

00346

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

4



FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

“LA RELACION LACTATO/PIRUVATO E
IDENTIFICACION DE GLUCOGENO EN LA
RETINA DE LA RATA”.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS
(BIOLOGIA CELULAR)**

P R E S E N T A :

EL BIOLOGO VICTOR MANUEL COFFE RAMIREZ

DIRECTORA DE LA TESIS: DRA. ROCIO SALCEDA S.

289293

MEXICO, D. F.,

200)



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradezco a:

La Dra. Rocio Salceda S.

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

A los Dres:

María Luisa Fangul Peña.

María Cristina Revilla Monsalve.

Mauricio Días Muñoz.

Rolando Hernández Muñoz.

María Eugenia Gonsebatt Bonaparte.

Julio Eduardo Roque Mórán Andrade.

Sinodales de este trabajo.

Dedico esta tesis:

**A mis padres y hermanos
por darme el apoyo durante el desarrollo de mis estudios.**

**A los amigos de siempre.
Gustavo, Carmen, Estuardo, Daniel, Maricela y Naty.**

INDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.	
LA RETINA.	
Generalidades.....	2
Estructura y función.....	4
Metabolismo de la glucosa.....	11
Reservas Energéticas.....	15
RETINOPATIA DIABETICA.	
Retinopatía.....	18
OBJETIVO	24
METODOS.	
Materiales y métodos.....	25
RESULTADOS.	
Niveles de lactato y piruvato en la retina de animales control.....	29
RATAS TRATADAS CON ESTREPTOZOTOCINA	
Niveles de lactato y piruvato en la retina.....	31
CUANTIFICACION DE LOS NIVELES DE GLUCÓGENO.	
Niveles de glucógeno en la retina de animales control.....	32
RATAS TRATADAS CON ESTREPTOZOTOCINA.	
Niveles de glucógeno en la retina.....	33
Tablas y Gráficas.....	34
DISCUSIÓN.....	54
CONCLUSIÓN.....	65
BIBLIOGRAFIA.....	67

RESUMEN.

La retina para llevar a cabo sus funciones requiere de una gran cantidad de oxígeno y nutrientes, principalmente glucosa, que se obtienen del flujo sanguíneo. Las alteraciones en el flujo de estos nutrientes puede llevar a cambios funcionales importantes tales como la retinopatía producida por la diabetes.

El estudio de las propiedades metabólicas de la retina representa un gran interés, principalmente en lo que se refiere a la utilización de glucosa como fuente de energía. Aunque existen reportes referentes al metabolismo de la glucosa éstos no son suficientes y en lo que se refiere a la presencia de glucógeno la información que se tiene es contradictoria. Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue identificar las reservas de glucógeno y la utilización de glucosa en la retina de la rata sana y diabética.

En este trabajo se cuantificaron por métodos enzimáticos y espectrofotométricos los niveles de lactato, piruvato y glucógeno, bajo diferentes condiciones experimentales que simulan diversas situaciones fisiológicas de la retina: a) En ausencia de glucosa; b) En presencia de diferentes concentraciones de glucosa; c) efecto de la adaptación a la luz y a la obscuridad.

Encontramos que en las retinas recién aisladas de animales adaptados a la obscuridad, los niveles de lactato y piruvato fueron con respecto a los animales que fueron adaptados a la iluminación; sin embargo la relación lactato/piruvato fue igual en ambas condiciones. Aunque las retinas incubadas tanto en condiciones de iluminación como de obscuridad son capaces de producir piruvato y lactato, la relación lactato/piruvato fue mayor en condiciones de iluminación.

Con el propósito de conocer si la producción de lactato es proporcional a la concentración de glucosa, las retinas de animales adaptados a la luz se incubaron bajo condiciones de obscuridad en ausencia y presencia de diferentes concentraciones de glucosa. Como se esperaba, en ausencia de glucosa la producción de lactato fue 6 veces menor que en presencia de 5.6 mM de glucosa (control), mientras que los niveles de piruvato permanecieron constantes; por lo que la relación lactato/piruvato disminuyó 10 veces. En las retinas incubadas en presencia de altas concentraciones de glucosa (20 y 25 mM), los niveles de lactato aumentaron en un 50% con respecto al control, y los niveles de piruvato permanecieron constantes, por lo que la relación lactato/piruvato en el tejido aumentó al doble. Los niveles de lactato en las retinas incubadas en presencia de 30 mM de glucosa son similares al control, y la relación lactato/piruvato no presentó cambios estadísticamente significativos.

En las ratas en que se indujo la diabetes por administración de estreptozotocina, se observó un aumento en la concentración de glucosa en plasma y la concentración de lactato en la retina aumentó un 110%. Como consecuencia, la relación lactato/piruvato aumento hasta un 140% en la retina de la rata diabética, comparada con el control.

En este trabajo se identificó la presencia de glucógeno en la retina de la rata. Nuestros resultados son relevantes en el sentido que los niveles de glucógeno que observamos se modifican de manera significativa bajo diferentes condiciones fisiológicas. En la obscuridad, los niveles de glucógeno son 50% menores que en la luz. A bajas concentraciones de glucosa en el medio, los niveles descendieron aproximadamente un 60% tanto en condiciones de luz como de obscuridad, y los niveles de glucógeno se incrementaron paralelamente al aumento en la concentración extracelular de glucosa (0-20 mM). Sin embargo, los niveles de glucógeno son semejantes en las retinas incubadas en presencia de 5.6 ó 30 mM de glucosa. Es interesante que la retina de ratas diabéticas presenta una mayor concentración de glucógeno, la que es proporcional al tiempo del establecimiento del estado diabético. Los resultados obtenidos indican que el metabolismo de la glucosa en la retina está regulado por las concentraciones de glucosa, así como las condiciones de luz y obscuridad. Dicha regulación "per-se" está alterada en las retinas de animales diabéticos.

INTRODUCCION.

La retina es una estructura especializada del sistema nervioso, que transduce la luz en señales biológicamente significativas, procesa estas señales y subsecuentemente transmite esta información a los centros superiores de integración.

La retina se encuentra en el fondo del globo ocular de los vertebrados, en el hemisferio posterior denominado copa óptica. El globo ocular presenta varias capas tisulares, la más externa de las cuales es de recubrimiento, la esclerótica, que forma en la parte anterior la córnea. La siguiente capa tisular es la coroides, que contiene el tejido vascular que irriga al ojo; la coroides forma el iris en la parte anterior del globo ocular y una abertura circular en éste constituye la pupila. Del iris se encuentra sostenido el cristalino que por movimientos musculares concentra los rayos luminosos que llegan a la retina. (Farber y Adler, 1986) (Figura 1).

Estructural y funcionalmente la retina está formada por dos componentes, el epitelio pigmentario de la retina (EPR), y la retina neural propiamente dicha. El EPR es una monocapa de células neuroepiteliales interpuestas entre los capilares de la coroides y los fotorreceptores de la retina neural. La retina neural es una extensión periférica del cerebro, consiste esencialmente de 6 tipos de neuronas; que presentan una organización laminar. 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, que distribuye aproximadamente el 20% del total de el flujo sanguíneo a la retina (Kuwabara, 1969). El segundo sistema es el de la coroides o sistema uveal que consiste de una ramificación de capilares o coriocapilares fenestrados cuyo diámetro es amplio, lo que permite un flujo fácil de la sangre. El 80% del flujo sanguíneo total es proporcionado por este sistema a las

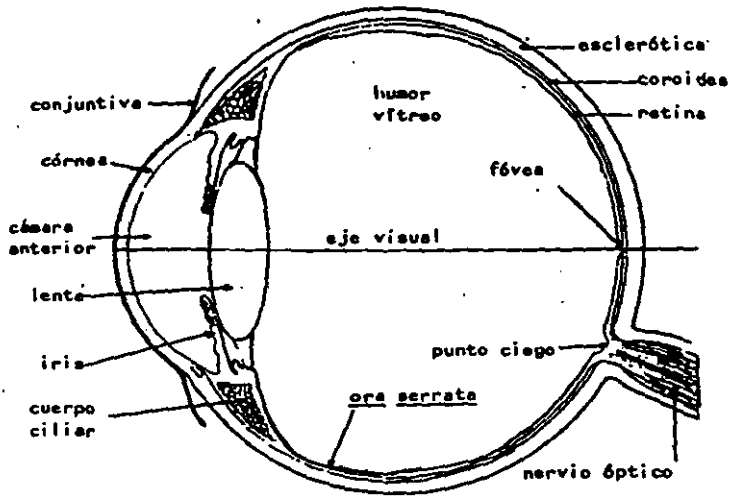


Figura 1.- Diagrama de la sección transversal del ojo de los vertebrados (Farber y Adler, 1986).

capas externas de la retina y el epitelio ciliar no pigmentado.

RETINA: ESTRUCTURA Y FUNCION.

El EPR junto con las células endoteliales de la arteria retiniana, participa en la formación de la barrera hematorretiniana, la cual regula el paso de glucosa y otros metabolitos hacia dentro y afuera de la retina. La participación del EPR en la barrera hematorretiniana está determinada por la presencia de uniones estrechas en sus células, las cuales sellan los espacios intercelulares e impiden el intercambio libre de solutos, estableciéndose así un gradiente de concentración de estos a través de la membrana; estos solutos usualmente se transportan por mecanismos especializados presentes en la membrana (Cunha-Vaz, 1980). Así, el transporte de glucosa en el EPR se lleva a cabo por un sistema de difusión facilitada (Pascuzzo, et al.1980; Masterson y Chader, 1981; Grosson y Pautler, 1982).

La función normal del EPR es importante para mantener el buen funcionamiento de la retina, de tal forma que cualquiera de las actividades del EPR que se vea alterada puede conducir a alteraciones en las células fotorreceptoras y pueden causar ceguera en el área afectada. El EPR parece estar relacionado con una variedad de enfermedades de la retina y coroides, tales como el desprendimiento de la retina, desordenes inflamatorios, diabetes, así como los producidos por agentes tóxicos, nutricionales o ambientales (Zinn, K. M. y Henkind, J; 1979) (Figura 2).

La retina neural esta organizada en las siguientes capas celulares: la capa de los fotorreceptores formados por el extremo distal o segmento externo de las células fotorreceptoras, mientras que los somas de los fotorreceptores (conos y bastones) que forman la capa nuclear externa. Las terminales de los fotorreceptores presentan algunas características particulares, tales como su gran tamaño y la existencia de una estructura electrodensa en forma de listón rodeada por pequeñas vesículas. Dichas

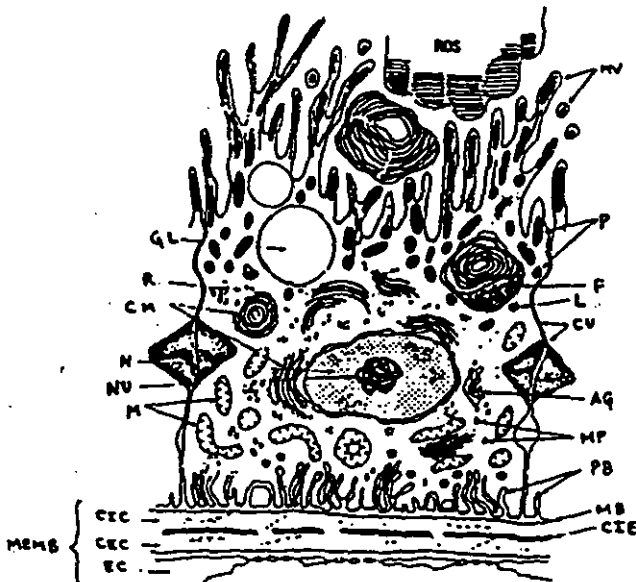


Figura 2.- Diagrama de una célula del epitelio pigmentario de la retina. AG, aparato de golgi; CEC, capa externa de colágena; CIE, capa intermedia de colágena; CIE, capa intermedia elástica; CM, cuerpos mieloides; CU, complejos de unión; EC, endotelio de los coriocapilares; F, fagosoma; GL, gota de lípidos; 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).

terminales forman contactos con los procesos de células horizontales y bipolares, formando la capa plexiforme externa. Los somas de las células horizontales, bipolares y amacrinas forman la capa nuclear interna. Los procesos de las células horizontales se ramifican en grandes áreas en la capa plexiforme externa, haciendo contactos con células bipolares, horizontales y fotorreceptores. La capa plexiforme interna está formada por sinápsis entre las células bipolares, amacrinas y ganglionares. En la capa nuclear interna existen además los somas de las células interplexiformes, los cuales se caracterizan por tener procesos en ambas capas plexiformes, de tal manera que se crea un flujo de información entre ellas. Las células ganglionares se encuentran en el margen interno de la retina y sus axones constituyen el nervio óptico (Dowling, 1960) (Figura 3).

Otro tipo celular en la retina son las células gliales de Müller, las cuales se extienden desde la superficie vítrea hasta la capa de los fotorreceptores, en donde sus prolongaciones apicales forman la membrana limitante externa. Mientras que sus prolongaciones basales forman la membrana limitante interna, que aísla a las células ganglionares 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).

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 lleva a una pérdida irreversible de la visión. El correcto 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 síntesis continua y degradación del segmento externo de los fotorreceptores. El segmento externo de los fotorreceptores se renueva continuamente por la adición de discos membranosos recién sintetizados en el extremo basal de dicho segmento; paralelamente, los discos de la parte distal del

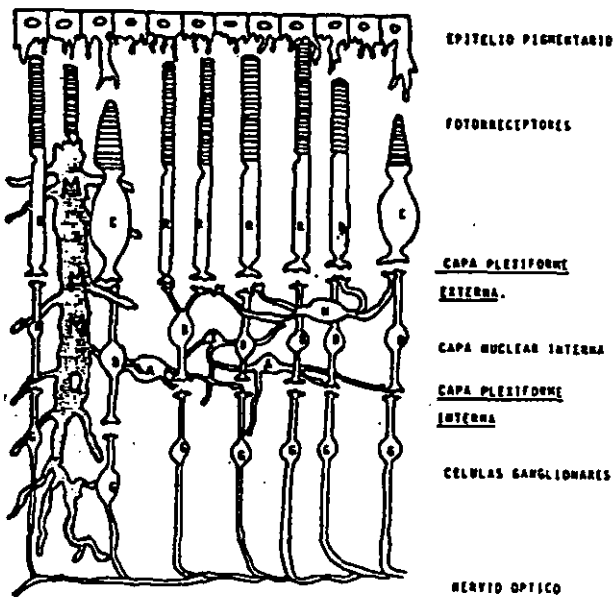


Figura 3.- Diagrama de las capas de la retina y sus relaciones sinápticas. Los principales tipos celulares se designan como: R, bastones; C, conos; H, células horizontales; B, células bipolares; A, células amacrinas; G, células ganglionares; I, células interplexiformes; M, células de Muller.

segmento externo son eliminados a través de un mecanismo de fagocitosis que efectúa el epitelio pigmentario de la retina. (Zinn, K.M. y Henkind, J. 1979).

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 amácrinas (Dowling, 1960).

La presencia de un estímulo luminoso produce en la retina una respuesta eléctrica; el electroretinograma (ERG), que se caracteriza por la presencia de una respuesta 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. En la retina, la luz actúa sobre la rodopsina, proteína que se encuentra embebida en la membrana de los segmentos externos de los fotorreceptores, e induce la isomerización del retinaldehído. Esta isomerización lleva a la activación de la transducina o proteína G, la cual hidroliza GTP a GDP. La transducina a su vez activa a la fosfodiesterasa, enzima que hidroliza al guanosín monofosfato cíclico (GMPC), la disminución en los niveles de este conduce a un aumento en la resistencia de la membrana y una disminución en la entrada de iones sodio, causando así una hiperpolarización de la célula (Baylor y Lam, 1979; Korenbrot, 1972; y Sillman y Tomita, 1969) (Figura 4).

En la obscuridad, los fotorreceptores presentan altas concentraciones de GMPC, el cual actúa sobre 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, que despolariza al fotorreceptor (Fesenko, 1985). Esta despolarización provoca la liberación del

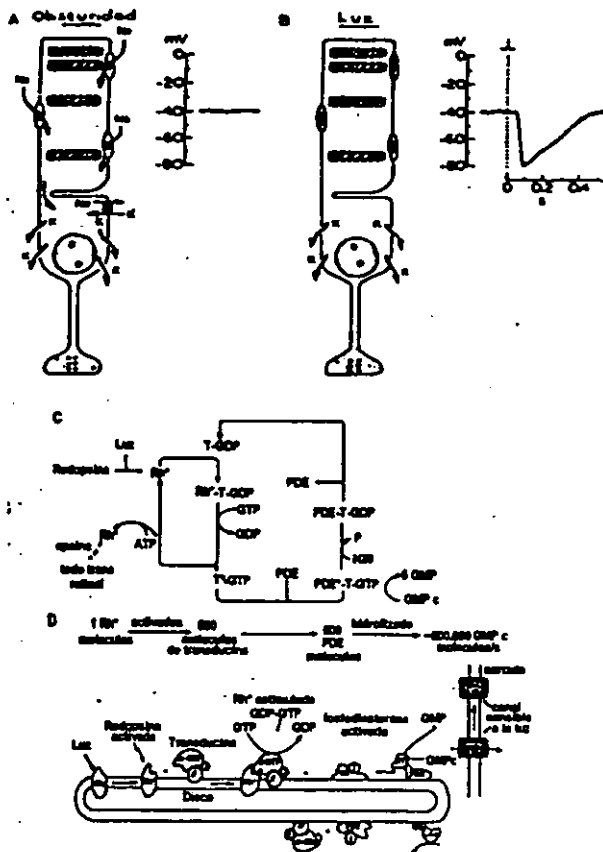


Figura 4.-Mecanismo de la fototransducción: (A) Corriente oscura, entrada de iones sodio. (B) Proceso de transducción, los canales sensibles a luz se cierran. (C) Cascada de la rodopsina. (D) Estados de amplificación y (E) Cascada de nucleotidos como proteínas integrales y periféricas de la membrana de los discos del fotorreceptor.

neurotransmisor en la terminal del fotorreceptor (Nakatami y Yau, 1985) (Figura 4).

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, Kufner 1953). Las células bipolares a las que los fotorreceptores transmiten son de dos tipos, las que responden a la luz hiperpolarizándose (bipolares "Off") y las que con el mismo 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 recibe señales de ambos tipos de células bipolares y se conocen como "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 es típicamente rápida y corta duración. La acción del neurotransmisor es terminada por degradación enzimática o por recaptura en la terminal presináptica del neurotransmisor (Werman, 1966).

Ninguna sustancia ha sido plenamente identificada como neurotransmisor en la retina; sin

embargo, existen evidencias que indican que los aminoácidos glutamato y/o 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 γ -aminobutírico (GABA) puede funcionar como neurotransmisor inhibitorio de las células horizontales y amácrinas (Murakami, 1978; Yazulla, 1983). En las células amácrinas se han propuesto como neurotransmisores una gran variedad de sustancias tales como la glicina (Voaden, 1977), acetilcolina (Vogel, 1977), dopamina (Redburn, 1980) y varios neuropeptidos, entre los cuales están la sustancia P, neurotensina y la colecistocinina (Watt, et al. 1985; Li, et al. 1986; Stone et al. 1987). En las células interplexiformes los neurotransmisores propuestos son la dopamina y la glicina (Dowling y Ehinger, 1978; Marc, Lam y Stell, 1979).

