



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

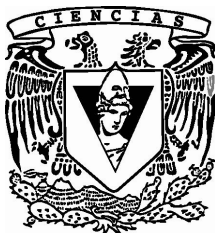
**INMUNOLocalización DE LA GLUCÓGENO SINTASA EN
CÉLULAS DE MÜLLER EN CULTIVO:
RELACIÓN CON EL CITOESQUELETO**

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:**

LILIANA FRANÇOIS MARTÍN DEL CAMPO



**DIRECTORA DE TESIS:
DRA. ROCÍO SALCEDA SACANELLES
2011**



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.

1. Datos del alumno

François
Martín del Campo
Liliana
(044) 55 41 92 15 42
Universidad Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
407096655

2. Datos del tutor

Dra
Rocío
Salceda
Sacanelles

3. Datos del sinodal 1

Dra.
Sara
Frías
Vázquez

4. Datos del sinodal 2

Dra
Alette
Ortega
Gómez

5. Datos del sinodal 3

Biól
Gustavo
Sánchez
Chávez

6. Datos del sinodal 4

Biól
Ixchel
Osorio
Paz

7. Datos del trabajo escrito

Inmunolocalización del la glucógeno sintasa en células de Müller en cultivo:
relación con el citoesqueleto

57pp

2010

Índice.....	i
Abreviaturas.....	iii
1 Introducción.....	1
1.1 Estructura de la retina.....	1
1.1.1 Las células de Müller.....	3
1.1.2 Metabolismo de la retina.....	5
1.1.2.1 Metabolismo de las células de Müller.....	6
1.2 El glucógeno.....	7
1.2.1 Síntesis del glucógeno.....	9
1.2.2 Degradación del glucógeno.....	10
1.2.3 La glucógeno sintasa.....	12
1.2.4 Regulación de la síntesis de glucógeno.....	13
1.2.4.1 Regulación de la actividad de la GS.....	13
1.2.4.2 La insulina y la síntesis de glucógeno.....	15
1.3 El citoesqueleto.....	17
1.3.1 Filamentos intermedios.....	17
1.3.2 Microtúbulos.....	18
1.3.3 Filamentos de actina.....	18
2 Antecedentes.....	20
2.1 Distribución subcelular de la GS en hepatocitos.....	20
2.2 Distribución subcelular de la GS en músculo.....	21
2.3 Metabolismo del glucógeno en las células de Müller.....	23
2.4 El glucógeno y la GS en el núcleo.....	23
3 Hipótesis.....	25
4 Objetivos.....	25
5 Métodos.....	26
5.1 Cultivo de las células de Müller.....	26
5.2 Tratamientos.....	27
5.3 Inmunocitoquímica.....	27
5.4 Observaciones microscópicas.....	27
5.5 Análisis estadístico.....	28

6	Resultados.....	29
6.1	Caracterización del cultivo de glía de Müller.....	29
6.2	La glucosa provoca la translocación de la GS del citoplasma al núcleo.....	29
6.3	La insulina provoca la translocación de la GS del citoplasma al núcleo.....	30
6.4	Los filamentos de actina no colocalizan con la GS.....	30
6.5	Los microtúbulos participan en la translocación de la GS.....	32
6.6	La glucosa y la insulina reducen la actividad metabólica.....	32
6.7	Fotografías.....	33
6.8	Gráficas.....	41
7	Discusión.....	43
8	Conclusiones.....	49
9	Bibliografía.....	50

ABREVIATURAS

Akt, PKB proteína cinasa B
ADP bifosfato de adenosina
ATP trifosfato de adenosina
Cy3 Indocarbocyanine
DAPI 4',6-diamidino-2-fenilindol
DMEM Dulcecco's modified Eagle's medio
DMEM-S10 DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino
DMSO dimetil sulfóxido
EPR epitelio pigmentario de la retina
FITC Isotiocianato de Fluoresceína
G1P glucosa-1-fosfato
G6P glucosa-6-fosfato
GAPDH gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GDP difosfato de guanosina
GFAP proteína gliofibrilar ácida
GLAST transportador glutamate-aspartato
GP glucógeno fosforilasa
GS glucógeno sintasa
GSK3 glucógeno sintasa 3-cinasa
GTP trifosfato de guanosina
HBSS-CMF solución salina de Hank libre de calcio y magnesio.
IRS sustrato del receptor de insulina
LGS glucógeno sintasa del hígado
MGS glucógeno sintasa del músculo
MTT Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
PBS Solución Buffer Fosfatos
PI3K fosfoinositol-3-cinasa
Pi fosfato inorgánico
PIP3 fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato
PP1 proteína fosfatasa 1
PPi pirofosfato
SFB suero fetal bovino
TRITC Isotiocianato de Tetrametil Rodamina
UDP bifosfato de uridina
UDPG bifosfato de uridina - glucosa
UTP trifosfato de uridina

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Estructura de la retina

El ojo de los vertebrados (Fig. 1), órgano especializado del sentido de la vista, capta la luz ambiental a través de la retina, donde la energía luminosa se transforma en impulsos eléctricos que se transmiten a lo largo del nervio óptico hasta el cerebro, donde se descifran y se interpreta la información para generar una imagen (Antonetti *et al.* 2006).

La retina se localiza en la parte posterior del ojo, es un tejido translúcido formado por varias capas de células (Fig. 1). Se pueden considerar dos principales regiones: la externa, cercana la coroides, y la interna, hacia el cuerpo vítreo (Berman, 1991). La retina se compone por dos tipos de células: neuronas y células gliales (Antonetti *et al.* 2006; Bringmann *et al.* 2006).

Las neuronas pueden ser fotorreceptores, que transducen la energía luminosa en impulsos eléctricos y se localizan en la región externa de la retina; o neuronas bipolares, horizontales o amácrinas que básicamente transmiten e integran los impulsos hasta las neuronas ganglionares, cuyos axones forman el nervio óptico en la región interna (Antonetti *et al.* 2006; Bringmann *et al.* 2006).

Las células gliales o células de Müller son un tipo de glía radial especializada que realizan muchas de las funciones que los astrocitos, oligodendrocitos y células endoteliales tienen en otras regiones del sistema nervioso: proporcionan sustratos a las neuronas, regulan las funciones sinápticas y las propiedades de la barrera hemato-retiniana (Newman y Reichenbach, 1996). En algunas retinas existen también astrocitos que envuelven los vasos sanguíneos de la capa más interna de la retina y contactan las fibras de las células ganglionares. Este último tipo de células gliales únicamente se encuentran en las especies con retinas con vasculatura interna y contribuyen junto con las células de Müller a la formación barrera hemato-retiniana (Bringmann *et al.* 2006; Sarthy y Ripps, 2001; Newman y Reichenbach, 1996)

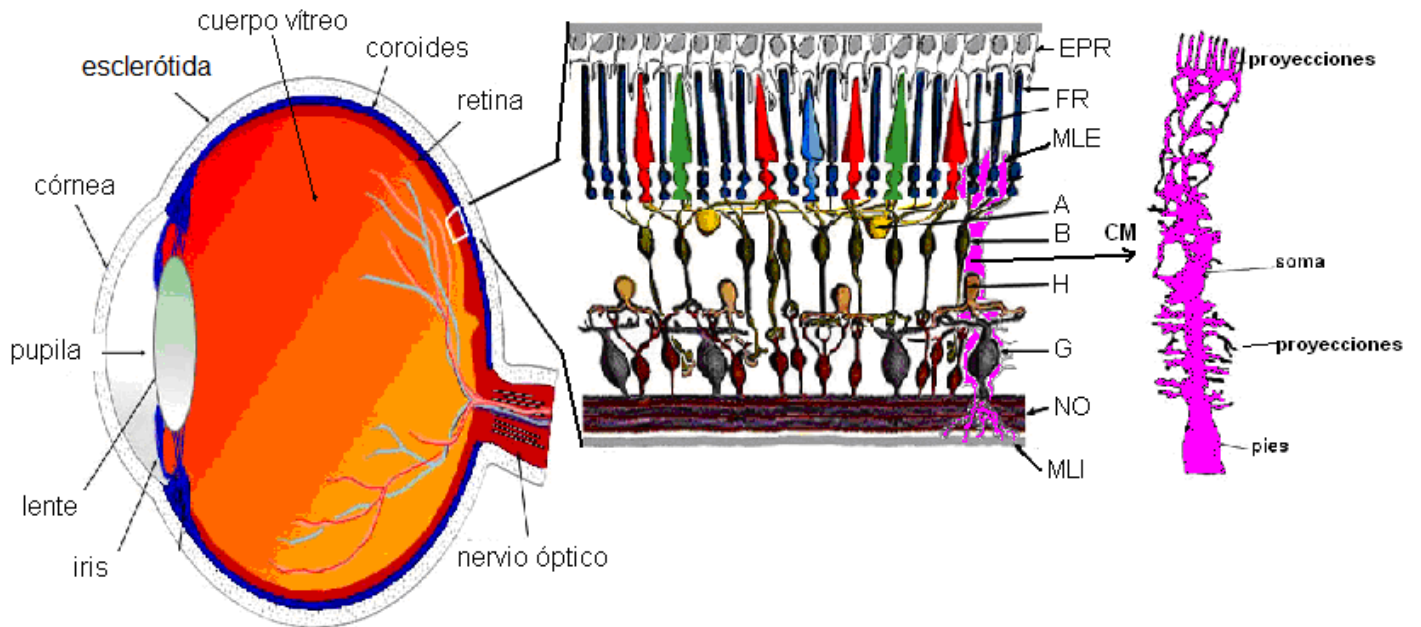


Figura 1. Localización, estructura de la retina y morfología de la célula de Müller

Izquierda: Estructura del ojo (<http://webvision.med.utah.edu/sretina.html>)

Centro: Representación de la retina, EPR: epitelio pigmentario, FR: fotorreceptores (conos y bastones), MLE: membrana limitante externa, A: neuronas amácrinas, B: neuronas bipolares, CM: células de Müller (rosa), H: neuronas horizontales, G: neuronas ganglionares, MLI: membrana limitante interna.

Derecha: morfología de la célula de Müller (Bringmann *et al.*, 2006).

Hacia la región más externa, los fotorreceptores están en contacto con las células del epitelio pigmentario de la retina (EPR), como su nombre lo dice, estas células contienen pigmento, el cual absorbe el exceso de luz que entra a través de la pupila. El EPR forma parte de la barrera hemato-retiniana, funciona como medio de transporte para sustratos y difusión de oxígeno entre la circulación coroidal y la retina. También remueve el ácido láctico que se acumula como producto del metabolismo de las células retinianas, y fagocita los

fragmentos de los segmentos externos de los fotorreceptores (Antonetti *et al.* 2006; Strauss, 2005).

La retina interna recibe irrigación sanguínea de la vasculatura retiniana, sin embargo ésta es limitada y en algunas especies está ausente (p.e. en el conejo y el cobayo), por lo que adicionalmente la retina recibe nutrientes y oxígeno de la circulación coroidal (Berman, 1991; Urtúbia, 1999).

1.1.1. Las células de Müller

Las células de Müller son las principales células gliales de la retina, se extienden a todo el grosor de la retina desde la membrana limitante interna (cerca del cuerpo vítreo) en donde sus pies hacen contacto con los vasos sanguíneos, hasta la capa limitante externa (segmentos internos de los fotorreceptores) y sus proyecciones cubren todos los somas y procesos neuronales (fig. 1; Berman, 1991; Newman y Reichenbach, 1996; Bringmann *et al.* 2006; Puro, 2002).

Las células de Müller constituyen no sólo un soporte estructural para dar forma a la retina, sino que también participan en numerosos procesos metabólicos que son vitales para el funcionamiento de la misma (Bringmann *et al.* 2006; Sarthy y Ripps, 2001). Dentro de las funciones que realizan las células de Müller podemos destacar las siguientes (fig. 2):

1. Contribuyen a la función de la barrera hemato-retiniana ya que envuelven con sus procesos todos los vasos sanguíneos (Antonetti *et al.* 2006; Bringmann *et al.* 2006; Sarthy and Ripps, 2001).
2. Mantienen la homeostasis de agua, iones y pH dentro de la retina gracias a los diversos canales iónicos y transportadores que poseen (fig. 2A; Bringmann *et al.* 2006; Newman y Reichenbach, 1996; Puro, 2002). La homeostasis iónica, en especial la del potasio (K⁺) la cuál mantiene el potencial de membrana de todas las células de la retina, indispensable para el soporte, supervivencia y funcionalidad de las neuronas (Bringmann *et al.* 2006; Newman y Reichenbach, 1996).

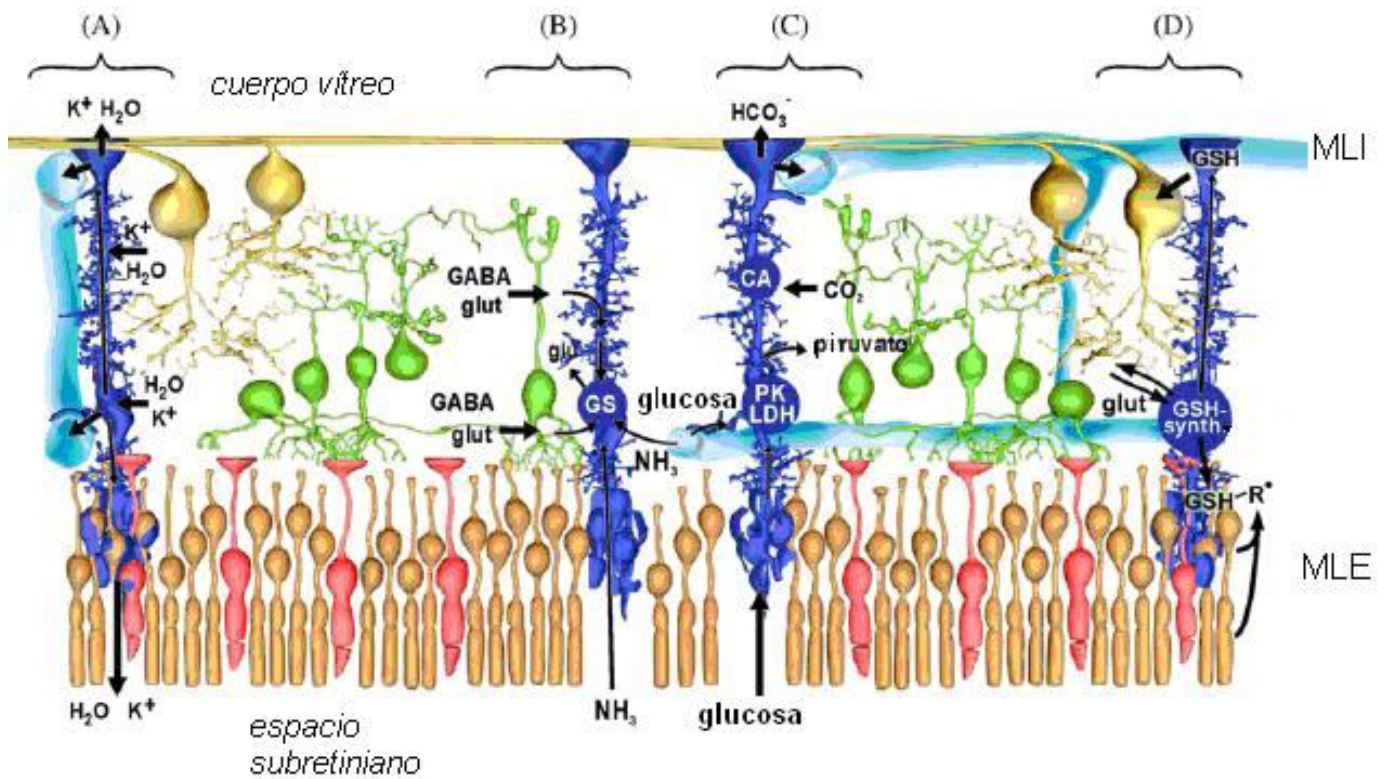


Figura 2. Principales funciones de las células de Müller.

(A) Homeostasis iónica y de agua. (B) Reciclaje de neurotransmisores. (C) Soporte metabólico. (D) Protección contra radicales libres y liberación de glutatión.

CA: anhidrasa carbónica; cyst: cisteína; Glut: glutamato, GS: glutamino sintasa, PK: piruvato cinasa, LDH: lactato deshidrogenasa, GABA: ácido γ -aminobutírico, GSH: glutatión, GSH-synth: glutatión sintasa, R^* : radicales libres, NH_3 : amoniaco.

Modificado de: Bringmann *et al.* 2006

3. Proporcionan a las neuronas diferentes metabolitos como glucosa, lactato y piruvato, principales sustratos de las neuronas para su metabolismo oxidativo y funcionan como el único sitio de almacén de glucógeno (Winkler *et al.* 2000; Pfeiffer *et al.* 1994). Remueven además los desechos metabólicos de las neuronas como el bióxido de carbono y amoniaco (fig. 2C; Antonetti *et al.* 2006; Bringmann *et al.* 2006).
4. Contribuyen a la transmisión sináptica mediante la captura y reciclaje de diferentes neurotransmisores (glutamato, GABA; fig. 2B). De relevancia es el transportador de glutamato-aspartato (GLAST), indispensable para terminar la transmisión glutamatérgica y evitar la excitotoxicidad por acumulación de glutamato (Newman y Reichenbach, 1996). Las células de Müller también pueden degradar el glutamato capturado convirtiéndolo en glutamina y/o en glutatión, importante antioxidante celular (fig. 2D; Antonetti *et al.* 2006; Bringmann *et al.* 2006; Bringmann y Reichenbach, 2001).

1.1.2. Metabolismo de la retina.

La retina es uno de los tejidos con mayor consumo energético (Berman, 1991; Urtúbia, 1999) requerido para llevar acabo procesos como la fototransducción, mantenimiento de los gradientes iónicos y actividad sináptica (Sarthý y Ripps, 2001; Winkler, 1981; Sánchez-Chávez *et al.*, 2008). Los fotorreceptores obtienen energía principalmente de la oxidación de la glucosa (Winkler, 1981), consumen entre un 70 y 80% de la glucosa y oxígeno obtenidos de la circulación coroidal y vasculatura retiniana (Berman, 1991; Urtúbia, 1999). La retina puede funcionar en condiciones aeróbicas o anaeróbicas y a pesar de que tiene una alta tasa de respiración, gran parte de la glucosa empleada se transforma a lactato (Winkler, 1981; Berman, 1991), que también se puede emplear para generar energía

(Urtúbia, 1999). Adicional a la utilización de glucosa directamente por las neuronas, algunos autores proponen que la glucosa se transporta a las células de Müller y éstas la convierten en piruvato, el cuál liberan al medio y se utiliza por las neuronas (Tsacopoulos y Magistretti, 1996; Winkler *et al.*, 2000). Pequeñas reservas de glucosa en forma de glucógeno se sintetizan y almacenan en las células de Müller (Kuwabara y Cogan, 1961).

