

03068

18

25



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

UNIDAD ACADEMICA DE LOS CICLOS PROFESIONALES DE POSGRADO DEL COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES.

"ALTERACIONES EN LA RETINA Y EN LA PERMEABILIDAD DEL EPITELIO PIGMENTARIO DE LA RETINA EN UN MODELO DE DIABETES EXPERIMENTAL INDUCIDO POR ESTREPTOZOTOCINA"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS FISIOLÓGICAS

PRESENTA LA BIÓLOGA

MARIA DEL CARMEN VILCHIS QUINTERO



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 está 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.

*Este trabajo se realizó en el Departamento de Neurociencias
del Instituto de Fisiología Celular
de la Universidad Nacional Autónoma de México,
bajo la dirección de la Dra. Rocío Salceda S.
Con el apoyo del sistema de Becas de la D.G.A.P.A.,
U.N.A.M., y del CONACyT., SEP.*

Agradezco a:

La Dra. Rocio Salceda S.

*por su amistad, calma y apoyo que me brindó durante
la realización de esta tesis.*

A los Dres.:

Victoria Chagoya de Sánchez

Mauricio Díaz Muñoz

Rolando Hernández Muñoz

Gonzalo Martínez de la Escalera

Sinodales de este trabajo.

Agradezco a:

Jorge Sepulveda
Rodolfo Paredes
Federico Jandete

por su ayuda en la
microscopía

Dedico esta tesis:

A mis padres y hermanos

por darme el apoyo durante el desarrollo de mis estudios.

A los amigos de siempre.

*Mercedes, Refugio, Ricardo, Sergio, Mónica Salas, Mónica Romo,
Elizabeth, Alejandro, Gustavo, Jorge, Victor, Estuardo, Daniel,
Maricela, Naty, Jorge Flores, Lochill, Alejandra y Arturo.*

INDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCION	
LA RETINA	
Estructura y Función.....	2
EPITELIO PIGMENTARIO	
Estructura	10
Función	13
RETINOPATIA DIABETICA	
Retinopatía.....	18
OBJETIVO.....	24
METODOS	
Materiales y métodos.....	25
RESULTADOS	
Acumulacion de Fluoreceína.....	32
Microscopia Electrónica.....	32
Acumulación de aminoácidos.....	33
Niveles Endógenos de aminoácidos.....	34
Actividad de la ATPasa Na ⁺ -K ⁺	34
Unión de ouabina.....	35
Acumulación de glucosa.....	36
Niveles de lactato y piruvato.....	38
Actividad de la LDH.....	40
Figuras y Gráficas.....	41
DISCUSION	58
CONCLUSIONES	69
BIBLIOGRAFIA.....	70

RESUMEN.

La retina requiere de una gran cantidad de oxígeno y nutrientes que obtiene del flujo sanguíneo. El Epitelio Pigmentario de la Retina (EPR), forma parte de la barrera hematorretiniana y regula el flujo de iones y metabolitos de la coroides hacia la retina.

En la diabetes mellitus, el EPR presenta varias alteraciones, que comprenden el rompimiento de uniones estrechas y aumento en la superficie de la membrana basal (Kirber, 1980; Davis, 1990). Estos cambios en la estructura del EPR modifican su función, permitiendo el paso libre de moléculas que pueden ser tóxicas para la retina, lo que puede jugar un papel importante en la retinopatía diabética.

Con el objetivo de identificar si la permeabilidad del EPR participa en la etiología de la retinopatía diabética, estudiamos el transporte de aminoácidos, de glucosa y de iones, en la retina y el EPR de animales tratados con estreptozotocina. Asimismo, medimos los niveles de algunos parámetros de regulación metabólica como es el estado redox del citosol de la célula.

La retina de animales tratados con estreptozotocina mostraron alteraciones en la estructura de las células fotorreceptoras de la retina y de la membrana apical del EPR. Asociados a dichos cambios, se encontró una disminución en la acumulación de ácido aspártico tanto en la retina como en el ERP. La acumulación de taurina y GABA aumento en ambos tejidos. El transporte de glucosa en la retina de animales diabéticos disminuyó, y en presencia de insulina se observó un incremento.

La relación lactato/piruvato aumentó en la retina de animales diabéticos, mientras que en el EPR disminuyó. Las alteraciones en la relación NADH/NAD sugieren cambios energéticos y un posible incremento de radicales libres que en conjunto pueden modificar la permeabilidad y función general del EPR y la retina, los que conllevan a la retinopatía diabética.

INTRODUCCION.

La visión es considerada como uno de los procesos sensoriales más importantes en los mamíferos. El primer paso en el fenómeno visual es la transducción de la luz en un impulso nervioso, que posteriormente se transmite por medio del nervio óptico hacia los centros superiores de integración. La transducción de la luz en un impulso eléctrico se lleva a cabo en la retina.

La retina es el órgano fotosensible que se encuentra ubicado en el fondo del globo ocular, su superficie distal está en contacto con el epitelio pigmentario de la retina (EPR), el cual se encuentra junto a la coroides y su superficie proximal en contacto con el humor vítreo, del cual se separa por medio de una membrana limitante interna (Farber y Adler, 1986) (fig. 1).

RETINA: ESTRUCTURA Y FUNCION.

Estructural y funcionalmente la retina está formada por 2 componentes; el epitelio pigmentario de la retina (EPR) y la retina neural propiamente dicha.

La retina neural es una extensión periférica del cerebro que consiste esencialmente de 6 tipos de neuronas: fotorreceptores, células horizontales, bipolares, amacrinas, interplexiformes y ganglionares, las cuales presentan una organización laminar. Los fotorreceptores se encuentran en contacto con el EPR, sus segmentos externos forman la capa fotorreceptora y sus somas forman la capa nuclear externa. En la capa plexiforme externa, las terminales de los fotorreceptores forman contactos sinápticos con las células horizontales y bipolares. Los somas de éstas, junto con los de las

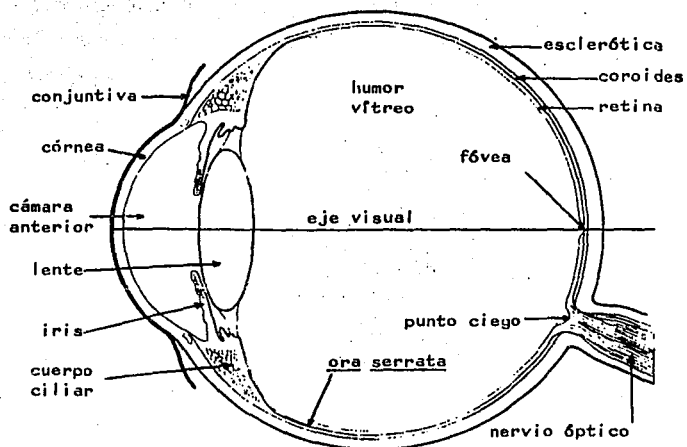


Figura 1. Diagrama de la sección transversal del ojo de los vertebrados (Farber y Adler, 1986).

células interplexiformes y amacrinas, forman la capa nuclear interna. La capa plexiforme interna está formada por las sinápsis de las células bipolares, amacrinas y ganglionares. Las células ganglionares se encuentran en el margen interno de la retina y sus axones constituyen el nervio óptico (fig. 2) (Dowling, 1966).

El impulso nervioso que se genera en los fotorreceptores es transmitido en sentido vertical a través de las células bipolares y ganglionares, hasta salir por el nervio óptico hacia los centros superiores de integración. El impulso es modulado en sentido horizontal por las interneuronas inhibitorias horizontales y amacrinas (Dowling, 1966).

Otro tipo celular en la retina son las células gliales de Müller, las cuales se extienden desde la superficie vítreo hasta la capa de los fotorreceptores, en donde sus prolongaciones apicales se conectan con estos y forman la membrana limitante externa ; sus procesos basales forman la membrana limitante interna, que aísla a las neuronas del humor vítreo. Las células de Müller participan en el control extracelular de los niveles de potasio y en la eliminación de los neurotransmisores del espacio sináptico (Hertz, 1976; Barbour et al., 1988)

La presencia de un estímulo luminoso produce en la retina una respuesta eléctrica negativa rápida (onda a) correspondiente a la hiperpolarización de los fotorreceptores, posteriormente se genera una onda positiva lenta (onda b) propia de las células de la capa interna y la onda c que corresponde a la actividad del EPR (Brown, 1968).

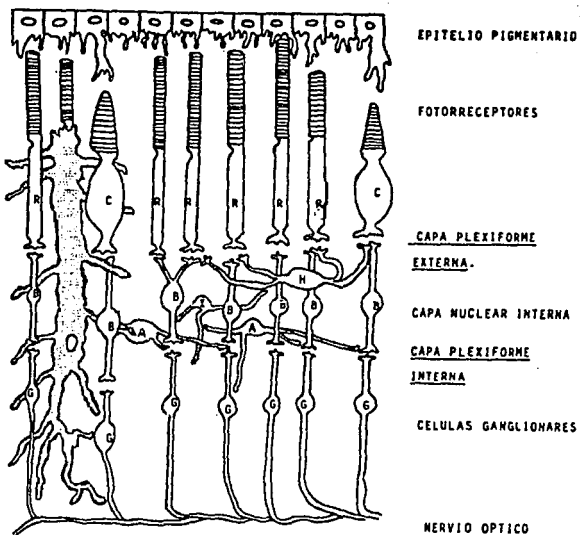


Figura 2. Diagrama de las capas de la retina y sus relaciones sinápticas. Los principales tipos celulares se designan como: R, bastones; C, conos; H, células horizontales; B, células bipolares; A, células amacrinas; G, células ganglionares; I, células interplexiformes; M, células de Muller.

En la retina, la luz actúa sobre la rodopsina, proteína que se encuentra embebida en las membranas de los segmentos externos de los fotorreceptores, lo que induce la isomerización de este pigmento. Este cambio lleva a la activación de la transducina o proteína G, la cual intercambia GTP por GDP en una de sus subunidades. La transducina activa a su vez a la fosfodiesterasa, enzima que hidroliza al guanosin monofosfato cíclico (GMPC). La disminución en los niveles de éste conduce a un aumento en la resistencia de la membrana y una disminución en la entrada de iones sodio, causando así una hiperpolarización (Tomita, 1970; Baylor y Lamb, 1979; Korenbrot, 1972 y Sillman y col., 1969).

En la obscuridad, los fotorreceptores presentan altas concentraciones de GMPC, el cual se une a los canales de sodio localizados en la membrana del segmento externo, permitiendo así la entrada de Na^+ , lo que crea un flujo continuo de corriente conocida como corriente oscura, la cual despolariza al fotorreceptor (Fesenko, 1986). Esta despolarización provoca la liberación del neurotransmisor en la terminal del fotorreceptor (Nakatami y Yau, 1985) (fig. 3).

En la retina, como en todo el sistema visual, las células responden en función de sus campos receptivos. Así una población específica de fotorreceptores cuya respuesta a la luz altera el comportamiento de cualquier neurona subsecuente en la cadena de información visual, constituye el campo receptivo de dicha neurona (Granit, 1947, Kufler 1953). Las células bipolares a las que los fotorreceptores transmiten son de 2 tipos, las que responden a la luz hiperpolarizándose (bipolares Off) y las que con el mismo

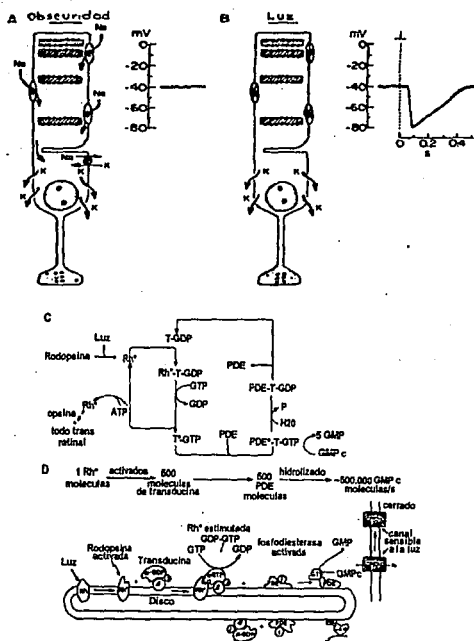


Figura 3. Mecanismo de la fototransducción: (A) Corriente oscura, entrada de iones sodio. (B) Proceso de transducción, los canales sensibles a luz se cierran. (C) Cascada de la rodopsina. (D) Estados de amplificación y (E) Cascada de nucleótidos como proteínas integrales y periféricas de la membrana de los discos del fotorreceptor.

estímulo se despolarizan (bipolares On) (Kaneko, 1973). Se ha demostrado que las células bipolares On forman contactos sinápticos con las células ganglionares despolarizantes On; mientras que las Off activan células ganglionares hiperpolarizantes Off. Existe un tercer tipo de células ganglionares que reciben señales de ambos tipos de células bipolares (On-Off) (Murakami, et al. 1975). Asumiendo que todas las células fotorreceptoras liberan un mismo transmisor, diferentes características en los receptores sinápticos son necesarias para explicar las diferentes respuestas en las células bipolares.

En la retina al igual que en el cerebro, la transmisión es preferentemente de tipo químico, mediada por neurotransmisores. Un neurotransmisor es considerado como una sustancia que es sintetizada y liberada de las terminales sinápticas de la neurona presináptica. Esta sustancia difunde a través de la hendidura sináptica y entonces se une a un receptor específico, localizado en la membrana de la célula postsináptica. La unión del neurotransmisor al receptor provoca una respuesta electrofisiológica que típicamente tiene un inicio rápido y corta duración. La acción del neurotransmisor es terminada por degradación enzimática o por su recaptura en la terminal presináptica (Werman, 1966).

Ninguna sustancia ha sido plenamente identificada como neurotransmisor en la retina; sin embargo, existen evidencias que indican que los aminoácidos glutamato y aspartato, probablemente son neurotransmisores excitadores en las células fotorreceptoras, bipolares y ganglionares (Miller et al. 1982; Miller y Schwartz,

1983). Por otro lado, diversas evidencias indican que el ácido *r*-aminoabutrítico (GABA) puede funcionar como neurotransmisor inhibitorio de las células horizontales y amacrinas (Murakami, 1978; Yazulla, 1983). En las células amacrinas se han propuesto como neurotransmisores una gran variedad de sustancias tales como la glicina (Voaden, 1977), acetilcolina (Vogel, 1977), dopamina (Redburn, 1979) y varios neuropeptidos, entre los cuales estan la sustancia P, neurotensina y colecistoquinina (Li, et al. 1986; Watt, et al. 1985; Stone, 1987). En las células interplexiformes los neurotransmisores propuestos son la dopamina y la glicina (Dowling y Ehinger, 1978; Marc, Lam y Stell, 1979).

Las células de la retina son altamente diferenciadas y no tienen la capacidad de dividirse, por lo que cualquier daño producido en ellas es irreparable y puede llevar a una pérdida irreversible de la visión.

La retina requiere para su funcionamiento de un enorme suministro de oxígeno, glucosa y otros nutrientes, los cuales adquiere de la vía sanguínea. La retina es alimentada por dos sistemas de vasos sanguíneos: las capas internas son alimentadas por la circulación retiniana y la vena central de la retina (Kuwabara, 1969). Los vasos de la coroides nutren al EPR, este sistema está constituido por coriocapilares fenestrados cuyo diámetro es amplio, lo que permite un flujo fácil de la sangre. En la retina existe un sistema de barrera vascular análogo al sistema de barrera hematocerebral formado por las células endoteliales de los vasos de la arteria retiniana y por las células del EPR (Cunha-Vaz, 1980).

1983). Por otro lado, diversas evidencias indican que el ácido γ -aminoabútrico (GABA) puede funcionar como neurotransmisor inhibitorio de las células horizontales y amacrinas (Murakami, 1978; Yazulla, 1983). En las células amacrinas se han propuesto como neurotransmisores una gran variedad de sustancias tales como la glicina (Voaden, 1977), acetilcolina (Vogel, 1977), dopamina (Redburn, 1979) y varios neuropeptidos, entre los cuales están la sustancia P, neurotensina y colecistoquinina (Li, et al. 1986; Watt, et al. 1985; Stone, 1987). En las células interplexiformes los neurotransmisores propuestos son la dopamina y la glicina (Dowling y Ehinger, 1978; Marc, Lam y Stell, 1979).

Las células de la retina son altamente diferenciadas y no tienen la capacidad de dividirse, por lo que cualquier daño producido en ellas es irreparable y puede llevar a una pérdida irreversible de la visión.

