



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**REGULACIÓN DE LOS NIVELES DE
GLUCÓGENO EN LA RETINA DE LA RATA.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A :

LUIS BERNARDO LUNA ULLOA



FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM

Director de Tesis
Dra. Rocío Salceda Sacanelles

2004



FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA



DIRECCIÓN NACIONAL
AGENCIA DE
MEXICO

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Bernardo Luna Ulloa

FECHA: 18 - Junio - 2004

FIRMA:

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

"Regulación de los niveles de glucógeno en la retina de la rata"

realizado por Luna Ulloa Luis Bernardo

con número de cuenta 9529625-2 , quien cubrió los créditos de la carrera de: Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

Dra. Rocío Salceda Sacanelles

Propietario

Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte

Propietario

Dra. María de Lourdes Massieu Trigo

Suplente

Dra. María del Carmen Vilchis Quintero

Suplente

M. en C. Julio Alejandro Prieto Sagredo

Consejo Departamental de Biología

M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIDAD DE ENSEÑANZA
DE BIOLOGÍA

Dedicatoria.

Dedico esta tesis a mis padres, por todo el cariño y apoyo que nos han brindado a mí y a mis hermanos con el propósito de que veamos cumplidas nuestras metas.

A mis hermanos, por que al crecer juntos, hemos tenido muchas experiencias tanto buenas como malas, pero sobre todo por que a pesar de algunos disgustos, siempre he contado con ellos.

A mi pequeña sobrina Donaji, por compartir con nosotros su alegría y por darnos un cariño tan sincero.

A Rocío Ramírez, por ser para mí una persona muy especial en quién siempre he podido confiar, que me ha acompañado y apoyado en los momentos difíciles, y ha compartido conmigo los momentos de alegría.

A mis amigos del laboratorio: Claudia, Cecilia, Naty, Vania, Gustavo, Ismael, Jethro y Miguel por ayudarme en la realización del presente trabajo pero sobre todo por su amistad.

A los amigos que me acompañaron durante la carrera: Inti, Victor, Sinué, José, Mainor y Carlos por hacer de nuestro paso por la facultad un grato recuerdo.

Agradecimientos.

Agradezco de forma especial a la Dra. Rocío Salceda Sacanelles por guiarme en la realización del presente trabajo; también le agradezco por sus “regaños” que en vez de eso, son lecciones muy importantes que siempre tendré presentes.

Agradezco a las Doctoras:

María Eugenia Gonsebatt Bonaparte

María de Lourdes Massieu Trigo

María del Carmen Vilchis Quintero

y al M. en C. Julio Prieto Sagredo

por sus valiosos comentarios para la realización del manuscrito final.

De forma también especial agradezco al Biól. Gustavo Sánchez Chávez por su excelente apoyo técnico durante la realización del presente proyecto así como por la revisión crítica del manuscrito.

Agradezco a Félix Sierra y al M. V. Z. Héctor Malagón por ayudarme con el tratamiento de los animales.

Agradezco al Biól. Daniel Estrada por ayudarme con el análisis estadístico de los datos.

El presente trabajo se realizó con el apoyo de CONACYT con el proyecto MO250-9911.

“Todo debería hacerse tan simple como fuera posible,
pero no más simple”

Albert Einstein

Contenido.

LISTA DE ABREVIATURAS.....	i
RESUMEN	ii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 El ojo de los vertebrados.....	2
1.2 Anatomía de la retina.....	3
1.3 Fototransducción	6
1.4 Metabolismo de la glucosa	7
1.4.1 Metabolismo de la glucosa en la retina	10
1.5 El glucógeno	14
1.5.1 Síntesis del glucógeno.....	15
1.5.2 Rompimiento de la molécula de glucógeno	17
1.5.3 Regulación recíproca de la síntesis y degradación del glucógeno	18
1.5.4 El glucógeno en el SNC.....	22
1.5.5 El glucógeno en la retina	25
1.6 Problemas relacionados con el metabolismo: Diabetes Mellitus	27
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVO.....	31
3. MATERIALES Y MÉTODOS	33
3.1 Animales	33
3.2 Medios de incubación	33
3.3 Determinación bioquímica del glucógeno	34
3.4 Determinación de proteínas.....	35
3.5 Análisis estadístico	35
3.6 Reactivos	35
4. RESULTADOS	37
4.1 Inhibidores metabólicos.....	40
4.2 Regulación del glucógeno en la retina.....	40
4.3 Ratas diabéticas.....	48
4.3.1 Niveles de glucógeno.....	48
5. DISCUSIÓN.....	53
5.1 Inhibidores metabólicos.....	56
5.2 Efectos de la insulina en los niveles de glucógeno en la retina.....	58