1.1.2.1. Metabolismo de las células de Müller

Las células de Müller tienen un metabolismo energético basado principalmente en la glucólisis y su consumo de oxígeno es bajo (aun en presencia de oxígeno; Winkler *et al.*, 2000, 2004). Esto les confiere una gran resistencia a condiciones adversas como isquemia, anoxia e hiperglucemia, a diferencia de las neuronas que son muy susceptibles a estas alteraciones (Winkler *et al.*, 2000; Bringmann *et al.*, 2006). A su vez, bajo condiciones de hipoglucemia y suficiente oxígeno, las células de Müller pueden emplear sustratos como el lactato, piruvato, glutamato o glutamina para generar energía a través de la vía de Krebs. Incluso periodos cortos de ausencia de glucosa y oxígeno pueden ser compensados al utilizar depósitos de glucógeno almacenados en su interior (Bringmann y Reichenbach, 2001; Bringmann *et al.* 2006).

Las células de Müller, son los principales sitios de almacén de glucógeno, por lo que representan un soporte metabólico para las neuronas durante momentos de alta actividad sináptica o de hipoglucemia, mediante el rompimiento del glucógeno en metabolitos como el lactato o piruvato (Poitry-Yamate *et al.*, 1995). Sin embargo las necesidades energéticas durante periodos largos de hipoglucemia no podrían mantenerse únicamente con las reservas de glucógeno ya que estas son limitadas (Coffe *et al.*, 2004). Se ha visto que los transportadores de glucosa se expresan en los pies de las células de Müller que se encuentran asociados a los vasos sanguíneos, lo que evidencia su capacidad

para tomar la glucosa del medio externo (Mantych *et al.*, 1993; Watanabe *et al.*, 1994; Sarthy y Ripps, 2001).

1.2 El glucógeno

El glucógeno es la principal forma de almacenamiento de glucosa en las células animales y está presente en casi todos los tejidos del cuerpo (Voet, 1995). El glucógeno (fig. 3) se encuentra en las células almacenado en forma de gránulos citosólicos formados por 120 000 unidades de glucosa unidas por enlaces $\alpha(1-4)$ glucosídicos, con ramificaciones cada 8 o 12 residuos unidos por medio de enlaces $\alpha(1-6)$ glucosídicos y con extremos no-reductores (Mathews *et al.*, 2006). Estos gránulos también contienen las enzimas que catalizan y degradan el glucógeno, así como las que regulan dichas actividades (Voet, 1995; Nelson y Cox, 2006).

La mayor parte del glucógeno se encuentra almacenado en el hígado y en el músculo esquelético (Voet, 1995). En dichos tejidos, la función del glucógeno y la regulación de las enzimas encargadas de su síntesis y degradación están ampliamente estudiadas. Se sabe que el hígado regula los niveles de glucosa sanguínea: cuando estos son altos (p.e después de comer), captura la glucosa y la convierte en glucógeno, mientras que cuando hay hipoglucemia (p.e. en ayuno) lo rompe y libera glucosa al torrente sanguíneo. Por otro lado, en el músculo, el metabolismo del glucógeno ejerce más bien una función local durante momentos de gran demanda energética (p.e. durante el ejercicio) cuando la principal vía metabólica es la glucólisis y se libera lactato a la sangre (Brown y Ranson, 2007). En el sistema nervioso el glucógeno se almacena mayoritariamente en los astrocitos y sus niveles son menores que en hígado y músculo (Dringen *et al.*, 1993). De manera semejante, en la retina de los vertebrados el glucógeno se almacena en las células de Müller (Kuwabara y Cogan, 1961; Pfeiffer *et al.* 1994, 2004).

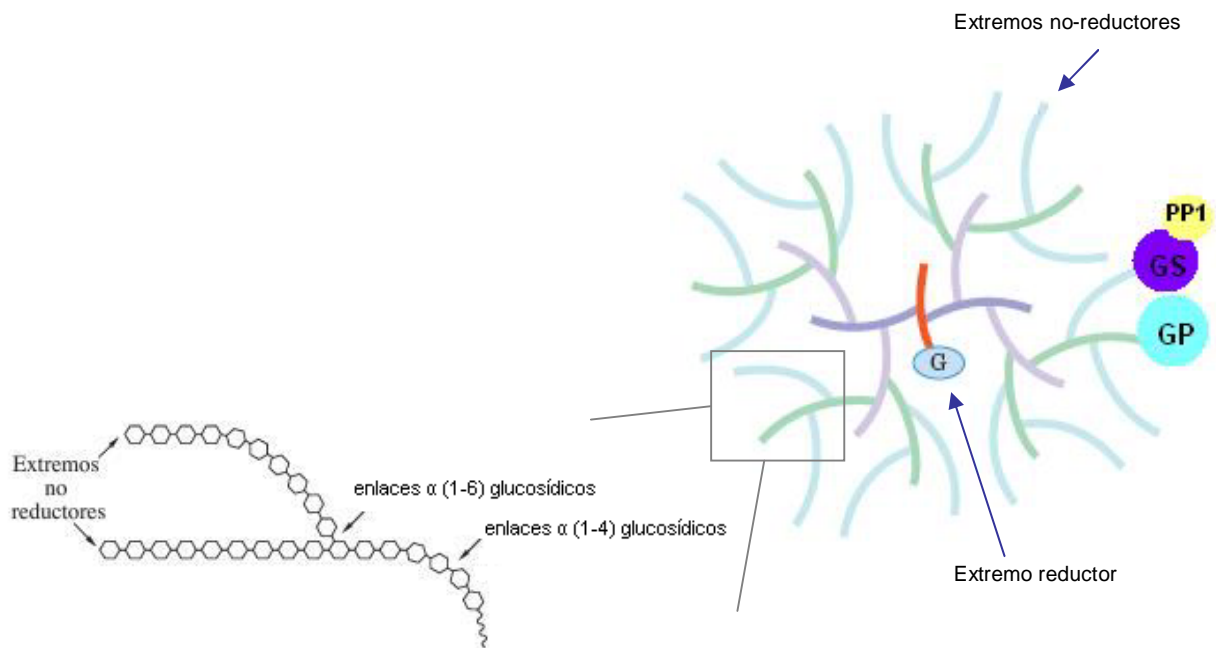


Figura 3. Gránulo de glucógeno formado por cadenas de residuos de glucosa unidos por enlaces glucosídicos.

G: glucogenina, GS: glucógeno sintasa, GP: glucógeno fosforilasa, PPI: proteína fosfatasa 1

Modificado de: Nelson y Cox, 2006

Aún no se conoce con certeza cuál es la principal función del glucógeno en el sistema nervioso central, sin embargo hasta ahora su papel más importante es el de proveer de energía tanto a la glía como a las células adyacentes durante la actividad metabólica normal (Brown y Ranson, 2007; Poitry-Yamate y Tsacopoulos, 1992; Dringen *et al.*, 1993), así como durante momentos de alta demanda energética o de estrés fisiológico o patológico (Dringen *et al.*, 1993; Tsacopoulos y Magistretti, 1996).

En la retina, las reservas de glucógeno dependen del grado de vascularización en las diferentes especies. En retinas avasculares o poco vascularizadas, la cantidad de glucógeno es mayor que en las retinas más vascularizadas (Kuwabara y Cogan, 1961; Uga y Smelser, 1973), asimismo estas reservas

fluctúan en función de la cantidad de glucosa presente en el medio (Poitry-Yamate y Tsacopoulos, 1992). Estudios con inmunohistoquímica revelaron la presencia de glucógeno y de la glucógeno fosforilasa (GP), enzima encargada de la degradación del glucógeno, en las células de Müller (Ohanian, 1972; Pfeiffer *et al.*, 1994, 2004), sin embargo existen pocos estudios sobre la presencia de la glucógeno sintasa (GS) en éstas células y en general de su función en la retina.

1.2.1 Síntesis del glucógeno (glucogenosis):

La glucosa que se transporta al interior de la células se fosforila por la enzima hexocinasa o glucosinasa para formar glucosa-6-fosfato (G6P). Dependiendo de los requerimientos energéticos de la célula, la G6P puede entrar a la vía de la glucólisis para generar energía o puede ser convertido por la fosfoglucomutasa en glucosa-1-fosfato (G1P) para iniciar la síntesis de glucógeno. La síntesis de glucógeno (fig. 4) es una reacción de polimerización que requiere de la acción de tres enzimas (Voet, 1995):

1. La enzima uridina bifosfato (UDP)-glucosa pirofosforilasa cataliza la reacción entre la G1P y la uridina trifosfato (UTP) para formar UDP-glucosa (UDPG), con lo que se libera una molécula de pirofosfato (PPi). De esta forma la glucosa es sustrato de la glucógeno sintasa (Mathews *et al.*, 2006; Voet, 1995).
2. La GS transfiere la UDPG al extremo no reductor (C4-OH) de una de las ramas del glucógeno para formar un enlace α (1-4) glucosídico. Para iniciar la adición de residuos de glucosa se requiere la presencia de un cebador que se forma en una proteína llamada glucogenina, la cuál cataliza su propia glucosilación: transfiere una glucosa a partir del UDPG a un residuo de tirosina para formar cadenas de hasta ocho residuos de glucosa (Alonso *et al.*, 1995). La glucogenina funciona como un iniciador para que la GS pueda catalizar el alargamiento posterior del glucógeno y

queda embebida en el centro del polisacárido, unida covalentemente al único extremo reductor (Fig. 3; Mathews *et al.*, 2006; Nelson y Cox, 2006).

3. La enzima amilo-(1,4 \rightarrow 1,6)-transglucosilasa o enzima ramificante promueve la remoción de un oligosacárido de 6 o 7 residuos del extremo no reductor de una ramificación y lo adhiere al grupo C6-OH de la misma o de otra cadena cercana. De esta forma se forman más sitios donde adicionar o eliminar residuos de glucosa para agilizar la síntesis o degradación del glucógeno (Mathews *et al.*, 2006).

1.2.2 Degradación del glucógeno (glucogenólisis):

La degradación del glucógeno requiere también de tres pasos (fig. 4):

1. Las unidades de glucosa de los extremos no reductores de las ramificaciones del glucógeno se remueven por la GP mediante una reacción de fosforólisis en la que se rompe el enlace α -(1 \rightarrow 4) mediante la adicción de un fosfato inorgánico (Pi). El producto de esta reacción es la eliminación de un residuo del polisacárido y la formación de G1P (Voet, 1995). La actividad de la glucógeno fosforilasa se detiene cuatro residuos antes del punto de ramificación por lo que se requiere de la acción de la siguiente enzima: la desramificante (Mathews *et al.*, 2006).
2. La enzima desramificante o (α 1,4 \rightarrow α 1,4) glucantransferasa tiene dos actividades: a) la actividad de transferasa, en la que transfiere tres de los cuatro residuos de glucosa restantes a otra rama para que la actividad de la GP continúe y b) la actividad de glucosidasa, con la que rompe el enlace α (1 \rightarrow 6) del residuo restante y se libera una molécula de glucosa (Mathews *et al.*, 2006).
3. Las moléculas de G1P que se formaron por la acción de la GP, se transforman por la enzima fosfoglucomutasa en G6P, que puede entrar a la vía glucolítica o ser hidrolizada a glucosa (Voet, 1995).

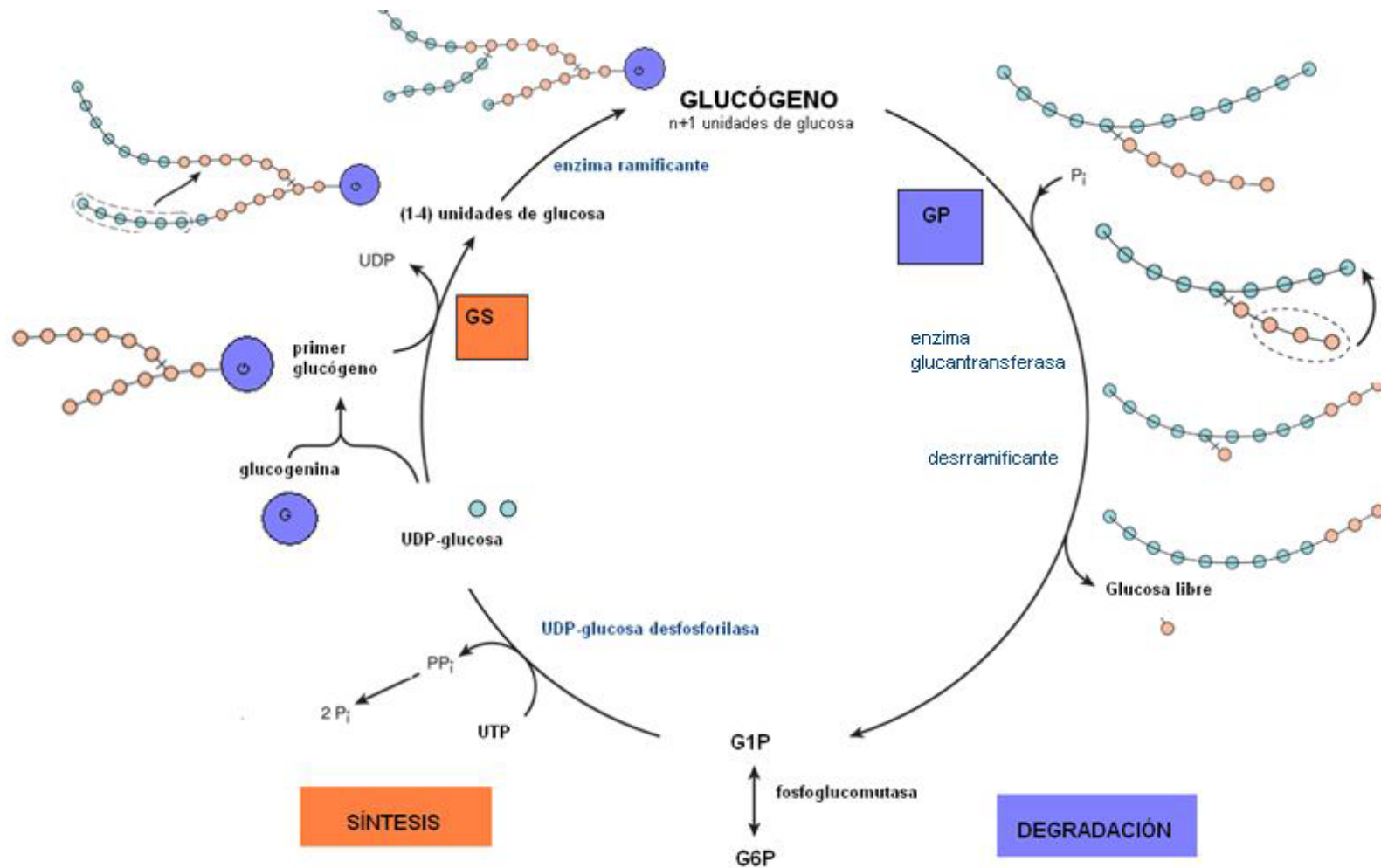


Figura 4. Pasos de la síntesis (izquierda) y degradación (derecha) del glucógeno.

Síntesis: 1) la enzima fosfoglucomutasa convierte G6P en G1P, 2) la UDP-glucosa desfosforilasa adhiere una uridina a la G1P para formar UDP-glucosa, 3) La GS realiza la adición del residuo de glucosa a la cadena de glucógeno previamente iniciada por la glucogenina. Degradación: 1) la GP elimina un residuo de glucosa en forma de G1P, 2) la enzima desramificante transfiere los últimos cuatro residuos de glucosa a otra cadena y libera una glucosa, 3) la fosfoglucomutasa realiza la conversión de las moléculas de G1P liberadas por la GP a G6P.

Modificada de: Murray *et al.*, 2009

1.2.3 La glucógeno sintasa (GS)

La GS (UDP-glucosa:glucógeno 4- α -D-glucosiltransferasa E.C. 2.4.1.11) es la enzima limitante para la síntesis del glucógeno (Ferrer *et al.*, 2003; Prats *et al.*, 2005; Mathews *et al.*, 2006). Es una proteína tetramérica con un peso molecular de aproximadamente 350KDa formada por cuatro subunidades idénticas y se encuentra unida estrechamente a los gránulos intracelulares de glucógeno (Mathews *et al.*, 2006).

En mamíferos están descritas dos isoformas para la GS: la del hígado (LGS) que es específica de este tejido y la isoforma del músculo esquelético (MGS), que se expresa también en otros tejidos, incluyendo al tejido nervioso (Ferrer *et al.*, 2003; Cid *et al.*, 2005). La GS se puede encontrar en dos estados: desfosforilada (activa, GS-a) o fosforilada (inactiva, GS-b) en residuos de serina (Ferrer *et al.*, 2003; Mathews *et al.*, 2006). La MGS posee 9 sitios susceptibles a fosforilación que son fosforilados por diversas cinasas, la fosforilación de cada sitio tiene diferentes efectos sobre su actividad. En la rata, los sitios 2 (Ser⁷) y 2a (ser¹⁰) se encuentran cerca del extremo N-terminal mientras que el resto (3a-c, 4, 5, 1a y 1b) se localiza dentro de los 100 residuos del carboxilo terminal (Lawrence y Roach, 1997). De todos estos sitios, los que provocan una mayor actividad enzimática al ser desfosforilados son los sitios 2, 2a, 3a y 3b mientras que los demás tienen poco o ningún efecto sobre la actividad de la enzima (Lawrence y Roach, 1997; Srivastava y Pandey 1998; Skurat *et al.* 2000). La LGS presenta 7 sitios fosforilables homólogos a los del MGS (Ferrer *et al.*, 2003). Aunque no hay muchos estudios sobre los efectos diferenciales por la desfosforilación en los distintos sitios de la LGS, la desfosforilación en el sitio 2 (ser⁷) parece ser suficiente para activar totalmente la enzima (Ros *et al.*, 2009).

1.2.4 Regulación de la síntesis de glucógeno

Un estricto control de la activación de las enzimas involucradas en el metabolismo de glucógeno se requiere para sostener los requerimientos energéticos de la célula durante diversas condiciones metabólicas. La regulación de la actividad de las dos enzimas encargadas de la síntesis y degradación del glucógeno está dada por la fosforilación en múltiples sitios, por la acción de efectores alostéricos y por su distribución intracelular (Bollen *et al.*, 1998, Ferrer *et al.*, 2003, Ros *et al.*, 2009). Aunque los estudios sobre los mecanismos de la regulación de la enzima GS iniciaron en los años 60, aún no son comprendidos en su totalidad (Prats *et al.*, 2009).

1.2.4.1 Regulación de la actividad de la GS

La GS puede ser fosforilada por al menos 11 proteínas cinasas diferentes, de las cuales la glucógeno sintasa cinasa 3 (GSK3) es la enzima reguladora más importante, añade grupos fosforilo en tres sitios de serina del extremo carboxilo terminal lo que provoca su inactivación (Nelson y Cox, 2006).

El principal activador alostérico de la GS es la G6P, que incluso revierte la inactivación covalente por fosforilación. La G6P provoca en la enzima un cambio conformacional con el que quedan expuestos sus grupos fosfatos, lo que la convierte en un mejor sustrato para las enzimas fosfatasas, en especial la proteína fosfatasa 1 (PP1) que elimina los tres grupos fosforilo de las serinas (Nelson y Cox, 2006; Ferrer *et al.*, 2003; Prats *et al.*, 2005, 2009).

