

1989-B

REG. No. 082548041

Universidad de Guadalajara

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



Biblioteca de la Facultad
de Ciencias.

"GLUCOSA-6-FOSFATO DESHIDROGENASA Y CATARATAS
POR AZUCAR. ESTUDIOS IN VITRO".

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
LICENCIADA EN BIOLOGIA

P R E S E N T A

MARTHA ADELA VARGAS JIMENEZ

GUADALAJARA, JALISCO.

1991



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
FACULTAD DE CIENCIAS

Sección
Expediente
Número ..0811/90.....

SRITA. MARTHA ADELA VARGAS JIMENEZ
P R E S E N T E . . -

Manifiesto a usted que con esta fecha ha sido aprobado el tema de Tesis "GLUCOSA -6- FOSFATO DESHIDROGENASA Y CATARATAS POR AZUCAR. ESTU DIO In Vitro" para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos a usted que ha sido aceptado como Director de dicha tesis el M. en C. Gerardo Vaca Pacheco.



A T E N T A M E N T E
"PIENSA Y TRABAJA"
Guadalajara Jal. / 2 de Junio de 1990

EL DIRECTOR

FACULTAD DE CIENCIAS ING. ADOLFO ESPINOZA DE LOS MONTEROS CARDENAS

EL SECRETARIO

M.V.Z. MIGUEL CARBAJAL SORJA



Biblioteca de la Facultad
de Ciencias.

c.c.p. El M. en C. Gerardo Vaca Pacheco
c.c.p. El expediente del archivo

cgir.

Al contestar este oficio cítese fecha y número



INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

Mayo 27 de 1991.

M. en C. Carlos Beas Zárate
Director de la Facultad de
Ciencias Biológicas de la
Universidad de Guadalajara.
P r e s e n t e.

Estimado M. en C. Beas Zárate:

Como Tutor de la alumna MARTHA ADELA VARGAS JIMENEZ y Director de su Tesis "GLUCOSA-6-FOSFATO DESHIDROGENASA Y CATARATAS POR AZUCAR. ESTUDIOS In vitro, que dicha alumna desarrolló con el propósito de obtener su título de Licenciada en Biología, le comunico que después de haber leído el manuscrito que ella elaboró, no tengo inconveniente en que se proceda con la impresión de la tesis.

Atentamente,

M. EN C. GERARDO VACA PACHECO
Investigador Nacional.
División de Genética
Unidad de Investigación
Biomédica de Occidente
Apartado Postal 1-3838
Guadalajara, Jal.



Biblioteca de la Facultad
de Ciencias

DEDICO ESTA TESIS:

A MIS PADRES:

ANTONIO Y REBECA

Con todo mi respeto y cariño, gracias por todo el amor y apoyo desinteresado que siempre demuestran a sus hijos.

A MIS HERMANOS:

MARCOS

BECKY

LUIS

LOS QUIERO MUCHO.

A G R A D E C I M I E N T O S :

Agradezco sinceramente a las siguientes personas su apoyo y colaboración para que esta tesis se realizara:

M. en C. GERARDO VACA PACHECO

M. en G.H. MARIA GUADALUPE RAMIREZ

M. en G.H. CLAUDINA MEDINA

Dr. JOSE MARIA CANTU

Y además a las siguientes personas:

Ma. Eugenia de la Mora, Alejandro Martínez, Alma Villalobos, Caridad Leal, Adriana Alvarez, Ma. Dolores Medina, Bety Ibarra, Antonio Hernández Cordova, Dr. Fernando Rivas, Dr. Sánchez Corona y demás personas que laboran en la División de Genética de la UIBO.

T E S I S

GLUCOSA - 6 - FOSFATO DESHIDROGENASA
Y CATARATAS POR AZUCAR.
ESTUDIOS IN VITRO.

P R E S E N T A D A P O R

M A R T H A A D E L A V A N G A S J I M E N E Z

D I R I G I D A P O R

M. en C. G E R A R D O V A C A P A C H E C O

R E A L I Z A D A E N

El laboratorio de Bioquímica Genética I de la División de
Genética de la Unidad de Investigaciones Biomédicas del
Centro Médico de Occidente IMSS.

I N T R O D U C C I O N

1. - Metabolismo de la glucosa en eritrocito.

El eritrocito humano maduro es una célula carente de núcleo, retículo endoplásmico y mitocondrias; por lo tanto es incapaz de sintetizar ácidos nucleicos y proteínas o de generar energía por la vía del ciclo de Krebs. Transportar oxígeno de los pulmones a los tejidos y dióxido de carbono en la dirección inversa, es la principal función del eritrocito; ésta es realizada por la hemoglobina, la que debe mantenerse en estado reducido y en un medio ambiente que contenga concentraciones adecuadas de varios compuestos orgánicos y de ciertos iones inorgánicos. El metabolismo del eritrocito se acopla a esta función, cuya principal fuente de energía es la glucosa plasmática. El transporte de glucosa del plasma al interior del eritrocito, es mediado por un acarreador localizado en la membrana; dicho transporte es insulina independiente (1-3).

El eritrocito maduro metaboliza la glucosa a través de dos vías (Fig 1):

La primera es la vía de Embden-Meyerhof, que proporciona aproximadamente 95% de los requerimientos energéticos de la célula; la glucosa es convertida a piruvato o lactato, proceso que resulta en la fosforilación de ADP a ATP y en la reducción de NAD^+ a NADH. El ATP proporciona la energía para múltiples reacciones metabólicas en tanto que el NADH se requiere para la conversión enzimática de la metahemoglobina (Fe^{+++}) a hemoglobina

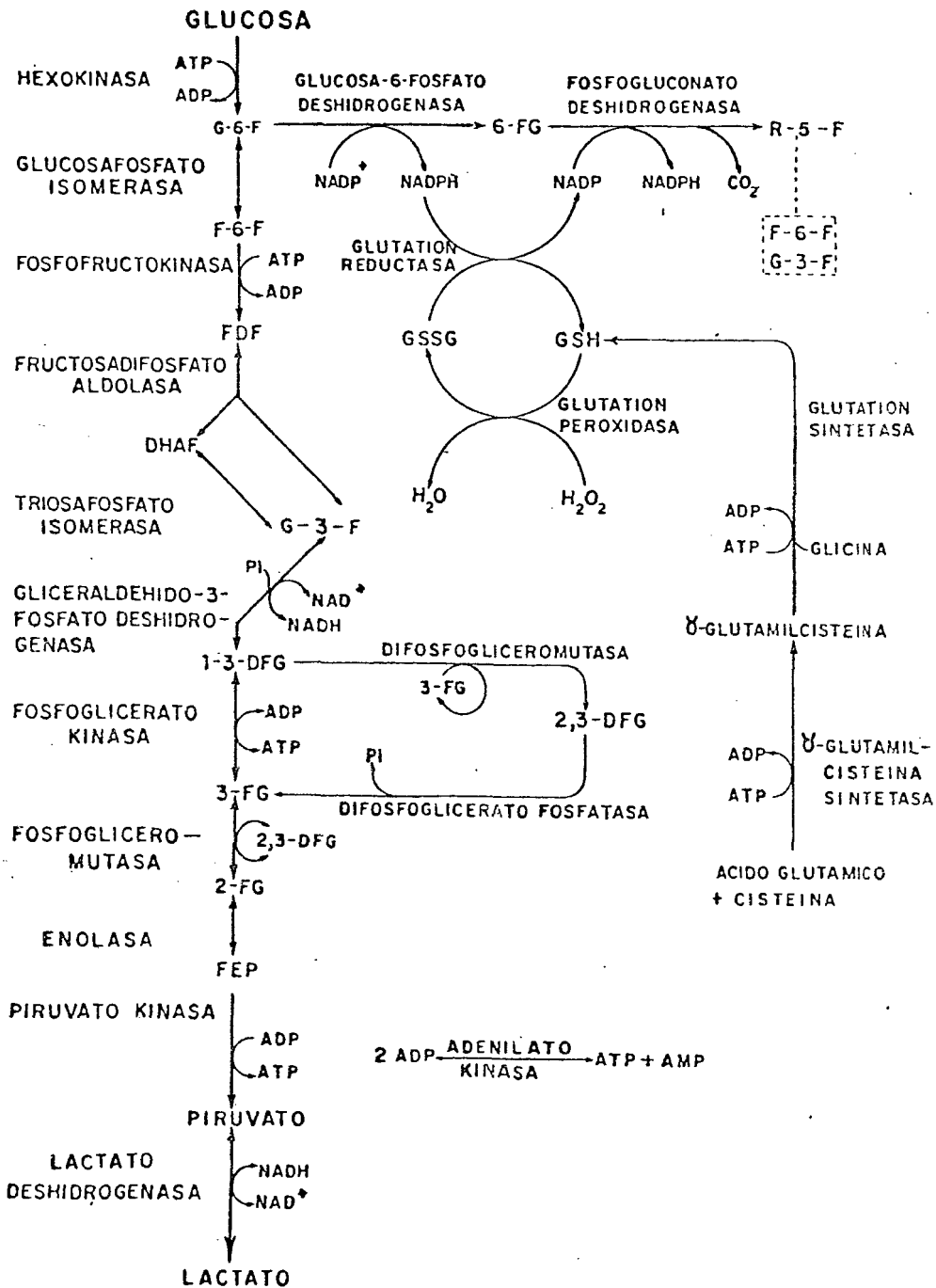


Fig. 1. Vía glucolítica y algunas vías metabólicas auxiliares del eritrocito humano maduro.

(Fe⁺⁺). Si el NADH es reoxidado en la reducción de metahemoglobina a hemoglobina, el producto final del metabolismo de la glucosa es el piruvato. Si el NADH no se reoxida por la metahemoglobina, el piruvato es reducido a lactato en la reacción catalizada por la deshidrogenasa láctica. El lactato o el piruvato formados difunden fuera del eritrocito y son metabolizados en otro sitio. La producción de 2,3-difosfoglicerato (2,3-DFG) es otra función importante de esta vía metabólica. Este compuesto es un regulador de la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno; al combinarse con la desoxihemoglobina, reduce la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno. El 2,3-DFG se forma a partir del 1,3-difosfoglicerato que es un intermediario de la glucólisis. El 2,3-DFG puede reingresar a la vía glucolítica en forma de 3-fosfoglicerato. La formación y defosforilación de 2,3-DFG es catalizada por la misma enzima (difosfogliceromutasa) y se conoce como la derivación de Rapoport-Luebering. Los iones hidrógeno inhiben la reacción de formación de 2,3-DFG y estimulan la reacción de defosforilación. Un aumento en el pH causa una elevación en los niveles de 2,3-DFG en tanto que la acidosis conduce a una depleción de 2,3-DFG. La regulación del metabolismo de la glucosa en este punto de ramificación determina la tasa de fosforilación de ADP a ATP así como la concentración de 2,3-DFG. Así, el metabolismo de la glucosa en el eritrocito hasta piruvato o lactato puede generar de 0 a 2 moléculas de ATP por molécula de glucosa, según la cantidad de esta hexosa que pase por la derivación de Rapoport-Luebering (1-3).

Las reacciones limitantes de la velocidad de utilización de la glucosa son las catalizadas por las enzimas regulatorias hexoquinasa y fosfofructokinasa-1. La hexoquinasa es modulada por varios intermediarios glucolíticos: es inhibida por glucosa-6-fosfato, glucosa-1,6-difosfato, 2,3-difosfoglicerato y glutatión oxidado; el fósforo inorgánico estimula la actividad. De todas las enzimas glucolíticas del eritrocito, la hexoquinasa es la que tiene menor actividad específica. La fosfofructokinasa-1 es modulada positivamente por el ADP, fósforo inorgánico, amonio y fructosa-2,6-difosfato; el ATP y el 2,3-difosfoglicerato son moduladores negativos. La hexoquinasa y la fosfofructokinasa tienen un pH óptimo relativamente elevado; su actividad es muy reducida a valores de pH menores de 7. Por lo tanto, un incremento en el pH resulta en estimulación de la actividad de ambas enzimas (1).