6. CONCLUSIONES.....	61
BIBLIOGRAFÍA	63

LISTA DE ABREVIATURAS

Acetil-CoA	Acetil coenzima-A
AMP	Adenosín monofato
ATP	Adenosín trifosfato
DMSO	Dimetil sulfóxido
EPR	Epitelio pigmentario de la retina
ERG	Electrorretinograma
F1P	Fructuosa 1-fosfato
FADH	Dinucleótido de flavina y adenina
G1P	Glucosa 1-fosfato
G3PDH	Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa
G6P	Glucosa 6-fosfato
G6P-asa	Glucosa 6-fosfatasa
GK	Glucocinasa
GMP	Guanosín monofosfato
GS	Glucógeno sintetasa
GSK-3	Glucógeno sintetasa cinasa-3
GTP	Guanosín trifosfato
IAA	Iodoacetato
mTOR	Proteína blanco de la rapamicina
NADH	Dinucleótido de adenina y nicotinamida
PACAP	Péptido activador de la adenilato ciclasa de la pituitaria
PDK-1	Proteína dependiente de fosfoinosítidos-1
PEP	Fosfoenolpiruvato
IRS	Sustrato del receptor de insulina
PI3K	Fosfatidil-inositol 3-cinasa
PIP3	Fosfatidil inositol trifosfato
PKA	Proteína cinasa A
PKC	Proteína cinasa C
PMA	Forbol 12-miristato 13-acetato
UDP	Uridín difosfato
UTP	Uridín trifosfato
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular
VIP	Peptido intestinal vasoactivo

Resumen.

La retina, se caracteriza por sus elevados requerimientos energéticos. Aunque presente en bajas concentraciones, el glucógeno representa la principal reserva energética en la retina, sin embargo poco se conoce acerca de sus mecanismos de regulación. En el presente estudio se investigaron algunos de los posibles factores que regulan el metabolismo del glucógeno en la retina de la rata. En un medio sin glucosa, el glucógeno en la retina disminuyó, lo cual sugiere que actúa como reserva energética; esta disminución se aminoró por la presencia de glutamato exógeno. El glucógeno en la retina aumentó en presencia de iodoacetato y ouabaina, lo cual sugiere un aumento en los niveles de activadores alostéricos de la glucógeno sintetasa tales como la glucosa 6-P y/o ATP. El glucógeno en la retina, no se modificó en presencia de inhibidores de la cadena respiratoria lo cual sugiere un aumento en la actividad glucolítica. El contenido de glucógeno en la retina, se incrementó en presencia de insulina; este efecto fue inhibido por wortmanina sugiriendo la acción de la PI3K. Proteínas cinasas tales como la PKA y la PKC no parecen participar en la regulación del glucógeno en la retina. La inducción de la diabetes con estreptozotocina, causó un incremento en los niveles de glucógeno en la retina y el riñón. El tratamiento con dosis bajas de insulina, disminuyó los niveles de glucógeno en estos tejidos; en la retina este efecto solo se observó a los 20 días de tratamiento. Los niveles de glucógeno en el hígado, no se modificaron con el tratamiento con insulina, mientras que en la corteza cerebral, estos mostraron una disminución considerable. La actividad de la glucosa 6-fosfatasa y la presencia de glucagon en el plasma, serían los responsables de disminuir el glucógeno en el hígado de ratas diabéticas. La disminución en los niveles de glucógeno en la retina y riñón de ratas diabéticas tratadas con insulina, podría deberse a la síntesis de proteínas y grasas estimulada por insulina que llevaría a una disminución en la actividad gluconeogénica.