La activación simultánea de la GS y GP se evita por una red de regulación recíproca efectuada por una serie de actividades enzimáticas que poseen todos los tejidos aunque con ciertas diferencias adaptativas en cuanto a la sensibilidad de los estímulos (Mutalik y Venkatesh, 2005; Cárdenas y Goldbeter, 1992).

La activación de las enzimas que regulan el estado de fosforilación de la GS y GP se encuentra bajo control hormonal (Yeaman *et al*, 2001). Algunos ejemplos de estas hormonas son: la insulina, el glucagón y la adrenalina (fig. 5; Mathews *et al.*, 2006). En astrocitos la glucogenólisis se promueve por la noradrenalina, el péptido vasoactivo intestinal, la adenosina y el ATP que provocan la fosforilación de la GP. Por otro lado, el glutamato y la insulina activan la glucogénesis; el primero favorece la captura de glucosa y el segundo induce la desfosforilación de la GS (Hamai *et al.*, 1999; de Almeida Souza *et al.*, 2010, Heni *et al.*, 2011; Dringen y Hamprecht, 1992).

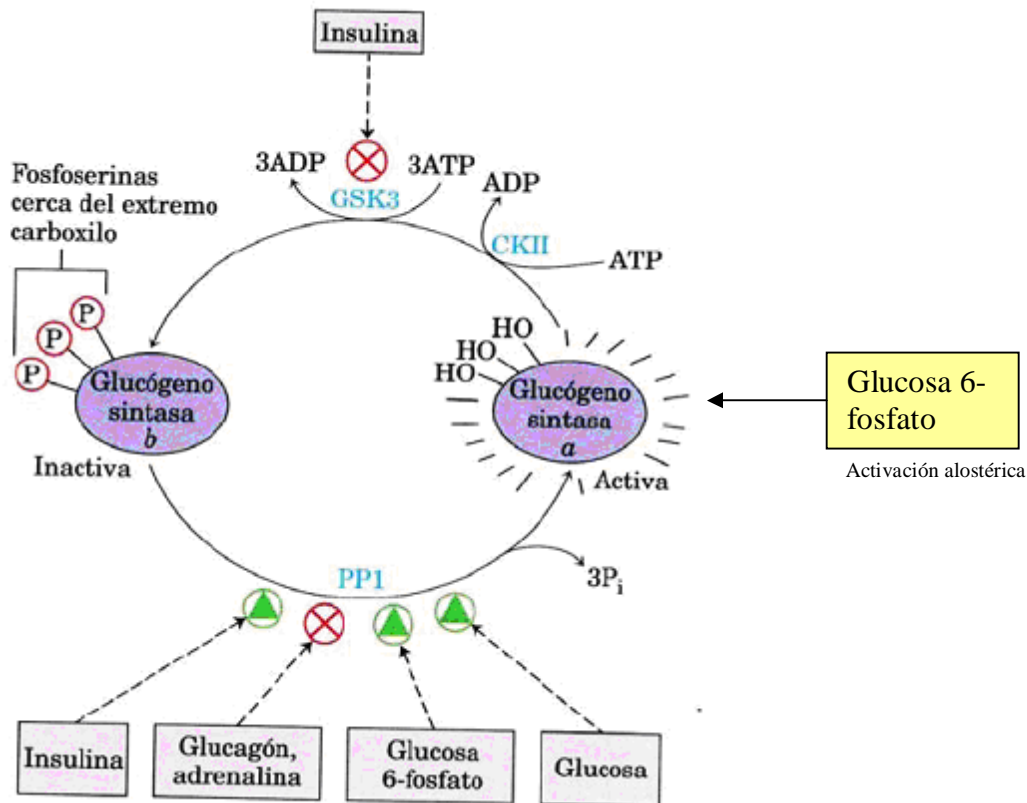


Figura 5. Señales que regulan la activación de la GS.

Modificado de: Nelson y Cox, 2006

Adicionalmente la actividad intrínseca de la MGS se encuentra regulada negativamente por el contenido de glucógeno. Es decir que si los niveles de glucógeno son muy bajos, la GS va a estar menos fosforilada y por tanto activa, mientras que cuando el contenido de glucógeno es alto, la enzima se inactiva (Nielsen *et al.*, 2001; Prats *et al.*, 2009).

1.2.4.2. La insulina y la síntesis del glucógeno

La insulina es una hormona con múltiples funciones, interviene en el metabolismo, en la expresión de genes, en estimulación de la proliferación celular, y en la morfología de las células, ya que puede inducir cambios en el arreglo del citoesqueleto de actina (Tsakiridis *et al.*, 1999; Tobe *et al.*, 2003). Su principal acción metabólica es la estimulación de la captura de nutrientes (glucosa, aminoácidos, ácidos grasos) y su conversión en macromoléculas de almacén tales como el glucógeno, proteínas y triglicéridos (Saltiel, 1996).

El metabolismo del glucógeno está ampliamente regulado por la acción de la insulina que promueve la síntesis de glucógeno a través de dos procesos: por un lado, favorece la entrada de glucosa a la célula por los transportadores de tipo GLUT4 (en inglés “glucose transporter 4”) localizados principalmente en células musculares y adipocitos; y por otro lado, regula la desfosforilación de la GS y GP (Srivastava y Pandey, 1998; Yeaman *et al.*, 2001).

La estimulación de la síntesis del glucógeno por la insulina (fig. 7) inicia con la autofosforilación de su receptor, que provoca la fosforilación y activación de los sustratos del receptor (IRS), consecuentemente se activa la fosfoinositol-3-cinasa (PI3K), que produce fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato (PIP3). Éste es un segundo mensajero que estimula la fosforilación de la proteína cinasa B (PKB o Akt), que a su vez provoca la fosforilación y con ello la inactivación de la GSK3 (Yeaman *et al.*, 2001). La inactivación de la GSK3, promueve la desfosforilación de la GS por la enzima fosfatasa PP1, sobre la cuál la insulina también tiene una acción activadora

(Srivastava y Pandey, 1998; Cohen, 2002), lo que lleva a un aumento en la síntesis de glucógeno.

Aunque la captura de glucosa en células gliales no es dependiente de insulina, recientemente se demostró que la activación de la GS y almacenamiento de glucógeno incrementa en astrocitos (Dringen y Hamprecht, 1992; Hamai et al., 1999; Heni *et al.*, 2011) y en células de Müller (Reinchenbach et al., 1993) incubadas en presencia de insulina.

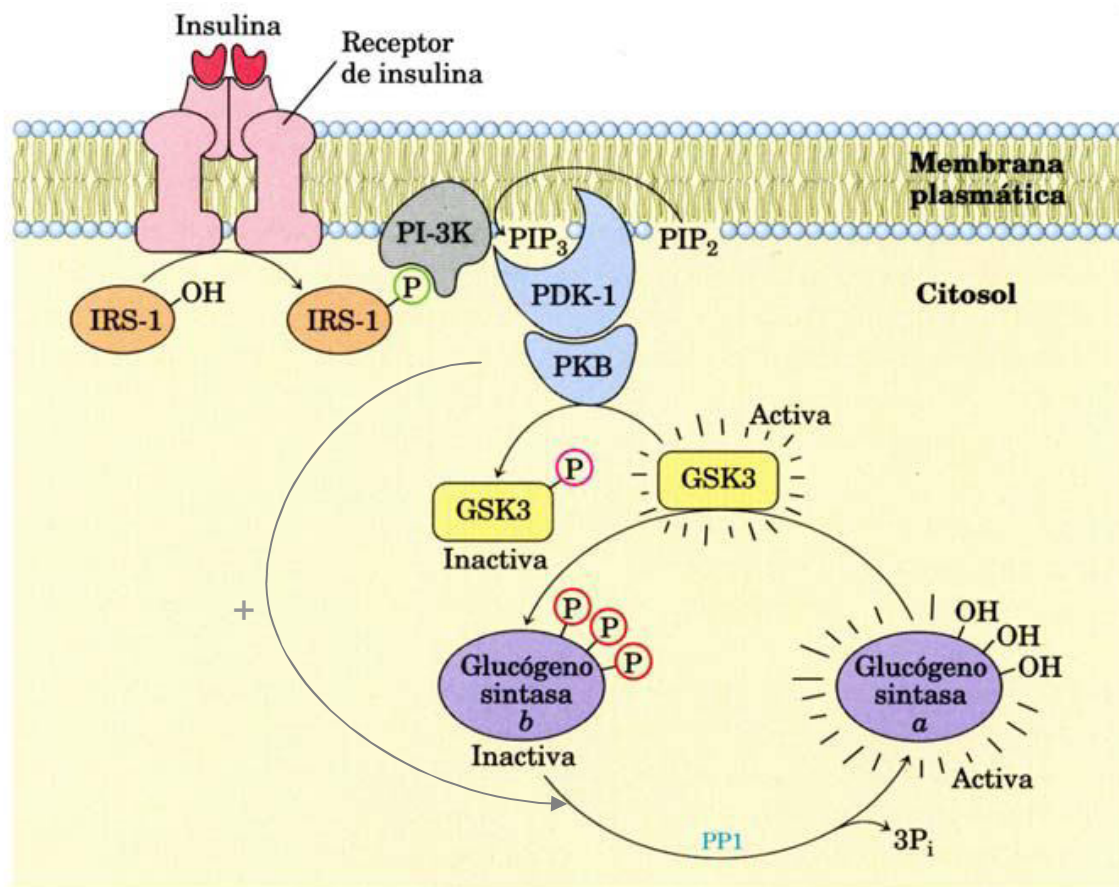


Figura 7. Vía de activación de la GS por la insulina.

La GS se encuentra fosforilada (inactiva) por la GSK3, la cascada de señalización de la insulina promueve la inactivación de la GSK3 y consecuente desfosforilación de la GS por la PP1.

Modificado de: Nelson y Cox, 2006

1.3 EL CITOESQUELETO

El citoesqueleto es una compleja red de filamentos proteícos que le dan forma a la célula, organización interna y movimiento (Alberts *et al.*, 2010). Existen tres tipos de estructuras: los filamentos intermedios, los microtúbulos y los filamentos de actina.

El citoesqueleto se asocia con una variedad de proteínas que permiten la interacción entre sí y con otros componentes celulares lo que resulta en diferentes formas de organización de los filamentos y túbulos. La asociación de estos filamentos y túbulos con proteínas motoras que hidrolizan ATP permiten el movimiento de organelos y otros elementos en la célula (Alberts *et al.*, 2010).

1.3.1 Los filamentos intermedios

Los filamentos intermedios forman una red muy estable que se distribuye en el citoplasma, desde la membrana plasmática hasta el núcleo, y provee a la célula de resistencia contra el estrés mecánico evitando la deformación y ruptura de la membrana plasmática.

Están formados por subunidades monoméricas de proteínas fibrilares entrelazadas entre sí que forman una estructura tipo cuerda. Según el tipo celular pueden estar formados por distintas proteínas (Alberts *et al.*, 2010):

- a) Filamentos de queratina, en las células epiteliales.
- b) Filamentos de vimentina, en células conectivas, musculares y células gliales (marcador de células de Müller; Sarthy y Ripps, 2001).
- c) Neurofilamentos, en los axones de las células nerviosas.
- d) Laminas, forman una red de filamentos llamada lámina nuclear, que rodea y refuerza la membrana nuclear de todas las células animales.

1.3.2 Los microtúbulos

La tubulina forma estructuras tubulares que se pueden ensamblar y desensamblar rápidamente, extendiéndose desde el centrosoma hacia la periferia de la célula. El dinamismo con el que los microtúbulos se arman y desarman les confiere una gran funcionalidad en procesos celulares de señalización, transporte intracelular de componentes celulares, migración, forma y durante la división, ya que forma el huso acromático (Alberts *et al.*, 2010; Bhattacharyya *et al.*, 2008).

El ensamblaje de subunidades de tubulina requiere de trifosfato de guanosina (GTP), sin embargo se hidroliza rápidamente a difosfato de guanosina (GDP) debilitando la unión entre las tubulinas, por lo que en ausencia de GTP el microtúbulo se acorta (Alberts *et al.*, 2010).

La colchicina, es una molécula con alta afinidad por la tubulina libre que altera la incorporación de las subunidades al microtúbulo y por lo tanto detiene su crecimiento, incluso en altas concentraciones provoca su despolimerización (Alberts *et al.*, 2002; Bhattacharyya *et al.*, 2008).

1.3.3 Los filamentos de actina

La actina es la proteína más abundante en las células eucariotas, cada subunidad de actina (G-actina) es un polipéptido de 375 aminoácidos. Los monómeros de G-actina se unen apuntando hacia la misma dirección para formar una cadena helicoidal polarizada (F-actina). La polimerización de la actina requiere de ATP y su hidrólisis favorece la despolimerización (Alberts *et al.*, 2010).

Las citocalasinas y faloidinas son ejemplos de moléculas orgánicas que se unen a la actina y han sido empleadas para el estudio de la polimerización y dinámica de los microfilamentos. La citocalasina se une al extremo positivo lo que evita la polimerización por ese lado, mientras que por el extremo negativo la hidrólisis constante del ATP provoca la despolimerización de la actina, lo que disminuye la

longitud del microfilamento (Cooper, 1987). La faloidina tiene mayor afinidad por los microfilamentos que los mismos monómeros de G-actina por lo que se une a todo lo largo del filamento y estabiliza por completo al filamento (Alberts *et al.* 2002; Cooper, 1987). El uso de derivados fluorescentes de la faloidina permiten cuantificar y estudiar la localización de los filamentos de actina *in vitro* (Cooper, 1987).

Los filamentos de actina se asocian a una gran variedad de proteínas que forman una red dinámica localizada justo debajo de la membrana plasmática llamada córtex celular (Alberts *et al.*, 2010). La orientación de los filamentos está controlada por sitios de nucleación (sitios de anclaje e inicio de la polimerización) en la membrana plasmática por lo que éstos dos mantienen una estrecha relación.

Diversas señales que llegan a la membrana plasmática (p. e. la insulina; Tobe *et al.*, 2003) pueden provocar una reestructuración de los microfilamentos y por lo tanto, la reorganización del córtex favoreciendo distintas formas celulares, polarización, formación de lamelipodios, filopodios o la retracción de la membrana para la división celular. De esta manera el citoesqueleto de actina puede ser considerado como una parte integral del sistema de transducción de señales de la célula (Alberts *et al.*, 2010).

2. ANTECEDENTES

Recientemente se observó en hepatocitos y células musculares que el control del metabolismo del glucógeno no está dado únicamente por la regulación alostérica y grado de fosforilación de las enzimas GS y GP, sino también por su distribución intracelular. La distribución del glucógeno y de la GS dentro de la célula no es uniforme y se modifica de acuerdo a las concentraciones extracelulares de glucosa (Fernandez-Novell *et al.*, 1992, 1997; Cid *et al.*, 2005).

2.1 Distribución subcelular de la GS en hepatocitos

La formación de glucógeno en hígado ocurre en función de las concentraciones de glucosa en sangre, adicionalmente, la presencia de insulina promueve la activación de la GS y por lo tanto aumenta la síntesis de glucógeno (Mathews *et al.*, 2006).

Al-Habori y colaboradores, en 1991 incubaron células hepáticas en presencia de insulina y observaron que la síntesis de glucógeno disminuyó significativamente al agregar citocalasina (inhibidor de microfilamentos) o colchicina (inhibidor de microtúbulos) al medio. Esto demostró que el citoesqueleto participa en la síntesis de glucógeno.

En 1997 Fernández-Novell y colaboradores observaron con técnicas de inmunocitoquímica que la GS está distribuida homogéneamente en el citoplasma de los hepatocitos recién aislados y se moviliza hacia la periferia, a una región rica en actina, cuando éstos son incubados en presencia de altas concentraciones de glucosa (30 mM; fig. 6). Además observaron que el glucógeno se acumula desde la periferia hacia el centro de la célula. En 2001, García-Rocha y colaboradores obtuvieron resultados semejantes en hepatocitos en cultivo, pero en este caso no encontraron colocación de la GS y la actina (Fig. 6). A pesar de esto la incubación con citocalasina sí afectó la translocación de la enzima a la periferia celular.

2.2 Distribución subcelular de la GS en músculo:

En las células musculares en cultivo, a diferencia de hepatocitos, la MGS se concentra dentro del núcleo cuando los miocitos se incuban en ausencia de glucosa y los niveles de glucógeno son bajos; cuando las concentraciones de glucosa son altas, la MGS se distribuye en el citoplasma en forma de agregados unidos al glucógeno (Ferrer *et al.*, 1997).

Nielsen y colaboradores en 2001 observaron en músculo esquelético que cuando los niveles de glucógeno disminuyen, la GS se asocia con una fracción celular que corresponde al citoesqueleto.

En 2005, Prats y colaboradores observaron con inmunohistoquímica que en el músculo esquelético, posterior a una estimulación eléctrica intensa, la MGS se asocia al citoesqueleto de actina y forman compartimentos intracelulares dinámicos que favorecen la re-síntesis de glucógeno. Más tarde mostraron que la MGS tiene una distribución distinta en el músculo según el estado de activación. La formación de dichos compartimentos está relacionado con la desfosforilación de la MGS en los sitios 2 y 2a, es decir, cuando la enzima está más activa, lo que concluyeron, es una forma reunir a la enzima y mejorar la eficiencia en la síntesis de glucógeno bajo ciertas situaciones metabólicas (Prats *et al.*, 2009).

