



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

REGULACIÓN DE LOS NIVELES DE
GLUCÓGENO EN LA RETINA, EFECTO DE LA
GLUCOSA 6 FOSFATO.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A :

IXCHEL OSORIO PAZ

TUTOR

DRA. ROCÍO SALCEDA SACANELLES

2007





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Hoja de datos del jurado

1.- Datos del alumno

Osorio

Paz

Ixchel

82840862

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

099254629

2.- Datos del tutor

Dra.

Rocío

Salceda

Sacanelles

3.- Datos del sinodal 1

Dra.

María Luisa

Fanjul

Peña

4.- Datos del sinodal 2

Dra.

Lourdes

Massieu

Trigo

5.- Datos del sinodal 3

Dra.

Rocío

Salceda

Sacanelles

6.- Datos del sinodal 4

Dr.

Rolando Efraín

Hernández

Muñoz

7.- Datos del sinodal5

Biol.

Gustavo

Sánchez

Chávez

8.- Datos del trabajo escrito

Regulación de los niveles de glucógeno
en la retina, efecto de la glucosa 6 fosfato

53p

2007

AGRADECIMIENTOS

Agradezco de manera especial a la Dra. Rocío Salceda Sacanelles por el tiempo, entusiasmo y apoyo que me brindó durante la realización de este trabajo.

A los revisores de este escrito:

Dra. María Luisa Fanjul Peña.

Dra. Lourdes Massieu Trigo.

Dr. Rolando Efraín Peña.

Agradezco también al Biólogo Gustavo Sánchez, por la revisión del escrito y por su valioso apoyo técnico durante la labor experimental.

Ixchel Osorio Paz contó con la beca CONACYT 45840-M, durante la elaboración de esta tesis.

Dedico esta tesis con mucho cariño a los que siempre me han apoyado:

Dios y mi Familia

A mi papá por despertar en mí la ilusión de estudiar ciencia

A mi mamá por su ternura

A Melina y Daniel mis compañeros, mis mejores amigos, mis hermanos

Con amor y respeto a mis abuelos Ma. De Jesús Díaz y Javier Paz

Por supuesto a mis amigos del laboratorio: la Dra. Rocío Salceda, Gustavo, Naty, Miguel, Claudia, Raúl y Moisés. Con mucho cariño por su apoyo, y los buenos ratos.

A Itzel y Mauricio. A todos mis amigos compañeros de fiestas, desveladas, exámenes, aventuras, prácticas de campo... mis amigos de la Facultad de Ciencias.

La manera como se presentan las cosas no es la manera como son,
y si las cosas fueran como se presentan la ciencia entera sobraría.

Karl Marx

LISTA DE ABREVIATURAS

AMP	monofosfato de adenosina
AMPc	monofosfato de adenosina ciclico
AMP K	cinasa dependiente de monofosfato de adenosina
ATP	trifosfato de adenosina
EP	Epitelio pigmentario de la retina
G6P	glucosa 6 fosfato
GP	glucógeno fosforilasa
GS	glucógeno sintasa
GSK3	glucógeno sintasa cinasa 3
HK	hexoquinasa
IRS	sustratos del receptor de insulina
MAPK	proteínas cinasas activadas por mitógenos
MLE	membrana limitante externa
MLI	membrana limitante interna
mTOR	receptor de rapamicina en mamíferos
PI3K	fosfoinositol cinasa 3
PKA	proteína cinasa A
PKB Akt	proteína cinasa B (Akt)
PKC	proteína cinasa C
PP1	proteína fosfatasa 1
PP2A	proteína fosfatasa 2A
PTPasas	proteínas fosfatasas de tirosina

RI receptor de insulina

STZ estreptozotocina

UDP difosfato de uridina

ÍNDICE	página
Lista de abreviaturas	2
Resumen	3
INTRODUCCIÓN	4
Transporte de glucosa	4
Metabolismo de la glucosa	5
Glucógeno	6
Síntesis de glucógeno	6
Ramificación del glucógeno	9
Degradación del glucógeno	10
Regulación del metabolismo del glucógeno	12
Diabetes mellitus	17
La retina; estructura y función	19
Metabolismo de la glucosa en la retina	21
Importancia de la insulina en la retina	22
Retinopatía diabética	23
HIPÓTESIS	25
OBJETIVOS	25
MÉTODOS	26
RESULTADOS	30
DISCUSIÓN	37
CONCLUSIÓN	45
BIBLIOGRAFÍA	46

RESUMEN

La glucosa se almacena en las células en forma de glucógeno, principalmente en el hígado y músculo esquelético. La insulina promueve la entrada de glucosa de la sangre a los tejidos y la síntesis de glucógeno a través de una cascada de señalización que desemboca en la activación de la glucógeno sintasa (GS). Adicionalmente la GS puede ser regulada alostéricamente por la glucosa-6-fosfato (G6P). La presencia del receptor de insulina se demostró en el tejido nervioso, sin embargo la acción de la insulina en este tejido se desconoce. Resultados previos de nuestro laboratorio demostraron que la retina de ratas con diabetes tipo 1, presenta niveles de glucógeno mayores que en los animales control.

El objetivo de este trabajo es determinar los mecanismos que regulan la concentración del glucógeno en la retina.

Se utilizaron ratas Long-Evans adultas. Con el objeto de conocer mejor la función de la insulina en la regulación del metabolismo del glucógeno, la retina neural y el epitelio pigmentario de la retina (EP) de ratas control se incubaron en Ringer Krebs (RK) bajo diferentes condiciones experimentales y se determinaron los niveles de glucógeno y G6P. A otro grupo de ratas se les indujo diabetes por la administración de estreptozotocina (STZ).

La concentración de G6P, los niveles de glucógeno y el contenido total de proteínas fueron determinados a través de métodos espectrofotométricos. La significancia de los resultados se analizó con la prueba de T y correlación lineal.

La presencia de insulina en el medio de incubación causó una disminución del 40% en los niveles de G6P en ambos tejidos. Asimismo la insulina incrementó los niveles de glucógeno en un 46% en retinas y 64% en EP. El efecto de insulina sobre los niveles de G6P y de glucógeno no se modificó en presencia de compuestos que inhiben la vía de señalización de insulina. En la retina de ratas diabéticas los niveles de G6P aumentaron 6.7 veces, mientras que en el EP disminuyeron 3 veces con respecto a los observados en las ratas control.

Los resultados indican que los niveles de glucógeno en la retina y en el EP son regulados por G6P y por insulina, sin embargo el mecanismo por el cual la insulina ejerce su efecto aún no es claro.

INTRODUCCIÓN

Los organismos vivos son sistemas abiertos que requieren de energía para mantener sus funciones vitales. El metabolismo es el proceso global por el cual los organismos adquieren y utilizan esta energía. La glucosa es el sustrato metabólico esencial para todas las células, las neuronas son totalmente dependientes de un constante suministro de esta molécula. Los animales obtienen glucosa a través de su ingestión directa, o de su síntesis a partir de distintas fuentes (gluconeogénesis); el metabolismo de la glucosa comienza con su transporte del flujo sanguíneo al interior de las células (Voet, et. al. 1992). La glucosa se almacena en las células en forma de glucógeno, principalmente en el hígado y el músculo esquelético, aunque también se han encontrado reservas en el cerebro.

La diabetes es una enfermedad metabólica que conlleva a diversos trastornos patológicos incluyendo la retinopatía. En la diabetes las alteraciones en el metabolismo de la glucosa son de particular importancia, por lo que conocer el metabolismo de la glucosa en la retina, puede ayudar a identificar las causas de la retinopatía diabética.

Transporte de glucosa

La glucosa presente en la sangre entra a las células a través de transportadores específicos. El transporte de glucosa puede ser dependiente ó independiente de sodio. El transporte dependiente de sodio es característico de tejidos epiteliales tales como el epitelio intestinal. Los transportadores de glucosa independientes

de sodio constituyen una familia de proteínas transmembranales llamadas *Glut* las cuales pueden ser específicas para cada tejido y tienen diferencias básicamente en cuanto a su ubicación tisular (Mueckler. M. 1994). En mamíferos se conocen al menos 7, el transportador Glut1 es el que mayormente se expresa en todos los tejidos y es también el más abundante en el cerebro; el transportador Glut 2 es característico en hepatocitos, células β pancreáticas, intestino y riñón. El Glut4 se localiza en el músculo esquelético, cardíaco y tejido adiposo, tejidos en los cuales el transporte de glucosa es dependiente de insulina, este transportador se encuentra en vesículas citosólicas y es traslocado a la membrana en respuesta a esta hormona (Mueckler. M. 1994).

Metabolismo de la glucosa

Una vez dentro de la célula, la glucosa es fosforilada a glucosa-6-fosfato (G6P) por la enzima hexocinasa (HK), de la que en mamíferos se conocen 4 isoformas, HKI, HKII, HKIII y HKIV ó GK (glucocinasa), (Katsen, et al. 1965). La HKIV es un monómero de 50kDa y las otras isoformas son monómeros de 100kDa, con excepción de la HKIV estas isoformas se inhiben por G6P. La HKI es predominante en el cerebro, HKII es la isoforma más abundante en músculo, HKIV se encuentra en hepatocitos, y la isoforma HIII ha sido poco estudiada por estar ausente en muchos tejidos o encontrarse en bajas cantidades (Cardenas, et al. 1998).

La G6P puede tener diferentes destinos metabólicos, dependiendo de la demanda de glucosa:

- 1- La vía glucolítica convierte a la G6P en dos moléculas de piruvato, produciendo 2 moles de ATP/mol de glucosa. En condiciones aeróbicas, el piruvato es oxidado en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos hasta CO_2 y agua, y a través de la fosforilación oxidativa se producen 36 moléculas de ATP/mol glucosa, en condiciones anaeróbicas el piruvato es transformado en lactato.
- 2- La G6P puede ser degradada en la vía de las pentosas la cual genera NADPH+ requerido en la biosíntesis de los ácidos grasos.
- 3- Cuando la demanda corporal de glucosa es baja puede ser almacenada en forma de glucógeno, principalmente en el hígado y músculo esquelético (Voet, et. al.1992).
- 4- En el hígado, la G6P es convertida a glucosa por la glucosa 6 fosfatasa y así es transportada al torrente sanguíneo para proveer a otros tejidos de glucosa en periodos de ayuno.

Glucógeno

Los animales almacenan glucosa en forma de glucógeno en el hígado y el músculo esquelético, aunque actualmente sabemos que otros tejidos como el riñón, tejido adiposo y cerebro son capaces de almacenarla. El glucógeno es un polímero formado por residuos de glucosa, que se depositan formando gránulos en el citosol, en estos gránulos están también contenidas las enzimas

responsables de su síntesis, la glucógeno sintasa (GS), y de su degradación, la glucógeno fosforilasa (GP). Estas son las dos enzimas principales del metabolismo del glucógeno y su regulación es una red metabólica compleja que involucra principalmente procesos de fosforilación y desfosforilación.

Síntesis de glucógeno

El glucógeno es un polímero ramificado formado por residuos de glucosa unidos por enlaces $\alpha 1-4$ y se ramifica por enlaces $\alpha 1-6$. La G6P es intercambiada a glucosa-1-fosfato por la enzima fosfoglucomutasa, y es convertida a UDP-glucosa por efecto de la enzima UDP-glucosa pirofosforilasa. La enzima GS es la que cataliza la unión de residuos de UDP-glucosa a la cadena del glucógeno; para el inicio de esta cadena se necesita la participación de la enzima glucogenina, que actúa como un cebador. La GS es un homodímero de 81kDa y se sabe que es controlada por la fosforilación reversible de múltiples residuos de serina (Bollen, et al. 1998). Esta enzima es regulada por fosforilación y se encuentra en dos formas, la GS_b que está fosforilada y es inactiva y la GS_a que no está fosforilada y es activa. Esta enzima es fosforilada y por lo tanto inhibida, por la enzima glucógeno sintasa cinasa 3 (GSK3) (Cohen, 1986. citado en Azpiazu, et al. 1996), y es desfosforilada en el músculo principalmente por la proteína fosfatasa 1 (PP1) y en el hígado por la proteína fosfatasa 2A (PP-2A) (Ingebristen, et al. 1983 citado en Villar-Palasi, et al. 1997); La insulina es el principal factor en la activación de la GS, además es regulada alostéricamente por diferentes metabolitos, principalmente por la G6P y el ATP (Leloir, et al. 1959 citado en Hanashiro, et al. 2002).

En mamíferos la GS se expresa en dos isoformas, producidas por dos genes, el gen GYS1 predominante en músculo y el gen GYS2 expresado en el hígado (Roach, et al. 2002 citado en Hanashiro, et al. 2002), aunque estas isoformas comparten el 70% en su secuencia de amino ácidos, en la región amino y carboxilo terminal donde se encuentran los sitios reconocidos de regulación por fosforilación existe poca homología (Fig.1) (Bai, et al.1990). Así encontramos que la isoforma de GS encontrada en el músculo no parece ser sensible a regulación alostérica, contrario a lo que ocurre con la isoforma predominante en el hígado (Ferrer, et al, 2003).

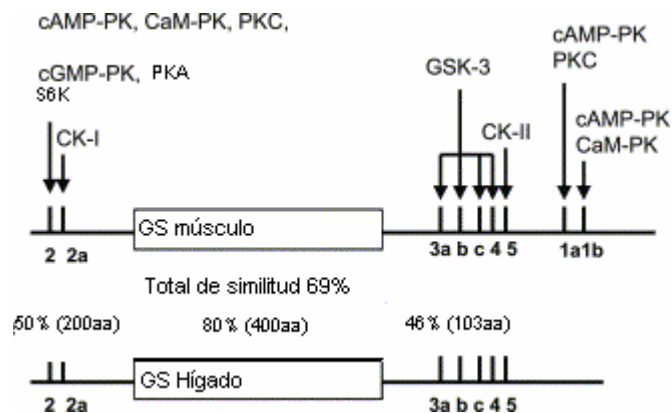


Figura 1. Comparación de la GS del hígado y músculo. La región central contiene los residuos catalíticos, los sitios de fosforilación conocidos en las terminales amino y carboxilo. Proteína cinasa dependiente de calmodulina (cAMP-PKC), Proteína cinasa dependiente de GMPc (cGMP-

PK), Proteína cinasa dependiente de AMPc (PKA), caseína cinasa I y II (CK-1, CKII), Glucógeno sítasa cinasa 3 (GSK3). Modificado de Ferrer, et al. 2003

Villar-Palasi y colaboradores en 1960 mostraron con experimentos *in vivo* que la insulina incrementa los niveles intracelulares de G6P en el diafragma y músculo esquelético. Otros experimentos *in vitro* mostraron que concentraciones elevadas de G6P son capaces de activar alostéricamente a la GS del músculo, lo que adicionalmente la hace más susceptible a la desfosforilación y por ende a su activación por proteínas fosfatasa 1 y 2 A, efecto que se revierte al regresar a condiciones basales (Fig. 2) (Villar-Palasi, C. 1994).