La retina requiere para su funcionamiento de un enorme suministro de oxígeno, glucosa y otros nutrientes, los cuales adquiere de la vía sanguínea. La retina es alimentada por dos sistemas de vasos sanguíneos: las capas internas son alimentadas por la circulación retiniana y la vena central de la retina (Kuwabara, 1969). Los vasos de la coroides nutren al EPR, este sistema está constituido por coriocapilares fenestrados cuyo diámetro es amplio, lo que permite un flujo fácil de la sangre. En la retina existe un sistema de barrera vascular análogo al sistema de barrera hematocerebral formado por las células endoteliales de los vasos de la arteria retiniana y por las células del EPR (Cunha-Vaz, 1980).

El funcionamiento de la retina depende fundamentalmente de la actividad de las células fotorreceptoras, la estructura y función de éstas depende a su vez, de la continua síntesis y degradación del segmento externo de los mismos.

EPITELIO PIGMENTARIO DE LA RETINA: ESTRUCTURA Y FUNCION.

El epitelio pigmentario de la retina (EPR), está constituido por una monocapa de células neuroepiteliales interpuestas entre los capilares de la coroides y los fotorreceptores de la retina neural. Las células del EPR presentan polaridad en su membrana plasmática, distinguiéndose así dos superficies: la membrana apical y la basolateral. Dicha polaridad se mantiene debido a la presencia de uniones estrechas localizadas en la superficie lateral formando un cinturón conocido como barra terminal (Shakib y Cunha-Vaz, 1966) (fig. 2)

Estas uniones estrechas constituyen una barrera que limita el intercambio de sustancias potencialmente tóxicas entre la circulación coroidal y la retina neural (Steinberg y Miller, 1979). Además se ha observado la presencia de desmosomas y de uniones comunicantes, lo cual sugiere la existencia de un acoplamiento eléctrico entre las células (Davson, 1980).

El EPR sintetiza la lámina basal, conocida como membrana de Bruch, estructura compuesta que separa la membrana plasmática del EPR de la coroides. Está constituida por una zona de colágena interna, una capa elástica intermedia, una capa de colágena externa y la lámina basal de los capilares de la coroides (Clark, 1986; Zinn y Benjamin-Hendkind, 1979). La membrana de Bruch, contiene

espacios en la zona de colágeno y zonas elásticas, sirve de soporte y evita el desprendimiento de las células del EPR (Caldwell, 1987). Se ha sugerido que el depósito y acumulación de materiales residuales en esta lámina basal puede originar procesos patológicos, tales como la generación de drusas (Kornzweig, 1979; Zinn y Benjamín-Hendkind, 1979).

La superficie apical de las células está orientada hacia el espacio subretiniano y está en íntimo contacto con la retina neural a través de microvellosidades largas, que están situadas entre los segmentos externos de los fotorreceptores (Zinn y Benjamín-Henkind, 1979). Estas microvellosidades contienen retículo endoplásmico liso y gránulos de melanina (Zinn y Benjamín-Hendkind, 1979; Matsumoto, et al. 1987).

Las células del EPR son ricas en organelos. Su citoplasma contiene un núcleo localizado en la porción basal de la célula, presenta numerosas mitocondrias y lisosomas, gránulos de melanina, fagosomas, aparato de Golgi y un retículo endoplásmico liso profuso. Además, se ha observado la presencia de cuerpos mieloides, que son una especialización del retículo endoplásmico, que se asocian al núcleo y a gotas de aceite, por lo que se ha sugerido que pueden participar en el metabolismo de lípidos (Porter and Yamada, 1960) (fig. 4).

Las células del EPR se caracterizan por un activo metabolismo oxidativo. Se conoce que los requerimientos energéticos para llevar a cabo sus funciones son provistos por la oxidación de la glucosa en el ciclo de Krebs (Young y Bok, 1979; Masterson,

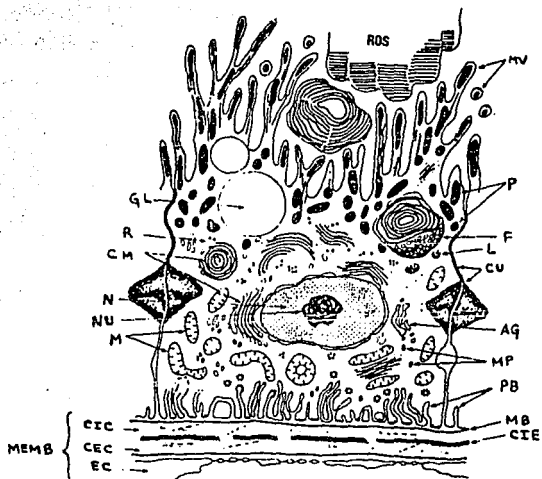


Figura 4. Diagrama de una célula del epitelio pigmentario de la retina. AG, aparato de golgi; CEC, capa externa de colágena; CIE, capa intermedia de colágena; CIE, capa intermedia elástica; CM, cuerpos mieloides; CU, complejos de unión; EC, endotelio de los coriocapilares; F, fagosoma; GL, gota de lípidos; L, lisosoma; M, mitocondria; MB, membrana basal; MEMB, membrana de Bruch; MP, microperoxisoma; MV, microvellosidades; N, núcleo; P, gránulos de pigmento; ROS, segmentos externos de los bastones (Nguyen-Legros; 1978).

1978).

El EPR lleva a cabo una gran variedad de funciones, dentro de las cuales está la captación, almacenaje y movilización del retinol derivado de la vitamina A. La vitamina A proveniente de la dieta, es metabolizada por el hígado formando retinol. El retinol es transportado asociado a una proteína específica del suero (Clark, 1986; Berman, 1979; Young y Bok, 1979). El retinol deja la corriente sanguínea de los capilares de la coroides, vía las fenestraciones de las células endoteliales; atravesando por difusión la membrana de Bruch. Una vez que el retinol llega al EPR, se une a una proteína específica localizada en la membrana basolateral (Young y Bok, 1979; Clark, 1986). En el EPR, el retinol es convertido a 11-cis-retinaldehído y es transportado a las células fotorreceptoras, donde se incorpora a la rodopsina (Zimmerman, 1975; 1976).

Las células del EPR son capaces de almacenar el retinol en forma de éster. Los ésteres consisten principalmente de isómeros de palmitato, esterato y oleato (Bridges et al. 1982) y el principal sitio de almacenamiento está en los microsomas en algunas especies y en gotas de aceite en otras. La cantidad, así como el sitio de almacenamiento de estos en el EPR varía ampliamente en las diferentes especies y los niveles absolutos dependen del estado de adaptación a la luz o a la obscuridad. Las ratas adaptadas a la obscuridad almacenan retinoides en pequeñas cantidades (Dowling, 1960; Zimmerman, 1974; Alvarez et al. 1981); sin embargo en ratas adaptadas a la luz, virtualmente toda la vitamina A es almacenada en forma éster.

Por otra parte se conoce que en algunas especies el EPR participa en la adaptación de los fotorreceptores a la luz y la obscuridad a través del movimiento de granulos de pigmento a lo largo de las microvellosidades apicales. Dichos granulos conocidos como melanosomas contienen grandes cantidades de melanina, la cual juega un papel importante en atrapar el exceso de luz que llega a la retina, favoreciendo la formación de una imagen definida. En los vertebrados, la melanina se forma a partir de tirosina, por la acción catalítica de la enzima tirosinasa. El primer paso en la biosíntesis de melanina involucra la oxidación de la tirosina a 3,4-dihidroxifenilalanina (DOPA), por medio de la tirosinasa, misma que cataliza la oxidación de DOPA a una serie compleja de intermediarios, resultando en la síntesis de dos tipos de melanina: las feomelaninas y las eumelaninas (fig. 5) (Dryja, et al., 1978; Basu, et al., 1983).

Asimismo, el EPR participa en el proceso de renovación del segmento externo del fotorreceptor. Los discos apicales de los segmentos externos de los fotorreceptores son continuamente fagocitados por el EPR, y degradados en los lisosomas. Los residuos no digeridos forman cuerpos residuales y/o gránulos de lipofucsina. Paralelamente, en la región basal del segmento externo del fotorreceptor se adicionan discos membranosos recién sintetizados. Alteraciones en la actividad fagocítica del EPR puede causar la degeneración de los fotorreceptores y la pérdida de la función visual (Besharse, et al., 1983).

Además, el EPR junto con los otros elementos de la barrera hematorretiniana, mantiene el microambiente normal retiniano, a

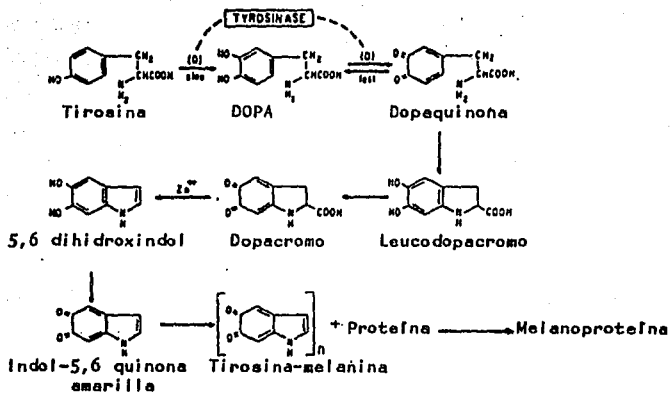


Figura 5. Ruta de síntesis de la melanina en el EPR.

través del transporte de agua (Miller, 1982) y de iones sodio, cloro, bicarbonato, potasio, calcio y magnesio, transportandolos en dirección retina-coroides (Bito y De Roussean, 1980; Wiederholt y Zadunaisky, 1984).

En el EPR, se ha reportado el transporte de metabolitos, tales como la glucosa, de la cual se encontró un flujo neto de la coroides hacia la retina, a través de un mecanismo mediado por un acarreador (Pascuzzo, et al. 1980; Masterson y Chader, 1981; Crosson y Pautler, 1982). Además este sistema de transporte muestra preferencia estereoespecífica por D-glucosa. Existe también un sistema de transporte mediado por acarreador, de ácidos monocarboxílicos de cadena corta, el cual incrementa la permeabilidad de la barrera a lactato, al piruvato y el β -hidroxibutirato. Estos acarreadores parecen facilitar la pérdida de lactato de la retina cuando su producción excede los mecanismos enzimáticos para eliminarlo (Tonquist, 1979). Por otro lado se conoce que el mio-inositol, necesario para el recambio de fosfatidilinositol, se acumula por dos sistemas de transporte, uno de alta y otro de baja afinidad (Khatami, 1987). Asimismo, existe un sistema de cotransporte del ácido ascórbico con sodio, a través de este epitelio (Khatami, 1986).

Particularmente interesante es el transporte de algunos neurotransmisores y de sus precursores a través del EPR. Se ha observado que la dihidroxifenilalanina (DOPA), histidina y triptófano son transportados por sistemas específicos (Cunha-Vaz, 1980).

De la misma manera, se ha observado el transporte a través de este tejido, de los aminoácidos lisina, leucina, serina y tirosina, hacia la coroides (Sellnar y Mosland, 1983). Estudios autorradiográficos demostraron que la taurina llega a la retina a través del EPR (Lake, N. 1977). Evidencias adicionales, demostraron la existencia de un mecanismo activo de captación de taurina en células del EPR en cultivo (Edwards, 1977), en el EPR de la rata (Salceda y Saldaña, 1993), y en el EPR de la rana con un flujo neto de la retina hacia la coroides (Miller y Steinberg, 1976).

Los aminoácidos glutamato y aspartato, por otra parte, son transportados a través de la membrana del EPR en dirección retina-coroides, flujos que son modificados por las concentraciones externas de los iones Na^+ , K^+ y Ca^{2+} (Pautler y Tengerdy, 1986).

En la superficie apical de las células del EPR se localiza la ATPasa Na^+-K^+ , cuya actividad es consistente con los flujos de sodio en dirección hacia la retina, y es reponsable de un transporte activo del ión potasio a través del EPR (Ostwald y Steinberg, 1980).

De esta manera, la participación del EPR en el funcionamiento de la retina es evidente, de tal manera que cualquiera de las actividades del EPR que se altere, puede llevar a alteraciones en las células fotorreceptoras y ceguera en el área afectada. El EPR parece estar involucrado en una variedad de enfermedades de la retina y coroides, tales como la degeneración macular, desprendimiento de la retina, desordenes inflamatorios, hereditarios y del desarrollo, diabetes, así como aquellos

producidos por agentes tóxicos, nutricionales o ambientales (Cunha-vaz, 1980).

RETINOPATIA DIABETICA.

La diabetes mellitus es una enfermedad determinada genéticamente, con alteraciones en el metabolismo de carbohidratos, proteínas y lípidos, asociada a una deficiencia absoluta o relativa de la secreción de insulina y con varios grados de resistencia a la misma. Se caracteriza por una pérdida de peso, fatiga, poliuria y cetosis, lo que conlleva a problemas vasculares y neuropatías. La dependencia de insulina implica que la administración de insulina es esencial para prevenir la cetosis espontánea, el coma diabético y la muerte; sin embargo, los tratamientos comunes no previenen el desarrollo de las complicaciones crónicas que afectan a los riñones, a las arterias y al sistema nervioso en general (McCall, 1992).

La diabetes puede causar una serie de alteraciones en el sistema nervioso central, que incluye modificaciones en el flujo sanguíneo y el metabolismo que pueden producir encefalopatía crónica, deficiencias neurológicas, ataques y problemas en la conciencia (Plum, F., 1960). Por otro lado, se conoce que la hipoglucemia producida por los tratamientos largos con insulina, pueden provocar necrosis laminar en la corteza cerebral, especialmente en la tercera y quinta capas, y en algunas ocasiones también ocurre desmielinización en el hipocampo (McCall, 1992). La diabetes mellitus provoca en el nervio periférico la disminución del transporte axonal y desmielinización segmental asociada con una

disfunción motora, sensorial y autónoma (Green, 1991).

La diabetes es una de las principales causas de ceguera en pacientes menores de 60 años (Patz, A., 1978), ya que provoca la formación de cataratas en el cristalino, hemorragias en el cuerpo vitreo y alteraciones en la estructura y fisiología de la retina (Nishimura y Kuriyama, 1985; Engerman, 1989). Así, la retinopatía diabética, es una de las consecuencias más severas de esta enfermedad ya que puede llevar a la pérdida irreversible de la función visual, asociada fundamentalmente a cambios patológicos en la microvasculatura retiniana (Davis, 1988).

A la retinopatía diabética se le divide frecuentemente en un estado proliferativo y un estado previo, durante el cual ocurren lesiones en la vasculatura de la retina. Dichas lesiones son identificadas en el inicio de la retinopatía e incluyen la formación de aneurismas capilares, pérdida de pericitos, proliferación de células endoteliales, disminución del flujo sanguíneo y oclusión de los capilares y de pequeñas arteriolas. En la retinopatía diabética no proliferativa se presenta edema, formación de exudados duros y hemorragias, asociadas a un engrosamiento de la membrana basal de los vasos (Larsen, 1960; Tolentino, 1966).

En la retinopatía diabética proliferativa la isquemia producida en algunas zonas de la retina, es probablemente una de las causas importantes de la neovascularización. Las hemorragias que se originan en los vasos que se forman sobre la superficie de la retina y en la cabeza del nervio óptico, son una de las causas

patrón del electroretinograma (Yonemura, 1962). Se ha sugerido que la amplitud del patrón del electroretinograma se deteriora en relación directa con la duración de la diabetes (Arden, 1986). En humanos, se encontró una disminución de la amplitud de la onda b (Yonemura, 1977; Nishimura y Kuriyama, 1985). Por otra parte, en ratas albinas diabéticas se encontró una caída promedio del 40% en la amplitud de la onda a y del 37% para la onda b, lo cual refleja problemas en la función retiniana (Tamai y Tanaka, 1973). Además se han observado cambios en la amplitud de la onda c del electroretinograma, la cual refleja la hiperpolarización pasiva de la membrana apical del EPR, en respuesta a la luz (Pautler y Ennis, 1980).

La diabetes mellitus es una enfermedad metabólica, por lo que es razonable asumir que los cambios metabólicos ocurren en la retina antes de que aparezcan las alteraciones estructurales características de la retinopatía diabética. Por ejemplo, se ha observado la glicosilación de sistemas enzimáticos provocada por las altas concentraciones extracelulares de glucosa. En células en cultivo, se ha observado que las altas concentraciones de glucosa en el medio provocan un aumento en su transporte, y modificaciones en la síntesis y la actividad de sus transportadores. Así, la presencia de concentraciones de glucosa menores de 5mM, provocan la sobreexpresión de su sistema de transporte en los fibroblastos de hamster (Kalckar, 1973) y en el músculo esquelético de rata (Sasson, 1986; Walker, 1989; Koivisto, 1991); mientras que a concentraciones mayores de 5 mM de glucosa se observa una disminución del transporte de glucosa (Maher, 1990).

patrón del electroretinograma (Yonemura, 1962). Se ha sugerido que la amplitud del patrón del electroretinograma se deteriora en relación directa con la duración de la diabetes (Arden, 1986). En humanos, se encontró una disminución de la amplitud de la onda b (Yonemura, 1977; Nishimura y Kuriyama, 1985). Por otra parte, en ratas albinas diabéticas se encontró una caída promedio del 40% en la amplitud de la onda a y del 37% para la onda b, lo cual refleja problemas en la función retiniana (Tamai y Tanaka, 1973). Además se han observado cambios en la amplitud de la onda c del electroretinograma, la cual refleja la hiperpolarización pasiva de la membrana apical del EPR, en respuesta a la luz (Pautler y Ennis, 1980).