1. INTRODUCCIÓN

Las especies animales conocen el medio que los rodea a través de sus sistemas sensoriales, que envían información al sistema nervioso central (SNC), el cual de acuerdo con la información recibida genera patrones de actividad hacia los sistemas efectores que conducen a una respuesta adecuada al estímulo (Díaz-Cintra et al. ,1995). La percepción del medio externo e interno de los organismos se inicia cuando los distintos estímulos son identificados y convertidos en una señal eléctrica por células especializadas llamadas receptores sensoriales. Cuando un receptor sensorial es estimulado, ocurre la apertura o cierre de canales iónicos presentes en sus membranas; el cambio concomitante en la permeabilidad de la membrana causa un cambio eléctrico graduado que se conoce como potencial del receptor, con duración y amplitud proporcionales a la intensidad del estímulo. A su vez, el potencial del receptor es convertido en un potencial de acción que se propaga por vías aferentes hasta el sistema nervioso central. Si bien algunas células receptoras funcionan de manera individual, otras se organizan en tejidos para formar órganos especializados para percibir las distintas modalidades sensoriales (Hole,1993).

Para la mayoría de los vertebrados, la visión se considera como uno de los procesos sensoriales de mayor relevancia. Por medio de la visión, los organismos conocen el mundo que los rodea, pueden juzgar la velocidad y distancia de los objetos, identificar el alimento, así como a miembros de su especie o enemigos de otras especies (Salceda, 1995; Matthews, 1998). A lo largo de la escala evolutiva, han aparecido una gran variedad de fotorreceptores que van desde grupos de células que solo detectan cambios en la dirección e intensidad de la luz, hasta un órgano sensorial llamado ojo, capaz de formar imágenes gracias a estructuras especializadas que concentran la luz sobre células sensitivas localizadas en una cámara cerrada. Existen algunas variaciones estructurales y funcionales entre los ojos de los distintos organismos, sin embargo es incorrecto mencionar que alguno

sea superior a otro, cada ojo ha evolucionado para satisfacer precisamente las necesidades del organismo a que pertenece. Así, existe el ojo compuesto de los insectos, el de los cefalópodos y el ojo de los vertebrados (Pérez-León y Salceda, 1998).

1.1 El ojo de los vertebrados.

La estructura del ojo de los vertebrados se muestra en la figura 1. Está formado por tres capas dispuestas de forma concéntrica. La capa más externa la forman la esclerótica y la córnea; la capa media se compone de la coroides, cuerpo ciliar e iris; y la capa más interna es la retina. La esclerótica es la cubierta externa protectora, que consiste de un tejido conectivo fibroso cuya porción anterior es transparente y forma la córnea por la cual los rayos de luz entran al ojo. La túnica media o coroides está compuesta de tejido pigmentado sumamente vascularizado que provee de nutrientes a los tejidos oculares. En su porción anterior se encuentran los músculos intrínsecos (de movimiento involuntario) que forman el cuerpo ciliar y el iris. El cuerpo ciliar es un músculo situado por delante de la coroides; la contracción de este músculo permite variar la curvatura del cristalino lo que permite la visión cercana o lejana. Desde la base del cuerpo ciliar se continúa hacia delante, el iris en cuyo centro se encuentra un orificio circular denominado pupila. El iris está formado por fibras de músculo liso radiales y circulares; las fibras radiales facilitan la dilatación de la pupila cuando hay poca iluminación lo que permite una entrada máxima de la luz. Por otro lado, las fibras circulares permiten la contracción de la pupila lo cual impide que entre mucha luz al ojo. El iris divide el interior del ojo en dos cámaras: la anterior y la posterior. En la primera se encuentra el humor acuoso que llena el espacio entre la córnea y el cristalino. La cámara posterior del ojo contiene al humor vítreo (Adler y Faber, 1986; Hole, 1993; Ganong, 1995; Reid, 1999).

