

100
2 ej^o



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

PARTICIPACION DEL COMPLEJO
CALCIO-CALMODULINA EN EL INCREMENTO DEL
CONSUMO DE GLUCOSA PRODUCIDO POR INSULINA
EN CORAZON DE RATA ADULTA.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A :

RAUL HUERTO SOLIS

DIR. DRA. VERÓNICA GUARNER LANS.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
P r e s e n t e

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:
Participación del complejo Calcio-Calmodulina en el incremento del consumo
de glucosa producido por insulina en corazón de rata adulta.

realizado por Raúl Huerto Solís

con número de cuenta 8030923-7 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario Dra. Verónica Gurrner Lans.

Propietario Biol. Julio Alejandro Prieto Sagredo.

Propietario Dr. Ignacio Camacho Arroyo.

Suplente Dra. Ma. Teresa Benítez Rodríguez.

Suplente Dra. Ma. Luisa Fanjul Moles.

Consejo Departamental de Biología

M. en C. Alejandro Martínez Mena.

Este trabajo fue realizado en el departamento de Fisiología del Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez", bajo la dirección de la Dra. Verónica Garner.

Con todo cariño a mí padre

A mi Mamá, quién me ha apoyado constantemente. por su cariño y amor y me ha enseñado a ser perseverante y organizado.

A mi hermana Angélica. por su bondad y gran amor a la familia.

A mis niños Claudia Pamela, José Pablo, Eduardo Alfredo y Angel Ricardo.
Por su cariño e increíbles sonrisas.

A los amigos por su amistad, constantes **críticas** y su honestidad.

Fernando Arroyo, Eduardo Cumming, Eduardo Esponda, Ricardo Gamboa, Angélica Guerrero, Luis Angel Gomez, Claudina Gomez y al pequeño Emilio, Efraín Hernandez, Sara Mendez, Lina Riego, Claudia Saavedra, José Vivas.

Agradezco a los sinodales sus observaciones y críticas a este trabajo.

Biol. Julio Alejandro Prieto Sagredo.

Dr. Ignacio Camacho Arroyo.

Dra. Ma. Teresa Benítez Rodríguez.

Dra. Ma. Luisa Fanjul Moles.

INDICE

Resumen	1
Introducción	2
Antecedentes	
Aspectos generales del metabolismo cardíaco.	4
Transporte de glucosa.	7
Propiedades de los transportadores de glucosa	9
Factores que regulan el transporte de glucosa	11
Acción de la insulina.	14
Relación Ca^{++} intracelular y el transporte de glucosa.	19
Efecto de la trifluoperazina sobre el consumo de glucosa producido por insulina.	22
Hipótesis y Objetivos.	25
Materiales y Métodos.	26
Resultados.	29
Efecto de la insulina sobre el consumo de glucosa.	31
Efecto de la trifluoperazina sobre el consumo de glucosa.	32
Efecto de distintas concentraciones de insulina y trifluoperazina sobre el consumo de glucosa.	33
Discusión.	35
Conclusión.	40
Referencias.	41

RESUMEN

La glucosa es un importante nutriente en el metabolismo celular, y antes de que esta pueda ser utilizada por las células debe transportarse a través de la membrana celular hacia el citoplasma por un proceso de difusión facilitada. El paso de la glucosa al interior celular no depende exclusivamente del gradiente de concentración, sino también de la misma actividad metabólica y funcional de la célula, de la disponibilidad del sustrato y de la proteína acarreadora. La molécula encargada de este último proceso, ha sido caracterizada como el transportador GLUT4 en los músculos esquelético y cardíaco. Se sabe que los transportadores GLUT4 se encuentran almacenados dentro de vesículas intracelulares y que su número se incrementa cuando por exocitosis se exponen en la superficie celular como consecuencia del efecto de la insulina. El calcio modula muchas actividades intracelulares a través de su unión a la calmodulina, la cual estimula los mecanismos del transporte de vesículas intracelulares. Por lo que en el presente trabajo se estudió, la inhibición del mecanismo de formación del complejo Ca^{++} -calmodulina para valorar su participación en el mecanismo de exocitosis de las vesículas intracelulares que contienen las moléculas transportadoras de la glucosa GLUT4 en el miocardio, inducido por la insulina.

Se utilizaron ratas macho adultas de la cepa Wistar a las que se diseccionó el corazón que fue perfundido por el sistema de Langendorff. Se midió el consumo de glucosa a los 15 y 30 min. de perfusión con solución Tyrode, sol. Tyrode e insulina (50, 100, 250, 500 y 1000 mU/ml) y sol. Tyrode, insulina y trifluoperazina (inhibidor de la calmodulina). Se observó que la insulina incrementa el consumo de glucosa por el músculo cardíaco hasta en un 100% con respecto al valor control y que la trifluoperazina inhibe este efecto. Se propone que el complejo Ca^{++} -calmodulina interviene en el proceso de exocitosis de las vesículas intracelulares que contienen a los transportadores GLUT4 y por lo tanto en la regulación de la difusión facilitada de la glucosa en el miocardio, ya que cuando se inhibió su formación se observó una disminución en la incorporación de la glucosa.

INTRODUCCION

La glucosa es una molécula hidrofílica que atraviesa con dificultad las membranas lipídicas, por lo tanto requiere de vías de entrada específicas, tal como el proceso de difusión facilitada (Lienhard y cols., 1992). Existe una gran diversidad de moléculas transportadoras de glucosa que regulan este transporte. Las moléculas acarreadoras se han agrupado en una familia conocida como GLUTs, cuyos miembros en general son semejantes en estructura y función. Se conocen por lo menos cinco miembros de esta familia. La molécula encargada de este proceso de difusión facilitada en el músculo esquelético, en células adiposas y en el músculo cardíaco ha sido caracterizado como el transportador GLUT1 (Pessin y Bell, 1992).

La difusión facilitada en células musculares no depende exclusivamente de la diferencia del gradiente de concentración entre el espacio intracelular y el extracelular, sino también de factores como la actividad metabólica y funcional de la célula, cambios en la disponibilidad de sustratos, hormonas como la insulina y además el ejercicio, los cuales actúan como señales de retroalimentación para ajustar la tasa del transporte de la glucosa (Elbrink y Bilder, 1975).

Se ha descrito que la insulina incrementa el transporte de glucosa debido a un fenómeno de reclutamiento de moléculas transportadoras de glucosa las cuales se encuentran almacenadas dentro de vesículas intracelulares y que su número se incrementa por exocitosis hacia la superficie celular como consecuencia del efecto de la insulina. Cuando la insulina se une al receptor en la membrana celular, se dispara una cascada de eventos moleculares de los cuales se conocen solamente algunos, dando como consecuencia una redistribución de los transportadores de la glucosa en la membrana celular (Suzuki y Kono, 1980; Wardzala y Jeanrenaud, 1981).

El calcio modula muchas actividades intracelulares a través de su unión a la calmodulina, estimulando diversas enzimas y proteínas que intervienen en el metabolismo de los carbohidratos, en la contracción muscular y en los mecanismos del transporte de membranas intracelulares (Cheung, 1980). Es por esto, que se relacionó al complejo calcio-calmodulina el cual podría tener un papel importante en la regulación del número de

transportadores de la glucosa en la membrana plasmática a través de un mecanismo similar a la exocitosis.

Como ha sido previamente informado, la trifluoperazina un bloqueador de la calmodulina intracelular, inhibe el incremento en el consumo de glucosa producido por la insulina en adipocitos (Schechter, 1984) y en el músculo esquelético de la rata (Guarner y cols., 1993).

Por lo tanto, en el presente trabajo se estudió la participación del complejo calmodulina en el mecanismo de exocitosis de vesículas intracelulares conteniendo las moléculas transportadoras de la glucosa, GLUT4 en el miocardio y que es inducido por la insulina.

Aspectos generales del metabolismo cardíaco

El corazón es un órgano que trabaja constantemente y por lo tanto su consumo de energía es elevado (Neely y cols., 1972). Dado que el ventrículo izquierdo debe desarrollar continuamente una alta actividad consume una gran cantidad de energía, cerca de un 7% del consumo de oxígeno corporal, a pesar de que constituye sólo alrededor del 0.3% del peso corporal total en el ser humano (West, 1993).

Existen importantes diferencias entre el metabolismo del músculo cardíaco y el esquelético: las células del músculo cardíaco son sumamente ricas en mitocondrias, las cuales ocupan por lo menos el 40% de su espacio citoplásmico, mientras que la mayoría de los músculos esqueléticos contienen relativamente pocas mitocondrias. Por otra parte, el músculo cardíaco puede utilizar más sustratos que el músculo esquelético el cual depende de manera predominante de la glucosa. En condiciones normales, la producción de energía en el músculo cardíaco ocurre totalmente por medios aerobios y el músculo esquelético puede utilizar con facilidad la vía anaerobia.

En el miocardio se utilizan de preferencia los ácidos grasos respecto a la glucosa cuando estos están disponibles, pero también pueden ser metabolizados el lactato, el piruvato, los cuerpos cetónicos y los aminoácidos (Bing, 1965). Durante una sobrecarga del trabajo cardíaco, la glucólisis se convierte en una fuente más importante de producción de fosfatos de alta energía a través de la glucólisis aerobia; si bien sólo se produce glucólisis anaerobia, en el músculo cardíaco durante la isquemia (Opie, 1976; Kobayashi y Neely, 1979).

Los requerimientos metabólicos del corazón son bastantes similares entre las diferentes especies de mamíferos, los principales sustratos usados por el corazón son los ácidos grasos libres que son responsables de más de la mitad del consumo de oxígeno (Bing, 1965).

Los triacilglicéridos circulantes en el plasma son hidrolizados a ácidos grasos libres en las membranas capilares y celulares por lipoproteínlipasas, que están localizadas en el endotelio capilar y la posterior captación de ácidos grasos por parte de las células

miocárdicas depende de su concentración plasmática. También hay cierto almacenamiento intracelular de triacilglicéridos, y estos pueden ser movilizados para formar ácidos grasos libres cuando falta la glucosa o los ácidos grasos libres exógenos. Las mitocondrias utilizan directamente ácidos grasos de cadena corta, mientras que los ácidos grasos de cadena más larga, como el palmitato emplean el sistema de transporte de carnitina para ingresar en la matriz mitocondrial donde la beta oxidación permite disponer de acetil-CoA para la oxidación en el ciclo de Krebs, con la producción final de fosfatos de alta energía en la cadena respiratoria. La oxidación de ácidos grasos libres es controlada por la tasa de eliminación de acetil-CoA en el ciclo del ácido cítrico y una relación NADH/NAD alta inhibe la beta oxidación (Neely y Morgan, 1974).

En cuanto al metabolismo de carbohidratos por el corazón se conoce que el transporte de glucosa a través de las membranas miocárdicas se realiza por difusión facilitada y es regulado por una variedad de factores: tales como la disponibilidad del sustrato, el glucógeno y los ácidos grasos, además de hormonas como la insulina. Un incremento en el trabajo cardíaco da como resultado un mayor transporte de glucosa hacia las células, mientras que la oxidación de ácidos grasos libres inhibe su movilización hacia las células (Neely y cols., 1976).

Dentro de la célula miocárdica, la glucosa puede ser almacenada como glucógeno o ingresar en la vía glucolítica aerobia, que aporta aproximadamente el 30% de fosfatos de alta energía mediante la producción oxidativa de la acetil-CoA producida a partir de piruvato por la acción de la piruvato deshidrogenasa que ingresa en las mitocondrias (Tripp, 1989).

Cuando el músculo cardíaco es totalmente privado de O_2 por una obstrucción coronaria, los depósitos de glucógeno se depletan con rapidez y existe una producción insuficiente de ATP por glucólisis por lo que no se pueden mantener las concentraciones normales de ATP (West, 1993).

Cualquiera que sea la fuente de energía que utilizan las células cardíacas, son las arterias coronarias las que proveen los sustratos metabólicos.