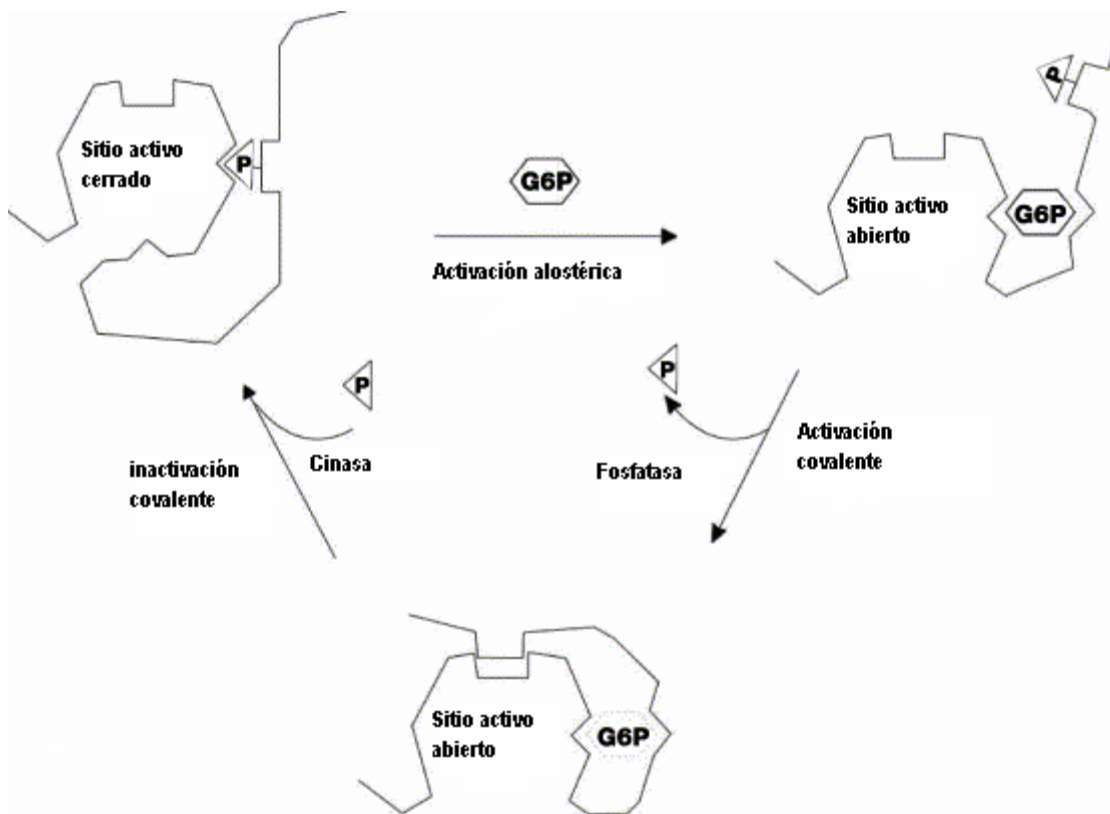


Figura 2. La G6P promueve un cambio conformacional en la GS lo que expone su sitio activo, este cambio la hace un mejor sustrato para las enzimas fosfatasas que inducen su desfosforilación y como consecuencia su activación. Modificado de Ferrer, et al. 2003

Ramificación del glucógeno

La ramificación de la molécula de glucógeno, es iniciada por la actividad de la enzima ramificadora, esta enzima rompe los enlaces α -1,4 formando enlaces α -1,6, esta ramificación del glucógeno es importante por que lo hace más soluble y además facilita un mayor número de sitios de acción para su degradación (Roach, P. J. 2002).

Degradación del glucógeno

El rompimiento de enlaces α -1,4 es catalizado por la enzima GP; esta enzima es un homodímero de aproximadamente 100kDa; existen 3 isoformas reconocidas principalmente por su localización en el hígado, músculo y cerebro (Newgard, et al. 1989 y Browner, et al. 1992. Citados en Bollen, 1998). Esta enzima se regula por fosforilación, a diferencia de la GS sólo cuenta con un sitio de fosforilación; así se encuentra en su forma “a” más activa (fosforilada) y “b” menos activa (desfosforilada) (Johnson, 1992); esta fosforilación y activación es catalizada por la enzima fosforilasa cinasa. Las isoenzimas de la GP del músculo y cerebro son activadas alostéricamente por AMP y son inhibidas por G6P; mientras que la isoenzima del hígado es controlada principalmente por fosforilación y en menor grado por regulación alostérica (Bollen, M.1998).

Los enlaces α -1,6 que forman las ramificaciones del glucógeno se rompen por la actividad de la enzima desramificadora, dejando enlaces α -1,4, estos enlaces pueden romperse por la GP formando glucosa 1 fosfato, que se convierte a G6P por la enzima fosfoglucomutasa.

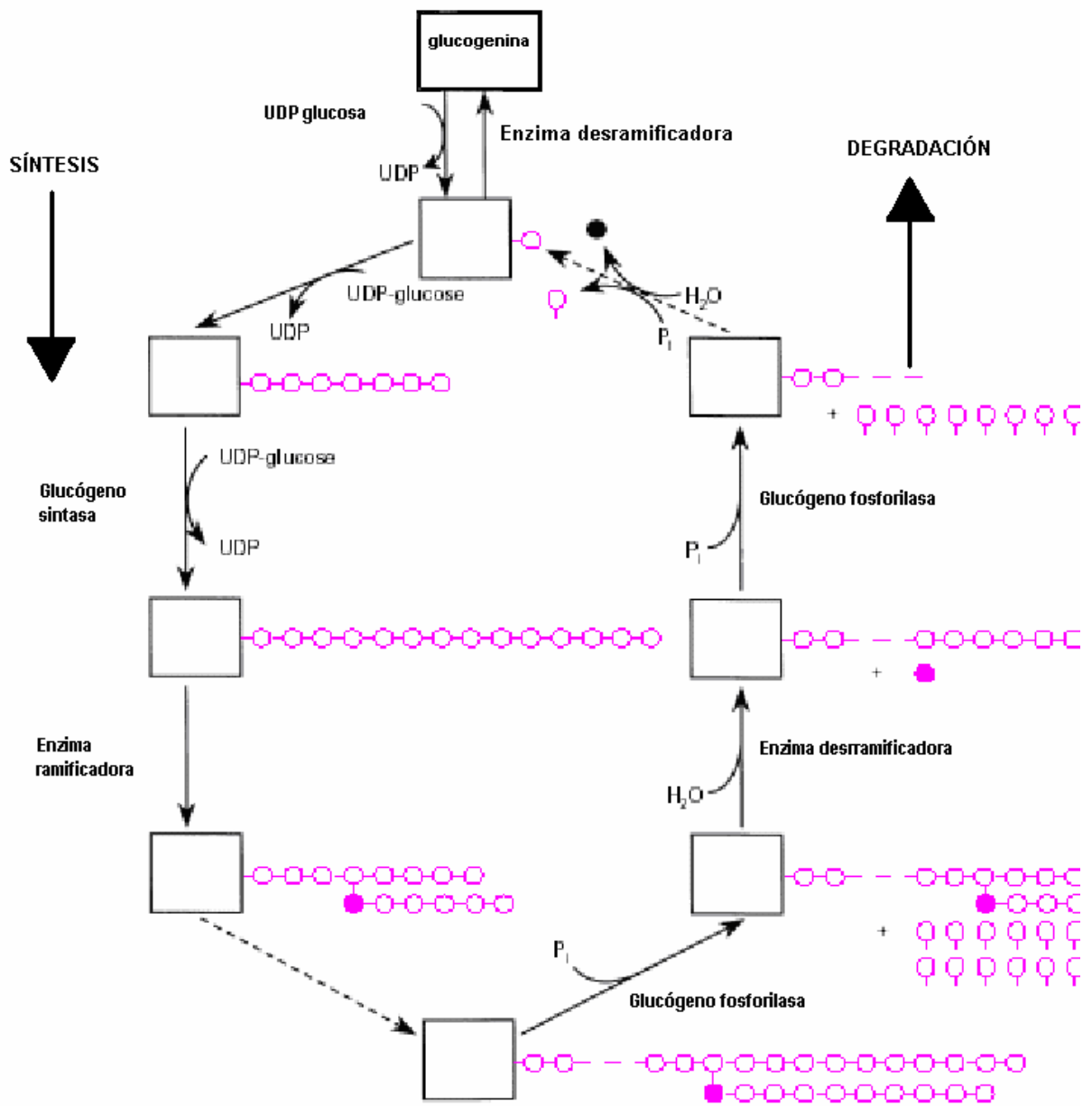


Figura 3. Pasos de síntesis y degradación del glucógeno. Modificado (Bollen, et al., 1998)

Regulación del metabolismo del glucógeno

Los animales experimentan periodos de ayuno y alimentación que provocan cambios en la concentración de glucosa plasmática, sin embargo esta variación se mantiene entre 4 y 7mM. Esta variación se debe a la absorción de glucosa desde el intestino, la producción de glucosa hepática, su absorción y metabolismo en órganos periféricos, y su control y equilibrio, procesos regulados por la insulina.

La insulina es una hormona polipeptídica con un peso molecular de 6000 Da, es la hormona anabólica más potente que se conoce, promueve el crecimiento y diferenciación celular, la lipogénesis, síntesis de glucógeno y proteínas (Saltiel, et al. 2002). Su acción principal en la homeostasis de la glucosa plasmática es incrementar la absorción de glucosa en el músculo esquelético y tejido adiposo, promover la síntesis de glucógeno e inhibir la gluconeogénesis y glucogenólisis en el hígado. En periodos de alimentación la concentración de glucosa plasmática aumenta, lo que lleva a la liberación de insulina de las células β pancreáticas al torrente sanguíneo.

La insulina induce una cascada de fosforilaciones, que comienza con la autofosforilación de su receptor (RI), que es una proteína transmembranal de la familia de cinasas de tirosina, está compuesto de dos subunidades α extracelulares que contienen el dominio de unión para la insulina y dos subunidades β , intracelulares con la actividad de proteína cinasa de tirosina (Cox, et al. 2005). Cuando la insulina se une a las cadenas α se induce la actividad de tirosina cinasa de las subunidades β , entonces cada monómero

fosforila tres residuos de tirosina del otro monómero, esta autofosforilación activa la actividad de cinasa del receptor y entonces ocurre la fosforilación de otras proteínas, la mayoría de estas proteínas blanco se encuentran básicamente en dos vías principales: la vía metabólica ó vía de la PI3K (fosfoinositol cinasa 3), y la vía mitogénica ó vía MAPK (proteínas cinasas activadas por mitógenos). La primera desemboca en la activación de GS. (Fig. 4). Tanto el RI como sus sustratos (IRS) son sensibles a fosforilaciones de residuos serina y treonina lo cual lleva a una disminución en su actividad de tirosina cinasa y a su cascada de señalización, provocando resistencia a insulina, de esta forma se provee retroalimentación negativa a la vía; existen varias cinasas involucradas en este proceso tales como la proteína fosfatidil inositol cinasa 3 (PI3K), Akt, glucógeno sintasa cinasa 3 (GSK3), la proteína cinasa C (PKC) y el receptor de rapamicina (mTOR) en mamíferos. Además la acción de la insulina puede ser atenuada por proteínas fosfatasas de tirosina (PTPasas), las cuales catalizan la desfosforilación de residuos de tirosina del RI y sus sustratos (Saltiel, et al. 2001)