La diabetes mellitus es una enfermedad metabólica, por lo que es razonable asumir que los cambios metabólicos ocurren en la retina antes de que aparezcan las alteraciones estructurales características de la retinopatía diabética. Por ejemplo, se ha observado la glicosilación de sistemas enzimáticos provocada por las altas concentraciones extracelulares de glucosa. En células en cultivo, se ha observado que las altas concentraciones de glucosa en el medio provocan un aumento en su transporte, y modificaciones en la síntesis y la actividad de sus transportadores. Así, la presencia de concentraciones de glucosa menores de 5mM, provocan la sobreexpresión de su sistema de transporte en los fibroblastos de hamster (Kalckar, 1973) y en el músculo esquelético de rata (Sasson, 1986; Walker, 1989; Koivisto, 1991); mientras que a concentraciones mayores de 5 mM de glucosa se observa una disminución del transporte de glucosa (Maher, 1990).

En la diabetes, además de las fluctuaciones en la concentración de glucosa en sangre, la retina está expuesta a una disminución en la disponibilidad de oxígeno (Sutherland, 1990).

Asociado al aumento en el transporte de glucosa, se ha encontrado un aumento en la actividad y expresión de la aldosa reductasa (Kador, 1980), que sintetiza sorbitol a partir de glucosa (Kador, 1988). La acumulación de polialcoholes de glucosa provoca hipertonicidad, que lleva a un aumento en la acumulación de agua en las células, causando hinchamiento y un eventual daño en la membrana plasmática, lo que provoca la pérdida de la barrera hematorretiniana (Kador y Kinoshita, 1985).

Adicionalmente, se ha reportado una disminución en los niveles de mio-inositol, presumiblemente debido a una inhibición competitiva de su sistema de transporte por los altos niveles extracelulares de glucosa (Khatami, y Rockey, 1987). Además, la acumulación de sorbitol y su vía de síntesis pueden interferir con la síntesis de novo o de las vías de reciclaje del inositol (Macgregor y Matschinsky, 1986; Li, 1989). La disminución del mio-inositol en las células provoca alteraciones en el metabolismo de los lípidos, así como flujos alterados de sodio y potasio. En el nervio periférico estas anormalidades bioquímicas están asociadas a un flujo axoplásmico reducido y a un desacople en la conducción del impulso (Green, y Lattimer, 1989).

Por otro lado, varios estudios han reportado un aumento en la concentración de los radicales libres, en la retina de ratas diabéticas (Murata, 1981; Cohen, 1984; Nishimura y Kuriyama, 1985).

Además, como la retina es un tejido rico en ácidos grasos poliinsaturados, es altamente sensible a la reactividad de los radicales libres, lo que puede provocar lisis mebranal (Anderson y Sperling, 1971; Doly, 1984).

Otras evidencias han sugerido que los factores de crecimiento, incluyendo a la propia insulina, pueden contribuir al engrosamiento de la pared de los vasos y al desarrollo de la retinopatía diabética proliferativa en estado terminal.

La diabetes parece producir en la retina y en el EPR cambios metabólicos que seguramente contribuyen al desarrollo de la retinopatía diabética, sin embargo, los mecanismos se desconocen.

OBJETIVO.

En la retina, existe un sistema de barrera similar a la barrera hematocerebral, sistema que durante la diabetes mellitus puede sufrir alteraciones que contribuyen a una variedad de problemas visuales. Se ha reportado un aumento en la permeabilidad de los vasos retinianos en animales diabéticos; pero se conoce relativamente poco acerca de los sitios específicos y los mecanismos celulares de tales alteraciones a nivel del EPR, por lo que estudiamos la posibilidad de que cambios en la permeabilidad del EPR en animales diabéticos pueda llevar a alteraciones en la retina neural.

En este trabajo estudiamos la permeabilidad del EPR de la rata y sus posibles modificaciones inducidas por la diabetes. Asimismo, investigamos la posibilidad de que estos cambios lleven a alteraciones en el funcionamiento en la retina. Por lo que estudiamos en animales normales y diabéticos el transporte de glucosa y de aminoácidos, de los que se tiene evidencia de que funcionan como neurotransmisores en la retina, así como la actividad de la ATPasa $\text{Na}^+\text{-K}^+$, enzima que puede afectar la actividad de dichos transportadores.

Asimismo, en un intento de profundizar en los posibles mecanismos de tales alteraciones, decidimos medir los niveles de algunos parametros de regulación metabólica, como lo es el estado redox del citosol.

MÉTODOS.

Los experimentos se llevaron a cabo con ratas Long-Evans de 150-200g de peso. Estas fueron divididas en 3 grupos: control, diabéticas y diabéticas tratadas con insulina.

La diabetes se indujo por medio de una inyección intraperitoneal de estreptozotocina en amortiguador de citratos pH 4.8 (65mg/kg de peso) (Mackerer, 1971). Al grupo de animales tratados con insulina, se les administraron diariamente 5 unidades/kg de peso durante 20 días, a partir del segundo día después de la inyección de estreptozotocina. Los animales se alimentaron ad libitum y después de diferentes periodos de tiempo, se sacrificaron.

Los niveles de glucosa en el plasma se determinaron por la técnica de orto-toluidina (Hultman, 1959), utilizando un equipo de reactivos comerciales. Se consideraron a los animales como diabéticos cuando presentaron arriba de 300 mg de glucosa/dl de suero.

Los animales se sacrificaron después de 7, 14, 20, 30 y 45 días de inducida la diabetes. Los ojos se enuclearon y se seccionaron ecuatorialmente, la parte anterior de ellos fue eliminada. La retina y el EPR se aislaron en Ringer Krebs Bicarbonato (RKB) con una composición (mM) de 118 de NaCl; 1.17 de KH_2PO_4 ; 2.5 de CaCl_2 ; 1.17 de MgSO_4 ; 5.6 de glucosa; 25 de NaHCO_3 ; a un pH de 7.4, oxigenado con una mezcla de O_2 al 95% y CO_2 al 5%.

ACUMULACION DE FLUORESCENCIA

Los animales fueron anestesiados con pentobarbital, y

posteriormente se les administró por vía intravenosa 100 μ l de una solución de fluoresceína de sodio al 10%. Después de 2 min, los ojos se enuclearon y se seccionaron ecuatorialmente, las copas ópticas se fijaron por 4 horas en paraformaldehído al 4%. Posteriormente, se lavaron en una solución salina de NaCl (0.9%) preparada en un amortiguador de fosfato de sodio 0.1 M pH 7.4 y se incubaron durante 24 horas en sacarosa al 30%. Cortes de 10 μ m se obtuvieron en un criostato y se observaron bajo el microscopio de fluorescencia (Nikon, alphaphot) utilizando un filtro para una longitud de onda de 500 nm.

MICROSCOPIA ELECTRONICA:

Las copas ópticas de los animales normales y diabéticos se fijaron glutaraldehído al 2.5 % en amortiguador de fosfatos 0.1 M, pH 7.4 y postfijaron en tetraóxido de osmio al 2 % en el mismo amortiguador. Las muestras se embebieron en Epon 812 y se obtuvieron cortes finos con un ultramicrotomo Reichertt UMP₃. Posteriormente se observaron en un microscopio electrónico Jeol 1.

ACUMULACION DE AMINOACIDOS:

El tejido de ratas normales y diabéticas se incubó a 37°C por 20 min. en 1 ml de RKB que contenía 0.25 μ Ci de glutamato-³H (36.7 Ci/mmol), L-aspartato-³H (13.5 Ci/mmol), glicina-³H (43 Ci/mmol), ácido τ -aminobutírico-³H (GABA, 50 Ci/mmol), o taurina-³H (29 Ci/mmol), a una concentración final de 20 μ M. Al final de la incubación, el tejido se lavó durante 1 min en RKB a 4°C y posteriormente se pesó y digirió con 0.5 ml de dodecil sulfato de

tejido se le agregaron 5 ml de tritosol (Frike, 1975) y la radiactividad incorporada se determinó en un contador de centelleo líquido (Beckman, LS 1701).

NIVELES ENDOGENOS DE LOS AMONIOACIDOS.

Para el análisis de los aminoácidos libres, se siguió el método de Geddes y Wood, (1984), que es una modificación del método reportado por Lenda y Svenneby, (1980). Brevemente, se utilizó el tejido de dos ratas y se homogeneizó en 500 μ l de etanol al 80%. Las proteínas se precipitaron a 4°C durante 10 min y posteriormente se centrifugaron a 10,000 rpm durante 30 seg en una microfuga Beckman. El precipitado se solubilizó con NaOH y se cuantificaron las proteínas totales. El sobrenadante se filtró con una membrana de 0.22 μ m (Millipore), posteriormente se tomaron 50 μ l de la muestra y se derivatizó con O-phtaldialdehído y se analizó en un HPLC utilizando una columna ultrasfere XL ODS de 4.5 mm de diámetro interno, con un tamaño de partícula de 3 μ m (Beckman Ins). Como fase móvil se utilizó una solución amortiguadora de acetato de sodio 50 mM, pH 6.8 y metanol en un gradiente lineal, con un flujo de 1.5 ml/min.

ACTIVIDAD DE LA ATPasa Na⁺-K⁺.

La actividad de la ATPasa Na⁺-K⁺ se determinó según el método de Bonting, et al (1961). Brevemente, el tejido se homogeneizó al 5 % en un amortiguador Tris 92mM pH 7.1. Alicuotas de 100 μ l (350 μ g de proteína), se incubaron a 37°C por 30 min. en un medio con una composición (mM): 1 de MgCl₂; 0.1 de EDTA; 92 de tris; 10 de NaCN, 58 de NaCl; 5 de KCl y 2 de ATP. La actividad de la ATPasa

Na⁺-K⁺, se obtuvo restando los valores obtenidos a una muestra que se incubó paralelamente con 200 μ M de ouabaina.

La reacción se detuvo con 2.5 ml de ácido perclórico al 6% en frío. Las muestras se centrifugaron a 1000 rpm por 10 min. El fósforo inorgánico producido se midió en el sobrenadante por el método de Brunette, et al. (1978).

UNION DE OUABAINA-³H.

Las membranas totales de la retina y del EPR se obtuvieron por homogeneización del tejido a 4°C en 20 volúmenes de agua, las membranas se sedimentaron por centrifugación a 71,000 x g por 20 min, el procedimiento se repitió dos veces y las membranas se congelaron a -20°C o se utilizaron inmediatamente.

Las membranas resuspendidas en un amortiguador de imidazol 50 mM, pH 7.5 (1.6 mg de proteína/ml), se incubaron a 37°C por 30 min, en 0.5 ml del amortiguador en presencia de ouabaina-³H (23.2 Ci/mmol) a una concentración final de 45 nM. La unión específica de ouabaina se determinó incubando en presencia de 200 μ M de ouabaina no radiactiva. La reacción se detuvo a los 30 min. por la adición de 3 ml del amortiguador frío, y filtración al vacío, utilizando filtros de fibra de vidrio GF/B. Los filtros se lavaron con 10 ml del amortiguador frío y se transfirieron a viales a los que se les agregaron 5 ml de tritosol. La radiactividad se cuantificó en un contador de centelleo líquido.

ACUMULACION DE Ca⁴⁵.

La acumulación de Ca⁴⁵ se determinó incubando la retina y el EPR con 0.25 μ Ci de Ca⁴⁵, a 37°C en RKB, durante diferentes

periodos de tiempo. Al finalizar la incubación se digirió el tejido con 0.5 ml de SDS al 1%. Posteriormente se le añadieron 5 ml de tritosol y se cuantificó la radiactividad incorporada en un contador de centelleo líquido.

ACUMULACION DE GLUCOSA.

El tejido se incubó en 1 ml. de RKB el cual contenía 0.5 μ Ci (13 μ M) de 2- desoxiglucosa- 3 H (2-DOG) (37.3 Ci/mmol), a 37°C por diferentes periodos de tiempo.

La cinética del transporte, se estudió incubando el tejido por 2 minutos, en 1 ml de RKB sin glucosa y en presencia de diferentes concentraciones de 2-DOG.

El efecto del sodio en la acumulación de 2-DOG, se estudió substituyendo en cantidades equimolares el cloruro de sodio por cloruro de colina, y el bicarbonato de sodio por bicarbonato de potasio.

El efecto de diferentes compuestos, sobre el sistema de transporte, se estudió adicionándolos simultáneamente a la 2-DOG.

El efecto de la insulina sobre el transporte de glucosa, se determinó incubando el tejido a 37°C, en presencia de 1, 5, 10 y 100 ng/ml de insulina.

NIVELES DE LACTATO Y PIRUVATO:

Los niveles de lactato y del piruvato se determinaron midiendo las concentraciones de NADH producido, siguiendo el método de Noll (1983) y Lamprecht y Heinz (1983), respectivamente. Brevemente, el tejido se homogeneizó al 5% (p/v) en 1 ml de ácido perclórico al

8%, y se centrifugó a 26,000 x g durante 10 min. Los sobrenadantes se ajustaron a un pH de 7-8 con una solución de NaOH 10 N.

Los niveles de lactato en el sobrenadante se determinaron en un sistema que contenía 100 μ l de la muestra, 450 μ l de un amortiguador de glicina (1 M) pH 9.5, 50 μ l de NAD (50 μ M), 400 μ l de agua, en un volúmen final de 1 ml. La reacción se inició adicionando 4 μ l de una suspensión de la enzima deshidrogenasa láctica (860 unidades/mg de proteína). La reacción se siguió espectrofotométricamente a 340 nm durante 30 min, a temperatura ambiente.

La determinación de los niveles de piruvato, se llevó a cabo en un sistema que contenía 500 μ l de muestra, 300 μ l de amortiguador de trietanolamina (0.5 M) pH 7.5, en presencia de NADH (8 mM), en un volúmen total de 1 ml. La reacción se inició adicionando 4 μ l de la enzima deshidrogenasa láctica (860 unidades/mg de proteína), y se siguió en un espectrofotómetro a 340 nm por 30 min.

La concentración de lactato y piruvato se obtuvo utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{nmoles/ml} = \frac{\Delta E \times \text{vol. total}}{0.0062 \times \text{vol. de muestra}}$$

Donde 0.0062 equivale a 1 nmola de lactato

ACTIVIDAD DE LA DESHIDROGENASA LACTICA.

La actividad de la deshidrogenasa láctica, se determinó por

La actividad de la deshidrogenasa láctica, se determinó por el método reportado por Johnson et al., 1960. Para ello, el tejido se homogeneizó al 5% (p/v), en amortiguador de fosfatos 0.05 M a un pH de 7.5. Los reactivos se mezclaron directamente en la celda en los siguientes volúmenes: 2.8 ml del amortiguador, 50 μ l de NADH a una concentración final de 170 μ M y 50 μ l de piruvato de sodio a una concentración final de 0.03 M. La reacción se midió espectrofotométricamente a 340 nm, durante 10 min.

La actividad de la LDH se determinó utilizando el valor del coeficiente de extinción molar del NADH que es de 6.22×10^6 /molas.

La concentración de proteínas en las muestras, se determinó de acuerdo al método de Lowry (1951), con albúmina serica bovina como estándar.

La significancia de los datos experimentales se calculó por medio de la prueba de Anova Unifactorial (análisis de varianza) y las comparaciones múltiples de Tukey.

RESULTADOS.

El EPR como parte de la barrera hematorretiniana, restringe el paso de solutos hacia la retina provenientes de la coroides. Con el objetivo de conocer si la diabetes altera o rompe esta barrera, estudiamos la permeabilidad del EPR a la fluorescencia y su paso hacia la retina en animales normales y de diferentes días de inducida la diabetes.

La retina presenta autofluorescencia especialmente en los segmentos externos de los fotorreceptores y en la capa plexiforme externa, sin embargo, cuando se administró fluoresceína a los animales control se observó un aumento en la fluorescencia de los vasos sanguíneos de la retina, de la coroides y del EPR (fig. 6a). Al séptimo día de inducida la diabetes, se observó un aumento en el paso de fluorescencia a nivel de la capa nuclear externa (fig. 6b). A los 20 y 45 días se observó un aumento de la fluorescencia en la retina interna, principalmente en la capa nuclear interna y en la capa de las células ganglionares (fig. 7a , 7b y 7c).