Debido a la actividad propulsora del corazón basada en la sucesión rítmica de relajamiento (diástole) y contracción (sístole) de los ventrículos, la sístole ventricular provoca una disminución en el diámetro de los vasos coronarios provocada por la compresión de las fibras miocárdicas. Durante el ciclo cardíaco existe una relación de flujo distinto para cada coronaria. La coronaria derecha tiene su máximo flujo durante la sístole, debido a la menor tensión a la que está sometida esta pared y siendo por lo tanto, el calibre de los vasos poco afectado. La izquierda, en contraste, alcanza un flujo máximo durante la diástole, cuando la pared ventricular izquierda se encuentra relajada.

Se ha postulado que el flujo sanguíneo coronario depende del estado metabólico del corazón. Actualmente se ha podido demostrar que a mayor trabajo cardíaco, mayor flujo coronario y viceversa. Se ha propuesto a varios metabolitos como eslabones entre el trabajo cardíaco y el flujo coronario. Uno de los que se ha mencionado es el oxígeno (Rubio y Berne, 1969); cuanto mayor es el consumo de oxígeno, mayor es el flujo coronario. Diversas situaciones aumentan el consumo de oxígeno como son el aumento de la contractilidad, del trabajo, los cuales producen cambios paralelos en el flujo coronario.

La adenosina es un potente vasodilatador, el cual juega un papel importante en la regulación del flujo sanguíneo coronario, en respuesta a la demanda de oxígeno del miocardio. La adenosina se forma por la desfosforilación del AMP y difunde libremente hacia afuera de la célula, lo cual permite que alcance fácilmente los capilares coronarios. El efecto que este agente produce sobre el músculo liso vascular es la dilatación de las arterias coronarias aumentando así el flujo coronario y por lo tanto el aporte de oxígeno. La adenosina es liberada lentamente del miocardio normóxico y su liberación se incrementa de 4 a 5 veces en condiciones de hipoxia (Schrader y cols., 1977). Al aumentar el oxígeno disponible, aumenta la fosforilación oxidativa y disminuye la producción de adenosina (Berne, 1980). Este mecanismo de retroalimentación pudiera ser el enlace entre el estado metabólico y el flujo coronario.

Transporte de Glucosa

La glucosa es un nutriente vital para el metabolismo de la mayor parte de los organismos y antes de que pueda ser utilizada por las células, debe transportarse a través de la membrana celular hacia el citoplasma (Lienhard y cols., 1992).

Existen tres mecanismos independientes del transporte de glucosa (Cartuthers, 1990) entre los compartimientos vasculares, extracelular e intracelular del organismo. 1) *Transporte activo*, el cual es mediado por una proteína acarreadora que transporta también iones de sodio. Esto es, la glucosa es transportada contra gradientes de concentración a través de la capa epitelial de las células del intestino delgado, formando parte del proceso de absorción de azúcares del intestino a la sangre. También la glucosa es transportada contra gradiente por transporte activo por la capa celular epitelial de los túbulos renales desde el filtrado glomerular hasta la sangre, de este modo, normalmente, la glucosa no se excreta por la orina, sino que es rescatada y mantenida en el torrente circulatorio. 2) *Difusión simple*, esta dado por el movimiento cinético de las moléculas de glucosa a través de aberturas o de espacios intermoleculares de la membrana plasmática, sin necesidad de unión a proteínas transportadoras, esto ocurre a nivel del endotelio capilar y este transporte se encuentra limitado exclusivamente por la tasa de utilización del carbohidrato que modifica el gradiente de concentración entre el exterior y el interior celular. 3) *Difusión facilitada*, este proceso requiere de la interacción de las moléculas de glucosa con una proteína transportadora que permita cruzar la membrana plasmática, mediante su unión química a esta proteína y posterior transporte a través de la membrana. Este es el mecanismo por el cual la glucosa atraviesa las membranas plasmáticas de casi todas las células. Este transporte de glucosa se caracteriza por tener una cinética de Michaelis-Menten, es decir, está mediado por moléculas transportadoras, es saturable, específico y siempre es a favor de un gradiente de concentración.

Estudios recientes han identificado una gran diversidad de moléculas transportadoras de glucosa expresadas en membranas de las células de los mamíferos, que regulan el proceso de difusión facilitada desde el líquido extracelular al interior de las

células. Estas moléculas transportadoras de glucosa son proteínas de alto peso molecular y se diferencian por su afinidad a la glucosa y por los mecanismos que regulan el transporte (Pessin y Bell, 1992). Cada una de estas se adapta a las necesidades metabólicas del tejido en el cual se encuentran. Las cinco proteínas han sido designadas como GLUT1/eritrocito, GLUT2/hígado, GLUT3/cerebro, GLUT4/músculo/tejido adiposo y GLUT5/intestino delgado; pero con la posibilidad de que otro miembro queda por ser descrito en tejidos humanos el GLUT6 (Kayano y cols., 1990).

Los miembros de esta familia están caracterizados por estar constituidos por 500 aminoácidos, orientados en la membrana plasmática, incluyendo 12 segmentos que atraviesan la membrana plasmática; los grupos NH₂- y COOH-terminal se encuentran orientados intracelularmente, además de un segmento hidrofílico largo unido a los dominios transmembranales M6 y M7. Existe un segmento largo extracelular enlazando los segmentos transmembranales M1 y M2, el cual posee un sitio de unión para la glicosilación.

Las células y los tejidos pueden expresar más de una proteína transportadora de glucosa para la difusión facilitada y algunas células también pueden expresar al cotransportador Na⁺/glucosa (Pessin y Bell, 1992). Cada una de las proteínas transportadoras de glucosa ha sido expresadas en sistemas heterogeneos incluyendo bacterias, ovocitos de Xenopus o células de mamíferos en cultivo (Burant y cols., 1991). De estos estudios se han conocido las propiedades bioquímicas de cada proteína transportadora, examinándolas independientemente, lo cual permite distinguir las con base en sus propiedades cinéticas y afinidades para los distintos azúcares.

Propiedades de los transportadores de glucosa

El transportador de glucosa GLUT1 se expresa en altos niveles en tejidos fetales, cerebro y placenta, además del eritrocito humano. En muchos de los tejidos adultos, el GLUT1 se expresa en células endoteliales y forma la barrera entre el cerebro y la sangre (barrera hematoencefálica).

La secuencia de aminoácidos del GLUT1 está altamente conservada y hay una identidad del 97-98% entre el humano, la rata, el conejo, el ratón y el cerdo, esto implica que todos los dominios de esta proteína son funcionalmente importantes (Pessin y Bell, 1992).

El GLUT1 en eritrocito humano impulsa un transporte neto de glucosa a favor de un gradiente de concentración del metabolito. La velocidad de entrada de la D-glucosa en los eritrocitos humanos aumenta con la concentración del sustrato, pero finalmente se aproxima a una velocidad máxima, que es cuando el sistema de transporte está saturado. El GLUT1 exhibe una amplia especificidad de sustrato y es capaz de transportar muchos otros azúcares, incluyendo la D-manosa, la D-galactosa, la D-xilosa, la D-arabinosa y la D-ribosa, así como los siguientes derivados artificiales no metabolizables: la 2-desoxi-D-glucosa y la 3-O-metil-D-glucosa, que son frecuentemente utilizados como sustratos de prueba (Lehninger, 1982).

El GLUT2 se expresa en el hígado, en el intestino delgado, en el riñón y en las células β del páncreas, las cuales secretan insulina. Su distribución tisular está más restringida que el GLUT1, lo cual sugiere que regula la entrada y liberación de la glucosa por los hepatocitos y que participa en el transporte de la glucosa transepitelial por el intestino delgado y el riñón. Su presencia en las células β sugiere que puede funcionar en la regulación de la secreción de insulina estimulada por la glucosa. La secuencia de aminoácidos del transportador GLUT2 no está tan altamente conservada entre las especies como el transportador GLUT1, la cual posee una identidad del 81% entre el humano y la rata o ratón (Pessin y Bell, 1992).

El GLUT3 está presente en niveles variables en los tejidos humanos adultos y en tumores, además se ha encontrado en niveles mayores en cerebro, riñón y placenta (Kayano y cols., 1988). La distribución del transportador GLUT3 en tejidos humanos sugiere que al igual que el transportador GLUT1, es responsable del transporte de glucosa basal sin el estímulo de la insulina.

La aparente mayor afinidad del GLUT3 por los azúcares comparado con el GLUT1 asegura una eficiente entrada de glucosa hacia las células neuronales, incluso cuando las concentraciones de glucosa extracelular son bajas (Gould y cols., 1991).

Simultáneamente, en cuatro grupos de trabajo se aislaron clones de DNA-complementario que codifican a un transportador de glucosa el cual es regulado por insulina en humano (Fukumoto, 1989), rata (Birnbbaum, 1989; Charron y Kahn, 1990; James y cols., 1989), y ratón (Kaestner y cols., 1989) denominado GLUT4. La insulina causa un rápido incremento en la actividad del transporte de glucosa en el músculo y tejido adiposo (Simpson y Cushman, 1986). El aislamiento y caracterización de un anticuerpo monoclonal que específicamente reconoce al transportador de glucosa regulado por insulina, indicó que se trata de un transportador único, diferente de los otros transportadores de glucosa presentes en eritrocitos, cerebro, riñón e hígado (James y cols., 1988). Este transportador se distingue por su gran movilidad de reservorios citosólicos hacia la membrana plasmática.

El ARNm del GLUT4 se ha encontrado en grandes niveles en las células adiposas que forman la grasa parda y la blanca, además del músculo esquelético y cardíaco (Birnbbaum, 1989; Charron y cols., 1989; Fukumoto y cols., 1989; James y cols., 1989; Kaestner y cols., 1989).

El más reciente de los transportadores de glucosa de esta familia ha sido identificado como GLUT5. El ARNm del GLUT5 se encuentra expresado predominantemente en la región del yeyuno del intestino delgado, aunque también se detectan niveles bajos en riñón, músculo esquelético y tejido adiposo. La distribución subcelular y la función del GLUT5 en estos tejidos son aún desconocidos (tabla 1).

TRANSPORTADORES DE GLUCOSA

Designación	Principales sitios de expresión	Función
A - Transportador de Glucosa Dependiente de Sodio GLUT:Na ⁺	Intestino delgado y riñón	Consumo activo de glucosa en el lumen y reabsorción de glucosa filtrada en el tubo proximal.
B - Transportadores de Glucosa por difusión facilitada		
GLUT1	Placenta, cerebro, eritrocitos, tejidos fetales.	Consumo basal de glucosa por las células y transporte de glucosa a través de las barreras entre la sangre y los tejidos.
GLUT2	Hígado, intestino delgado, riñón y células B del páncreas.	Consumo y liberación de glucosa por hepatocitos, transporte de glucosa transepitelial, en células B regula la secreción de insulina estimulada por glucosa.
GLUT3	Muchos tejidos humanos incluyendo cerebro, placenta y riñón; en otras especies es expresado en altos niveles en el cerebro.	Consumo de glucosa por todas las células en humanos incluyendo las del cerebro; consumo de glucosa por células del cerebro en otras especies.
GLUT4	Músculo esquelético y cardíaco además en tejido adiposo	Consumo de glucosa estimulada por insulina.
GLUT5	Intestino delgado (yeyuno)	Absorción de azúcares del lumen del intestino delgado (?).

Factores que regulan el transporte de glucosa

El transporte de glucosa en los distintos tejidos de mamíferos se correlaciona funcionalmente con sus propiedades y actividades metabólicas. Así, un incremento en el transporte de glucosa puede estar regulado por la demanda de este carbohidrato y los cambios en la actividad funcional o metabólica actúan como señales de retroalimentación para ajustar la tasa del transporte. Por ejemplo, el transportador GLUT1 en células endoteliales y eritrocitos, en los que la tasa metabólica es relativamente constante con reservas de glucógeno muy pequeñas, el transporte de glucosa depende exclusivamente del gradiente de concentración.

En cambio, el transporte de glucosa en tejidos con un metabolismo muy variable y con reservas de glucógeno importantes, como el músculo esquelético y tejido adiposo, puede estar regulado por hormonas y otros factores que dan flexibilidad al sistema y lo

ajustan a los requerimientos metabólicos de las células en cada momento (Elbrink y Bibler, 1975).

Existen distintos factores que modifican el transporte de glucosa como los cambios en la disponibilidad de sustratos, la insulina y el ejercicio que lo incrementan y otros como la presencia de glucógeno y ácidos grasos que lo disminuyen.