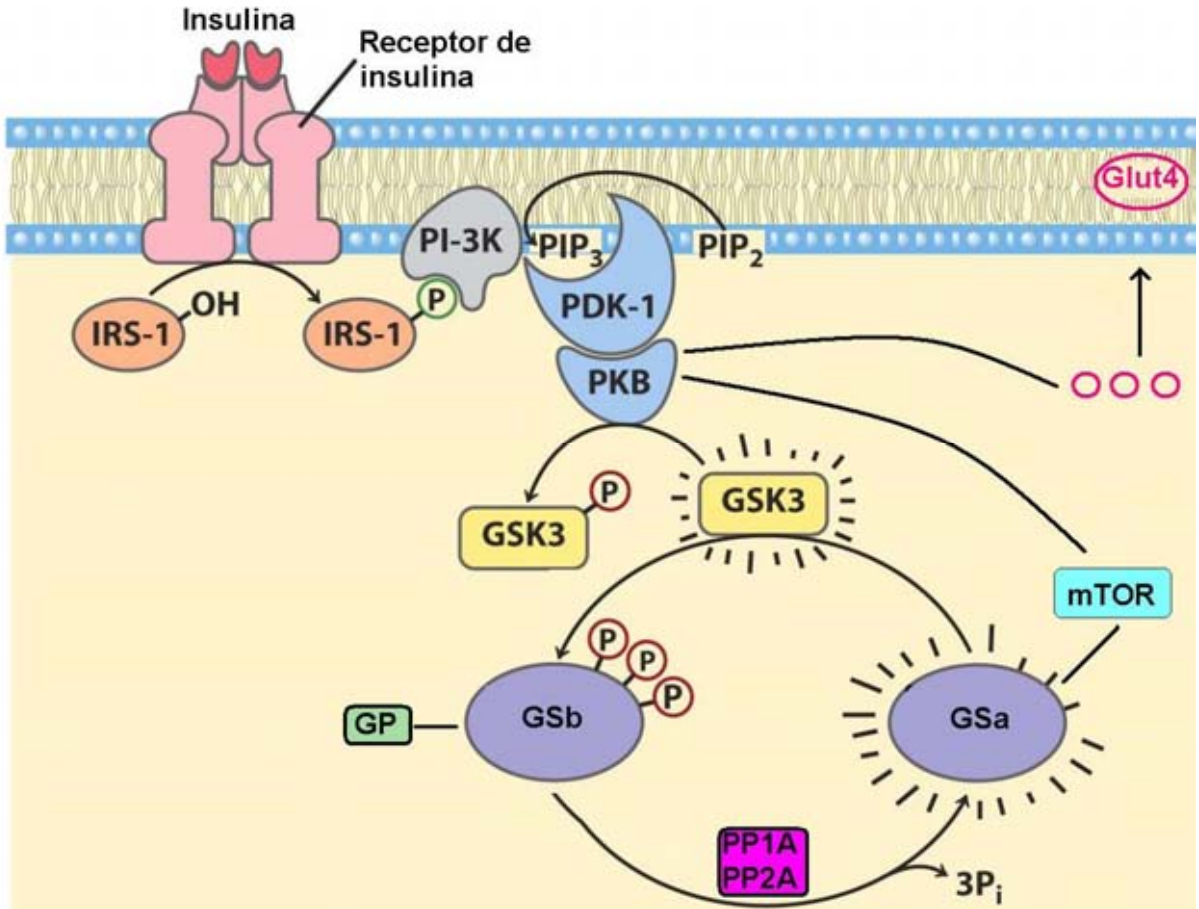


Figura 4. Control del metabolismo del glucógeno por la insulina. RI, receptor de insulina; IRS, sustratos del receptor de insulina; PI3K, fosfatidilinositol cinasa 3; PDK1, proteína cinasa 1 dependiente de fosfoinositido 3; mTOR, receptor en mamíferos de rapamicina; PKB, proteína cinasa B; GSK3, glucógeno sintasa cinasa 3; PP1A y PP2A, proteínas fosfatasas 1A y 2A; GS, glucógeno sintasa; GP, glucógeno fosforilasa; GLUT 4 transportador de glucosa, isoforma 4 (Modificado de cources.cm.utexas.edu).

En periodos de ayuno, cuando la concentración de glucosa en sangre disminuye, también disminuyen los niveles de insulina y las células α del páncreas secretan glucagon. En el hígado, esta hormona regula la tasa de producción de glucosa, aumentando la glucogenólisis y la gluconeogénesis e inhibiendo la síntesis de glucógeno; la adrenalina produce el mismo efecto en el músculo. El glucagon se une a un receptor asociado a proteínas G, lo que lleva a la estimulación de la enzima adenilato ciclasa, generándose monofosfato de adenosina cíclico (AMPc), el cual activa a la enzima GP a través de la activación de la proteína cinasa A (PKA), lo que lleva a la liberación de glucosa hacia el torrente sanguíneo (Fig. 3). Además el glucagon promueve la secreción de calcio de los depósitos intracelulares activando a la enzima PKC, provocando la fosforilación de residuos de serina y treonina del IR, causando la resistencia a insulina.

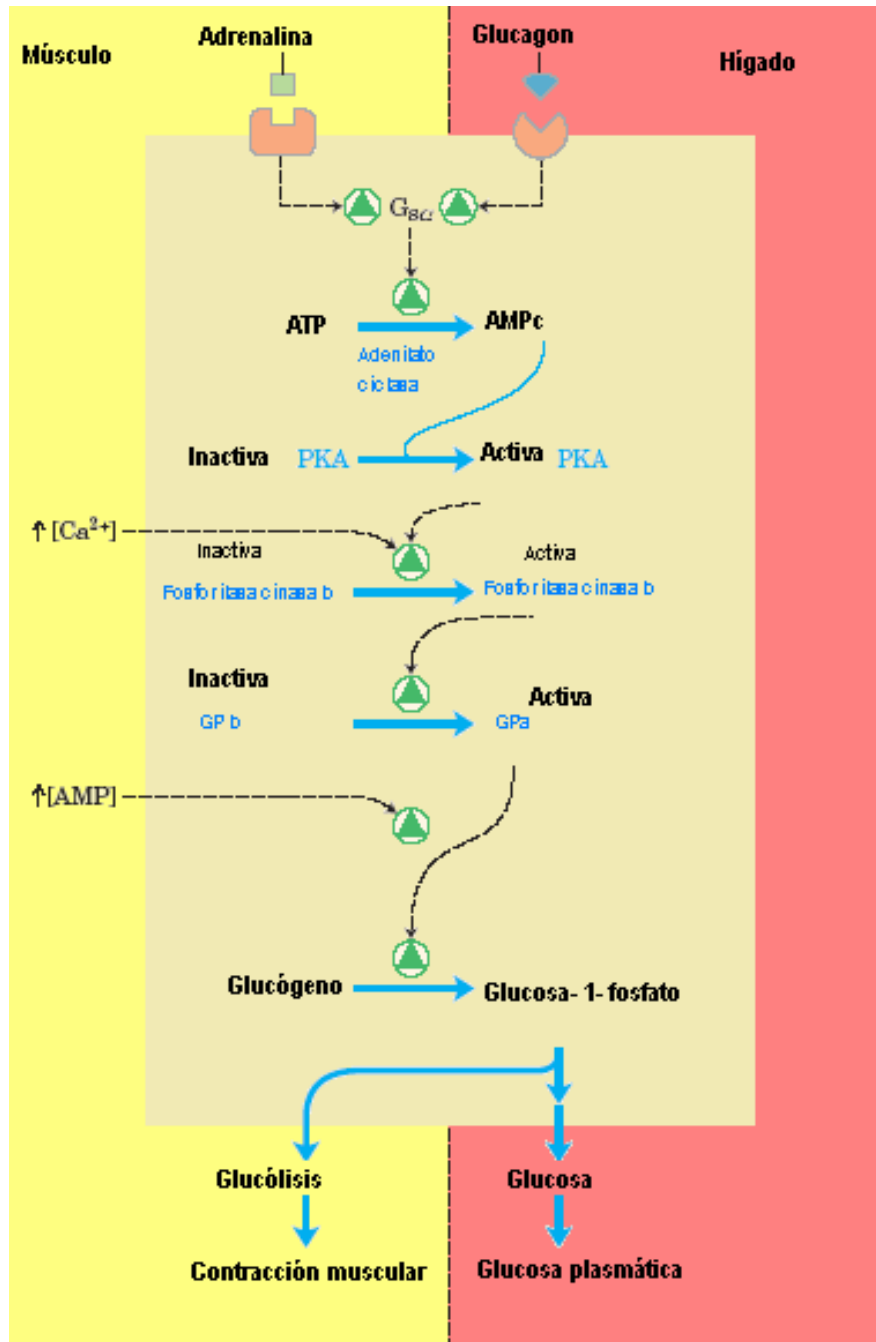


Figura 5. Señalización del glucagon en el hígado y músculo. GPb,a, glucógeno fosforilasa b y a (modificado de Cox, et al. 2005).

El desequilibrio de los mecanismos que regulan los niveles de glucosa en sangre, provoca trastornos metabólicos que en conjunto, se conocen como *Diabetes mellitus*.

Diabetes mellitus

La diabetes mellitus se caracteriza por un desequilibrio en la homeostasis de la glucosa que lleva a un aumento de glucosa en la sangre (hiperglucemia), ocasionado principalmente por la falta de insulina o por la resistencia a ésta. Inicialmente, la ausencia o resistencia de insulina afecta la entrada de glucosa a los tejidos periféricos y el hígado libera glucosa a partir de sus reservas de glucógeno y de la gluconeogénesis, contribuyendo así al aumento de glucosa en la sangre.

Se conocen dos tipos básicos de diabetes: Diabetes tipo 1 ó diabetes insulino-dependiente, se caracteriza por una falta en la producción de insulina por parte de las células β pancreáticas, posiblemente ocasionado por una respuesta inmunológica que destruye a las propias células β del páncreas; generalmente se asocia a una predisposición genética en la que parecen estar implicados varios genes, aunque se consideran también importantes algunos factores ambientales como infecciones virales y toxinas. La diabetes tipo 2 o insulino-independiente se genera por una resistencia a la insulina, este tipo de diabetes se atribuye a fallas en el sistema de transducción de señales producidos por esta hormona. En pacientes con diabetes tipo 2 se encuentra sustancialmente reducida la actividad de tirosina cinasa del RI (Kellerer, et. al, 1995 y Grasso, et

al. 1995), y una reducción importante en la activación de la PI3K (Cantley, 2002 y Standaert. et. al, 2002). Los mecanismos celulares y moleculares involucrados en el desarrollo de la diabetes tipo 2 son múltiples y aún poco conocidos. En general se caracteriza por defectos a varios niveles: disminución de la concentración y actividad de cinasa del RI, de la concentración y fosforilación de los sustratos del receptor de insulina 1 y 2 (IRS1, 2) y de alteraciones en la traslocación a la membrana del transportador de glucosa Glut 4 (Pessin, et al, 2000).

Durante esta enfermedad los problemas crónicos son consecuencia de desórdenes metabólicos que ocurren en los diferentes tejidos. Con respecto al glucógeno se ha reportado que en el músculo esquelético de humanos los niveles de glucógeno (Schluman, et al. 1990) y la activación de la enzima GS (Rothman, et al 1992) disminuyen, al igual que el transporte de glucosa y su fosforilación (Villar-Palasi, et al. 1994); resultados semejantes se observaron en hepatocitos de ratas diabéticas, donde la activación de la GS y los niveles de glucógeno disminuyen. Por el contrario, el contenido de glucógeno en el riñón de ratas con diabetes experimental inducida con estreptozotocina se incrementa hasta 30 veces con respecto a las ratas normales (Khandelwal, et al, 1979); asimismo, se encontraron niveles más altos de glucógeno en las retinas de ratas tratadas con estreptozotocina (Luna, 2004).

La Diabetes mellitus representa uno de los principales problemas de salud pública, México ocupó el cuarto lugar mundial en 1995 con casi 4 millones de enfermos. Se estima que en el año 2025 ocupará el séptimo lugar mundial con

12 millones de enfermos (Kuri, et al. 2001). Esta enfermedad es una de las principales causas de amputación de miembros inferiores, insuficiencia renal, malformaciones congénitas, retinopatía diabética y otros problemas de salud agudos y crónicos.

Una de las complicaciones más frecuentes de la diabetes es la retinopatía diabética. Identificar las alteraciones en el metabolismo de la retina, así como intentar conocer cuales son los mecanismos que desencadenan la retinopatía, son preguntas que han llevado a realizar muchos estudios, sin embargo, poco se conoce aún con respecto a las alteraciones metabólicas en la retina ocasionadas por la diabetes.

La Retina: estructura y función

El proceso visual se inicia en la retina, órgano fotosensible que se encuentra en el fondo del ojo (Fig. 4), muchos organismos perciben el medio que les rodea a través de la visión y esto les permite responder a muchos de los constantes cambios que ocurren en su ambiente.

La señal luminosa atraviesa la córnea, la cámara anterior, el cristalino y el humor vítreo hasta llegar a la retina, cuya función es capturar fotones y transformarlos en impulsos nerviosos, que son transmitidos a través del nervio óptico hasta la corteza visual donde se analizan e integran formando una imagen visual.

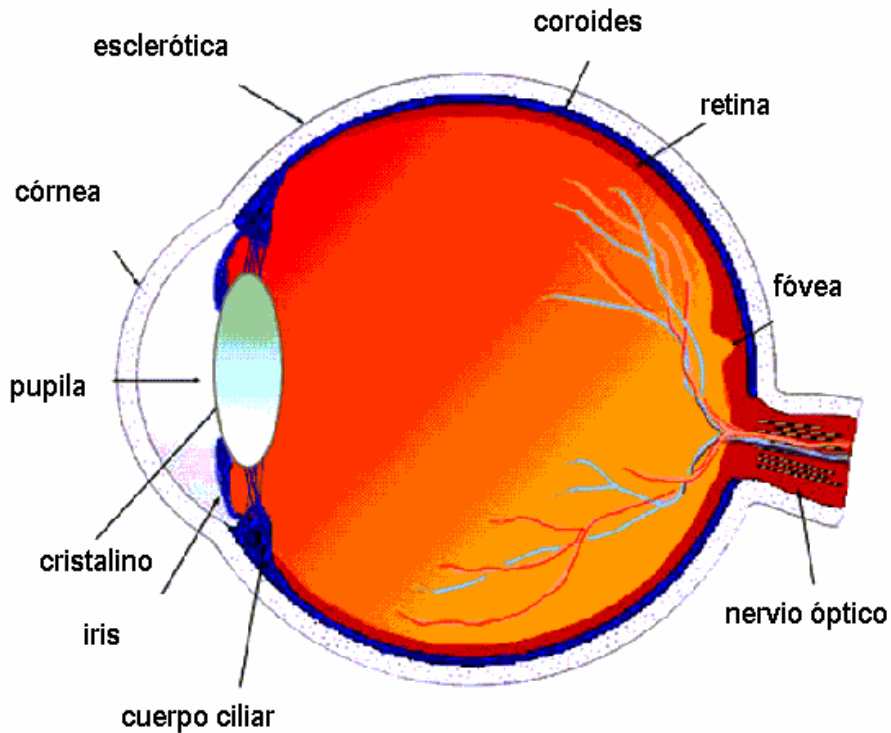


Figura 6. Estructura del ojo de los vertebrados

La retina de los vertebrados está compuesta por el epitelio pigmentario y la retina neural (Fig. 5). El epitelio pigmentario retiniano (EP) está formado por una monocapa de células neuroepiteliales, localizadas entre los capilares de la coroides y la retina neural (Salceda, R. 1998). La retina neural está compuesta por diferentes tipos celulares organizados en cinco capas. La capa nuclear externa que se forma por las células fotorreceptoras, conos y bastones, cuyos segmentos externos están en contacto directo con el EP; la capa nuclear interna formada por células bipolares, horizontales, amacrinas e interplexiformes; y por último la capa de células ganglionares. También existen en la retina las células de Müller ó células gliales que se extienden desde la capa de células ganglionares, hasta rodear los segmentos internos de los fotorreceptores. Estas tres capas celulares se encuentran interconectadas por la capa sináptica externa

que contiene las sinápsis entre fotorreceptores y células de la capa nuclear interna, y la capa sináptica interna que comprende las sinapsis entre las células de la capa nuclear interna y las células ganglionares. Los axones de las células ganglionares forman el nervio óptico (Salceda, R. 1998). (Fig. 5)