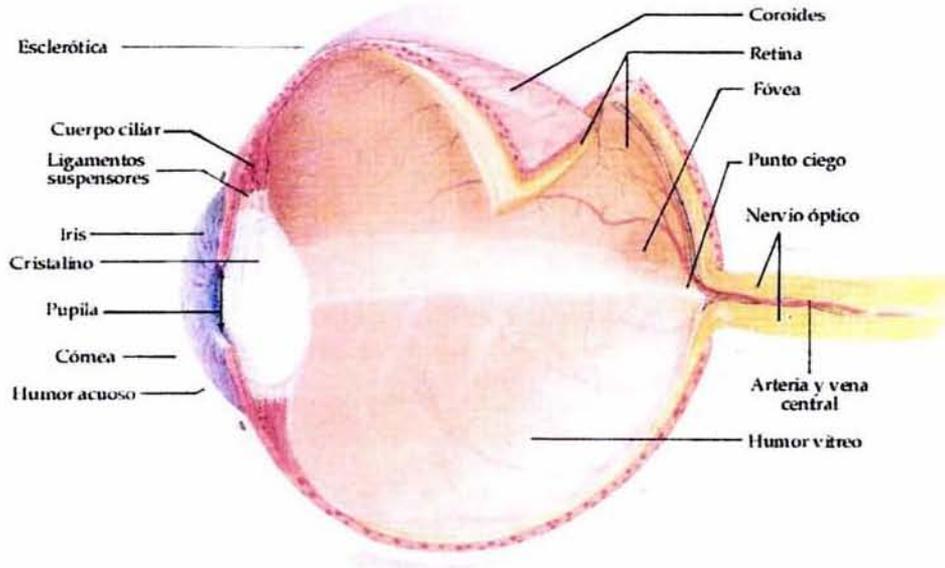


Figura 1. Anatomía del ojo de los vertebrados. Se muestran las principales capas que lo forman, así como las estructuras especializadas en la proyección de la imagen sobre la retina. (Modificada de Campbell, 1990).

Todas estas estructuras están diseñadas para que la imagen se enfoque con la menor distorsión óptica posible en la cubierta mas interna del ojo, la retina, que es la capa de tejido nervioso en la cual se encuentran las células sensibles a la luz o fotorreceptores (conos y bastones). La retina es la estructura especializada encargada de transducir los estímulos luminosos en señales nerviosas que posteriormente son transmitidas a centros superiores de integración.

1.2 Anatomía de la retina.

La retina está formada por dos componentes, el epitelio pigmentario de la retina (EPR) y la retina neural (Adler y Faber, 1986; Berman, 1991; Kandel et al. , 2001; Pulido, 2002). El EPR es una monocapa de células neuroepiteliales interpuesta entre los capilares de la coroides y los fotorreceptores de la retina neural; sus

células se encuentran adheridas por uniones estrechas (zónula occludens) que impiden el libre paso de sustancias potencialmente tóxicas entre la circulación coroidal y la retina neural, por lo que el EPR constituye una parte importante de la barrera hemato-retiniana. Las células del EPR contienen abundantes gránulos de melanina que absorben el exceso de luz, lo que impide la reflexión de esta en el interior del globo ocular evitando la iluminación difusa en la retina. El EPR además participa en una amplia variedad de actividades que incluyen la renovación del segmento externo del fotorreceptor, la regulación del transporte de metabolitos o nutrientes, tales como aminoácidos y glucosa, entre los fotorreceptores y los capilares de la coroides. La abundancia de mitocondrias sugiere que las células del EPR poseen una intensa actividad oxidativa, sin embargo, se tienen muy pocos estudios sobre el metabolismo de la glucosa en este tejido (Berman, 1991; Marmor, 1998).

La retina neural está formada por seis clases principales de neuronas dispuestas en una organización laminar en la que puede observarse una exquisita correlación entre forma y función (Wäsle y Boicot, 1991). La anatomía de la retina en los diferentes grupos de vertebrados es similar, y está compuesta de cinco capas, tres de ellas formadas de cuerpos celulares y dos capas plexiformes o sinápticas entre ellas (figura 2). Los somas de los fotorreceptores se encuentran en la capa nuclear externa; las interneuronas (células horizontales, bipolares, amacrinas e interplexiformes) ocupan la capa nuclear interna y las células ganglionares se sitúan en la capa que lleva su nombre. Los axones de las células ganglionares forman las fibras del nervio óptico.