En 1980 Samuel W. Cushman y Tetsuro Kono describieron un mecanismo molecular por el cual la insulina incrementa el transporte de glucosa en adipocitos (Cushman y Wardzala, 1980; Suzuki y Kono, 1980; Simpson y Cushman, 1986). Estos dos grupos demostraron independientemente que el principal efecto de la insulina sobre los adipocitos aislados de rata era el inducir la translocación de una reserva intracelular de transportadores de glucosa hacia la membrana plasmática, es decir, la insulina incrementa el número de proteínas transportadoras funcionales en la superficie celular.

El transporte de glucosa estimulado por insulina en el músculo esquelético y cardíaco también ocurre por la translocación de transportadores de glucosa preformados de un reservorio intracelular hacia la membrana plasmática (Hirshman y cols., 1990; Klip y cols., 1987; Simpson y Cushman, 1986). Así el mecanismo, por el cual el transporte de glucosa estimulado por la insulina es similar en tejido adiposo y tejido muscular.

Existen trabajos en los que se ha informado que en músculo esquelético el ejercicio también incrementa el transporte de glucosa (Richter y cols., 1985). Donen y colaboradores en 1989 observaron que el ejercicio, al igual que la insulina estimula el transporte de glucosa y que este efecto persiste por un período considerable después de suspender el ejercicio; esto involucra un incremento en la velocidad máxima (V_{max}) del transporte del carbohidrato, pero sin ningún cambio significativo en la K_m (Hollozy y Narahara, 1965; Nesher y cols., 1985).

Aunque se ha demostrado que el incremento en el consumo de glucosa después del ejercicio no requiere de insulina (Richter y cols., 1985 y Wallberg-Henrickson y Hollozy, 1984), es desconocido el mecanismo por el cual se estimula el transporte de glucosa (Guarner y col., 1994).

De los estudios realizados por Sternlicht E. y colaboradores en 1989 con vesículas aisladas de sarcolema mostraron que el ejercicio y la insulina incrementan la V_{max} del transporte de glucosa en un límite similar, sin alterar la K_m . Los datos indican que el ejercicio incrementa el transporte de glucosa solamente por un incremento en la velocidad de recambio de las moléculas transportadoras.

El hecho de que el ejercicio y la insulina trabajan a través de diferentes mecanismos para incrementar el transporte de glucosa ha sido sugerido por Garthwaite y Hollozy en 1982 y por Nesher y colaboradores en 1985.

Otro factor que regula el transporte de glucosa es el glucógeno. Existen trabajos en los que se ha observado que en músculo esquelético perfundido el consumo de glucosa con altos niveles de glucógeno es menor que en músculos con niveles de glucógeno normales (Richter y Galbo, 1986).

Hespele y Richter en 1990 encontraron una diferencia en el consumo de glucosa en el músculo esquelético de rata dependiendo de los niveles de glucógeno muscular antes de la estimulación eléctrica. Los resultados demostraron que el consumo de glucosa puede variar por varios factores. Un factor posible es a través de la velocidad del transporte de glucosa en la membrana muscular, la cual podría estar afectada directamente por la concentración de glucógeno o, por la producción de metabolitos intracelulares durante la degradación del glucógeno, o por el mecanismo molecular detrás de la activación de los transportadores de glucosa, si están afectados por la concentración de glucógeno muscular.

Por otro lado, es conocido que en el corazón la presencia y sobre todo el metabolismo de los ácidos grasos disminuye el consumo de glucosa por inhibición de varios pasos en la vía glucolítica. Se ha postulado que los ácidos grasos inhiben el consumo de glucosa en tres niveles importantes: 1) Transporte de glucosa, 2) Actividad de las enzimas: hexoquinasa y fosfofructoquinasa y 3) Actividad de la piruvato deshidrogenasa (Nelly y Morgan, 1974).

Acción de la insulina

En el tejido adiposo y el músculo la glucosa entra por difusión facilitada pero es regulada por insulina y otras hormonas (Simpson y Cushman, 1986). La insulina es una hormona peptídica secretada por las células β del páncreas, la cual posee un peso molecular de unos 6000 daltons. Consta de dos cadenas peptídicas de 21 y 30 aminoácidos denominadas cadenas A y B respectivamente, con tres puentes disulfuro, dos intercatenarios y uno intracatenario.

El nivel de glucosa en el plasma es el determinante más importante de la tasa de liberación de la insulina. Tanto la síntesis como la secreción se estimulan cuando el nivel de glucosa plasmática aumenta y se inhibe cuando éste disminuye.

Los efectos metabólicos de la insulina se inician por la interacción de la hormona con un receptor altamente específico en la membrana plasmática de la célula blanco. Esta unión es saturable, muy específica y tiene una afinidad muy alta. Es probable que la mayoría de los efectos biológicos comiencen por la interacción insulina-receptor independientemente de la posterior internalización de la insulina unida a los receptores por las células blanco (Kahn, 1985; Czech, 1985).

Por medio del uso de cromatografía de afinidad y marcación por fotoafinidad se ha purificado y caracterizado totalmente a los receptores de la insulina (Czech, 1985 y Kahn, 1985) y se ha clonado su ADN complementario (Ullrich y cols., 1985; Ebina y cols., 1985). El receptor de insulina es una glicoproteína intrínseca de membrana que consiste de dos subunidades α (135 Kd) y dos subunidades β (95 Kd) unidas por tres puentes disulfuro.

Estas estructuras dinámicas, en condiciones fisiológicas y patológicas pueden modificar su capacidad de unión. Los niveles circulantes de la hormona pueden modificar o regular a sus propios receptores. Una disminución de la insulina circulante facilita su unión con el receptor, y a la inversa (down regulation). El aumento o la reducción de la capacidad de fijación de la insulina se deben a una variación de la afinidad del receptor por la hormona, o a la modificación del número de receptores.

El receptor activado por la insulina es una enzima que cataliza la fosforilación de residuos de tirosina de la misma molécula receptora y de otras proteínas blanco. Los

dominios de tirosina cinasa del receptor están localizados en la parte citoplasmática de las subunidades β . Los centros de unión de la insulina están en las subunidades α , en la parte extracelular de la membrana. La unión de insulina promueve la actividad tirosina cinasa del receptor y el receptor activado fosforila dos residuos de tirosina. Esta autofosforilación incrementa a su vez la capacidad propia para fosforilar residuos de tirosina en proteínas blanco. Cabe mencionar que entre las proteínas blanco se encuentra la calmodulina (proteína moduladora de diferentes actividades enzimáticas dependientes de Ca^{++}). Se ha demostrado que la insulina induce la fosforilación de ésta, además de que sirve como sustrato para la actividad cinasa asociada al receptor (Graves y cols., 1986; Wong y cols., 1988). La fosforilación de residuos de serina y treonina por la proteína cinasa A (activada por AMPc) y la proteína cinasa C (activada por fosfoinosítido) disminuyen la actividad tirosina cinasa del receptor. En cualquier caso, la activación de la tirosinasa del receptor a insulina parece ser la señal inicial de la acción hormonal.

La insulina facilita también la síntesis de diacilglicerol a partir de los fosfatidilinosítoles de membrana, que a su vez son activadores de la proteína cinasa C a la que podemos considerar como un efector de la actividad celular. Hasta el momento se desconoce el mecanismo por el cual la insulina provoca estos efectos (Zarzano, 1988).

En adipocitos la insulina produce una rápida activación de la fosfolipasa C, enzima que cataliza la formación de inositol trifosfato, el cual induce la liberación de Ca^{++} intracelular, por lo que el calcio podría ser un mensajero intracelular importante de esta hormona dentro de la cascada de reacciones que desencadena.

Además la insulina ejerce un control importante sobre el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas (Lawrence, 1992). Por ejemplo, favorece la síntesis del glucógeno por activación de la glucógeno sintetasa e inactivación simultánea de la degradación del glucógeno por reducción de la actividad de la glucógeno fosforilasa. Sobre la vía glucolítica activa la fosfofructocinasa, piruvatocinasa y piruvato deshidrogenasa (Neely y Morgan, 1974).

Uno de los efectos inmediatos de la insulina es la hiperpolarización de la membrana plasmática, un efecto que debe reflejar los cambios de flujo de iones. In vivo altera la distribución del sodio y del potasio entre los espacios extracelular e intracelular. Hay

evidencias de que la insulina actúa directamente sobre la ATPasa sodio y potasio unida a la membrana (Hougen y cols., 1978). Por otro lado, la insulina activa los sistemas de transporte para las hexosas, aminoácidos y iones.

La insulina estimula el transporte de glucosa a través de un incremento en la velocidad máxima de transporte (V_{max}) más que por un cambio en la afinidad (K_m) del acarreador para la glucosa (Vinten y cols., 1976; Sternlicht y cols., 1988 y 1989).

Conceptualmente surgen dos mecanismos que pueden ser considerados para incrementar la V_{max} en el transporte de glucosa en respuesta a la insulina: el primero involucra un cambio en la actividad intrínseca del transportador de glucosa en la membrana plasmática, tal que cada acarreador transportaría la glucosa con una velocidad más rápida; y el segundo comprende un incremento en el número de transportadores de glucosa funcionales en la membrana plasmática expuestos hacia el medio extracelular (Karnieli y col., 1981). Este último modelo fue propuesto independientemente por T. Kono y K. Suzuki de la Universidad de Vanderbilt en Tennessee y por S.W. Cushman y L.J. Wardzala de los Institutos Nacionales de Salud en Bethesda, E.U.A. en 1980.

La hipótesis de la translocación de los transportadores por acción de la insulina (Fig. 1), la cual apoya un incremento en el número de transportadores expuestos en la membrana plasmática propone los siguientes eventos: a) la insulina se une a su receptor específico en la superficie celular induciendo una señal, sin embargo, la naturaleza de esta todavía permanece desconocida a pesar de una intensa investigación (Kahn, 1985 y Czech, 1985); b) en respuesta a esta señal las vesículas intracelulares que tienen al acarreador de glucosa son transportados por un mecanismo semejante a la exocitosis hacia la membrana plasmática de una manera comparable a los procesos de secreción celular (Pollard y cols., 1979 y Mehler y cols., 1980); c) la fusión de estas vesículas con la membrana plasmática, expone a los transportadores de glucosa con la membrana celular e incrementan la actividad del transporte de glucosa. d) finalmente los transportadores de glucosa son reciclados hacia el mismo reservorio intracelular por un mecanismo endocítico similar a la endocitosis mediada por un receptor (Silverstein y col. 1977).

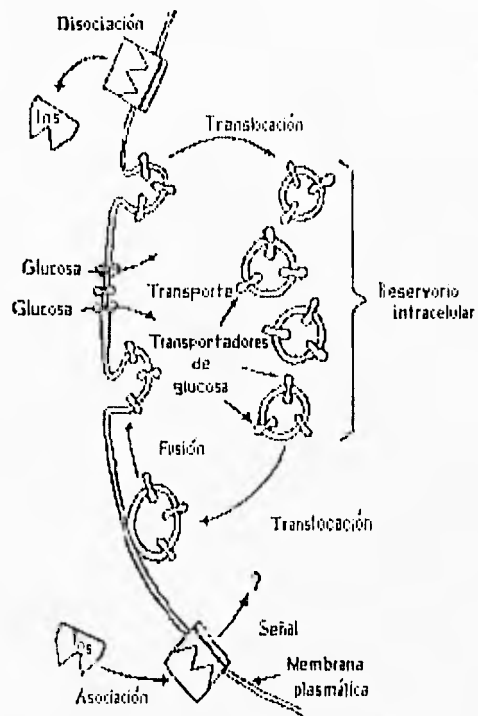


Figura 1. Representación esquemática del mecanismo de acción de la insulina sobre el transporte de glucosa. Tomado de Karnieli y cols. *Journal of Biological Chemistry*, (1981) 256:4772-4777.

Existen diferentes trabajos donde se ha estudiado el modelo de la translocación de los transportadores de glucosa por efecto de la insulina por ejemplo: en adipocitos de rata (Suzuki y Kono, 1980; Oka y Czech, 1984), en músculo esquelético (Klip y col., 1987; Sternlicht y col., 1988 y 1989; Douen y col., 1989 y 1990), en corazón de la rata (Zametti y col., 1988) y en miocitos de rata (Slot y col., 1991).