La segunda vía del metabolismo de la glucosa es la oxidativa directa o vía de las pentosa (Fig. 1). En esta vía la glucosa-6-fosfato es descarboxilada y convertida a una pentosa-fosfato y en este proceso el cofactor NADP^+ es reducido a NADPH. La pentosa fosfato formada (ribulosa-5-fosfato) sufre una serie de rearrreglos moleculares que resultan en la formación de gliceraldehído-3-fosfato y fructosa-6-fosfato, los cuales ingresan a la vía de Embden-Meyerhof. La función primaria de la vía de las pentosas consiste en la generación de poder reductor en forma de NADPH. El NADPH es necesario para el mantenimiento del glutatión en estado reducido (GSH) a través de la reacción catalizada por la enzima glutatión reductasa. A su vez, el GSH es

un compuesto con actividad antioxidante. La cantidad de glucosa metabolizada por la vía de las pentosas depende de la velocidad de oxidación del GSH (1-4).

El eritrocito también tiene la capacidad de metabolizar glucosa por la vía del sorbitol, particularmente en condiciones de hiperglicemia (Fig. 2-A). Por experimentos in vitro se demostró, que a concentraciones fisiológicas de glucosa, aproximadamente 3% de la glucosa transportada al interior de la célula es metabolizada por la vía del sorbitol, cifra que aumenta a 11% cuando la concentración de glucosa en el medio es de 50mM (5,6).

2. - Metabolismo de la glucosa en el cristalino.

El cristalino del ojo está localizado inmediatamente atrás de la pupila. Para minimizar la dispersión de luz, no hay vasos sanguíneos dentro del cristalino. Este enfoca la luz entrante sobre los fotorreceptores de la retina. El cristalino está rodeado por los humores vítreo y acuoso; éste último es la fuente principal de nutrientes y oxígeno necesarios para el metabolismo; dichos nutrientes son incorporados al tejido a través de una delgada capa de células epiteliales. La mayor parte del transporte y acumulación de los nutrientes necesarios, así como el mantenimiento del balance iónico, son realizadas por el epitelio ya que allí se localizan la mayoría de las células nucleadas y mitocondrias del cristalino. La fuente de energía en el cristalino es la glucosa, la cual es metabolizada a través de las vías de Embden-Meyerhof, ciclo de Krebs y derivación hexosa

monofosfato (7-9).

Casi toda la actividad metabólica del cristalino se localiza en la periferia del tejido ya que solamente en la capa epitelial se encuentran núcleos celulares intactos; las mitocondrias y microsomas solo son abundantes en la región externa del tejido. Estas observaciones, así como la baja tensión de oxígeno en la región del cristalino permiten anticipar que el ciclo de Krebs tiene un papel menor en el metabolismo de la glucosa. En el cristalino la ruta principal para el metabolismo de la glucosa es la vía Embden-Meyerhof y el producto final de la vía el lactato, es eliminado en el líquido acuoso. Aproximadamente el 80% de la glucosa es metabolizada por esta vía; 10-15% de la glucosa es metabolizada por la derivación hexosa monofosfato y aproximadamente 5% por el ciclo de Krebs. Si bien la derivación hexosa monofosfato no genera ATP, produce pentosas que son utilizadas en reacciones biosintéticas y genera poder reductor en forma de NADPH. En el cristalino el NADPH es requerido en las reacciones catalizadas por la glutatión reductasa y la aldosa reductasa (8-10).

En cristalinicos incubados en presencia de concentraciones crecientes de glucosa se observa un incremento en la actividad de la derivación hexosa monofosfato. A concentraciones de glucosa 30mM el incremento es de 6 a 6.5 veces mayor que a concentraciones de 5mM. La vía de las pentosas también es activada por oxidación. Por lo tanto esta vía metabólica está asociada con la cataratogénesis por azúcar (ver apartado de Vía del Sorbitol y mecanismo de formación de cataratas por azúcar) y

con la detoxificación de peróxido de hidrógeno por la glutatión reductasa (ver Fig. 2-B). (8).

Ya que la glucosa-6-fosfato formada en la reacción catalizada por la hexoquinasa es el sustrato inicial de la derivación hexosa monofosfato, la actividad de la hexoquinasa en el cristalino regula a la glucólisis y a la vía de las pentosas. El control de la glucólisis ocurre a nivel de la hexokinasa y la fosfofructokinasa. La hexokinasa es inhibida por su producto glucosa-6-fosfato; y el fósforo inorgánico libera a la enzima de dicha inhibición. La fosfofructokinasa es inhibida en presencia de concentraciones elevadas de ATP, en tanto que la fructosa-6-fosfato, el ADP y el AMP revierten la inhibición mediada por el ATP. En cristalino animal la actividad de la fosfofructokinasa así como la actividad de la derivación hexosa monofosfato disminuyen a medida que el animal envejece (8,9).

Por otro lado, la hexokinasa del cristalino tiene una actividad específica extremadamente baja y una gran afinidad por glucosa. Por lo tanto, en presencia de concentraciones fisiológicas de glucosa, la enzima está saturada; el incremento en la concentración de glucosa en la sangre o en el humor acuoso conduce a un marcado aumento en la concentración intracelular de glucosa sin un incremento en la formación de lactato. El exceso de glucosa es metabolizada a través de la vía del sorbitol (8,9).

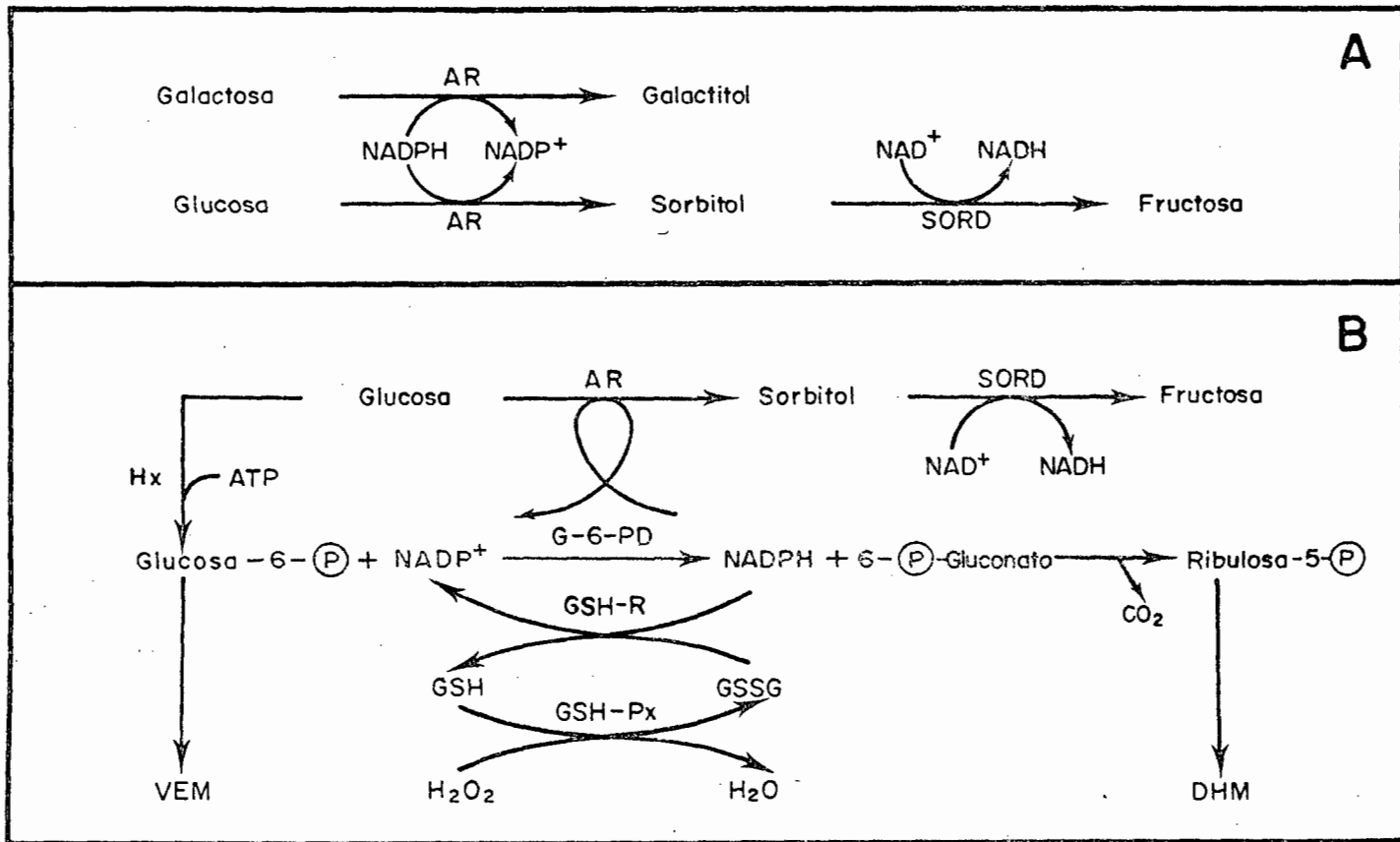


Fig. 2. A: VIA DEL SORBITOL; B: REPRESENTACION ESQUEMATICA DE LA COMPETENCIA DE LA ALDOSA REDUCTASA POR EL COFACTOR NADPH. Abreviaturas: AR = aldosa reductasa; SORD = sorbitol deshidrogenasa; G-6-PD = glucosa-6-fosfato deshidrogenasa; Hx - hexokinasa; GSH = glutati3n reducido; GSSG = glutati3n oxidado; GSH-R = glutati3n reductasa; GSH-Px = glutati3n peroxidasa; VEM = vfa de Embden-Meyerhof; DHM = derivaci3n hexosamonofosfato.

3. - Metabolismo del glutati3n en el eritrocito y en el cristalino.

La sntesis de glutati3n reducido (GSH) procede a trav3s de 2 reacciones (Fig. 1) (1):

- a) glutamato + cisteina + ATP \rightleftharpoons γ -glutamilcisteina + ADP + Pi
(reacci3n catalizada por la γ -glutamilcisteina sintetasa)
- b) γ -glutamilcisteina + glicina + ATP \rightleftharpoons GSH + ADP + Pi
(reacci3n catalizada por la glutati3n sintetasa)

Se argumenta que el eritrocito requiere un sistema para la sntesis de GSH debido al transporte activo del glutati3n oxidado (GSSG) fuera del eritrocito. El eritrocito y el cristalino contienen concentraciones elevadas de GSH. En el cristalino la mayor concentraci3n de GSH ocurre en el epitelio; y dicha concentraci3n disminuye en la corteza y es mucho menor en el n3cleo (1, 10).

Las funciones generales del GSH incluyen: a) la detoxificaci3n de bajos niveles de per3xido de hidr3geno que pueden formarse espont3neamente o como resultado de la administraci3n de drogas. El per3xido de hidr3geno es convertido a agua en la reacci3n catalizada por la glutati3n peroxidasa (Fig. 2-B); b) reducir grupos sulfhidrilo oxidados de prote3nas. En ambos procesos el GSH es convertido a glutati3n oxidado (GSSG). A su vez la glutati3n reductasa convierte al GSSG en GSH usando como reductante al NADPH suministrado por la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. El mismo sistema enzim3tico tiene la capacidad de reducir disulfuros mixtos de prote3nas y glutati3n (1, 10).

4. - Epidemiología de las cataratas.

Cuando el cristalino pierde su transparencia normal y hay interferencia con el paso de luz a través del cristalino, está presente una catarata. La alteración visual estará determinada por la localización, tamaño y densidad de la opacidad del cristalino. Actualmente el único tratamiento para cataratas consiste en la remoción quirúrgica del cristalino; para compensar la pérdida de enfoque debido a la extracción del cristalino se usan anteojos, lentes de contacto o intraoculares (7).