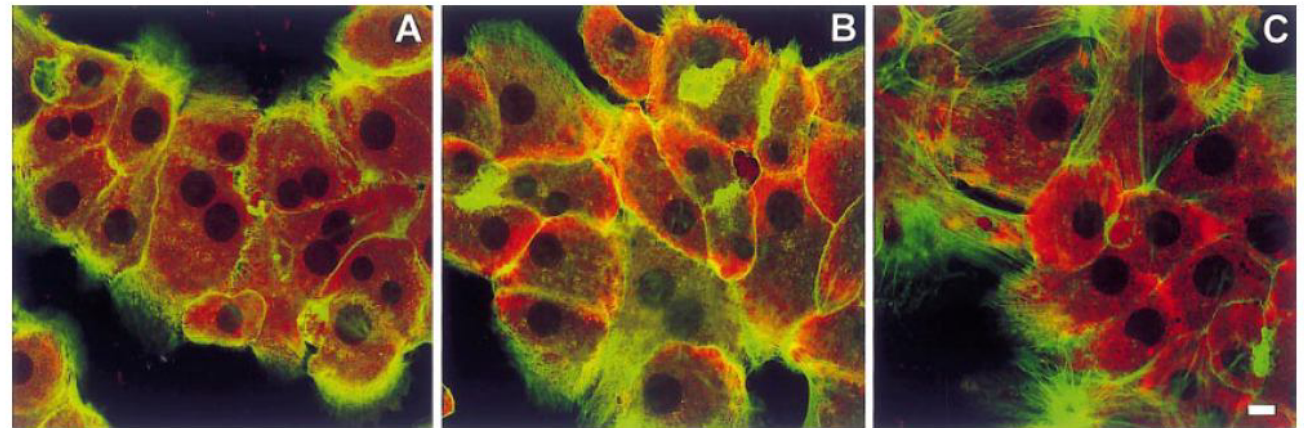
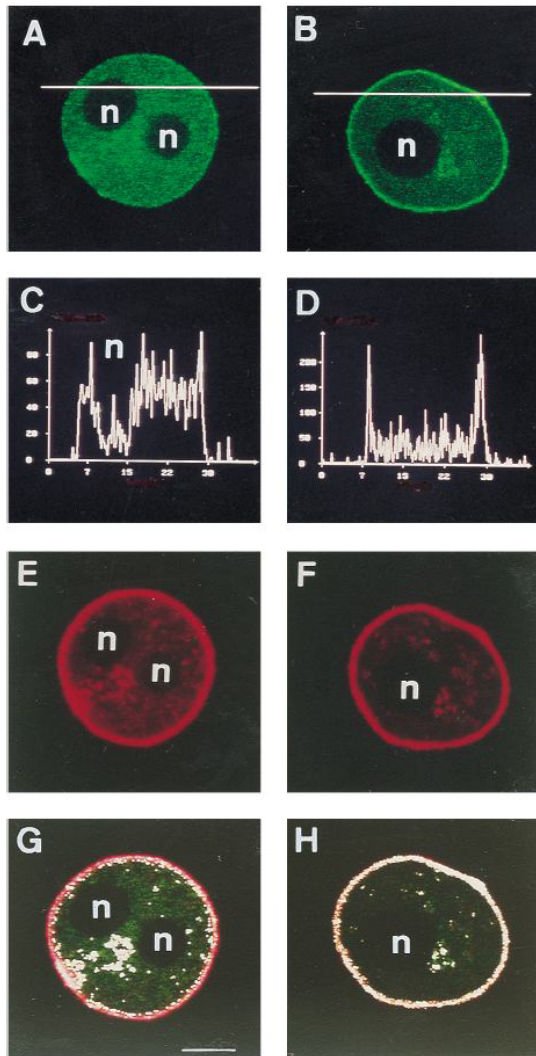


Figura 6. Estudios realizados sobre la distribución de la GS y su relación con la actina. Izquierda: Hepatocitos aislados incubados en ausencia (A, E, G) o presencia (B, F, H) de 30mM de glucosa por 30min. (A y B) inmunocitoquímica contra GS (verde); (C, D) distribución subcelular de la GS; (E y F) actina detectada con faloidina (rojo); (G y H) colocalización de actina y GS (en blanco). La incubación con glucosa provoca la translocación de la GS en la periferia de las células, colocalizando con la actina. Fernández-Novell *et al.*, 1997.

Derecha: Cultivo de hepatocitos incubados en ausencia (A) o presencia de 30mM de glucosa por 8h (B) y 24hrs (C). La GS (rojo) se distribuye en el citoplasma y no coincide con los filamentos de actina (verde). García-Rocha *et al.* 2001

2.3 Metabolismo del glucógeno en las células de Müller

En 1961 se descubrió que el glucógeno de la retina se sintetiza y almacena en las células de Müller (Kuwabara y Cogan, 1961). La glía expresa las enzimas necesarias para la síntesis y degradación del polisacárido (Pfeiffer et al., 1994, 2004), pero poco se sabe sobre la distribución y mecanismos de regulación de la GS en las células de Müller.

Como ya se mencionó, los depósitos de glucógeno en las células de Müller dependen de las concentraciones de glucógeno en el medio (Poitry-Yamate y Tsacopoulos, 1992). Aunque las células de Müller presentan transportadores de glucosa no-dependientes de insulina (GLUT1 y 2; Mantych *et al.*, 1993; Watanabe *et al.* 1994), se ha visto que en células de Müller de conejo en cultivo y en retinas aisladas de gato la síntesis de glucógeno aumenta en presencia de esta hormona (Reinchenbach et al., 1993; Linsel *et al.* 2000; Niemeyer, 2001). El receptor de insulina se localiza a lo largo de toda la célula de Müller (Gosbell *et al.*, 2002; Reiter y Gardner, 2003) y estudios de nuestro laboratorio demostraron que la vía PI3K-Akt-GSK3-GS está presente en la retina (Sánchez-Chávez y Salceda, no publicado), por lo que es probable que la síntesis de glucógeno se active a través de esta vía.

2.4 El Glucógeno y la GS en el núcleo.

Aunque normalmente se refiere que el glucógeno es almacenado en el citoplasma (Voet, 1995), también se ha reportado su presencia en el núcleo de distintos tipos celulares, tales como hepatocitos, adipocitos y células musculares (Granzow *et al.* 1981; Kopun *et al.* 1982; Ferrer *et al.* 1997). Se piensa que esta localización nuclear se debe a anomalías en el metabolismo del glucógeno, ya que es más frecuente en condiciones patológicas como la diabetes o tumores (Granzow *et al.* 1981; Ferrans *et al.*, 1975; Caramia *et al.*, 1968; Kopun *et al.* 1982; Cid *et al.*, 2005). En este sentido, existe evidencia de que la GS sintetiza glucógeno en el núcleo de células tumorales (Granzow *et al.*, 1981).

En retinas de ratas sanas, Amemiya (1970) demuestra que existe síntesis de glucógeno en el núcleo de las células de Müller, lo que no sucede en las demás células del tejido. Estas parecen ser las únicas células que en condiciones no patológicas sintetizan glucógeno intranuclear, lo que podría estar relacionado con el elevado metabolismo del glucógeno que tienen.

Con el objetivo de conocer los posibles mecanismos que regulan el metabolismo del glucógeno en las células de Müller e identificar si son equivalentes a lo que ocurre en hepatocitos y músculo, estudiaremos con técnicas de inmunocitoquímica la distribución de la GS en la glía de Müller en cultivo en presencia de altas concentraciones de glucosa (30 mM) o de concentraciones fisiológicas en presencia de insulina (10 ng/ml).

Bajo estas condiciones se estudiará la distribución de los filamentos de actina y su posible colocalización con las GS. Se evaluará también la posible participación de los microtúbulos en la distribución de la enzima, utilizando para ello colchicina.

Se evaluará el efecto de la insulina y las altas concentraciones de glucosa en el metabolismo y/o viabilidad celular utilizando el ensayo de MTT.

3. HIPÓTESIS

En las células de Müller, la GS cambia su distribución subcelular en respuesta a la insulina y a las altas concentraciones de glucosa en el medio. La distribución subcelular de la GS está relacionada con el citoesqueleto.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Conocer la localización subcelular de la GS en las células de Müller en cultivo y su relación con el citoesqueleto.

4.2 Objetivos particulares

En las células de Müller en cultivo:

1. Localizar a la GS por medio de inmunocitoquímica.
2. Observar la organización de los filamentos de actina (F-actina) con faloidina.
3. Observar el curso temporal (1, 3 y 6 horas) de la distribución de la GS y de los filamentos de actina en altas concentraciones de glucosa (30 mM) y en presencia de insulina (10 ng/ml).
4. Demostrar con colchicina la participación de los microtúbulos en la distribución de la GS.
5. Evaluar el efecto de las altas concentraciones de glucosa y presencia de insulina en el medio sobre el metabolismo mitocondrial y la viabilidad celular a tiempos cortos (1 a 24 horas) y largos (hasta una semana).

5. MÉTODOS

5.1. Cultivo de células de Müller

El cultivo se elaboró mediante una modificación del método descrito por Hicks y Courtois, 1990. Ratas Long Evans de siete días de edad se decapitaron, se extrajeron los ojos y se dejaron incubando a temperatura ambiente, en la oscuridad durante toda la noche en Dulbecco's modified Eagles Medium (DMEM; Sigma D6546, 5.5 mM de glucosa, anfotericina B 2.5 µg/ml, penicilina 100 U/ml, estreptomicina 10 mg/ml y L-glutamina 2 mM).

Al día siguiente los ojos se lavaron ligeramente con alcohol al 70% y se incubaron por 30 minutos en solución salina de Hanks libre de calcio y magnesio (HBSS-CMF) con tripsina al 0.1% a 37°C. Al terminar la incubación los ojos se colocaron en DMEM suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% (DMEM-S10) para inactivar a la tripsina.

Cuidadosamente se cortó cada ojo a nivel ecuatorial, se eliminó la parte anterior y la copa óptica se agitó suavemente en DMEM-S10 para desprender la retina. Con una pipeta Pasteur se tomaron las retinas y se disgregaron mecánicamente en 3ml de DMEM-S10 con 100µl de desoxirribonucleasa I (DNasa; 4000U/ml), las células disociadas se diluyeron en el medio DMEM-S10 y se sembraron.

Para cada caja de 24 pozos se emplearon dos retinas diluídas en 12 ml de DMEM-S10 y se sembraron lo más homogéneamente posible en cada uno de los pozos (0.5 ml por pozo, ~ 500 000 células por pozo). Previo al sembrado, se colocó un cubreobjetos de vidrio en cada pozo sobre el cuál crecieron las células. Tres días después de la siembra, se incubó el cultivo por seis horas en DMEM (sin suero) para provocar la muerte neuronal y obtener un cultivo de glía más puro.

Las células crecieron en DMEM-S10 por dos semanas o hasta alcanzar la confluencia (80%) en una incubadora a 37° C en una atmosfera húmeda de 5% CO₂ / 95% aire. Para eliminar las neuronas adheridas a las células gliales, cada tercer o cuarto día se realizó un cambio de medio pipeteándolo directamente sobre las células gliales y reemplazándolo por medio fresco (DMEM-S10).

5.2. Tratamientos

Se retiró el medio de cultivo (DMEM-S10) y las células se incubaron bajo distintas condiciones por diferentes periodos de tiempo.

- a) **Control:** DMEM-S10.
- b) **Glucosa:** DMEM-S10 adicionado con 30 mM de glucosa.
- c) **Colchicina:** DMEM-S10 adicionado con 20 μ M de colchicina.
- d) **Glucosa+Colchicina:** DMEM-S10 adicionado con 30 mM de glucosa y 20 μ M de colchicina.
- e) **Sin suero (S/S):** DMEM sin SFB.
- f) **S/S + Insulina:** DMEM sin SFB adicionado con 10 ng/ml de insulina.

5.3. Inmunocitoquímica

Las células se incubaron bajo las condiciones mencionadas durante 1, 3, 6 y 24 horas; al finalizar el tratamiento, se eliminó el medio de cultivo y las células adheridas a los cubreobjetos, se lavaron dos veces con buffer fosfato salino (PBS; KCl 1.3 mM, KH₂PO₄ 0.5 mM, Na₂HPO₄ 3.2 mM, NaCl 135 mM, pH 7.4) y se fijaron con paraformaldehído al 4% - sacarosa al 4% por 10 minutos. Posteriormente se lavaron dos veces con PBS y se permeabilizaron con PBS - saponina al 0.4% (PBS-S) durante 7 minutos. Se incubaron durante 60 minutos en solución de bloqueo (suero normal de cabra al 5% y albumina de suero bovino al 1% en PBS-S) en una cámara húmeda y posteriormente se incubó con un anticuerpo primario, anti-GS (Cell Signaling, generado en conejo) a una dilución 1: 50 durante toda la noche.

Al día siguiente, se realizaron tres lavados de 10 minutos con PBS-S y se incubó con el anticuerpo secundario, anti-conejo-TRITC (Isotiocianato de Tetrametil Rodamina; 1:400) por dos horas en una cámara húmeda, a temperatura ambiente y protegido de la luz. Se lavó con PBS-S, se agregó 40 mg/ml de faloidina-FITC (Isotiocianato de Fluoresceína) y se incubó por 40 minutos adicionales. Se lavó nuevamente cuatro veces con PBS-S, se montó con Vectashield-DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol; Vector Laboratories) para detectar los núcleos y se selló con esmalte de uñas.

Para reconocer a la glía se usó el anticuerpo anti-vimentina (Millipore, generado en ratón, dilución 1: 250) y el secundario anti-ratón-Cy3 (Indocarbocianina, Zymed, generado en cabra, dilución 1: 200).

5.4. Observaciones microscópicas

Las células se observaron en un microscopio de epifluorescencia Nikon con un objetivo de 20x y se fotografiaron con una cámara Nikon DXM 1200.

Para la fluorescencia triple (GS-TRITC, faloidina-FITC, DAPI) se usó un microscopio confocal Olympus FV1000 (unidad de microscopía electrónica, IFC, UNAM), con un objetivo super apocromático de inmersión en aceite 40X y se tomaron planos en Z de aproximadamente 0.8 a 2 μm por rebanada. De cada condición se observaron 4 ó 5 campos, las fotos mostradas son representativas de cada condición.

El porcentaje de células con GS intranuclear se obtuvo a partir del total de células contadas en los campos observados de cada condición (de 20 a 50 células por campo, de 100 – 150 células totales). Los datos mostrados para cada condición son el promedio de los porcentajes obtenidos de cada campo.

5.5 Metabolismo y viabilidad celular

Al finalizar los tratamientos mencionados (1h - 7días), se agregaron 50 μl de la solución de MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol 5 mg/ml PBS) a cada pozo y se incubó a 37°C por 15 minutos. Al terminar la incubación, se agregaron 300 μl de dimetil sulfóxido (DMSO) y se agitó por 5 minutos para disolver los cristales formados. Se leyó la absorbancia de 200 μl de cada muestra en un espectrofotómetro de microplacas (Biotek) a una longitud de onda de 570 nm.

El MTT es una sustancia de color amarillo que por la actividad mitocondrial de las células vivas es reducida en cristales de formazán de color morado oscuro, la intensidad de la reacción representa la actividad mitocondrial y ésta se considera como un índice de viabilidad celular (Mosmann, 1983). Los resultados se expresan como el porcentaje de viabilidad respecto al control (100%) de dos o más experimentos independientes realizados por duplicado.

5.6 Análisis estadístico

Los datos del MTT se analizaron con el programa GraphPad Prisma 5, se usó la prueba de análisis de varianzas de una vía (one-way ANOVA) y una prueba posterior de Dunnett para obtener las diferencias estadísticamente significativas de cada grupo con respecto al control.

6. RESULTADOS

6.3. Caracterización del cultivo de glía de Müller.

El cultivo realizado se identificó con el anticuerpo contra vimentina (foto 1), un marcador despecífico de filamentos intermedios muy empleado para reconocer células gliales de Müller.

La organización de los filamentos de actina se observó utilizando faloidina-FITC (foto 2), alcaloide que se une específicamente a la F-actina. Este inmunomarcaje también nos permitió observar la morfología celular.

La morfología de una célula de Müller en cultivo varía notablemente a la observada en el tejido intacto (fig. 1); inicialmente las células en cultivo adquieren una forma fibroblástica y posteriormente (en confluencia) se aplanan y extienden presentando una variedad de prolongaciones (foto 1, 2).

6.2. La glucosa provoca la translocación de la GS del citoplasma al núcleo

En condiciones normales (DMEM-S10) el inmunomarcaje de la GS se observa como pequeños puntos distribuidos en todo el citoplasma, aunque se concentra alrededor del núcleo (foto 3).

Cuando las células fueron incubadas en presencia de altas concentraciones de glucosa (30 mM) durante una hora, la distribución de la GS fue homogénea en el citoplasma de todas las células (foto 4A). Adicional a la presencia de la señal en el citoplasma, a las 3 horas de tratamiento el 86% de las células observadas presentaron inmunomarcaje de GS en el núcleo (foto 5A).

La GS en el núcleo forma de 1 a 3 grandes gránulos con un fuerte inmunomarcaje (foto 5A, 6) que miden de 2 a 5 micras de diámetro.

A las 6 horas de incubación el 54% de las células tuvieron cúmulos de GS en el núcleo de aproximadamente 3 micras de diámetro. Adicionalmente la señal de GS en el citoplasma se mantuvo pero se observó en algunas células (20%) alrededor del núcleo (foto 7A).

6.3. La insulina provoca la translocación de GS del citoplasma al núcleo

Para ver los efectos de la insulina en la distribución de la enzima, las células se incubaron en medio sin suero en ausencia o presencia de 10 ng/ml de insulina. A todos los tiempos de incubación en ausencia de suero e insulina la GS se distribuye homogéneamente en el citoplasma (foto 8A, 9A, 10A). Bajo esta condición sólo observamos que un 3% de las células presentaron pequeños cúmulos intranucleares de no más de 2 micras de diámetro.

En las células incubadas con insulina (foto 8C, 9C y 10C), la distribución de la GS en el citoplasma es parecida a la observada en condiciones controles (foto 3): se concentra alrededor del núcleo. A las 3 y 6 horas de incubación con insulina la señal intranuclear se observa en un 45 y 63% de las células respectivamente (foto 9C y 10C). Los cúmulos aumentaron de tamaño con el tiempo de incubación; a las 3 horas midieron entre 1 y 2 micras, mientras que a las 6 horas midieron alrededor de 3 micras.

En el cuadro 1 (p. 32) se resumen los datos obtenidos para comparar más fácilmente lo que sucede bajo las distintas condiciones (control vs. altas concentraciones de glucosa y presencia de insulina). En condiciones controles únicamente encontramos 3 células que tenían señal de GS en el núcleo. Podemos ver que la mayor acumulación de GS intranuclear, tanto en frecuencia como en tamaño de los gránulos, se obtuvo en presencia de altas concentraciones de glucosa a las 3 y 6 horas, sin embargo no hubo una diferencia significativa con respecto al tratamiento con insulina que también presentó gránulos intranucleares de GS.

6.4. Los filamentos de actina no colocan con la GS

Los distintos tratamientos aplicados provocaron cambios en la organización de los filamentos de actina y en la morfología celular. Bajo condiciones de altas concentraciones de glucosa las células se contraen a la primera hora de incubación (foto 4B), pero recuperan progresivamente, a las 3 y 6 horas, su forma y tamaño (foto 5B y 7B).

En ausencia de suero, los filamentos de actina se acortan y las células se contraen. A la primera (foto 8B) y tercer hora (foto 9B) de incubación las células

tienen proyecciones cortas que probablemente sean los sitios de nucleación que se mantienen mientras que el resto del citoesqueleto se retrae. A las 6 horas en medio sin suero las células están totalmente contraídas y redondeadas (foto 10B), no presentan proyecciones.

El tratamiento con insulina mantuvo la polimerización y longitud de los microfilamentos, durante todos los tiempos observados (1, 3 y 6 horas; foto 8D, 9D y 10D) las células presentan una morfología aplanada y extendida parecida a las células en condiciones de control (foto 3).

A diferencia de lo que esperábamos, bajo ninguna condición observamos la colocalización de la GS y la actina, por lo que no podemos afirmar que exista una interacción directa entre estas dos.

6.5. Los microtúbulos participan en la translocación de la GS del citoplasma al núcleo

Debido a que la presencia de GS intranuclear fue más frecuente en las células incubadas en altas concentraciones de glucosa a las 3 horas, decidimos adicionar bajo estas condiciones 20 μ M de colchicina, un inhibidor de la formación de microtúbulos.

Como se observa en la foto 11, el tratamiento con colchicina inhibió totalmente la acumulación de GS en el núcleo de las células incubadas en altas concentraciones de glucosa durante 3 horas, lo que sugiere que los microtúbulos participan en la translocación de la GS del citoplasma al núcleo.

6.6. La glucosa y la insulina modifican la actividad metabólica

El ensayo de MTT mide la actividad mitocondrial de las células y se utiliza ampliamente para determinar la viabilidad celular bajo distintos tratamientos.