Watanabe y colaboradores (1984) investigaron la acción de la insulina sobre el transporte de glucosa en el corazón de la rata. En este estudio, los corazones fueron perfundidos con insulina y sin insulina, posteriormente fueron homogenizados y fraccionados por una centrifugación diferencial.

Los resultados obtenidos por estos autores indican que una parte de la actividad del transporte de glucosa en corazones de rata es recuperada en dos fracciones subcelulares designadas como fracción P-5 y P-6.

La fracción P-5 está enriquecida con 5'-nucleotidasa, con el receptor a la insulina (¹²⁵I) iodoinsulina y p-nitrofenilfosfatasa sensible a ouabaina, las cuales son marcadores de la membrana plasmática, la cual está asociada a la actividad del transporte de glucosa.

La fracción P-6 coincide con la actividad de la enzima UDPGal:N-acetilglucosamina galactosiltransferasa, un marcador enzimático del aparato de Golgi, al cual es posible que los transportadores estén incorporados en las membranas de este organelo ó con vesículas de sedimentación similares a las de Golgi (Watanabe y cols., 1984).

Los resultados muestran que la insulina incrementa significativamente la actividad del transporte de glucosa en la fracción P-5 en 1.59 veces. Mientras que la insulina disminuye la actividad considerablemente del transporte de glucosa en la fracción P-6. Estas observaciones sostienen la visión que al igual que en adipocitos, la insulina incrementa el transporte de glucosa en corazones de rata por inducción de la translocación de los transportadores de glucosa desde un sitio intracelular (fracción P-6) a la membrana plasmática (en la fracción P-5). En concordancia con los resultados de Morgan y cols. (1961) la insulina estimula la actividad del transporte de glucosa aproximadamente 2 veces en el corazón de rata perfundido.

Relación del Ca^{++} intracelular y el transporte de glucosa

En una amplia variedad de células, el principal paso limitante en el consumo de glucosa parece ser su transporte a través de la membrana plasmática. Puesto que la demanda de glucosa puede fluctuar dependiendo de diversos estados funcionales, es necesario que la capacidad del sistema de transporte pueda ser variado. El hecho de que la tasa de consumo de la glucosa pueda estar incrementada hasta 20 veces en pocos minutos, indica la existencia de un potente mecanismo activador para el transporte de glucosa.

Se ha propuesto que el calcio, la calmodulina y la activación del sistema de microtúbulos pueden actuar como activadores del transporte de glucosa (Clausen, 1980).

Con respecto al papel del Ca^{++} citoplasmático y el transporte de glucosa, se han estudiado los efectos de varios agentes que estimulan la liberación de calcio de reservorios intracelulares en los distintos tipos celulares. El calcio puede ser liberado del retículo sarcoplásmico por estimulación eléctrica, despolarización con K^+ y cafeína. En todos estos casos, hay un rápido aumento en el flujo de $^{45}\text{Ca}^{++}$ coincidiendo con una estimulación de la captación del 3-O-metilglucosa (Clausen y cols., 1975).

En el músculo esquelético la velocidad del transporte de glucosa se ha relacionado con la frecuencia de la contracción muscular (Holloszy y Narahara, 1965). Las evidencias indican que los estímulos para incrementar el transporte de glucosa pueden ser proporcionados por eventos asociados con el acoplamiento excitación-contracción y se ha sugerido que los iones de Ca^{++} pueden actuar como una conexión entre la contracción muscular y la regulación del transporte.

Los mismos autores en 1967 demostraron el efecto de la despolarización con K^+ sobre el incremento en la captación de 3-O-metilglucosa en músculo sartorio de rana en presencia de calcio en el medio de incubación. Además las contracturas producidas por cafeína (agente que facilita la liberación de calcio del retículo sarcoplásmico) fueron asociadas con un incremento en la permeabilidad al 3-O-metilglucosa, indicando el efecto estimulador de la actividad contráctil sobre el transporte de glucosa (Holloszy y Narahara, 1967).

Otra evidencia indirecta de la importancia del calcio en el control del transporte de glucosa fue presentado por Bihler (1968), quien demostró que la inhibición del transporte activo de $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ en el diafragma de rata lleva a la estimulación de la captación del 3-0-metilglucosa. El autor propone que el incremento en Na^+ intracelular podría estimular al intercambiador $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{++}$ a través de la membrana plasmática, resultando en un aumento de los niveles de Ca^{++} citoplasmático, e incrementando el transporte del azúcar. Como la inhibición de la bomba $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ lleva a las contracturas (Kohn y Clausen, 1971 y Irwin y Oliver, 1970) hay pocas dudas en relación a que el Ca^{++} citoplasmático estuviese incrementado.

En los últimos años Youn y colaboradores (1991) proporcionaron evidencias de que un aumento en la concentración de Ca^{++} citoplasmático produce un incremento en el transporte de glucosa en el músculo esquelético, aún con concentraciones de Ca^{++} citoplasmático demasiado bajas para causar la contracción muscular. Para elevar la concentración de Ca^{++} citoplasmático usaron compuestos como N-(6-aminohexil)-5-cloro-1-naftalensulfonamida (W-7) y cafeína, los cuales causan la liberación de Ca^{++} del retículo sarcoplásmico vía los canales que regulan la liberación de Ca^{++} inducida por Ca^{++} (Palade, 1987). Las concentraciones de W-7 en el rango de 50 y 100 μM , no aumentaron la tensión muscular, por lo que en estas concentraciones el incremento en Ca^{++} está por debajo del umbral para la contracción muscular; pero el transporte del 3-0-metilglucosa se incrementó entre 6 y 8 veces respectivamente. También pequeñas concentraciones de cafeína (2.5 y 3 mM) no provocaron la contracción muscular, pero sí un pequeño incremento en el transporte de glucosa. Es decir, 30 minutos de incubación del músculo con 3 mM de cafeína causa un incremento de aproximadamente 3 veces el transporte de glucosa. En conclusión estos autores proporcionan evidencias directas que el aumento en Ca^{++} citoplasmático produce un incremento en el transporte de glucosa, independientemente de la actividad contráctil del músculo esquelético.

Se ha propuesto que el mecanismo a través del cual el calcio juega un papel importante en la regulación del transporte de glucosa en la membrana plasmática es por un mecanismo similar a la exocitosis (Clausen, 1980), incrementando el número de

transportadores por reclutamiento de vesículas intracelulares que los contienen, de una manera similar a la secreción de hormonas y neurotransmisores.

La propuesta de este mecanismo se fundamenta en el hecho de que la secreción de hormonas y neurotransmisores pueden ser inducidos por ionóforos de calcio y la estimulación fisiológica de la exocitosis ha sido acompañada con incrementos en el Ca^{++} citosólico (Klip, 1984). El ión calcio ejerce una profunda influencia en muchos procesos biológicos, tales como la motilidad celular, contracción muscular, movimiento de cromosomas, liberación de neurotransmisores, endocitosis y exocitosis (Cheung, 1980). El catión ha sido considerado como una señal para llevar a cabo la exocitosis (DeLisle y Williams, 1986) y como un requerimiento químico para la fusión de las membranas (Klip, 1984).

La participación del calcio depende de la activación de proteínas estructurales específicas como la calmodulina. La calmodulina por sí misma no es activa, su forma activa la constituye el complejo Ca^{++} -calmodulina cuyo ensamblaje le confiere otra conformación. (Cheung, 1980).

Se ha descrito que el complejo Ca^{++} -calmodulina estimula una proteína cinasa que fosforila a la tubulina. La fosforilación cambia las propiedades físicas y químicas de la tubulina, la cual se agrega para formar estructuras filamentosas y estos filamentos interactúan con la membrana facilitando procesos como el movimiento de los cromosomas en la anafase (Marcum y cols., 1978), la liberación de los neurotransmisores (DeLorenzo y cols., 1979) y posiblemente la fusión de vesículas que contienen a los transportadores de glucosa (GLUT 4) en las células cardíacas.

Efecto de la trifluoperazina sobre el consumo de glucosa producido por insulina.

En los últimos años, ha quedado bien establecido que muchos de los efectos biológicos del Ca^{++} son dirigidos por la actividad específica de una proteína reguladora dependiente de Ca^{++} , como es la calmodulina (Cheung, 1980).

La calmodulina se ha relacionado con el mecanismo de la exocitosis de vesículas secretoras (DeLesli, 1986), por lo cual al utilizar un inhibidor como la trifluoperazina, cabe esperar que el mecanismo de exocitosis para reclutar las vesículas intracelulares que contienen al transportador de glucosa GLUT4 sea inhibido, produciendo un decremento tanto en el transporte como en el consumo de la glucosa.

La trifluoperazina es un derivado de la fenotiazina, la cual es usada frecuentemente como un fármaco antipsicótico. Sin embargo, la trifluoperazina posee la propiedad de ser un inhibidor de la calmodulina, por lo que al unirse éstas, la calmodulina queda biológicamente inactiva (Cheung, 1980).

Existen diversos trabajos donde se evalúa el mecanismo de acción de la trifluoperazina para inhibir la exocitosis; por ejemplo, al interactuar con la calmodulina en la secreción de insulina. Krausz y cols. (1980) reconocen que la glucosa es un importante estimulador en la secreción de insulina, la cual actúa modificando el flujo celular de Ca^{++} . Al utilizar la trifluoperazina, observaron que la secreción de insulina mediada por glucosa se inhibía en los islotes pancreáticos.

En un examen más detallado, Schubart y cols. (1980) utilizaron ouabaina y K^+ para estimular la liberación de insulina en insulinomas de hamsters. Puesto que la glucosa es ineficaz para estimular la secreción de insulina en estas células, la ouabaina y la despolarización con K^+ fueron usados para estimular la secreción de insulina, mediante el aumento en el flujo celular de Ca^{++} . Y al igual que Krausz, la trifluoperazina inhibió la secreción de insulina en estas células.

Estos resultados sugieren, que la calmodulina mediada por calcio regula la secreción de insulina y que la trifluoperazina inhibe esta secreción, al parecer en un punto posterior a la entrada de Ca^{++} . La idea de que la trifluoperazina actúa después del aumento del Ca^{++}

citoplásmico se basa en el hecho de que la despolarización de la membrana plasmática con ouabaina o K^+ causa un incremento en la entrada de Ca^{++} y esto no se ve alterado por el fármaco.

Puede concluirse que la trifluoperazina inhibe una parte del mecanismo de liberación de insulina, y que la calmodulina juega un papel importante en este mecanismo de secreción mediada por calcio, en un sitio entre el metabolismo de la glucosa y el incremento del Ca^{++} intracelular.

Por otro lado se han obtenido evidencias, con las cuales se evalúa la participación de la calmodulina en la activación del transporte de glucosa, a través de los transportadores de glucosa básicamente por los trabajos de Slechter (1984) quien utilizó células adiposas y por Guarnier y cols. (1993) quienes utilizaron el músculo esquelético como modelo.

En los estudios de Shechter se observa que el efecto de la trifluoperazina sobre el consumo de 2-deoxiglucosa inducido por insulina fue dosis dependiente, es decir la inhibición de un 15% en el transporte de la 2-deoxiglucosa en las células adiposas fue con una concentración de 70 μM , mientras que la inhibición completa se encontró con una concentración de 150 μM de trifluoperazina. Así la fenotiazina inhibe la acción estimuladora de la insulina sobre el transporte de la hexosa.

Guarnier y colaboradores (1993) también informaron que la trifluoperazina inhibe el incremento en el consumo de glucosa producidos por la insulina en el músculo esquelético. Esto lo obtuvieron al perfundir la musculatura de la pierna trasera de rata por medio de la cateterización de la arteria femoral con diferentes soluciones conteniendo insulina 10,000 $\mu U/ml$ y diferentes concentraciones de trifluoperazina. El consumo de glucosa inducido por insulina disminuyó con una concentración de 10^{-10} y se observó una inhibición total con las dosis de 10^{-8} y 10^{-6} de trifluoperazina (Fig. 2).