METABOLISMO DE LA GLUCOSA

La retina requiere de una gran cantidad de energía para llevar a cabo sus funciones y mantener su actividad. En la retina la glucosa es la fuente principal de energía metabólica para la que se han reportado la presencia de transportadores del tipo de difusión facilitada (Elbrink, and Bihler, 1975; Stramm, E.L. and Pautler E.T. 1980. López-Escalera R. et al. 1991). El transportador GLUT 1 se ha encontrado principalmente en el epitelio pigmentario de la retina (Miller, S y Steinberg, H.R. 1976. Pascuzzo, G.B. et al 1980. Stramm., L.E. y Pautler L.E. 1980. Masterson., E. y Chader J.G. 1981. Crosson, C.E. y Pautler., L.E. 1982.) y en la membrana plasmática de los segmentos externos de los fotorreceptores (Hsu, S.C. y Molday, R.S. 1991; López-Escalera, R. et al. 1991; Hsu., S.C. y Molday, R.S. 1994; Badr, G.A. et al., 1999).

En la retina de los vertebrados se ha demostrado la presencia de las actividades enzimáticas relacionadas con el metabolismo de la glucosa por las vías glucolítica, oxidativa y síntesis de

glucógeno (Lowry, O.H. et al 1961).

En la retina de mamíferos se ha observado un metabolismo activo de glucosa en condiciones anaerobias y aerobias, paralelo a niveles elevados de consumo de oxígeno, producción de ácido láctico, y la respuesta eléctrica a la luz (Warburg Posener y Negelein, 1924; Ames y Gurian, 1963; Winkler, 1972). El metabolismo de glucosa puede ser balanceado por dos efectos inhibitorios: el exceso de glucosa produce una disminución de la captación de oxígeno (efecto Crabtree ; Cohen, L.H. and Noell, W.K. 1960), y un aumento de la oxidación de esta, modificando la utilización de glucosa e interrupción de la acumulación de lactato (efecto Pasteur ; Laser, H. 1937; Shichi, 1983; Winkler., 1983 a). La energía para el metabolismo y la actividad eléctrica proviene tanto de la glucólisis como de la oxidación completa de la glucosa (Noell, 1959; Futterman y Kinoshita, 1959; Cohen y Noell., 1960; Ames y Gurian., 1963; Winkler, 1974; 1975).

Experimentos "in vitro" demostraron que la retina en condiciones anaerobias es capaz de formar lactato, glutamato, GABA, aspartato, glutamina , alanina y producir CO₂, a partir de glucosa (Catanzaro, R., et-al., 1962; Ames y Gurian, 1963; ; Starr, S.M., 1975; Morjaria, B. y Voaden, J.M. 1979; Voaden, M.J. y Morjaria, B., 1980). En retinas de rata y de conejo incubadas de 10-15 minutos en un medio sin glucosa y ausencia de oxígeno se produce lactato, el contenido de ATP disminuye drásticamente, y la actividad eléctrica se ve afectada (Winkler, et-al, 1977 a; Berman, E. R. 1991).

En las retinas incubadas en un medio conteniendo 5 mM de glucosa y equilibrado con 95% oxígeno/ 5% de CO₂ presentaron un requerimiento absoluto de bicarbonato para mantener altos niveles de producción de lactato, consumo de oxígeno (Hopkinson y Kerly., 1959; Graymore, 1960; Riley, 1965; Riley y Voaden, 1970; Winkler et-al, 1977 a; b; 1981, a; b). y la actividad

eléctrica (Winkler, et al. 1977 a; b; Winkler, 1983 a).

La producción de lactato en la retina es máxima en presencia de altas concentraciones de glucosa (20 mM) y oxígeno (Graymore 1960; Hopkinson y Kerly, 1959; Glockin y Potts, 1965; Riley y Voaden, 1970). Cuando la concentración de glucosa se reduce a 1mM (hipoglicemia) la producción de lactato disminuye hasta un 56%, mientras que el contenido de ATP disminuye un 20%, y el ERG no se afecta significativamente, resultados que sugieren que la retina lleva a cabo una mayor actividad anaerobia (Winkler, S.B.1981 a ; b).

Aunque se ha mencionado que la glucosa es el sustrato preferido del cerebro y de la retina, existe información que indica que el lactato es un sustrato alternativo capaz de ser metabolizado y capaz de proporcionar energía necesaria para el buen funcionamiento del tejido nervioso de los vertebrados (Larrabee, 1983, 1992; Schurr et al., 1988; Dringen, R. et al., 1993 a; b).

Así mismo, se demostró que el lactato puede sustituir a la glucosa para mantener el metabolismo oxidativo de la retina y la función de los fotorreceptores (Winkler, 1981 a; b; Poitry- Yamate et-al., 1992; 1995). Estos resultados han sugerido la posibilidad de que el lactato se sintetice y libere "in situ" por algunos tipos celulares de la retina, y se metabolice por los fotorreceptores los cuales presentan un alta actividad respiratoria (Haugh et-al., 1990; Poitri- Yamate et-al., 1995).

La actividad eléctrica de la retina se mantiene constante hasta un período de 8-10 minutos "in vitro" bajo condiciones de perfusión continua del ojo a través de la arteria ocular (Niemeyer, G., 1975). En estas condiciones se observó que concentraciones elevadas de glucosa (8-10 mM) incrementan significativamente la onda b del ERG, y la respuesta del nervio óptico (Niemeyer, G. et-al; 1991; Onoe, S. y Niemeyer, G. 1992).

Estudios farmacológicos utilizando iodoacetato, un inhibidor de la triosa fosfato deshidrogenasa,

conduce a la desaparición de la actividad eléctrica de la retina, paralela a una disminución en la producción de ATP y lactato (Noell, 1959) semejante a lo que ocurre en la hipoglucemia.

La oxidación de la glucosa se lleva a cabo en parte por la vía de las pentosas fosfato presente en el segmento externo de los fotorreceptores. Mediante esta vía, se regeneran los niveles de NADPH, cofactor de la glutatión reductasa, enzima que regenera los niveles de glutatión reducido el cual participa en la eliminación de peróxidos (Shichi, 1983). Entre el 70 y 80% del consumo total de O₂ en la retina ocurre en las células fotorreceptoras (Cohen, y Noell, 1965). Se ha demostrado que la fotoestimulación incrementa alrededor de 4 veces el consumo de oxígeno de las células fotorreceptoras aisladas. A pesar de la alta tasa respiratoria, la mayor parte de la glucosa utilizada por la retina es transformada a lactato (Winkler, 1983 a).

La actividad glucolítica en el segmento externo de los fotorreceptores indica que por lo menos una parte de la energía en forma de ATP y GTP, requerida para el proceso de la fototransducción, es suministrada por el metabolismo de la glucosa que tiene lugar en estas células (Hsu y Molday, 1994). Las retinas de ratas distróficas, en la que las células fotorreceptoras disminuyen, tienen una disminución en la captación de oxígeno y una reducción en la actividad glucolítica hasta de un 50% en relación con las retinas normales. Estos resultados nos indican el metabolismo elevado de los fotorreceptores en comparación con el resto de la retina (Winkler, S.B.1981, a).

Durante el desarrollo ontogénico, el metabolismo de la retina se modifica, en las retinas de conejos de 5 a 7 días de edad la producción aeróbica de ácido láctico es de hasta 10 veces mayor que la producción de CO₂. En la retina de conejo adulto la actividad aeróbica es mayor comparada con la retina de conejos jóvenes, incremento que se presenta entre los 10 y 20 días de edad. Estos resultados correlacionan con la diferenciación de las células fotorreceptoras y con la aparición y

maduración de las funciones visuales (Cohen, H.L. y Noell, W.K. 1960).

Las células de Müller en cultivo asimilan y fosforilan la glucosa, parte de la cual es almacenada en forma de glucógeno (Kuwabara y Cogan. , 1961; Shabadasch. , 1972 a; b; Babel y Stango., 1973; Poitry-Yamate y Tsacopoulos., 1992) que se sugiere funciona como almacén de energía para las neuronas (Ranson y Fern., 1970). Recientemente se observó que más del 90% de la producción de lactato en las células de Müller procede de glucosa exógena, y que el lactato es liberado por estas células bajo condiciones aeróbicas. Adicionalmente, se observó que las células de Müller presentan pocas mitocondrias, evidencia que apoya que estas células presentan preferentemente una vía glucolítica (Uga y Smelser. , 1973).

Es interesante, que en las retinas de abeja se obtuvo evidencia experimental que indica que en condiciones de iluminación las células gliales liberan lactato producido a partir de glucosa, el cual puede ser utilizado por los fotorreceptores (Poitry-Yamate, C.L., Poitry, S. y Tsacopoulos, M. 1995). En apoyo a estos estudios, se demostró que en condiciones de iluminación los fotorreceptores producen CO_2 a partir de lactato exógeno. (Poitry-Yamate, C.L., Poitry, S. Y Tsacopoulos, M. 1995).

RESERVAS ENERGETICAS.

El elevado requerimiento energético de la retina ha llevado a considerar la presencia de almacenes endógenos de glucosa; las evidencias indican que si éstos existen son limitados. La actividad eléctrica de la retina de gato desaparece en el orden de minutos cuando se incubaba en ausencia de glucosa (Rungger-Brändler et al., 1996). Los niveles de glucógeno en la retina del gato, de la rata, del hámster y del conejo no siempre correlacionan, y en la retina de la rata existe una gran controversia en cuanto a la existencia de glucógeno. (Kuwabara y Cogan, 1961; Mizuno y

Soto; 1975; Rungger-Brändle, et-al., 1996).

Sin embargo, con la utilización de técnicas de microscopía de luz, electrónica e histoquímicas se ha probado la existencia de almacenes de glucógeno en la retina de vertebrados e invertebrados. En peces como Lepisosteus platyrhineus (Ginglymoidi), se reportó la presencia de glucógeno en los fotorreceptores y el EPR (Collin, S.P; Collin, H.B. 1993). En anfibios el glucógeno se distribuye en todas las capas de la retina, encontrándose en mayor abundancia en las células de Müller y los fotorreceptores (Schabadasch.,A.L. 1972 a; 1972 b; Goldman, S.S. 1988; 1990; Brackeveld, C.R. 1993 a; b). En el pollo, se observaron altos niveles de gránulos de glucógeno en el segmento interno de los conos (Anemiya, T. 1975). En la retina de la rata se describió la presencia de partículas de glucógeno intramitocondrial en los segmentos internos de los fotorreceptores (Ishikawa, T. y Pci, F.Y. 1965). Estudios recientes sugieren que los conos, pero no los bastones, contienen glucógeno abundante (Okubo, A. et- al. 1998). Almacenes de glucógeno en la retina de la rata, hámster y conejo se reportó principalmente en las células de Müller (Shimizu y Maeda., 1953; Kuwabara y Cogan., 1961; Eichner y Themann, 1962; Uga y Smelser., 1973; Chase, 1982; Johnson, N. F. 1977; Poitry-Yamate C. L. 1992). En las abejas, también se observaron depósitos de glucógeno en células fotorreceptoras y gliales (Poitry-Yamate et al.,1995), el cual puede ser degradado rápidamente (1 minuto) durante periodos de isquemia o hipoxia (Lowry et al. 1961; Lajtha et al. 1981; Sorg y Magistretti, 1992).

La síntesis de glucógeno se ha descrito en varios tipos celulares, principalmente en células del hígado y células musculares (Pilkis, S.J. 1988). En el tejido nervioso anteriormente se consideró que el glucógeno estaba ausente; sin embargo, estudios recientes demostraron su presencia en cerebro (Nelson, S.R. et al 1968; Dringen R. 1993 a; b) principalmente en astrocitos, en los que se

demostró la actividad de la glucógeno fosforilasa (Dringen, R. 1993 a). El contenido de glucógeno en estas células es regulado por neurohormonas como la adenosina, serotonina, norepinefrina, histidina y el VIP (peptido intestinal vaso activo), que inducen la degradación de glucógeno; en contraste a la insulina y el factor de crecimiento similar a la insulina tipo I y II que inducen la formación de glucógeno en los astrocitos (Dringen, R. 1992; 1993 a; b). Así mismo, los astrocitos en cultivo bajo condiciones que simulan hipoxia o isquemia, producen niveles sustanciales de lactato a partir de glucógeno (Dringen, R. et al. 1993 a, 1993 b). Estos resultados han llevado a sugerir que el lactato podría liberarse de los astrocitos y ser un buen sustrato para la producción de energía en las células vecinas que tengan una baja actividad de la hexocinasa, como es el caso de los oligodendrocitos y algunas neuronas (Dringen, R. et al 1993 a., 1993 b). En estas últimas se ha observado la presencia de un sistema de transporte de lactato con propiedades parecidas a las del acarreador monocarboxílico presente en el tejido periférico (Dringen, R. et al. 1993 b).

En la retina de la rana se observó que existen cambios dinámicos del glucógeno en condiciones de la adaptación a la obscuridad y a la luz. Estos cambios ocurren principalmente en las células de Müller, en las que en condiciones de adaptación a la obscuridad se observa una mayor acumulación de glucógeno (Schabadasch, A.L. 1972 a); y que éste es utilizado en condiciones de iluminación. Los resultados demuestran que las células de Müller responden activamente a los cambios fisiológicos de la retina (Schabadasch, A.L. 1972 b). Así mismo en la retina de anfibios y especialmente en las células de Müller, el VIP es un agonista más potente que el glucagon en la producción de adenosin monofosfato cíclico (AMPc), lo que sugiere una regulación recíproca entre los niveles de AMPc y la actividad glucógenolítica (Goldman, S.S.1988). En la retina de los anfibios la síntesis de glucosa a partir de lactato es similar al ciclo de Cori, lo que permite mantener

los niveles de glucosa en la retina (Goldman, S.S. 1990).

Las células de Müller en la retina de vertebrados presentan una captación rápida y fosforilación de glucosa y parte de ésta es almacenada como glucógeno (Kuwabara y Cogan, 1961; Babel y Stangos, 1973; Poitry-Yamate y Tsacopoulos, 1991).

La glucógeno fosforilasa, enzima clave en la degradación de glucógeno, se detectó inmunocitoquímicamente en astrocitos y células ependimales, pero no en neuronas del cerebro (Ignacio et al. , 1990; Pfeiffer et al., 1990; 1992; 1993). En la retina del conejo y de la rata se localizó en el pie terminal de las células de Müller y la capa nuclear interna (Pfeiffer, B. et-al., 1994). La actividad de la glucógeno sintetasa y de la glucógeno fosforilasa se demostró en los conos de la retina del pollo (Anemiyi, T. 1975). Así mismo estudios "in vitro" han demostrado la síntesis de glucógeno en retinas de rata incubadas en un medio con altas concentraciones de glucosa (Kuwabara y Cogan. 1961).

DIABETES

La diabetes mellitus, enfermedad que afecta de 20 a 30 millones de personas en el mundo, es determinada genéticamente se caracteriza por alteraciones en el metabolismo de carbohidratos, proteínas y lípidos, y está asociada a una absoluta o relativa deficiencia de insulina. Aunque la deficiencia de insulina puede ser corregida con la administración de insulina o una terapia con agentes hipoglucémicos orales, este tratamiento no evita el desarrollo de complicaciones que afectan el riñón, las arterias, los nervios y el ojo (Brownlee, M. y Cerami, A. 1981; Mc Call, 1992).

El daño renal asociado con la diabetes está caracterizado clínicamente por proteinuria y

disminución de los niveles de filtración glomerular. Anormalidades hematológicas también relacionadas con la diabetes son la dilatación de los vasos que ocurre como autorregulación en respuesta a una hipoxia local; también se presenta agregación de eritrocitos, incrementos en los niveles de glucohemoglobina, viscosidad de la membrana plasmática de eritrocitos y glicosilación de proteínas de membrana. (Brownlee, M. y Cerami, A. 1981).

En ratas y en humanos con diabetes crónica se ha reportado una disminución de ácido siálico y del contenido de colesterol en los eritrocitos, presentándose cambios en la superficie celular. Las plaquetas presentan un incremento en la adhesión a los endotelios, cambios en la sensibilidad a agentes de agregación y una acelerada producción de derivados de trombogénicos y prostaglandinas (Brownlee, M. y Cerami, A. 1981). Adicionalmente se presentan anomalías en las proteínas plasmáticas, las que provocan un incremento en la viscosidad de la sangre, acelerando el consumo de fibrinógeno, así como una disminución de la trombina III, disminución de fibrinolisis y un incremento en los niveles del factor de Von Willebrand (vWF) (Brownlee, M. y Cerami, A. 1981).

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, y deficiencias neurológicas (Plum, F., 1960). Así mismo se conoce que la hipoglucemia producida por los tratamientos largos con insulina puede 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). En el sistema nervioso periférico se han observado varios cambios morfológicos y fisiológicos en pacientes diabéticos. Los nervios periféricos presentan cambios electrofisiológicos que reflejan alteraciones estructurales y cambios en las propiedades bioquímicas del axón y de la vaina de mielina, así como una desmielinización

segmental, lo que lleva a una disminución en la velocidad de conducción del nervio motor (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 vítreo, cambios en la microvasculatura y alteraciones en la estructura y fisiología de la retina (Davis, 1988; Engerman, 1989). Alteraciones en la bioquímica del microambiente de los capilares retinianos pueden ser un factor en la patogénesis de la microangiopatía diabética (Brownlee, M. y Cerami, A. 1981). 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 (Davis, 1988).

Los mecanismos involucrados en la retinopatía diabética son poco conocidos, se han mencionado varias alteraciones como: a) la formación de microaneurismas, b) aumento en la permeabilidad vascular, c) pérdida de pericitos, d) oclusión vascular, e) proliferación de nuevos vasos, acompañadas de tejido fibroso sobre la superficie de la retina y el disco óptico. La formación de microaneurismas está acompañada de una permeabilidad excesiva, lo cual produce un edema en la retina; frecuentemente estas alteraciones involucran el centro de la mácula y conduce a alteraciones en la visión (Brownlee, M. y Cerami, A. 1981).

El incremento en la permeabilidad de las células endoteliales está asociado a un engrosamiento en la membrana basal y al rompimiento de la barrera hematorretiniana, lo que podría ser causado por un incremento en el transporte vascular y alteraciones en las uniones estrechas entre las células endoteliales. Posteriormente, se lleva a cabo la oclusión de vasos y un rompimiento en las arteriolas terminales, lo que provoca una liberación masiva de factores de crecimiento (Larsen, 1960; Tolentino, 1976; Davis, 1988).

La retinopatía diabética proliferativa se caracteriza por la formación de nuevos vasos que es la fuente principal de la hemorragia vítrea y la pérdida de la visión causada por el desprendimiento de la retina. Con el empleo de sustancias fluorescentes, se han evidenciado alteraciones de la barrera hematorretiniana a nivel del EPR, que consiste en el daño o ruptura de las uniones intercelulares, aumento en la actividad pinocítica y necrosis (Kirbe, 1980; Tso, 1980).