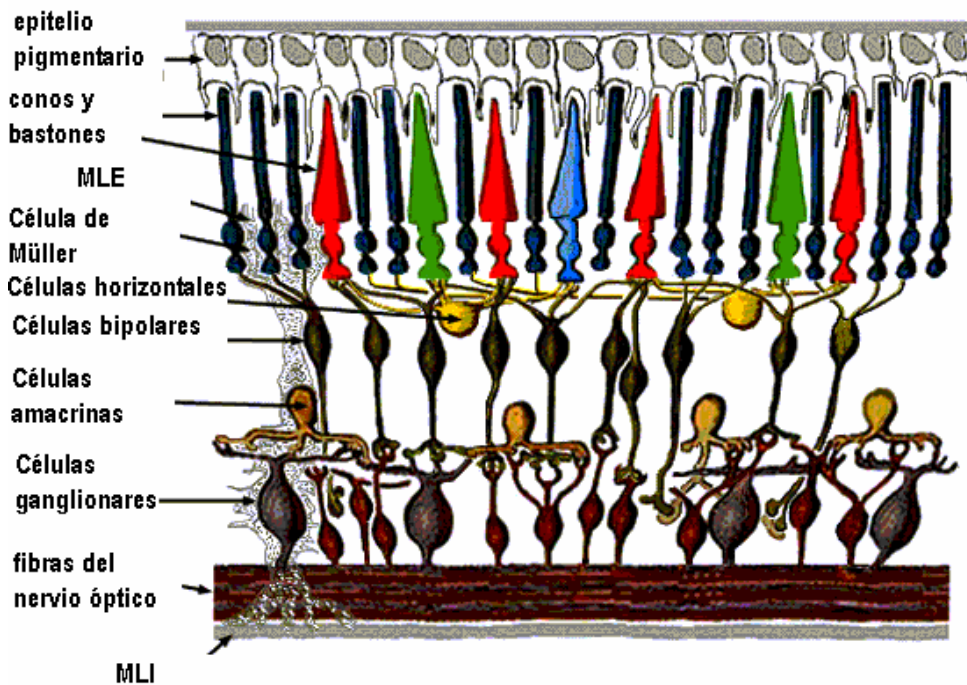


Figura 7. Estructura general de la retina de los vertebrados

La retina se separa del sistema de circulación sanguínea por la barrera hematorretiniana, y recibe suplementos nutricionales a través de la circulación retiniana y los vasos de la coroides (Bito, et al. 1978 citado en Antonetti, et al. 2006). Los capilares retinianos son los principales suministradores de glucosa y oxígeno de las capas internas de las retinas vascularizadas, en tanto que las células fotorreceptoras reciben sus nutrientes principalmente de la circulación

coroidea. Las células de Müller y astrocitos transportan sustratos como el lactato y aminoácidos de la circulación hacia las neuronas (Gardner, et al. 1997). En la retina de los mamíferos, las células de Müller son capaces de almacenar glucógeno (Kuwabara y Cogan 1961), lo que hace probable que tengan la capacidad de proveer glucosa a otras células de la retina; las células de Müller también regulan las concentraciones extracelulares iónicas y participan con las neuronas en el ciclo glutamato/glutamina importante en la neurotransmisión sináptica (Gardner, 1997). El EP, como parte de la barrera hematorretiniana es una barrera selectiva al paso de una variedad de moléculas provenientes de la circulación coroidal hacia la región externa de la retina, remueve el ácido láctico de la retina, fagocita los segmentos externos de los fotorreceptores, absorbe el exceso de luz y participa con las células fotorreceptoras en el ciclo de la vitamina A (Strauss, O. 2005).

Metabolismo de la glucosa en la retina

La glucosa es la principal fuente de energía para la retina, en donde se encuentra altamente expresado el transportador de glucosa GLUT1, al igual que en las células del EP (Pascuzzo, et al 1980). Los estudios metabólicos en la retina han demostrado que tiene una alta tasa respiratoria, de hecho la retina neural tiene la tasa más alta de respiración que cualquier otro tejido examinado *in vitro* (Cohen y Noel, 1960, 1965; Graymore 1970, citados en Berman, E. R 1991). A pesar de esta alta tasa respiratoria, la mayoría de la glucosa usada en la retina es convertida a lactato; se estima que el consumo de glucosa en la

retina en presencia de oxígeno es de $0.73\mu\text{mol}/\text{mg}$ de peso seco por hora, y cerca del 70% de la glucosa utilizada aeróbicamente es convertida a lactato (Winkler, 1981), este fenómeno se presenta en todas las capas de la retina sin embargo es más prominente en la capa de células fotorreceptoras.

Diversos estudios mostraron la dependencia de la glucosa en la actividad eléctrica de la retina (Ames 1963; Winkler 1972) sugiriendo que en este tejido no existen reservas energéticas. En 1972 con un análisis histoquímico Schabadasch y colaboradores demostraron la distribución de glucógeno en todas las capas de la retina de la rana. En general en los mamíferos se muestra la presencia de glucógeno, principalmente en las células de Müller, (Kuwabara, et al. 1961) así como la presencia de la GP (Pfeiffer, et al. 1994). En 1988, Goldman sugirió que gran parte del glucógeno almacenado en las células de Müller es producto de la vía gluconeogénica.

Estudios previos en nuestro laboratorio demostraron la presencia de glucógeno en la retina de la rata y que su concentración varía dependiendo de las concentraciones de glucosa extracelular y las condiciones de luz-oscuridad, (Coffe, et al 2004) sugiriendo que el glucógeno participa como reserva energética en la retina.

Importancia de la insulina en la retina

Los efectos de la insulina que afectan el metabolismo de los carbohidratos, ocurren principalmente en el músculo esquelético y el tejido adiposo, sin embargo, diversos estudios demostraron la presencia del receptor de insulina y

de la propia insulina (HavranKova. et al. 1978; Havrankova et al, 1981, 1983) en el cerebro, específicamente en el bulbo olfatorio, hipotálamo, corteza cerebral y en el hipocampo (Plum et al. 2005). Asimismo estudios in vitro demostraron que la insulina regula el transporte de la glucosa en las células gliales (Clarke, et al. 1984). La función de la insulina en el sistema nervioso central no es clara, sin embargo se sugiere que puede participar en procesos de desarrollo, plasticidad neuronal, aprendizaje y memoria (van der Heide, et al. 2006).

En la retina diversos estudios sugieren la importancia del RI en la función retiniana, al demostrar que esta proteína se expresa en la retina y EP (Waldbillig, et al. 1987) en cantidades equivalentes a las encontradas en hígado y cerebro (Naeser, 1997). Sin embargo se han encontrado diferencias fisiológicas en la retina donde los periodos de ayuno y alimentación no afectan la actividad de cinasa de tirosina del RI fenómeno que ocurre también en el cerebro (Simon, et al. 1986), contrario a lo que ocurre con el RI en hepatocitos y músculo (Reiter, et al. 2003). En la retina la fosforilación del RI aumenta 30 minutos después de aplicarse una inyección de insulina (Rodrigues, et al. 1988; Waldbillig, et al, 1991), mientras que en el hígado y el músculo ocurre en menos de 90 segundos. Se sugiere que estas diferencias se deben a la presencia de la barrera hematorretiniana que pudiera mantener niveles de insulina relativamente estables en la retina.

Retinopatía diabética

La retinopatía diabética es una complicación crónica de la diabetes mellitus; se caracteriza inicialmente por microaneurismas, hemorragias retinales, exudados

duros y algodonosos, dilatación venosa y nueva producción de vasos. Sin embargo existen otros síntomas incluso antes de que sea diagnosticada la retinopatía como son: pérdida de la visión nocturna, falta en la sensibilidad a los colores y contrastes así como electroretinogramas alterados (Antonetti, et al. 2006). En las retinas de animales diabéticos se han observado las siguientes alteraciones: activación de la PKC (Koya et al. 1998), glucosilación no enzimática (Brownlee. 2001), incremento en la síntesis de hexosamina y producción de especies reactivas de oxígeno (Nakamura et al. 2001).

Experimentos previos de nuestro laboratorio mostraron que en un modelo experimental de diabetes, los niveles de glucógeno en la retina de la rata aumentan hasta 3 veces con respecto al control y que además existe un aumento en la actividad de GS (Hernández, 2003). La administración *in vitro* de iodoacetato inhibidor de la enzima gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa (G3PDH), causó un aumento significativo en los niveles de glucógeno, lo que permite proponer un aumento en la G6P y a ésta como activador alostérico de la GS, asimismo cuando las retinas fueron incubadas en presencia de 10ng/ml de insulina, el glucógeno incrementó cerca del 40%, evidenciando el papel de la insulina como inductor de la síntesis de glucógeno (Luna, 2004).

Con respecto a la regulación del metabolismo del glucógeno por insulina, Zetterström y colaboradores en 1992 observaron una mayor expresión de RI en la retina de ratas diabéticas con respecto a las ratas control; sin embargo, se demostró que en ratas diabéticas se altera la señalización de la vía de PI3K, paralelamente a un incremento en la apoptosis en la retina (Reiter, et al. 2006),

Por lo anterior consideramos que el esclarecimiento de los mecanismos que causan estos desórdenes metabólicos en la retina es fundamental para entender la retinopatía diabética.

Considerando que: La GS se activa por la acción de la insulina y que en ratas con diabetes tipo 1 no hay insulina, resulta contradictorio el que en las retinas de animales diabéticos los niveles de glucógeno sean mayores a los encontrados en animales control, se puede sugerir entonces que la activación de GS en los animales diabéticos, se debe a un aumento en la concentración de su activador alostérico, la G6P.

3.- HIPÓTESIS

Los niveles de G6P en las retinas de ratas tratadas con estreptozotocina, serán mayores a los encontrados en retinas de ratas control. Estos niveles de G6P estarán relacionados con la concentración de glucógeno y con la actividad de la enzima glucógeno sintasa.

2.- OBJETIVOS

I Determinar los niveles de G6P en la retina y epitelio pigmentario de ratas normales y diabéticas.

II Determinar *in vitro* el efecto de la insulina en los niveles de G6P en la retina.

III Comparar los niveles de G6P en la retina con la concentración de glucógeno y la actividad de GS

4.- MÉTODOS

En este trabajo se usaron ratas adultas de la cepa Long-Evans con un peso de 170-200g. La diabetes se indujo por la inyección intraperitoneal de estreptozotocina (97.4mg/kg) repartida en dos días consecutivos, el tercer día después de iniciar el tratamiento se consideró como primer día de inducción de la diabetes. Las ratas se utilizaron 20 y 45 días después de la administración de estreptozotocina (STZ). Las ratas se consideraron diabéticas si los niveles de glucosa en sangre fueron iguales o mayores a 300mg/dl. La glucosa en plasma se determinó con un medidor instantáneo de glucemia marca ROCHE al momento de sacrificarlas.

En un grupo de ratas diabéticas se estudió el efecto de la insulina: al tercer día del tratamiento con, se les administró 5U de insulina por vía subcutánea. La insulina se aplicó cada tercer día durante 45 días.

Las ratas se decapitaron y se extrajo la retina, epitelio pigmentario, hígado, riñón y corteza frontal del cerebro, en un medio salino (NaCl al 0.9%) frío; las retinas y EP de un animal, así como 30mg de los otros tejidos se homogenizaron con 500µl de HClO₄ al 6%. Después de 15 minutos se centrifugó a 10621g durante 10 minutos a 4° C y el pH del sobrenadante se neutralizó con una mezcla de KOH-KHCO₃, se centrifugó de la misma forma, el sobrenadante se congeló para la posterior determinación de G6P.

Con el fin de determinar si la insulina modifica los niveles de G6P y glucógeno la retina y el EP se incubaron en medio Krebs (NaCl 118mM, KCl 4.7mM, KH₂PO₄ 1.2mM, CaCl₂ 2.5mM, MgSO₄ 1.17mM, glucosa 5.6mM) durante 10 minutos, al

cabo de los cuales se agregó insulina (10ng/ml) y se incubo por 10 minutos mas. Cuando se utilizaron inhibidores de las enzimas de la vía de señalización de la insulina (tabla 1), estos se adicionaron 10 minutos antes de la insulina. La incubación se terminó con la homogenización en HClO₄ al 6% para la determinación de G6P o con agua para la determinación de glucógeno.

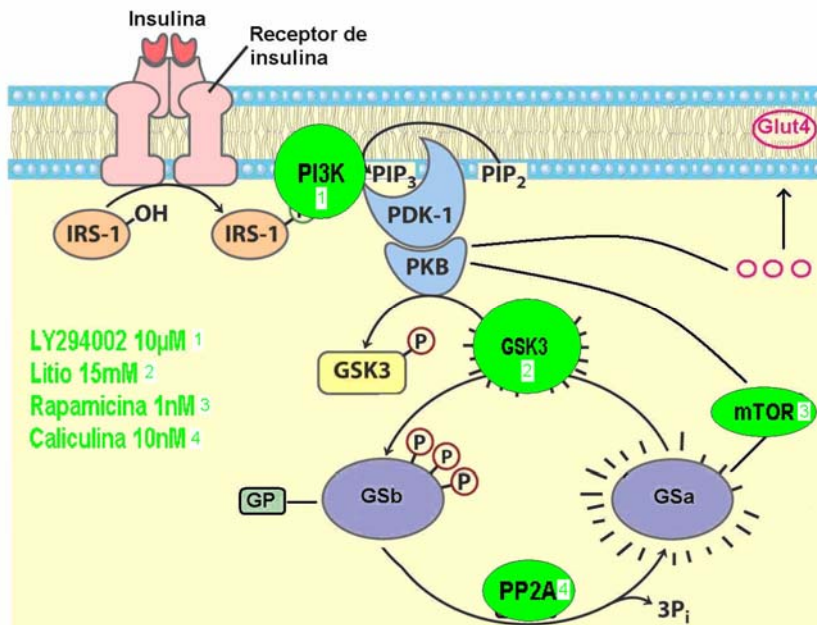


Figura 8. Inhibidores de la vía de la insulina.