Así los resultados muestran la importancia del Ca^{++} y la calmodulina como los posibles segundos mensajeros de la insulina, puesto que el Ca^{++} y la calmodulina deben interactuar para producir la translocación de las vesículas intracelulares conteniendo a los transportadores de glucosa (GLUT4) y fusionarse con la membrana plasmática de las células cardíacas, incrementando por lo tanto el consumo de la glucosa.

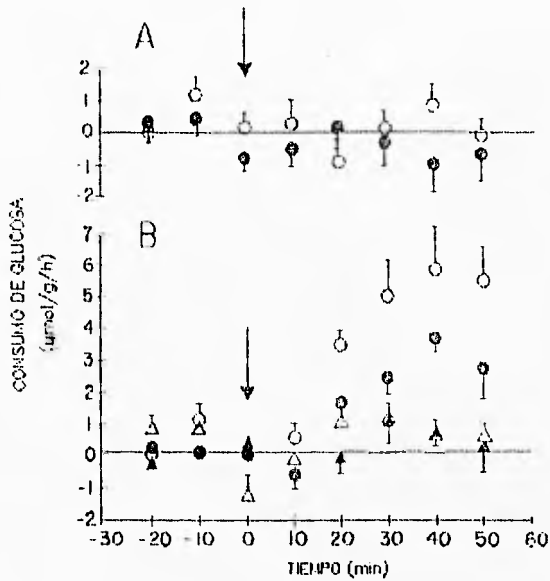


Fig.2. Cambios en el consumo de glucosa en la perfusión de la pata trasera de la rata. En condiciones control (A). ○ Perfusión con solución Tyrode, ● Perfusión con solución Tyrode + trifluoperazina 10^{-6} M. En condiciones experimentales (B). ○ Perfusión con insulina (10 000 μ U/ml), ● Insulina (10 000 μ U/ml) + trifluoperazina 10^{-10} M, Δ Insulina (10 000 μ U/ml) + trifluoperazina 10^{-8} y \blacktriangle Insulina (10 000 μ U/ml) + trifluoperazina 10^{-6} M. Tomado de Guanter y cols. *European Journal of Pharmacology*, (1993) 237:139-141.

HIPOTESIS

Si el complejo Ca^{++} -calmodulina participa en el mecanismo de exocitosis de vesículas intracelulares que contienen las moléculas transportadoras de glucosa (GLUT4) en las células del corazón inducido por insulina, al inhibir la calmodulina con un agente como la trifluoperazina se observará un decremento en el consumo de la glucosa por el miocardio.

Para probarla se proponen los siguientes objetivos:

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la participación del complejo Ca^{++} -calmodulina como un elemento en el proceso de exocitosis de las vesículas intracelulares que contienen el transportador (GLUT4) para incrementar el transporte de glucosa a través de las membranas plasmáticas de las células cardíacas inducido por insulina.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Determinar el consumo de glucosa del músculo cardíaco por el método de Langendorff.
- 2.- Además determinar el consumo de glucosa del músculo cardíaco en presencia de distintas concentraciones de insulina y en las mismas condiciones pero agregando un inhibidor de la calmodulina, como es la trifluoperazina.

MATERIALES Y METODOS

Con el propósito de conocer la participación del complejo calcio-calmodulina sobre el consumo de glucosa en el miocardio se realizaron distintas series experimentales sobre los corazones de ratas macho de la cepa Wistar de 250-290 gramos.

Las ratas se sacrificaron por dislocación cervical y se diseccionó el corazón. Los corazones fueron aislados y montados con la técnica de Langendorff (Neely y cols., 1967) para ser perfundidos con una solución Tyrode modificada durante 20 minutos aproximadamente, hasta que el corazón se estabilizara, es decir, que las arterias coronarias quedarán libres de sangre y la frecuencia cardiaca se mantuviera constante. El tiempo que transcurrió entre la extirpación del corazón y la iniciación de la perfusión fue menor de 4 minutos.

La técnica de Langendorff consiste en canular la aorta del corazón aislado e iniciar la perfusión de las arterias coronarias a una presión constante. La técnica permite proveer de un adecuado control de sustratos y oxígeno a los corazones aislados. En esta preparación la velocidad de perfusión ejerce una presión a la aorta, sin embargo, el flujo coronario no se ve afectado en rangos muy amplios de presión arterial. Una ventaja más de esta técnica es que los sustratos y el oxígeno son liberados a las células vía una circulación capilar intacta (Neely y Morgan, 1974).

La solución de Tyrode modificada que se utilizó contenía lo siguiente: (en mM/ml) NaCl 136.9, KCl 5.4, CaCl₂ 1.8, MgCl₂ 1.05, NaHCO₃ 11.9, NaHPO₄ 0.33 y Glucosa 5.5, ajustada a un pH de 7.4. La solución fue burbujeada constantemente con una mezcla de O₂ al 95% y de CO₂ al 5% y la temperatura se mantuvo a 37°C. Se utilizó una bomba (Sigmamotor) para perfundir la solución a una velocidad constante.

Se inició la perfusión experimental recirculando sólo 30 ml de Tyrode a un flujo de 7.5 ml/minuto. Se midió la absorbancia de la concentración inicial de glucosa en el Tyrode y la absorbancia de las concentraciones de glucosa a los 15 y 30 minutos de iniciada la perfusión para estimar el consumo de glucosa. Esto se realizó mediante el método de la glucosa oxidasa (Trinder-SIGMA); esta consiste en tomar una muestra de 20 µl en el tiempo indicado de la perfusión y colocarla en un tubo de ensaye, al que se le agrega 2.5 ml del reactivo glucosa-oxidasa. Los tubos de ensaye se colocaron en baño María a 30°C por

20 minutos y posteriormente se midió la absorbancia de cada muestra en un espectrofotómetro (Perkin-Elmer J111) a una longitud de onda de 505 nm.

El reactivo de la glucosa-oxidasa se utiliza para determinar la concentración de glucosa en sueros o plasmas por métodos enzimáticos. Las reacciones enzimáticas involucradas en la determinación son: la glucosa es primero oxidada a ácido glucónico y peróxido de hidrógeno, esta reacción es catalizada por la glucosa oxidasa. El peróxido de hidrógeno formado reacciona con la 4-aminoantipirina y el sulfonato p-hidroxibenzeno en presencia de una peroxidasa forma un colorante de quinoneímina. La intensidad del color producido es directamente proporcional a la concentración de glucosa en las muestras.

Para la realización de las distintas series experimentales los corazones se dividieron en cuatro grupos experimentales 1) Controles (n=8), los cuales durante todo el período de perfusión recibieron sólo solución Tyrode; además se realizó un grupo control, donde los corazones fueron perfundidos con Tyrode y la dosis de trifluoperazina 10^{-8} M durante 15 y 30 minutos de perfusión para determinar que la trifluoperazina no posee por sí misma ningún efecto sobre el consumo de glucosa. 2) Para determinar el efecto de la insulina sobre el consumo de glucosa en el corazón de rata se realizó un segundo grupo experimental, donde se perfundió con diferentes concentraciones de insulina, que van de 50, 100, 250, 500 y 1000 mU/ml. Para cada dosis se utilizó una n=6.

3) Para evaluar la participación de la calmodulina en el consumo de la glucosa inducido por la insulina se realizó un tercer grupo experimental, en el que los corazones se perfundieron con 500 mU/ml de insulina y distintas concentraciones de trifluoperazina, desde 10^{-10} M hasta 10^{-6} M. Para cada dosis la n fue de 6. La trifluoperazina se utilizó como un inhibidor de la calmodulina.

4) En el cuarto grupo experimental la perfusión de los corazones se hizo con distintas concentraciones de insulina 100, 250, 500 y 1000 mU/ml y trifluoperazina 10^{-8} M.

Los datos del consumo de glucosa se normalizaron tomando como el 100% los primeros 15 minutos de perfusión con tan sólo la solución Tyrode.

Al finalizar cada experimento se determinó el peso del corazón en gramos para calcular el consumo de glucosa en $\mu\text{mol/h/g}$. Para determinar el consumo de glucosa, se calculó el número de milimolas de glucosa en los 30 ml de Tyrode recirculado en la

perfusión del corazón. Posteriormente se calculó la diferencia entre la concentración inicial de milimolas de glucosa y la concentración al finalizar la perfusión (15 y 30 minutos). Esta diferencia se convirtió a micromolas y dividió por hora y por gramo de peso del corazón.

Análisis Estadístico

Se aplicó un análisis de varianza de una sola vía para determinar los resultados de perfundir el corazón con las distintas concentraciones de insulina con respecto al control. Además se realizó una prueba de "t" de student para muestras independientes para evaluar las diferencias en la perfusión con insulina 500 mU/ml y la trifluoperazina 10^{-8} M y también para determinar las diferencias entre la perfusión de distintas concentraciones de insulina y la dosis de trifluoperazina 10^{-8} M.

RESULTADOS

Con el propósito de conocer el consumo de glucosa en el corazón de rata adulta, se realizó un grupo de experimentos controles. Esto es, los corazones fueron aislados y perfundidos con la técnica de Langendorff suministrándoles 30 ml de solución Tyrode modificada recirculada durante 15 y 30 minutos para determinar el consumo de glucosa. En los controles se observó que el corazón consume a los 15 minutos 68.46 ± 9.78 ($n=8$) $\mu\text{molas/h/g}$ de glucosa y a los 30 minutos el corazón consume 45.42 ± 3.77 $\mu\text{molas/h/g}$ de glucosa. Estos valores se muestran como (C) en la gráfica 3.

Para determinar el efecto de la insulina sobre el consumo de glucosa en el corazón de rata se realizó un primer grupo experimental, donde se utilizaron diferentes concentraciones de insulina y se muestran en la figura 3. Se tomaron muestras a los 15 y 30 minutos de perfusión para estimar el consumo de glucosa.

En la figura 3 observamos un incremento del 36% y 27% en el consumo de glucosa producido por insulina a los 15 minutos con las concentraciones de 50 y 100 mU/ml respectivamente; con 250 mU/ml de insulina el consumo de glucosa se incrementó hasta un 66%, mientras que el consumo de glucosa se incrementa hasta en un 100% con respecto del valor control con concentraciones de 500 y 1000 mU/ml de insulina. Estadísticamente los resultados con 250, 500 y 1000 mU/ml de insulina son significativos con una prueba de ANOVA con una $p < 0.001$ y una $f = 15.72$ con respecto al control en una prueba de contraste de Scheffé. Mientras que a los 30 minutos de perfusión los incrementos en el consumo de glucosa fueron más discretos en todas las concentraciones de insulina y no se observaron diferencias significativas con respecto al control.

La figura 4 muestra los resultados de la tercera serie experimental. La perfusión del corazón de rata adulta con la concentración de 500 mU/ml de insulina, con la cual se obtuvo el máximo consumo de glucosa y diferentes concentraciones de trifluoperazina.

El consumo de glucosa producido por la insulina disminuyó con las diferentes dosis de trifluoperazina de una manera dosis dependiente. Esto es, durante los 15 minutos de perfusión se observa una pequeña inhibición con las dosis de 10^{-10} y 10^{-9} , mientras que con las dosis de 10^{-8} y 10^{-6} se presenta la mayor inhibición significativa con una prueba de "t"

de student con una $p < 0.01$. Posteriormente, a los 30 minutos de perfusión la inhibición de la trifluoperazina a dosis de 10^{-10} y 10^{-9} fue muy discreta y sólo con la dosis de 10^{-8} la inhibición fue estadísticamente significativa con una $p < 0.05$.

En la figura 5 se muestran los resultados de la perfusión del corazón con distintas concentraciones de insulina y la dosis de trifluoperazina 10^{-8} M sobre el consumo de glucosa, a los 15 y 30 minutos de perfusión. En el panel (A) se observa que la trifluoperazina 10^{-8} M prácticamente no tiene efecto inhibitor sobre el consumo de la glucosa estimulado por insulina en concentraciones de 100 y 250 mU/ml, además con la concentración de 1000 mU/ml la trifluoperazina tiene un efecto discreto. Tan sólo obtuvimos un efecto inhibitor de la trifluoperazina del 60% sobre el consumo de glucosa producido por insulina a una concentración de 500 mU/ml. El panel (A) muestra los datos de la perfusión del corazón a los 15 minutos de ésta.