Por otro lado, la retinopatía diabética se caracteriza además por una serie de cambios funcionales como resultado de las alteraciones metabólicas de la retina, que se refleja en modificaciones en el patrón del ERG (Yonemura, 1962). Se ha sugerido que la amplitud del patrón del ERG se deteriora en relación directa con el desarrollo avanzado de la diabetes (Arden, 1986). En humanos, se encontró una disminución de la amplitud de la onda b (Yonemura, 1962; 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 ERG, lo cual indica 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 cambios metabólicos ocurren en la retina previos a las alteraciones estructurales características de la retinopatía diabética. En la diabetes, la retina está expuesta a desequilibrios en las concentraciones de glucosa en el torrente sanguíneo, y una disminución en la disponibilidad de oxígeno (Brownlee, M. y Cerami A. 1981; Sutherland., F. 1990) aunado a otras alteraciones metabólicas inducidas por la enfermedad. Se ha considerado que estas alteraciones pueden estar involucradas en la retinopatía diabética, para lo cual se han sugerido varias hipótesis con el fin de explicar dichas alteraciones. La

primera manifestación es el incremento en la concentración de glucosa extracelular, lo cual provoca un aumento en el transporte de glucosa; sin embargo la acumulación de glucosa por las células no está en función únicamente de la glucosa extracelular (Brownlee, M., y Cerami, A 1981) sino también por las características del sistema de transporte de glucosa presente en los diferentes tipos celulares. Estudios en células mamarias de hámster en cultivo demostraron que cambios en la concentración extracelular de glucosa pueden alterar la síntesis y actividad de los transportadores presentes en las células (Kalckar, 1973).

Estudios bioquímicos demostraron que el transporte de mio-inositol en las células del EPR y la retina neural se reduce en condiciones de hiperglicemia lo que lleva a una disminución de su concentración intracelular. (Del Monte, et al.1991). Se ha sugerido que cambios en la concentración de glucosa pueden estar relacionadas a un aumento en las concentraciones de polioles como resultado de la actividad de la aldosa reductasa, que es una enzima que a partir de glucosa sintetiza sorbitol y su vía de síntesis puede interferir con la síntesis de "novo" o de las vías de reciclaje del inositol (Mac Gregor y Matschinsky, 1986; Li, 1986; 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 anomalías bioquímicas están asociadas a un flujo axoplásmico reducido y a un desacople en la conducción del impulso (Green, y Lattimer, 1989).

Tanto en la retina como en la corteza cerebral, se ha encontrado un incremento significativo en la relación lactato/piruvato que se observa a los 7 días después de la administración de estreptozotocina (Salceda, R. et-al. 1998). Esto produce una disminución en la relación NAD⁺/NADH citosólica y, por lo tanto, cambios en el estado redox del citoplasma que podrían

producir valores subnormales de glutatión reducido y la regeneración de rodopsina durante la diabetes (Kowluru et-al 1997; Obstroy et al 1990).

Por otro lado, varios estudios han reportado un aumento en la concentración de radicales libres en la retina de ratas diabéticas (Murata, 1981; Cohen, 1984; Nishimura y Kuriyama, 1985). Esto puede provocar lisis membranal debido a que la retina es altamente sensible a la reactividad de los radicales libres. Por ser un tejido rico en ácidos grasos poliinsaturados (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; sin embargo, los mecanismos se desconocen.

OBJETIVO.

La retina representa un gran interés en el estudio de sus propiedades metabólicas, principalmente en lo que se refiere a la utilización de glucosa como fuente de energía; aunque existen reportes referentes al metabolismo de la glucosa estos no son suficientes y en lo que se refiere a la presencia de glucógeno la información que se tiene es contradictoria. Por lo que el objetivo del presente trabajo es identificar las reservas de glucógeno y la utilización de glucosa en la retina de la rata normal y diabética.

HIPOTESIS

Las altas concentraciones de glucosa pueden modificar su utilización y por lo tanto los niveles de glucógeno, piruvato y lactato, lo que puede llevar a cambios en la osmolaridad y en el estado redox de la célula, factores que pueden ser responsables de las alteraciones en la retinopatía diabética.

MATERIAL Y METODOS.

Los experimentos se llevaron a cabo en 344 ratas Long-Evans de 150-200 g de peso, mantenidos 12 horas luz- 12 horas oscuridad y alimentadas **ad libitum**; los animales se sacrificaron entre las 10 y las 12 hrs. del día.

Los animales adaptados por lo menos 2 horas a la luz u oscuridad se sacrificaron por decapitación, los ojos se enuclearon y se seccionaron ecuatorialmente, la parte anterior de ellos se eliminó. La retina se aislo en Ringer Krebs bicarbonato (RKB) con una composición (mM) de 118 de NaCl; 1.17 de KH_2PO_4 ; 4.7 de KCl; 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%. Se utilizarón las retinas de 30 ratas, con la finalidad de conocer si se presentan variaciones durante las horas del día en las concentraciones de glucosa en el suero y de los niveles de lactato en la retina. Las retinas de otras 32 ratas se procesaron inmediatamente, para determinar los niveles de lactato, piruvato y glucógeno. Mientras que otras retinas de 204 ratas se incubaron en RKB por distintos periodos de tiempo a 37 °C bajo diferentes condiciones experimentales que simularon diversas situaciones fisiológicas de la retina:

I.- Con el propósito de conocer el efecto de la adaptación a la luz y a la oscuridad, y si los niveles de lactado, piruvato y glucógeno en la retina se modifican durante la incubación. Se utilizaron las retinas de 128 ratas las cueles se incubaron bajo condiciones normales de iluminación del laboratorio o en la oscuridad (luz tenue roja).

II.- Con el propósito de conocer si la producción de lactado, piruvato y glucógeno es proporcional a la concentración de glucosa, las retinas de 76 animales adaptados a la luz se incubaron durante 20 minutos bajo condiciones de obscuridad en presencia de diferentes concentraciones de glucosa:

- a) En ausencia de glucosa (hipoglicemia).
- b) En presencia de 5.6 mM de glucosa (normoglucemia).
- c) Altas concentraciones de glucosa 20 y 30 mM de glucosa (hiperglucemia).

III.- La diabetes se le indujo a 78 animales con una administración intraperitoneal de estreptozotocina (65mg/Kg de peso) en amortiguador de citratos pH 4.8 (Macker, 1971) y se sacrificaron a : 7, 14, 20, 45 días después del tratamiento. Los niveles de glucosa en el suero se determinaron por la técnica de orto-toluidina (Hultman, 1959), utilizando un equipo de reactivos comerciales (Salubridad, México). Los animales se consideraron diabéticos si los valores de glucosa eran superiores a los 300 mg /dl de suero.

Determinación de lactato y piruvato:

Los niveles de lactato y de piruvato se determinaron midiendo las concentraciones de NAD⁺/NADH producido, siguiendo el método de Noll 1983; Lamprecht y Heinz 1983 respectivamente. El tejido se homogenizó 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 µl de la muestra, amortiguador de glicina (1M) pH 9.5, NAD⁺ (50 µM), 400 µl de

agua en un volumen final de 1 ml. La reacción se inició adicionando 4 μ l de una suspensión de la enzima deshidrogenasa láctica de músculo de conejo [E.C. 1.1.1.27. Sigma Chemical Co. St. Louis, MO] (860 unidades/mg de proteína). La reacción se siguió espectro-fotométricamente a 340 nm. por 30 min.

La determinación de los niveles de piruvato, se llevó a cabo en un sistema que contenía en un volumen total de 1 ml: 500 μ l de muestra, amortiguador de trietanolamina (0.5 M) pH 7.5, 8 mM de NADH . La reacción se inició por la adición 4 μ l de la enzima deshidrogenasa láctica de músculo de conejo [E.C. 1.1.1.27. Sigma Chemical Co. St. Louis, MO] (860 unidades/mg de proteína), y se siguió espectrofotométricamente a 340 nm por 30 min. a temperatura ambiente.

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

$$\text{nmolas/ml} = \frac{AE \times \text{volumen total}}{0.0062 \times \text{vol. de la muestra}}$$

Donde 0.0062 equivale a 1 nmola de lactado coeficiente de extinción Molar.

Determinación de Glucógeno.

Los niveles de glucógeno se determinaron siguiendo el método de Lust et al., 1975, Kepper y Decker., 1983. El tejido se homogenizó al 5% (p/v) en 400 μ l de NaOH 100 mM el homogenado se incubó 60 min a 80°C (para hidrolizar a la glucosa y a la glucosa-6-fosfato). Las muestras se dejaron a temperatura ambiente por 30 min. La precipitación del glucógeno se llevó a cabo por la adición de 1ml. de etanol al 100%, incubación a -20°C por 20 min. y centrifugación a 14000g por 15 min. El glucógeno precipitado se

lío-filizó en una secadora al vacío y posteriormente se resuspendió en 490 μ l de acetato de sodio 50 mM pH 4.5; y se sometió a sonicación para disolver el glucógeno; la digestión de éste se llevo a cabo con la adición de 10 μ l de amiloglucosidasa de Aspergillus niger [E. C. 3.2.1.3. Sigma Chemical Co. St. Louis, MO.] (1.4 U / muestra liofilizada) se incubó a 37 °C por 60 minutos posteriormente se centrifugó a 14000 g por 15 minutos. Una alícuota de 150 μ l del sobrenadante se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente en 150 μ l de trietanolamina (300 mM/ HCl) pH 7.6 que contenía ATP (2mM), NADP⁺ (2 mM), hexocinasa Tipo C-300 de levadura [E.C. 2.7.1.1. Sigma Chemical Co. St. Louis, MO.] (3 U/ ml), glucosa-6- fosfato deshidrogenasa Tipo III de levadura [E.C. 1.1.1.49. . Sigma Chemical Co. St. Louis, MO.] (8.5 U/ml), MgSO₄ (4 mM). La absorbancia se leyó en un lector de microplacas a 340 nm. La cantidad de residuos glucosilados expresada en nmol/mg de proteína se obtuvo considerando que el coeficiente de extinción molar del NADPH es de 6.2 mM⁻¹ cm⁻¹.

La cantidad de proteína total se determinó de acuerdo al método de Lowry (1951) y Peterson (1979) en la cual se emplea albúmina de suero de bovino como estándar y se leyó en un lector de microplacas a 690 nm.

El análisis estadístico se llevó a cabo mediante una Anova Unifactorial y comparación múltiples de Tukey a una $p < 0.05$ para la significancia.

RESULTADOS.

Los niveles de glucosa y por lo tanto de lactato y piruvato en el tejido depende en buena medida de la concentración de glucosa en la sangre. Con la finalidad de conocer si se presentan variaciones en las concentraciones de estos compuestos durante las diferentes horas del día se cuantificaron los niveles de glucosa en el suero. Los resultados indican que los niveles de glucosa presentan cambios notables durante las horas del día, observándose los valores más altos de 167.29 ± 6.7 mg/dl, a las 4 A.M. y los valores más bajos de 80.85 ± 8.7 mg/dl a las 8 A.M. (Tabla 1).

En la retina los niveles de lactato presentaron una relación directa con los niveles de glucosa en suero; la mayor concentración se observó a las 4 A.M. 6.76 ± 0.45 nmolas/mg de tejido y una menor concentración a las 8 A.M. 3.56 ± 0.17 nmolas/ mg de tejido (tabla 1). Basándonos en los resultados anteriores, los experimentos siguientes se realizaron entre las 10 y las 12 A.M.

Los niveles de lactato se cuantificaron en las retinas recién aisladas de ratas adaptadas a las condiciones de luz u oscuridad. En condiciones de adaptación a la luz se observaron niveles de lactato de 2.68 ± 0.38 y en la oscuridad de 4.46 ± 0.38 (Tabla 2).

Los niveles de piruvato en la retina aislada de ratas mantenidas en condiciones de iluminación fue de 0.141 ± 0.016 y en la de ratas que se adaptaron a la oscuridad fue de 0.302 ± 0.002 (Tabla 2). La relación lactato/ piruvato en la retina de ratas adaptadas a la luz fue de 17.02 ± 2.64 y en las ratas adaptadas a la oscuridad fue de 20.03 ± 2.39 . (Tabla 2).

NIVELES DE LACTATO Y PIRUVATO EN LA RETINA.

Condiciones de luz y oscuridad.

Con el propósito de conocer si los niveles de lactato en la retina se modifican con los tratamientos, éstas se incubaron bajo condiciones de luz u oscuridad por distintos periodos. En estos experimentos las ratas adaptadas a la luz se sacrificaron y las retinas se incubaron en la oscuridad o bajo las mismas condiciones de iluminación.

Los niveles de lactato en la retina tienden a aumentar durante los primeros 10 minutos de incubación tanto en la luz como en la obscuridad y se mantuvieron constantes durante el periodo estudiado. (Tablas 3 y 4).

Los niveles de piruvato disminuyeron un 50%, en las retinas incubadas durante 10 minutos bajo condiciones de iluminación y se mantuvieron constante hasta los 30 minutos de incubación (Tabla 3). En condiciones de obscuridad los valores de piruvato se mantuvieron constantes (Tabla 4).

La relación lactato/ piruvato aumenta 4.3 veces en las retinas que se incubaron durante 30 minutos tanto en condiciones de iluminación como de obscuridad. (Tablas 3 y 4).

Niveles de lactato y piruvato en el medio de incubación del tejido.

La presencia de lactato y piruvato se determinó en el medio en que se incubaron las retinas y se observó que los niveles de lactato aumentan con respecto al tiempo de incubación alcanzando a los 30 minutos valores de 35.41 ± 2.67 nmolas/ mg. de tejido, y de 68.50 ± 5.06 nmolas/mg. de tejido en condiciones de iluminación y de obscuridad, respectivamente. (Tablas 3 y 4)

Los niveles de piruvato aumentaron significativamente tanto en la luz como en la obscuridad durante los primeros 5 minutos de incubación; estos niveles se mantuvieron constantes hasta los 30 minutos de incubación (Tablas 3 y 4).

El curso temporal de la relación lactato/ piruvato se incrementó notablemente en el medio de incubación de las retinas, alcanzando a los 30 minutos de incubación valores de 288.69 ± 34.67 y 253.51 ± 37.8 en la luz y en la obscuridad respectivamente (Tablas 3 y 4).

Niveles de lactato y piruvato en retinas incubadas con diferentes concentraciones de glucosa.

Con el propósito de conocer si la producción de lactato es proporcional a la concentración de glucosa, las retinas de animales adaptados a la luz se incubaron durante 20 minutos bajo condiciones de obscuridad en presencia de diferentes concentraciones de glucosa. (Gráfica 1).

En ausencia de glucosa, la producción de lactato fue 6 veces menor que en aquellas en presencia de 5.6 mM de glucosa (control). En presencia de 20mM de glucosa el lactato aumentó 50% con

respecto al control, mientras que en presencia de 30 mM de glucosa; la producción de lactato disminuyó 50% con respecto al control (Gráfica 1).

Por otro lado los niveles de piruvato sólo se modificaron cuando las retinas se incubaron en presencia de 30 mM de glucosa, en donde disminuyeron 50% con respecto al control (Gráfica 2).

Debido a los cambios observados en los niveles de lactato, la relación lactato /piruvato se incrementó al doble en presencia de 20 mM de glucosa, disminuyó 10 veces en ausencia de glucosa y no se presentaron cambios significativos a 30 mM de glucosa. (Gráfica 3).

Niveles de lactato y piruvato en los medios de incubación de retinas incubadas en diferentes concentraciones de glucosa.

Los niveles de lactato y piruvato en los medios de incubación de las retinas incubadas en diferentes concentraciones de glucosa presentaron un patrón semejante al observado en el tejido (Gráficas 4 y 5); por lo que la relación lactato /piruvato se incrementó notablemente en presencia de 20 mM de glucosa; mientras que en presencia de 30 mM de glucosa la relación lactato/ piruvato fue 3 veces menor a la observada en el medio control (Gráfica 6).

Ratas tratadas con estreptozotocina.

La existencia de diabetes en ratas tratadas con estreptozotocina fue tomando en cuenta las siguientes mediciones 1) la presencia de niveles altos de glucosa en la sangre (al menos de 300 mg./dl), 2) una disminución significativa de peso (Tabla 5).

Niveles de lactato y piruvato en la retina de ratas tratadas con estreptozotocina.

Tres días después del tratamiento con estreptozotocina, los niveles de lactato aumentaron considerablemente en la retina de la rata, comparados con los encontrados en animales control (Gráfica 7). Estos valores se mantuvieron altos durante los primeros 14 días después de la administración de estreptozotocina (Gráfica 7), y posteriormente se observó una tendencia a disminuir.

Los niveles de piruvato en la retina de ratas diabéticas sólo se modificaron a los 14 días después del tratamiento, tiempo en el que se observó un aumento del 50 % (Gráfica 8).

Como resultado del incremento en los niveles de lactato, la relación lactato/ piruvato fue de 2 a 3 veces mayor en los animales tratados con estreptozotocina, comparada con la observada en los animales control (Gráfica 9).

CUANTIFICACION DE LOS NIVELES DE GLUCÓGENO.

Niveles de glucógeno en la retina.

Se cuantificaron los niveles de glucógeno en retinas de ratas que fueron adaptadas bajo condiciones de luz y oscuridad con el propósito de conocer si se presentan cambios en estas condiciones. En condiciones de iluminación normal, los valores de glucógeno en las retinas recién aisladas fueron de 48.23 ± 3.47 nmolas de residuos glucosilados/mg. de proteína, mientras que en las retinas de animales que fueron adaptados a la oscuridad se encontraron valores de 19.53 ± 0.44 nmolas de residuos glucosilados/ mg. de proteína (Tabla 6).

Niveles de glucógeno en las retinas incubadas.

Las retinas se incubaron en un RKB normal bajo condiciones de luz o de oscuridad. Los niveles de glucógeno en las retinas incubadas en la luz no presentaron cambios significativos con respecto a aquellos en el tejido recién aislado (Gráfica 10).

Sin embargo a los 5 minutos de incubación de la retina bajo condiciones de oscuridad, se observó una disminución de los niveles de glucógeno de un 54% con respecto al control (retinas recién aisladas en condiciones de iluminación). Estos valores aumentaron durante el periodo de incubación hasta alcanzar niveles semejantes a los observados en el tejido recién aislado e incubado bajo condiciones de iluminación (Gráfica 11).

Niveles de glucógeno en las retinas incubadas en presencia de diferentes concentraciones de glucosa.

Los niveles de glucógeno se estudiaron en las retinas de ratas adaptadas e incubadas en la oscuridad en presencia de diferentes concentraciones de glucosa.

En las retinas incubadas durante 20 minutos en un medio normal (glucosa 5.6 mM), se observaron valores de 39.39 ± 2.61 nmolas de residuos glucosilados/ mg. de proteína; mientras que las retinas que fueron incubadas en ausencia de glucosa los niveles de glucógeno disminuyeron un 42% con respecto al control (Gráfica 12). Cuando las retinas se incubaron en

presencia de 20 mM de glucosa, los niveles de glucógeno aumentaron un 75%, en tanto que en aquellas incubadas en presencia de 30mM de glucosa, los niveles de glucógeno disminuyeron 15.2% con respecto al control. (Figura 12).

Los niveles de glucógeno en las retinas incubadas en condiciones de iluminación no variaron con respecto a la concentración de glucosa en el medio, aunque en ausencia de ésta los niveles de glucógeno disminuyeron 69.5% (Gráfica 13)

Niveles de glucógeno en las retinas de ratas tratadas con estreptozotocina.

En la retina de ratas diabéticas, los niveles de glucógeno aumentaron de 2.5- 3.5 veces con respecto al control, en todos los tiempos estudiados en las ratas tratadas con estreptozotocina (Gráfica 14). Se observó un aumento continuo con respecto a los días de tratamiento con estreptozotocina. (Gráfica 14).

Tabla 1.- Niveles de glucosa en el suero y niveles de lactato en la retina de la rata durante diferentes horas del día.