El ensayo de MTT mostró a las 6 y 24 horas de incubación en altas concentraciones de glucosa, una disminución estadísticamente significativa del porcentaje de MTT reducido de un 20 y 28% respectivamente, sin embargo éste se recuperó a tiempos mayores de incubación (3 a 7 días; gráf. 1).

El tratamiento con 20 μ M de colchicina durante 3 horas no modificó significativamente la actividad metabólica de las células incubadas en presencia o ausencia de 30 mM de glucosa (gráf. 2).

Al incubar las células en medio sin suero, no se obtuvieron cambios estadísticamente significativos en los valores de MTT reducido (gráf. 3), aunque sí presentan una tendencia a disminuir.

La adición de 10 ng/ml de insulina al medio sin suero provocó durante las primeras 24 horas un descenso del metabolismo mitocondrial del 29%, pero a pesar de esta significativa reducción, a tiempos posteriores (3 a 7 días) los niveles se recuperaron en su totalidad (gráf. 4).

Para ver si los datos de MTT reducido se podrían deber a cambios en la viabilidad celular, se observaron los núcleos teñidos con DAPI bajo cada una de las condiciones anteriores. Estas observaciones no demostraron evidencia de muerte celular.

Condición	Tiempo (h)	Porcentaje de células con GS intranuclear	Tamaño de cúmulos intranucleares (micras)
Control		2 ± 1	2
Glucosa (30mM)	1	0	-
	3	86 ± 12 ***	2 – 5
	6	54 ± 9 **	3
Insulina (10ng/ml)	1	0	-
	3	45 ± 18 *	1 - 2
	6	63 ± 12 ***	3

Cuadro 1. Resumen de la distribución de la GS bajo los distintos tratamientos.

One-way ANOVA, * p<0.005, ** p<0.001, ***p<0.0001 de significancia con respecto al control (Dunnett's post test).

En medio sin suero, a todos los tiempos estudiados, el porcentaje de células con acumulación de GS intranuclear fue igual al control, por lo que no se incluye en el cuadro.

6.7. Fotografías

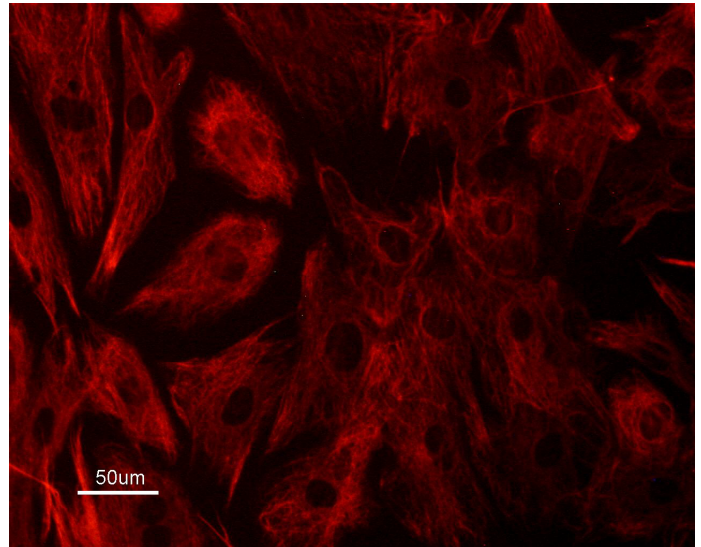
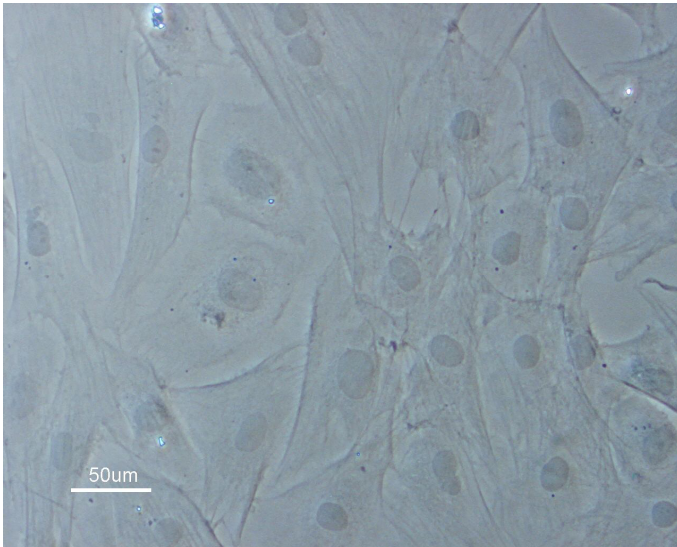


Foto 1. Caracterización del cultivo prácticamente puro de células de Müller, utilizando vimentina, un marcador específico de los filamentos intermedios de este tipo de glía. Derecha: cultivo en campo claro; izquierda: células marcadas con vimentina (rojo).

Se usó el anticuerpo anti-vimentina (Millipore 1: 250) y el secundario Cy3 (Zymed 1: 200).

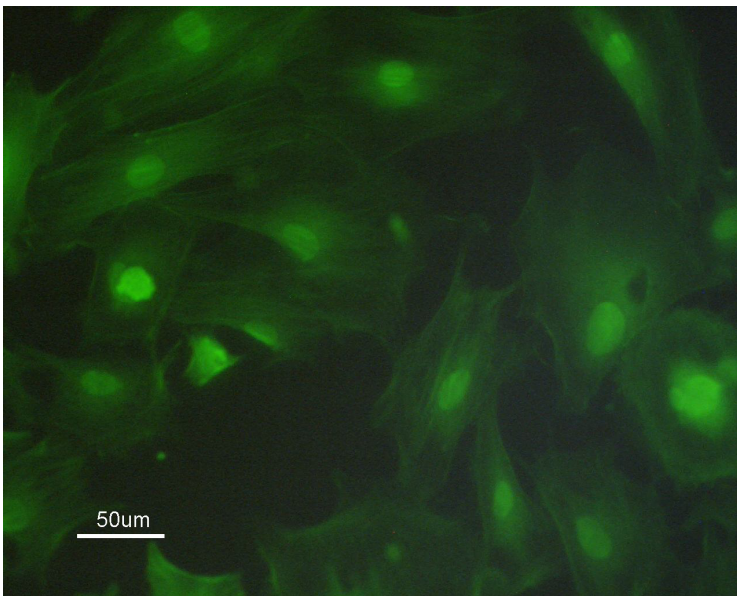


Foto 2. Morfología de las células de Müller en condiciones controles (DMEM-S10).

Las células de Müller en cultivo tienen una morfología aplanada e irregular que difiere a la observada en la retina completa (representada en fig. 1).

Filamentos de actina marcados con faloidina-FITC (40 mg/ml).

Fotos tomadas con un microscopio de epifluorescencia Nikon y una cámara DXM1200.

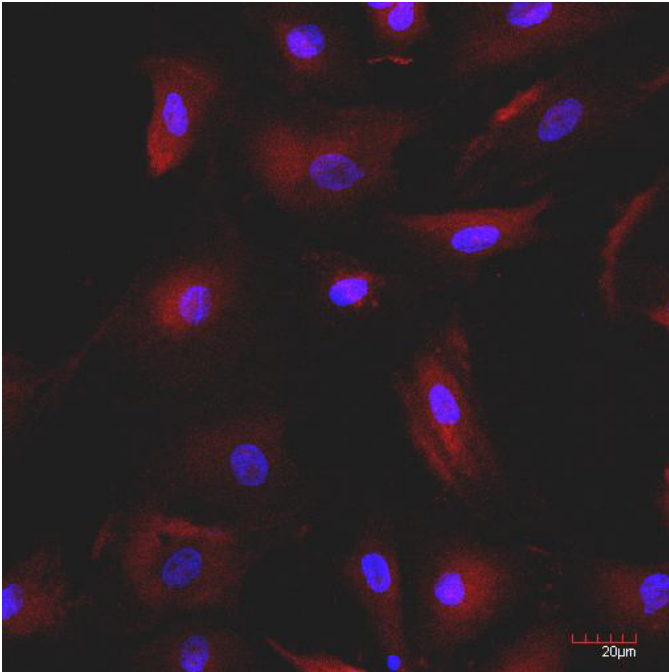
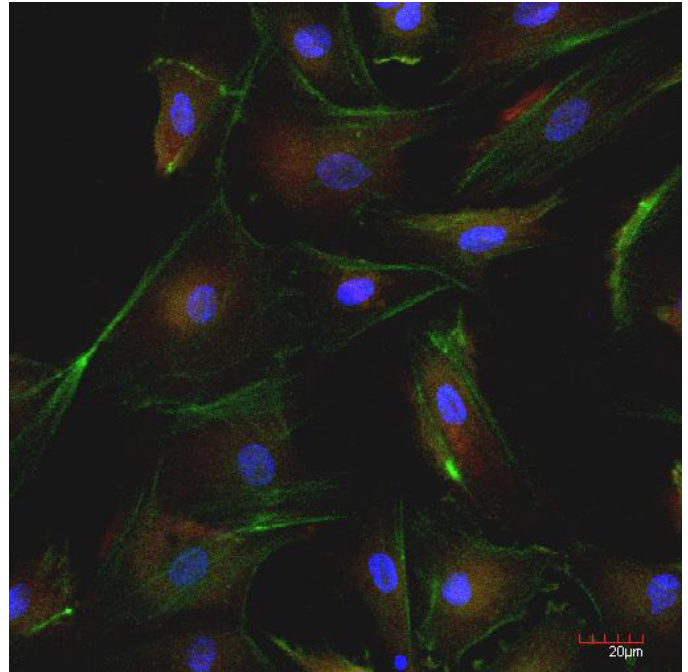
GS**GS + faloidina**

Foto 3. Localización subcelular de la GS en las células de Müller en cultivo bajo condiciones controles (DMEM-S10).

A la izquierda se observa la GS-TRITC (rojo) y los núcleos marcados con DAPI (azul), a la derecha se observa adicionalmente los filamentos de actina (verde).

La GS se encuentra difusa por todo el citoplasma y concentrada perinuclearmente.

Para la inmunocitoquímica se usó el anticuerpo primario anti-GS (Cell-Signaling, 1: 50) y el secundario marcado con TRITC, para reconocer a la actina se usó faloidina-FITC (40 mg/ml). Los cubreobjetos se montaron en vectashield-DAPI para observar los núcleos (ver métodos).

Las fotos se tomaron con un microscopio confocal Olympus FV1000 y un objetivo superapocromático de inmersión en aceite 40X, se muestra la suma de los planos tomados en Z.

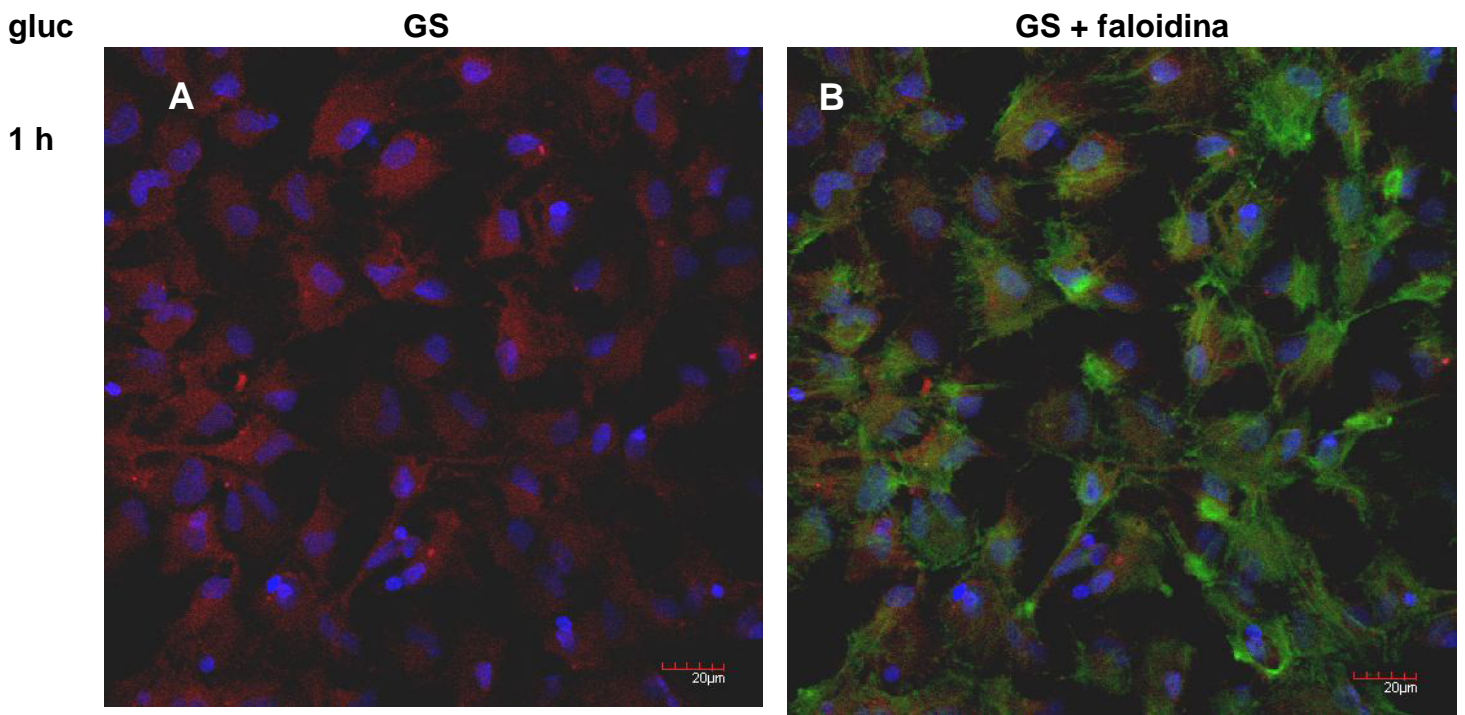


Foto 4. Inmunocitoquímica de células incubadas en medio con altas concentraciones de glucosa por 1 hora. La GS se distribuye en todo el citoplasma de las células incubadas con altas concentraciones de glucosa (A). Las células se contraen y presentan pequeñas proyecciones (B).

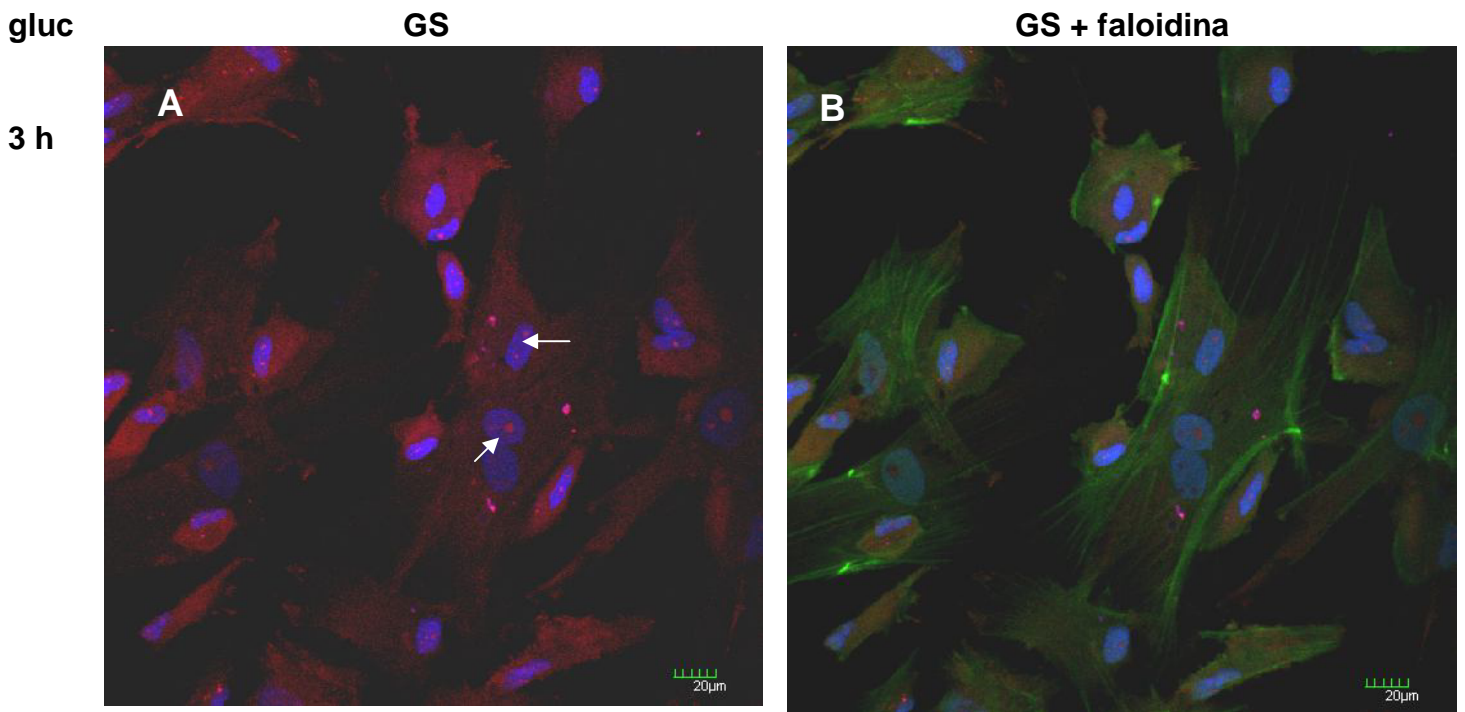


Foto 5. Inmunocitoquímica de células incubadas en medio con altas concentraciones de glucosa por 3 horas. Adicional a la distribución de la GS homogénea en el citoplasma, la inmunofluorescencia de GS se observa en el núcleo en forma de densos cúmulos esféricos (A, flechas blancas; ver acercamiento en foto 6). Las células recuperan su forma y tamaño (B).

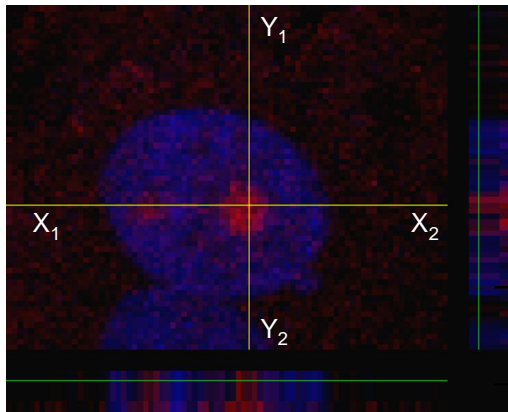


Foto 6. Acercamiento del núcleo de la célula en el centro de la foto 4. La fotografía muestra cortes ópticos (en Z) los ejes X y Y, de esta forma se puede determinar que el inmunomarcaje a GS está en el núcleo, en forma de gránulos densos.