Determinación de G6P

La G6P se determinó por el método espectrofotométrico de Gerhard Michal, 1984. Este método está basado en la formación de NADPH a partir de G6P por la siguiente reacción:

G6P DH



En esta reacción la glucosa 6 fosfato es oxidada a gluconolactona 6 fosfato por la acción de la enzima glucosa 6 fosfato deshidrogenasa, y el NADP se reduce a NADPH.

Las muestras se descongelaron a temperatura ambiente y permanecieron en hielo, la mezcla de reacción consistió en 500µl de la muestra, 10µl de MgCl 500mM, 10µl de NADP 24mmol/l, en un mililitro de Buffer Trietanolamina 400mM pH 7.6. La concentración inicial de NADPH se obtiene por la densidad óptica a 340 nm, después se adicionaron 5µl de G6P-DH (5U/ml), y a los 5 minutos se mide la densidad óptica (D.O.). La diferencia en D.O entre las dos lecturas representa al NADPH formado. La concentración se calculó utilizando un coeficiente de extinción molar de 6.3×10^2 (mM⁻¹.cm⁻¹).

Determinación de glucógeno

La determinación de glucógeno se basó en el método de Lust, et al. 1975 y Keppler y Decker 1983.

Cada retina y EP fueron homogenizados con 400µl de agua y se tomó una alícuota para proteínas, al resto del homogenado se le adicionó NaOH 100mM para precipitación de proteínas, las muestras se incubaron en un baño seco a 80°C durante 1 hora, para degradar la glucosa endógena, se precipitó el glucógeno con 1ml de etanol frío. Las muestras se centrifugaron a 14,000g durante 15 minutos a 4° C, se eliminó el sobrenadante, y el pellet se secó al vacío en una centrifuga liofilizadora. El pellet se resuspendió con 490µl de buffer

acetato de sodio 50mM, pH 4.5 y se sonicó durante 20 minutos. Para digerir el glucógeno se agregaron 10µl de la enzima amiloglucosidasa (1.4U) y se incubó en un baño seco a 37°C durante una hora. Una alícuota de las muestras se incubó en una mezcla de reacción que contiene: ATP 2mM, NADP 2mM, hexocinasa 3U/ml, glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa 8.5 U/ml, MgSO₄ 4mM, buffer trietanolamina 300mM pH 7.6; durante 15 minutos a temperatura ambiente, y se determinó la aparición de NADPH por absorbancia a 340nm en un lector de micro placas. La concentración de glucógeno se determinó utilizando una curva estándar de glucosa.

La cantidad de proteína se determinó de acuerdo al método de Lowry (1951) utilizando un paquete comercial de BIO-RAD, y se utilizó la albúmina como proteína de referencia.

Para el estudio de correlación lineal, se compararon resultados obtenidos en el presente trabajo con datos previos de nuestro laboratorio (Luna, 2004 y Hernandez, 2003).

Análisis estadísticos

Los resultados fueron analizados con una prueba de T y correlación lineal. Utilizando el programa *Graph Pad Prism 4*.

RESULTADOS

Los niveles plasmáticos de glucosa en los animales tratados con STZ fueron tres veces mayores a los encontrados en las ratas control, tanto a los 20 como a los 45 días de tratamiento. La administración de insulina a las ratas diabéticas no modificó la concentración de glucosa plasmática (tabla 1).

Condición	Glucosa mg/dl
Controles	154 ± 27
Hiperglicemicas de 20d	454 ± 78
Hiperglicemicas 45d	421 ± 96
Hiperglicemicas 45d + insulina	408 ± 89

Tabla 1. Niveles sanguíneos de glucosa en las ratas sometidas a los tratamientos: controles, diabéticas (inducida con STZ) de 20 días y 45 días. Diabéticas de 45 días tratadas con insulina. La concentración de G6P en los animales control, fue diferente en cada tejido; el EP presentó los niveles más altos seguido del hígado, retina, corteza y riñón (tabla 2).

Tejido	G6P pmol/mg prot
Retina	14 ± 2
EP	370 ± 70
Riñón	6 ± 1
Hígado	35 ± 3
Cerebro	9 ± 2

Tabla 2. Contenido de G6P en los diferentes tejidos de ratas control.

La concentración de G6P aumentó de 6 a 10 veces en la retina, cerebro y riñón a los 20 días después del tratamiento con STZ; por el contrario, en el hígado y el EP se observó un descenso de 2 a 3 veces. Después de 45 días de la administración de STZ los niveles de G6P en cerebro y riñón fueron entre 4 y 8 veces más altos que los de los animales control. En el EP los niveles de G6P se mantuvieron bajos y en el hígado y la retina fueron semejantes a los observados en los animales control (Fig. 9-13).

En las ratas diabéticas tratadas con una dosis baja de insulina, los niveles de G6P en el riñón fueron semejantes a los de las ratas diabéticas. En el resto de los tejidos estudiados los niveles de G6P fueron de 2 a 4 veces más altos que en los animales diabéticos de 45 días (Fig. 9-13).

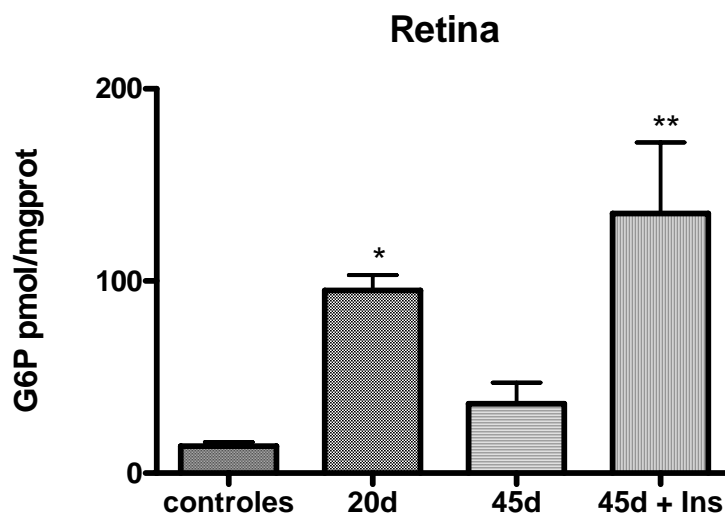


Figura 9 Contenido de G6P en la retina de la rata bajo diferentes condiciones: 20 días con diabetes (20d), 45 días con diabetes (45d), y 45 días con diabetes y tratamiento de insulina. Diferencia significativa con respecto al control * $P < 0.0001$, con respecto a 45 días diabéticas ** $P = 0.02$.

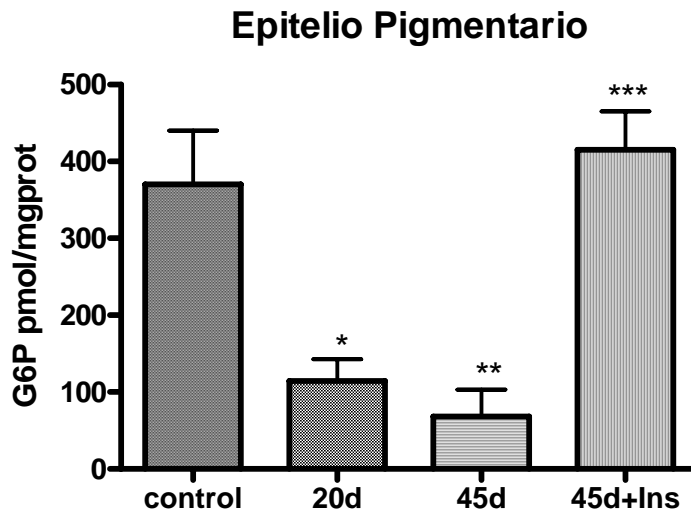


Figura 10 Contenido de G6P en el EP de la rata bajo diferentes condiciones: 20 días con diabetes (20d), 45 días con diabetes (45d), y 45 días con diabetes y tratamiento de insulina. Diferencias significativas contra control * P = 0.01, ** P = 0.005. Con respecto a ratas diabéticas de 45 días *** P = 0.001

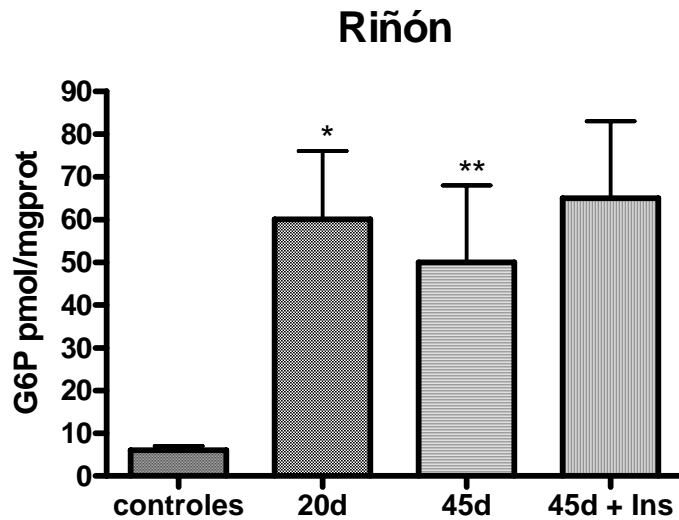


Figura 11. Niveles de G6P en el riñón de la rata bajo diferentes condiciones: 20 días con diabetes (20d), 45 días con diabetes (45d), y 45 días con diabetes y tratamiento de insulina. Diferencia significativa con respecto a ratas controles * P = 0.006, ** P = 0.04.

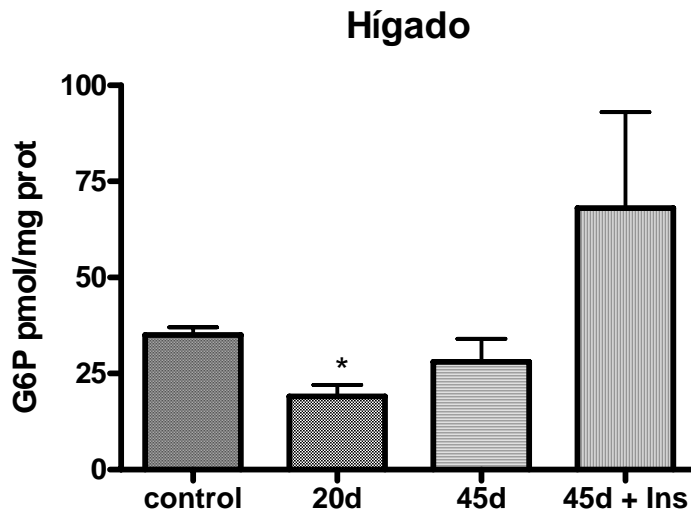


Figura 12. Contenido de G6P en el hígado de la rata bajo diferentes condiciones: 20 días con diabetes (20d), 45 días con diabetes (45d), y 45 días con diabetes y tratamiento de insulina. Diferencia significativa con respecto al control * P = 0.006.

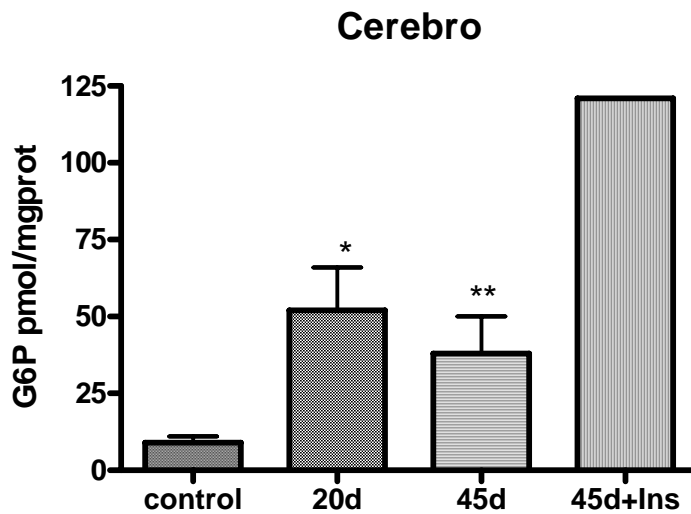


Figura 13. Niveles de G6P en el cerebro de la rata bajo diferentes condiciones: 20 días con diabetes (20d), 45 días con diabetes (45d), y 45 días con diabetes y tratamiento de insulina. Diferencia significativa con respecto al control * P = 0.01, ** P = 0.04

Niveles de G6P *in vitro*

Cuando las retinas de ratas control se incubaron en un medio de Krebs normal, se observaron niveles de G6P de 0.18 nmol/mg prot niveles que disminuyeron 40% en las retinas incubadas con insulina (10ng/ml). Los niveles de G6P no se modificaron de manera significativa cuando la retina se incubó en presencia de diferentes inhibidores de la vía de la insulina. Resultados semejantes de observaron en el EP, los niveles de G6P fueron de 0.47 nmol/mg prot cuando se incubó en un medio normal; la presencia de insulina causó un descenso del 40%. Estos niveles no se modificaron significativamente cuando el tejido se incubó en presencia de inhibidores de la vía de la insulina (figura 8) (Fig. 14B y 15B).

Los niveles de glucógeno se estudiaron en la retina y el EP de ratas control, cuando fueron incubados en presencia de insulina aumentaron un 40% en ambos tejidos, y al adicionar los distintos inhibidores de la vía de señalización de la insulina, no se encontraron cambios significativos (Fig. 14A y 15B).