Horas del día.	Niveles de glucosa en el suero mg/dl.	Niveles de lactato en la retina nmolas/mg de tejido.	Relación glucosa/lactato.
8:00	83.7 ± 4.9	3.37 ± 0.19	26.37 ± 1.1
12:00	120.7 ± 5.9 *	4.35 ± 0.14 *	27.75 ± 0.8
16:00	107.1 ± 2.7 **	3.88 ± 0.27 **	28.86 ± 1.2
20:00	115.4 ± 2.1 *	3.99 ± 0.18 *	28.38 ± 1.1
24:00	135.1 ± 8.5 *	5.78 ± 0.17 *	23.32 ± 1.2
4:00	167.2 ± 6.7 *	6.79 ± 0.22 *	24.64 ± 0.6

Los animales se mantuvieron en condiciones de luz y oscuridad (12 horas luz – 12 horas oscuridad) y se sacrificaron a la hora indicada. Los niveles de glucosa en el suero y los niveles de lactato en la retina se determinaron como se indica en materiales y métodos. Los resultados son expresados como la media de por lo menos 5 experimentos independientes ± el error estándar. *p< 0.01; **p < 0.05 con respecto a los valores de los animales sacrificados a las 8 A. M.

TABLA 2.-NIVELES DE LACTATO, PIRUVATO EN LA RETINA DE RATA.

Condición	Lactato nmolas/mg de tejido	Piruvato nmolas/mg de tejido	Lactato/ piruvato
Luz.	2.68 ± 0.38	0.14 ± 0.016	18.60 ± 1.94
Obscuridad	4.46 ± 0.37 *	0.30 ± 0.002 *	20.03 ± 2.39

Los animales se adaptaron durante dos horas a la luz o a la obscuridad y el lactato y el piruvato se determinaron como se indica en materiales y métodos. Los valores son la media ± el error estándar de por lo menos 10 experimentos. * $p < 0.05$ con respecto al tejido recién aislado en condiciones de iluminación.

TABLA 3.- NIVELES DE LACTATO Y PIRUVATO EN LA RETINA DE LA RATA A DIFERENTES TIEMPOS DE INCUBACIÓN EN CONDICIONES DE LUZ.

	Tiempo de incubación	Lactato nmolas / mg de tejido	Piruvato nmolas/ mg de tejido	Lactato/ piruvato
Tejido	0	2.68 ± 0.38	0.141 ± 0.01	17.02 ± 2.64
	5	7.12 ± 0.61 *	0.171 ± 0.04	59.60 ± 12**
	10	5.23 ± 0.32 *	0.073 ± 0.02 **	75.96 ± 23**
	20	5.28 ± 0.29 *	0.085 ± 0.01	57.30 ± 5.4 **
	30	6.15 ± 0.58 *	0.085 ± 0.03	74.18 ± 18*
Medio de incubación.	5	17.98 ± 2.2	0.308 ± 0.03	55.17 ± 5.7
	10	21.66 ± 1.1	0.110 ± 0.01 *	185.7 ± 32.8 *
	20	30.34 ± 3.4 **	0.220 ± 0.02 **	145.0 ± 22.6 **
	30	35.41 ± 2.7 *	0.137 ± 0.02 *	288.6 ± 34.7 *

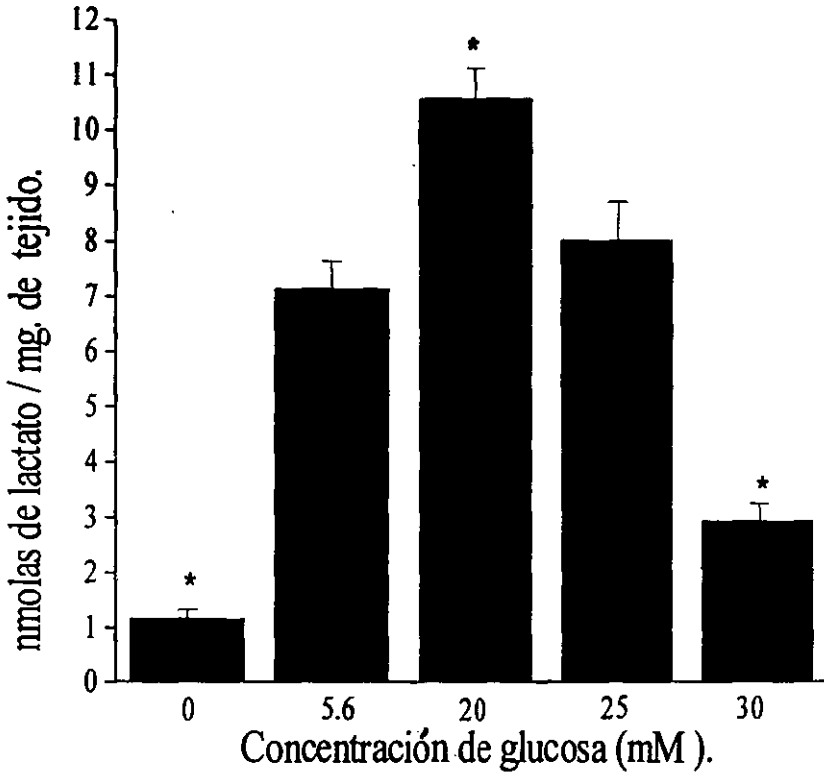
Las retinas se incubaron bajo condiciones de iluminación a diferentes periodos de tiempo (5, 10, 20 y 30 min.) En presencia de 5.6 mM. de glucosa. El lactato liberado al medio de incubación se expresa como nmolas/ mg de tejido. Los valores son la media de por lo menos 10 experimentos independientes ± el error estándar. *p < 0.01; **p < 0.05 con respecto a los valores del tejido recién aislado en condiciones de iluminación y en el medio de incubación es con respecto a los 5 minutos de incubación.

TABLA 4.- NIVELES DE LACTATO Y PIRUVATO EN LA RETINA DE LA RATA A DIFERENTES TIEMPOS DE INCUBACIÓN EN CONDICIONES DE OSCURIDAD.

	Tiempo de incubación	Lactato. nmolas/ mg de tejido	Piruvato. nmolas/ mg de tejido	Lactato/ piruvato
Tejido.	0	2.68 ± 0.38	0.141 ± 0.02	17.02 ± 2.6
	5	5.21 ± 0.24 *	0.262 ± 0.05	14.07 ± 2.0
	10	8.11 ± 0.46 *	0.217 ± 0.03	35.21 ± 2.3 **
	20	7.16 ± 0.49 *	0.181 ± 0.03	41.18 ± 6.9 **
	30	7.85 ± 0.39 *	0.116 ± 0.02	73.80 ± 13.8 *
Medio de incubación	5	20.36 ± 2.5	0.269 ± 0.04	55.64 ± 11.4
	10	34.55 ± 3.1 **	0.304 ± 0.05	100.45 ± 7.2 *
	20	42.53 ± 2.9 *	0.339 ± 0.07	105.18 ± 24.1 *
	30	68.50 ± 5.0 *	0.214 ± 0.02	253.51 ± 37.8 *

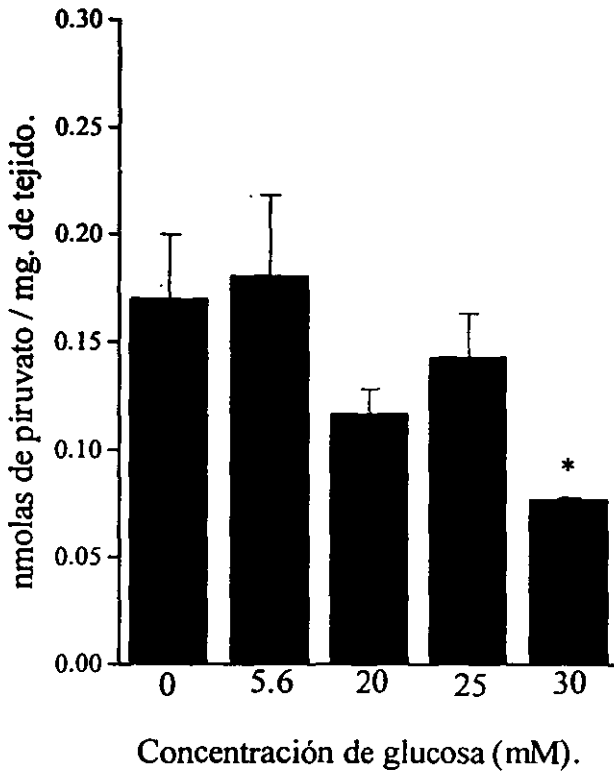
Las retinas se incubaron bajo condiciones de obscuridad a diferentes periodos de tiempo (5,10, 20 y 30 min.). En presencia de 5.6 mM. de glucosa. El lactato liberado al medio de incubación se expresa como nmolas/mg de tejido. Los valores son la media de por lo menos 10 experimentos independientes ± el error estándar. *p < 0.01; **p < 0.05 con respecto a los valores del tejido recién aislado en condiciones de iluminación y en el medio de incubación es con respecto a los 5 minutos de incubación.

Niveles de lactato en la retina de la rata.



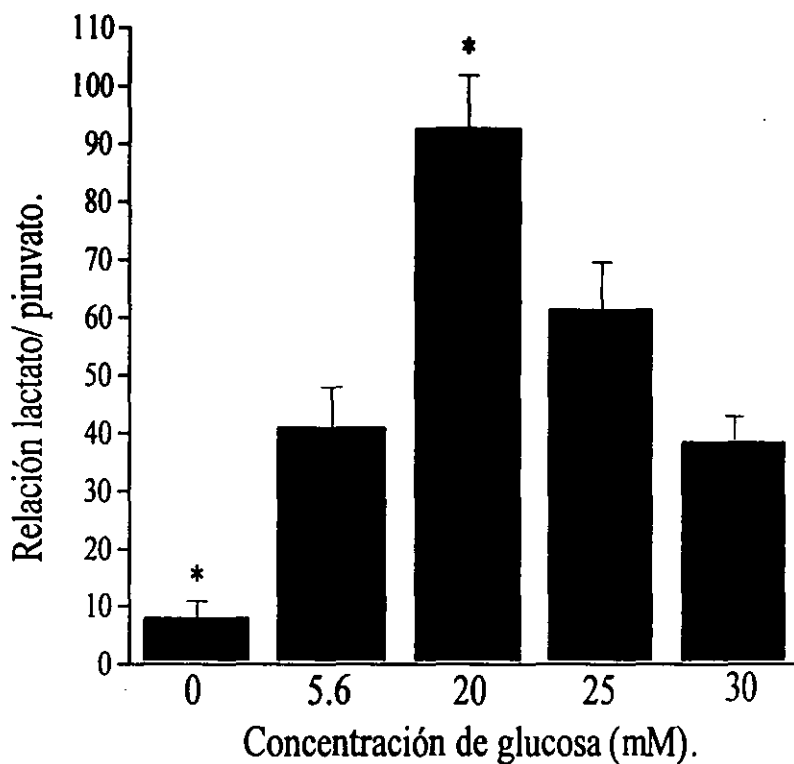
Gráfica 1.- Niveles de lactato en la retina de la rata incubada durante 20 minutos en condiciones de obscuridad y diferentes concentraciones de glucosa. Los valores son la media \pm el error estándar de por lo menos 10 experimentos independientes. * $p < 0.01$ con respecto a los valores de los tejidos incubados en glucosa 5.6 mM.

Niveles de piruvato en la retina de la rata.



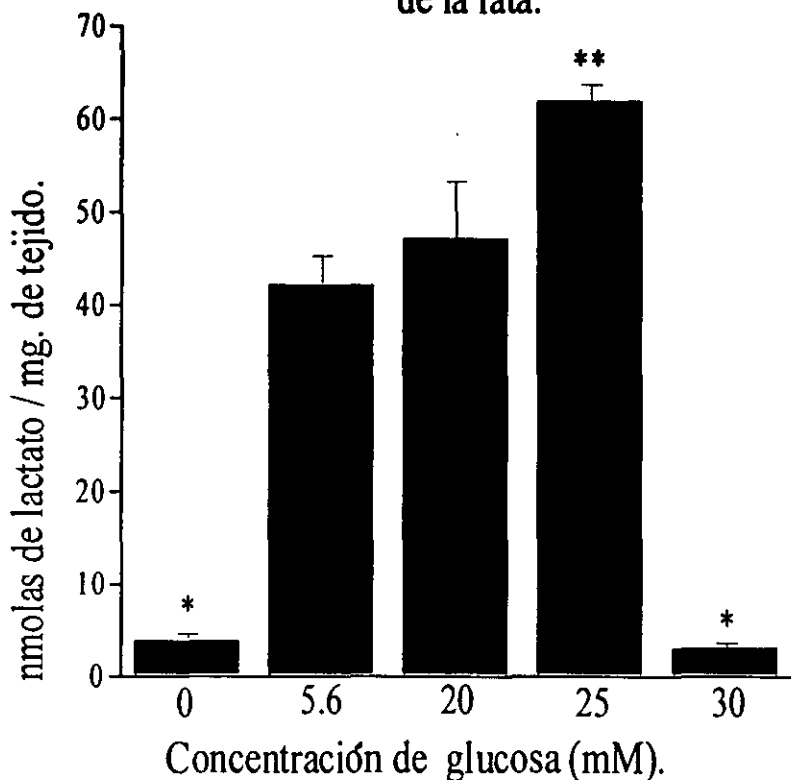
Gráfica 2.-Niveles de piruvato en la retina de la rata incubada durante 20 minutos en condiciones de obscuridad y diferentes concentraciones de glucosa. Los valores son la media \pm el error estándar de por lo menos 10 experimentos independientes. * $p < 0.05$ con respecto a los valores de los tejidos incubados en glucosa 5.6 mM.

Relación lactato/ piruvato en la retina de la rata.



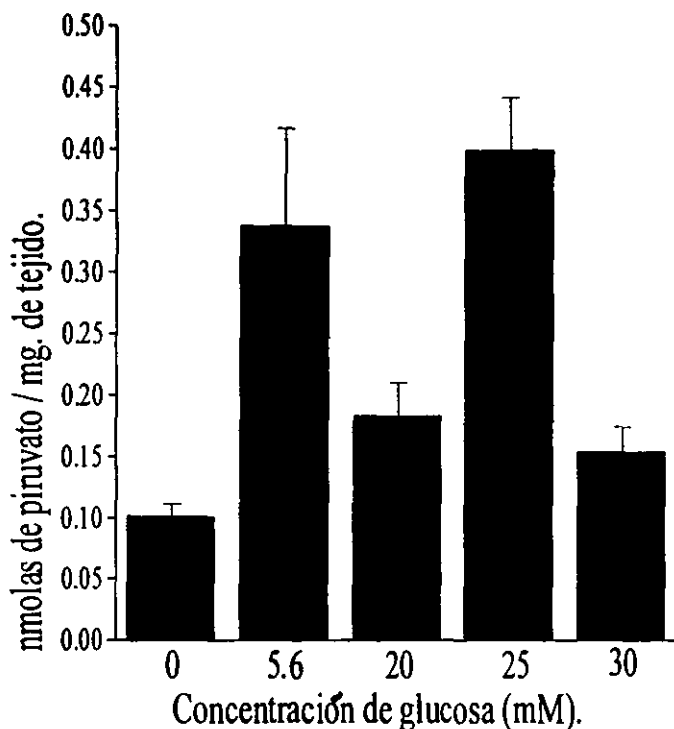
Gráfica 3.- La relación lactato/ piruvato en la retina de la rata incubada durante 20 minutos en condiciones de oscuridad y diferentes concentraciones de glucosa. Los resultados corresponden a los valores obtenidos de las gráficas 1 y 2 . *p < 0.01 con respecto a los valores del control.

Niveles de lactato en el medio de incubación de la retina de la rata.



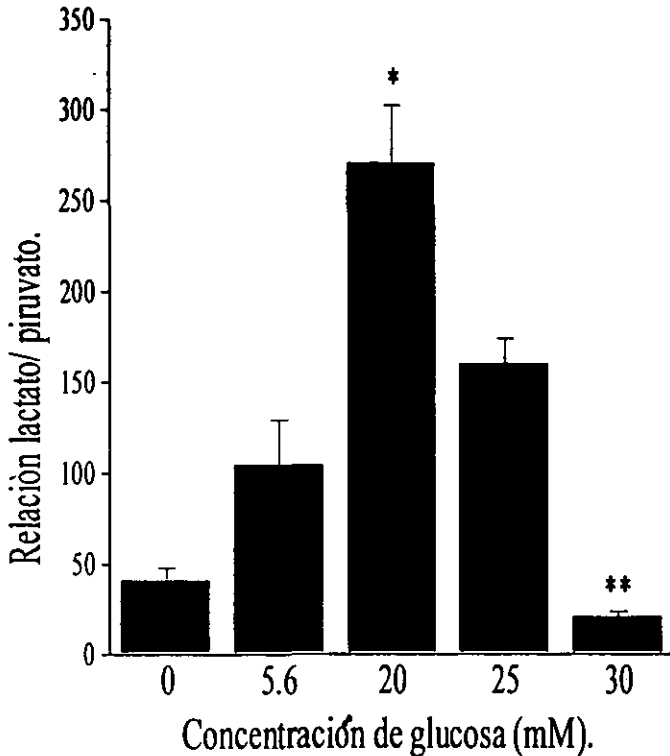
Gráfica 4. - Niveles de lactato en el medio de incubación de la retina de la rata en presencia de diferentes concentraciones de glucosa. El tejido (dos retinas) se incubó durante 20 minutos en condiciones de obscuridad. El lactato liberado al medio de cultivo se expresa como nmolas/ mg de tejido. Los valores son la media \pm el error estándar de por lo menos 10 experimentos independientes. * $p < 0.01$; ** $p < 0.05$ con respecto a los valores de los tejidos incubados en glucosa 5.6 mM.

Niveles de piruvato en el medio de incubación de la retina de la rata.



Gráfica 5. - Niveles de piruvato en el medio de incubación de la retina de la rata en presencia de diferentes concentraciones de glucosa. El tejido (dos retinas) se incubó durante 20 minutos en condiciones de oscuridad. El piruvato liberado al medio de cultivo se expresa como nmolas/ mg de tejido. Los valores son la media \pm el error estándar de por lo menos 10 experimentos independientes. * $p < 0.05$ con respecto a los valores de los tejidos incubados en 5.6 mM.