→ Corte óptico $Y_1 - Y_2$

→ Corte óptico $X_1 - X_2$

gluc

GS

GS + faloidina

6hrs

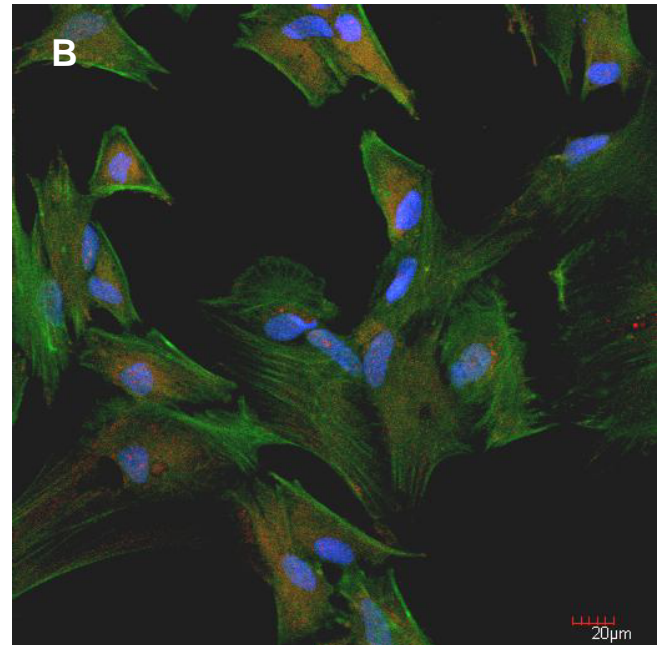
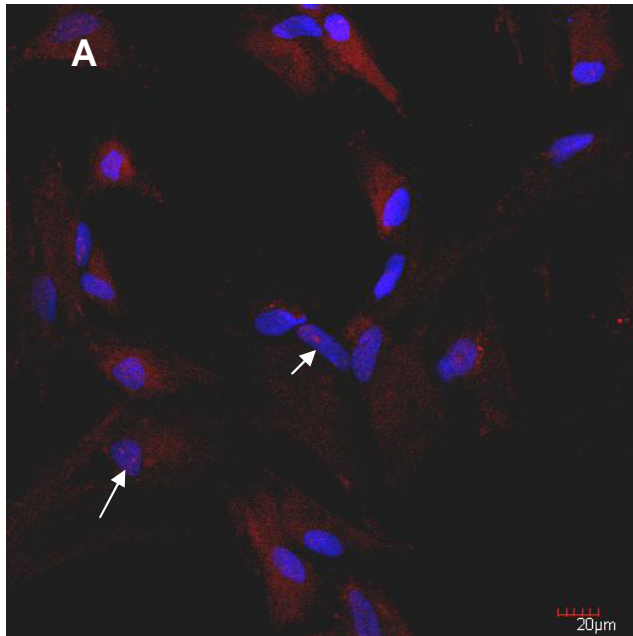


Foto 7. Inmunocitoquímica de células incubadas en medio con altas concentraciones de glucosa por 6 horas.

El inmunomarcaje de la GS en el núcleo es menos frecuente y de menor tamaño (A, flechas blancas) que en las células incubadas por 3 horas (foto 6). La señal de GS en el citoplásmica es menos intensa y se concentra alrededor del núcleo. Las células recuperan su tamaño (B).

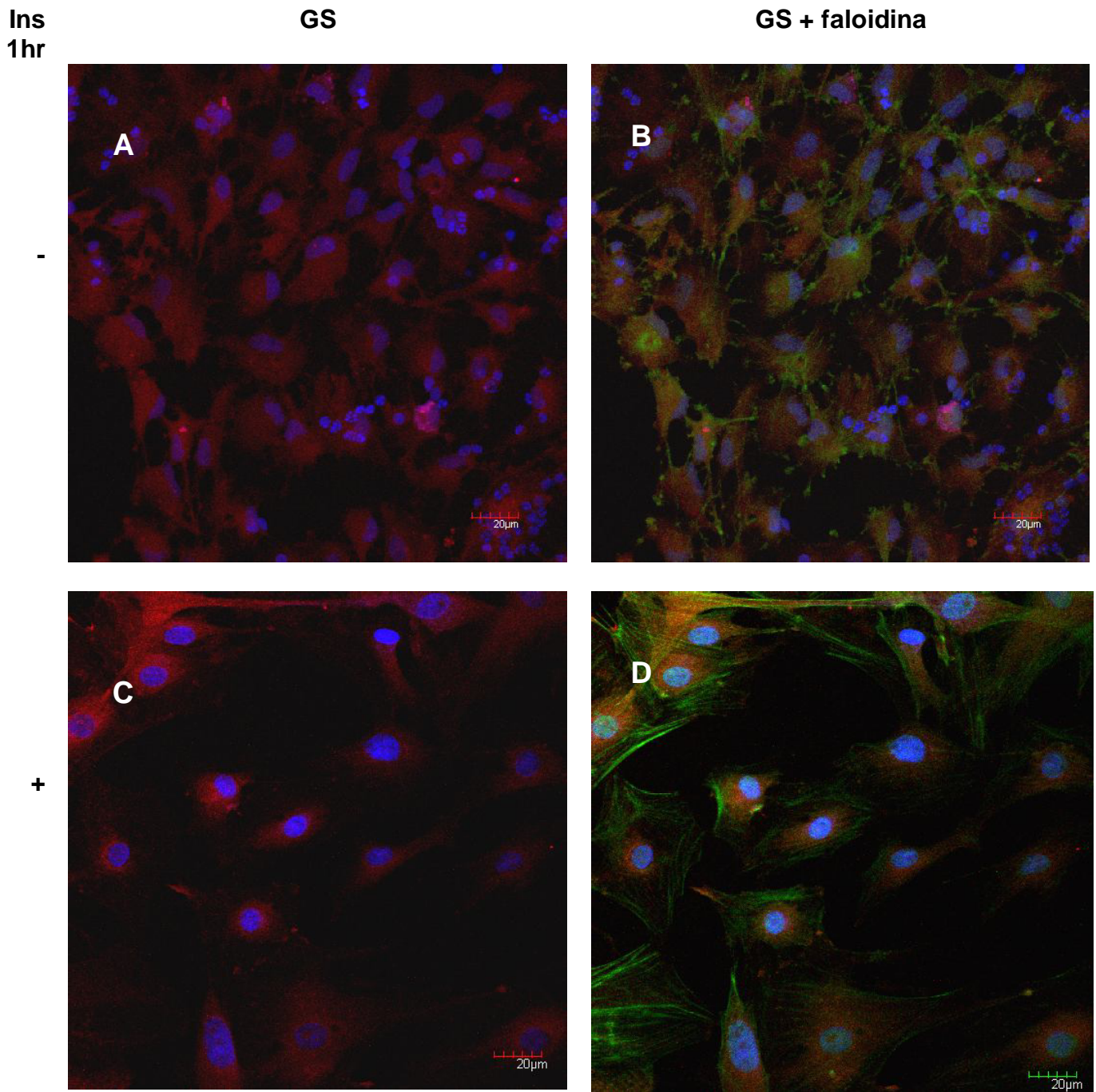


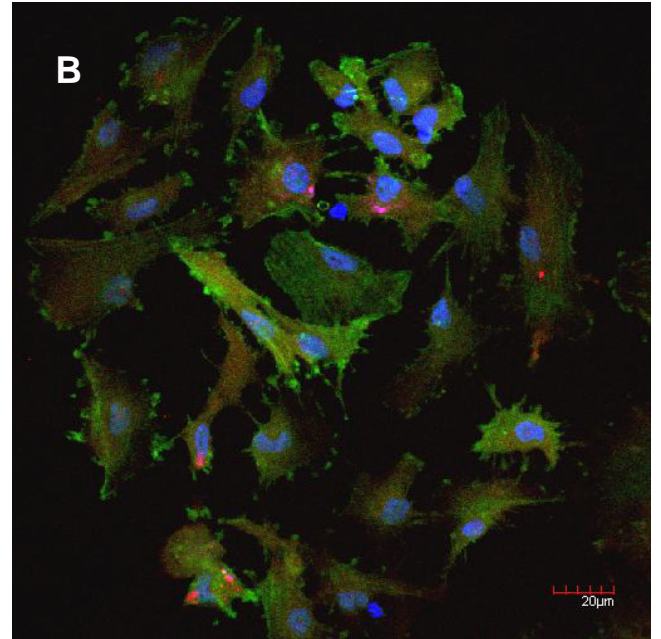
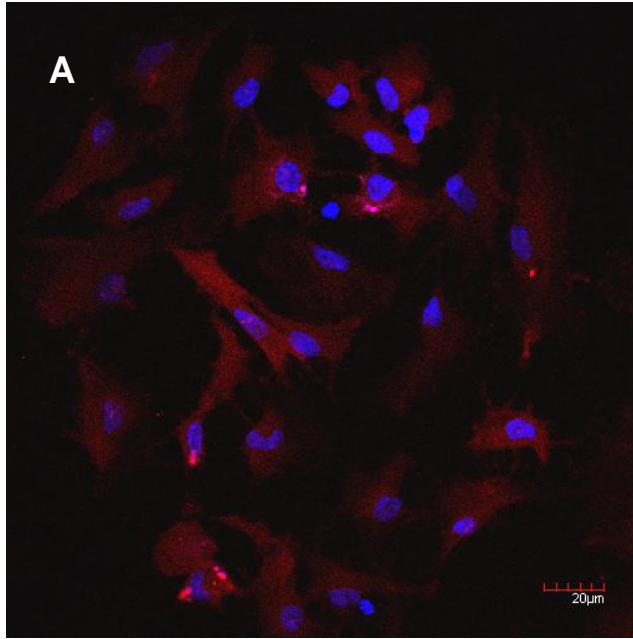
Foto 8. Cultivo de glía de Müller incubada en medio sin suero en ausencia (A, B) o presencia de 10 ng/ml de insulina (C, D) durante 1 hora. En ausencia de suero, el inmunomarcaje de GS se observa homogéneo en todo el citoplasma (A), las células están contraídas y presentan pequeñas proyecciones (B). Al agregar insulina al medio sin suero la GS se concentra alrededor del núcleo (C) y las células mantienen su tamaño y forma (D) parecida al control (foto3).

Ins
3hrs

GS

GS + faloidina

-



+

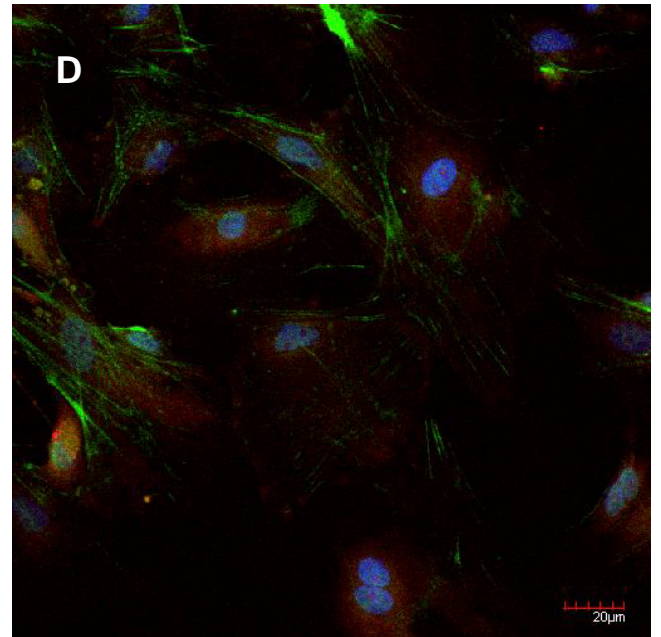
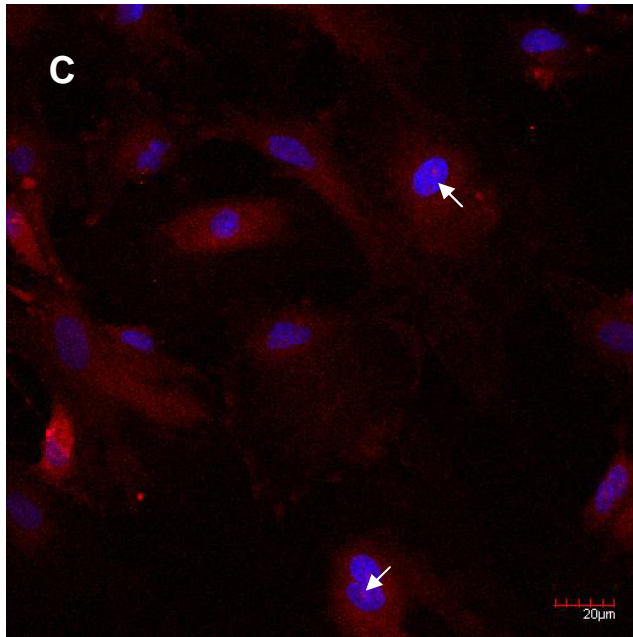


Foto 9. Incubación durante 3 horas en medio sin suero en ausencia (A,B) o presencia (C, D) de 10 ng/ml insulina.

El tratamiento con insulina provoca la formación de pequeños gránulos de GS en el núcleo de algunas células (C, flechas blancas), lo que no se observa en ausencia de insulina (A). La mayoría de las células mantienen su forma típica (D), mientras que en ausencia de insulina las células están contraídas (B).

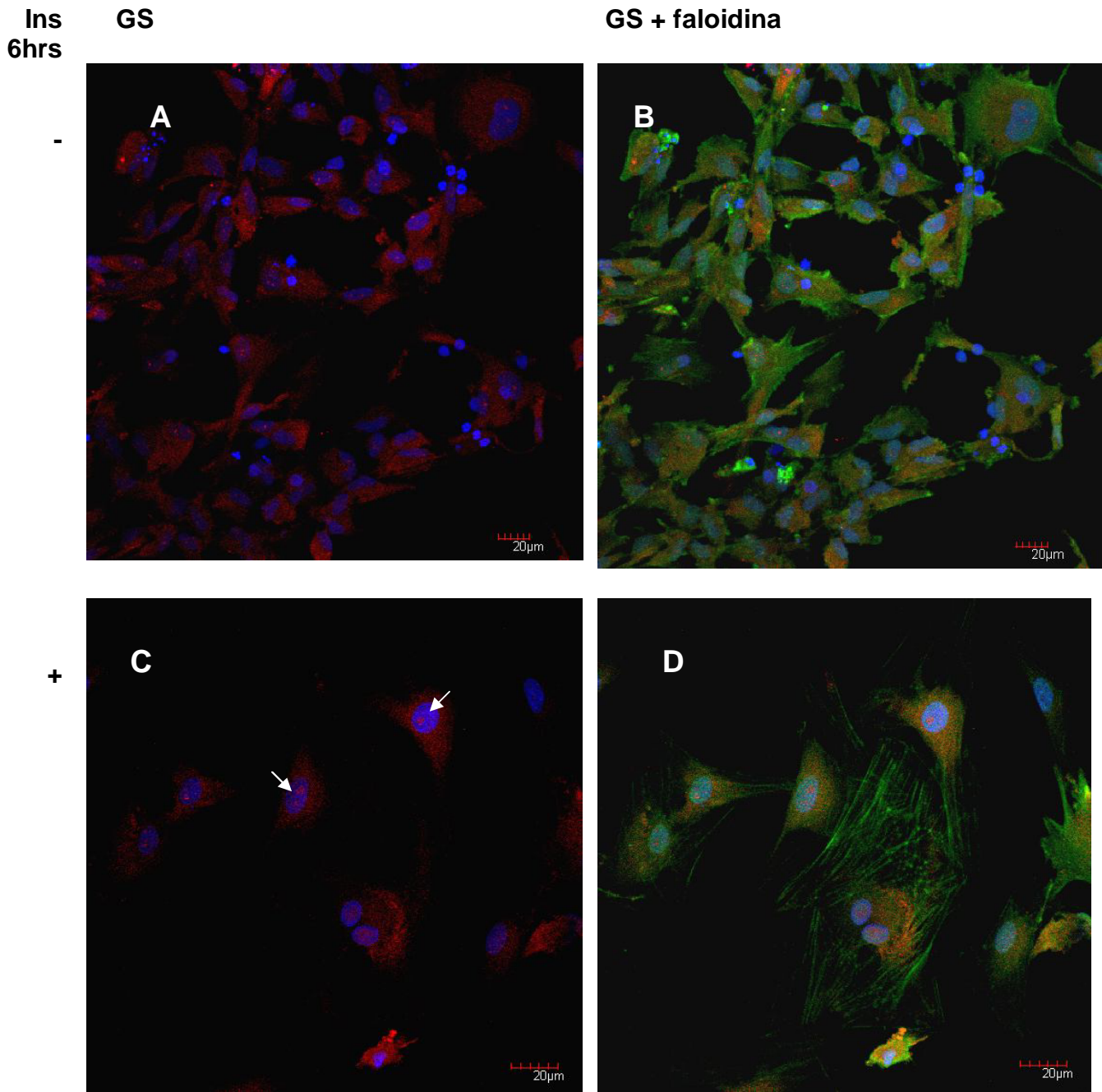


Foto 10. Incubación de 6 horas en medio sin suero en ausencia (A,B) o en presencia de 10 ng/ml de insulina (C, D).

Algunas de las células incubadas en medio sin suero presentan pequeñas acumulaciones de GS en el núcleo.

Con insulina, los gránulos intranucleares son más grandes (C, flechas blancas) y las GS citoplásmica está concentrada alrededor del núcleo.

La polimerización de los filamentos de actina disminuye en ausencia de suero (B), las células están contraídas y redondeadas. El tratamiento con insulina favorece la polimerización de los filamentos de actina y las células mantienen su forma aplanada y alargada (D).