El panel (B) presenta los datos a los 30 minutos de perfusión del corazón con las distintas concentraciones de insulina y la trifluoperazina 10^{-8} M. Se observa que con la concentración de 100 mU/ml de insulina el efecto inhibitor de la trifluoperazina es discreto sobre el consumo de la glucosa y que con la concentración de 250 mU/ml no se observa ningún efecto; mientras que con la concentración de 1000 mU/ml de insulina y la de trifluoperazina se observa un incremento en el consumo de glucosa estadísticamente significativo con una prueba de "t" de student con una $p < 0.05$.

CURVA DÓISIS-RESPUESTA

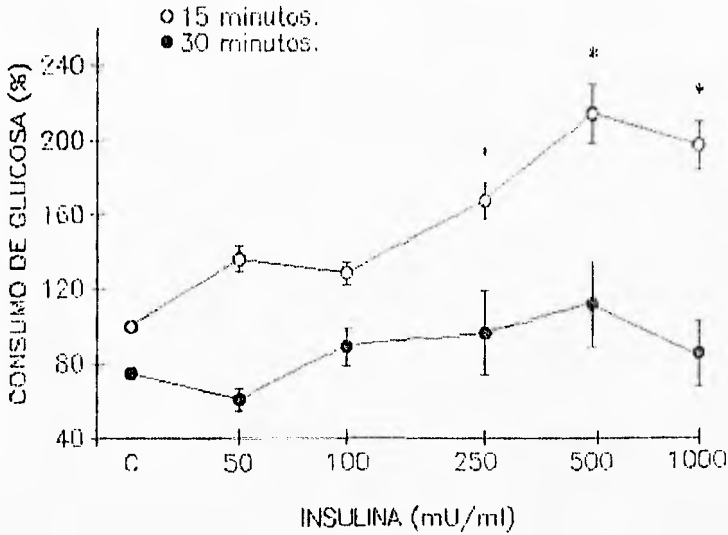


Fig. 3. Efecto de diferentes concentraciones de insulina sobre el consumo de glucosa en el corazón de rata adulta. Se observa un incremento discreto del 30% en el consumo de glucosa con concentraciones de 50 y 100 mU/ml de insulina; en contraste el consumo de glucosa se incrementa en un 100% del valor en el control con concentraciones de 500 y 1000 mU/ml, durante los 15 minutos de perfusión experimental. A los 30 minutos de perfusión el consumo de glucosa decae con respecto a los valores observados a los primeros 15 minutos de perfusión. (C) corresponde a los datos control. Los resultados son estadísticamente significativos con una $p < 0.001$ con respecto al control.

EFFECTO INHIBIDOR DE LA TRIFLUOPERAZINA

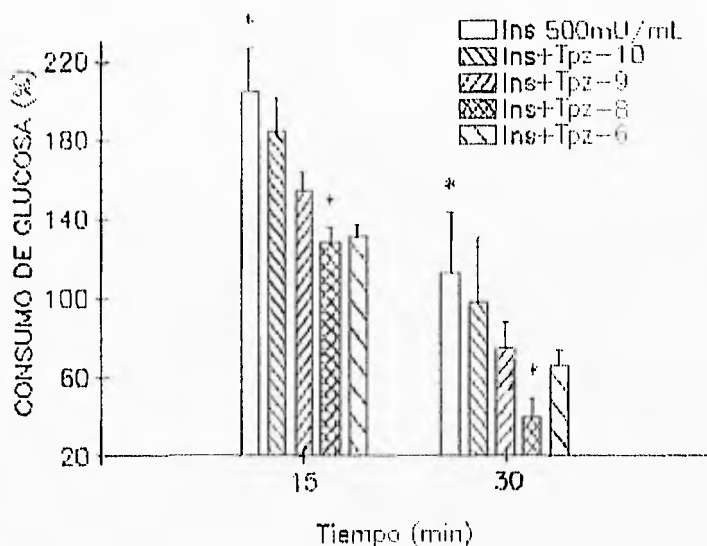


Fig. 4. Efecto inhibidor de la trifluoperazina sobre el consumo de glucosa en el corazón de rata adulta. Se observa que el incremento en el consumo de glucosa producido por la insulina a una concentración de 500 mU/ml se inhibe con la presencia de diferentes dosis de trifluoperazina. La mayor inhibición se presenta con una dosis de trifluoperazina de 10^{-8} M, tanto a los primeros 15 minutos de perfusión como a los 30 minutos de ésta. Los resultados son presentados como la media \pm E. S. de cada serie experimental con una $n = 6$. (*) Los resultados son significativos con una $p < 0.01$ a los 15 minutos de perfusión y una $p < 0.05$ para los 30 minutos.

CURVAS DOSES-RESPUESTA

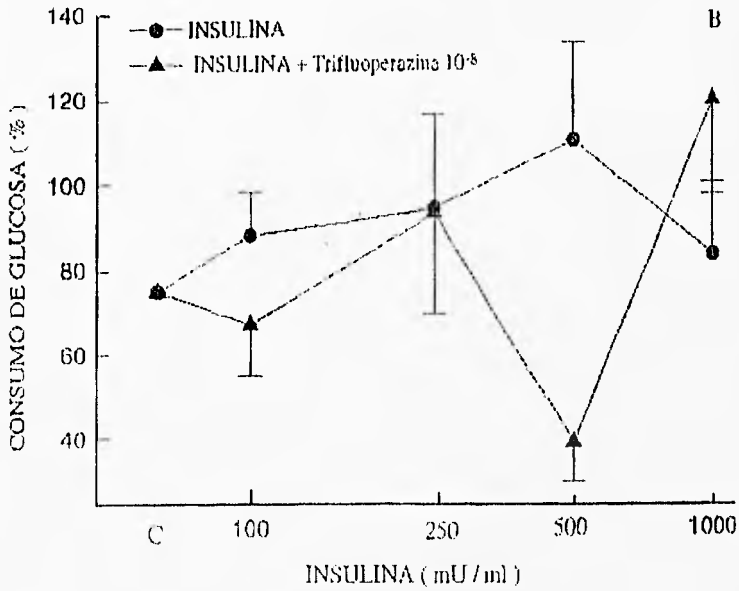
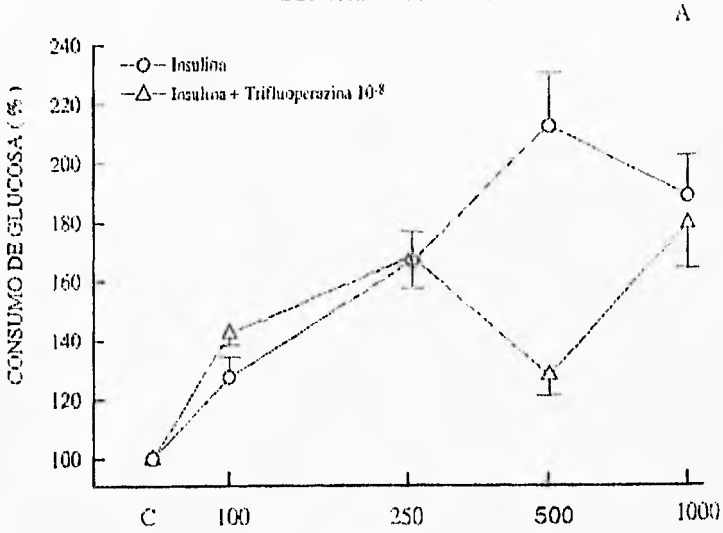


Fig.5. Efecto de distintas concentraciones de insulina y trifluoperazina sobre el consumo de glucosa en el corazón de rata adulta, durante 15 minutos (A) y 30 minutos de perfusión (B). Se observa que la trifluoperazina con una dosis de 10^{-8} M no tiene efecto sobre el incremento en el consumo de glucosa producido por la insulina a dosis entre 100 y 250 mU/ml, y con la dosis de 1000 mU/ml de insulina el efecto inhibitor de la trifluoperazina es muy poco (panel A). A los 30 minutos de perfusión se observa un efecto inhibitor de la trifluoperazina muy pobre con las dosis de insulina 100 y 250 mU/ml, mientras que con la concentración de insulina 1000 mU/ml la trifluoperazina tiene otro tipo de efecto sobre el consumo de glucosa. Los resultados representan la media \pm F.S. de una $n=6$ para cada serie experimental. Los datos son estadísticamente significativos (*) con una $p<0.01$ y una $p<0.05$ a los 15 y 30 minutos de perfusión respectivamente con la dosis de 500 mU/ml de insulina.

DISCUSION

El propósito de este trabajo fue evaluar la participación del complejo Ca^{++} -calmodulina en el proceso de exocitosis inducido por insulina de vesículas intracelulares que contienen a los transportadores de glucosa (GLUT4), permitiendo el paso de la glucosa a través de las membranas plasmáticas de las células cardíacas.

Los resultados muestran en la figura 3 que el corazón responde a las diferentes concentraciones de insulina, por lo que el corazón incrementa el consumo de glucosa hasta el doble del valor control y por lo tanto el transporte de éste, durante los 15 minutos de perfusión. Esto se debe probablemente a que la insulina incrementa el transporte de glucosa en las células cardíacas por el mecanismo de exocitosis de los transportadores GLUT4 que se encuentran asociados a pequeños elementos vesiculares de membrana y túbulos irregulares cerca del sarcolema, pero después de la estimulación los transportadores aumentan su proporción en los diferentes dominios de la membrana plasmática (Slot y cols., 1991) permitiendo el paso de la glucosa. A los 30 minutos de perfusión, el incremento en el consumo de glucosa no es tan evidente, ya que este podría estar limitado por metabolitos secundarios ó enzimas glucolíticas que participan en la fosforilación de la glucosa.

Morgan y colaboradores (1961) observaron en corazones de rata perfundidos con insulina, que cuando se presenta una acumulación significativa de los niveles de glucosa libre intracelular provoca que el paso limitante en el control del consumo de glucosa cambie del transporte a la fosforilación de la glucosa.

Se sabe que el consumo de glucosa por el músculo cardíaco está regulado en una serie de pasos de la conversión de este sustrato hasta acetyl-CoA. La inhibición del consumo de glucosa se ha localizado a nivel de las enzimas hexoquinasa, fosfofructoquinasa-1 y piruvato deshidrogenasa. Estos importantes reguladores en la vía de la glucólisis son activados o inhibidos dependiendo de la actividad y requerimientos metabólicos del músculo cardíaco. La fosforilación de la glucosa es el primer paso en la glucólisis de las células cardíacas. La reacción es catalizada por la hexoquinasa. En las células hay relativamente poca glucosa libre y la mayor parte de la glucosa intracelular existe en forma fosforilada (Lehninger, 1982). La hexoquinasa es una enzima reguladora que es inhibida

por su propio producto de reacción, la glucosa-6-fosfato. El nivel intracelular de glucosa-6-fosfato es un factor importante que determina la velocidad de la fosforilación de la glucosa. Cuando la célula tiene una concentración elevada de glucosa-6-fosfato y no precisa de ella para atender a sus necesidades energéticas se inhibe la hexoquinasa, impidiéndose de este modo la formación de cantidades ulteriores del metabolito, teniendo como consecuencia una inhibición en la fosforilación de la glucosa y por lo tanto en el transporte de glucosa a través de las membranas celulares (Manchester y cols., 1994). Además un incremento en la concentración intracelular de glucosa-6-fosfato y de la fructuosa-6-fosfato da como resultado la inhibición de otra enzima glucolítica, la fosfofructoquinasa-1. La fosforilación de la fructuosa-6-fosfato constituye el punto de control más importante de la secuencia glucolítica (Bloxham y Lardy, 1973; Mansour, 1972). La fosfofructoquinasa-1 posee múltiples moduladores negativos, entre los cuales caben destacar, concentraciones elevadas de ATP, de citrato y de ácidos grasos de cadena larga. Por ello, cuando se produce en la célula una concentración elevada de ATP o cuando se dispone de otros combustibles tales como los ácidos grasos o el citrato, la fosfofructoquinasa-1 se inhibe interrumpiéndose la glucólisis y por lo tanto el transporte de glucosa a través de las membranas celulares.