Relación lactato/ piruvato en el medio de incubación de la retina de la rata



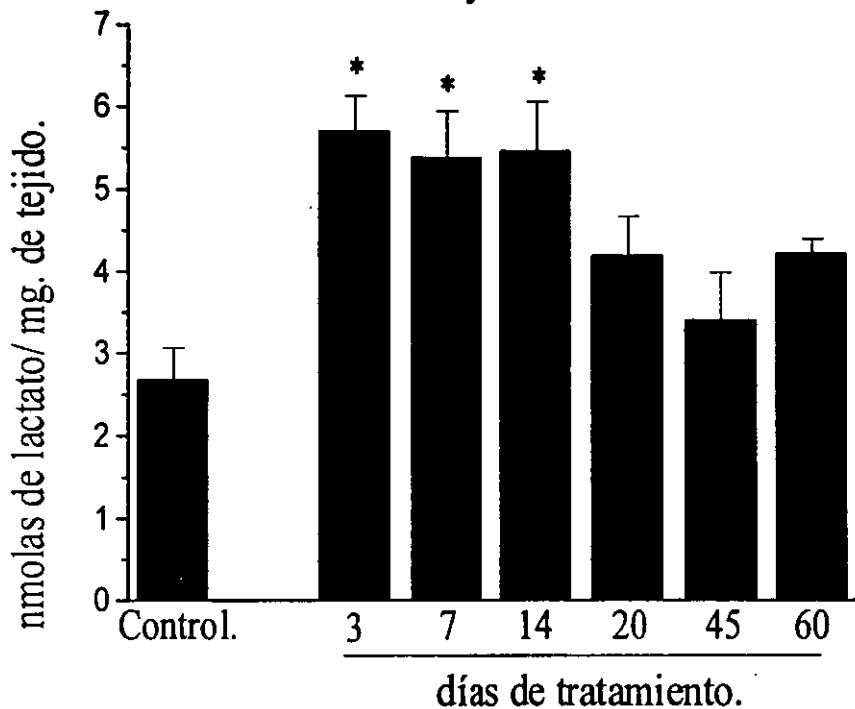
Gráfica 6. - Relación lactato/ piruvato en el medio de incubación de la retina en presencia de diferentes concentraciones de glucosa. Los resultados corresponden a los valores obtenidos de las gráficas 4 y 5 son la media \pm el error estándar de por lo menos 10 experimentos independientes. * $p < 0.01$; ** $p < 0.05$ con respecto al control.

TABLA 5. ESTADO METABOLICO DE RATAS TRATADAS CON ESTREPTOZOTOCINA.

Días después del tratamiento	Glucosa en sangre (mg./ dl.)	Peso corporal. (% de perdida)
3	365 ± 13	8.5 ± 0.54
7	374 ± 24 *	9.0 ± 0.2
14	449 ± 48 *	12.4 ± 0.4
20	536 ± 19 *	36.2 ± 2.0 *
45	734 ± 30 *	43.5 ± 2.7 *

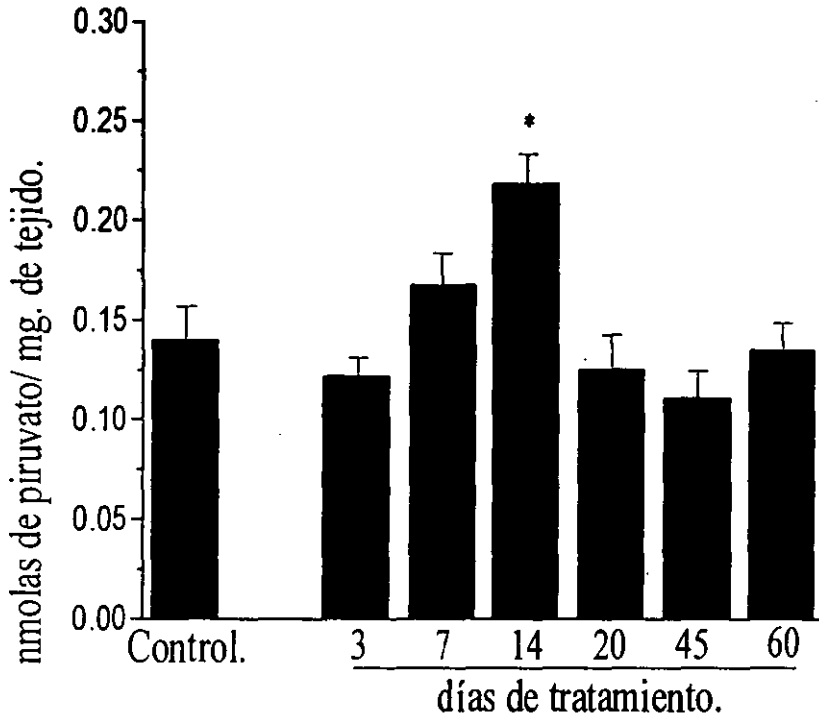
Los datos son el promedio ± el error estándar de grupos formados por 15 animales cada uno. Los niveles de glucosa en sangre de ratas control fue de 114 ± 3.8 mg./dl. * p< 0.001

Niveles de lactato en la retina de ratas normales y diabéticas.



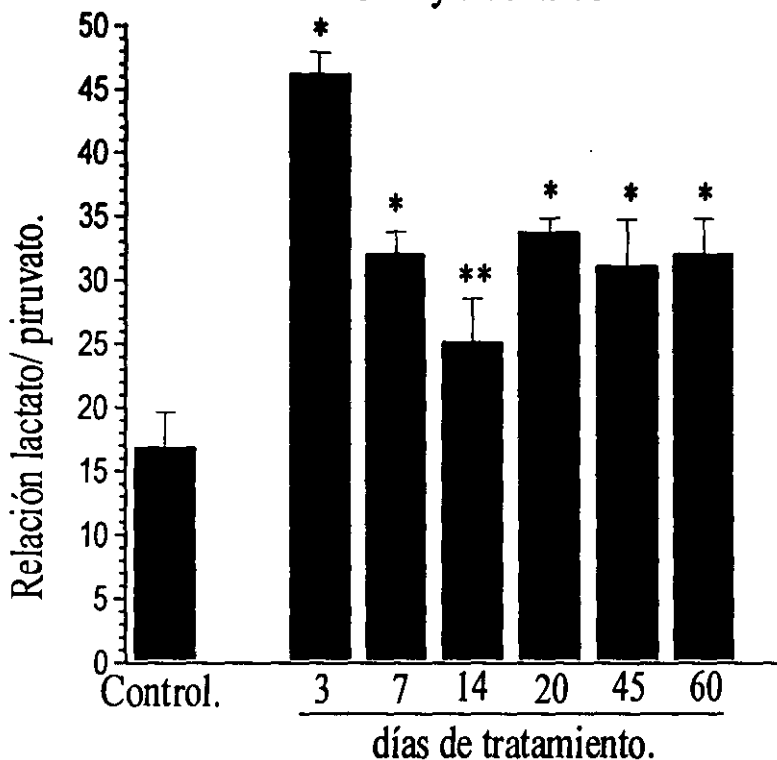
Gráfica 7.- Los niveles de lactato en la retina de ratas control y después de 3, 7, 14, 20, 45 y 60 días del tratamiento con estreptozotocina. Las retinas se aislaron de ratas adaptadas a la luz. Los resultados son la media \pm el error estándar de por lo menos 10 experimentos independientes. * $p < 0.01$ con respecto a los valores del control.

Niveles de piruvato en la retina de ratas normales y diabéticas.



Gráfica 8.- Los niveles de piruvato en la retina de ratas control y después de 3, 7, 14, 20, 45 y 60 días del tratamiento con estreptozotocina. Las retinas se aislaron de ratas adaptadas a la luz. Los resultados son la media \pm el error estándar de por lo menos 10 experimentos independientes. * $p < 0.01$ con respecto a los valores del control.

Relación lactato/ piruvato en la retina de ratas normales y diabéticas.



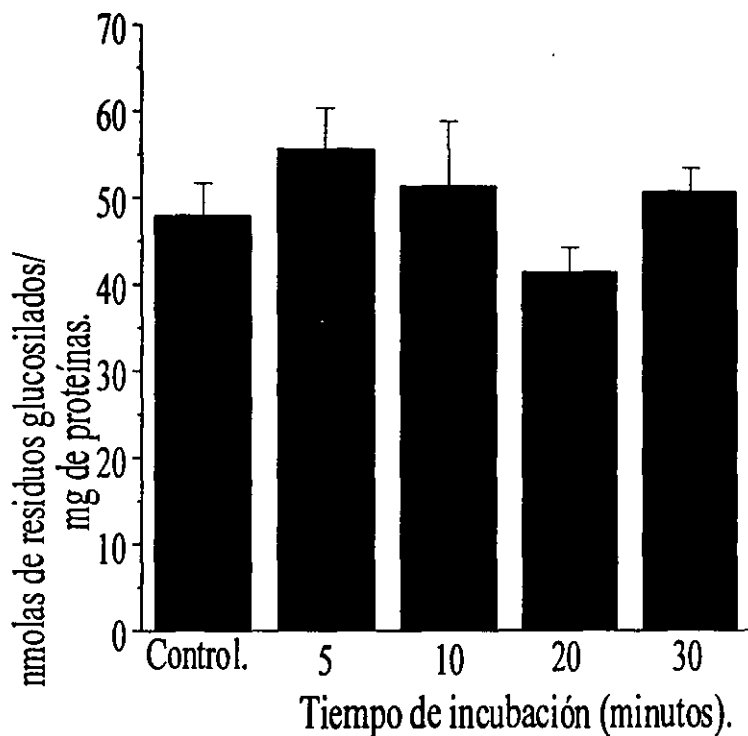
Gráfica 9.- La relación lactato/ piruvato en retinas de ratas control y diabéticas. Los resultados corresponden a los valores obtenidos de las gráficas 7 y 8 son la media \pm el error estándar de por lo menos 10 experimentos independientes. * $p < 0.01$; ** $p < 0.05$ con respecto a los valores del control.

TABLA 6. - NIVELES DE GLUCÓGENO EN LA RETINA RECIÉN AISLADA.

CONDICIONES DE INCUBACIÓN.	RETINA. (nmolas de residuos glucosilados/ mg de proteína)
LUZ.	48.23 ± 3.47
OBSCURIDAD.	19.53 ± 0.44

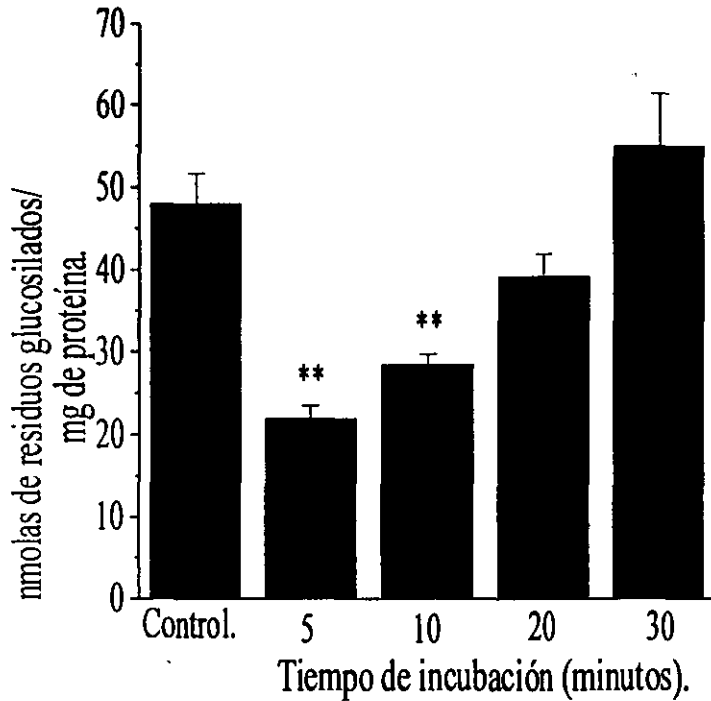
Los animales se adaptaron durante dos horas a la luz y a la obscuridad y el glucógeno se determinó como se indica en materiales y métodos. Los resultados son la media ± el error estándar de por lo menos 6 experimentos independientes.

Niveles de glucógeno en la retina de la rata.



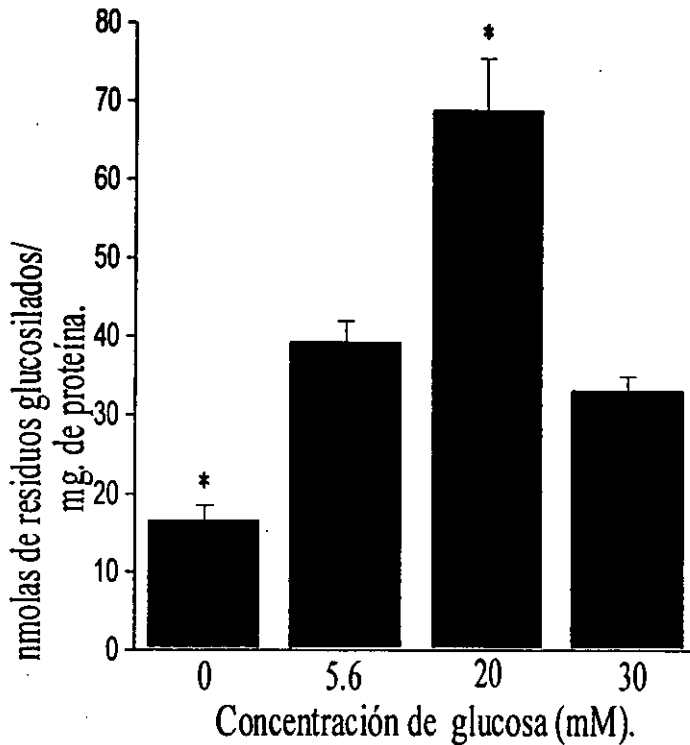
Gráfica 10.- Los niveles de glucógeno en la retina adaptada a la luz e incubada en RKB bajo condiciones de iluminación a diferentes periodos de tiempo. Los resultados son la media \pm el error estándar de por lo menos 6 experimentos independientes.

Niveles de glucógeno en la retina de la rata.



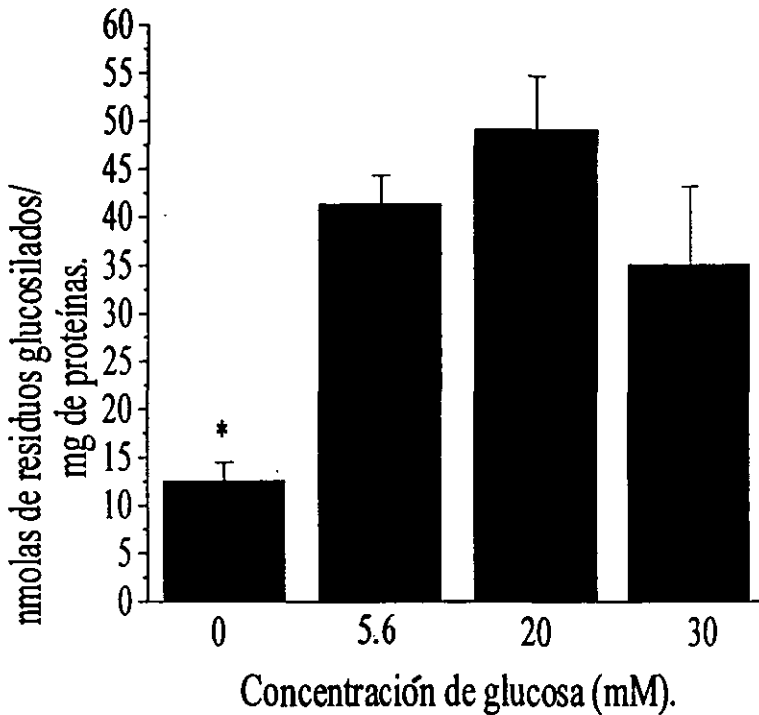
Gráfica 11.- Los niveles de glucógeno en la retina adaptada a la luz e incubada en RKB bajo condiciones de obscuridad a diferentes periodos de tiempo. Los resultados son la media \pm el error estándar de por lo menos 6 experimentos independientes. * $p < 0.05$ con respecto a los valores del tejido recién aislado en condiciones de iluminación.

Niveles de glucógeno en la retina de la rata.



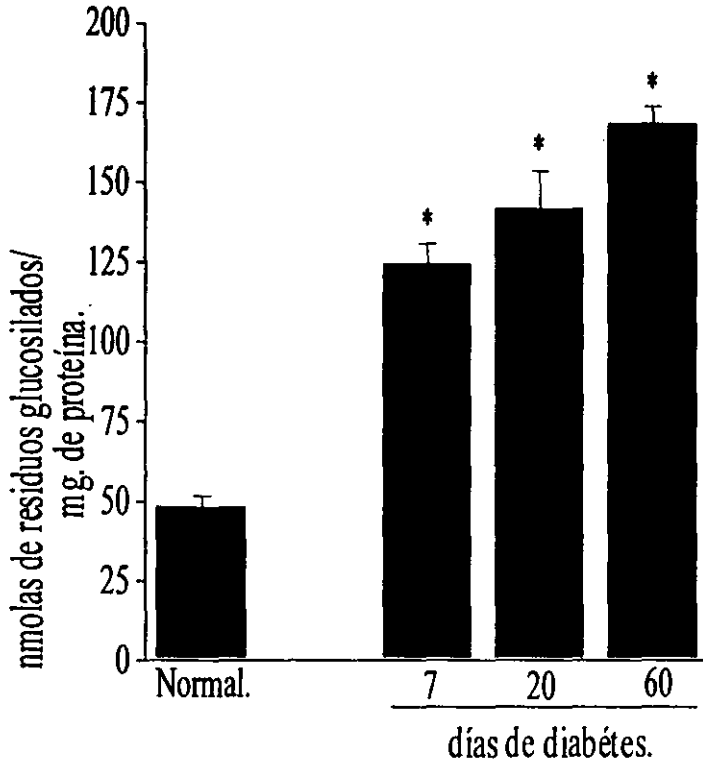
Gráfica 12.- Los niveles de glucógeno en la retina adaptada a la luz e incubada durante 20 minutos en presencia de diferentes concentraciones de glucosa en condiciones de oscuridad. Los resultados son la media \pm el error estándar de por lo menos 6 experimentos independientes. * $p < 0.01$ con respecto a los valores del control.

Niveles de glucógeno en la retina de la rata.



Gráfica 13.- Los niveles de glucógeno en la retina adaptada e incubada en condiciones de iluminación, en presencia de diferentes concentraciones de glucosa. Los resultados son la media \pm el error estándar de por lo menos 6 experimentos independientes. * $p < 0.05$ con respecto a los valores del control.

Niveles de glucógeno en la retina de ratas normales y diabéticas.



Gráfica 14.- Los niveles de glucógeno en la retina de ratas control y después, de 7, 20 y 60 días del tratamiento con estreptozotocina. Las retinas se aislaron de ratas adaptadas a la luz. Los resultados son la media \pm el error estándar de por lo menos 6 experimentos independientes. * $p < 0.01$ con respecto a los valores del control.

DISCUSIÓN.

En todas las células animales, el metabolismo de la glucosa es crucial para mantener sus funciones. Por lo tanto alteraciones que afecten las concentraciones de glucosa, como ocurre en la diabetes mellitus, pueden conducir a cambios en las vías metabólicas que eventualmente produce anomalías anatómicas y funcionales (Brownlee, M., y Cerami, A. 1981; Mac, Gregor et-al. 1984; Frank, R. N. 1995; Alder, V. A. et-al. 1997; Mizutani, M.et-al. 1998).

La retina requiere de una gran cantidad de energía para llevar a cabo sus funciones y mantener su actividad. La glucosa es la fuente principal de energía en la retina y desde los experimentos de Warburg's (1924) se ha descrito que presenta una alta actividad glucolítica, tanto en condiciones anaerobias como aeróbicas y por lo tanto una alta producción de lactato.