MICROSCOPIA ELECTRONICA.

Para definir la extensión de las alteraciones en la estructura de la retina y del EPR provocadas por la diabetes, se hicieron observaciones al microscopio electrónico. A los 7 días de inducida la diabetes, existe desorganización en la membrana apical del EPR, de tal manera que se pierden las interacciones de las microvellosidades y los segmentos externos de los fotorreceptores, observadas en animales control (fig. 8a y 8b). Sin embargo, a este tiempo se observó la presencia de uniones estrechas de la membrana

lateral del EPR (fig. 8c).

A los 20 días, se encontró un aumento en la superficie de la membrana basal, además de que el plegamiento de esta membrana presenta configuraciones sinuosas que se extienden profundamente dentro del citoplasma de la célula. En la retina, por otro lado, las alteraciones se presentaron en la zona de los fotorreceptores, con desorganización de las membranas de sus segmentos externos e hinchamiento de los segmentos internos (fig. 7d). Finalmente, a los 45 días de inducida la diabetes se presentó un hinchamiento generalizado de las células del EPR, y en la retina se presentó vacuolización de la zona interna, así como un hinchamiento de las mitocondrias (fig. 7e y 7f).

ACUMULACION DE AMINOACIDOS

Se estudió en la retina y EPR de ratas normales y diabéticas, la acumulación de glicina, glutamato, aspartato, taurina y GABA, de los que se tiene evidencia que juegan un papel como neurotransmisores en la retina. Nuestros resultados muestran que la glicina, se acumula en la retina y en el EPR, observandose valores de 23.12 ± 1.75 y de 7.29 ± 0.52 nmolas/g de tejido, respectivamente; valores que no se modifican en el tejido de animales diabéticos. En forma similar a lo observado con la glicina, los niveles de glutamato acumulados en la retina y EPR de animales diabéticos no cambiaron con respecto a los de los animales normales, encontrandose valores de 125 ± 1.5 nmolas/g de tejido en la retina y de 5.29 ± 0.58 nmolas/g de tejido en el EPR (gráfica 1).

En contraste, se observó una disminución del 40% y 50% en los niveles de aspartato acumulados en la retina y en el EPR de ratas diabéticas, con respecto a las control.

De manera diferente, la acumulación de taurina aumentó considerablemente, 70% y 40%, en la retina y en el EPR de ratas diabéticas, respectivamente (gráfica 1).

NIVELES ENDOGENOS DE AMINOACIDOS

Los cambios observados en la acumulación de aminoácidos tanto en la retina como en el EPR, pueden estar asociados a posibles alteraciones en sus niveles endógenos, por lo que estudiamos el contenido de aminoácidos libres en la retina y el EPR de animales normales y diabéticos.

La retina de ratas diabéticas de 20 días, presentó una disminución general del 30 al 50% en los niveles de aminoácidos libres, con respecto a los niveles observados en la retina de ratas control. Aunque los niveles de taurina y de isoleucina, disminuyeron sólo en un 18% y 11% respectivamente (gráfica 2a).

Los niveles de aminoácidos libres en el EPR de ratas diabéticas presentaron un patrón complejo. Algunos aminoácidos como la arginina, la alanina y la taurina, presentaron un aumento del 50%, mientras que el GABA presentó un aumento del 100%. Por otro lado, los niveles de tirosina, serina, lisina, leucina y valina, disminuyeron en un 40 y 50%, mientras que los de glutamato y aspartato no cambiaron (gráfica 2b).

ACTIVIDAD DE LA ATPasa Na⁺-K⁺

La acumulación de aminoácidos neurotransmisores, se conoce que es mediada por sistemas de transporte dependientes de sodio. Alteraciones en las concentraciones iónicas pueden llevar por tanto, a cambios en la acumulación de estos aminoácidos. La ATPasa Na^+-K^+ mantiene los gradientes iónicos a través de la membrana, por lo que estudiamos su actividad y cantidad en la retina y en el EPR de animales normales y diabéticos. Nuestros resultados muestran que la actividad de esta enzima en la retina y en el EPR de animales normales, presenta valores de 18.6 y 3.01 μmol de Pi/mg de prot. respectivamente. La actividad de la ATPasa Na^+-K^+ en el EPR no se modificó de manera significativa a los diferentes periodos de inducida la diabetes (gráfica 3b). De acuerdo con estos resultados, no se observaron cambios en la unión específica de ouabaina- ^3H (gráfica 4).

De manera diferente, la actividad de la ATPasa Na^+-K^+ en la retina de animales diabéticos se inhibió en un 50% en todos los periodos estudiados (gráfica 3a). Dicha actividad no se reestableció en los animales diabéticos tratados con insulina. La inhibición de la actividad enzimática observada se correlacionó con una disminución del 50% en la unión específica de ouabaina- ^3H en las membranas totales de la retina (gráfica 4a).

ACUMULACION DE Ca^{45}

En general, el balance iónico de las neuronas se mantiene por la actividad de la ATPasa Na^+-K^+ , por lo que alteraciones en su actividad pueden llevar a cambios en la acumulación de otros iones como el calcio. Asimismo, la actividad de esta enzima es inhibida

por las altas concentraciones de calcio. Dada la inhibición en la actividad de esta enzima observada en la retina de ratas diabéticas, decidimos estudiar la acumulación de Ca^{45} en el EPR y la retina. La acumulación de Ca^{45} en el EPR de ratas control es saturable en función del tiempo, alcanzando niveles máximos a los 20 minutos ($4.2 \pm 0.26 \mu\text{mol}/\text{g}$ de tejido). Los niveles de acumulación de este ión en el EPR de ratas diabéticas no presentó cambios significativos con respecto a las control. En la retina de animales normales, la acumulación de Ca^{45} se satura a los 20 min de incubación, alcanzando valores de $3.67 \pm 0.4 \mu\text{mol}/\text{g}$. de tej. En la retina de ratas diabéticas, se observó un aumento del 30% en dicha acumulación (gráfica 5).

ACUMULACION DE GLUCOSA

En un intento por conocer si las alteraciones observadas se deben a cambios en la acumulación intracelular de glucosa causada por las elevadas concentraciones extracelulares, se estudió la acumulación de 2-desoxiglucosa- ^3H (2-DOG), análogo no metabolizable de la glucosa, en el EPR y la retina de ratas control y diabéticas.

La 2-DOG se acumula en función del tiempo de incubación alcanzando la saturación alrededor de los 30 minutos, con valores de 1.36 y $10.8 \mu\text{mol}/\text{g}$ de tejido, en el EPR y la retina de ratas control, respectivamente (gráfica 6):

Con el objetivo de estudiar la cinética del transporte, se incubó el EPR en presencia de diferentes concentraciones de 2-DOG ($1-30 \text{ mM}$). Bajo estas condiciones, la acumulación presentó un comportamiento sigmoideal, que no pudo linealizarse por el método de

Lineweaver-Burk. Cuando se estudió la cinética de acumulación de 2-DOG en el EPR de ratas diabéticas se encontró un sistema de transporte saturable (gráfica 7a). El análisis cinético de Lineweaver-Burk evidenció un sistema con una Km aparente de 20 mM y una Vmax de 0.75 μ molas/g de tejido/ minuto (gráfica 7b).

En la retina de ratas control se encontró un sistema de transporte saturable cuando se incubó en presencia de diferentes concentraciones de 2-DOG (0.1-5 mM). La gráfica de Lineweaver-Burk mostró un sistema de transporte con una Km de 2.5 mM y una Vmax de 0.5 μ molas/g de tejido/min. En la retina de ratas diabéticas se observó un sistema de transporte, de menor afinidad y mayor capacidad que el observado en las retinas de ratas normales, con una Km de 5mM y una Vmax de 1.33 μ molas/g de tejido/min. (gráfica 8).

El sistema de transporte de 2-DOG, en el EPR y en la retina es sensible a temperatura, ya que cuando se incubó a 4°C se inhibió en un 88% y 97% respectivamente. La dependencia de energía en el transporte de 2-DOG se estudió incubando el tejido en presencia de diferentes inhibidores metabólicos. La presencia de iodacetato (Iac, 1 mM) inhibió en un 53 y 75% la acumulación de 2-DOG, en el EPR y en la retina respectivamente. Por su parte el cianuro de potasio (KCN, 1 mM) inhibió ligeramente la captación de 2-DOG en el EPR (20%), mientras que en la retina no tuvo efecto. La presencia de ouabaina (0.1 mM), provocó una inhibición en la acumulación de 2-DOG del 20% en ambos tejidos (tabla 1).

La floridizina (0.1 mM), floretina (0.1 mM) y citocalasina B

(10 μM), inhibidores específicos de los transportadores de glucosa en otros sistemas, inhibieron la acumulación de 2-DOG en el EPR en un 5, 35 y 40% respectivamente. En la retina la presencia de floridizina inhibió la acumulación de 2-DOG en un 20%, mientras que la floretina y la citocalasina B la inhibieron en un 30 y 50%, respectivamente (tabla 1).

La dependencia de Na^+ en la acumulación de 2-DOG se estudió incubando el tejido en un medio carente de sodio, el cual se substituyó por cloruro de colina (118 mM). En estas condiciones, la acumulación de 2-DOG en el EPR no se modificó, mientras que en la retina se inhibió en un 97% (tabla 1).

El efecto de insulina en la acumulación de 2-DOG, se estudió incubando la retina y el EPR en presencia de 1, 5, 10 y 100 ng/ml de insulina. Bajo estas condiciones, no se observó modificación en los niveles de 2-DOG acumulados en el EPR a los tiempos estudiados. En la retina, a tiempos largos de incubación (30-40 min), la insulina aumentó la acumulación de 2-DOG de manera dependiente de la dosis, alcanzando valores máximos (60%) con 10 ng/ml de insulina, sin observarse efectos a dosis mayores (gráfica 9). Por otro lado, los niveles de acumulación de 2-DOG en la retina de ratas diabéticas fueron menores a los observados en las ratas control. La acumulación de 2-DOG en las retinas de ratas diabéticas incubadas en presencia de insulina, alcanzó valores similares a los observados en las retinas de ratas normales (gráfica 10).

NIVELES DE LACTATO Y PIRUVATO:

Las alteraciones causadas por la diabetes pueden estar.

relacionadas con la disponibilidad energética de la glucosa. Se ha reportado, que hay una importante actividad glucolítica y oxidativa en ambos tejidos, las cuales podrían modificarse durante la diabetes. En un intento por conocer el estado energético de la retina y el EPR, se determinaron los niveles de lactato y piruvato en animales normales y diabéticos.

Nuestros resultados muestran, que en la retina de ratas control los niveles de lactato fueron de 1.6 ± 0.48 nmolas/mg de tejido y los niveles de piruvato fueron de 0.13 ± 0.04 nmolas/mg de tejido, con una relación lactato/piruvato de 12.42 ± 0.77 . Por otro lado, en la retina de ratas diabéticas se encontró un aumento considerable (130%) en la producción de lactato, aumento que se observa desde el 7° día de inducción de la enfermedad y se mantiene a tiempos largos (45 días). Por el contrario, no se encontraron cambios significativos en los niveles de piruvato en el tejido de ratas diabéticas con respecto al de las ratas control (tabla 3). Estos resultados llevan a un aumento en la relación de lactato/piruvato (30) en la retina de ratas diabéticas (100%), lo que es un reflejo del aumento en los niveles de lactato observados (gráfica 11).

Los niveles de lactato y piruvato encontrados en el EPR de animales normales, fueron de 1.722 ± 0.278 nmolas/mg de tejido y de 0.17 ± 0.05 nmolas/mg de tejido, respectivamente, obteniéndose una relación lactato/piruvato de 11.79 ± 1.01 . En contraste, los niveles de lactato en el EPR de ratas diabéticas disminuyó en un 50%, mientras que los de piruvato se mantuvieron sin cambios significativos en relación a los niveles encontrados en las ratas

control (tabla 2). Los cambios en los niveles de lactato provocaron una disminución del 60% en la relación lactato/piruvato en el EPR de ratas diabéticas (gráfica 11).

ACTIVIDAD DE LA LDE.

La actividad de la deshidrogenasa láctica en la retina de animales normales presenta una actividad de 1.25 μ molas/mg de proteína, valores que se incrementan en un 50% en la retina de animales diabéticos (gráfica 12). Por otro lado, la actividad de esta enzima en el EPR fue de 0.8 μ molas/mg de prot. en animales normales y en los diabéticos se observó un aumento del 25% en dicha actividad (gráfica 12).

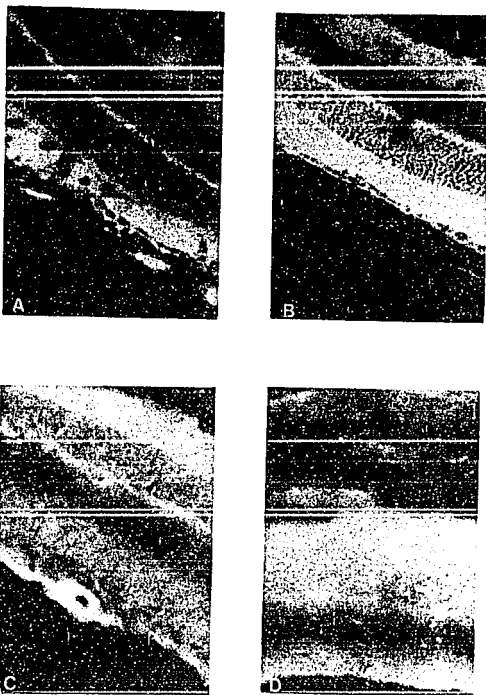


Figura 6. Acumulación de fluoresceína en la retina de ratas control (A) y de ratas diabéticas de 7 días (B), de 20 días (C) y de 45 días (D). Note el paso de la fluoresceína hacia la retina desde los 7 días de inducida la diabetes. Amplificación 1000x.

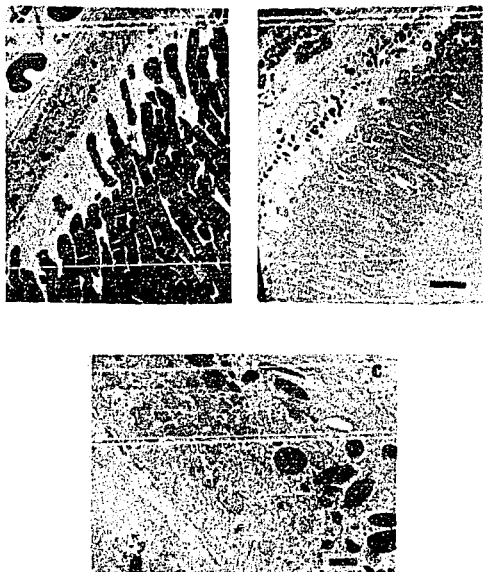


Figura 7. Micrografía electrónica del EPR y de la zona externa de la retina de ratas control (a) y de ratas diabéticas de 7 días (b y c). Note la presencia de uniones estrechas en el EPR de ratas diabéticas de 7 días (c flecha). Escala en a y b 5 μ m, y en c 1 μ m.