Col
20uM

GS

GS + Faloidina

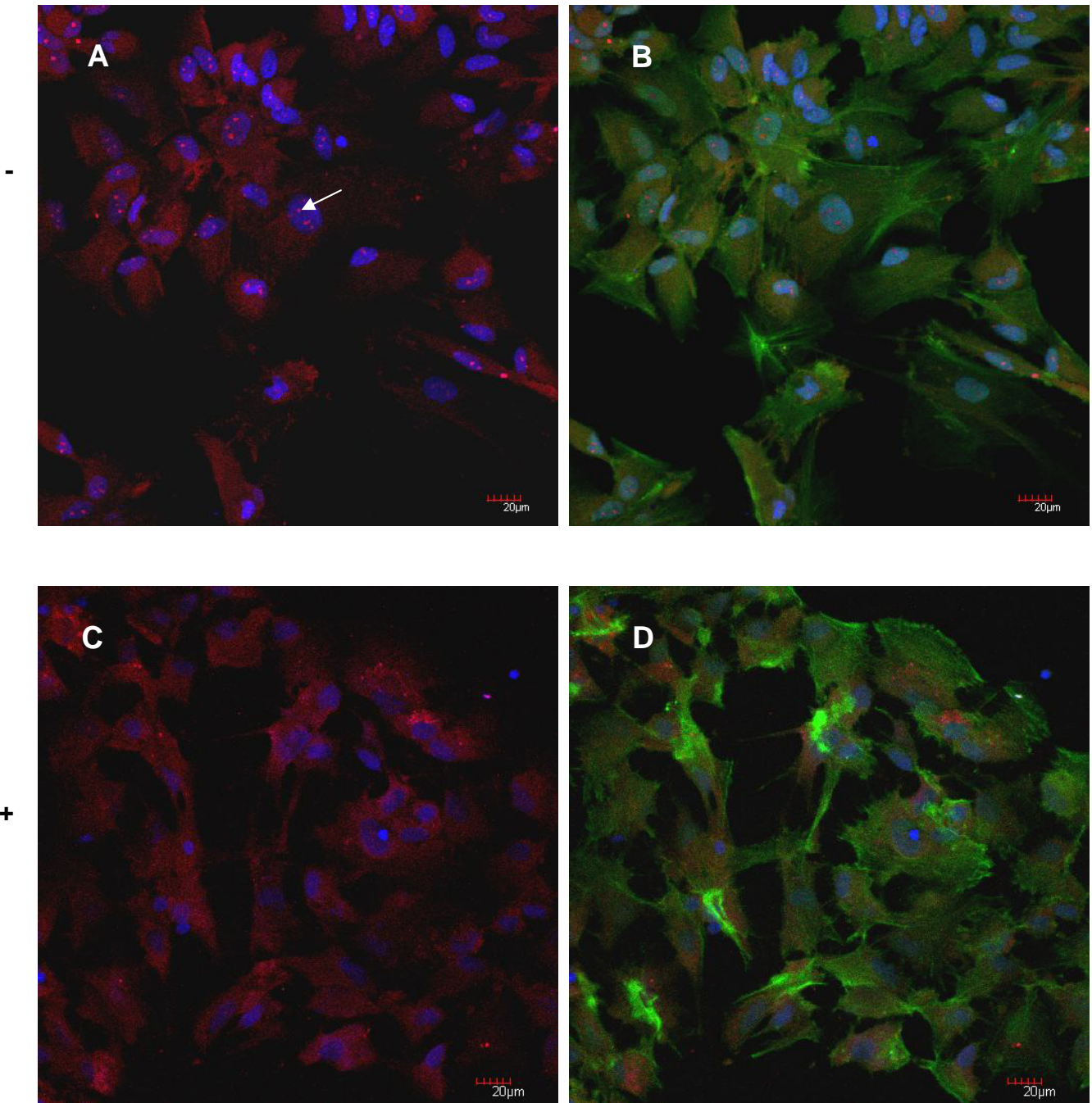
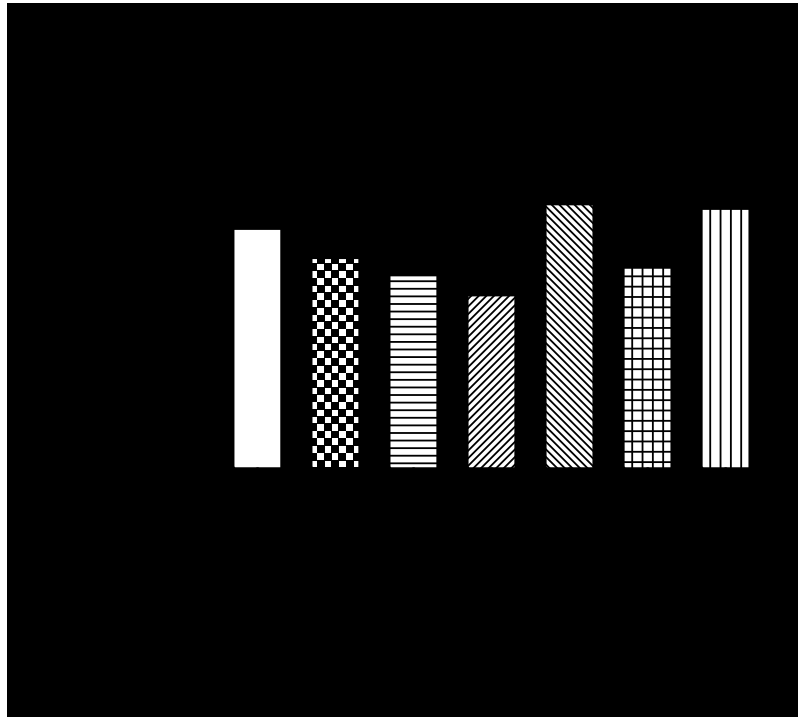


Foto 11. Inhibición de la acumulación intranuclear de la GS por la adición de 20 μM de colchicina.

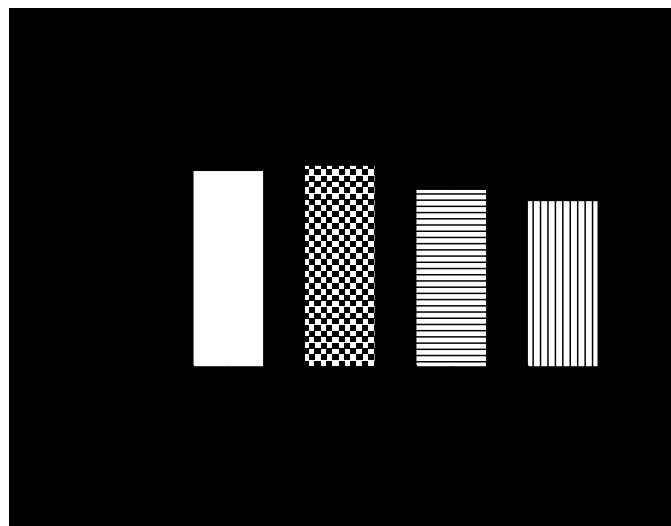
Las células se incubaron en DMEM-S10 con glucosa 30 mM en ausencia (A, B) o presencia (C, D) de 20 μM de colchicina durante 3 horas.

La incubación en presencia de glucosa provoca la acumulación de GS en el núcleo (A, flechas blancas; foto 5), lo que fue inhibido por el tratamiento con colchicina (C).

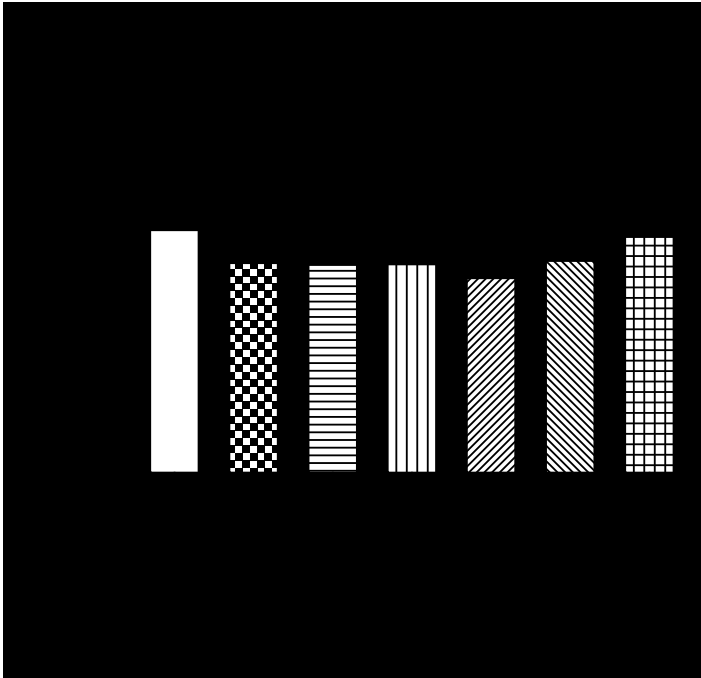
6.8. Gráficas



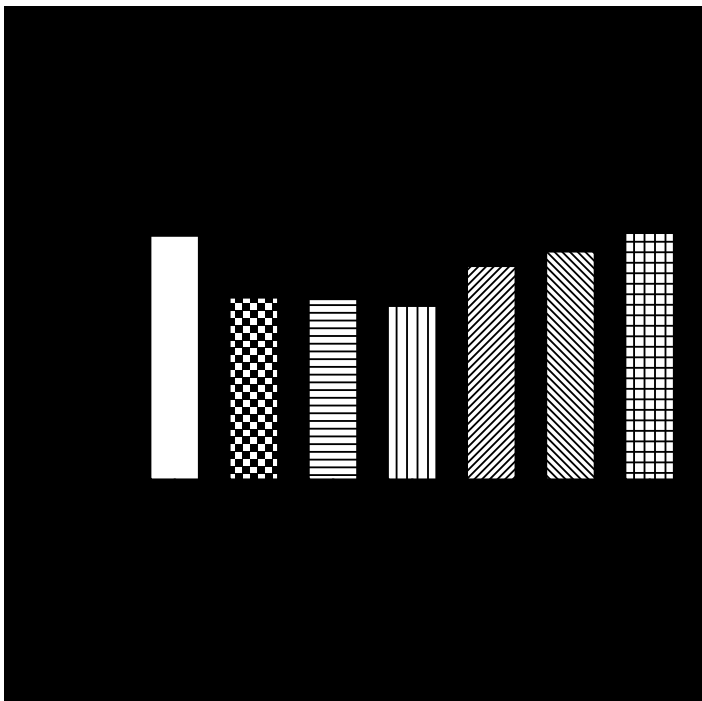
Gráfica 1. Efecto de las altas concentraciones de glucosa (30 mM) en el metabolismo mitocondrial de las células de Müller en cultivo (control = DMEM-S10, 5.5 mM de glucosa). One-way ANOVA, * $p < 0.005$, *** $p < 0.0001$ de significancia con respecto al control (Dunnett's post test).



Gráfica 2. Efecto de la colchicina en la reducción de MTT por las células de Müller en cultivo. Se determinó a las 3 horas de incubación en DMEM-S10 (control), en presencia de altas concentraciones de glucosa (G 30mM) y en presencia o ausencia de colchicina (COL 20 μ M).



Gráfica 3. Efecto de la ausencia de suero en la actividad mitocondrial de la glía de Müller en cultivo. Se incubaron las células en DMEM sin suero durante una semana (control = DMEM-S10, 5.5 mM de glucosa).



Gráfica 4. Efecto de la insulina en la actividad mitocondrial de las células de Müller en cultivo incubadas en ausencia de suero (control = DMEM-S10, 5.5 mM de glucosa).
One-way ANOVA, * $p < 0.005$, ** $p < 0.001$ de significancia con respecto al control (Dunnett's post test).

7. DISCUSIÓN

El glucógeno es la principal forma de almacenamiento de energía a partir de glucosa en las células animales. Este polisacárido se sintetiza y almacena principalmente en el hígado y músculo esquelético, aunque en menores concentraciones también se encuentra en otros tejidos, como en el sistema nervioso central. El glucógeno en la retina se almacena en las células de Müller, principales células gliales del tejido. La GS, enzima limitante para la síntesis de glucógeno, se expresa en estas células (Kuwabara y Cogan, 1961) pero los estudios reportados no proporcionan información sobre los mecanismos de regulación y su significado en condiciones patológicas.

Con la finalidad de conocer los mecanismos que regulan los niveles de glucógeno en la retina, en este trabajo, determinamos con inmunocitoquímica la localización subcelular de la GS en la glía de Müller en cultivo. Se analizó la distribución temporal de la inmunoreactividad en células incubadas en un medio con altas concentraciones de glucosa (30 mM) y en presencia de insulina en el medio (10 ng/ml), condiciones bajo las cuales se sabe que la GS se activa y cambia su distribución en otros tejidos (Ferrer *et al.*, 2003; Nielsen *et al.*, 2001; Prats *et al.*, 2005; Ros *et al.*, 2009).

El cultivo celular es un método que permite estudiar células de cierto tipo deseado bajo condiciones controladas, sin embargo al estar aisladas del tejido algunas propiedades pueden estar modificadas, tal es el caso de la morfología. *In situ*, la glía de Müller presenta una forma alargada que se extiende a todo el grosor de la retina y atraviesa todas las capas nucleares y plexiformes. En cultivo, las células de Müller adquieren una forma aplanada y extendida, y la inmunocitoquímica de la GS se observa en forma punteada en el citoplasma y se concentra alrededor del núcleo.

Al agregar altas concentraciones de glucosa en el medio, esperábamos que la enzima se concentrara en la periferia de la célula, como ocurre en hepatocitos y en células musculares. Por el contrario, en las células de Müller la GS se

distribuyó homogéneamente en todo el citoplasma y adicionalmente se agregó en forma de gránulos compactos en el núcleo.

La insulina es una hormona que favorece la síntesis de glucógeno en las células a través de la activación de la GS por desfosforilación (Lawrence y Roach, 1997; Mathews *et al.*, 2006; Heni *et al.*, 2011). En hepatocitos y músculo, la insulina favorece la localización de la GS en la periferia celular (Al-Habori *et al.*, 1991; Nielsen *et al.*, 2001). En las células de Müller incubadas con insulina, la enzima se acumuló gradualmente en el núcleo y formó gránulos cada vez más grandes de acuerdo al tiempo de incubación. Esto sugiere que las células de Müller responden a la hormona, lo que promueve la acumulación de la GS en el núcleo.

Bajo ambas condiciones (presencia de insulina y altas concentraciones de glucosa) la localización de la GS en el núcleo fue dependiente del tiempo de incubación, lo que indica que éste es un proceso dinámico en respuesta a estos estímulos. En otros tipos celulares se sabe que la insulina y la G6P activan a la GS (Mathews *et al.*, 2006; Cárdenas y Goldbeter, 1996), por lo que nuestros resultados sugieren que la GS intranuclear está desfosforilada y por lo tanto activa.

Las células de Müller respondieron a los tratamientos aplicados modificando su forma y organización de los filamentos de actina. En ausencia de suero las células se contraen, disminuyen la polimerización de actina y no recuperan su forma ni presentan GS intranuclear. La adición de insulina al medio revierte totalmente este efecto y mantiene a las células con características morfológicas similares a las controles, lo que sugiere que la insulina favorece la polimerización de los filamentos de actina. Cuando se añadió glucosa al medio, las células se encogieron en una hora pero con el paso del tiempo (de 3 a 6 horas) recuperan progresivamente su forma y tamaño, lo que coincide con la aparición de GS en el núcleo que también sucedió en presencia de insulina.

Los filamentos de actina, además de participar en la forma y movimiento de la célula, participan en procesos de señalización. Un ejemplo muy conocido es su participación en el metabolismo de la glucosa, facilitando la translocación del GLUT4 en respuesta a la presencia de insulina extracelular (Tsakiridis *et al.*, 1999). La translocación de la GS y su activación se han visto relacionadas directamente con los filamentos de actina en células hepáticas (Fernández-Novell *et al.*, 1997) y musculares (Prats *et al.*, 2009). Cabe señalar que entre los tipos celulares que se han estudiado, existen diferencias en cuanto a la regulación y distribución subcelular de esta enzima (Ferrer *et al.* 1997, Fernandez-Novell *et al.*, 1997), lo que indica que según las características funcionales y requerimientos metabólicos de cada tipo celular, las propiedades de la GS también varían.

A diferencia de lo que esperábamos, en la glía de Müller no observamos colocalización entre la GS y la actina como se ha visto en otras células, por lo que no podemos concluir que exista una interacción directa entre estas dos. De manera similar, García-Rocha y colaboradores tampoco encontraron una colocalización entre los filamentos de actina y la GS en hepatocitos en cultivo (fig. 6), pero el tratamiento con citocalasina disminuyó la acumulación de la enzima en la periferia celular, por lo que sugirieron que los filamentos de actina participan en la síntesis de glucógeno a través un mecanismo indirecto (Al-Habori *et al.*, 1991) o que la interacción entre la enzima y los microfilamentos es transitoria (García-Rocha *et al.*, 2001). Aunque en las células de Müller la GS se translocó del citoplasma al núcleo, no se observaron cambios en los microfilamentos que estuvieran directamente relacionados con el movimiento de la enzima.

Para identificar los posibles mecanismos que llevan a la translocación de la GS hacia el interior del núcleo, usamos colchicina, una toxina que impide la polimerización de los microtúbulos, elemento del citoesqueleto indispensable para el transporte intracelular de organelos y biomoléculas (Alberts *et al.*, 2010, 2002; Bhattacharyya *et al.*, 2008). El tratamiento con colchicina inhibió los efectos de las altas concentraciones de glucosa en la localización intranuclear

de la GS, lo que sugiere que los microtúbulos participan en la translocación de la GS del citoplasma al núcleo. Esto es algo novedoso ya que aunque se ha visto que el funcionamiento de los microtúbulos se requiere para la síntesis de glucógeno (Al-Habori *et al.*, 1991) pero hasta ahora no se había demostrado la participación de los microtúbulos en la distribución subcelular de la GS.

Por el contrario a lo reportado en otros tipos celulares, en las células de Müller la ausencia de suero no alteró significativamente la viabilidad celular determinada por la tinción de núcleos con DAPI y la reducción del MTT.

El tratamiento con insulina disminuyó la actividad mitocondrial (medida con MTT) a tiempos cortos (de 6 a 24 horas). Sin embargo al observar los núcleos teñidos con DAPI, no encontramos un aumento de núcleos condensados, lo que nos sugiere que la disminución de MTT reducido que obtuvimos es efecto de una disminución de la actividad metabólica mitocondrial provocada por la insulina y no de muerte celular.

Efectos positivos de la insulina sobre la viabilidad se han reportado pero en concentraciones mayores a las que nosotros usamos. Por ejemplo en pericitos y endotelio de retina, concentraciones de 1 mg/ml favorecen la proliferación celular, mientras que concentraciones fisiológicas como las que nosotros aplicamos (10 ng/ml) únicamente aumentan la incorporación de glucosa (Bonafonte y García, 2006). En este sentido no esperamos que las concentraciones que usamos de insulina elevaran significativamente la viabilidad celular.

En relación a las altas concentraciones de glucosa, otros autores han reportado que elevadas la muerte en una variedad de tipos celulares (Busik *et al.*, 2008; Cui *et al.*, 2006; Xi *et al.*, 2005; Kusner *et al.*, 2004; Du *et al.*, 2003), sin embargo las células de Müller en nuestros cultivos parecen adaptarse a las condiciones y mantenerse metabólicamente activas durante periodos relativamente largos (hasta 7 días). Esta información es relevante dado que se postula que la hiperglucemia es causa de las afectaciones producidas por la diabetes.

El MTT entra a las células por endocitosis y se reduce por la enzima deshidrogenasa succínica mitocondrial a su forma insoluble, el formazán. Este método mide directamente la actividad mitocondrial y puede ser interpretado como una medida de viabilidad celular, sin embargo algunos factores pueden afectar la reducción del MTT y por lo tanto sobreestimar o subestimar los valores de viabilidad. Debido a que los resultados obtenidos con el MTT no coinciden con la observación de núcleos con DAPI, es muy probable que la glucosa en concentraciones altas y la insulina disminuyan la actividad mitocondrial. De hecho las células de Müller se caracterizan por tener un metabolismo oxidativo muy bajo (Winkler et al., 2000) y es probable que al aumentar las concentraciones de glucosa intracelulares, la vía de la glucólisis se vea favorecida.

El aumento en la reducción del MTT que observamos a los 3, 5 y 7 días en ambas condiciones podría deberse a un efecto de proliferación celular o a que las células generan resistencia a estos estímulos y recuperan su actividad metabólica basal.

Nuestros resultados demuestran que las células de Müller tienen mecanismos de regulación de la GS diferentes observados a los hepatocitos y células musculares. El glucógeno en las células de Müller es empleado por la misma glía, pero también es degradado para proveer de sustratos a las neuronas (Poitry-Yamate *et al.*, 1995; Tsacopoulos y Magistretti, 1996). Se ha visto que la glía de Müller de animales sanos sintetiza glucógeno en el núcleo, lo que no sucede en otros tipos de células bajo condiciones no patológicas. Aunque no se conocen las funciones del glucógeno en el núcleo, éste proceso podría ser una adaptación al elevado metabolismo de glucosa que tienen estas células (Amemiya *et al.*, 1970).