Por otro lado, a nivel molecular muchas enzimas y proteínas son sometidas a la fosforilación o desfosforilación en respuesta a la insulina. Por ejemplo, se han realizado distintas investigaciones donde el calcio y la calmodulina participan en la cascada de eventos moleculares involucrados en la transducción a la señal de la insulina. Básicamente se ha mostrado que la calmodulina puede ser activada por la tirosina cinasa fosfatada del receptor a la insulina (Wong y cols., 1988), y también que la insulina estimula la fosforilación de la calmodulina (Graves y cols., 1986). Por lo tanto, se propone que el complejo Ca^{++} -Calmodulina podría jugar un papel clave en la regulación de funciones celulares en respuesta a la insulina.

Se ha propuesto que la insulina aumenta los niveles de calcio iónico citoplasmático, ejerce efecto sobre la liberación de calcio de la forma unida dentro de la célula y favorece el ingreso desde el líquido extracelular. Es posible que el calcio iónico a través de la calmodulina ejerce un control sobre los sistemas enzimáticos regulados por la insulina y éstos formen parte de los eventos moleculares que desencadenan la acción de la insulina.

En la figura 4 se muestran los resultados de perfundir el corazón con insulina y distintas dosis de trifluoperazina. Este fármaco se utilizó porque posee la propiedad de ser un inhibidor de la calmodulina, por que al unirse a ella la inactiva. Se observa que el incremento en el consumo de glucosa producido por insulina es inhibido al bloquear la calmodulina, con las distintas dosis de trifluoperazina. Esto lo consideramos como prueba de que el complejo Ca^{++} -calmodulina participa en el mecanismo de exocitosis de las vesículas intracelulares que contienen a los transportadores de glucosa (GLUT-4) y llevar a cabo el transporte de glucosa a través de la membrana plasmática.

Las distintas dosis de trifluoperazina inhibieron al complejo Ca^{++} -calmodulina y por lo tanto el transporte de glucosa, pero se observa que esta inhibición no es completa, ya que el consumo de glucosa estimulado por insulina persiste en un 25% con respecto al control. Se observa que las dosis de trifluoperazina $10^{-8}M$ y $10^{-6}M$ inhibe el consumo de glucosa en un 75% aproximadamente, por lo que se manifiesta que el transporte de glucosa estimulado por insulina no sólo está restringido al complejo Ca^{++} -calmodulina, sino que el transporte de glucosa podría ocurrir a través de alguna otra vía molecular que no involucre a la calmodulina.

No es difícil de pensar en esta posibilidad, ya que la insulina podría activar el transporte de glucosa a través de distintos mecanismos y los segundos mensajeros involucradas en el mecanismo de acción de la insulina no estén restringidos a la calmodulina, y porque no, al mismo calcio.

Por un lado se ha observado la existencia de proteínas reguladoras dependientes de Ca^{++} y diferentes a la calmodulina aún sin caracterizar (Cheung, 1980), las cuales podrían promover la exocitosis inducida por calcio de las vesículas intracelulares (Wollheim y Sharp, 1981). Por ejemplo, algunas otras proteínas que fijan Ca^{++} y que son reguladoras potenciales de actividades enzimáticas al igual que regulan diferentes procesos celulares como la parvalbúmina, calsequestrina, S-100, nequerin. También se ha descrito la existencia de un grupo de proteínas citoplasmáticas homólogas denominadas anexinas (Creuts, 1992), las cuales están involucradas en el tránsito intracelular de vesículas, así como en la regulación de eventos dependientes de Ca^{++} , y que han sido propuestas como mediadores de la exocitosis.

Una de estas proteínas en particular la sinexina es capaz de promover la agregación de gránulos cromafines de la médula adrenal dependiente de Ca^{++} . También ha sido informado que la sinexina causa fusión de los granulos dependienta de Ca^{++} . Esto es la sinexina participa como un pegamento entre las membranas de las vesículas y la membrana plasmática (Almers, 1990).

Para el caso del calcio, ciertos efectos de la insulina como la activación de la glucógeno sintetasa y la estimulación de la oxidación de la glucosa no requieren de la presencia de Ca^{++} . En realidad, un incremento del Ca^{++} citoplasmático como el resultado de la liberación de Ca^{++} inducido por insulina ha sido propuesto como mediador de la hormona en músculo y tejido adiposo (Cheng y Lamer, 1985).

En numerosos informes se ha evaluado el papel del Ca^{++} sobre el transporte de la glucosa estimulado por insulina. Por ejemplo, en el músculo sóleo de rata la presencia de EGTA respondió a la acción de la hormona; igualmente despojando al músculo de Ca^{++} con EDTA y abastecerlo de Mg^{++} permitió la respuesta de la insulina. Y la insulina en presencia de EGTA aún estimuló el transporte de glucosa en miocitos aislados y en células en cultivo L6 (Klip, 1984). Por lo tanto, es evidente que el papel del Ca^{++} en la acción de la insulina no ha quedado bien establecida.

Por ello, se han propuesto dos mecanismos de inducción de la exocitosis, uno involucrando Ca^{++} y otro independiente de Ca^{++} . Por ejemplo se ha determinado que la liberación de insulina en hepatocitos estimulada por glucagón no es inhibida con trifluoperazina, sugiriendo que el AMPcíclico regula la liberación de insulina por un mecanismo distinto del incremento de Ca^{++} citosólico (Wollheim y Sharp, 1981).

Los resultados en las figuras 5 muestran que la trifluoperazina con una dosis de $10^{-8}M$ y las diferentes concentraciones de insulina no generan cambios significativos en el consumo de glucosa (panel A y B). Sólo con la concentración de 500 mU/ml de insulina, se observa una inhibición en el consumo de la glucosa, esto es quizás debido a la selectividad o especificidad del mecanismo de transporte de la glucosa. Como hemos discutido anteriormente, existe la hipótesis de la existencia de otras vías intracelulares que involucren el transporte de glucosa, y que tan solo la inhibición que se muestra en la figura 4 sea

específica para el complejo Ca^{++} -calmodulina involucrado con el mecanismo exocítico de los transportadores de glucosa.

En cuanto a la dosis de insulina 1000 mU/ml y trifluoperazina en la figura 5 a los 30 minutos el efecto parece ser distinto. Esto es quizás, debido a que las células al estar expuestas a la insulina durante un período de tiempo prolongado, a menudo pierden la capacidad de responder a la hormona. De hecho, la degradación del receptor de insulina se acelera por exposición de las células al ligando, por lo que se manifiesta en una disminución en la concentración de receptores en la superficie celular (Zorzano, 1988) y por consiguiente a una inhibición del mecanismo de acción de la insulina.

ESTA TESIS NO DEBE
VALER DE LA BIBLIOTECA

CONCLUSIONES

En el modelo experimental empleado el corazón responde incorporando glucosa de manera dosis-dependiente a la concentración de insulina. El consumo máximo se encontró con una concentración de 500 mU/ml de insulina.

Los bloqueadores de la calmodulina como la trifluoperazina inhiben el efecto estimulador de la insulina sobre el transporte de glucosa en el corazón.

El efecto de la insulina sobre el incremento en el consumo de la glucosa es a través de la activación de un proceso de exocitosis de vesículas intracelulares que contienen al transportador GLUT4, por lo que se propone al complejo Ca^{++} -calmodulina como uno de los posibles segundos mensajeros de la insulina.

El transporte de glucosa estimulado por insulina no sólo está restringido al complejo Ca^{++} -calmodulina, sino que el transporte de glucosa ocurre a través de alguna otra vía molecular, la cual no involucra a la calmodulina.

REFERENCIAS.

- Almers W. (1990). Exocytosis. *Ann. Rev. Physiol.* 52: 607-624.
- Berne R.M. (1980). The role of adenosine in the regulation of coronary blood flow. *Circ. Res.* 47:6-10.
- Bihler I. (1968). The action of cardiotonic steroids on sugar transport in muscle. in vitro. *Biochem. Biophys. Acta* 163: 401-410.
- Bing R.J. (1965). Cardiac metabolism. *Physiol. Rev.* 45: 171-213.
- Birnbaum M.J. (1989). Identification of a novel gene encoding an insulin-responsive glucose transporter protein. *Cell* 57:305-315.
- Bloxham D.P. y Lardy H.A. (1973). Phosphofructokinase. *Enzymes* 8: 239-278.
- Burant C.F., Sivitz W.L., Fukumoto H., Kayano T. y Nagamatsu S. (1991). Mammalian glucose transporters: structure and molecular regulation. *Rec. Prog. Horm. Res.* 47: 349-387.
- Carruthers A. (1990). Facilitated diffusion of glucose. *Physiol. Rev.* 70 (4): 1135-1176.
- Charron M.J. y Kahn B.B. (1990). Divergent molecular mechanisms for insulin-resistant glucose transport in muscle and adipose cells in vivo. *J.Biol. Chem.* 265: 7994-8000.
- Charron M.J., Brosius F.C., Alper S.L. y Lodish H.F. (1989). A glucose transport protein expressed predominantly in insulin-responsive tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 2535-2539.
- Cheng K. y Larner J. (1985). Intracellular mediators of insulin action. *Ann. Rev. Physiol.* 47: 405-424.
- Cheung W.Y. (1980). Calmodulin plays a pivotal role in cellular regulation. *Science* 207: 19-27.
- Clausen T. (1980). The role of calcium in the activation of the glucose transport system. *Cell. Calcium* 1: 311-325.
- Clausen T., Elbrink J. y Dahl-Hansen A.B. (1975). The relationship between the transport of glucose and cations across cell membranes in isolated tissues. IX. The role of

cellular calcium in the activation of the glucose transport system in rat soleus muscle. *Biochem. Biophys. Acta* 375: 292-308.

Creuts C.E. (1992). The annexins and exocytosis. *Science* 258: 924-930.

Cushman S.V. y Wardzala L.J. (1980). Potential mechanism of insulin action on glucose transport in the isolated rat adipose cell. *J. Biol. Chem.* 255: 4758-4762.

Czeck M.P. (1985). The nature and regulation of the insulin receptor: structure and function. *Ann. Rev. Physiol.* 47: 357-381.

DeLisle R.C. y Williams J.A. (1986). Regulation of membrane fusion in secretory exocytosis. *Ann. Rev. Physiol.* 48: 225-238.

DeLorenzo R.J., Freedman S.D., Yohe W.B. y Maurer S.C. (1979). Stimulation of Ca^{++} -dependent neurotransmitter release and presynaptic nerve terminal protein phosphorylation by calmodulin and a calmodulin-like protein isolated from synaptic vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 1838-1842.

Douen A.G., Ramlal T., Klip A., Young D.A., Cartee G.D. y Holloszy J.O. (1989). Exercise-induced increase in glucose transporters in plasma membranes of rat skeletal muscle. *Endocrinology* 124: 449-451.

Douen A.G., Ramlal T., Rastogi S., Bilal P.L., Cartee G.D., Vranic M., Holloszy J.O. y Klip A. (1990). Exercise induces recruitment of the "insulin-responsive glucose transporter". *J. Biol. Chem.* 265: 13427-13430.

Ebina Y., Ellis L., Jarnagin K. y otros. (1985). The human insulin receptor cDNA: The structural basis for hormone-activated transmembrane signalling. *Cell* 40: 747-758.

Elbrink J. y Bihler I. (1975). Membrane transport: its relation to cellular metabolic rates. *Science* 188: 1177-1184.

Fukumoto H., Kayano T., Buse J.B., Edwards Y. y Pilch P.F. (1989). Cloning and characterization of the major insulin-responsive glucose transporter expressed in human skeletal muscle and other insulin-responsive tissues. *J. Biol. Chem.* 264: 7776-7779.

Garthwaite S.M. y Holloszy J.O. (1982). Increased permeability to sugar following muscle contraction. *J. Biol. Chem.* 257: 5008-5012.

Gould G.W., Thomas H.M., Jess T.J. y Bell G.I. (1991). Expression of human glucose transporters in *Xenopus* oocytes: kinetic characterization and substrate specificities

of the erythrocyte (GLUT 1), liver (GLUT 2) and brain (GLUT 3) isoforms. *Biochemistry* 30: 5139-5145.