También se conoce que la retina de la rata presenta un alto consumo de O_2 lo que indica una elevada actividad mitocondrial. Sin embargo, en la retina de la rata, conejo y de cerdo, se observó que la mayor parte de la glucosa consumida (el 70%) en presencia de O_2 se convierte a lactato (Krebs, H.A. et-al 1972; Törnquist, P. et-al. 1979; Winkler, B.S. 1983, a; Wang, L. et-al 1993; 1997 a; b). Los niveles de glucosa en la retina pueden variar en función de los niveles de glucosa en plasma y por tanto de la conducta alimenticia del organismo. Los valores de glucosa en plasma oscilan durante las diferentes horas del día. presentándose los valores más altos durante la noche y los valores más bajos durante la mañana (Ahlersova, E. et-al. 1981; Larue-Achagiotis, et-al 1983; Van-Cauter. E. 1991; Bizot-Espiard, J. G. Et-al 1998), fenómeno confirmado en el presente estudio. En estudios realizados en humanos, se encontró que los valores de glucosa en suero son altos al

amanecer y bajos en la noche, fenómeno opuesto al que se presenta en la rata, animal de vida nocturna (Bizot-Espiard J. G. et-al. 1998).

En base a estos resultados, estudiamos la posible relación entre los niveles de glucosa en la sangre y la producción de lactato en la retina durante las diferentes horas del día. Efectivamente, los niveles de lactato en la retina oscilan durante el día, donde los valores más altos se presentaron durante la noche y los valores más bajos durante el día, semejante a lo que ocurre con los niveles de glucosa en plasma (Tabla 1). De manera similar, en la sangre y en el hígado de la rata, los valores más altos de lactato se presentan durante la noche (Ahlersova, E. et-al. 1981) en forma paralela a un aumento en el consumo de glucosa (Le-Magnen, et-al. 1980), y al incremento en la actividad de enzimas como la malato, isocitrato, y la glucosa-6- fosfato deshidrogenasas. De estos resultados, es evidente que los estudios referentes a la utilización de glucosa deben hacerse en tiempos definidos, lo cual no se ha reportado previamente en la retina.

Adicional a los hábitos alimenticios del organismo, la actividad metabólica de la retina podría variar dependiendo de su actividad fisiológica: luz, oscuridad. Así, aunque existen reportes que sugieren diferencias en el metabolismo de las retinas adaptadas a la oscuridad o a la luz, éstos no son contundentes (Yamamoto, F. et-al. 1992), por lo que estudiamos en la retina de la rata los niveles de lactato y piruvato y su posible modificación, durante la incubación bajo condiciones de luz u oscuridad.

En este trabajo se encontró que en las retinas recién aisladas de animales adaptados a la oscuridad, los niveles de lactato y piruvato son mayores con respecto a la de aquellos animales que fueron adaptados a la luz; sin embargo, la relación lactato/ piruvato fue igual en ambas condiciones.

In vitro los niveles de lactato y piruvato se incrementan con respecto al tiempo de incubación, y aunque son mayores en condiciones de obscuridad, la relación lactato/piruvato es mayor en condiciones de iluminación lo que sugiere que en la retina existen cambios en la síntesis y la utilización de lactato y/o piruvato. Nuestros resultados están de acuerdo con estudios previos en los que se reportaron pequeñas diferencias en cuanto a la producción de lactato entre retinas incubadas bajo condiciones de luz u obscuridad (Winkler, B. S. 1981; a; b). Simultáneamente, estudios recientes en las retinas de gato, cerdos y monos mantenidas bajo condiciones de obscuridad, mostraron un mayor consumo de glucosa y una alta producción de lactato en comparación con las retinas incubadas bajo condiciones de iluminación (Bill, A. et-al 1990; Braun, R. D. et-al 1995; Wang, L. et-al 1997 a; b). Así mismo, en la retina externa del cerdo se reportó que la energía producida tanto por la vía glucolítica como la oxidativa es aproximadamente del 42% menor en condiciones de iluminación que en condiciones de obscuridad (Wang, L. 1997 a).

La liberación de lactato al medio extracelular se observó en células de Müller incubadas en la obscuridad, liberación probablemente acompañada de H^+ (Poitry, C. L. 1995; Spencer y Lehninger, 1976). En condiciones de obscuridad, el pH en el espacio extracelular y en el humor vítreo presenta valores de 7 y 7.17 respectivamente. En condiciones de iluminación el pH en estos tejidos aumentó a 7.27 (Tsacopoulos and Levy 1976; Murray, D. L. et-al 1991), por lo tanto la liberación de lactato al espacio extracelular podría ser un factor que contribuye a la acidificación, la cual puede causar daño celular (Murray, D. L. et-al 1991). Por otro lado, en la retina de numerosas especies el consumo de O_2 es mayor en condiciones de obscuridad (Stefansson, E. 1983; Linsenmeier. 1986; . Linsenmeier, and Yancey, 1989; Murray, D. L. 1991; Braun, R. D. 1995; Wang, L. 1997 a; 1997 b.). En los

fotorreceptores aislados, se observó una disminución del 60% en el consumo de O_2 en condiciones de iluminación (Linsenmeier, 1986), comparado a lo que ocurre en la oscuridad (Haugh et al., 1990).

La ATPasa de Na^+ / K^+ requiere de un gran consumo de energía para mantener la homeostasis iónica del tejido nervioso (Erecinska, M. et-al, 1990; 1991; 1996; Silver, I.A. y Erecinska, M. 1997 a; 1997 b; 1998). En la retina, la ATPasa Na^+ / K^+ ocupa aproximadamente el 37% de la hidrólisis total de la glucosa para mantener el gradiente de concentración de Na^+ requerido para la corriente de oscuridad de los fotorreceptores (Winkler, B. S. 1981 a; 1982; 1983 b; Stirling, C. and Sarthy, P. 1985). Existe evidencia en una gran variedad de tejidos que indica que la actividad de la ATPasa Na^+ / K^+ estimula la captación de glucosa, la glucólisis, y la producción de lactato (Parker and Hoffman, 1967; Paul, et-al; 1979; Lipton and Robacker, 1983; Lynch and Balaban, 1987). En la retina se encontró en condiciones de iluminación una disminución en la actividad de la ATPasa $Na^+ - K^+$ (Kimble, E. A., et-al. 1980), paralelo a una disminución en la utilización de glucosa y glutamina para la formación de glutamato, aspartato y GABA (Voaden, M. J. 1980), aminoácidos cuya síntesis y liberación aumenta en la oscuridad (Graham, et-al. 1970; Lam, 1972; 1975; Starr, 1973; Graham, 1974; Voaden, M. J. 1980). Así mismo, la acumulación de glutamato y su conversión a glutamina en las células de Müller es mayor en la oscuridad (Winkler, B.S. et-al. 1999). En conjunto los resultados antes mencionados indican que el requerimiento energético de la retina es mayor en condiciones de oscuridad.

Con el propósito de conocer si la producción de lactato es proporcional a la concentración de glucosa, las retinas de animales adaptados a la luz se incubaron bajo condiciones de oscuridad en ausencia y presencia de diferentes concentraciones de

glucosa. Como se esperaba, en ausencia de glucosa la producción de lactato es 6 veces menor que en las incubadas en presencia de 5.6 mM de glucosa (control), mientras que los niveles de piruvato permanecieron constantes; por lo que la relación lactato/ piruvato disminuyó 10 veces en el tejido incubado en ausencia de glucosa con respecto al control. La pequeña producción de lactato en ausencia de glucosa debe provenir de carbohidratos endógenos (Kuwabara. and Cogan, 1961; Babel, and Stangos, 1973 Poitry-Yamate and Tsacopoulos, 1991; Berman, E.R. 1991; Poitry-Yamate, et-al. 1995; Fliesler, S.J. 1997; Niemeyer, G. 1997). En condiciones de isquemia, se observó la liberación de la lactato deshidrogenasa, la cual puede prevenirse en presencia de bajas concentraciones de glucosa [1-2 mM] (Romano. 1998). En la retina de pollo y de la rata incubada en presencia de 1mM de glucosa, la producción de lactato y ATP disminuyeron en un 56% y un 20% respectivamente, y el ERG y la respuesta eléctrica del nervio óptico se vieron afectadas (Winkler. 1981 b; Macatuso. et-al 1992; Fliesler. et-al. 1997; Niemeyer. 1997; Maynard. et-al. 1998; Romano, C. et-al. 1998); lo que podría sugerir que las reservas de carbohidratos son bajas. En este sentido, en el cerebro se observó que en condiciones de hipoglucemia (0.5 mM de glucosa) el estado redox disminuye un 60% en comparación al tejido que se mantuvo en presencia de 5 mM de glucosa (Garofalo, O. 1988).

Cuando la retina se incubó en presencia de altas concentraciones de glucosa (20 y 25 mM), los niveles de lactato en la retina y medio de incubación aumentaron en un 50% con respecto al control (Figuras 1 y 6). En estas condiciones, los niveles de piruvato permanecieron constantes, por lo que la relación lactato/ piruvato en el tejido aumentó al doble. Los resultados que están de acuerdo con el aumento en la actividad glucolítica reportada en las retinas de rata incubadas en condiciones aeróbicas y en presencia de 20 mM de glucosa (Cohen, H.L. 1960; Keen, and Chlouverakis, 1965; Winkler, B.S. 1981 a,

b; 1997; Van den Eden, M. 1995). El incremento en los niveles de lactato observados con altas concentraciones de glucosa son semejantes a los observados en otros tejidos tales como el riñón (Tilton, R.G. et-al. 1992) cerebro (Williamson, J. R. 1993), aorta (Morrison, A. D. 1972), cristalino (Varma, S.D. 1974; Kinoshita, J.H. 1979; Cheng, H-M.1988; Lou, M.F. 1988; Tsubota, K. 1989; Nyengaard, 1994), eritrocitos (Travis, S. F. 1971) y células endoteliales en cultivo (Leet-S, et-al. 1989).

La elevada relación lactato/ piruvato observada en presencia de altas concentraciones de glucosa en el medio de incubación es congruente con el incremento de esta relación en las retinas de ratas diabéticas. Estas observaciones apoyan los conceptos de hiperglucemia, pseudohipoxia (Williamson, J.R. 1993) y falsa anoxia (Keen and Chlouverakis, 1965) que se postula que pueden ocurrir en el estado diabético, provocando alteraciones funcionales y estructurales en la retina.

En contraste, las retinas incubadas en presencia de 30 mM de glucosa presentaron valores de lactato similares a los observados con 5.6 mM de glucosa, por lo que la relación lactato/ piruvato no presentó cambios estadísticamente significativos con respecto a las retinas incubadas en un medio control (5.6 mM de glucosa). Este aparente desacuerdo en los resultados podría explicarse en base a que en los animales diabéticos la concentración de glucosa en plasma se mantiene elevada por tiempos largos (crónicos) y nuestros experimentos se realizaron en tiempos cortos (agudo). En apoyo a esta interpretación, Van den Enden, M. et-al. 1995, y Winkler, B.S. 1997 demostraron una alta relación lactato/ piruvato en retinas incubadas a tiempos largos de incubación (1-2 horas) en presencia de 30 mM de glucosa. Es importante señalar que a tiempos largos de incubación (1-2 horas) en presencia de 5.6 mM, la retina presenta cambios importantes: disminución en los niveles de ATP, blanqueamiento de la rodopsina, pérdida de la actividad eléctrica, y probablemente

muerte celular (Berman, R. E 1991). Bajo las condiciones que nosotros usamos, consideramos que la retina se mantiene en condiciones óptimas, pues sí la regresamos a un medio con concentraciones normales de glucosa, la relación lactato/piruvato se restablece.

Algunos estudios sugieren que la diabetes es acompañada por cambios crónicos en las vías metabólicas, con una eventual pérdida anatómica y funcional que caracteriza a la retinopatía (Mac, Gregor. Et-al. 1986; Frank, R. N. 1995). Aunque la naturaleza de estos cambios no se conocen, se ha sugerido que podrían ser causados por la elevación de los niveles de glucosa y la disminución del metabolismo aeróbico (Mac, Gregor. Et-al. 1986; Frank, R. N. 1995).

En las ratas que se indujo la diabetes por estreptozotocina, la concentración de glucosa en la sangre aumentó de 3 a 5 veces, incremento que se observó a partir de los 3 días posteriores del tratamiento. Así mismo, en la retina, los niveles de lactato aumentaron aproximadamente 3 veces, en tanto que los niveles de piruvato no se modificaron significativamente. El aumento en las concentraciones de lactato en la retina de estas ratas hiperglicémicas es similar al incremento observado en el riñón (Tilton, 1992), y aorta (Morrison. 1972) de animales diabéticos y en células endoteliales de la retina cultivadas, 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 forma de NADH (Mac, Gregor., et-al. 1986; Frank., 1995). Este cambio en el estado redox del citoplasma puede favorecer la formación de especies oxigenadas reactivas, provocando estrés oxidativo (Mac, Gregor et-al 1986; Williamson, et-al. 1993), lo cual también afectaría la actividad de numerosas enzimas que usan equivalentes $NAD^+/NADH$ como cofactores en reacciones acopladas de oxido reducción. Valores subnormales de glutatión reducido y un desequilibrio en la

regeneración de rodopsina, se observaron en tiempos largos de establecida la diabetes (Ostroy, et-al. 1990; Kowluru, R. A. et-al. 1997).

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 lactato deshidrogenasa (LDH) que se observa en la retina de ratas diabéticas (Lolley, R. N. 1969; Vilchis-Quintero, 1995; Salceda, R. 1998).

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). El aumento en los niveles de lactato, probablemente sobresaturan el sistema del acarreador causando su acumulación en el tejido (Bito, 1980). Aunado al incremento en los niveles de lactato, ocurre un aumento en la producción y liberación de CO_2 , estos dos factores son responsables de la caída del pH, que resulta en una acidosis metabólica regional. Bajo condiciones patológicas como la isquemia, se ha observado un incremento en el contenido de lactato que es acompañado por una disminución del pH (Paschen, et-al. 1987), que a su vez puede provocar un incremento en la liberación de neurotransmisores (Madl., 1994). Si la acidosis láctica es una condición dañina para el tejido nervioso, éste podría presentar un mecanismo compensatorio, de transformación de ácido láctico en moléculas inocuas, o ser reciclado para la transformación de energía. En el cerebro se encuentran presentes las enzimas necesarias para la gluconeogénesis (Hawkins., et-al. 1983; Shank., et-al. 1985; Dringen, R. 1993 a; b; c) y se reportó que los astrocitos son capaces de convertir lactato en residuos glucosilados (Dringen, R. 1993 c). Por otra parte, se ha observado en el cerebro y en la retina de anfibios que sustratos de la gluconeogénesis se incorporan al glucógeno (Ide, et-al. 1969; Golman, R. et-al. 1987; 1988).

Durante mucho tiempo se consideró que en el sistema nervioso las reservas de glucógeno eran pequeñas o no existían; estudios recientes indican que no se encuentra en las neuronas (Ignacio et-al; 1990; Pfeiffer, et-al; 1990; 1992; Reinhart et-al., 1990). Sin embargo, en la glia principalmente en los astrocitos, existe la actividad de la glucógeno fosforilasa y de reservas energéticas en forma de glucógeno (Cataldo y Broadwell, 1986; Ignacio et-al.,1990; Pfeiffer, et-al., 1990; 1992). También se reportó que los astrocitos pueden degradar al glucógeno y liberarlo en forma de residuos glucosilados que pueden ser utilizados como sustratos metabólicos por neuronas y oligodendrocitos adyacentes. (Magistretti, et-al., 1988; Dringen, R, et-al., 1992; 1993 c; Forsyth, R. J. 1996; Wiesinger, et-al. 1997).

En la retina, la presencia de glucógeno es controvertida; en algunos vertebrados como en el gato se demostró histoquímicamente la presencia de glucógeno; sin embargo la respuesta eléctrica de la retina se pierde rápidamente en ausencia o a bajas concentraciones de glucosa, (Niemeyer, G. 1997), y estudios bioquímicos demostraron en la misma especie la ausencia, bajas o altas concentraciones de glucógeno. (Rungger-Brändle, E. et-al. 1996; Niemeyer, G. 1997).

En el presente estudio, se identificó la presencia de glucógeno en la retina de la rata (Tabla 6), si bien los valores fueron relativamente bajos (50 nmolas de residuos glucosilados/ mg de proteína) comparados con los reportados en otras especies (Tsacopoulos y Magistretti, 1996; Golman, S. S. and Witkovsky , P. 1987). Nuestros resultados son relevantes en el sentido de que los niveles de glucógeno se modifican de manera significativa bajo diferentes condiciones fisiológicas. En la obscuridad los niveles de glucógeno son 50% menores que en la luz, lo que está de acuerdo con los valores de lactato y piruvato que son mayores en la obscuridad, así como con la menor utilización de

glucosa en condiciones de iluminación (Bill, A et-al 1990; Braun, R. D. et-al 1995; Wang, L. et-al 1997 a; b).

Más aún, cuando se simularon condiciones de hipoglicemia los niveles de glucógeno en la retina descendieron aproximadamente un 60%, tanto en condiciones de luz como de oscuridad, lo que sugiere que el glucógeno fue degradado para su conversión a glucosa y posterior utilización de ésta. Esto está de acuerdo con la presencia de la glucógeno fosforilasa, demostrada en las células de Müller de la retina de conejo, rata (Pfeiffer, 1994), mono y humano (Nihira et-al., 1995).

Así mismo, los niveles de glucógeno se incrementaron paralelamente al incremento en la concentración extracelular de glucosa (0-20 mM); sin embargo, en presencia de una concentración extracelular de 30 mM, los niveles de glucógeno son semejantes a los observados con 5.6 mM de glucosa. Resulta interesante que en presencia de 30 mM de glucosa, los niveles de glucógeno al igual que de los de lactato y piruvato son semejantes a los observados en presencia de 5 mM de glucosa. Estos resultados sugieren que las altas concentraciones de glucosa (30 mM) pueden modificar la síntesis o degradación de glucógeno, o bien inhibir a los transportadores de glucosa en la retina.

Es interesante que la retina de ratas diabéticas presenta una mayor concentración de glucógeno que es proporcional al tiempo del establecimiento del estado diabético, lo que sugiere que el metabolismo está alterado. Esta alta concentración de glucógeno, al igual que el aumento en las concentraciones de sorbitol observado en organismos diabéticos (Kador, 1988) puede provocar hipertonicidad, lo que a su vez puede llevar a un aumento en la acumulación de agua en las células, causando hinchamiento y/o edema del tejido.

En general nuestros resultados sugieren que hay una menor utilización de glucosa en condiciones de iluminación.

Que en animales tratados con estreptozotocina encontramos un aumento en los niveles de glucógeno, así como en la relación lactato/piruvato lo que refleja un desequilibrio metabólico asociado a la producción y acumulación de equivalentes reducidos en forma de NADH, lo que sugiere que el metabolismo en general de las células se altera e induce daño celular que podría estar relacionado a la retinopatía diabética.

En el presente estudio se identifico la presencia de glucógeno en la retina de la rata. Nuestros resultados son relevantes en el sentido de que los niveles de glucógeno se modifican de manera significativa bajo diferentes condiciones fisiológicas. Sin embargo, un dato interesante es que en retinas incubadas en 30 mM de glucosa, la relación lactato/piruvato y los niveles de glucógeno son semejantes a los niveles encontrados en las retinas incubadas en 5.6 mM de glucosa. Lo anterior nos permite sugerir que se realicen experimentos para medir el transporte de glucosa bajo estas condiciones, así como medir cuanta glucosa se va a la vía oxidativa bajo las distintas condiciones fisiológicas aquí estudiadas.

CONCLUSIONES.

Encontramos que en las retinas recién aisladas de animales adaptados a la obscuridad, los niveles de lactato y de piruvato son mayores con respecto a la de aquellos animales que fueron adaptados a la luz, sin embargo la relación lactato/piruvato es igual en ambas condiciones.