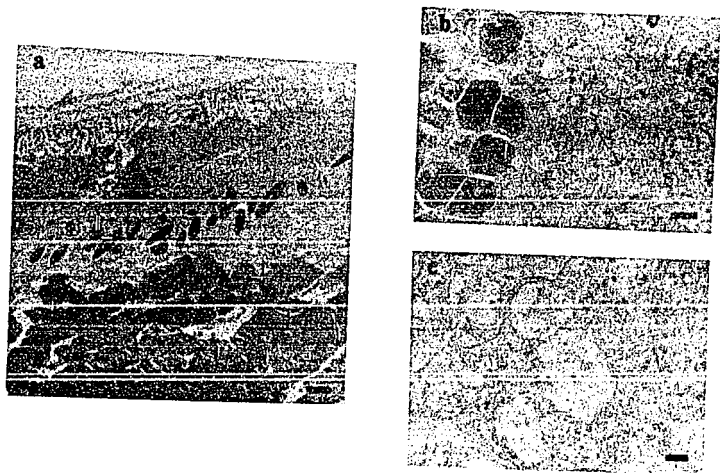
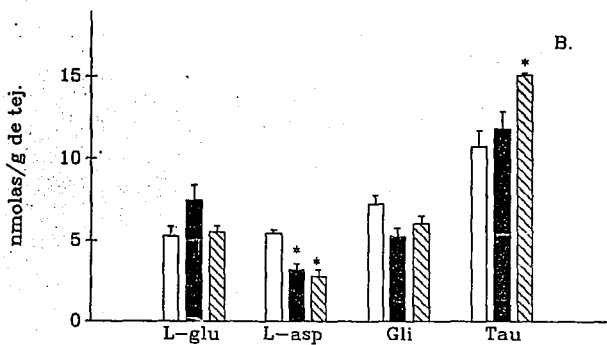
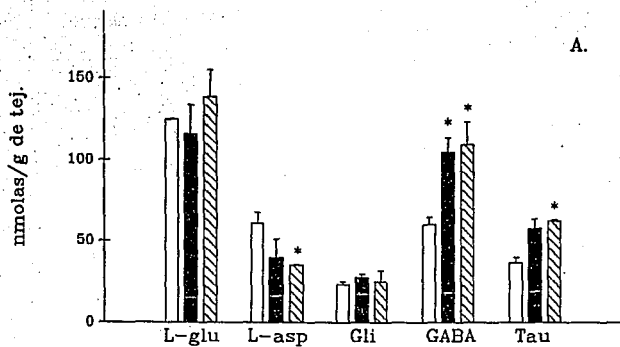
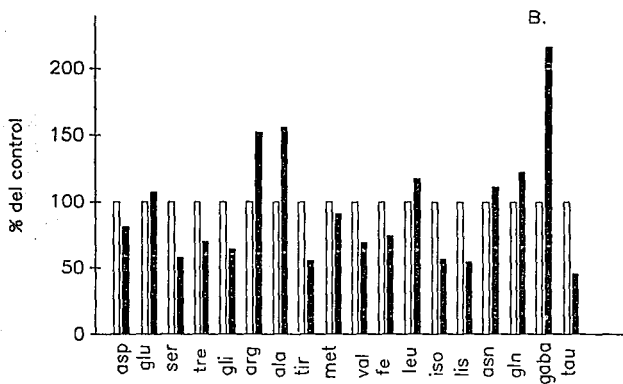
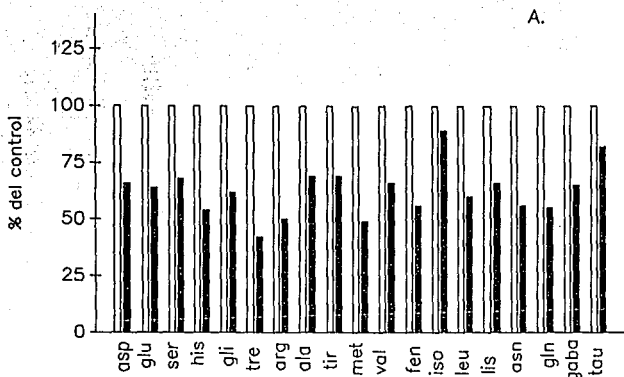


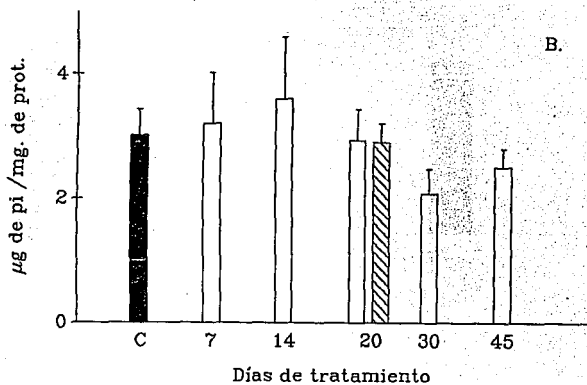
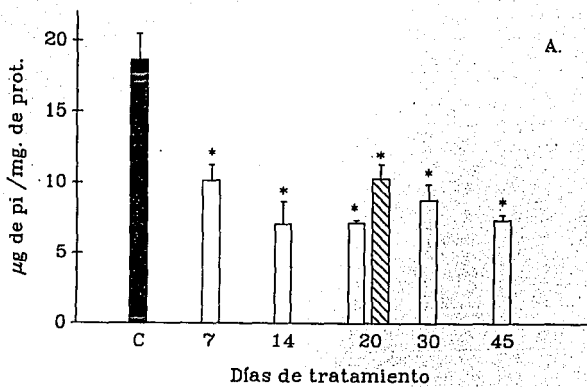
Figura 8. Micrografía electrónica del EPR y de la zona externa de la retina de ratas diabéticas de 20 días (a) y de la zona interna de la retina de ratas diabéticas de 45 días (b y c). Escala en a 1 μm , en b 2 μm y en c de 0.2 μm .



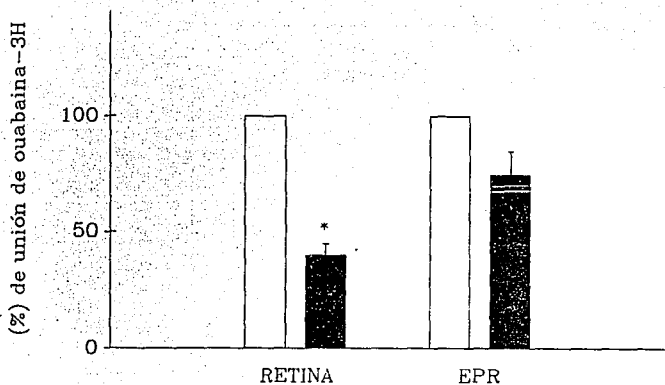
Gráfica 1. Acumulación de aminoácidos en la retina (A) y en el EPR (B) de ratas control (□), diabéticas de 20 días (■) y diabéticas de 45 días (▨). Los datos son el promedio de al menos 3 experimentos independientes ± el error estándar. * P < 0.01 con respecto a las control.



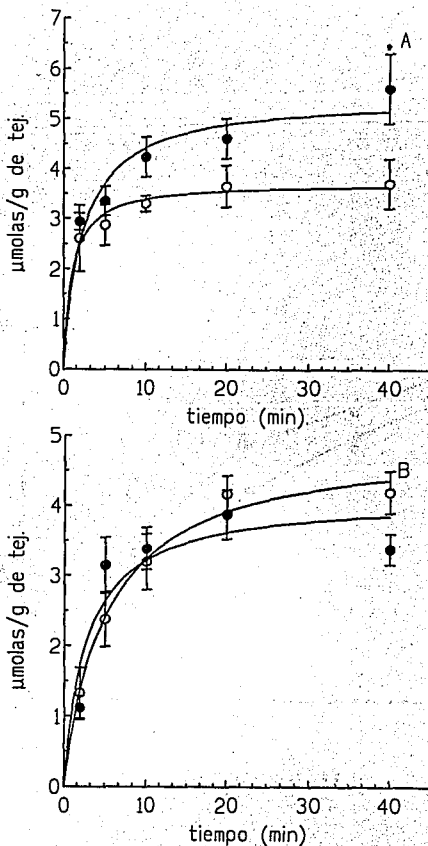
Gráfica 2. Contenido de aminoácidos libres en la retina (A) y en el EPR (B) de animales control (□) y diabéticos (■). Los datos son el promedio de por lo menos 2 experimentos independientes.



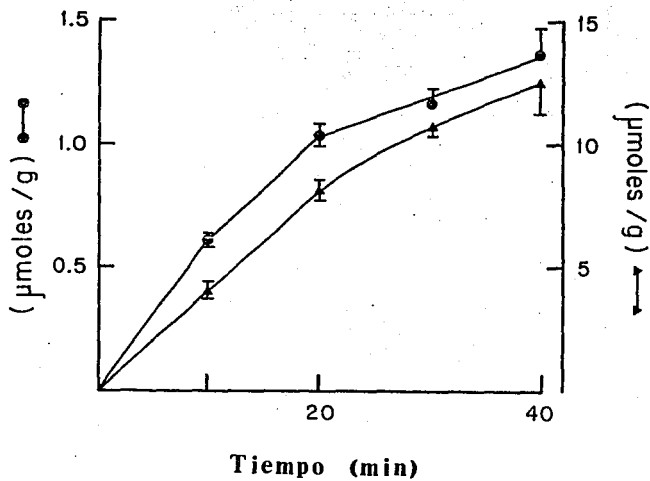
Grafica 3. Actividad de la ATPasa Na⁺-K⁺ en la retina (A) y en el EPR (B) de animales control (■), diabéticas de 20 días (□) y de diabéticas tratadas con insulina (▨). Los datos son el promedio ± el error estándar de 3 experimentos independientes. * P < 0.01 con respecto al control.



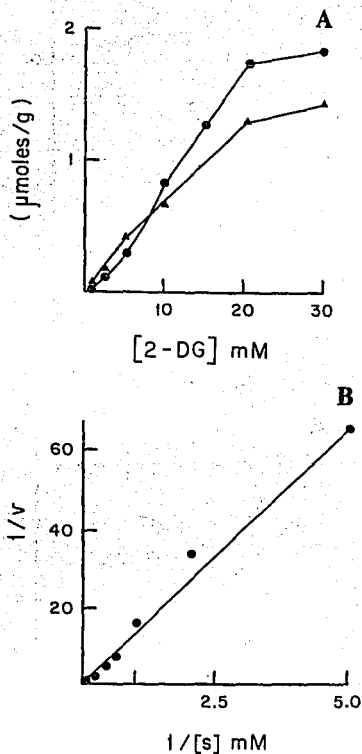
Gráfica 4. Unión específica de ouabaina en membranas totales de retina y EPR de ratas control (□) y diabéticas de 20 días (■). Los datos son el promedio \pm el error estandar de por lo menos 3 experimentos independientes. $P < 0.01$ del control.



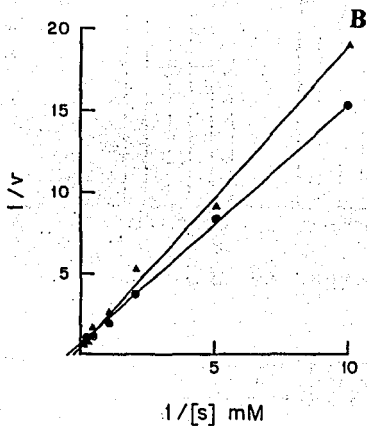
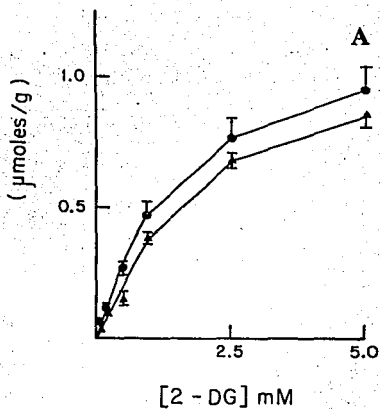
Gráfica 5. Acumulación de Ca^{45} en la retina (A) y en el EPR (B) de ratas control (o) y diabéticas de 20 días (•). Los datos son el promedio \pm el error estándar de por lo menos 3 experimentos independientes. * $P < 0.01$ con respecto del control.



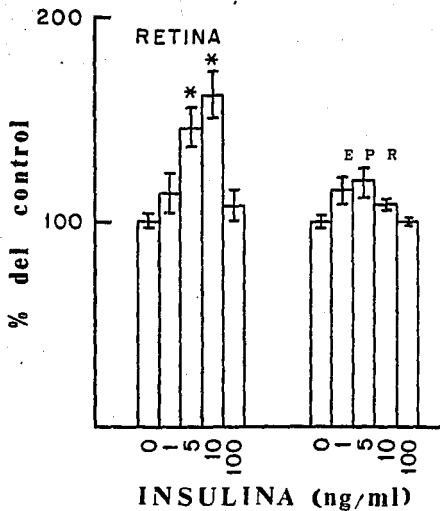
Gráfica 6. Acumulación de glucosa en la retina (▲-▲) y en el EPR (●-●) de ratas control. Los datos son el promedio \pm el error estándar de por lo menos 3 experimentos independientes.



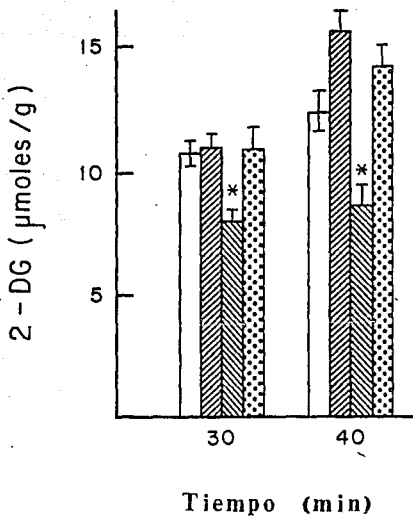
Gráfica 7. (A) Cinética de Acumulación de 2-Dexosiglucosa-³H en el EPR de ratas control (●) y diabéticas de 20 días (▲). El tiempo de incubación fue de 2 min. (B) Análisis de Lineweaver-Burke de la cinética. Los datos son el promedio de por lo menos 3 experimentos independientes.



Gráfica 8. (A) Cinética de acumulación de 2-Desoxiglucosa-³H en la retina de ratas control (●) y diabéticas de 20 días (▲). El tiempo de incubación fue de 2 min. (B) Análisis de Lineweaver-Burke de la cinética. Los datos son el promedio de por lo menos 3 experimentos independientes.



Gráfica 9. Efecto de la insulina sobre la acumulación de 2-DG-H en la retina y en el EPR de rata normal. El tejido fue incubado por 40 min. Los datos son el promedio \pm el error estándar de por lo menos 3 experimentos. * $P < 0.01$.

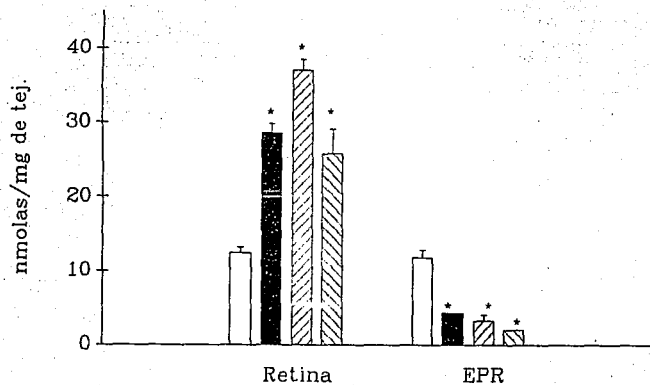


Gráfica 10. Acumulación de 2-DOG-³H en la retina de ratas control y diabéticas. Retina de ratas control (□), o de ratas diabéticas de 20 días (▨), que fueron incubados en presencia (▩) o en ausencia de insulina (▤). Los datos son el promedio ± el error estándar de 3 experimentos independientes. * P < 0.01.

Tabla 1. Efecto de diferentes compuestos sobre el transporte de DOG.

Adición	Retina ($\mu\text{mol/gr}$)	EPR
-	7.67 ± 0.18	1.26 ± 0.15
KCN (1mM)	8.03 ± 0.40	1.02 ± 0.03
Ouabaina (0.1mM)	6.38 ± 0.43	1.05 ± 0.08
Iodoacetato (1mM)	$1.88 \pm 0.08 *$	$0.59 \pm 0.04 *$
Floridizina (0.1mM)	7.46 ± 0.57	1.28 ± 0.17
Floretina (0.1mM)	$5.24 \pm 0.37 *$	$0.81 \pm 0.08 *$
Citocalacina B (10 μM)	$3.56 \pm 1.12 *$	$0.75 \pm 0.04 *$
Baja temperatura (4°C)	$0.19 \pm 0.02 *$	$0.16 \pm 0.02 *$
Medio libre de sodio	$0.97 \pm 0.07 *$	1.08 ± 0.01

El tejido es incubado por 20 minutos en medio Krebs bicarbonato con 5mM de glucosa en presencia de DOG (0.5 μCi). Cada valor es la media \pm S.E.M. de al menos tres experimentos. * $P < 0.01$ con respecto al control.

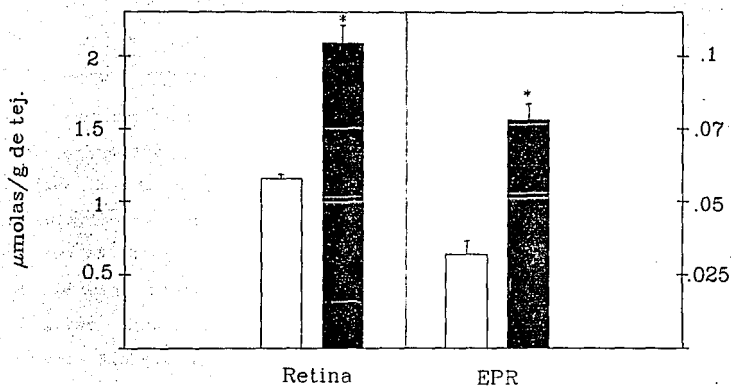


Gráfica 11. Relación lactato/piruvato en la retina y el EPR de ratas control (□), diabéticas de 7 días (■), de 20 días (▨) y de 45 días (▩). Los datos son el promedio de por lo menos 3 experimentos independientes \pm el error estándar. * $P < 0.01$ con respecto a las control.