Múltiples reportes de datos epidemiológicos e investigaciones clínicas indican que la diabetes mellitus acelera el desarrollo de cataratas seniles en el humano (para revisión ver referencia 7). Las cataratas seniles constituyen un problema de salud pública. Mundialmente la catarata senil es responsable de alteración visual significativa en 30 a 45 millones de personas (11). No existe una causa única de formación de cataratas seniles; éstas tienen una etiología multifactorial. Se han sugerido múltiples mecanismos de formación de cataratas en el humano; sin embargo, en la actualidad solamente uno está bien definido: el mecanismo de formación de cataratas diabéticas y de cataratas galactosémicas (cataratas por azúcar) por la vía metabólica del sorbitol (11).

5. - Vía del sorbitol y mecanismo de formación de cataratas por azúcar.

Dos enzimas están involucradas en la vía: la aldosa reductasa (AR) que cataliza la conversión de glucosa y galactosa en sorbitol y galactitol respectivamente, y la sorbitol deshidrogenasa (SORD) que convierte sorbitol en fructosa (fig. 2-A).

La AR tiene una baja afinidad (Km 70-200mM) por glucosa y galactosa, de tal forma que para reducir las a sus respectivos polialcoholes requiere de niveles elevados de la hexosa y suficiente poder reductor en forma de NADPH. En el cristalino el NADPH es suministrado a través de la reacción catalizada por la G-6-PD (fig. 2-B) (11).

La vía del sorbitol está relacionada bioquímica y patofisiológicamente con la diabetes: el sorbitol y el galactitol están involucrados en la patogénesis de las cataratas diabéticas y de las cataratas galactosémicas ("cataratas por azúcar"). El desarrollo de cataratas diabéticas o de cataratas galactosémicas tiene un mecanismo común: concentraciones sanguíneas elevadas de glucosa o galactosa conducen a la formación de cataratas en animales experimentales, en cristalinos incubados in vitro y en pacientes con diabetes mellitus o con galactosemia debida a errores innatos del metabolismo de la galactosa (8, 11-16). En condiciones normales hay poco flujo a través de la vía del sorbitol en la mayoría de los tejidos. Sin embargo, en condiciones de hiperglicemia o hipergalactosemia, aumenta

considerablemente el flujo, originándose concentraciones intracelulares elevadas de sorbitol y galactitol respectivamente. Las membranas celulares son pobremente permeables a estos polialcoholes, lo cual da por resultado que estos se acumulen intracelularmente provocando una hipertonicidad en el citoplasma de las células; en estas condiciones se establece un imbalance osmótico que termina produciendo una serie de alteraciones patológicas en varios tejidos. En el cristalino, la acumulación de alcoholes de azúcares es responsable para el desarrollo de cataratas hiperglicémicas o hipergalactosémicas debido a la hipertonicidad resultante de su acumulación (8,11-16).

Un bloqueo en la formación de sorbitol o galactitol, debido a una actividad muy baja de AR (como ocurre en una cepa de ratones con hiperglicemia congénita) o a la inhibición de la AR inducida experimentalmente, previene o retarda el desarrollo de las "cataratas por azúcar" (8,12-17). Se han reportado múltiples inhibidores de la AR que retardan significativamente el inicio de las "cataratas por azúcar" en animales experimentales. Para que los inhibidores sean efectivos deben administrarse al inicio de la diabetes o galactosemia experimentales. Además, si los inhibidores se administran en la fase temprana del desarrollo de las cataratas, pueden revertir el proceso cataratogénico (12-17).

6. - Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G-6-PD).

La G-6-PD es la primera enzima de la vía de las pentosas y cataliza la oxidación de la glucosa-6-fosfato a 6-fosfogluconato; en la reacción se genera NADPH, necesario para el mantenimiento del glutati6n en estado reducido (GSH) a trav6s de la reacci6n catalizada por la enzima glutati6n reductasa (GSH-R). El GSH funciona en el eritrocito y en el cristalino manteniendo en estado activo reducido los grupos sulfhidrilo de las prote6nas, adem6s, el GSH participa en la detoxificaci6n de bajos niveles de per6xido de hidr6geno por medio de la reacci6n catalizada por la glutati6n peroxidasa (GSH-Px) (1, 10) (fig. 2-B).

La deficiencia de G-6-PD es el error innato del metabolismo m6s com6n en el humano, se distribuye mundialmente y se estima que afecta a m6s de 400 millones de personas, de todas las razas, aunque su frecuencia var6a de manera notable entre diferentes grupos 6tnicos. El bloqueo metab6lico impuesto por la deficiencia de G-6-PD interfiere con la entrada de la glucosa a la v6a de las pentosas e incapacita al eritrocito para generar cantidades adecuadas de NADPH y de GSH, aumentando la susceptibilidad de los gl6bulos rojos al da6o oxidativo. El gen que determina la estructura de la mol6cula de G-6-PD se localiza en el cromosoma X. La deficiencia de esta enzima tiene una herencia recesiva (3, 4, 18). La G-6-PD es una enzima polim6rfica de la que se han descrito m6s de 300 variantes, probablemente al6licas; 6stas se han agrupado en 5 clases de acuerdo, sobre todo, con el porcentaje de actividad enzim6tica y con la existencia de anemia

hemolítica no esferocítica hereditaria. Las variantes más comunes son la A⁺ y la A⁻ frecuentes en individuos de raza negra; la Mediterráneo, común en países de la cuenca del Mediterráneo y la Cantón, común en individuos de China (4,18).

Las manifestaciones clínicas de la deficiencia de G-6-PD incluyen ictericia neonatal, anemia hemolítica crónica o hemólisis aguda en situaciones que provocan un estrés oxidativo tales como la exposición a ciertos compuestos químicos, las infecciones bacterianas o virales, la acidosis diabética y la ingestión de frijol de fava. La prevención y el tratamiento consisten en evitar la ingestión de drogas oxidativas o de frijol de fava, la transfusión sanguínea y fototerapia o transfusión de intercambio en casos de hiperbilirrubinemia neonatal severa (4,18). Recientemente fué clonado y secuenciado el gen que codifica para la G-6-PD; este importante avance ha permitido iniciar la caracterización a nivel molecular de las variantes comunes de G-6-PD y de algunas variantes raras (4).

P L A N T E A M I E N T O D E L P R O B L E M A

Una consecuencia metabólica de la deficiencia de G-6-PD, la cual también se expresa en el cristalino (19), es el incremento de los niveles de NADP^+ y el decremento en los de NADPH (18) (Ver Fig. 2-B). La K_m por NADPH de la aldosa reductasa de cristalino humano es de 0.06 mM y la concentración intracelular de este nucleótido de piridina es de 0.02 mM. Además el NADP^+ inhibe a la aldosa reductasa de cristalino humano (20).

Por lo tanto, un bloqueo metabólico impuesto por la deficiencia de G-6-PD, reduciría el suministro de NADPH bloqueando la formación de polialcoholes y consecuentemente prevendría o retardaría el inicio de las cataratas por azúcar (21-23).

Las estrategias para abordar el problema son las siguientes:

- 1.- Tamizaje para la deficiencia de G-6-PD eritrocitaria y evaluación oftalmológica en pacientes con diabetes mellitus.
- 2.- Evaluar el efecto de la deficiencia de G-6-PD de causa genética o inducida experimentalmente:
 - a) Sobre la acumulación de sorbitol en células completas incubadas en presencia de concentraciones elevadas de glucosa (Modelo in vitro), y
 - b) Sobre la formación de "cataratas por azúcar" en un modelo animal con galactosemia (Modelo in vivo).

Resultados parciales de las diferentes estrategias ya fueron publicados (23,24). En este trabajo de Tesis se presentarán los resultados de nuevos experimentos utilizando el modelo in vitro.

H I P O T E S I S

Un bloqueo metabólico impuesto por la deficiencia de G-6-PD, de causa genética o inducida experimentalmente, produce una disminución en los niveles intracelulares de sorbitol en células incubadas en presencia de concentraciones elevadas de glucosa.

O B J E T I V O S .

1. - Evaluar el efecto de los inhibidores de G-6-PD sobre la actividad de la enzima de eritrocitos humanos y de cristalino de rata.
2. - Determinar la concentración de inhibidor que produce 50% de inhibición (CI₅₀) y el tipo de inhibición (ver apéndice 1).
3. - Determinar el efecto de la deficiencia de G-6-PD inducida experimentalmente sobre la acumulación de sorbitol en cristalinos de rata incubados en glucosa.
4. - Determinar el efecto de la deficiencia de G-6-PD inducida experimentalmente sobre la acumulación de sorbitol en eritrocitos humanos de individuos normales incubados en glucosa.
5. - Determinar la concentración intracelular de sorbitol en eritrocitos de pacientes G-6-PD deficientes incubados en glucosa.

MATERIAL Y METODOS

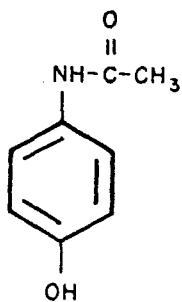
1. - Evaluación del efecto de los inhibidores sobre la actividad de G-6-PD:

Inhibidores de G-6-PD: acetaminofen (ACTF), cloranfenicol (CLFC) y dehidroepiandrosterona (DHEA) (ver apéndice 2 y la Fig. 3). Los dos primeros fueron seleccionados previamente en un estudio de tamizaje para inhibidores de G-6-PD entre diferentes medicamentos (24) y el tercero es un inhibidor uncompetitivo de la G-6-PD de mamíferos reportado en la literatura (25).

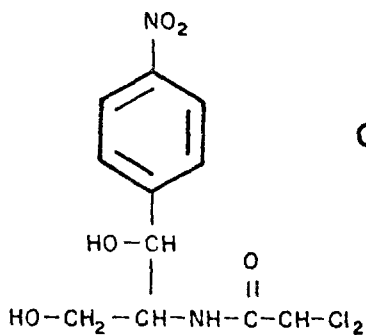
Para la evaluación de los efectos de ACTF, CLFC, y DHEA sobre la actividad de la enzima se utilizaron 2 fuentes de G-6-PD:

- a) Un sobrenadante (12,000 xg) proveniente de un homogenado de cristalinos de rata Sprague-Dawley en KCl 0.15M (1:10 p/v) y
- b) G-6-PD de eritrocitos humanos, purificada parcialmente de acuerdo al procedimiento de González y cols. (26).

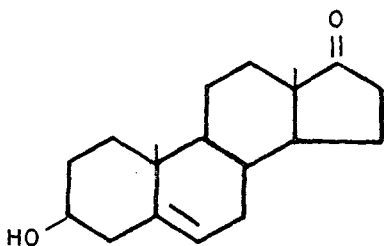
La actividad de G-6-PD fué cuantificada de acuerdo al procedimiento de la WHO o de Glock y McLean (27). La concentración de inhibidor que produce una inhibición de 50% (CI₅₀) se estimó a partir de las líneas de regresión de las curvas en las que se grafican el logaritmo de la concentración de inhibidor versus el porcentaje de inhibición.



ACETAMINOFEN (ACTF)



CLORANFENICOL (CLFC)



DEHIDROEPIANDROSTERONA (DHEA)

Fig. 3.- Fórmulas del ACTF, CLFC y DHEA

2. - Estudios en células totales in vitro.

2.1. Cristalinos.

Estos fueron removidos quirúrgicamente de ratas Sprague-Dawley adultas. Los cristalinos fueron incubados en 2.5ml de Buffer HEPES 0.1M (pH 7.4) que contiene NaCl 135mM, glucosa 50mM. Las concentraciones de inhibidor fueron: 0 a 5.33mM de CLFC y 0 a 143µM de DHEA. El DHEA fué disuelto previamente en etanol al 20%; al control sin DHEA se adicionó el mismo volumen de etanol al 20%. Los tiempos de incubación fueron de 4hr a 37°C en un baño con agitación mecánica.