En las retinas incubadas en condiciones de iluminación los niveles de lactato y piruvato son menores que en aquellas incubadas en la obscuridad. Sin embargo la relación lactato/piruvato es mayor tanto en el tejido como en el medio de incubación en condiciones de iluminación. En conjunto los resultados antes mencionados indican que el requerimiento energético de la retina es mayor en condiciones de obscuridad. También nuestros estudios indican que la producción de lactato es proporcional a la concentración de glucosa (0-25 mM). La elevada relación lactato/piruvato observada en presencia de altas concentraciones de glucosa en el medio de incubación es congruente con el incremento de esta relación en las retinas de ratas diabéticas, por lo tanto estas observaciones apoyan los conceptos de hiperglicemia, pseudohipoxia y falsa anoxia que se postula que pueden ocurrir en el estado diabético.

En ratas que se indujo la diabetes por estreptozotocina encontramos un aumento en la relación lactato/piruvato lo que refleja un desequilibrio metabólico asociado a la producción y acumulación de equivalentes reducidos en forma de NADH, lo que sugiere que el metabolismo general de las células se altera i induce daño celular que podría estar relacionado a la retinopatía diabética.

En el presente estudio se identifico la presencia de glucógeno en la retina de la rata, nuestros resultados son relevantes en el sentido que los niveles de glucógeno se modifican de manera significativa bajo diferentes condiciones fisiológicas. En la obscuridad los niveles de glucógeno son 50% menores que en la luz, lo que podría sugerir una menor utilización de glucosa en condiciones de iluminación. Cuando se simulan condiciones de hipoglucemia los niveles de glucógeno en la retina descienden tanto en condiciones de luz u obscuridad. Así mismo, los niveles de glucógeno se incrementan paralelamente al incremento en la concentración extracelular de glucosa (0-20 mM). Sin embargo la concentración extracelular de 30 mM, los niveles de glucógeno son semejantes a los observados con 5.6 mM de glucosa.

En la retina de ratas diabéticas presento una mayor concentración de glucógeno que es proporcional al tiempo del establecimiento del estado diabético, lo que sugiere que el metabolismo está alterado. Esta alta concentración de glucógeno al igual que el aumento de sorbitol observado en organismos diabéticos, puede provocar hipertoncicidad, lo que a su vez puede causar un aumento en el volumen celular y/o edema en el tejido.

BIBLIOGRAFIA.

Ahlersova, E; Ahlers, I. Toropila, M; Smajda, B, and Datelinka, I. (1981). Circadian rhythm of the lactate and pyruvate concentration in rat liver and blood. **Physiol. Bohemoslov.** 30: (3): 213-220.

Alder, V. A; Su, E. N; Yu, D. Y; Cringle, S.J. and Yu, P. K. (1997). Diabetic retinopathy: early functional changes. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.** 24: (9-10): 785- 788.

Ames, A. and Gurian, B. S. (1963). Effects of glucose and oxygen deprivation on functional 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.

Anemiya, T. (1975). Electron microscopic and cytochemical study on paraboloid glycogen of the accessory cone of the chick retina. **Histochemistry.** 43 (2): 185-192.

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

Babel, J. y Stangos N. (1973) Essai de corelation entre l' ERG et les ultrastructures de la rétine. I. **ARCH. OPHTHALMOL (PARIS)** 33: 297-312.

Badr, G. A; Zhang, J. Z. Tang, J; Kern, T. S. y Ismai-Beigi, F. (1999). GLUT1 and GLUT3 expression, but not capillary density, is increased by cobalt chloride in rat cerebrum and retina.

BRAIN RES. MOL. BRAIN RES. 22;64(1):24-33.

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

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

Berman, E. R. (1991). Biochemistry of the retinal pigment epithelium. Chap. VI In: Zinn, K. M. and Marmor M. F. (eds.). **The Retinal Pigment Epithelium.** Harvard Univ. Press. England, pp: 83-102.

Bill, A; and Sperber, G. O. (1990). Aspects of oxygen and glucose consumption in the retina: effects of high intraocular pressure and light. **Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.** 228 (2): 124-127.

Bito, L; DeRousseau, C. J; (1980). Transport functions of the blood-retinal barrier system and the microenvironment of the retina. En: **THE BLOOD RETINAL BARRIERS.** Cunha-Vaz, J. G. Nueva York, Plenum Press, 133.

Bizot-Espiard, J.G; Double, A; Guardiola-Lemaite, B; Delagrang, P; Ktorza, A. and Penicaud, L. (1998). Diurnal rhythms in plasma glucose, insulin, growth hormone and melatonin levels in fasted and hyperglycaemic rats. **Diabetes Metab.** 24 (39): 235-240.

Braekevelt, C. R. (1993 a). Fine structure of the retinal photoreceptors of the tiger salamander (*Ambystoma tigrinum*). **HISTOL. HISTOPATHOL.** 8(2): 265-272.

Braekevelt, C. R. (1993 b). Retinal photoreceptor fine structure in the red-tailed hawk (*Buteo jamaicensis*). **ANAT HISTOL EMBRYOL.** 22(3): 222-232.

Braun, R. D; Linsenmeier, R. A; and Goldstick, T. K. (1995). Oxygen consumption in the inner

and outer retina of the cat. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.** 36 (3): 542-554.

Brownlee, M. and Cerami, A. (1981). THE BIOCHEMISTRY OF THE COMPLICATIONS OF DIABETES MELLITUS. **Ann. Rev. Biochem.** 50: 385-432.

Cataldo, A. M; and Broadwell, R. D. (1986). Cytochemical identification of cerebral glycogen and glucose -6-phosphatase activity under normal and experimental conditions: neurons and glia. **J. Electron Microsc. Tech.** 3, 413-437.

Catanzaro, R., Chain, E. B., Pocchiari F. and Reading H. W. (1962). The metabolism of glucose and pyruvate in rat retina. **Proc. R. Soc. B.** 156: 139-143.

Chase, J. (1982). The evolution of retinal vascularization in mammals. **Ophthalmology**, 89: 1518-1525.

Cheng H. M; Gonzalez, R. G; Von- Saltza, I; Chylack, L. T. Jr., and Hutson, N.J.(1988). Glucose flux and the redox state of pyridine dinucleotides in the rat lens. **Exp. Eye Res.** 46:947-952.

Cohen, L. H. and Noell, W. K. (1960). Glucose catabolism of rabbit retina before and after development of visual function. **J. Neurochem.** 5: 253-276.

Cohen, L. H. and Noell, W. K. (1965). Relationships between visual function and metabolism. In **Biochemistry of the Retina**. C. Graymore, editor. **Academic Press Inc.** (London) Ltd. 36-50.

Cohen, G. (1984). Oxy-radical production in alloxan- induced diabetes: an example of an in vivo metal-catalyzed Harber-Weiss reaction in: **FREE RADICALS IN MOLECULAR BIOLOGY**.

Collin, S.P; Collin, H.B. (1993). The visual system of the Florida garfish, **Lepisosteus platyrhincus (Glinglymodi)**. I. Retina. **Brain- Behav. Evol.** 42(2): 77-97.

Cringle, S; Yu, D-Y., Alder, V. y Su, E-N. (1992). Oxigeno tension and blood flow in the retina of normal and diabetic rats. **Adv. Exp. Med. Biol.** 317: 787-791.

Crosson, C. E. and Pautler, E. L. (1982). Glucose transport across isolated bovine pigment epithelium. **Exp. Eye Res.** 35, 371.

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.

Del Monte, M. A; Rabbani, R; Diaz, T. C; Lattimer, S. A; Nakamura, J; Brennan, M. C; Greene, D. A. (1991). Sorbitol, myo-inositol, and rod outer segment phagocytosis in cultured hRPE cells exposed to glucose. In vitro model of myo-inositol depletion hypothesis of diabetic complications. **Diabetes.** 40 (10): 1335-1345.

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 dopaminerg neurons of the goldfish retina. **PROC. SOC. LOND. (BIOL.)** 201:7-26.

Dringen, R. and Hamprecht, B. (1992). Glucose, insulin and insulin-like growth factor I regulate the glycogen content in astroglia-rich primary cultures, **J. Neurochem.** 58: 511-517.

Dringen, R., Gebhardt, R. and Hamprecht, B. (1993; a). Glycogen in astrocytes: Possible function as lactate supply for neighboring cells, **Brain Res.** 623: 208-214.

Dringen, R., Wiesinger, H. and Hamprecht, B. (1993; b). Uptake of L-lactate by cultured rat brain neurons. **Neuroscience Letters.** 163: 5-7.

Dringen, R; Schmoll, D; Cesar, M. and Hamprecht, B. (1993; c). Incorporation of radioactivity

from [^{14}C] lactate into the glycogen of cultured mouse astroglial cells. **Biol. Chem. Hoppe-Seyler.**

374: 343-347.

Eichner, D. and Themann, H. (1962). Zur Frage des Netzhautglycogens beim Meerschweinchen. **Zeitschr. Zellforsch.**, 56:231-246.

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.

Erecinska, M. and Dagani, F. (1990). Relationships between the neuronal sodium/ potassium pump and energy metabolism. Effects of K^+ , Na^+ , and adenosine triphosphate in isolated brain synaptosomes. **J. Gen. Physiol.** 95 (4): 591-616.

Erecinska, M; Dagani, F; Nelson, D; Deas, J; and Silver, I. A. (1991). Relations between intracellular ions and energy metabolism: a study with monensin in synaptosomes, neurons, and C6 glioma cells. **J. Neurosci.** 11(8): 2410-2421.

Erecinska, M; Nelson, D; Deas, J; and Silver, I. A. (1996). Limitation of glycolysis by hexokinase in rat brain synaptosomes during intense ion pumping. **Brain Res.** 8; 726(1-2): 153-159.

Farber, D. y Adler, R. (1986) Issues and questions in cell biology of the retina. En: Adler, R. y Farber, D. (Eds) **The retina Part I. Academic Press Florida**, pp. 2-16

Fesenko, E. E. Kolesnikou, 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.

Fliesler, S. J; Richards, M. J; Miller, C. Y; McKay, S. and Winkler B. S. (1997). In vitro metabolic competence of the frog retina: effects of glucose and oxygen deprivation. **Exp. Eye Res.**

64(5): 683-692.

Forsyth, R. J. (1996). Astrocytes and the delivery of glucose from plasma to neurons. **Neurochem. Int.** 28(3):231-241.

Frank, R. N. (1995). Diabetic retinopathy. **Progress in Retinal and Eye Res.** 14: 361-392.

Futterman, S., y Kinoshita, J.H. (1959). Metabolism of the retina. I. Respiration of cattle retina. **J. BIOL. CHEM.** 234: 723-726.

Garofalo, O; Cox, D. W; and Bachelard, H. S. (1988). Brain levels of NADH and NAD⁺ under hypoxic and hypoglycaemic conditions in vitro. **J. Neurochem.** 51;(1): 172-176.

Glockin, V. C., and Potts., A. M. (1965) The metabolism of retinal pigment cell epithelium. II. Respiration and glycolysis. **Invest. Ophthalmol.** 4 : 226-234.

Golman. S. S. and Witkovsky P.(1987). Evidence for gluconeogenesis in the amphibian retina. **Exp. Eye Res.** 44: 65-71.

Goldman. S. S. (1988). Gluconeogenesis in the amphibian retina: lactate is preferred to glutamate as the gluconeogenic precursor. **Biochem. J.** 254: 359-365.

Golman. S. S. (1990). Evidence that the gluconeogenic pathway is confined to an enriched Müller cell fraction derived from the amphibian retina. **Exp. Eye Res.** 50: 213-218.

Graham, L. T; Baxter, C. F; and Lolley, R. N. (1970). In vivo influence of light or darkness on the GABA system in the retina of the frog (*Rana pipiens*). **Brain Res.** 20, 379- 388.

Graham, L. T. (1974). Comparative aspects of neurotransmitters in the retina, in *The Eye*. Vol. 6: Comparative Physiology (Davson, H. and Graham, L. T., Jr. Eds). pp. 283-342. Academic Press , New York and London.

Granit, R. (1947) Sensory mechanisms of the retina: **London Oxford University Press.**

Graymore, C. N. (1960). Metabolism of the developing retina. III. Respiration in the developing normal rat retina and effect of an inherited degeneration of the retinal neuro-epithelium. **Br. J. OPHTHALMOL.** 44: 363-369.

Graymore, C. N. (1970). Biochemistry of the retina. In: Graymore, C. N., ed. *Biochemistry of the Eye*. London: Academic Press; 645-735.

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

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

Haugh, L.M; Linsenmeier, R. A. y Goldstick, T. K. (1990) Mathematical models of the spatial distribution of retinal oxygen tension and consumption, including changes upon illumination. **ANN. BIOMED. ENG.** 18: 19-36.

Hawkins, R. A. and Mans, A. M. (1983). Intermediary metabolism of carbohydrates and other fuels. Pages. 259-294. In Lajtha, A. (ed), *Handbook of Neurochemistry* Vol. 3. Plenum Press, New York.

Hertz, L. (1976). Potassium effects on transport of amino acids, inorganic ions and mater; Ontogenic and quantitative differences In: Levile Battstin, L. and Lajtha, A. (eds.). *Transport phenomains in the nervous system. Physiological and aspects pathological.* **Adv. Exp. Med. Biol.** 69: 371-383.

Hopkinson, L. y Kerly, M. (1959) The effect of monoiodoacetate on the aerobic metabolism of ox retina in vitro. **BIOCHEM. J.** 72: 22-27.

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

Hsu, S. C. y Molday, R. S. (1994) Glucose metabolism in photoreceptor outer segments. Its role in phototransduction and in NADPH- requiring reactions. **J. BIOL. CHEM.** 269(27): 17954-17959.

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

Ide, T; Steinke, J. and Cahill, G. F. (1969). Metabolic interactions of glucose, lactate and β -hydroxybutyrate in rat brain slices. **Am J. Physiol.** 217: 784-792.

Ignacio., P.C; Baldwin., B.A; Vijayan., V. K; Tait., R.C. and Gorin., F.A. (1990). Brain isozyme of glycogen phosphorylase: immunohistological localization within the central nervous system. **Brain Res.** 529: 42-49.

Ishikawa, T. and Pci, F.Y. (1965). Intramitochondrial glycogen particles in rat retinal receptor cells. **Brief Notes.** 8: 402- 407.

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.

Kalkar, H. and Ullrey, D. (1973). Two distinct type of enhancement of galactose uptake into hamster cells: Tumovirus transformation and hexose starvation. **PROC. NATL. ACAD. SCI. U.S.A.** 70: 839-843.

Kaneko, A. (1973) Receptive field organization of bipolar and amacrine cells in the goldfish

retina. **J. PHYSIOL.** 235:133-153.

Keen, H; and Chlouverakis, C. (1965). Metabolic factors in diabetic retinopathy. International Symposium on the Biochemistry of the Retina: Biochemistry of the retina. London: Academic Press; 123-136.

Keppeler, D. and Decker, K. (1983). Glycogen, in Methods of Enzymatic Analysis, Vol. 6 (Bergmeyer, H. U., ed.). Verlag Chemie, Weinheim, F.R.G. pp. 11-18.

Kimble, E. A; Svoboda, R. A; Ostroy, S.E. (1980). Oxygen consumption and ATP changes of the vertebrate photoreceptor. **Exp. Eye Res.** 31(3): 271-288

Kinoshita, J.H; Fukushi, S; Kador, P; and Merola L. O. (1979). Aldose reductase in diabetic complications of the eye. **Metabolism.** 28:462-469.

Kirber, W., Charles, M. D., Nichols, M. D., Grimes, P. A., Winegrand, A. and 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 the light in isolated rod outer segments. **J. GEN. PHYSIOL.** 60:20-45

Kowluru, R. A; Kern, T. S. y Engerman, R. L. (1997). Anomalities of retinal metabolism in diabetes or experimental galactosemia. IV Antioxidant defense system. **Free Radical Biol. And Medicine.** 22: 587-592.

Krebs, H. A. (1972). The Pasteur effect and the relations between respiration and fermentation. In: Dickens F, Campbell P. N, eds. **Assays in Biochemistry.** New York: Academic Press: 1-34.

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

Kuwabara, T., y Cogan, D. G. (1961) Retinal glycogen. **AM. J. OPHTHALMOL.** 66: 680-688.

Kuwabara, T. (1969) Blood-vessels in the normal retina. En: **The retina. Straatsman (ed)** California Press. Los Angeles.

Lajtha, A.L; Maker H. S. and Clarke., D. D. (1981) Metabolism and transport of carbohydrates and amino acids. In : **Basic neurochemistry (Siegel., G.J. Albers R.W. Agranoff, B.W. and Katzman., R.** eds), Boston: Little, Brown. pp: 329-353.

Lam, D. M. K. (1972). The biosynthesis and content of gamma-aminobutyric acid in the goldfish retina. **J. Cell Biol.** 54: 225-231.

Lam, D. M. K. (1975). Synaptic chemistry of identified cells in the vertebrate retina, in **Cold Spring Harbour Symposia on Quantitative Biology: The Synapse.** 40: 571-579.

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

Larrabee, M. G. (1983) Lactate uptake and release in the presence of glucose by sympathetic ganglia of chicken embryos and by neuronal and non neuronal cultures prepared from these ganglia. **J. NEUROCHEM.** 40: 1237-1250.

Larrabee, M. G. (1992) Extracellular intermediates of glucose metabolism: fluxes of endogenous lactate and alanine through extracellular pools in embryonic sympathetic ganglia. **J. NEUROCHEM.** 59: 104-152.

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.

Larue-Achagiotis, C. and Le-Magnen, J. (1983). Fast-induced changes in plasma glucose, insulin and free fatty acid concentration compared in rats during the night and day. **Physiol. Behav.** 30 (1): 93-96.

Laser, H. (1937). Tissue metabolism under the influence of low oxygen tension. **BIOCHEM. J.** 31:1671-1676.

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

Le-Magnen, J; Devos, M. and Larue-Achagiotis, C. (1980). Food deprivation induced parallel changes in blood glucose, plasma free fatty acids and feeding during two parts of the diurnal cycle in rats. **Neurosci. Biobehav. Rev.** 4 suppl. 1: 17-23.

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, H. B; 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.

Linsenmeier, R. A. (1986). Effects of light and darkness on oxygen distribution and consumption in the cat retina. **J. Gen. Physiol.** 88, 521-542.

Linsenmeier, R. A; and Yancey, C. M, (1989) Effects of hyperoxia on the oxygen distribution in the intact cat retina. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.** 30: 612-618.

Lipton, P. and Robacker, K. (1983). Glycolysis and brain function: $[K^+]_o$ stimulation of protein synthesis and K^+ uptake require glycolysis. *Fed. Proc.* 42: 2875-2880.

Lolley, R. N. (1969). Metabolic and anatomical specialization within the retina. Pages 473-504, In Lajtha, A. (ed). *Handbook of Neurochemistry* Vol. 3. Plenum Press. New York.

Lopez-Escalera, R., Li, X. B., Szerencsei, R.T., Schnetkamp, P. P. 1991. Glycolysis and glucose uptake in intact outer segments isolate from bovine retinal rods. *Biochemistry.* 30(37): 8970-8976.

Lou, M. F; Dickerson, J. R. Jr; Garadi, R. York, M. B. Jr. (1988). Glutathione depletion in the lens of galactosemic and diabetic rats. *Exp. Eye Res.* 46: 517-530.