**TABLA 2.- NIVELES DE LACTATO Y PIRUVATO
(nMOLAS / mg DE TEJIDO)**

	RETINA	EPITELIO PIGMENTARIO
CONTROL		
Lactato	1.6 ± 0.48	1.72 ± 0.27
Piruvato	0.13 ± 0.04	0.17 ± 0.05
L/P	12.42 ± 0.77	11.79 ± 1.011
7 DÍAS		
Lactato	4.02 ± 0.02	0.639 ± 0.03
Piruvato	0.142 ± 0.011	0.19 ± 0.02
L/P	28.57 ± 1.29	4.24
14 DÍAS		
Lactato	2.72 ± 0.95	2.79 ± 0.9
Piruvato	0.234 ± 0.096	0.47 ± 0.08
L/P	13.89 ± 2.59	8.070 ± 0.86
20 DÍAS		
Lactato	3.5 ± 0.62	0.9 ± 0.28
Piruvato	0.093 ± 0.011	0.283 ± 0.44
L/P	37.06 ± 1.46	3.16 ± 0.84
45 DÍAS		
Lactato	1.595 ± 0.15	0.46
Piruvato	0.062 ± 0.006	0.24
L/P	25.77 ± 3.24	1.19

Los niveles de estos metabolitos fueron cuantificados enzimáticamente en la retina y EPR de ratas control y diabéticas, de 7, 14, 20 y 45 días. Los resultados son expresados como la media de por lo menos 3 experimentos independientes ± el error estándar. *P < 0.01.



Gráfica. 12. Actividad de la LDH en la retina y el EPR de ratas control (□) y diabéticas de 20 días (■). Los datos son el promedio \pm el error estándar de por lo menos 3 experimentos independientes. * $P < 0.01$ con respecto al control.

DISCUSION

El EPR junto con las células endoteliales de los vasos retinianos, participa en la formación de la barrera hematorretiniana, la cual regula el paso de sustancias de y hacia la retina.

En los pacientes con diabetes mellitus, el rompimiento de esta barrera, se ha reportado que puede ocurrir previo a la manifestación clínica de la retinopatía diabética. Sin embargo, el origen de este defecto aún está en controversia, por lo que en este trabajo se estudiaron los cambios en la permeabilidad de esta barrera a través de la distribución de fluoresceína en la retina de la rata durante diferentes tiempos de inducida la diabetes.

Nuestros resultados demuestran un cambio en la permeabilidad del EPR evidenciado por el paso de fluoresceína hacia la retina. Desde los 7 días de inducida la diabetes, se observó un aumento en la acumulación de fluoresceína, especialmente en la zona externa de la retina. A tiempos largos de inducida la diabetes, se observó fluoresceína también en la zona interna de la retina. Resultados similares, aunque a tiempos más largos (1 mes), se obtuvieron en animales diabéticos y galactosémicos, en los que se encontró el paso libre de fluoresceína, peroxidasa de rábano (Kirber, 1980) y de albúmina (Vínóres, 1988, 1989, 1990) hacia la retina.

Los estudios de microscopía electrónica indican alteraciones en la estructura de la membrana apical y basal del EPR, que pueden ser la causa del aumento en la difusión de fluoresceína y probablemente de otros compuestos potencialmente tóxicos, lo que lleva a alteraciones en la capa nuclear externa de la retina y particularmente

en los segmentos externos de los fotorreceptores.

ACUMULACION DE AMINOACIDOS

La concentración de los aminoácidos libres parece ser un factor importante en el metabolismo de las células nerviosas, de esa manera, se ha observado que en algunas patologías los cambios en dicha concentración afectan la síntesis de diversos neurotransmisores (Latja, 1980; Bito, 1977).

En la retina de ratas diabéticas, las alteraciones en la estructura de los fotorreceptores pueden estar asociadas a la disminución en los niveles endógenos de taurina, aminoácido esencial para la viabilidad de estas células (Hayes, 1975). El aumento en la acumulación de taurina (40%), observada en la retina de ratas diabéticas puede ser un mecanismo de compensación por la pérdida del mismo.

Las alteraciones estructurales de los fotorreceptores de la retina de animales diabéticos, seguramente afectan a las neuronas subsiguientes en la vía de comunicación, por lo que decidimos estudiar la acumulación de aminoácidos neurotransmisores, la cual es un reflejo de la función retiniana.

En la retina de ratas diabéticas se observó una disminución en los niveles de acumulación de aspartato, mientras que la acumulación de glutamato no cambió en forma significativa. La diferencia del efecto de la diabetes sobre la acumulación de estos aminoácidos, sugiere que aunque estos aminoácidos son transmisores excitadores en la retina, estos pueden estar localizados en diferentes regiones o confinados a diferentes tipos celulares (Salceda y Vilchis, 1994).

Otra posibilidad es que la acumulación del glutamato no se modifique debido a la importante actividad metabólica de este aminoácido, y la presencia de una variedad de mecanismos que pueden regular su concentración.

La disminución en la acumulación de aspartato podría deberse a la acidosis regional provocada por la diabetes (Sutherland, 1990; Cringle, 1992), ya que se ha demostrado que cuando existe hipoxia regional disminuye el pH, condiciones bajo las cuales se revierte el sistema de recaptura de los transmisores y aumenta su liberación (Madl, 1994). Sin embargo, estos cambios no parecen afectar los sistemas de acumulación del glutamato y de la glicina. Resulta interesante que aunque la acumulación de estos aminoácidos no se afectó; los niveles endógenos de éstos y en general de todos los aminoácidos disminuyó de un 30 a un 50%. Esta disminución puede estar asociada a la liberación de aminoácidos inducida por las altas concentraciones de glucosa().

Los niveles endógenos de aminoácidos en el EPR de ratas diabéticas variaron considerablemente con respecto a los de los animales control, aunque no siguen un patrón general. Los niveles de taurina disminuyeron, de acuerdo con los resultados reportados en las células del EPR en cultivo, en presencia de altas concentraciones de galactosa (Reddy, 1992).

En forma semejante a lo que ocurre en la retina, la acumulación de aspartato en el EPR de animales diabéticos disminuyó, mientras que la de la taurina aumentó.

Estos resultados sugieren una alteración general en el

metabolismo de la célula, provocado por la diabetes.

ACTIVIDAD DE LA ATPasa $\text{Na}^+\text{-K}^+$

La ATPasa $\text{Na}^+\text{-K}^+$ es una enzima que mantiene los gradientes de sodio y potasio, a través de la membrana y modificaciones de su actividad se han relacionado con los defectos en la conducción nerviosa en animales diabéticos (Greene y Lattimer, 1989).

Nuestros resultados no mostraron cambios significativos en la actividad, o en la cantidad de la ATPasa $\text{Na}^+\text{-K}^+$ en el EPR de ratas diabéticas; en contraste a la disminución de la actividad de esta enzima reportada en el EPR del conejo diabético (McGregory y Matschincky, 19886). En la retina de ratas diabéticas, se observó a tiempos cortos de inducida la diabetes, una disminución en la actividad de esta enzima; resultados similares se han observado en la retina del conejo diabético (McGregory y Matschinsky, 1986), y en la retina de ratas diabéticas espontáneas (Eichberg, 1993); así como en las células endoteliales y en los pericitos de los vasos de la retina en cultivo, en presencia de altas concentraciones de glucosa (Lee, 1989; Berweck, 1993).

La disminución en la actividad de la ATPasa $\text{Na}^+\text{-K}^+$ observada en la retina, parece ser un reflejo de la disminución en la cantidad de la enzima o de alguna de sus isoformas, ya que la unión de ouabaina disminuye de igual manera. En relación a esta disminución, se ha observado que la enzima puede sufrir glucosilación en el dominio de unión a los cationes (Tehrani, 1990). Tales alteraciones en su estructura, puede modificar la actividad total y selectivamente afectar la sensibilidad de la enzima a la ouabaina (Garner y Spector,

1985), 1986; Fedorak, 1991).

Por otro lado, la disminución de la actividad de la ATPasa $\text{Na}^+\text{-K}^+$ en una variedad de tejidos de animales diabéticos, se ha asociado con alteraciones en la actividad de la proteína cinasa C (PKC). Green y col. (1986), encontraron que activadores de la PKC, llevan a un aumento de la actividad de la ATPasa $\text{Na}^+\text{-K}^+$ del nervio periférico, a valores cercanos a los observados en animales normales. La relación entre estas proteínas se desconoce, sin embargo, se ha propuesto que la PKC altera la fosforilación de la ATPasa $\text{Na}^+\text{-K}^+$, ejerciendo un efecto modulador sobre la actividad de ésta.

Adicionalmente, se ha observado un aumento en la peroxidación de lípidos de la membrana durante la diabetes (Murata, 1981), lo que puede modificar el ambiente lipídico de la ATPasa $\text{Na}^+\text{-K}^+$ causando dicha disminución en su actividad.

ACUMULACION DE Ca^{45}

Los resultados obtenidos en el presente estudio mostraron un aumento en la acumulación de Ca^{45} en la retina de ratas diabéticas. Resultados que son similares a los reportados en aorta de ratas diabéticas (Fleckenstein, 1987; Sada, 1990 y Ohara, 1991). El aumento en la acumulación de Ca^{45} puede ser un resultado de la disminución en la actividad de la ATPasa $\text{Na}^+\text{-K}^+$, ya que provoca una disminución en el gradiente iónico del sodio, que a su vez puede disminuir la actividad de la ATPasa $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$.

Por otro lado, el aumento en la acumulación de Ca^{45} quizá se deba a la disminución de la actividad de la ATPasa $\text{-Ca}^{2+}\text{-Mg}^{2+}$, como se encontró en la retina de ratas diabéticas y galactosémicas (Kern,

1994).

El aumento en la acumulación de Ca^{45} observado, puede llevar a un aumento en las concentraciones intracelulares de calcio libre, efecto que se conoce, produce modificaciones en la síntesis de ATP, la activación de enzimas degradativas dependientes de calcio (Choi, 1987; Campbell, 1987), el aumento de reacciones mediadas por radicales libres, y daño de las membranas celulares; modificaciones que pueden llevar a la muerte celular.

ACUMULACION DE GLUCOSA

El EPR como parte de la barrera hematorretiniana regula el intercambio de sustancias entre la coroides y la retina. Particularmente importante es el transporte de glucosa a través de este epitelio, ya que es la principal fuente de energía de la retina (Ames y Gurian, 1963; Winkler 1972).

El transporte de glucosa preferencialmente ocurre en los diferentes tipos celulares a través de un sistema facilitado mediado por un sistema acarreador (Elbrik y Biher, 1975). Recientemente se ha demostrado la existencia de una familia de transportadores diferentes, con homologías en su secuencia primaria, cuya velocidad parece estar regulada por la insulina y otras hormonas (Olefsky, 1978). La actividad de estos transportadores puede estar modificada en enfermedades como la diabetes (Gould, 1990; Gould, 1991; Nishimura, 1993).

Nuestros resultados, en concordancia con estudios previos (Zadunasky y Degran, 1976; Miller y Steinberg, 1976 y Pascuzzo; 1980), muestran que la 2-DOG en el EPR se acumula a través de un sistema mediado por acarreador y dependiente de energía, evidenciado por su

inhibición en presencia de Iac y KCN. La cinética de acumulación de 2-DOG es compleja, lo que podría explicarse a través de interacciones alostéricas del propio transportador o a la interacción entre los diferentes tipos de transportadores. Recientemente se reportó, la presencia de los genes de los transportadores de glucosa 3, 5 y 1 en las células del EPR (Hsu y Molday, 1991).

La acumulación de 2-DOG en este tejido es independiente de sodio, ya que no fue afectada en ausencia de este ión o en presencia de ouabaina, inhibidor de la ATPasa de $\text{Na}^+\text{-K}^+$, resultados que están de acuerdo con los encontrados en el EPR del gato (Steinberg, 1978).

Adicionalmente, la acumulación de 2-DOG se inhibió notablemente en presencia de citocalasina B y floretina, inhibidores de la acumulación de la glucosa en diferentes sistemas; mientras que no se modificó en presencia de flordizina. La diferencia en la potencia de inhibición de la floretina y la flordizina podría ser explicada por la diferente sensibilidad de los transportadores a estas drogas.

En el EPR de ratas diabéticas, la acumulación de 2-DOG presentó una cinética de saturación normal, estos resultados sugieren la posibilidad de que las altas concentraciones extracelulares de glucosa y/o la presencia de insulina puedan alterar la actividad del transportador(es). En este sentido, se reportó que las concentraciones elevadas de glucosa disminuyen la síntesis y actividad del transportador de glucosa en células endoteliales en cultivo (Kalcker, 1973; Sason, 1980; Walker, 1989; Kovisto, 1991). Por otro lado, la presencia de insulina en el medio de incubación, no modificó los niveles de acumulación de 2-DOG en el EPR de ratas diabéticas.

La acumulación de 2-DOG en la retina es considerablemente mayor a la observada en el EPR. Los resultados indican que la 2-DOG se acumula a través de un sistema de transporte sensible a temperatura y dependiente de energía.

La inhibición de la acumulación de 2-DOG en ausencia de sodio o en presencia de ouabaina, sugieren la presencia de un cotransportador sodio-glucosa en la retina, aunque el transporte no se afectó por floridizina, inhibidor específico de este tipo de cotransportadores (Wright, 1992).

La acumulación de 2-DOG en la retina de ratas diabéticas presentó una afinidad menor (5mM), que la observada en las ratas normales (2.5 mM), si bien la diferencia no es notable, las diferencias son semejantes a las obtenidas en el cerebro de la rata (Cjedde y Crone 1991). Estos resultados sugieren que las altas concentraciones de glucosa en el plasma pueden regular la actividad del transportador de glucosa en la retina.

La presencia de un sistema acarreador de glucosa sensible a insulina en la retina, es apoyado por el aumento en la acumulación de 2-DOG provocado por esta hormona en la retina de ratas normales, así como por la disminución de los niveles de acumulación de 2-DOG en la retina de las ratas diabéticas y su reestablecimiento a los niveles normales en presencia de insulina. El aumento en la acumulación de 2-DOG por insulina requiere de largos periodos de incubación (30 min), lo que sugiere que el mecanismo es a través de incorporar el transportador de vesículas citoplasmáticas a la membrana plasmática, como ocurre con los adipocitos (Olefsky, 1978), o bien a un efecto

estimulador de la capacidad del transportador.

La necesidad de largos periodos de exposición a insulina para provocar una respuesta sugieren que la insulina regula la acumulación de glucosa en la retina en forma tónica. Esta regulación tónica puede operar a largo plazo para regular la velocidad del metabolismo de glucosa, en forma similar a lo observado en fibroblastos y células endoteliales en cultivo (Olefsky, 1978; Allen, 1986).

En general, los resultados sugieren la presencia de diferentes tipos de transportadores de glucosa en la retina y en el EPR, transportadores que pueden ser afectados por la insulina y/o por las altas concentraciones de glucosa y que pueden estar relacionados a la manifestación de la retinopatía diabética.

NIVELES DE LACTATO Y PIRUVATO.

La disminución en la acumulación de glucosa en la retina de ratas diabéticas, sugiere un desequilibrio en su utilización por la vía oxidativa y/o fermentativa.

En animales diabéticos, la concentración de glucosa en la sangre, aumentó de 3 a 5 veces. Bajo estas condiciones, los niveles de lactato en la retina aumentan 3 veces en la retina, sin que se observaran cambios en los niveles de piruvato. El aumento en las concentraciones de lactato en la retina, es similar a lo reportado en el riñón (Tilton, 1992), aorta (Morrison, 1972) y células endoteliales de la retina en cultivo, en presencia de altas concentraciones de glucosa (Lee, 1989).

El aumento en la relación lactato/piruvato refleja un desequilibrio metabólico asociado a la producción y acumulación de

equivalentes reducidos. (en la forma de NADH) (Dawson, 1993). Asimismo, se favorece la formación de especies oxigenadas reactivas, provocando estres oxidativo (Dawson, 1993; Williamson, 1993). Lo cual también afecta la actividad de numerosas enzimas que usan estos como cofactores en reacciones acopladas de oxido-reducción (Williamson, 1993).

El incremento en la relación NADH/NAD favorece la conversión de piruvato a lactato, lo cual podría explicar el aumento en la actividad de la LDH observado en la retina de ratas diabéticas.