2.2. Eritrocitos.

Se colectó sangre heparinizada de individuos G-6-PD normales y de una familia con la variante G-6-PD Guadalajara; esta variante está asociada con anemia hemolítica crónica y muestra una actividad de 14% (sus propiedades bioquímicas se presentan en la tabla 1). Se incubaron 1.0 ml de eritrocitos lavados (con NaCl 0.9%) en 2.0 ml de Buffer HEPES 0.2M (pH 7.4) que contiene NaCl 135mM, glucosa 5mM e inhibidor, por 1 hr a 37°C en un baño con agitación. Las concentraciones de inhibidor fueron 50 y 200µM para DHEA y 2.4 y 4.8mM para CLFC. Posteriormente se adicionó glucosa al medio de incubación para obtener concentraciones finales de 50mM y la incubación se continuó por 4 hrs más.

TABLA 1. Propiedades enzimáticas de la variante G-6-PD Guadalajara comparada con la enzima normal B⁺. *

	Guadalajara	B ⁺ (normal)
Actividad (% del normal)	14	100
Km (glu-6-P)	36	50-70µM
Km (NADP ⁺)	5.3	2.9-4.4µM
Utilización de 2-deoxiglu-6-P (% de glu-6-P)	4.5	<4
Utilización de diamino-NADP ⁺ (% de NADP ⁺)	68.8	55-60%
Ki NADPH	22	7.6-30.9µM
Estabilidad térmica	Normal	Normal
pH óptimo	Normal	Truncado
Movilidad electroforética (% del normal)		
Buffer Tris	100	100
Buffer EDTA-Borato-Tris	100	100
Buffer Fosfatos	109	100

* Vaca G., Ibarra B., Romero F., Olivares N., Cantú J.M., Beutler E. : G-6-PD Guadalajara. A new mutant associated with chronic nonspherocytic hemolytic anemia. Hum. Genet. 61:175-176, 1982.

Al final de los periodos de incubación, se lavaron y pesaron los cristalinicos, posteriormente se homogenizaron en 1ml de HClO_4 6% frío.

Los eritrocitos fueron sedimentados por centrifugación, lavados con NaCl 0.9% y precipitados con 3 volúmenes de HClO_4 6% frío.

Los homogenados o los extractos fueron centrifugados a $5500 \times g / 4^\circ\text{C} / 10\text{min}$ y los sobrenadantes fueron neutralizados con K_2CO_3 8% y trietanolamina 2%. Los extractos neutralizados fueron centrifugados una vez más y los sobrenadantes se utilizaron para cuantificación de sorbitol de acuerdo al procedimiento de Poli et. al. (28). El ensayo depende de la conversión de sorbitol a fructosa en presencia de NAD^+ , catalizada por la sorbitol deshidrogenasa adicionada a la mezcla de incubación. El NADH formado se cuantificó fluorométricamente. La composición de la mezcla de incubación fué la siguiente:

Se adicionó una alícuota de sobrenadante neutralizado a 1.0 ml de Buffer Glicina 0.05M pH 9.4 que contiene NAD^+ 0.2mM y 0.64U/ml de sorbitol deshidrogenasa. El volumen final de la mezcla de incubación es de 1.5ml. Se incluyen en el ensayo sobrenadantes neutralizados de estandares de sorbitol de concentración conocida; el blanco de reactivos lo constituye un sobrenadante neutralizado que no lleva sorbitol. Se incuba durante 30min a 37°C y posteriormente se lee la fluorescencia en un fluorómetro Turner (filtro primario N^o 110-811; filtro secundario N^o 110-817).

R E S U L T A D O S

Inhibición de la G-6-PD.

Los resultados de la inhibición in vitro de la G-6-PD de cristalino de rata y de la G-6-PD de eritrocitos humanos por DHEA, CLFC y ACTF se muestran en las Figs. 4 y 5 respectivamente. La CI_{50} para cada inhibidor aparece en la Tabla 2.

TABLA 2. - Actividad inhibitoria in vitro de ACTF, CLFC y DHEA sobre la G-6-PD.

FUENTE DE ENZIMA	* CI_{50} (M)		
	ACTF	CLFC	DHEA
Cristalino de rata	1.77×10^{-1}	1.90×10^{-3}	8.51×10^{-6}
Eritrocitos humanos	1.04×10^{-1}	2.08×10^{-3}	5.49×10^{-6}

*Calculada a partir de las líneas de regresión de las curvas que representan el logaritmo de la concentración de inhibidor versus el porcentaje de inhibición.

Estos resultados indican que el DHEA es el inhibidor más activo mientras que el ACTF es el menos activo. Cada uno de los inhibidores tiene aproximadamente la misma actividad absoluta hacia la G-6-PD de rata y la G-6-PD humana.

El análisis cinético mostró patrones de inhibición no competitiva para CLFC y ACTF (Figs. 6, 7) y un patrón mixto uncompetitivo-no competitivo para DHEA (Fig. 8).

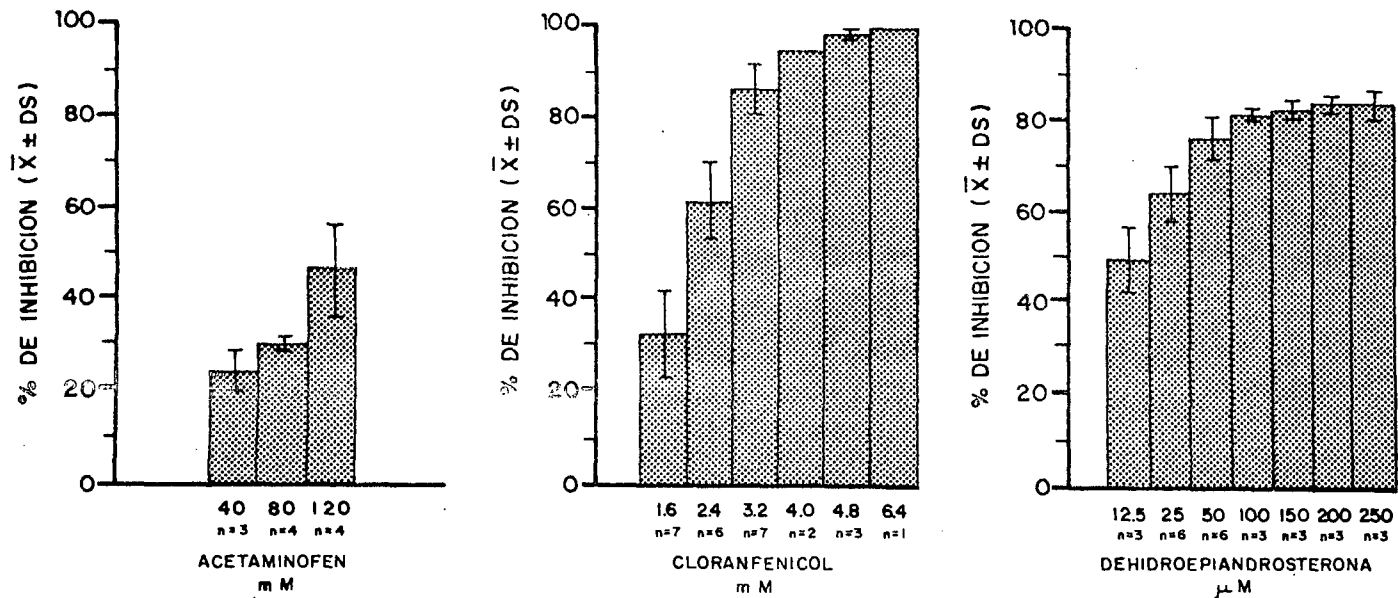


Fig. 4. Actividad de G-6-PD de cristalino de rata contra concentración de inhibidores.

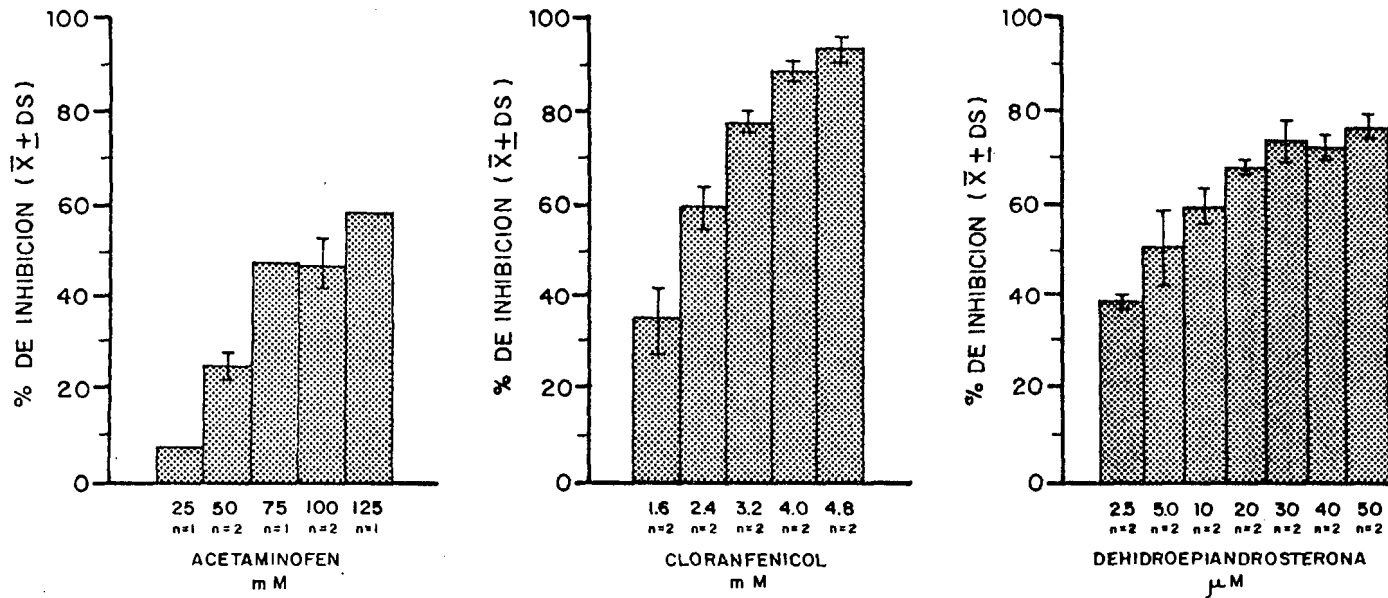


Fig. 5. Actividad de G-6-PD de eritrocitos humanos contra concentración de inhibidor.

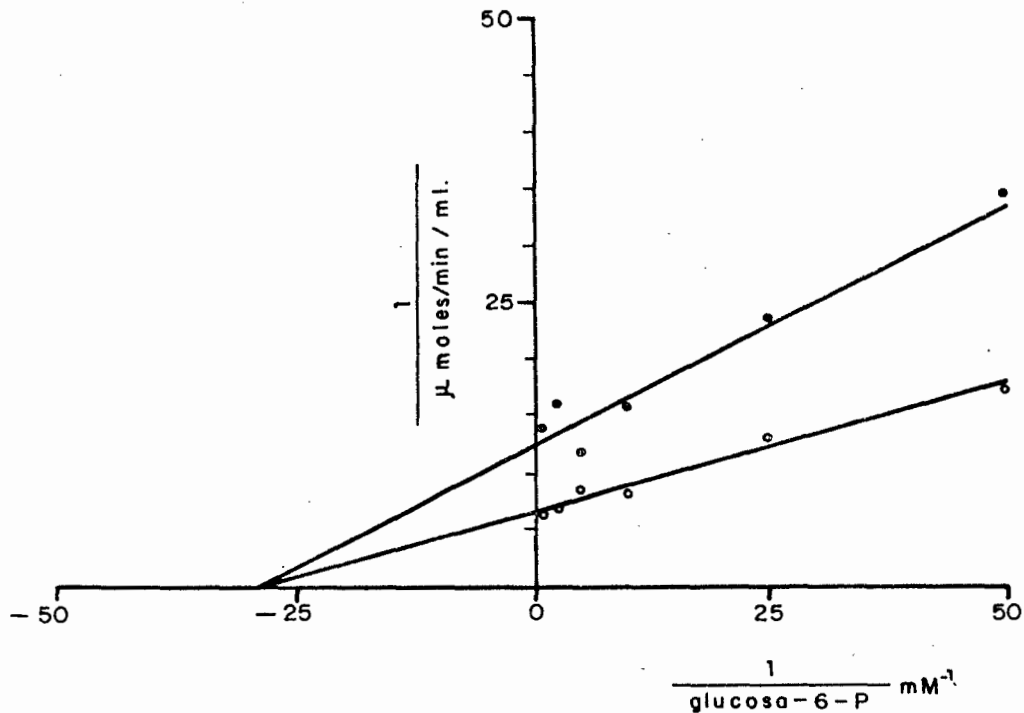


Fig. 6. Efecto del CLFC sobre la representación doble recíproca de la actividad de G-6-PD de eritrocitos humanos con glucosa-6-fosfato como sustrato. La ordenada representa la recíproca de la velocidad inicial. La abscisa representa la recíproca de la concentración de glucosa-6-fosfato entre 2×10^{-5} y 2×10^{-3} M. Símbolos abiertos, enzima no inhibida; símbolos cerrados, enzima inhibida por CLFC 1.6×10^{-3} M. Las pendientes se obtuvieron por análisis de regresión.