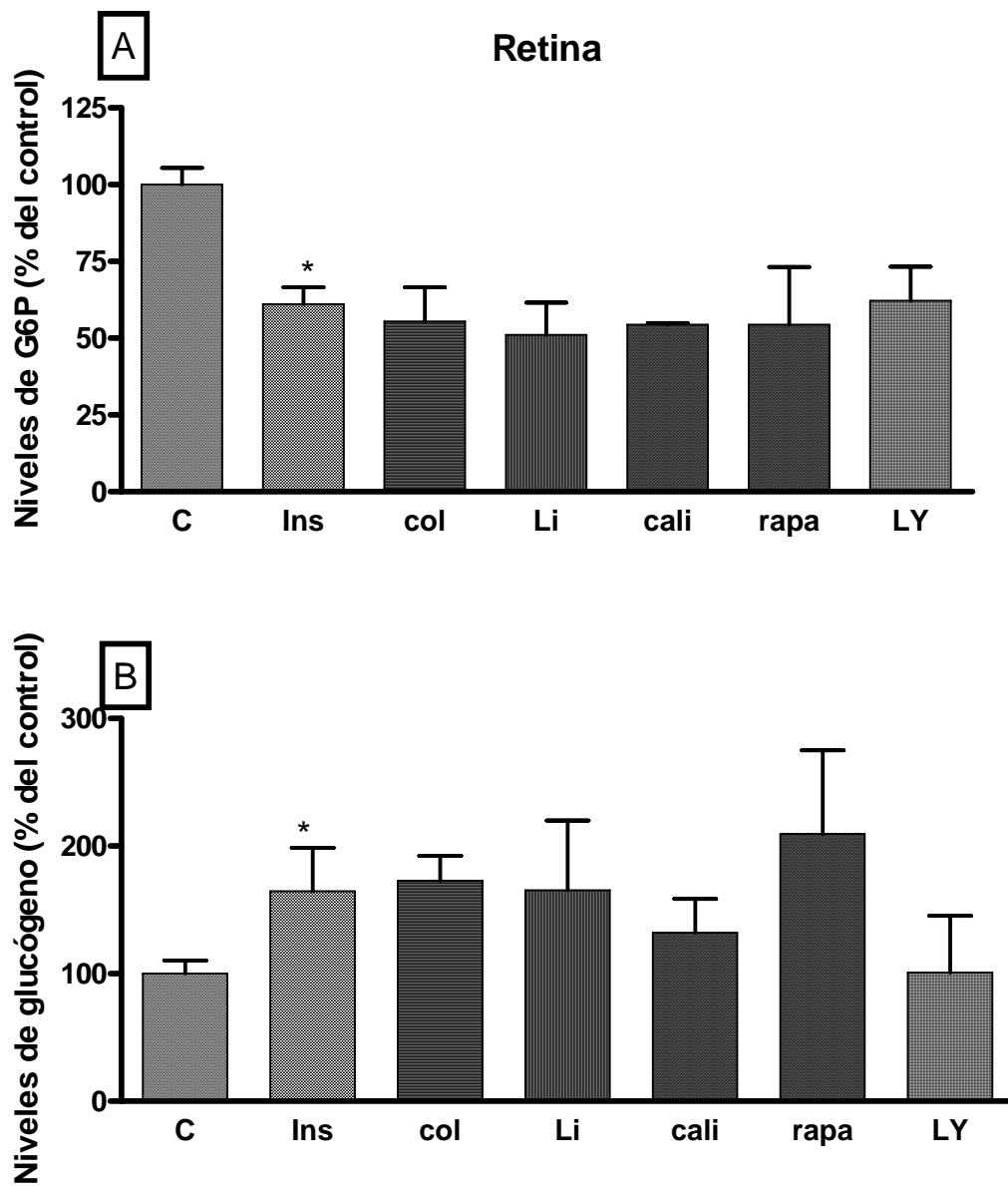


Figura 14. Porcentaje de los niveles de G6P (A) y glucógeno (B) en retinas de ratas normales incubados durante 20 minutos a 37° en presencia de: Insulina 10ng/ml (Ins), colina 15mM (col), litio 15mM (Li), caliculina 10nM (Cali), rapamicina 1nM (rapa), LY294002 10µM (LY). Diferencia significativa con respecto al control *p 0.01

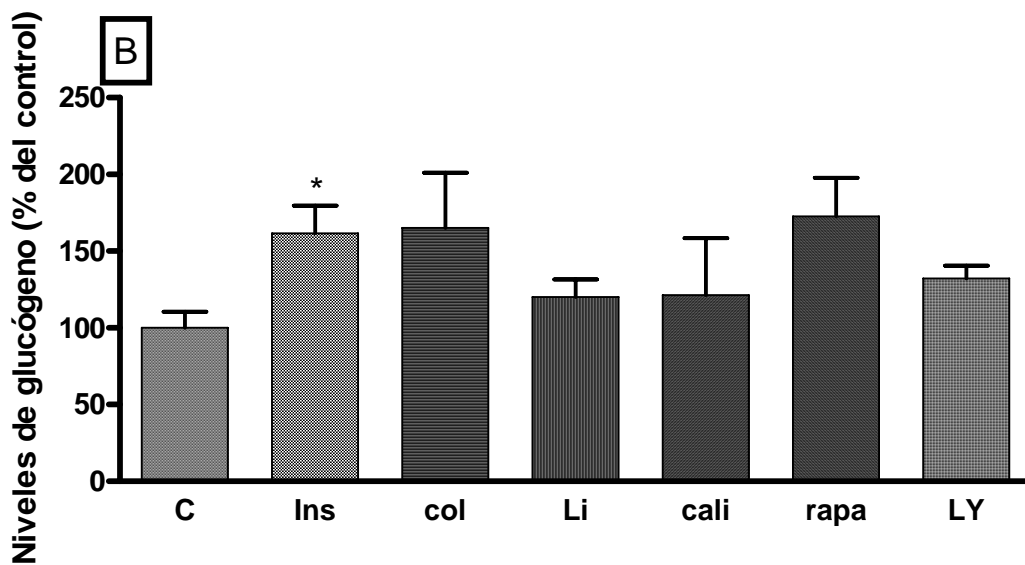
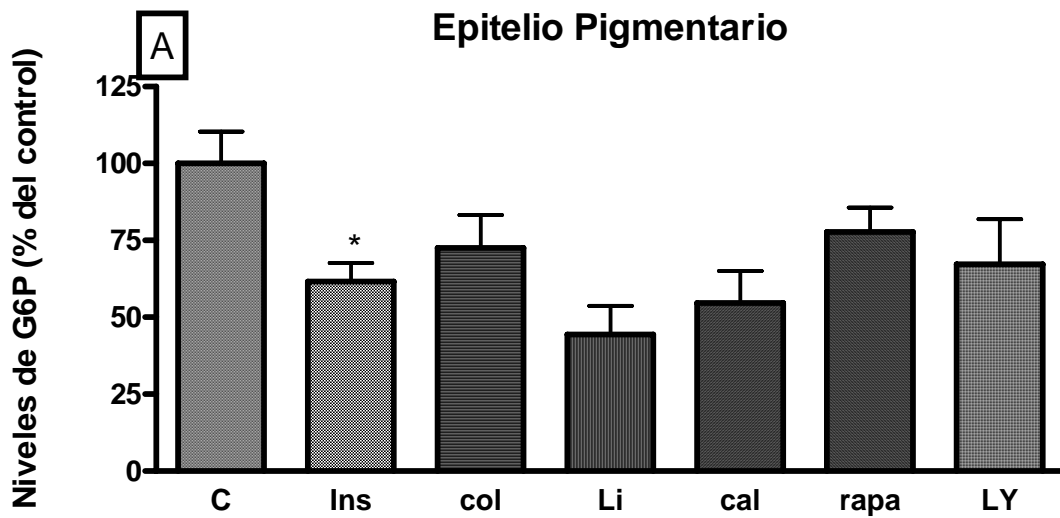


Figura 15. Porcentaje de los niveles de G6P (A) y glucógeno (B) en EP de ratas normales incubados durante 20 minutos a 37° en presencia de: Insulina 10ng/ml (Ins), colina 15mM (col), litio 15mM (Li), caliculina 10nM (cali), rapamicina 1nM (rapa), LY294002 10µM (LY). Diferencia con respecto al control (A) *p 0.01, (B) *p 0.001

DISCUSIÓN

Los niveles de glucógeno dependen de su síntesis y degradación, la GS enzima que sintetiza el glucógeno es regulada por su activador alostérico, la G6P (Leloir, et al. 1959 citado en Hanashiro, et al. 2002), lo que expone el sitio activo de la enzima y la convierte en un mejor sustrato para sus activadores directos, las fosfatasas (Ingebristen, et al. 1983 citado en Villar-Palasi, et al. 1997). La insulina también promueve la activación de GS a través de reacciones de fosforilación y desfosforilación, asimismo impide la degradación del glucógeno, por inactivar a la GP (Syed, et al. 2000) (Fig. 2).

Los resultados obtenidos muestran que el EP es el tejido que presenta la mayor concentración de G6P incluyendo el hígado. El EP forma parte de la barrera hematorretiniana, por lo que la elevada concentración de G6P es sugerente de un prominente transporte de glucosa.

En ratas diabéticas, observamos un aumento significativo en los niveles de G6P en retina, riñón y cerebro comparado con los niveles de G6P en ratas controles, sugiriendo una relación directa entre las concentraciones de G6P y glucosa en plasma, estos resultados concuerdan con los elevados niveles de glucógeno observados en estos tejidos (Luna, 2004). Por el contrario encontramos que los niveles de G6P en el hígado y EP disminuyen en los animales diabéticos.

El aumento de G6P en la retina, riñón y cerebro de animales diabéticos es congruente con las elevadas concentraciones de glucosa en plasma y con el hecho de que la insulina estimula la síntesis de glucógeno.

En la retina los altos niveles de G6P observados durante la diabetes pueden deberse a un aumento en el transporte de glucosa a la célula, aunado a la

actividad gluconeogénica que no se detiene a causa de la falta de insulina. En este sentido Newgard en 1984 y Goldman en 1988 demostraron que la G6P proveniente de la gluconeogénesis se dirige principalmente hacia la síntesis de glucógeno. Asimismo la glucosa puede estar metabolizándose resultando en un aumento en los niveles de lactato mismos que se encuentran elevados en la retina diabética (Salceda 1998).

Es interesante que la hiperglucemia y la insulina produzcan cambios específicos en los niveles de G6P y glucógeno en el hígado y EP lo que sugiere una participación preponderante del EP en la fisiología de la retina, de manera semejante al hígado con respecto a otros órganos.

El incremento en los niveles de G6P y de glucógeno en el EP de ratas diabéticas a las que se les administró insulina, nos sugiere que en este tejido la insulina promueve la entrada de glucosa y/o su fosforilación.

Con el objeto de conocer con más profundidad los mecanismos de regulación de los niveles de glucógeno en la retina y EP, se estudió el efecto de diferentes agentes que bloquean las diferentes enzimas de la vía de señalización de la insulina (ver tabla 1). En este estudio demostramos que en la retina y el EP *in vitro*; la insulina regula los niveles de G6P y de glucógeno. Sin embargo nuestros resultados no proveen datos suficientes para esclarecer el mecanismo de esta regulación. Estos estudios demostraron un claro efecto de la insulina sobre los niveles de G6P y glucógeno, sin embargo este efecto no se modificó significativamente cuando se inhibieron las distintas enzimas de la vía de señalización de la insulina. Estos resultados podrían explicarse por la presencia

de diferentes isoformas de estas enzimas y su susceptibilidad a los inhibidores utilizados. Asimismo el efecto de insulina podría deberse a cambios en los niveles de G6P.

La G6P, además de ser el activador alostérico de la GS, es el sustrato para la síntesis del glucógeno, esto indica que las variaciones en su concentración pueden provocar cambios en la actividad de la GS y en los niveles de glucógeno. Sin embargo la relación que existe entre G6P, GS y glucógeno y es afectada por insulina, por lo que probablemente durante la diabetes esta relación se ve alterada.

El análisis de los niveles de glucógeno y de la actividad de GS obtenidos previamente en nuestro laboratorio, bajo las mismas condiciones de diabetes tipo 1 a 20 y 45 días (Luna 2004, Hernández 2003) y los resultados del presente trabajo, demuestra que en el hígado no existe relación entre la concentración de G6P y de glucógeno, aunque existe una relación positiva entre la G6P y la actividad de la GS (Fig. 16 A y B), resultado que está de acuerdo con lo reportado por Ciudad y colaboradores en 1986. Asimismo estos resultados están de acuerdo con el hecho de que el hígado es el principal sitio de reserva del glucógeno y por tanto constituye la principal fuente de glucosa para el organismo, es decir, que en este tejido es suficiente señal la hiperglucemia para sintetizar glucógeno. La falta de correlación entre G6P y los niveles de glucógeno, indica que existen otros mecanismos que regulan la síntesis de glucógeno por ejemplo, la insulina. Adicionalmente esta correlación puede sugerir que el glucógeno en este tejido se sintetiza y degrada al mismo tiempo.

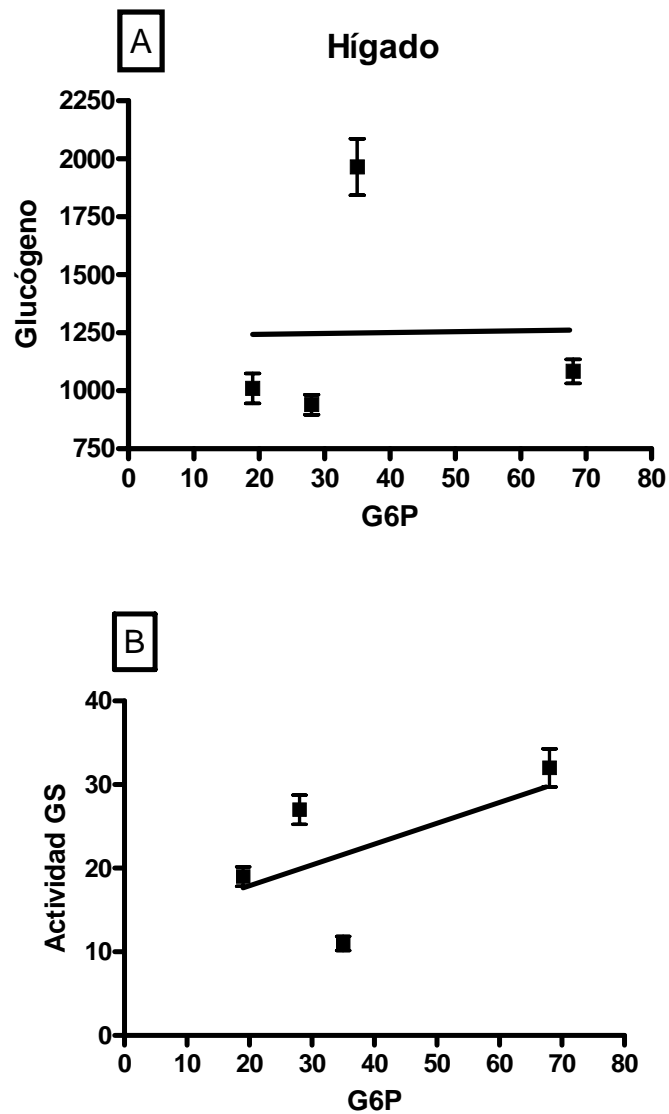


Figura 16 (A) Relación lineal entre la concentración de G6P y concentración de glucógeno r^2 0.0003. (B) Relación lineal entre niveles de G6P y actividad de GS r^2 0.33.