Graves C.B., Gale R.D., Laurino J.P. y McDonald J.M. (1986). The insulin receptor and calmodulin: calmodulin enhances insulin-mediated receptor kinase activity and insulin stimulates phosphorylation of calmodulin. *J. Biol. Chem.* 261: 10429-10438.

Guarner V., Hernández E.H., Huerto R., Gorostiza P. y Valenzuela F. (1993). Trifluoperazine inhibition of insulin-induced increase in skeletal muscle glucose uptake. *Eur J. Pharmacol.* 237: 139-141.

Guarner V., Hernández E.H., Huerto R., Favier Ch., Gorostiza P. y Valenzuela F. (1994) Different mechanism for insulin induced and contraction induced increases in skeletal muscle glucose uptake. *Life Sci.* 55: 301-305.

Hespel P. y Richter E.A. (1990). Glucose uptake and transport in contracting, perfused rat muscle with different pre-contraction glycogen concentrations. *J. Physiol.* 427: 347-359.

Hirshman M.F., Goodyear L.J., Wardzala L.J., Horton E.D. y Horton E.S. (1990). Identification of an intracellular pool of glucose transporters from basal and insulin-stimulated rat skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 265: 987-991

Holloszy J.O. y Narahara H.T. (1965). Studies of tissue permeability. X. Changes in permeability to 3-O-methyl-glucose associated with contraction of isolated frog muscle. *J. Biol. Chem.* 240: 3493-3498.

Holloszy J.O. y Narahara H.T. (1967). Enhanced permeability to sugar associated with muscle contraction. *J. Gen. Physiol.* 50: 551-562.

Hougen T.J., Hopkins B.E. y Smith T.W. (1978). Insulin effects on monovalent cation transport and Na-K-ATPase activity. *Am. J. Physiol.* 234: 59-63.

Irwin R.L. y Oliver K.L. (1970). Prevention of relaxation in slow skeletal muscle by inhibition of active transport of sodium. *Am. J. Physiol.* 218: 1216-1220.

James D.E., Brown R., Navarro J. y Pilch P.F. (1988). Insulin-regulatable tissues express a unique insulin-sensitive glucose transport protein. *Nature* 333: 183-185.

James D.E., Strube M. y Mueckler M. (1989). Molecular cloning and characterization of an insulin-regulatable glucose transporter. *Nature* 338:83-87.

Kaestner K.H., Christy R.J., McLenithan J.C., Braiterman L.T. y Cornelius P. (1989). Sequence, tissue distribution and differential expression of mRNA for a putative insulin-responsive glucose transporter in mouse 3T3-L1 adipocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 3150-3154.

Kahn C.R. (1985). The molecular mechanism of insulin action. *Ann. Rev. Med.* 36: 429-451.

Kamieli E., Zarnowski M.J., Hissin P.J., Simpson L.A., Salans L.B. y Cushman S.W. (1981). Insulin-stimulated translocation of glucose transport systems in the isolated rat adipose cell. *J. Biol. Chem.* 256: 4772-4777.

Kayano T., Burant C.F., Fukumoto H., Gould G.W. y Fan Y.S. (1990). Human facilitative glucose transporters: isolation, functional characterization and gene localization of cDNAs encoding an isoform (GLUT 5) expressed in small intestine, kidney, muscle and adipose tissue and an unusual glucose transporter pseudogene-like sequence (GLUT 6). *J. Biol. Chem.* 265: 13276-13282.

Kayano T., Fukumoto H., Eddy R.L., Fan Y.S. y Byers M.G. (1988). Evidence for a family of human glucose transporter-like proteins: sequence and gene localization of a protein expressed in fetal skeletal muscle and other tissues. *J. Biol. Chem.* 263: 15245-15248.

Klip A. (1984). Is intracellular Ca^{++} involved in insulin stimulation of sugar transport? Fact and prejudice. *Can. J. Biochem. Cell Biol.* 62: 1228-1236.

Klip A., Ramlal T., Young A.D. y Holloszy J.O. (1987). Insulin-induced translocation of glucose transporters in rat hindlimb muscles. *FEBS Lett.* 224(1): 224-230.

Kobayashi K. y Nelly J.R. (1979). Control of maximum rates of glycolysis in rat cardiac muscle. *Circ. Res.* 44 (2): 166-175.

Kohn P.G. y Clausen T. (1971). The relationship between the transport of glucose and cations across cell membranes in isolated tissues. VI. The effect of insulin, ouabain and metabolic inhibitors on the transport of 3-O-methylglucose and glucose in rat soleus muscles. *Biochem. Biophys. Acta* 225: 277-290.

Krausz Y., Wollheim C.B., Siegel E. y Sharp W.G. (1980). Possible role for calmodulin in insulin release. *J. Clin. Invest.* 66: 603-607.

- Lawrence J.C. (1992). Signal transduction and protein phosphorylation in the regulation of cellular metabolism by insulin. *Ann. Rev. Physiol.* 54: 117-193.
- Lehninger L.A. Bioquímica. Omega, Barcelona. 789-816. 1982.
- Lienhard G.E., Slot J.W., James D.E. y Mueckler M.M. (1992). How cells absorb glucose. *Sci Am* 266: 34-39.
- Manchester J., Kong X., Nerbonne J., Lowry O.H. y Lawrence J.C. (1991). Glucose transport and phosphorylation in single cardiac myocytes: rate-limiting steps in glucose metabolism. *Am. J. Physiol.* 266: 326-333.
- Mansour T.E. (1972). Phosphofructokinase. *Curr. Top. Cell. Regul.* 5: 1-16.
- Marcum J.M., Dedman J.R., Briakley B.R. y Means A.R. (1978). Control of microtubule assembly-disassembly by calcium-dependent regulator protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 3771-3775.
- Mehler P.S., Sussman A.L., Maman A., Leitner J.W. y Sussman K.E. (1980). Role of insulin secretagogues in the regulation of somatostatin binding by isolated rat islets. *J. Clin. Invest.* 66: 1334-1338.
- Morgan H.E., Henderson M.J., Regen D.M. y Park C.R. (1961). Regulation of glucose uptake in muscle. I. The effects of insulin and anoxia on glucose transport and phosphorylation in the isolated, perfused heart of normal rats. *J. Biol. Chem.* 236: 253-261
- Nelly J.R., Liebermeister H., Battersby E.J. y Morgan H.E. (1967). Effect of pressure development on oxygen consumption by isolated rat heart. *Am. J. Physiol.* 212: 804-814.
- Neely J.R. y Morgan H.E. (1974). Relationship between carbohydrate and lipid metabolism and the energy balance of heart muscle. *Ann. Rev. Physiol.* 36: 413-459.
- Nelly J.R., Whitmer K.M., Mochizuki S. (1976). Effects of mechanical activity and hormones on myocardial glucose and fatty acid utilization. *Circ. Res.* 38 (1): 22-30.
- Nelly J.R., Rovetto M.J., Oram J.F. (1972). Myocardial utilization of carbohydrate and lipids. *Pro. Cardiovas. Disc.* 15: 289-329.
- Nesher R., Karl I.E. y Kipnis D.M. (1985). Dissociation of effects of insulin and contraction on glucose transport in rat epitrochlearis muscle. *Am. J. Physiol.* 249: 226-232.

Oka Y. y Czech M. (1984). Photoaffinity labeling of insulin-sensitive hexose transporters in intact rat adipocytes. *J. Biol. Chem.* 259: 8125-8133.

Opie H.L. (1976). Metabolic regulation in ischemia and hypoxia: effects of regional ischemia on metabolism of glucose and fatty acids. *Circ. Res.* 38 (5): 52-68.

Palade P. (1987). Drug-induced Ca^{2+} release from isolated sarcoplasmic reticulum. II. Releases involving a Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release channel. *J. Biol. Chem.* 262: 6142-6148.

Pessin J.E. y Bell G.I. (1992). Mammalian facilitative glucose transporter family: structure and molecular regulation. *Ann. Rev. Physiol.* 54: 911-930.

Pollard H.B., Pazoles C.J., Creutz C.E. y Zinder O. (1979). The chromaffin granule and possible mechanisms of exocytosis. *Int Rev. Cytol.* 58: 159-197.

Richter E.A. y Galbo H. (1986). High glycogen levels enhance glycogen breakdown in isolated contracting skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* 61: 827-831.

Ritcher E.A., Ploug T. y Galbo H. (1985). Increased muscle glucose uptake after exercise. No need for insulin during exercise. *Diabetes* 34: 1041-1048.

Rubio R. y Berne R.M. (1969). Release of adenosine by the normal myocardium and its relationship to the regulation of the coronary resistance. *Circ. Res.* 25: 407-415.

Schechter Y. (1984). Trifluoperazine inhibits insulin action on glucose metabolism in fat cells without affecting inhibition of lipolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 327-331.

Schrader J., Haddy F.G. y Gerlach E. (1977). Release of adenosine, inosine and hypoxanthine from the isolated guinea pig heart during hypoxia, flow, autoregulation and reactive hyperemia. *Plügers Archiv.* 369:1-7.

Schubert U.K., Erlichman J. y Fleischer N. (1980). The role of calmodulin in the regulation of protein phosphorylation and insulin release in hamster insulinoma cells. *J. Biol. Chem.* 255: 4120-4124.

Silverstein S.C., Steinman R.M. y Cohn Z.A. (1977). Endocytosis *Ann. Rev. Biochem.* 46: 669-722.

Simpson I.A. y Cushman S.W. (1986). Hormonal regulation of mammalian glucose transport. *Ann. Rev. Biochem.* 55: 1059-1089.

Slot J.W., Geuze H.J., Gigengack S., James D.E. y Lienhard G.E. (1991). Translocation of the glucose transporter GLUT 4 in cardiac myocytes of the rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 7815-7819.

Sternlicht E., Barnard R.J. y Grinditch G.K. (1988). Mechanism of insulin action on glucose transport in rat skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* 254: 633-638.

Sternlicht E., Barnard R.J. y Grinditch G.K. (1989). Exercise and insulin stimulate skeletal muscle glucose transport through different mechanisms. *Am. J. Physiol.* 256: 227-230.

Suzuki K. y Kono T. (1980) Evidence that insulin causes translocation of glucose transport activity to the plasma membrane from an intracellular storage site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 2542-2545.

Tripp M.E. (1989). Developmental cardiac metabolism in health and disease. *Pediatr. Cardiol.* 10: 150-158.

Ullrich A., Bell J.R., Chen E.Y. y otros. (1985). Human insulin receptor and its relationship to the tyrosine kinase family of oncogenes. *Nature* 313: 756-761.

Vinten J., Gliemann J. y Osterlind K. (1976). Exchange of 3-O-methylglucose in isolated fat cells. *J. Biol. Chem.* 251: 794-800.

Wallberg-Henrickson H. y Holloszy J.O. (1984). Contractile activity increases glucose uptake by muscle in severely diabetic rats. *J. Appl. Physiol.* 57: 1045-1049.

Wardzala L.J. y Jeanrenaud B. (1981). Potential mechanism of insulin action on glucose transport in the isolated rat diaphragm. *J. Biol. Chem.* 256: 7090-7093.

Watanabe T., Smith M.M., Robinson F.W. y Kono T. (1984). Insulin action on glucose transport in cardiac muscle. *J. Biol. Chem.* 259: 13117-13122.

West J.B. Bases fisiológicas de la práctica médica. Best y Taylor, ed. Panamericana. pp 310-323. 1993.

Wollheim C.B. y Sharp G.W. (1981). Calcium regulation of insulin release. *Physiol. Rev.* 61: 920-962.

Wong E.C.C., Sacks D.B., Laurino J.P. y McDonald J.M. (1988). Characteristics of calmodulin phosphorylation by the insulin receptor kinase. *Endocrinology* 123: 1830-1836.

Youn J.H., Gulve E.A. y Holloszy J.O. (1991). Calcium stimulates glucose transport in skeletal muscle by a pathway independent of contraction. *Am. J. Physiol.* 260: 555-561.

Zaninetti D., Greco-Perotto R., Assimakopoulos-Jeanet F. y Jeanrenaud B. (1988). Effects of insulin on glucose transport and glucose transporters in rat heart. *Biochem. J.* 250: 277-283.

Zorzano, A.O. (1988). Mecanismos moleculares de acción de la insulina. *Endocrinología.* 35: 27-36.