Recientemente se ha propuesto que la GS podría funcionar como un sensor de las reservas energéticas de la célula y diversos autores sugieren que la enzima se transloca del citoplasma al núcleo donde puede participar en otras funciones

como es la regulación de la expresión génica (Ferrer *et al.* 1997; Cid *et al.*, 2005; Ragano-Caracciolo *et al.*, 1998). En el caso de las células de Müller, las reservas de glucógeno son menores a las de otros tipos celulares por lo que es probable que en presencia de sustancias que estimulan la síntesis de glucógeno (condiciones de altas concentraciones de glucosa e insulina), la célula regule concentraciones de glucógeno mediante la translocación de la enzima del citoplasma al núcleo. Adicionalmente, la GS en el núcleo podría regular su misma transcripción o la de otras enzimas relacionadas con el metabolismo energético.

De manera interesante, la presencia de GS en el núcleo en nuestras células de Müller coincide con los momentos de descenso de MTT reducido (actividad mitocondrial), por lo que es probable que la translocación de la enzima del citoplasma al núcleo esté relacionada con los cambios metabólicos que observamos y podría ser una respuesta adaptativa a las condiciones que fueron expuestas para mantener la actividad celular o incluso favorecer la proliferación celular.

Si bien la GS no parece interactuar directamente con los filamentos de actina, su localización en el núcleo depende del funcionamiento de los microtúbulos. La translocación de la GS al núcleo podría ser una estrategia metabólica de la célula en respuesta a una variedad de estímulos. Posiblemente la GS lleva a cabo funciones diferentes a las ampliamente conocidas (Ferrer *et al.* 1997; Cid *et al.*, 2005; Fuchs *et al.*, 2011; Pescador *et al.*, 2010). Existe una variedad de ejemplos de enzimas que llevan a cabo funciones adicionales a las canónicas y que modifican su distribución subcelular en relación con el estado metabólico de la célula (Forde y Dale, 2007; Sirover, 2011). Resulta evidente que se requieren más estudios para conocer el significado de la GS en el núcleo y su implicación en estados patológicos.

8. CONCLUSIONES

1. La morfología de las células de Müller en cultivo y la distribución de los filamentos de actina dependen de factores tróficos.
2. La insulina favorece la polimerización de los filamentos de actina.
3. Las células de Müller en cultivo parecen tener una respuesta adaptativa ante las distintas condiciones a las que fueron sometidas.
4. Las células de Müller responden a las altas concentraciones de glucosa y a la insulina favoreciendo la translocación de la GS al núcleo.
5. A diferencia de otras células, en la glía de Müller los microtúbulos no participan directamente en el movimiento subcelular de la GS.
6. El tratamiento con colchicina demostró que los microtúbulos participan en la translocación de la GS del citoplasma al núcleo.
7. La distribución de la GS parece depender del estado metabólico de la célula.
8. La GS puede tener una función reguladora, no descrita hasta el momento.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Essential Cell Biology*. Tercera edición. Garland Science, Taylor & Francis Group, NY, USA; 2010, 731pp.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the Cell*. Cuarta edición. Garland Science. New York. USA. 2002.
- Al-Habori M, Peak M, Agius L. (1991) Cythochalasin potently inhibit glycogen synthesis in hepatocytes cultures by an indirect mechanism. *Biochem. Soc trans.* 19(4): 1125-1127.
- Alonso MD, Lomako J, Lomako WM, Whelan WJ. (1995) A new look al the biogenesis of glycogen. *J FASEB.* 9: 1126-1137.
- Amemiya T. (1970) Intranuclear polysaccharide synthesis in Müller's cells of the normal rat retina – an electro microscopic study. *Acta Histochem. Cytochem.* 3(2): 41-51.
- 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: 2401–2411.
- Berman ER. *Biochemistry of the Eye*. Plenum Press. NY, USA. 1991. 476pp.
- Bhattacharyya B, Panda D, Gupta S, Banerjee M. (2008) Anti-mitotic activity of colchicine and the structural basis for its interaction with tubulina. *Med Res Rev.* 28(1):155-183
- Bollen M, Keppens S, Stalmans W. (1998) Specific features of glycogen metabolism in the liver. *Biochem J.* 336: 19-31.
- Bonafonte S y García CA. *Retinopatía diabética*. 2ª ed. Elsevier. España. 2006. 260pp.
- Bringmann A, Pannicke T, Grosche J, Francke M, Wiedemann P, Skatchkov SN, Osborne N, Reichenbach A. (2006) Müller cells in the healthy and diseased retina. *Retinal and eye research.* 25: 397-424.

- Bringmann A. and Reichenbach. 2001. Role of Müller cells in retinal degenerations. *Frontiers in Bioscience*. 6(e): 77-92.
- Brown AM, Ranson BR (2007). Astrocyte glycogen and brain energy metabolism. *Glia*. 55:1263-1271
- Busik JV, Mohr S, Grant MB. (2008) Hyperglycemia-induced reactive oxygen species toxicity to endothelial cells is dependent on paracrine mediators. *Diabetes*. 57: 1952-1965.
- Caramia F, Ghergo FG, Branciarri C. Menghini G. (1968) New aspect of hepatic nuclear glycogenesis in diabetes. *J Clin Path*. 21: 19-23
- Cárdenas ML y Goldbeter A. (1996) The glucose-induced switch between glycogen phosphorylase and glycogen synthase in the liver: outlines of a theoretical approach. *J theor Biol*. 182: 421-426
- Cid E, Cifuentes D, Baqué S, Ferrer JC, Guinovart JJ. (2005) Determinants of the nucleocytoplasmic shuttling of muscle glycogen synthase. *FEBS J*. 272: 3197-3213
- Coffe V, Carbajal RC, Salceda R (2004) Glycogen metabolism in the rat retina. *J Neurochem* 88:885–890
- Cohen TW. (2002) Protein phosphatase 1 – targeted in many directions. *J Cell Sci*. 115, 241:256
- Cooper John A. (1987) Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. Mini-Review. *J Cell Biol*. 105:1473-1478.
- Cui Y, Xu X, Bi H, Zhu Q, Wu J, Xia X, Ren Q, Ho P, (2006) Expression modification of uncoupling proteins and MnSOD in retinal endothelial cells and pericytes induced high glucose: the role of reactive oxygen species in diabetic retinopathy. *Exp Eye Res*. 83: 807-816.
- Dringen R, Gedhardt R, Hamprecht B. (1993) Glycogen in astrocytes: possible function as lactate supply for neighboring cells. *Brain Res*. 623: 208-214
- Dringen R y Hamprecht. (1992) Glucose, insulin and insulin-like growth factor I regulate the glycogen content of astroglial-rich primary cultures. *Int Soc Neurochem*. 58: 511-517.

- De Almeida Souza A, Seixas GS, Velez BS, Menezes AB, Montero M. (2010) Glycogen synthesis in brain and astrocytes is inhibited by chronic lithium treatment. *Neurosci Lett.* 482; 128:132
- Du Y, Miller CM, Kern TS. (2003) Hyperglycemia increases mitochondrial superoxide in retina and retinal cells. *Free rad Biol Med.* 35 (11): 1491-1499.
- Fernández-Novell JM, Ariño J, Vilaró S, Guinovart JJ. (1992) Glucose induces he translocation and the aggregation of glycogen synthase in rat hepatocytes. *Biochem J.* 281:443-448
- Fernández-Novell JM, Bellido D, Guinovart JJ. (1997) Glucose induces the translocation of glycogen synthase to the cell cortex in rat hepatocytes. *Biochem. J.* 321:227-231
- Ferrans V, Maron BJ, Buja M, Ali N, Roberts W. (1975) Intranuclear glucogen deposits in human cardiac muscle cells: ultrastructure and cytochemistry. *J Mol Cell Cardiol.* 7: 373-386.
- Ferrer JC, Baqué S, Guinovart JJ. (1997) Muscle glycogen synthase translocate from de cell nucleus to the cytosol in response to glucose. *FEBS lett.* 415: 249-252.
- Ferrer JC, Favre C, Gomis RR, Fernández-Novell JM, Gracia-Rocha M, de la Iglesia N, Cid E, Guinovart JJ. (2003) Control of glycogen deposition. *FEBS Lett.* 546: 127-132
- Forde JE, Dale TC. (2007) Glycogen sythse kinase 3: a key regulador of cellular fate. *Cell Mol Life Sci.* 64(15): 1930-44.
- Fuchs G, Diges C, Kohlstaedt LA, Wehner KA, Sarnow P. (2011) Proteomic anlysis of ribosomes: translational control of mRNA populations by glycogen synthse GYS1. *J mol Biol.* 410: 118-130
- Gosbell AD, Franzco IF, Joblnski P. (2002) The location of insulin receptors in bovine retina and isolated retinal cells. *Clin Exp Ophtal.* 30: 124-130.
- García-Rocha M, Roca A, De la Iglesia N, Baba O, Fernández-Novell JM, Ferrer J, Guinovart JJ. (2001) Intracellular distribution of glycogen synthase and glycogen in primary cultured rat hepatocytes. *Biochem J.* 357:17-24

- Granzow C, Kopun M, Zimmermann HP. (1981) Role of nuclear glycogen synthase and cytoplasmic UDP-glucose phosphorylase in the biosynthesis of nuclear glycogen. *J Cell Biol.* 89: 475-484.
- Hamai M, Minokoshi Y, Shimazu T. (1999) L-glutamate and insulin enhance glycogen synthesis in cultured astrocytes from the rat brain through different intracellular mechanisms. *J Neurochem.* 73: 400-407.
- Heni M, Hennige AM, Peter A, Siegel-Axel D, Ordelheide A, Krebs N, Machicao F, Fritsche A, Häring H, Staiger H. (2011) Insulin promotes glycogen storage and cell proliferation in primary human astrocytes. *PLoS ONE.* 6(6):e21594, 1-7.
- Hicks D y Courtois Y. (1990) The growth and behaviour of retinal Müller cells in vitro 1. An improved method for isolation and culture. *Exp Eye Res.* 51:119-129
- Kopun M, Spring H, Granzow C. (1982) Nuclear glycogen synthase- Fact or artifact. *FEBS Lett.* 147(2): 207-210.
- Kusner LL, Sarthy VP, Mohr S. (2004) Nuclear translocation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: a role in high glucose—induced apoptosis in retinal Müller cell. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 45: 1553-1561
- Kuwabara T and Cogan D. (1961) Retinal glycogen. *Trans Am Ophthalmol Soc.* 59:106-110
- Lansel N, Rungger-Brändle E, Hitz-Kueng N, Niemeyer G. (2000) Effects of insulin on retinal glycogen content. *Klin Monbl Augenheilkd.* 216(5):316-7. (German)
- Lawrence JC y Roach PJ. (1997) New insights into the role and mechanisms of glycogen synthase activation by insulin. *Diabetes.* 46(4): 541-548
- Mantych GJ, Hageman GS, Devaskar SU. (1993) Characterization of glucose transporter isoforms in the adult and developing human eye. *Endocrin.* 133(2): 600-607.
- Mathews CK, van Holde KE, Ahern KG. *Bioquímica.* Pearson Addison Wesley. Madrid, España. 2006. 4a ed. 1335pp.

- Mosmann T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Meth.* 65: 55-63.
- Murray RK, Bender DA, Botham KM, Kennelly PJ, Rodwell VW, Wil AP. *Harper's Illustrated Biochemistry*, McGraw-Hill Companies, 2009, 28a ed. Versión electrónica.
- Mutalik VK y Venkatesh KV. (2005) Quantification of the glycogen cascade system: the ultrasensitive responses of liver glycogen synthase and muscle phosphorylase are due to distinctive regulatory designs. *Theor Biol Med Model.* 2:1-19
- Nelson DL y Cox MM. *Lehninger principios de bioquímica*. Ediciones Omega. Barcelona, España. 2006. 4a ed. 1119pp.
- Newman E. y Reichenbach A. (1996) The Müller cell: a functional element of the retina. *Glia. Trends Neuroscience.* 19: 307-312
- Nielsen JN, Derave W, Kristiansen S, Ralson E, Ploug T, Richter EA. (2001) Glycogen Synthase localization and activity in rat skeletal muscle is strongly dependent on glycogen content. *J Phys.* 531(3): 757-769
- Niemeyer G. (2001) Retinal research using the perfused mammalian eye. *Prog Retin Eye Res.* 20 (3): 289-318.
- Ohanian, C. (1972) Histochemical studies on phosphorylase activity in the tissues of the albino rat under normal and experimental conditions. *Acta Histochem.* 44: 244-263
- Pescador N, Villar D, Cifuentes D, Garcia-Rocha M, Ortiz-Barahona A, Vazquez S, Ordoñez A, Cuevas Y, Saez-Morales D, García-Bermejo ML, Landazuri MO, Guinovart J, del Peso L. (2010) Hypoxia promotes glycogen accumulation through hypoxia inducible factor (HIF)-mediated induction of glycogen synthase 1. *PLoS ONE.* 5(3): e9644. doi:10.1371/journal.pone.0009644
- Pfeiffer B, Francke M, Reichenbach, Fleckenstein B, Jung G, Hamprecht B. (2004) Glycogen phosphorylase isosyme pattern in mammalian retinal Müller cells and in astrocytes of retina and optic nerve. *Glia* 49:84-95

- 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
- Poitry-Yamate CL, Tsacopoulos M. (1992) Glucose metabolism in freshly isolated Müller glial cells from mammalian retina. *J Comp Neurol*. 8;320 (2): 257-266.
- Poitry-Yamate CL, Poitry S, Tsacopoulos M. (1995) Lactate released by Müller glial cells is metabolized by photoreceptors from mammalian retina. *J Neurosci*. 15(7): 5179-5191
- Prats C, Cadefau JA, Cussó R, Qvortrup K, Nielsen JN, Wojtaszewski JFP, Hardie DG, Stewart G, Hansen BF, Ploug T. (2005) Phosphorylation-dependent translocation of glycogen synthase to a novel structure during glycogen resynthesis. *J Biol Chem*. 280 (24): 23165-23172.
- Prats C, Helge JW, Nordby P, Qvortrup, Ploug T, Flemming Dela, Wojtaszewski JFP. (2009) Dual regulation of muscle glycogen synthase during exercise by activation and compartmentalization. *J Biol Chem*. 284 (23): 15692-15700.
- Puro DG. (2002) Diabetes-induced dysfunction of retinal Müller cells. *Trans Am Ophthalmol*. 100: 339-352
- Ragano-Caracciolo M, Berlin WK, Miller Mw, Hanover JA. (1998) Nuclear Glycogen and glycogen Synthase Kinase 3, *Biomed Biophys Res Comm*, 249: 422-427.
- Reiter CEN y Gardner TW. (2003) Functions of insulin and insulin receptor signaling in the retina: possible implications for diabetic retinopathy. *Prog Ret Eye Res*. 22: 545-562.
- Reichenbach A, Stolzenburg JU, Eberhardt E, Chao TI, Dettmer D, Hertz L. (1993) What do retinal Müller (glial) cells do for their neuronal 'small siblings'?. *J chem. Neuroanat*. 6:201-213.
- Ros S, Garcí-Rocha M, Domínguez J, Ferrer JC, Guinovart JJ. (2009) Control of liver glycogen synthase activity and intracellular distribution by phosphorylation. *J Biol Chem*. 284(10): 6370-6378

- Saltiel AR. (1996) Diverse signaling pathways in the cellular actions of insulin. *Am physiologist*. 270: 375-385.
- Sánchez-Chávez G, Hernández J, Luna LB, Coffe V, Salceda R (2008) Effect of diabetes on glycogen metabolism in rat retina. *Neurochem Res*. 33:1301-1308
- Sarthy V y Ripps H. *The Retinal Müller Cell*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers; 2001.
- Sirover MA. (2011) On the functional diversity of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: biochemical mechanisms and regulatory control. *Biochim Biophys A*. 1810:741-751.
- Skurat AV, Dietrick AD, Roach PJ. (2000) Glycogen synthase sensitivity to insulin and glucose-6-phosphate is mediated by both NH₂- and COOH-terminal phosphorylation sites. *Diabetes*. 49_1096-1100.
- Srivastava AK y Pandey SL. (1998) Potential mecanismo(s) involved in the regulation of glycogen síntesis by insulin. *Mol cell Biochem*. 182:135-141.
- Strauss O. (2005). The retinal Pigment Epithelium in visual function. *Physiological reviews*. 85: 845-881
- Tobe K, Asai S, Matuoka K, Yamamoto T, Chida K, Kaburagi Y, Akanuma Y, Kuroki T, Takenawa T, Kimura S, Nagai R, Kadawaki T. (2003) Cytoskeletal reorganization induced by insulin: involvement of Grb2/Ash, Ras and phosphatidylinositol 3-kinase signaling. *Genes to Cells*. 8: 29-40.
- Tsacopoulos M, Magistretti PJ. (1996) Metabolic coupling between glia and neurons. *J Neurosci*. 16(3): 877-885.
- Tsakiridis T, Tong T, Matthews B, Tsiani E, Bilan PJ, Klip A, Downey GP. (1999) Role of the actin cytoskeleton in insulin action. *Micros Res Tech*. 47:79-92
- Uga S y Smelser GJ. (1973) Comparative study of the fine structure of retinal Müller cells in various vertebrates. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 12 (6): 434-448.
- Urtúbia Vicario César, (1999) *Neurobiología de la vision*. 2a ed. Ediciones UPC, Barcelona, España, 288pp.
- Voet D, Voet JG. *Biochemistry*. John Wiley & Sons, Inc. NY, USA. 1995. 2a. ed. 1361pp.

- Watanabe, T., Mio, Y., Hoshino, F. B., Naamastu, S., Hirosawa, K., and Nakahara, K. (1994) GLUT2 expression in the rat retina: Localization at the apical ends of Müller cells. *Brain Res.* 655:128-134
- Webvision. Simple anatomy of the eye - <http://webvision.med.utah.edu/sretina.html>
- Winkler BS (1981) Glycolytic and oxidative metabolism in relation to retinal function. *J Gen Physiol* 77:667–692
- Winkler BS, Arnold MJ, Brassel MA, Puro DG. (2000) Energy metabolism in human retinal Müller Cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 41: 3183-3190
- Winkler BS, Starnes CA, Sauer MW, Firouzgan NZ, Chen SC. (2004) Cultured retinal neuronal cells and Müller cells both show net production of lactate. *Neurochem Int.* 45:311.320.
- Xi X, Gao L, Hatala DA, Smith DG, Codispoti MC, Gong B, Kern TS, Zhang JZ. (2005) Chronically elevated glucose induced apoptosis is mediated by inactivation of Akt in cultured Müller cells. *BBRC.* 326:548-553
- Yeaman SJ, Armstrong JL, Bonavaud SM, Poinasamy D, Pickersgill L, Halse R. (2001) Regulation of glycogen synthesis in human muscle cells. *Biochem Soc Trans.* 29(4); 537-541.