En el EP podemos observar que no existe una correlación entre las concentraciones de G6P y glucógeno, sin embargo parece existir una correlación directa entre los niveles de G6P y la actividad de GS además la r^2 obtenida de la correlación entre los niveles de G6P y la actividad de GS, nos

indica que 30% de la actividad de esta enzima puede ser inducida por la G6P, indicándonos la regulación alostérica de GS en este tejido, igual que en el hígado (Fig. 17 A y B).

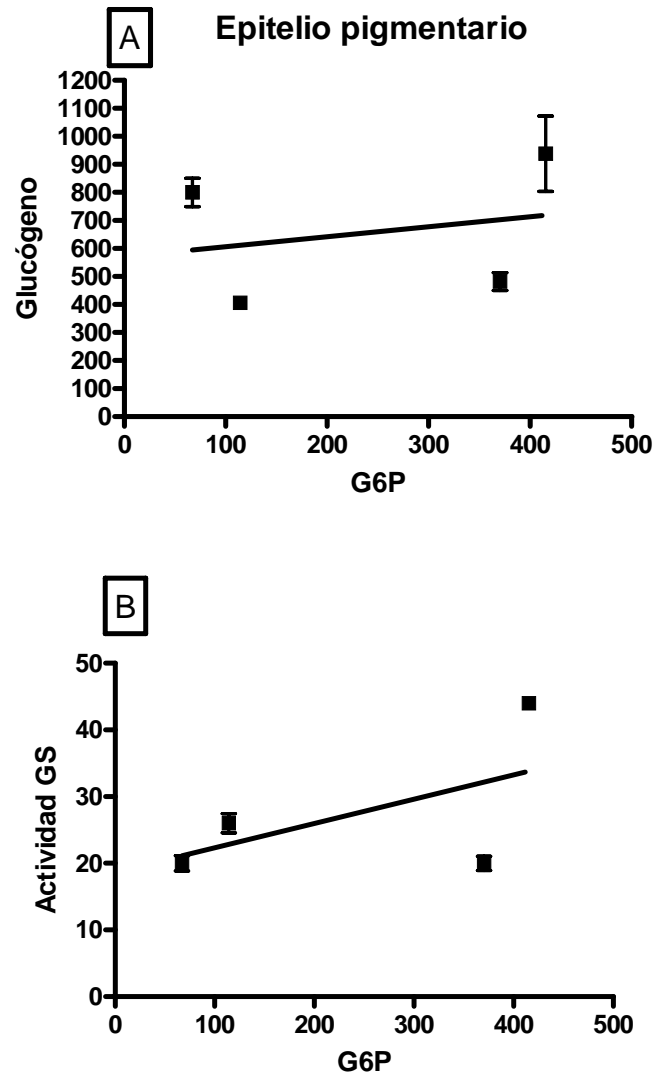


Figura 17 (A) Relación lineal entre la concentración de G6P y concentración de glucógeno r^2 0.06. (B) Relación lineal entre niveles de G6P y actividad de GS r^2 0.31.

En la retina encontramos una posible correlación positiva entre la G6P, el glucógeno y la GS donde la r^2 obtenida de la correlación entre G6P y la actividad de la GS, nos indica que cerca del 70% de la activación de la GS es alostérica,

mostrándonos una importante regulación de los niveles de glucógeno por la G6P (Fig. 18 A y B).

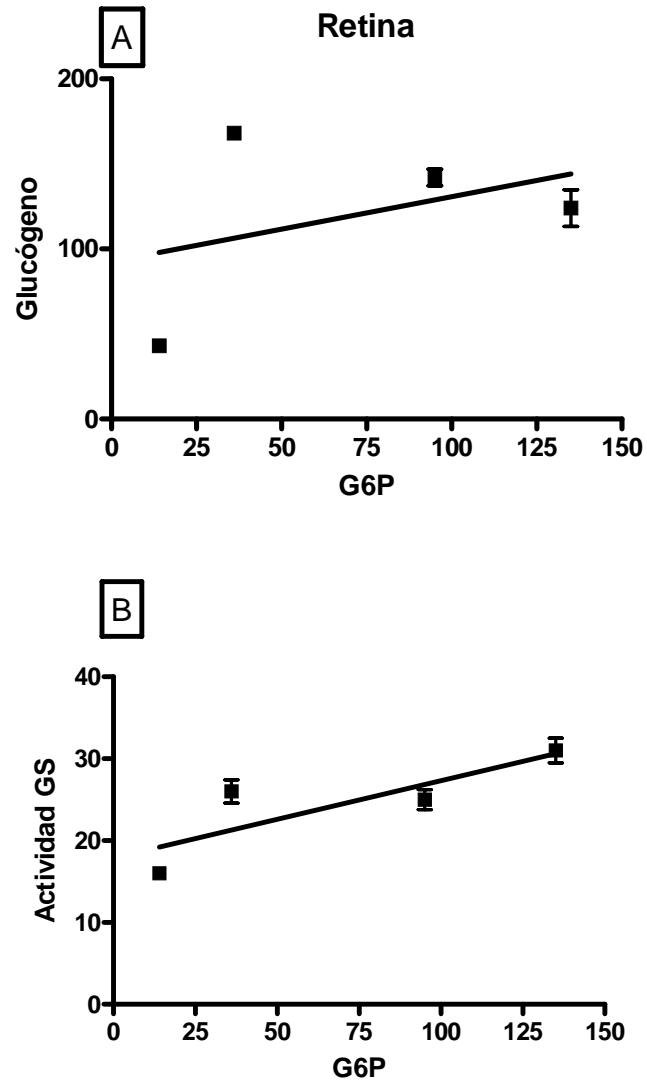


Fig. 18 (A) Relación lineal entre la concentración de G6P y concentración de glucógeno r^2 0.15.

(B) Relación lineal entre niveles de G6P y actividad de GS r^2 0.69.

En el cerebro encontramos una relación directa entre la concentración de glucógeno y G6P, también podemos observar una relación directa entre los

niveles de actividad de GS y la concentración de G6P (Fig. 19 A y B), resultado acorde con Goldberg y colaboradores quienes demostraron en 1964 que la GS del cerebro es sensible a la regulación alostérica por la G6P (Goldberg, et al 1964. citado en Passonneau, et al. 1975).

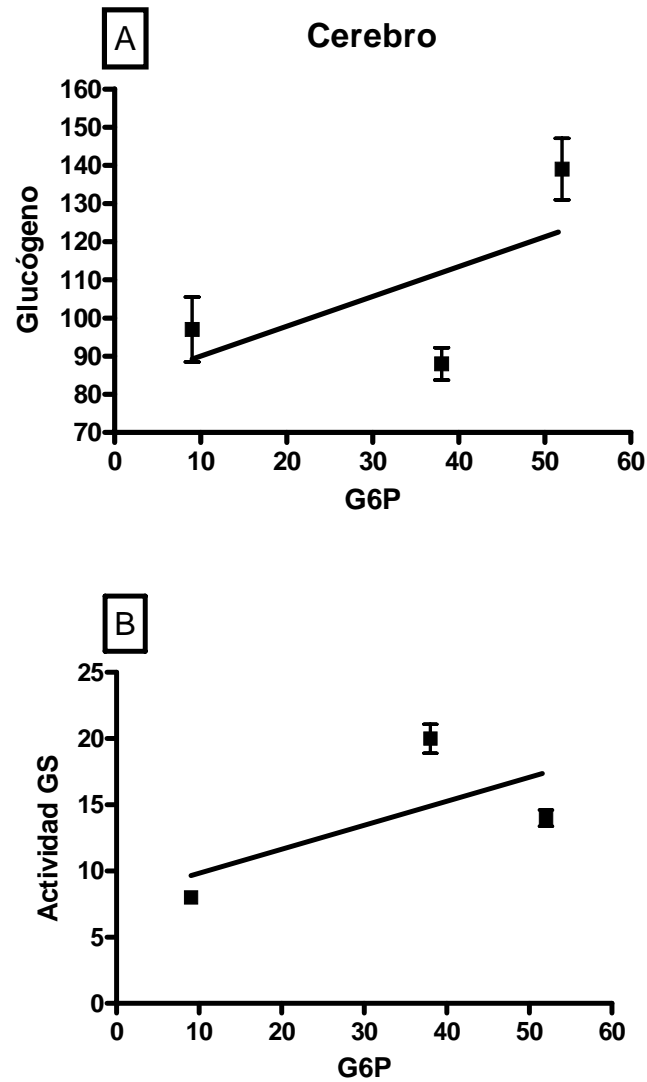


Fig. 19 (A) Relación lineal entre la concentración de G6P y concentración de glucógeno r^2 0.39.

(B) Relación lineal entre niveles de G6P y actividad de GS r^2 0.43

En el riñón existe una relación positiva entre la concentración de G6P y glucógeno, del mismo modo encontramos una relación negativa entre los valores de actividad de la GS y la concentración de G6P (Fig. 20 A y B), lo que pudiera estar mostrando que en este tejido no existe o es limitada la activación alostérica de la GS ó que la G6P es un regulador negativo de la enzima GS.

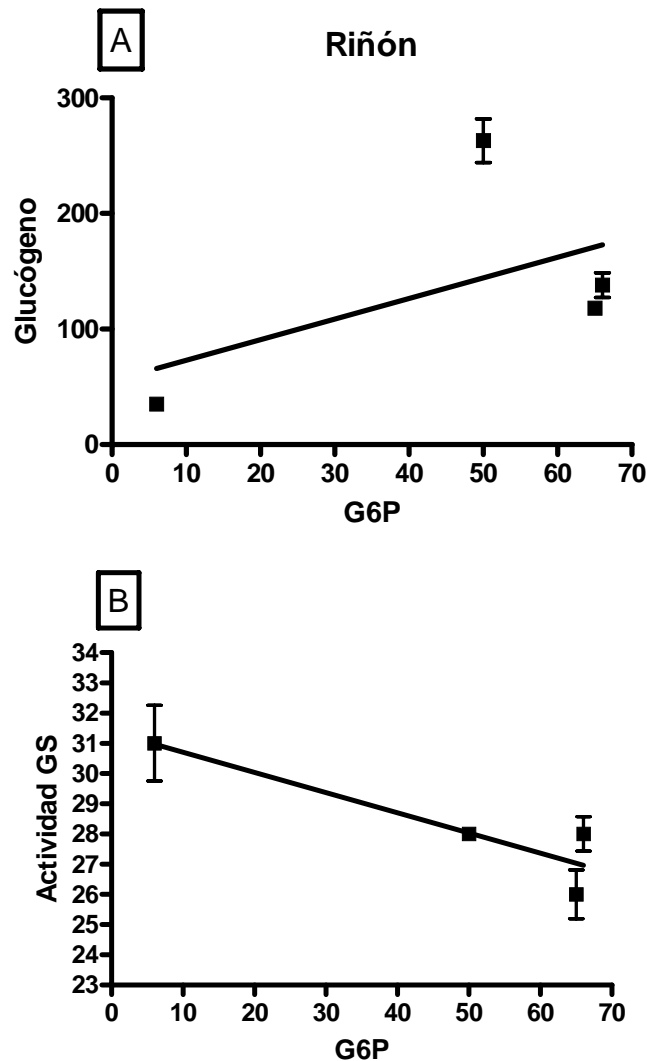


Fig.20 (A) Relación lineal entre la concentración de G6P y concentración de glucógeno r^2 0.15.

(B) Relación lineal entre niveles de G6P y actividad de GS r^2 0.83.

CONCLUSIONES

- 1) Como ocurre en otros tejidos, la G6P es un factor regulador de la síntesis de glucógeno en la retina y EP
- 2) La insulina promueve la síntesis de glucógeno en la retina y EP, sin embargo este efecto no se alteró significativamente en presencia de inhibidores de las enzimas de la vía de señalización presentes en otros tejidos. La falta de esta inhibición podría deberse a una diferente ruta de señalización de insulina en la retina y el EP, pero también a una concentración efectiva menor de la que se requiere para inhibir dichas enzimas.
- 3) En la diabetes dependiente de insulina:
Los niveles de G6P aumentan en la retina, riñón y cerebro, mientras que disminuyen en el hígado y EP. Sugiriendo que la insulina regula los niveles de G6P a través del transporte de glucosa y/o la utilización de la misma en los diferentes tejidos.

BIBLIOGRAFÍA

Ames, A., Gurian, B. S., 1963. Effects of glucose and oxygen deprivation on functional of isolated mammalian retina. *J. Neurophysiol.* 26: 617-634.

Antonetti DA, Barber AJ, Bronson SK, Freeman WM, Gardner TW, Jefferson LS, Kester M, Kimball SR, Krady JK, LaNoue KF, Norbury CC, Quinn PG, Sandirasegarane L, Simpson IA. 2006. Diabetic retinopathy: seeing beyond glucose-induced microvascular disease. *Diabetes.* 55(9):2401-11.

Azpiazu, I., Saltiel, A. R., De Paoli-Roach, A. A., Lawrence, J. C., 1996. Regulation of both Glycogen Synthase and PHAS-I by Insulin in Rat Skeletal Muscle Involves Mitogen-activated Protein Kinase-independent and Rapamycin-sensitive Pathways. *J. Biol. Chem.* 271 (9): 5033-5039.

Bai, G., Zhongjian, Z., Rudolf, W., Nuttall, F. Q., Agnes, W. H., Lee, E. Y. C. 1990. The primary structure of rat liver glycogen synthase deduced by cDNA cloning. *J. Biol. Chem.* 265 (14): 7843-7848.