Por otro lado, el aumento en los niveles de lactato puede estar asociado a una disminución en el consumo de oxígeno en la retina, misma que se ha reportado en animales diabéticos (Sutherland, 1990; Cringle 1992). Adicionalmente, este aumento en los niveles de lactato, probablemente sobresaturan el sistema acarreador causando su acumulación en el tejido (Bito, 1970). Aunado al incremento en los niveles de lactato, ocurre un aumento en la acumulación de CO_2 , estos dos factores son responsables de la caída del pH; que resulta en una acidosis regional que a su vez puede provocar un incremento en la liberación de los neurotransmisores (Madl, 1994).

En contraste a la retina, en el EPR la relación lactato/piruvato disminuye en animales diabéticos, lo que puede resultar en una reducción en la energía requerida para sus funciones.

Los cambios en la relación lactato/piruvato en la retina de animales diabéticos indican que las células son incapaces de oxidar NADH a NAD. Aunado a estos resultados, se ha reportado una disminución en la disponibilidad de oxígeno (Sutherland, 1990), lo que debe causar

un aumento en los niveles de NADH, por lo que seguramente lleva a una disminución de la carga energética de las células, que se refleja en los cambios estructurales y funcionales observados en este trabajo.

CONCLUSIONES.

La retina y el EPR de rata, presentaron alteraciones morfológicas tempranas en el desarrollo de la diabetes.

Asociado a dichos cambios se observaron alteraciones en el transporte de aminoácidos, de glucosa y de iones, tanto en la retina como en el EPR.

El transporte de glucosa en la retina de la rata es modulado por la presencia de insulina; congruente con estos resultados la diabetes disminuyó su acumulación.

Los cambios observados en la permeabilidad del EPR, pueden favorecer el paso libre de sustancias tóxicas hacia la retina, que inducen daño en la retina neural.

La relación lactato/piruvato en la retina de animales diabéticos aumento, mientras que en el EPR disminuyó. Estos cambios se presentaron paralelamente a los cambios estructurales, lo que sugiere que el metabolismo general de las células se altera e induce daño celular que esta relacionado a la retinopatía diabética.

Los resultados de este trabajo, pueden ser la base de estudios posteriores encaminados a esclarecer la localización del o los transportadores sensibles a insulina en la retina, así como su modulación.

Por otro lado, profundizar en los mecanismos que llevan a la pérdida de la polaridad de la membrana del EPR.

Y por último, conocer la relación existente entre los daños celulares observados y los cambios en el metabolismo celular.

BIBLIOGRAFIA.

Allen, L. A. y Gerristen, M. E. (1986). Regulation of hexose transport in cultured bovine retinal microvessels endothelium by insulin. *EXP. EYE RES.* 43: 679-686.

Ames III, A. y Gurian, B. S. (1963). Effects of glucose and oxygen deprivation on function of isolated mammalian retina. *J. NEUROPHYSIOL.* 26: 617-634.

Anderson, R. E. y Sperling, L. (1971). Lipids of ocular tissues. VII Positional distribution of the fatty acids in the phospholipids of bovine retina rod outer segments. *ARCH. BIOCHEM. BIOPHYS.* 144: 673-677.

Alvarez, R. A., Bridges, C. D. B. y Fong, S. L. (1981). High-pressure liquid chromatography of fatty acid esters of retinol isomers. Analysis of retinyl esters stored in the eye. *INV. OPHTHALMOL. VIS. SCI.* 20: 304-312.

Arden, G., Hamilton, M. y Wilson-Holt, J. (1986). Pattern electroretinograms become abnormal when background diabetic retinopathy deteriorates to a proliferative stage. Possible use as a screening test. *BR. J. OPHTHALMOL.* 70: 330.

Barbour, B., Brew, H. y Attwell, D. (1988). Electrogenic glutamate uptake in glial cells is activated by intracellular potassium. *NATURE.* 325 (29): 433-435.

Basu, P. K., Sarkar, P., Menon, I., Carre, F. y Persad, S. (1983). Bovine retinal pigment epithelial cells cultured in vitro: Grow characteristics, morphology, chromosomes, phagocytosis ability tyrosinase activity and effect of freezing. *EXP. EYE RES.* 36:671-683.

Baylor, D. A., Lam, T.D. y Yau, K. W. (1979). The membrane current of single rod outer segments. *J. PHYSIOL (LONDON).* 288:589-611.

Berweck, S, Thieme, H., Helbing, H. (1993). Effect of elevated glucose concentration on membrane voltage regulation in retinal capillary pericytes. *DIABETES.* 42:1347-1350.

Berman, E. R. (1979). Biochemistry of the retinal pigment epithelium. Cap VI En: Zinn, K. M. y Marmor M. F. (eds). *THE RETINA PIGMENT EPITHELIUM.* Harvard Univ. Press. England 83-102.

Besharse, J. C. y Dunis, D. A. (1983). Rod photoreceptor disc shedding in eye cups: Relationship to bicarbonate and amino acids. *EXP. EYE RES.* 36: 567-580.

Bito, L., deRousseau, C. J. (1980). Transport functions of the blood-retinal barrier system and the microenviroment of the retina.

En: THE BLOOD RETINAL BARRIERS. Cunha-Vaz, J. G. Nueva York, Plenum Press, 133.

Bonting, S. L., Simon, K. A. y Hawkins, N. M. (1961). Studies on sodium-potassium-activated adenosine triphosphatase. 1. Quantitative distribution in several tissues of the cat. ARCHS. BIOCHEM. BIOPHYS. 95:416.

Bridges, C. D. B., Alvarez, R. A. y Fong, S. L. (1982). Vitamin A in human eyes: Amount, distribution and composition. INV. OPHTHALMOL. VIS. SCI. 22:706-714.

Brown, K. T. (1968). The electroretinogram: It's components and their origins. VISION RES. 8:633-677.

Brunette, M., Vegneault, N. y Danan, G. (1978). New fluorometric method for determination of picomoles of inorganic phosphores. Application to the renal tubular fluid. ANAL. BIOCHEM. 86: 229-237.

Campbell, A. K. (1987). Intracellular calcium: Friend or foe? Clin Sci. 72:1-10

Caldwell, R. B., Slapnick, S. M. y McLaughlin, J. (1987). Quantitative freeze-fracture and filipin-binding study of retinal pigment epithelial-cell basal membranes in diabetic rats. EXP. EYE RES. 44:245-259.

Chakrabarti, S. y Sima, A. A. F. (1989). Effect of aldose reductase inhibition and insulin treatment on retinal capillary basement membrane thickening in BB rats. DIABETES. 38:(9):1181-1185.

Choi, D. W. (1987). Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. J. NEUROSCI. 7: 369-379.

Clark, V. M. (1986). The cell biology of the retinal pigment epithelium. En: Adler R. y Farber, D. (eds). THE RETINA PART II. Academic Press., Florida. 129-168.

Cohen, G. (1984). Oxy-radical production in alloxan-induced diabetes:un example of an in vivo metal-catalyzed Harber-Weiss reaction in FREE RADICALS IN MOLECULAR BIOLOGY. Armstrong D., Sohal, R. S.(eds) Raven Press, New York, 307-316.

Cringle, S., Yu, D-Y., Alder, V. y Su, E-N. (1992). Oxygen tension and blood flow in the retina of normal and diabetic rats.

Cunha-Vaz, J. (1980). Sites and Function of the Blood Retinal Barriers. En: THE BLOOD-RETINAL BARRIERS. Cunha-Vaz, J. (ed) Plenum Press, New York.

Davis, M. D. (1988). Diabetic Retinopathy: A clinical Overview. DIABETES/METABOLISM REVIEWS. 4: (4): 291-322.

Davson, H. (1980). PHYSIOLOGY OF THE EYE. Academic Press. New

York. 1-30.

Dawson, T. L.; Gores, G. S.; Nieminen, B. y Lemasters J. J. (1993). Mitochondria as a source of reactive oxygen species during reductive stress in rat hepatocytes. AM. J. PHYSIOL. C961-C967.

Doly, M., Braquet, P., Bonhomme, B. y Meyniel, G. (1984). Effects of lipid peroxidation on the isolated rat retina. OPHTHALMIC RES. 16: 292-296.

Dowling, J. E. (1960). Chemistry of visual adaptation in the rat. NATURE. 188:114-118.

Dowling, J. E. y Ehinger, B. (1978). The interplexiform cells system. I. Synapses of the dopaminergic neurons of the goldfish retina. PROC. R. SOC. LOND. [BIOL.] 201:7-26.

Dowling, J. E. (1979). Organization of vertebrate retinas. INVEST. OPHTHALMOL. VIS. SCI. 9:655-680.

Dryja, T. P., O'Neil-Dryja, M., Pawelek, J. M. y Albert, D. M. (1978). Demonstration of tyrosinase in the adult bivariate tract and retinal pigment epithelium. INVEST. OPHTHALMOL. VIS. SCI. 18: 231-236.

Eichberg, J., Mathew, J., Fox, D. y Ottlecz, A. (1993). Phosphoinositide metabolism and $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase activity are altered in nerve and retina from the Zucker diabetic rat DIABETES. 42: 101.

Edwards, R. B. (1977). Accumulation of taurine by cultured retinal pigment epithelium of the rat. INVEST. OPHTHALMOL. VISUAL SCI. 16: (3): 201.

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

Engerman, R. L. (1989). Pathogenesis of diabetic retinopathy. DIABETES. 38:1203-1206.

Fedorak, N. R., Cortas, N. y Field, M. (1991). Diabetes mellitus and Glucagon alter Ouabain-Sensitive $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase in Rat small intestine. DIABETES. 40:1603-1608.

Fesenko, E. E., Kolesnikov, S. S. y Lyubarsky, A. L. (1985). Induction by cyclic GMP of cationic conductance in plasma membrane of retinal rod outer segment. NATURE 313:310-311.

Fleckenstein, A., Frey, M., Zorn, J. y Flackenstein-Grun, G. (1987). The role of calcium in the pathogenesis of experimental arteriosclerosis. TRENDS PHARMACOL. SCI. 8:190-195.

Fricke, U. (1975). Tritosol: a new scintillation cocktail based on triton X-100. ANAL. BIOCHEMISTRY. 63:481-485.

Garner, M. H. y Spector, A. (1985). A glucose-6-phosphate

modification of bovine renal Na-K, ATPase. A model for changes occurring in the human renal medulla in diabetes. *BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN.* 131: 206-211.

Garner, M. H. y Spector, A. (1986). ATP hydrolysis kinetics by Na, K-ATPase in cataract. *EXP. EYE RES.* 42:339-348.

Geddes, J. W. y Wood, J. D. (1984). Changes in the Amino Acid Content of Nerve Endings (Synaptosomes) Induced by drugs that alter the Metabolism of glutamate and γ -Aminobutyric Acid. *J. NEUROCHEM.* 42: 16-24.

Gjedde, A. y Crone, C. (1981). Blood-brain glucose transfer: expression in chronic hyperglycemia. *SCIENCE.* 214:456-457.

Gould, G. W. y Bell, G. I. (1990). Facilitative glucose transporters: an expanding family. *TRENDS BIOCHEM.* 15:18-23.

Gould, G. W., Thomas, H. M., Jess, T. J. y Bell, G. I. (1991). Expression of human glucose transporters in *Xenopus* oocytes: Kinetic characterization and substrate specificities of the erythrocyte, liver and brain isoforms. *BIOCHEM.* 30:5139-5145.

Granit, R. (1947). *SENSORY MECHANISMS OF THE RETINA.* London Oxford University Press.

Greene, D. A. y Lattimer, S. A. (1989). Role of defective (Na, K)-ATPase Regulation in the Pathogenesis of Diabetic Complications in COMPLICATIONS OF DIABETES MELLITUS. 31-36.

Green, A. y Johnson, J. L. (1991). Evidence for impaired coupling of receptor to Gi protein in adipocytes from streptozotocin-induced diabetic rats. *DIABETES.* 40:88-94.

Crosson, C. E. y Pautler, E. L. (1982). Glucose transport across isolated bovine pigment epithelium. *EXP. EYE RES.* 35:371-377.

Hayes, K. C., Carey, R. E. y Schmidh, S. Y. (1975). Retinal degeneration associated with taurine deficiency in the cat. *SCIENCE* 188:949-951.

Hertz, L. (1976). Potassium effects on transport of amino acids, inorganic ions and matter; ontogenic and quantitative differences In: Leville, Battstin, L. y Lajtha, A: (Eds.) *TRANSPORT PHENOMENA IN THE NERVOUS SYSTEM. PHYSIOLOGICAL AND ASPECTS PATHOLOGICAL.* Adv. Exp. Med. Biol. 69:371-383.

Hsu, S. C. y Molday, R. S. (1991). Glycolytic enzymes and a GLUT 1 glucose transporter in the outer segments of rod and cone photoreceptor cells. *J. BIOL. CHEM.* 266: 21745-21752.

Hultman, S. (1959). *NATURE (LONDON).* 183:108.

Johnson, B. J. (1960). *METHODS IN ENZIMOLOGY* 7610-618.

Kador, P. F., Kinoshita, J. H., Tung, W. H. y Chylack Jr. L. T. (1980). Differences in the susceptiblity of various aldose reductases to inhibition II. INVEST. OPHTHALMOL. VIS. SCI. 19:980-982.

Kador, P. F., Akagi, I., Terubayashi, H. (1988). Prevention of pericyte ghost formation in retinal capillares of galactose-fed dogs by aldose reductase inhibitors. ARCH. OPHTHALMOL., 106:1099-1102.

Kador, P. F., Robinson Jr. W. G. y Kinoshita, J. H. (1985). The phamacology of aldose reductase inhibitors ANN. REV. PHARMACOL. TOXICOL. 25:691-714.

Kalckar, H. y Ullrey, D. (1973). Two distinct types of enhancement of galactose uptake into hamster cells: Tumorvirus transformation and hexose starvation. PROC. NATL. ACAD. SCI. USA. 70: 7502-7504.

Kaneko, A. (1973). Receptive field organization of bipolar and amacrine cells in the goldfish retina. J. PHYSIOL. 235:133-153.

Kathami, M. y Rockey, J. (1988). Regulation of Uptake of Inositol by Glucose in Cultured Retinal Pigment Epithelial Cells. BIOCHEM. CELL BIOL. 66: 951-957.

Kern, T. S., Kowluru, R. A. y Engerman, R. L. (1994). Abnormalities of retinal metabolism in diabetes or galactosemia: ATPases and Glutathione. INV. OPHTHALMOL. VIS. SCI. 35:7:2962-2967.

Kirber, W.; Charles, M. D.; Nichols, M. D., Grimes, P. A.; Winegrad, A. y Laties, M. D. (1980). A Permeability Defect of the Retinal Pigment Epithelium. Occurrence in Early Streptozotocin Diabetes. ARCH OPHTHALMOL. 98:725-728.

Korenbrot, J. I. y Cone, R. A. (1972). Dark ionic flux and the effects of light in isolated rod outer segments. J. GEN. PHYSIOL. 60:20-45.

Kornzweig, A. L. (1979). Aging of the retinal pigment epithelium. Cap. XXVI En: Zinn, K. M. y Marmor, M. F. (eds) THE RETINAL PIGMENT EPITHELUM. Harvard Univ. Press. England 478-495.

Koivisto, U. M., Martínez-Valdez, H., Bilan, P. (1991). Differential regulation of the GLUT-1 and GLUT-4 glucose transport systems by glucose and insulin in L6 muscle cells in culture. J. BIOL. CHEM. 266: 2615-2621.

Korte, G. E. (1989). Epithelium capillary interactions in the eye. The retinal Pigment Epithelium and the coriocalillares. En: INTERNATIONAL REVIEW OF CYTOLOGY. Academic Press. 114.

Kufler, S. W. (1953). Discharge paterns and functional organization of mammalian retina. J. NEUROPHYSIOL. 16:37-68.

Kuwabara, T. (1969). Blood vessels in the normal retina. En. THE

RETINA. Straatsma (ed) California Press. Los Angeles.

Lake, N., Marshall, J. y Voaden, M. J. (1977). The entry of taurine into the neural retina and pigment epithelium of the frog. BRAIN RES. 128: 497.

Lamprecht, W. y Heinz, F. (1983). en METHODS OF ENZIMATIC ANALYSIS (Bermeyer, J. y Grabl, M. (eds) Vol. 6 570-577.

Larsen, H. W. (1960). Diabetic retinopathy. An ophthalmoscopic study with a discussion of the morphologic changes and the pathogenetic factors in this disease. ACTA OPHTHALMOL. (COPENHAGEN). 60:1-89.

Laties, A. M., Grimes, P. A., Rapoport, S. I. (1980). Acute hypertension and experimental diabetes: evaluation of their effects on blood-ocular barriers. En: THE BLOOD RETINAL BARRIERS. Cunha-Vaz J. G. (ed). New York, Plenum Press.