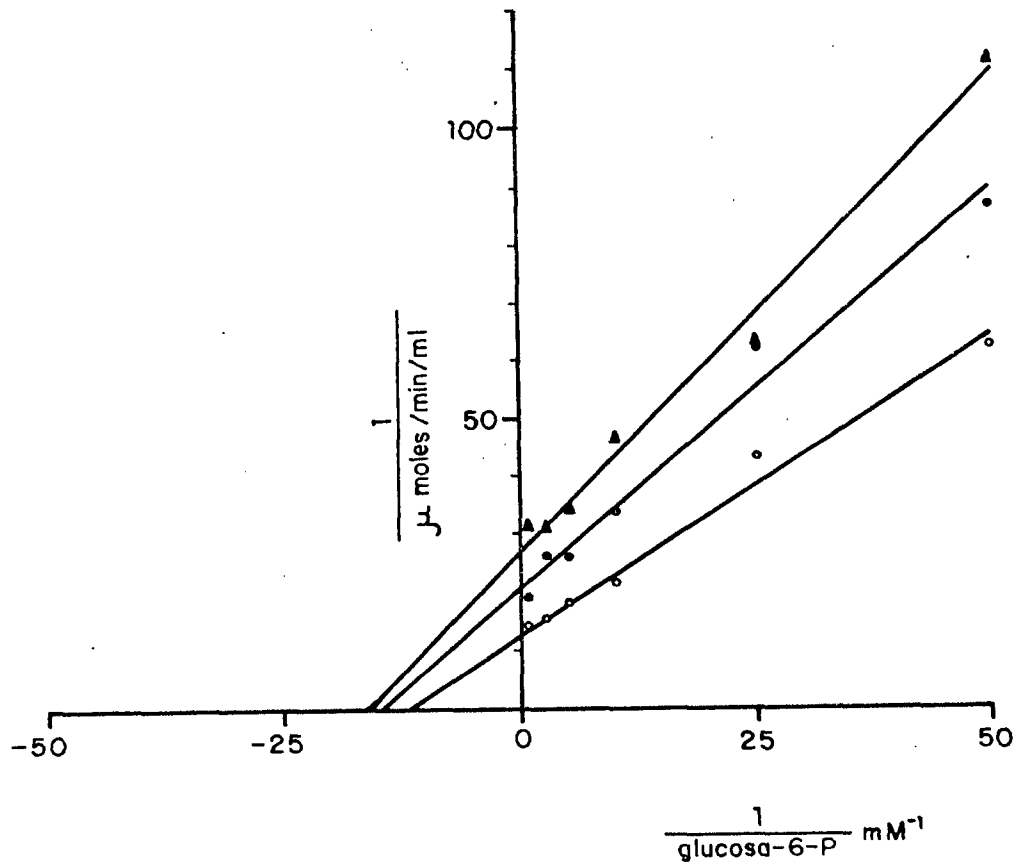


Fig. 7. Efecto del ACTF sobre la representación doble recíproca de la actividad de G-6-PD de eritrocitos humanos con glucosa-6-fosfato como sustrato. Símbolos abiertos, la enzima no inhibida; símbolos cerrados, la enzima inhibida por ACTF 0.066 y 0.132 M.

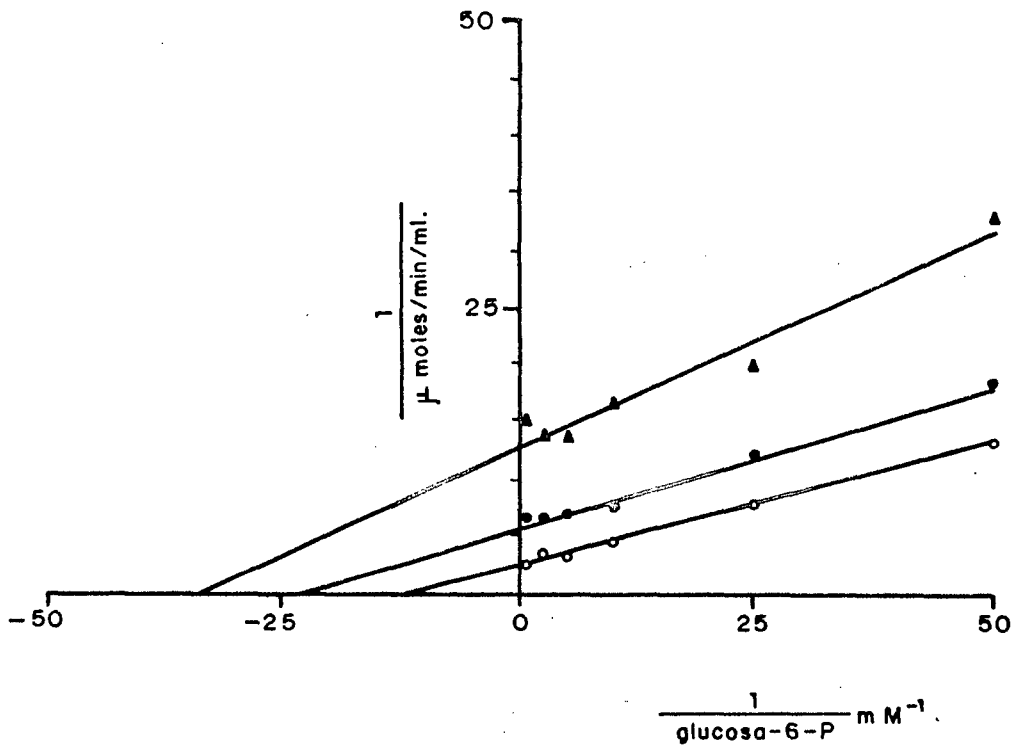


Fig. 8. Efecto del DHEA sobre la representación doble recíproca de la actividad de G-6-PD de eritrocitos humanos con glucosa-6-fosfato como sustrato. Símbolos abiertos, la enzima no inhibida; símbolos cerrados, la enzima inhibida por DHEA 1×10^{-5} y $5 \times 10^{-5} \text{ M}$.

Acumulación de sorbitol en tejidos incubados.

Los efectos de ACTF, CLFC y DHEA sobre la acumulación de sorbitol en cristalino de rata y en eritrocitos humanos incubados en glucosa 50mM se muestran en las Figs. 9 y 10 respectivamente. El CLFC (5.33mM) y el DHEA (143µM) disminuyeron significativamente los niveles de sorbitol en cristalino de rata. En presencia de CLFC los niveles de sorbitol fueron de 45% en relación al control sin inhibidor y con DHEA fueron de 51% (Fig. 9). Previamente se encontraron niveles de sorbitol de 18% en cristalininos de rata incubados en presencia de glucosa 50mM + ACTF 132mM (Fig. 9) (24). En eritrocitos humanos normales solamente el CLFC disminuyó significativamente los niveles de sorbitol a 42% en relación al control sin CLFC (Fig. 10).

Como puede verse en la FIG. 9 los niveles de sorbitol en el control sin DHEA (con etanol) son 2.5 a 3.0 veces menores que en los controles sin CLFC o sin ACTF (ambos sin etanol) en cristalino de rata; este efecto de etanol sobre los niveles de sorbitol no fué observado en eritrocitos humanos.

Los resultados de la acumulación de sorbitol en eritrocitos humanos G-6-PD deficientes incubados en glucosa 50mM se muestran en la Fig. 11. Los eritrocitos de los pacientes con la variante G-6-PD Guadalajara en estado hemisigoto y heterocigoto acumularon 40% y 76% de sorbitol respectivamente versus los eritrocitos de individuos G-6-PD normales.

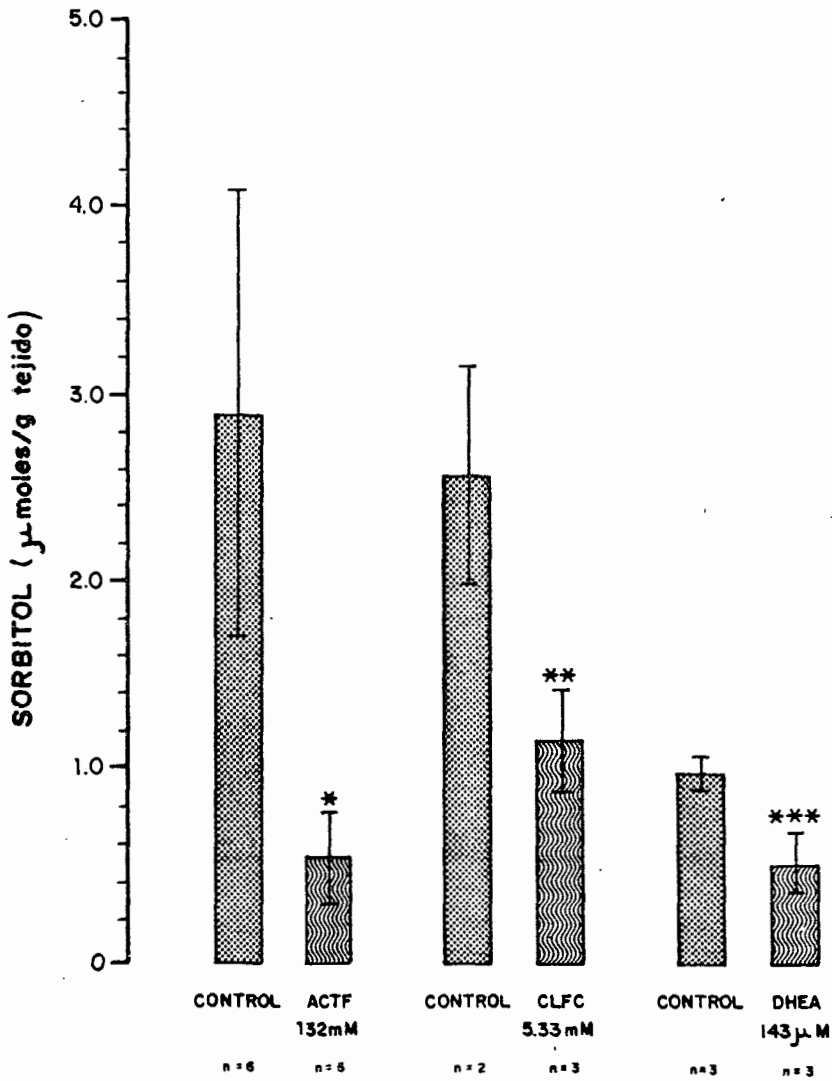


Fig. 9. Efecto del ACTF, CLFC y DHEA sobre la acumulación de sorbitol en cristalinios de rata incubados en presencia de glucosa 50 mM. Los valores son promedio \pm DS. * $p < 0.001$; ** $p < 0.05$; *** $p < 0.01$ vs el control correspondiente.