Berman, E, R. 1991. Biochemistry of the eye. Plenum Press. New York and London.

Bito LZ, Salvador EV, Petrinovic L. 1978. Intraocular fluid dynamics. IV. Intraocular sites of solute utilization and transport as revealed by studies on aphakic eyes. *Exp Eye Res.* 26(1):47-55.

Bollen, M., Keppens, S., Stalmans, W., 1998. Specific features of glycogen metabolism in the liver. *Biochem. J.* 336: 19-31.

Browner MF, Fauman EB, Fletterick RJ., 1992. Tracking conformational states in allosteric transitions of phosphorylase. *Biochemistry.* 24;31(46):11297-304.

Brownlee, M. 2001. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications *Nature*. 414: 813-820.

Cantley, L. C., 2002. The phosphoinositide 3-Kinase pathway. *Science*. 296(5573):1655-7.

Cardenas, M. L., Cornish-Bowden, A., Ureta, T., 1998. Evolution and regulatory role of hexokinases. *Biochim Biophys Acta*. 5;1401(3):242-64.

Ciudad, C.J., Carabaza A., Guinovart, J.J. 1986. Glucose-6-phosphate plays a central role in the activation of glycogen synthase by glucose in hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Comun.*141: 1195-1200.

Clarke, D.W., Boyd Jr., F.T., Kappy, M.S., Raizada, M.K., 1984. Insulin binds to specific receptors and stimulates 2-deoxy-D-glucose uptake in cultured glial cells from rat brain. *J. Biol. Chem.* 259, 11672–11675.

Coffe, V. M. (2000). La relación lactato piruvato e identificación de glucógeno en la retina de la rata. Tesis de grado. Maestría en ciencias. Facultad de Ciencias. UNAM.

Coffe, V., Carbajal, R. C., Salceda, R., 2004. Glycogen metabolism in the rat retina. *J. Neurochem.* 88: 885-890.

Cohen, L. H., Noell, W. K., 1965. Relationship between visual function and metabolism. Orlando, F. L. *Academic press*.

Cohen, P. 1986. The enzymes. (Boyer, P., and Krebs, E. G., eds) *Academic Press, Orlando, F. L* pp. 461-497,

Ferrer, C. J., Favre, C., Gomis, R. R., Fernández-Novell, J. M., García-Rocha, M., de la Iglesia, N., Cid, E., Guinovart, J. J., 2003. Control of glycogen deposition. *FEBS Letters* 546: 127-132.

Gardner TW, Lieth E, Khin SA, Barber AJ, Bonsall DJ, Leshner T, Rice K, Brennan WA, 1997. Astrocytes increase barrier properties and ZO-1 expression in retinal vascular endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 38(11):2423-7.

Goldberg ND, O'Toole AG. 1964. The properties of glycogen synthetase and regulation of glycogen biosynthesis in rat brain. *J. Biol. Chem.* 10;244(11):3053-61.

Goldman, S. S., 1988. Gluconeogenesis in the amphibian retina. *Biochem. J.* 254: 359-365.

Grasso G, Frittitta L, Anello M, Russo P, Sesti G, Trischitta V., 1995. Insulin receptor tyrosine-kinase activity is altered in both muscle and adipose tissue from non-obese normoglycaemic insulin-resistant subjects. *Diabetologia.* 38(1):55-61.

Graymore, C. N., 1970. Metabolic survival of the isolated retina. *Br Med Bull.* 26(2):130-3.

Hanashiro, I., Roach, P. J., 2002. Mutations of Muscle Glycogen Synthase That Disable Activation by Glucose 6-Phosphate. *Arch. Biochem. & Biophys.* 397 (2): 286-292.

Havrankova, J., Brownstein, M., Roth, J., 1981. Insulin and insulin-receptors in rodent brain. *Diabetologia* 20, 268–273.

Havrankova, J., Roth, J., 1978. Insulin receptors are widely distributed in central nervous-system of rat. *Nature* 212, 827–829.

- Havrankova, J., Roth, J., Brownstein, M.J., 1983. Insulin receptors in brain. *Adv. Metab. Disord.* 10, 259–268.
- Hernandez, B. J. 2003. Niveles de glucógeno y actividad de las enzimas de su síntesis y degradación en la retina de la rata durante la diabetes experimental. Tesis de grado. Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM.
- Ingebristen, T. S., Stewart, A. S., Cohen, P. 1983. The protein phosphatases involved in cellular regulation. 6. Measurement of type-1 and type-2 protein phosphatases in extracts of mammalian tissues: an assessment of their physiological roles. *Eur. J. Biochem.* 132: 297-307
- Johnson, L. N., 1992. Glycogen phosphorylase: control by phosphorylation and allosteric effectors. *FASEB J.* 6: 2274-2282.
- Katsen, H.M, Schimike, R.T., 1965. Multiple forms of hexokinase in the rat: tissue distribution, age dependency, and properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 54(4):1218-25.
- Kellerer M., Coghlan, M., Capp, E., Mühlhöfer, A., Kroder, G., Mosthaf, L., Galante, P., Siddle, K., Häring, H.U., 1995. Mechanism of insulin receptor kinase inhibition in non-insulin-dependent diabetes mellitus patients. Phosphorylation of serine 1327 or threonine 1348 is unaltered. *J. Clin. Invest.* 96: 6-11.
- Keppler, D., Decker, D. 1983. Glycogen. *Methods in Enzymatic Analysis.* Bergmeyer J. and Grabal M.J eds. Vol. 6, pp 11-18.
- Khandelwal, R. L., Zinman, S. M., Khull, H. R., 1979. The effect of streptozotocin –induced diabetes on glycogen metabolism in rat kidney and its relationship to liver system. *Arch. Biochem. Biophys.* 197: 310-316.

Koya, D., King, G. L., 1998. Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. *Diabetes*, 47(6):859-66

Kuri, M., Vargas, Z., Zarate, H., Juarez, V. Secretaria de salud. Direcció general de epidemiologia. La diabetes en Mèxico.

Kuwabara, T., Cogan, D. G., 1961. Retinal glycogen. *Arch Ophthalmol*. 66:680-8

Leloir, L. F., Olavarria, J. M., Goldemberg, S. H., and Carminatti, H. 1959. Biosynthesis of glycogen from uridine diphosphate glucose. *Arch. Biochem. Biophys*. 81: 508-520.

Lowry, O., Rosebrough, N J., Farr, A. L., Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem*. 193:265-275.

Luna, U.L. B. 2004. Regulaci3n de los niveles de gluc3geno en la retina de la rata. Tesis de grado. Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM

Lust, W., Passoneau, J., Crites, S. 1975. The measurements of glycogen in tissue by the amylo-1,4 -1,6 glucosidase after destruction of preexisting glucose. *Anal, Biochem*. 68: 328-331.

Michal, G. 1984. D-Glucose-6-phosphate and D-fructose-6-phosphate. In: Bergmeyer HU (ed) *Methods of enzymatic analysis*. 3rd edition. Vol 6. Verlag chemie, Weinheim, pp 191-198.

Mueckeler, M., 1994. Facilitative glucose transporters. *Eur J Biochem*. 219(3):713-25.

Naeser P. 1997. Insulin receptors in human ocular tissues. Immunohistochemical demonstration in normal and diabetic eyes. *Ups J Med Sci*. 102(1):35-40.

Nakamura, M., Barber, A. J., Antonetti, D. A., LaNoue, K. F., Robinson, K. A., Buse, M. G., Gardner, T. W., 2001. Excessive hexosamines block the neuroprotective effect of insulin and induce apoptosis in retinal neurons. *J. Biol. Chem.* 276: 43748-43755.

Nelson, D.L., Cox, M. M. 2005. Lehninger Principles of biochemistry. 4th edition. Editorial OMEGA.

Newgard, C. B., Hwang, P. K., Fletterick, R. J., 1989. The family of glycogen phosphorylases: structure and function. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 24(1):69-99

Pascuzzo GJ, Johnson JE, Pautler EL. 1980. Glucose transport in isolated mammalian pigment epithelium. *Exp Eye Res.* 30(1):53-8

Passonneau JV, Schwartz JP, Rottenberg DA. 1975. The partial purification and properties of pig brain glycogen synthase. *J Biol Chem.* 250(6):2287-92

Pessin, J.E., Saltiel, A.R., 2000. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. *J Clin Invest.* 106(2):165-9.

Pfeiffer, B., Grosche J., Reichenbach, A., Hamprecht, B, 1994. Immunocytochemical demonstration of glycogen phosphorylase in Müller (glial) cells of the mammalian retina. *Glia*, 12: 62-67.

Plum, L., Schubert, M., Bruning, J.C., 2005. The role of insulin receptor signaling in the brain. *Trends Endocrinol. Metab.* 16, 59–65.

Reiter, C.E., Gardner, T.W., 2003. Functions of insulin and insulin receptor signaling in retina: possible implications for diabetic retinopathy. *Prog Retin Eye Res.* 22(4):545-62.

Reiter, C. E., Wu X, Sandirasegarane, L., Nakamura, M., Gilbert, K. A., Singh, R. S., Fort, P. E., Antonetti, D. A., Gardner, T. W.. 2006. Diabetes reduces basal retinal insulin receptor signaling: reversal with systemic and local insulin. *Diabetes.*; 55(4):1148-56.

Roach, P. J., 2002. Glycogen and its metabolism. *Current Molecular Medicine*, 2: 133-152.

Roach, P. J., Skurat, A. V., Harris, R. A. 2001. in Handbook of Physiology, Section 7, Vol II, The endocrine pancreas and regulation of metabolism (Jefferson, L. S., & Cherrington, A. D., Eds.), *Oxford Univ. Press*, New York. pp. 609-647.

Rodrigues, M., Waldbillig, R. J., Rajagopalan, S., Hackett, J., LeRoith, D., Chader, G. J., 1988. Retinal insulin receptor: localization using a polyclonal anti-insulin receptor antibody. *Brain. Res.* 443: 339-394.

Rothman, D. L., Schluman, R. G., Schluman, G. I., 1992. ³²P nuclear magnetic resonance measurements of muscle glucose-6-phosphate. Evidence for reduced insulin-dependent muscle glucose transport or phosphorylation activity in non insulin dependent diabetes mellitus. *J. Clin invest.* 89: 1069-1075.

Salceda, R. 1998. Diferenciación de la retina de los vertebrados : mecanismos celulares y moleculares. *Rev. Soc. Mex. Hist. Nat.* 48: 115-124.

Salceda, R., Vilchis, C., Coffe, V., Hernández-Muñoz, R., 1998. Changes in the redox state in the retina and brain during the onset of diabetes in rats. *Neurochem Res.*; 23(6):893-7

Saltiel, R. A, Kahn, R., 2001. Insulin signaling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*, 414: 799-805.

Saltiel, R. A., Pessin, E. J., 2002. Insulin signaling pathways in time and space. *TRENDS in Cell Biol.* 12: (2) 65-71

Schabadasch, A. L., and Schabadasch, S. A., 1972. Localization and dynamic changes of glycogen in frog retina adapted to darkness or light. I. *Vision. Res.* 12: 1595-1604.

Schluman, G. I., Rothman, D. L., Jue, T., Stein, P., De Fronzo, R. A., Schluman, R. G., 1990. Quantitation of muscle glycogen synthesis in normal subjects and subjects with non-insulin-dependent diabetes by ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *N. Engl. J. Med.* 322: 223-228.

Simon, J., Rosebrough, R. W., McMurtry, J. P., Steele, N. C., Roth, J., Adamo, M., LeRoith, D., 1986. Fasting and refeeding alter the insulin receptor tyrosine kinase in chicken liver and fail to affect brain insulin receptors. *J. Biol. Chem.* 261: 17081-17088.

Standaert, M.L., Ortmeyer, H.K., Sajan, M.P., Kanoh, Y., Bandyopadhyay, G, Hansen, B.C., Farese, R.V., 2002. Skeletal muscle insulin resistance in obesity-associated type 2 diabetes in monkeys is linked to a defect in insulin activation of protein kinase C-zeta/lambda/iota. *Diabetes.* 51(10):2936-43.

Strauss, O., 2005. The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiol Rev.* 85(3):845-81.

Syed NA, Khandelwal RL. 2000. Reciprocal regulation of glycogen phosphorylase and glycogen synthase by insulin involving phosphatidylinositol-3 kinase and protein phosphatase-1 in HepG2 cells. *Mol Cell Biochem.* ;211(1-2):123-36.

Van der Heide, L. P., Ramakers, G. M., Smidt, M. P., 2006. Insulin signaling in the central nervous system: Learning to survive. *Progress Neuro.* 79: 205-221.

Villar-Palasi, C., 1994. Inhibition by glucose 6-phosphate of cyclic AMP-dependent protein kinase phosphorylation of glycogen synthase. *Biochim. Biophys. Acta*, 39: 171-173.

Villar-Palasi, C., Guinovart, J. J., 1997. The role of glucose-6-phosphate in the control of glycogen synthase. *FASEB J.* 11: 544-558.

Villar-Palasi, C., Lerner, J., 1960. Insulin mediated effect on the activity of UDPG-glycogen transglucosylase of muscle. *Biochim. Biophys. Acta.* 39: 171-173.

Voet, D., Voet, J. G. 1992. Bioquímica. Ed. OMEGA, S.A.

Waldbillig, R. J., Arnold, D. R., Fletcher, R. T., Chader, G. J., 1991. Insulin and IGF-I binding in developing chick neural retina and pigment epithelium: a characterization of binding and structural differences. *Exp. Eye Res.* 53: 13-22.

Waldbillig, R.J., LeRoith, D., 1987. Insulin receptors in the peripheral nervous system: a structural and functional analysis. *Brain Res.*21;409(2):215-20

Winkler, B. S., 1972. The electroretinogram of the isolated rat retina. *Vision. Res.* 12: 1183-1198.

Winkler, B. S., 1981. Glycolytic and oxidative metabolism in relation to retinal function. *J. Gen. Physiol.* 77: 667-692.

Zetterström, C., Benjamin, A., Rosenzweig, S. A., 1992. Differential expression of retinal insulin receptors in STZ-induced diabetic rats. *Diabetes.* ; 41(7):818-25