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.

Lowry, O. H., Roberts, N. R., Schulz, D. W., Clow, J. E. and Clark, J. R. (1961). Quantitative histochemistry of the retina. II. Enzymes of glucose metabolism. *J. Biol. Chem.* 236: 2813-2820.

Lust, W. D; Passonneau, J. V. y Crites, S. K. (1975). The measurement of glycogen in tissue by amylo-1,4- 1,6- glucosidase after destruction of pre-existing glucose. *ANAL. BIOCHEM.* 68: 328-331.

Lynch, R. M. and Balaban, R. S. (1987). Coupling of aerobic glycolysis and $Na^+ /K^+ -ATPase$ in renal cell line MDCK. *Am. J. Physiol.* 253: C269- C276.

Mac Gregor, 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.

Macaluso, C; Onoe, S; and Niemeyer, G. (1992). Changes in glucose level affect rod function

more than cone function in the isolated, perfused cat eye. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.** 33(10): 2798-2808.

Macker, 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 release glutamate by reversal of cotransporters. 24 TH ANNUAL MEETING NEUROSCIENCE. Nov. 13-18. Pp. 274.

Magistretti, P. J. (1988). Regulation of glycolysis by neurotransmitters in the central nervous system. **Diabete Metab. (Paris)**. 14: 237-246.

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. and Chader, G. J. 1981. Characterization of glucose transport by cultured chick pigmented epithelium. **Exp. Eye Res.** 32, 279.

Maynard, K. I; Quinones-Hinojosa, A; and Ogilvy, C. S. (1998). Magnesium plus mexiletine inhibit energy usage and protect retinas against ischemia. **Neuroreport.** 21;9 (18):4141-4144.

Mc Call, A. (1992). The Impact of Diabetes on the CNS. **Diabetes.** 41:557-570.

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

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.

ESTA TESIS NO SALE⁷⁹
DE LA BIBLIOTECA

- Mizuno, K. Sato, K. (1975). Reassessment of histochemistry of retinal glycogen. *Exp. Eye Res.* 21: 489-497.
- Mizutani, M., Gerhardinger, C., Lorenzi, M. (1998). Muller cell changes in human diabetic retinopathy. *Diabetes.* 47(3):445-449.
- Morjaria, B. and Voaden, J. M. (1979). The formation of glutamate, aspartate and GABA in the rat retina; glucose and glutamine as precursors. *J. Neurochem.* 33: 541-551.
- 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., Ohtsuka, K. and Shimasaki, H. (1975). Effects of aspartate and glutamate on the bipolar cell in the carp retina. *Vision Res.* 15: 456.
- 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.
- Murray, D. L; Feke, G. T. and Weiter, J. J. (1991). Preretinal pH changes in the rabbit under conditions of light and dark. *Exp. Eye Res.* 53 (6): 717-722.
- Nakatami, K. y Yau, K. (1985) cGMP open the light- sensitive conductance R in the retinal rods. *BIOPHYS. I.* 47:356.
- Nelson, S. R., Schulz, D. W., Passonneau J. V. and Lowry, O. H. (1968). Control of glycogen levels in brain. *J. Neurochem.* 15: 1271-1279.
- Niemeyer, G. (1975) The function of the retina in the perfused eye. *DOC. OPHTHALMOL.* 21: 39(1): 53-116.

Niemeyer, G., Onoe, S. and Macaluso C. (1991) The effect of glucose on rod function in the isolated, perfused cat eye. **Klin Monatsbl Augenheilkd.** 198 (5): 406-407.

Niemeyer, G. (1997). Glucose concentration and retinal function. **Clin. Neurosci.** 4(6): 327- 335.

Nihira M., Anderson, K. Gorin F. A., Burns, M. S. (1995). Primate rod and cone photoreceptors may differ in glucose accessibility. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.** 36(7):1259-1270.

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.

Noell, W. K. (1959) The visual cells: electric and metabolic manifestation of its life processes. **AM. J. PHYSIOL.** 48: 347-370.

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

Nyengaard, J. R. Ostrow, E; Burgan, J. R; Smith, S. R., Williamson, J. R. (1994). Interactions between hyperglycemia- and hipoxia- induced redox changes in rat retinas . **ARVO Abstracts.**
Invest. Ophthalmol. Vis. 36(7): 1259-70.

Onoe, S., y Niemeyer, G. (1992). Changing glucose concentration affects rod- mediated response in the perfused cat eye. **NIPPON GANKA GAKKAI ZASSHI.** 96(5): 634-640.

Okubo, A; Sameshima, M; Unoki, K; Uehara, F; Ohba, N. (1998) Ultracytochemical demonstration of glycogen in cone, but not in rod, photoreceptor cells in the rat retina. 180 (4): 307-314.

Ostroy, S.E; Svoboda, R. A. y Wilson, M. J. (1990). A stage in glycolysis controls the metabolic adjustments of vertebrate rod photoreceptors upon illumination. **Biophys. Res. Commun.** 168: 155-

160.

Parker, J. C; and Hoffman, J. F. (1967). The role of membrane phosphoglycerate kinase in the control of glycolytic rate by active cation transport in human red blood cells. *J. Gen Physiol.* 60: 893-916.

Paschen, W; Djuricic, B; Mies, G; Schmidt-Kaster, R. y Linn, F. (1987). Lactate y pH in the brain: association and dissociation in different pathophysiological states. *J. Neurochem.* 48: 154-159.

Pascuzzo, G. J., Johnson, J. E. and Pautler, E. L. (1980). Glucose transport in isolated mammalian pigment epithelium. *Exp. Eye Res.* 30: 53.

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

Paul, R. J and Bauer, M. and Pease, W. (1979). Vascular smooth muscle: aerobic glycolysis linked to sodium and potassium transport processes. *Science.* 206: 1414-1416.

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.

Peterson, G. L. (1979). Review of the Folin Phenol Protein Quantitation Method of Lowry, Rosebrough, Farr, and Randall, *Analytical Biochemistry*, 100: 201-220.

Pfeiffer, B; Elmer, K; Roggendorf, W; Reinhart, P. H; Hamprecht. B. (1990). Immunohistochemical demonstration of glycogen phosphorylase in rat brain slices. *Histochemistry.* 94: 73-80.

Pfeiffer, B; Meyermann, R; Hamprecht, B. (1992). Immunohistochemical co-localization of glycogen phosphorylase with the astroglial markers glial fibrillary acidic protein and S-100 protein

in rat brain slices. **Histochemistry**. 97: 407-412.

Pfeiffer, B; Buse, E; Meyermann, R; Rocha, M. J. A; Hamprecht, B. (1993). Glycogen phosphorylase activity and immunoreactivity during pre- and postnatal development of rat brain. **Histochemistry**. 100: 256-270.

Pfeiffer, B. R. Groschenbach., A. and Hamprecht, B. (1994). Immunocytochemical Demonstration of Glycogen Phosphorylase in Müller (Glial) Cells of the Mammalian Retina. **GLIA**. 12:62-67.

Pilkis, S. J., El-Maghrabi, M. R. and Claus, T. H. (1988). Hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. **Annu. Rev. Biochem.** 57: 755-783.

Poity-Yamate, C. L. and Tsacopoulos, M (1991). Glial (Müller) cells take up and phosphorylate [³H] 2 -deoxy-D- glucose in a mammalian retina, **Neurosci. Lett.**, 241-244.

Poity-Yamate, C. L., Tsacopoulos, M (1992) Glucose metabolism in freshly isolated Müller glial cells from a mammalian retina. **J. COMP. NEUROL.** 320: 257-266.

Poity-Yamate, C. L., Poity, S. y Tsacopoulos, M. (1995) Lactate released by MÜLLER glial cells is metabolized by photoreceptors from mammalian retina. **J. NEUROSCIENCE**. 15 (7): 5179-5191.

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

Ranson, B. R., y Fern R. (1970) Does astrocytic glycogen benefit axon function and survival in CNS white matter during glucose deprivation ? **GLIA**. 21(1): 134-141.

Redburn; D. A. y Kyles, C. B. (1980). Localization and characterization of dopamine receptors

whitin two synaptosome fractions of rabbit and bovine retina. **EXP. EYE RES.** 30:699-708.

Reinhart, H. P., Pfeiffer, B. Spengler, S., and Hamprecht, B. (1990). Purification of glycogen phosphorylase from bovine brain and immunocytochemical examination of rat glial primary cultures using monoclonal antibodies raise against this enzyme. **J. Neurochem.** 54(5): 1474-1483.

Riley, M. V. (1965) The effect of sodium ions on glucose metabolism of ciliary and retina. In **Biochemistry of the Retina**. C. Graymore, editor. Academic Press Inc. (London) Ltd 149-153.

Riley, M. V. and Voaden, M. V. (1970) The metabolism of the isolated retina. **OPHTHALMIC RES.** 1: 58-64.

Romano, C; Price, M.T; Almlı, T; and Olney, J. W. (1998). Excitotoxic neurodegeneration induced by deprivation of oxygen and glucose in isolated retina. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.** 39(2): 416-423. Rungger-Brändle E., Kolb, H., Niemeyer, G. (1996) Histochemical demonstration of glycogen in neurons of the cat retina. **INV. OPHTHALMOL. VIS SCI.** 37(5): 702-715.

Salceda, R, 1986. Isolation and biochemical characterization of frog retinal pigment epithelium cells. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.** 27: 1172-1176.

Salceda, R; Vilchis, C; Coffe, V. y Hernández-Muñoz Rolando. (1998). Changes in the Redox State in the Retina and Brain During the Onset of Diabetes in Rats. **Neurochemical Research.** 23 (6):893-897.

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

Schabadasch, A. L. and Schabadasch, S. A. 1972 (b). Localitation and dynamic changes of glycogen in frog retina adapted to darkness or light-II. **Vision Res.** 12: 1605-1617.

Schurr, A., West, C. A. y Rigor, B. M. (1988). Lactate supported synaptic function in the rat

hippocampal slice preparation. **SCIENCE**. 240: 1326- 1328.

Shank, R. P; Bennett, G. S; Freytag, S. O. y Campbell, G. L; (1985). Pyruvate carboxylase: an astrocyte- specific enzyme implicate in the replenishment of amino acid neurotransmitter pools. **Brain Res**. 329: 364-367.

Shichi, H. (1983). *Biochemistry of vision*. Ed. **Academic Press**, New York. pp:36-54.

Shimizu, N. and Maeda, S. (1953) Histochemical studies of glycogen in retina. **Anat. Rec**. 116: 427-437.

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

Silver, I. A; Deas, J; and Erecinska, M. (1997 a). Ion homeostasis in brain cells: differences in intracellular ion responses to energy limitation between cultured neurons and glial cells. **Neuroscience**. 78 (2): 589-601.

Silver, I. A; and Erecinska, M. (1997 b). Energetic demands of the Na^+ / K^+ ATPase in mammalian astrocytes. **Glia**. 21(1): 35-45.

Silver, I. A; and Erecinska, M. (1998). Glucose- induced intracellular ion changes in sugar-sensitive hypothalamic neurons. **J. Neurophysiol**. 79(4): 1733- 1745.

Sorg, O. and Magistretti., P. J. (1992). Vasoactive intestinal peptide and noradrenaline exert long-term control on glycogen levels in astrocytes: blockade by protein synthesis inhibition. **J. Neurosci**. 12: 4923-4931.

Spencer, T. L; and Lehninger, A.L. (1976). L-Lactate transport in Ehrlich ascites-tumor cells. **Biochem. J**. 154: 405-414.

Starr, M. S. (1973). Effect of dark-adaptation on the GABA system in retina. **Brain Res**. 59, 331-

Starr, M. S. (1975). A comparative study of the utilization of glucose, acetate, glutamine and GABA as precursors of amino acids by retinae of the rat, frog, rabbit and pigeon. **Biochem. Pharmac.** 24: 1193-1197.

Stefansson, E; Wolbarsht, M. L. and Landers, M. B. (1983). In vivo O₂ consumption in rhesus monkeys in light and dark. **Exp. Eye Res.** 37 (3): 251-256.

Stirling, C. E. and Sarthy, P.V. (1985). Localitation of the Na-K pump in turtle retina. **J Neurocytol.** 14(1): 33-47.

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

Stramm, L. E. and Pautler, E. L. (1980). Glucose Uptake by Normal and Dystrophic Rat Retinas and Ciliary Bodies. **Exp. Eye Res.** 30: 709-718.

Sutherland, F. S; Stefansson, E; Hatchell, D. L. y Reiser; H. (1990). Retinal oxigen consumption in vitro. The effect of diabetes mellitus, oxigen 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.

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

Tilton., R. G; Chang, K; Nyengaard, J.R; Vanden Enden, M; Ido, Y; and Williamson, J.R. (1995). Inhibition of sorbitol dehydrogenasa: effects on vascular and neural dysfunction in

streptozocin-diabetic rats. **Diabetes**. 44: 234-242.

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

Törnquist, P., Alm, A. (1979). Retinal and choroidal contribution to retinal metabolism in vivo: A study in pigs. **Acta Physiol. Scand**. 106: 351-357.

Tsacopoulos, M, Magistretti, P. J. (1996). Metabolic coupling between glia and neurons. **J. Neurosci**. 1; 16(3):877-885.

Tso, M. O. M. (1980). Pathology of the blood-retinal barriers. En *The Blood-Retinal Barriers*. Cunha-Vaz, V. (ed) Plenum Press. Nueva York.

Tsubota, K; Krauss, J. M. Kenyon, K. R. Laing, R. A. Miglior, S; and Cheng, H. M. (1989). Lens redox Fluorometry: Pyridine nucleotide fluorescence and analysis of diabetic lens. **Exp. Eye Res**. 49: 321-334.

Travis, S. F; Morrison, A. D; Clements, R. S. Jr.; Winegrad, A. I; Oski, F. A. (1971). Metabolic alterations in the human erythrocyte produced by increases in glucose concentration: The role of the polyol pathway . **J. Clin. Invest**. 50: 2104-2112.

Uga, S. y Smelser, G. K. (1973) Comparative study of the fine structure of retinal Müller cells in various vertebrates. **INVEST. OPHTHALMOL VIS. SCI**. 12: 434- 448.

Van- Cauter, E; Blackman, J. D; Roland, D; Spire, J. P; Refetoff, S. and Polonsky, K. S. (1991). Modulation of glucose regulation and insulin secretion by circadian rhythmicity and sleep. **J. Clin. Invest**. 88(3): 934-942.

Van den Enden, M; Nyengard, R.J; Ostrow, E; Burgan, J.H; and Williamson, Jr. (1995) Elevated glucose levels increase retinal glycolysis and sorbitol pathway metabolism: Implications for

diabetic retinopathy. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.** 36: 1676-1685.

Varma, S. D., and Kinoshita, J.H. (1974). Sorbitol pathway in diabetic and galactosemic rat lens. **Biochim. Biophys Acta.** 338: 632-640.

Vilchis- Quintero, C. (1995) Alteraciones en la retina y en la permeabilidad del epitelio pigmentario de la retina de la rata en un modelo de diabetes experimental inducido por estreptozotocina. Tesis de Maestría. UACPyP, UNAM.

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

Voaden, M. J. y Mejaria, B. (1980). The synthesis of neuroactive amino acids from radioactive glucose and glutamine in the rat retina: effects of light. **J. NEUROCHEM.** 35(1): 95-99.

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.

Walz, W., and Mukerji. 1988. Lactate production and release in cultured astrocytes. **Neuroscience Letters.** 86: 296-300.

Wang, L; Sperber, G. O; Bill, A. (1993). Blood supply and nutrition of the retina in rabbits: Effects of light. In: Lütjen- Drecoll E; Rohen, J. W., eds. **Basic Aspects of Glaucoma Research III.** Stuttgart: Schattauer; 167-177.

Wang, L; Tornquist, P. and Bill, A. (1997 a). Glucose metabolism in pig outer retina in light and darkness. **Acta Physiol Scand.** 160 (1): 75-81.

Wang, L; and Bill, A. (1997 b). Effects of constant and flickering light on retinal metabolism in rabbits. **Acta Physiol Scand.** 75 (3): 227-231.

- Warburg, O; Posenner, K., Negelein, E. (1924) Über den Stoffwechsel der carcinomzelle. **BIOCHEM. Z.** 152: 309-344.
- 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.
- Werman, R. (1966) Criterios for identification of a central nervous system transmitter. **COMP. BIOCHEM. PHYSIOL.** 18:745-766.
- Wiesinger, H; Hamprecht, B; Dringer, R. (1997). Metabolic pathways for glucose in astrocytes. **Glia.** 21(1): 22-34.
- 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 isolate rat retina. **Vision Res.** 12: 1183-1198.
- Winkler, B. S. (1974). Calcium and the fast and slow PIII components of the electroretinogram. **VISION RES.** 14: 1-9.
- Winkler, B. S. (1975). Dependence of rat and rabbit photoreceptor potentials upon anaerobic and aerobic metabolism in vitro: **Exp. Eye Res.** 21: 545- 548.
- Winkler, B. S. y Riley, M. V. (1977 a). Na-K and ATPase in retina: dependence on calcium and sodium. **INVEST. OPHTHALMOL.** 16: 1151-1154.
- Winkler, B. S. Simson, V. Benner, J. (1977 b). Importance of bicarbonate in retinal function. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.** 16(8): 766-768.
- Winkler, B. S. (1981a). Glycolytic and Oxidative Metabolism in Relation to Retinal Function. **J. Gen. Physiol.** 77:667-692.
- Winkler, B. S. (1981b). The intermediary metabolism of the retina: biochemical and functional

aspects. In *Biochemistry and Physiology of the Eye*. R. E. Anderson, Editor. American Academy of Ophthalmology, San Francisco. pp. 227-242.

Winkler, B. S. and Hopkins J. M. (1982). ATPase activities of human retina and pigment epithelium- Choroid. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 22 (1): 113-135.

Winkler, B. S. (1983 a) The intermediary metabolism of the retina: Biochemical and functional aspects in the biochemistry of the eye. Ed. American Academic of Ophthalmology, San Francisco. pp: 227-242.

Winkler, B. S. (1983 b). Relative inhibitory effects of ATP depletion, ouabain and calcium on retinal photoreceptors. *Exp. Eye Res.* 36: 581- 594.

Winkler, B. S; Arnold, J. M; Brassell, A.M; and Sliter, R. D.(1997). Glucose Dependence of Glycolysis, Hexose Monophosphate Shunt Activity, Energy Status, and the Polyol Pathway in Retinas Isolated From Normal (Nondiabetic) Rats. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 38(1):62-71.

Winkler B. S; Kapousta-Bruneau, N; Arnold, M. J; Green, D. G. (1999). Effects of inhibiting glutamine synthetase and blocking glutamate uptake on b wave generation in the isolated rat retina. *Vis. Neurosci.* 16(2): 345-353.

Yamamoto, F; Borgula, G. A; Steinberg, R. H. (1992). Effect of light and darkness on pH outside rod photoreceptors in the cat retina. *Exp. Eye Res.* 54: 685-697.

Yazulla, S. (1983). Stimulation of GABA release from retinal horizontal cells by potassium and 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.

Zinn, K.M. and Benjamin-Henkind, J. V. (1979). Anatomy of the human retinal pigment epithelium. Chap. I In: Zinn, K. M. and Marmor, M. F. (eds.). **The Retinal Pigment Epitelium.** Harvard Univ. Press. England, pp: 3-31.