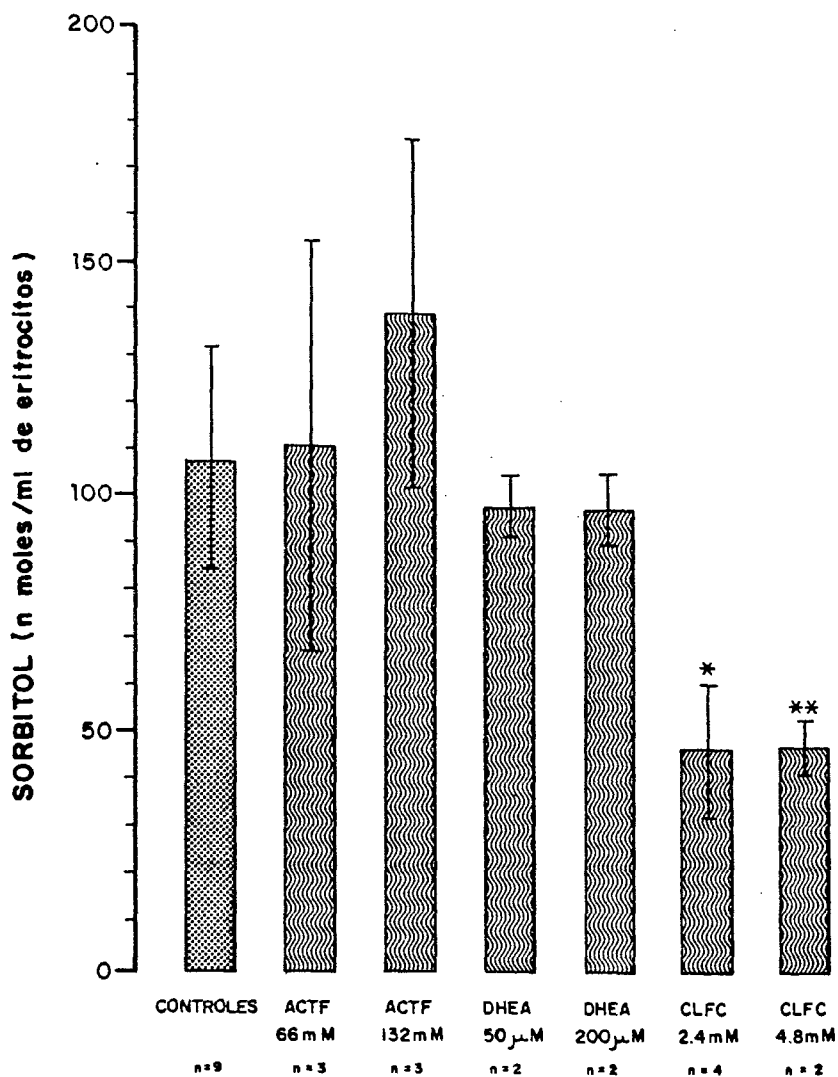


Fig. 10. Efecto del ACTF, DHEA y CLFC sobre la acumulación de sorbitol en eritrocitos humanos normales incubados en presencia de glucosa 50 mM. Los valores son promedio \pm DS. * $p < 0.001$; ** $p < 0.01$ vs los controles.

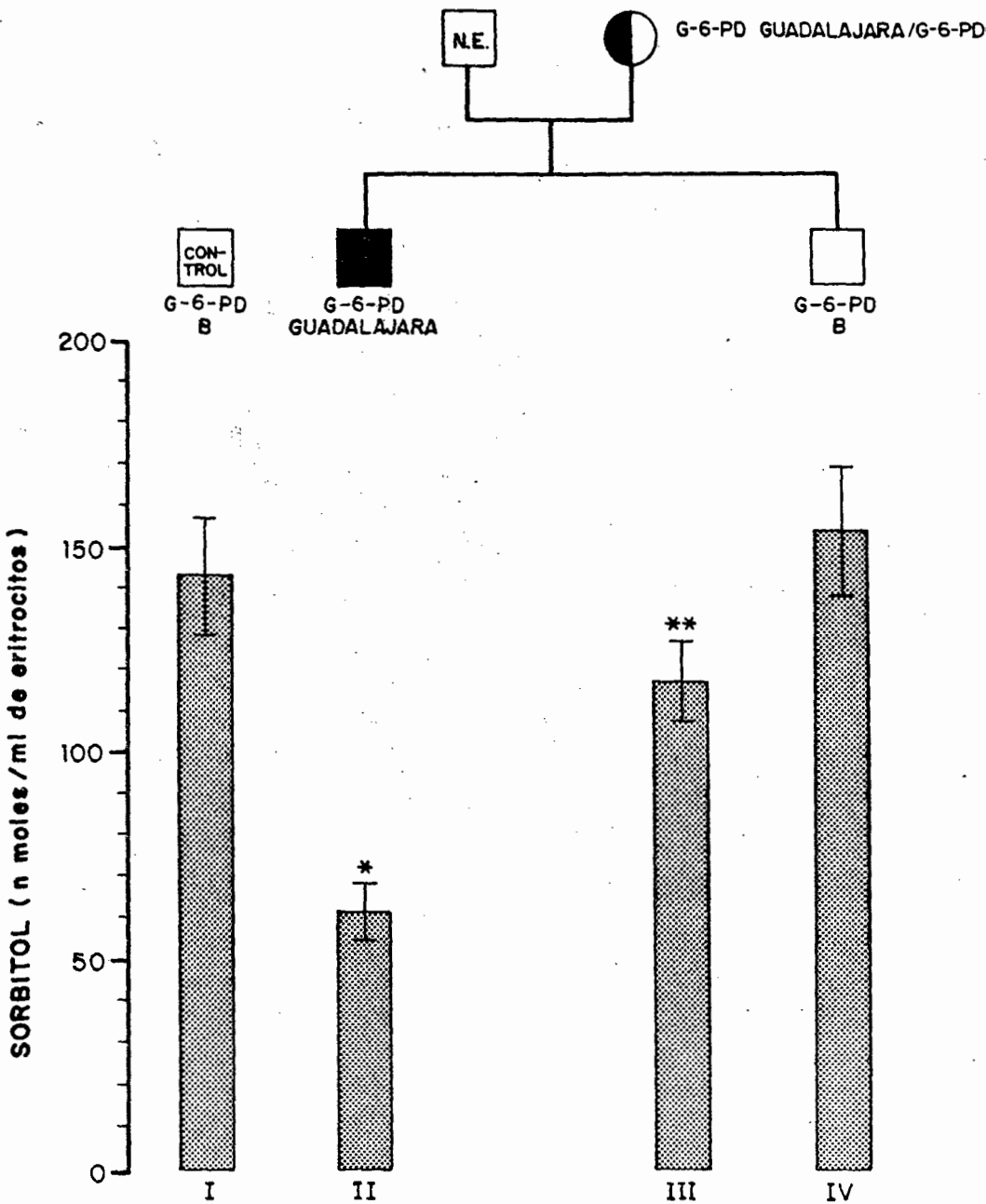


Fig. 11. Acumulación de sorbitol en eritrocitos de una familia con la variante deficiente G-6-PD Guadalajara incubados en presencia de glucosa 50 mM. Los valores son promedio \pm DS. * $p < 0.001$ vs I, III y IV; ** $p < 0.01$ vs IV. NE = no estudiado.

D I S C U S I O N

Como inhibidores de la actividad de G-6-PD in vitro (enzimas de rata y humana) la potencia en orden descendente fué: DHEA >CLFC >ACTF. La comparación de los valores de CI_{50} revela que el DHEA fué 223-378 veces y 19,000-20,000 veces más potente que el CLFC y que el ACTF respectivamente; el CLFC fué 50-93 veces más potente que el ACTF (Tabla 2). Los tres inhibidores de G-6-PD también inhibieron significativamente la formación de sorbitol en cristalininos de rata (Fig. 9):

% DE INHIBICION SOBRE LA ACUMULACION DE SORBITOL			
Controles	DHEA 143 μ M	CLFC 5.33mM	ACTF 132 mM
0	49%	55%	82%

El ACTF produjo una inhibición de 82% pero a una concentración 923 veces mayor que la de DHEA y 25 veces mayor que la de CLFC. El DHEA y el CLFC tuvieron efectos similares sobre los niveles de sorbitol en cristalino; la concentración de CLFC utilizada es 37 veces mayor que la de DHEA. Por lo tanto, es muy probable que como inhibidores de la acumulación de sorbitol en cristalino de rata, la potencia en orden descendente sea: DHEA >CLFC >ACTF.

En eritrocitos humanos solamente el CLFC tuvo un efecto significativo sobre los niveles de sorbitol (Fig. 10). El ACTF y el DHEA no inhibieron la acumulación de sorbitol probablemente debido a impermeabilidad a través de la membrana del eritrocito.

Varios inhibidores de la aldosa reductasa tienen un comportamiento similar al del DHEA en eritrocitos. Es decir, son fuertes inhibidores de la actividad de aldosa reductasa in vitro ($CI_{50} = 6 \times 10^{-7} M$) pero no tienen efecto sobre la acumulación de sorbitol en eritrocitos incubados en presencia de concentraciones elevadas de glucosa (29).

Los mayores efectos sobre la acumulación de sorbitol en tejidos incubados fueron producidos por el ACTF en el caso del cristalino de rata (82% de inhibición, Fig. 9) y por la deficiencia de G-6-PD de causa genética en el caso de los eritrocitos humanos (60% de inhibición, Fig. 11).

Kennedy y cols. (30) encontraron que fibroblastos de pacientes con la variante deficiente G-6-PD Mediterraneo incubados en presencia de concentraciones elevadas de galactosa acumularon significativamente menos galactitol que fibroblastos de sujetos normales. Beutler y Guinto (31) no observaron acumulación de glicerol en eritrocitos G-6-PD deficientes tipo A⁻ incubados en presencia de gliceraldehído; este último compuesto también es sustrato de la aldosa reductasa.

Los resultados del presente trabajo, así como los de Ramírez (24), Kennedy y cols. (30) y Beutler y Guinto (31) indican que la deficiencia de G-6-PD, inducida experimentalmente o transmitida genéticamente, produce un descenso en la acumulación intracelular de polialcoholes en células incubadas en presencia de niveles elevados de hexosa.

Por lo tanto, la deficiencia de G-6-PD podría prevenir o retardar el desarrollo de las cataratas por azúcar en un modelo animal con galactosemia inducida experimentalmente y en humanos

con diabetes mellitus.

Los siguientes datos de nuestro grupo apoyan la hipótesis anterior:

Ramírez (24) y Medina y cols. (32) encontraron que el ACTF administrado por vía oral o subcutánea produce un retardo en el desarrollo de las cataratas en ratas galactosémicas.

Además, los resultados de un programa de tamizaje para la deficiencia de G-6-PD en pacientes diabéticos de Guadalajara y de Costa Rica, sugieren que la deficiencia de G-6-PD tipo A⁻ previene el desarrollo de cataratas (23,24). La G-6-PD A⁻ es una variante clase 3 con deficiencia enzimática moderada y las crisis hemolíticas son precipitadas por exposición a drogas y por infecciones (18).

Otro grupo de trabajo no encontró evidencia de que la deficiencia de G-6-PD protege contra la formación de cataratas en pacientes diabéticos originarios de Cerdeña (33). La G-6-PD Mediterraneo es una variante clase 2 con deficiencia enzimática severa y es común en la zona del Mediterraneo (18).

Resultados de varios estudios epidemiológicos en pacientes (no diabéticos) con cataratas preseniles o seniles muestran que en Tailandia la deficiencia de G-6-PD no es un factor de cataratogénesis (34); en otros países (Cerdeña y Turkia) la incidencia para la deficiencia de G-6-PD es mayor que en la población sin cataratas (35-37). Las variantes de G-6-PD más comunes en Tailandia son diferentes de las de Cerdeña y Turkia (4, 34).