Latja, A. y Sershen, H. (1980). Alterations of amino acid transport in the central nervous system. En: THE BLOOD-RETINAL BARRIERS. Cunha-Vaz (ed). Plenum Press. New York. 119-132.

Lauritzen, T., Larsen, H. W., Frost-Larsen, K., Deckert, T. and the Steno Study Group (1983). Effect of 1 year of near-normal blood glucose levels on retinopathy in insulin-dependent diabetes. LANCET. 1:200-204.

Lee, T. S., MacGregor, L. C., Fluharty, S. J. y King, G. L. (1989). Differential regulation of protein kinase C and (Na^+-K^+) -adenosine triphosphatase activities by elevated glucose levels in retinal capillary endothelial cells. J. CLIN. INVEST. 83:90-94.

Lee, T. S., Saltsman, K. A., Ohashi, H. y King, G. L. (1989). Activation of protein Kinase C by elevation of glucose concentration: Proposal for a mechanism in the development of diabetic vascular complications. PROC. NATL. ACAD. SCI. USA. 86:5141-5145.

Lenda, K. y Svenneby, G. (1980). Rapid high-performance liquid chromatographic determination of amino acids in synaptosomal extracts. J. CHROMATOGRAPHY. 198:516-519.

Li, H. B., Marshak, D. W., Dowling, J. E. y Lam, D. M. K. (1986). Colocalization of immunoreactive substance P and neurotensin in amacrine cells of the goldfish retina. BRAIN RES. 366:307-313.

Li, W., Tang, L., Zhou, Q., Qin, M. y Hu, T. (1989). Attenuation of phosphoinositidase activity and phosphatidylinositol biphosphate level of bovine retinal capillary pericytes in high glucose. EXP. EYE RES. 48:99-106.

Lowry, O. H., Rosebrough, A., Farr, L. y Randall, R. J. (1951). Protein Measurement with the folin phenol reagent. J. BIOL. CHEM. 193: 265-275.

MacGregor, C. L., Rosecan, L. R., Laties, A. M. y Matschinnsky, F. M. (1986). Alteres retinal metabolism in diabetes. Microanalysis of lipid, glucose, sorbitol and myo-inositol in the coroid and in the individual layers of the rabbit retina. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY. 261:(9):4046-4051.

Mackerer, C. R., Paquet, R. J., Mehlman, M. A. y Tobin, R. B. (1971). Oxidation and phosphorylation in liver mitochondria from alloxan and streptozotocin diabetic rats. PROC. SOC. EXP. BIOL. 137: 992-995.

Madl, J. F. (1994). Hypertemia and acidosis-induced ATP depletion releases glutamate by reversal of cotransporters. 24TH ANNUAL MEETING NEUROSCIENCE. Nov. 13-18. pp. 274.

Maher, F. y Harrison, L. (1990). Hexose specificity for downregulation of Hep G2/brain type glucose transporter gene expression in L6 myocytes. DIABETOLOGIA. 33: 641-648.

Marc, R. E., Lam, D. M. K. y Stell, W. L. (1979). Glycinergic pathways in the goldfish retina. PROC. NATL. ACAD. SCI. U.S.A. 78:435-447.

Masterson, E. y Chader, G. J. (1981). Characterization of glucose transport by cultured chick pigmented epithelium. EXP. EYE RES. 32:279-289.

Masterson, E., Israel, P. y Chader, G. I. (1978). Pentose shunt activity in developing chick retina and pigment epithelium: A switch in biochemical expression in cultures pigment epithelial cells. EXP. EYE RES. 27: 409-416.

Matsumoto, B., Defoe, D. M. y Besharse, J. C. (1987). Membrane turnover in rod photoreceptors: Ensheatment and phagocytosis of outer segment distal tips by pseudopodia of the retinal epithelium PROC. ROY. SOC. LONDON SER. B. 230:339-354.

McCall, (1992). A. (1992). The Impact of Diabetes on the CNS. DIABETES. 41:557-570.

Miceli, M. V. y Newsome, D. A. (1991). Cultured Retinal Pigment Epithelium cells from donors with type I Diabetes show an altered insulin response. INV. OPHTHALMOL. VIS. SCI. 32:(11): 2847-2853.

Miller, S. y Steinberg, R. H. (1976). Transport of taurine, L-methionine and 3-O-Methyl-D-glucose across frog retinal pigment epithelium. EXP. EYE RES. 23:177-189.

Miller, S. S., Hughes, B. A. y Machen, T. E. (1982). Fluid transport across retinal pigment epithelium is inhibited by cyclic AMP. PROCC. NATL. ACAD. SCI. USA. 79: 211.

Miller, R. F., Slaughter, M. M. y Massey, S. C. (1982). Light and dark-dependent release of glutamate and aspartate in the isolated

retina of the mudpuppy. SOC. NEUROSCI. ABSTR. 8:131

Miller, R.F. y Schwarz, E. A. (1983). Evidence for the identification of synaptic transmitters released by photoreceptors of the toad retina. J. PHYSIOL. (LONDON). 334:325

Morrison, A. D.; Clements, R. S. Jr., Winegrad, A. I. (1972). Effects of elevated glucose concentrations on the metabolism of the aortic wall J. CLIN. INVEST. 51:3114-3123.

Murakami, M. Ohtsu, K. y Ohtsuka, T. (1972). Effects of chemical on receptors and horizontal cells in the retina J. PHYSIOL. (LONDON). 227:899.

Murakami, M., Ohtsuka, T. y Shimazaki, H. (1975). Effects of aspartate and glutamate on the bipolar cells in the isolated carp retina. VISION RES. 15:456-458.

Murakami, M., Shimoda, Y., y Nakatami, K. (1978). Effects of GABA on neuronal activities in the distal retina of the carp SENSORY PROC. 2:334-338.

Murata, T., Nishida, T., Eto, S. y Mukai, N. (1981). Lipid Peroxidation in diabetic rat retina. METABOLIC AND PEDIATRIC OPHTHALMOLOGY. 5:83-87.

Nakatami, K. y Yau, K. (1985). cGMP open the light-sensitive conductance R in the retinal rods. BIOPHYS I.47:356.

Nishimura, C. y Kuriyama, K. (1985). Alteration of lipid peroxide and endogenous antioxidant contents in retina of streptozotocin- induce diabetic rats: effect of vitamin A administration. J. PHARMACOL. 37:365-372.

Nishimura, H., Pallardo, F. Y., Seidner, G. A., Vanucci, S., Simpson, I. A. y Birnbaum, M. J. (1993). Kinetics of GLUT 1 y GLUT 4 glucose transporters expressed in xenopus oocytes. J. BIOL. CHEM. 268: 8514-8520.

Noll, F. (1983) en METHODS OF ENZYMATIC ANALYSIS (Bergmeyer, J. y Grabl, M., (eds). Vol. 6:582-588.

Ohara, T., Sussman, K. E. y Draznin, B. (1991). Effect of diabetes on Cytosolic Free Ca^{2+} and $Na^{+}-K^{+}$ -ATPase in rat aorta. DIABETES. 40: (11):1560-1563.

Oldendorf, W. H. (1973). Carrier-mediated blood-barrier transport of short-chain monocarboxylic organic acids. AM. J. PHYSIOL. 224:1450-1453.

Olefsky, J. M. (1978). Mechanisms of the ability of insulin to activate the glucose transport system in rat adipocytes. BIOCHEM. J. 172: 137-145.

Oswald, T. J. y Steinberg, R. H. (1980). Localization of frog retinal pigment epithelium $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$. EXP. EYE RES. 31:351-360.

Pascuzo, G. J., Johnson, J. E. y Pautler, E. L. (1980). Glucose Transport in Isolated Mammalian Pigment Epithelium. EXP. EYE RES. 30: 53-58.

Patz, A. (1978). Current concepts in ophthalmology. Retinal vascular diseases. N. ENGL. J. MED. 298:1451.

Pautler, E. L. y Ennis, S. R. (1980). The effect of induced diabetes on the electroretinogram components of the pigment rat. INVEST. OPHTHALMOL VISUAL SCI. 19: 702-705.

Pautler, E. L. y Tengerdy, C. (1986). Transport of acidic amino acids by the bovine pigment epithelium. EXP. EYE RES. 43:207-214.

Porter, K. R. y Yamada, E. (1960). Studies on the endoplasmic reticulum. V. Its form and differentiation in pigment epithelial cells of the frog retina. J. BIOPHYSIC BIOCHEM. CYTOL. 8:181-205.

Plum, F. (1960). The Neurologic Complications of Diabetes mellitus. IN DIABETES Williams RH Ed. New York, 602-622.

Redburn, D. A. y Kyles, C. B. (1980). Localization and characterization of dopamine receptors within two synaptosome fractions of rabbit and bovine retina. EXP. EYE RES. 30:699-708.

Reddy, V. N. (1992). Study of the polyol pathway and cell permability in human and retinal pigment epithelium in tissue culture. INV. OPHTHALMOL. VIS. SCI. 33:(4):2334-2339.

Sada, T., Koike, H., Ideda, M., Sato, K., Ozaki, H., y Karaki, H. (1990). Cytosolic free calcium of aorta in hypertensive rats. HIPERTENSION 16.245-251.

Salceda, R. y Saldaña, M. R. (1993). Glutamate and Taurine Uptake by Retinal Pigment Epithelium During Rat Development. COMP. BIOCHEM. PHYSIOL. 104:(2): 311-316.

Salceda, R. y Vilchis, M. C. (1994). High affinity uptake of glutamate and aspartate in the developing rat retina. CURRENT EYE RESEARCH 12: 297-302.

Sasson, S. y Cerasi, E. (1986). Autoregulation of hexose transport in rat skeletal muscle: Characterization and kinetic analysis in isolated soleus muscle cells in culture. J. BIOL. CHEM. 111: 16827-16833.

Segel, I. H. (1975). ENZYME KINETICS. John Wiley y Sons, New York. 346-464.

Shakib, M. y Cunha-Vaz, J. G. (1966). Studies on the permeability of the blood-retinal barrier. IV. Junctional complexes of the retinal

vessels and their role in the permeability of the blood-retinal barrier. EXP. EYE RES. 5:229.

Sillman, A. J., Ito, H. y Tomita, T. (1969). Studies on the mass receptor potential of the isolated frog retina I. VISION RES. 9:1435-1442.

Steinberg, R. H. y Miller, S. S. (1979). Transport and membrane properties of the retinal pigment epithelium. En: THE RETINAL PIGMENT EPITHELIUM. Zinn, K. M., Marmor, M. F. (eds.) Harvard University Press. Cambridge.

Stone, R. A., Kuwayama, Y. y Laties, A. M. (1987). Regulatory peptides in the eye. EXPERIENTIA. 43:791-800.

Sutherland, F. S., Stefansson, E., Hatchell, D. L. y Reiser, H. (1990). Retinal oxygen consumption in vitro. The effect of diabetes mellitus, oxygen and glucose. ACTA OPHTHALMOLOGICA. 68(6):715-720.

Tamai, A. y Tanaka, K. (1973). The ERG of the streptozotocin-diabetic albino rat. FOLIA OPHTHALMOL. 24:847-850.

Tehrani, S. T., Yamamoto, J. J. y Garner, M. H. (1990). Na^+ - K^+ -ATPase and changes in ATP hydrolysis, monovalent cation affinity, and K^+ occlusion in Diabetic and Galactosemic rats. DIABETES. 39(12):1472-1478.

Tilton, R. G., Baier, L. D., Harlow, S. E., Smith, S. R., Ostrow, E., Williamson, J. R. (1992). Diabetes induced glomerular dysfunction: links to a more redox cytosolic ratio of NADH/NAD^+ . KIDNEY INT. 41(4):778-788.

Tolentino, F. I., Schepens, C. L. y Freeman, H. M. (1976). Vitreoretinal Disorders: Diagnosis and management Philadelphia W. B. Saunders (ed). 141.

Tornquist, K. y Ehinger, B. (1988). Peptide immunoreactive neurons in the human retina. INV. OPHTHALMOL VIS. SCI. 29:680-686.

Tso, M. O. M. (1980). Pathology of the blood-retinal barriers. En THE BLOOD-RETINAL BARRIERS. Cunha-Vaz, V. (ed) Plenum Press. Nueva York.

Vinores, S. A., Campochiaro, P. A., May, E. E., Blaydes, S. H. (1988). Progressive ultrastructural damage and thickening of the basement membrane of the retinal pigment epithelium in spontaneously diabetic BB. EXP. EYE RES. 46: 545-558.

Vinores, S. A. y Campochiaro, P. A. (1989). Prevention or moderation of some ultrastructural changes in the RPE and retina of galactosemic rats by aldose reductase inhibition. EXP. EYE RES. 49:495.

Vinores, S. A., McGehee, R., Lee, A., Gadegbeku, C. y

Campochiaro, P. A. (1990). Ultrastructural localization of blood-retinal barrier breakdown in diabetic and galactosemic rats. THE J. OF HISTOCHEMISTRY AND CYTOCHEMISTRY. 38(9):1341-1352.

Voaden, M. J. (1977). Light and the spontaneous efflux of radioactive glycine from the frog retina. EXP. EYE. RES. 18:467-475.

Vogel, Z., Maloney, G. J., Ling, A. y Daniels, M. P. (1977). Identification of synaptic acetylcholine receptor sites in the retina with peroxidase-labeled- α -bungarotoxin. PROC. NATL. ACAD. SCI. U. S. A. 74:3268-3272.

Walker, P., Ramlal, T., Donovan, J. (1989). Insulin and glucose-dependent regulation of the glucose transport system in the rat L6 skeletal muscle cell line. J. BIOL. CHEM. 264: 6587-6595.

Watt, C. B., Li, H. B. y Lam, D. M. K. (1985). The presence of three neuroactive peptides in the putative glycinergic amacrine cells of an avian retina. BRAIN RES. 348:191-197.

Werbling, F. S. y Dowling, J. E. (1969). Organization of the retina of the mudpuppy, NECTURUS. Intracellular recording. J. NEUROPHYSIOL. 32:339-354.

Werman, R. (1966). Criterios for identification of a central nervous system transmitter. COMP. BIOCHEM. PHYSIOL. 18:745-766.

Wiederholt, M. y Zadunasky, J. A. (1984). Decrease of intracellular chloride activity by furosemide in frog retinal pigment epithelium. EXP. EYE RES. 3(4): 673-675.

Williamson, J. R.; Chang, K.; Frangos, M. (1993). Hyperglycemic pseudohypoxia and diabetic complication. DIABETES. 42:801-813.

Winkler, B. S. (1972). The electroretinogram of the isolated rat retina. VISION RES. 12: 1183-1198.

Wright, E. M., Hager, K. M. y Turk, E. (1992). Sodium cotransport proteins. CURRENT OPINION IN CELL BIOLOGY. 4:696-702.

Yazulla, S. (1983). Stimulation of GABA release from retinal horizontal cells by potassium and acid amino acids agonists. BRAIN RES. 275:61-74.

Yonemura, D., Aoki, T. y Tzusuki, K. (1962). Electroretinogram in diabetic retinopathy. ARCH. OPHTHAL. 68:49-54.

Yonemura, D. (1977). An electrophysiological study on activities of neuronal and non-neuronal retinal elements in man with reference to its clinical application. ACTA SOC. OPHTHALMOL. JAPAN. 81:1632-1665.

Young, R. W. y Bok, D. (1979). Metabolism of the retinal pigment epithelium Cap VII En: Zinn, K. M. y Marmor, M. F. (eds). THE RETINAL

PIGMENT EPITHELIUM. Harvard Univ. Press England. 3-31.

Zadunasky, J. A. y Degnan, K. J. (1976). Passage of Sugars and Urea across the isolated retina pigment epithelium of the frog. EXP. EYE RES. 23: 191-196.

Zinn, K. M. y Henkind, J. (1979). Anatomy of the human retinal pigment epithelium. En: THE RETINAL PIGMENT EPITHELIUM. Zinn, K. M. y Marmor, M. F. (ed). Cambridge, Mass. Harvard University Press.

Zimmerman, W. F. (1974). The distributions and proportions of vitamin A compounds during the visual cycle in the rat. VISION RES. 14:795-802.

Zimmerman, W. F., Lion, R., Daemen, F. J. M. y Bonting, L. S. (1975) Distribution of specific retinol dehydrogenase activities in sub-cellular fractions of bovine retina and pigment epithelium. EXP. EYE RES. 21:325-332.

Zimmerman, W. F. (1976). Subcellular distribution of 11-cis retinol dehydrogenase activity in bovine pigment epithelium. EXP. EYE RES. 23: 159-164.