Cuban propolis depend on the nemorosone content and may be mediated by mitochondrial uncoupling. *Chemico Biological Interactions* 2015; 228: 28–34.

⁶⁴Pardo-Andreu GL, Nuñez-Figueroa Y, Tudella VG, Cuesta-Rubio O, Rodrigues FP, Pestana CR, Uyemura SA, Leopoldino AM, Alberici LC, Curti C. The anti-cancer agent guttiferone-A permeabilizes mitochondrial membrane: ensuing energetic and oxidative stress implications. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2011; 253(3): 282–289.