El NADPH generado en la reacción catalizada por la G-6-PD,

también es necesario para mantener al glutati6n en estado reducido (GSH). El GSH es un compuesto importante involucrado en los mecanismos de defensa contra da6o oxidativo en los eritrocitos y en el cristalino (10,18). La falla para generar NADPH en cantidades adecuadas es la causa directa de hem6lisis de los eritrocitos G-6-PD deficientes (18). En el cristalino, los niveles de GSH disminuyen con la edad y con la formaci6n de cataratas (38). La disminuci6n en los niveles de GSH en cristalino tambi6n se ha observado en muchos tipos de cataratas experimentales, incluyendo las "cataratas por az6car", (38) y en cristalinos cataratosos de pacientes Sicilianos (no-diab6ticos) con deficiencia de G-6-PD (39). Adem6s, el tratamiento de ratas y ratones con butionina sulfoximina, un potente inhibidor de la bios6ntesis de GSH, conduce al desarrollo de cataratas, las cuales son prevenidas por tratamiento con glutati6n monoester (40,41). Sin embargo, la formaci6n de "cataratas por az6car" es iniciada por la s6ntesis excesiva de polioles catalizada por la Aldosa Reductasa (12) y la oxidaci6n no parece ser un factor contribuyente por lo menos en las primeras etapas de la cataratog6nesis (42).

Permanece por investigarse si la deficiencia de G-6-PD previene o retarda el inicio de las "cataratas por az6car" en humanos. Sin embargo, una deficiencia severa de G-6-PD podr6a ser un factor de riesgo para el desarrollo de cataratas por estr6s oxidativo. Asi mismo, con el prop6sito de contribuir al entendimiento de la relaci6n entre deficiencia de G-6-PD y cataratas, se requieren m6s estudios en pacientes y en modelos animales.

C O N C L U S I O N E S

De acuerdo a los objetivos formulados, las conclusiones del presente trabajo son las siguientes:

1. - Las CI_{50} para los tres inhibidores son:

	<u>ACTF</u>	<u>CLFC</u>	<u>DHEA</u>
Enzima de cristalino de rata	$1.77 \times 10^{-1} M$	$1.90 \times 10^{-3} M$	$8.51 \times 10^{-6} M$
Enzima de eritrocitos humanos	$1.04 \times 10^{-1} M$	$2.08 \times 10^{-3} M$	$5.49 \times 10^{-6} M$

2. - El análisis cinético mostró patrones de inhibición no competitiva para CLFC y ACTF y un patrón mixto uncompetitivo-no competitivo para DHEA.

3. - En cristalinos de rata incubados en glucosa 50mM, el CLFC (5.33mM) y el DHEA (142µM) tuvieron un efecto inhibitorio sobre los niveles de sorbitol de 55% y 49% respectivamente.

4. - En eritrocitos humanos de individuos normales solamente el CLFC tuvo un efecto inhibitorio (56%) significativo.

5. - Los eritrocitos de pacientes con la variante G-6-PD Guadalajara en estado hemicigoto y heterocigoto acumularon 40% y 76% de sorbitol respectivamente, versus los eritrocitos de individuos normales.

6. - Con base en los resultados obtenidos se concluye que la deficiencia de G-6-PD, inducida experimentalmente o transmitida genéticamente produce una inhibición significativa sobre la acumulación de sorbitol en células totales incubadas en glucosa 50mM. Dicha deficiencia enzimática podría prevenir o retardar el desarrollo de "cataratas por azúcar" en un modelo animal con diabetes o galactosemia, así como en pacientes con diabetes mellitus.

RESUMEN GENERAL DEL PROYECTO

La aldosa reductasa cataliza la reducción (NADPH-dependiente) de glucosa y galactosa a sorbitol y galactitol respectivamente, los cuales están involucrados en la patogénesis de las "cataratas por azúcar". En el cristalino, la reacción catalizada por la G-6-PD, es la fuente de NADPH.

La deficiencia de G-6-PD reduciría el suministro de NADPH, bloqueando la formación de alcoholes de azúcares y consecuentemente, prevendría o retardaría el inicio de las "cataratas por azúcar".

Para probar la hipótesis, evaluamos el efecto de la deficiencia de G-6-PD, inducida experimentalmente o transmitida genéticamente, sobre:

- a) La acumulación de sorbitol en células totales incubadas en glucosa 50mM (éste trabajo de tesis);
- b) La formación de "cataratas por azúcar" en un modelo de ratas galactosémicas (referencias 24 y 32).

Además, tamizamos para la deficiencia de G-6-PD en 249 pacientes diabéticos de Guadalajara y 31 pacientes diabéticos de Costa Rica (referencias 23 y 24). Los resultados encontrados apoyan la hipótesis.

Así, la deficiencia de G-6-PD inducida experimentalmente o transmitida genéticamente produjo una disminución significativa sobre la acumulación de sorbitol en cristalinos de rata y en eritrocitos humanos incubados en glucosa 50mM. En el modelo de ratas galactosémicas, la deficiencia de G-6-PD inducida

experimentalemnte con acetaminofen, retardó el desarrollo de cataratas.

Finalmente, los resultados del tamizaje para la deficiencia de G-6-PD en pacientes diabéticos sugieren que la deficiencia de G-6-PD tipo A⁻ previene el desarrollo de cataratas.

B I B L I O G R A F I A

1. - Beutler E. Energy metabolism and maintenance of erythrocytes. En: Hematology. W. J. Williams, E. Beutler, A. J. Erslev, M. A. Lichtman (editores). 4ª ed. McGraw Hill, New York, 1990. Pág. 355-368.
2. - Valentine W. N., Tanaka K. R., Paglia D. E. Piruvate Kinase and other enzyme deficiency disorders of the erythrocyte. En: The Metabolic Basis of Inherited Disease. Scriver Ch. R., Beaudet A. L., Sly W. S., Valle D. (editors). 6ª ed. McGraw Hill, New York, pág. 2341-2365, 1989.
3. - Vaca G., Velázquez A. L., Cantú J. M. Las eritroenzimopatias hereditarias. I. Aspectos bioquímicos y genéticos. Bol. of Sanit. Panam. 97:225-239, 1984.
4. - Luzzatto L., Mehta A. Glucose-6-phosphate dehydrogenase dificiency. En: The Metabolic Basis of Inherited Disease. Scriver Ch. R., Beaudet A. L., Sly W. S., Valle D. (editores). McGraw Hill, Nueva York, 1989. Págs. 2237-2265.
5. - Morrison A. D., Clements R. S., Travis S. F., Oski F., Winegrad A. I. Glucose utilization by the polyol pathway in human erythrocytes. Biochem. Biophys. Res. Comm. 40:199-205, 1970.
6. - Travis S. F., Morrison A. D., Clements R. S., Winegrad A. I., Oski F. A. Metabolic alterations in the human erythrocyte produced by increases in glucose concentration. The role of the polyol pathway. J. Clin. Invest. 50:2104-2112, 1971.

7. - Molinoff, M.S. Complications of chronic diabetes in man and their relation to hyperglycemia. En: Aldose reductase inhibition. An approach to the prevention of diabetic complications. Porte D. (editor). McGraw Hill, Nueva York, 1987. Págs. 3-68.
8. - Dvornick D. Hyperglycemia in the pathogenesis of diabetic complications. En: Aldose reductase inhibition. An approach to the prevention of diabetic complications. Porte D. (editor). McGraw Hill, Nueva York, 1987a. Págs. 73-151.
9. - Chylack L.T., Cheng H.M. Sugar metabolism in the cristalline lens. Surv. Ophtalmol. 23:26-34, 1978.
10. - Spector A. Aspects of the biochemistry of cataract. En: The Ocular Lens. Structure, Function and Pathology. Maisel H. (editor). Marcel Dekker, Nueva York, 1985. Págs. 405-438.
11. - Chylack L.T. : Mechanisms of senile cataract formation. Ophtalmology 91:596-602, 1984.
12. - Kinoshita J.H. Aldose reductase in the diabetic eye. Am. J Ophtalmol. 102:685-692, 1986.
13. - Kador P.F., Akagi Y., Kinoshita J.H. The effect of aldose reductase and its inhibition on sugar cataract formation. Metabolism 35:15-19, 1986.
14. - Dvornick D. Animal models of diabetic complications and their relation to aldose reductase inhibition. En: Aldose reductase inhibition. An approach to the prevention of diabetic complications. Porte D. (editor). McGraw Hill, Nueva York, 1987b. Págs. 154-219.

15. - Dvornick D. Aldose reductase inhibitors. En: Aldose reductase inhibition. An approach to the prevention of diabetic complications. Porte D. (editor). McGraw Hill, Nueva York, 1987c. Págs. 222-323.
16. - Kador P.F. The role of aldose reductase in the development of diabetic complications. Med. Res. Rev. 8:325-352, 1988.
17. - Raskin P., Rosenstock J.R. Aldose reductase inhibitors and diabetic complications. Am. J. Med. 83:298-306, 1987.
18. - Beutler E. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. En: The Metabolic Basis of Inherited Disease. Stanbury J. B., Fredrickson D. S., Goldstein J. L., Brown M. S., (editores). McGraw Hill, Nueva York, 1983. Págs. 1629-1653.
19. - Zinkham W.H. A deficiency of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in lens from individuals with primaquine sensitive erythrocytes. Bull. Johns Hopkins Hosp. 109:206-210, 1961.
20. - Jedziniak J. A., Chylack L. T., Cheng H. M., Gillis M. K., Kalustian A. A., Tung W. H. The sorbitol pathway in the human lens: aldose reductase and polyol dehydrogenase. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 20:314-326, 1981.
21. - Vargas E., Vaca G., Chávez Anaya E., Mendoza R., Ríos J., Ocampo R., García Maravilla S., Saenz G., Chávez M., Medina C., Arreola R., Cantú J.M. G-6-PD y cataratas por azúcar, presentación de una hipótesis de trabajo. VIII Cong. Nac. Genética Humana. 9-12 Noviembre, 1983. Morelia, Mich. Pág. 62. Libro de resúmenes.

22. - Vaca G., Medina C., Sánchez Corona J., Ibarra B., Cantú J.M. Estudio de los errores congénitos del metabolismo en poblaciones seleccionadas. En: Caminos en la Biología Fundamental. Martuscelli J., Palacios R., Soberón G. (editores). UNAM, México, 1984. Págs. 163-184.
23. - Vaca G., Chávez Anaya E., Mendoza R., Vargas E., Ríos J., Ocampo R., Medina C., Cantú J.M. Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-PD) deficiency prevents or delays sugar cataracts. Proceedings of the XXVth International Congress of Ophthalmology, Roma, Italia. 4-10 Mayo, 1986. Págs. 735-739, 1987.
24. - Ramírez M.G. Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y catarata por azúcar: una hipótesis de trabajo. Tesis de Maestría en Genética Humana, Universidad de Guadalajara, Febrero 1990.
25. - Marks P.A., Banks J. Inhibition of mammalian glucose-6-phosphate dehydrogenase by steroids. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 46:447-452, 1960.
26. - González R., Estrada M., García M., Gutiérrez A. G-6-PD Ciudad de la Habana: a new slow variant with deficiency found in a cuban family. Hum. Genet. 55: 133-135, 1980.
27. - Beutler E. Red Cell Metabolism. A Manual of Biochemical Methods. Grune and Stratton, Nueva York, 1975.
28. - Poli T., Lapolla A., Valerio A., Fedele D. Plasma and red cell sorbitol assay in diabetic subjects. Acta Diabetol. Lat. 22:17-23, 1985.

29. - Aida K., Tawata H., Shindo H., Onaya T., Sasaki H., Nishimura H., Chin M., Mitsuhashi H. The existence of aldose reductase inhibitors in some Kampo medicines (oriental herb prescriptions). *Planta Medica* 55:22-26, 1989.
30. - Kennedy A., Frank R.N., Varma S.D. Galactitol accumulation by glucose-6-phosphate deficient fibroblasts: a cellular model for resistance to the complications of diabetes mellitus. *Life Sciences* 33:1277-1283, 1983.
31. - Beutler E., Guinto E. The reduction of glyceraldehyde by human erythrocytes. L-hexonate dehydrogenase activity. *J. Clin. Invest.* 53:1258-1264, 1974.
32. - Medina M.D., Ramírez M.G., Mendoza R., Chávez Anaya E., Vargas M., Medina C., Valdovinos M.P., Vaca G. Efecto de la deficiencia de G-6-PD inducida experimentalmente sobre el desarrollo de cataratas galactosémicas. Modelo in vivo. XV Cong. Nac. Genética Humana. Jalapa, Ver. 14-17 de Noviembre de 1990. Pág. 84. Libro de resúmenes.
33. - Orzalesi N., Fossarello M., Sorcinelli R., Schlich U. The relationship between glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and cataracts in Sardinia (Italy). An epidemiological and biochemical study. *Doc. Ophthalmol. Mol.* 57:187-202, 1984.
34. - Panich V., Na-Nakorn S. G-6-PD deficiency in senile cataracts. *Hum. Genet.* 55:123-124, 1980.
35. - Orzalesi N., Sorcinelli R., Guiso G. Increased incidence of cataracts in male subjects deficient in glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Arch. Ophthalmol.* 99:69-70, 1981.

36. - Yüreguir G., Varinli I., Donma O. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency both in red blood cells and lenses of the normal and cataractous native population of Cukurova, the Southern part of Turkey. *Ophthalmic Research* 21:155-157, 1989.
37. - Yüreguir G., Varinli I., Donma O. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency both in red blood cells and lenses of the normal and cataractous native population in Cukurova, the Southern part of Turkey. *Ophthalmic Research* 21:158-161, 1989.
38. - Cheng H.M., vonSaltza I., González R.G., Ansari N.H., Srivastiva S. Effect of glutathione deprivation on lens metabolism. *Exp. Eye res.* 39:355-364, 1984.
39. - Mollica F., LiVolt S., Vanella A., Collura M. Activity and GSH content in cataractous lens of patients with and without G-6-PD deficiency. VI Meeting of international society of Genetic Eye Disease. 1-3 May, 1986. Amsterdam, Holand. Pág. 54. Book of Abstracts.
40. - Calvin H.I., Medvedovsky C., Worgul B.V. Near total glutathione depletion and age specific cataracts induced by buthionine sulfoximine in mice. *Science* 233:553-555, 1986.
41. - Martensson J., Steinherz R., Jain A., Meister A. Glutathione ester prevents buthionine sulfoximine induced cataracts and lens epithelial cell damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 8727-8731, 1989.
42. - Chand D., El-Aguizy H.K., Richards R.D., Varma S.D. Sugar catartacts in vitro: implications of oxidative stress and aldose reductase I. *Exp. Eye Res.* 35:491-497, 1982.

A P E N D I C E 1

TIPOS DE INHIBIDORES.

INHIBIDORES COMPETITIVOS. - Sustancias (usualmente relacionadas estructuralmente con el sustrato) que se combinan con una enzima en el mismo sitio que el sustrato. El inhibidor y el sustrato compiten por el mismo sitio formando complejos enzima-inhibidor y enzima-sustrato respectivamente. No se forman complejos enzima-sustrato-inhibidor. Este tipo de inhibición es completamente revertido por elevadas concentraciones de sustrato y en la gráfica de Lineweaver-Burk se obtienen aparentes constantes de Michaelis que son mayores que las constantes de Michaelis en ausencia del inhibidor.

INHIBIDORES NO-COMPETITIVOS. - Sustancias que se combinan con la enzima o con el complejo enzima-sustrato. En este caso se forman 3 complejos enzima-sustrato, enzima-inhibidor y enzima-sustrato-inhibidor y de éstos solamente el complejo enzima-sustrato forma productos de reacción. Este tipo de inhibición no es completamente revertido por elevadas concentraciones de sustrato pero en las gráficas de Lineweaver-Burk se obtienen constantes de Michaelis idénticas a las que se encuentran en ausencia de inhibidor.

INHIBIDORES UNCOMPETITIVOS. - Sustancias que solamente se combinan con el complejo enzima-sustrato y no con la enzima libre. En este tipo de inhibición solo se forman dos complejos: enzima-sustrato y enzima-sustrato-inhibidor. Este tipo de inhibición no es completamente revertido por elevadas

concentraciones de substrato y en las gráficas de Lineweaver-Burk se obtienen constantes de Michaelis menores que las encontradas en ausencia de inhibidor. *

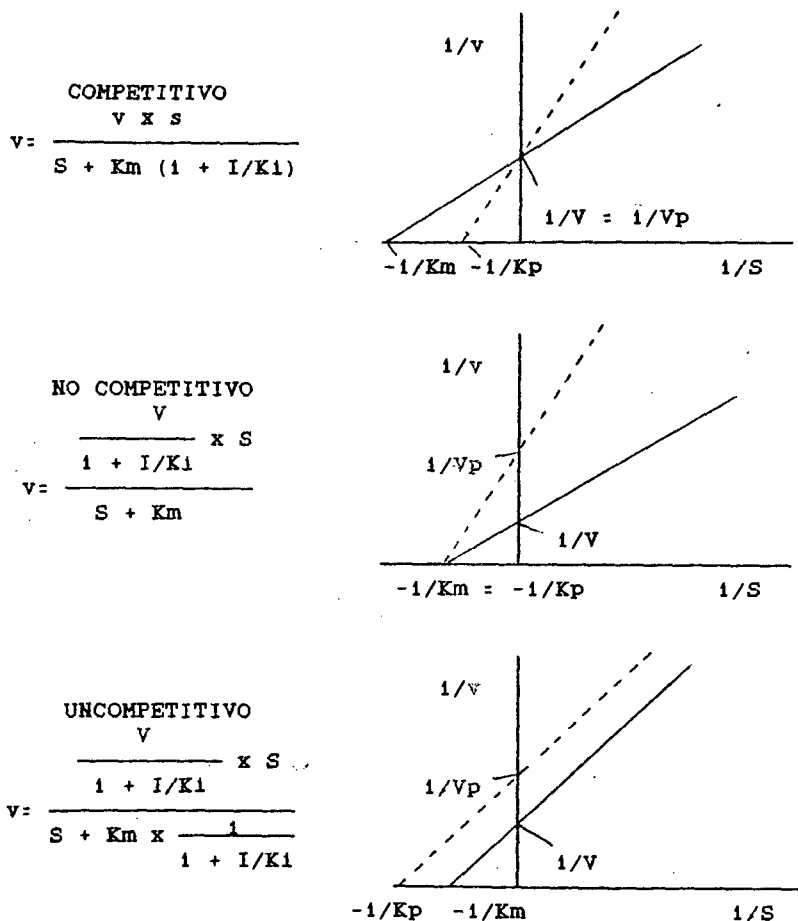


Fig. 11 Efecto de los tres tipos principales de inhibidores sobre las gráficas de Lineweaver-Burk. (— en ausencia de inhibidor; ---- en presencia de inhibidor; I: concentración de inhibidor; Kp= Km aparente en presencia de inhibidor; Vp= V en presencia de inhibidor).

* Barman E. Th. Enzyme Handbook. Volumen 1 Springer-Verlag. Segunda Edición 1985.

A P E N D I C E 2

ACTF: Es un analgésico y antipirético. Se absorbe rápidamente enseguida de su administración oral. Se conjuga con glucurónido y sulfato; ambos conjugados y parte de la droga no conjugada (menos del 10%) se excretan en la orina. En sobredosis el ACTF puede causar necrosis hepática (1).

CLFC. - Inhibe el crecimiento de múltiples bacterias gram-positivas y gram-negativas y de rickettsias. Es efectivo cuando se administra por vía oral o intravenosa. Puede producir depresión de la médula ósea con neutropenia, agranulocitosis o en los casos más severos anemia aplásica. No debe de usarse para infecciones triviales o para profilaxis. Debe de usarse sólo cuando su uso esté claramente indicado en infecciones severas (1).

DHEA. - Es un intermediario en la biosíntesis y metabolismo de esteroides. Es un producto de secreción endógena originado principalmente en la corteza adrenal y su derivado sulfatado (DHEA-S) es el esteroide más abundante en orina y plasma en humanos. Es débilmente androgénico y estrogénico.

Los niveles de DHEA y DHEA-S disminuyen marcadamente con la edad en ambos sexos. Se ha sugerido la posibilidad, apoyada por estudios epidemiológicos, de que los bajos niveles de DHEA y DHEA-S podrían estar relacionados con el desarrollo de enfermedades asociadas con el envejecimiento

tales como cáncer y arteroesclerosis.

La administración de DHEA produce un amplio espectro de efectos biológicos en animales:

- a) disminuye la incidencia de tumores espontáneos y de tumores inducidos por carcinógenos en roedores.
- b) inhibe la síntesis de DNA y la proliferación celular de células animales en condiciones basales y de estimulación con mitógenos.
- c) inhibe la lipogénesis.
- d) disminuye la ganancia de peso sin afectar el consumo de alimento.
- e) mejora la severidad de la diabetes genética en ratones.
- f) retarda las enfermedades autoinmunes asociadas con el envejecimiento.
- g) inhibe la aterogénesis en conejos.

Diversas evidencia experimentalles indican que por lo menos algunos de los efectos del DHEA son mediados a través de la inhibición de la G-6-PD. (Para una revisión general ver referencia 2). Además, la deficiencia de G-6-PD, inducida experimentalmente con DHEA o transmitida genéticamente, protege a fibroblastos humanos contra la transformación in vitro inducida con benzopireno. La activación metabólica de este carcinógeno requiere NADPH (3).

BIBLIOGRAFIA DEL APENDICE 2

1. - The Merck Manual of Diagnosis and Therapy. Thirteenth Edition, 1977. Pág. 1843-1844 y pág. 1979.
2. - Gordon G.B., Shantz L.M., Talalay P.: Inhibitory effects of dehydroepiandrosterone on cell proliferation, differentiation, and carcinogenesis: role of glucose-6-phosphate dehydrogenase. En: Hormones, Thermogenesis and Obesity. Lardy H.A. and Stratman F. (eds.) (Elsevier, New York, 1989). Pág. 339-354.
3. - Feo F., Pirisi L., Pascale R., Daino L., Frassetto S., Garcea R., Gaspa L. : Modulatory effect of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency on benzo(a)pyrene toxicity and transforming activity for in vitro cultured human skin fibroblasts. Cancer Res. 44: 3419-3425, 1984.

I N D I C E

INTRODUCCION

Metabolismo de la glucosa en eritrocito	2
Metabolismo de la glucosa en cristalino	6
Metabolismo del glutati3n en el eritrocito y en el cristalino	10
Epidemiologfa de las cataratas	11
Vfa del sorbitol y mecanismo de formaci3n de cataratas por az3car	12
Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G-6-PD)	14
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	16
HIPOTESIS	17
OBJETIVOS	18
MATERIAL Y METODOS	
Evaluaci3n del efecto de los inhibidores sobre la actividad de G-6-PD	19
Estudios en c3lulas totales <u>in vitro</u>	
Cristalinos	21
Eritrocitos	21
RESULTADOS	
Inhibici3n de la G-6-PD (de cristalino de rata y de eritrocitos humanos)	24
Acumulaci3n de sorbitol en tejidos incubados (cristalino de rata, eritrocitos normales y eritrocitos G-6-PD deficientes)	30
DISCUSION	34
CONCLUSIONES	38
RESUMEN GENERAL DEL PROYECTO	40
BIBLIOGRAFIA	42

APENDICE 1

Tipos de inhibidores 48

APENDICE 2

ACTF 50

CLFC 50

DHEA 50

ESTE PROYECTO FUE FINANCIADO PARCIALMENTE
POR CONACYT A TRAVES DEL DONATIVO
P 219 CCOL 881173.

Y POR UNA BECA-CREDITO CON REGISTRO
61649 ACTA NUM BA90163.