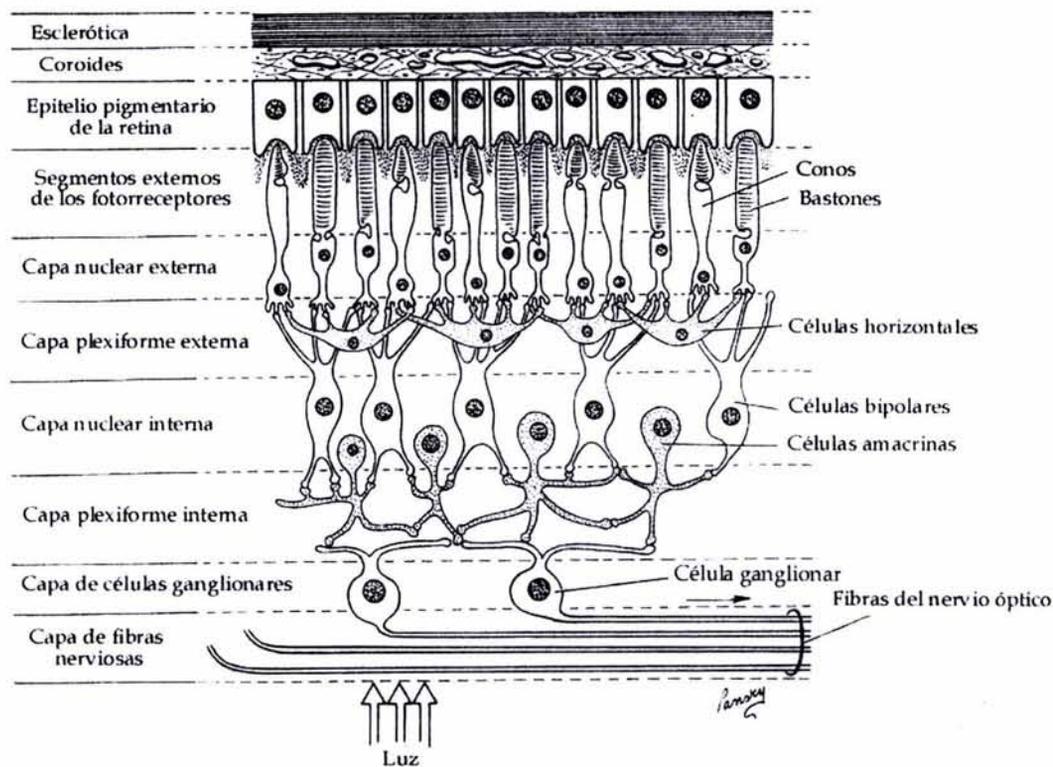


Figura 2. Esquema de la retina de los vertebrados donde se muestran los distintos tipos neuronales y las capas de que está formada. (Modificada de Panskey 1988).

Los fotorreceptores, las células bipolares y las horizontales establecen conexiones sinápticas entre sí en la capa plexiforme externa, mientras que las células bipolares amacrinas y ganglionares lo hacen en la capa plexiforme interna (figura 2) (Adler y Faber, 1986; Wässle y Boicot, 1991; Berman, 1991; Sterling, 1998; Reid, 1999; Kandel et al., 2001). Las células interplexiformes tienen procesos que se extienden a ambas capas plexiformes. La información nerviosa fluye verticalmente desde los fotorreceptores a las células bipolares y desde éstas a las células ganglionares; mientras que lateralmente, la información viaja a través de las células horizontales en la capa plexiforme externa y de las células amacrinas en la capa plexiforme interna. En la retina de la mayoría de los vertebrados existen dos tipos de células gliales, las células de Müller, que ocupan el grosor total de la retina, y los astrocitos que están principalmente confinados a la capa de fibras del nervio

óptico (Adler y Faber 1986; Wäsle y Boicot, 1991; Sterling 1998; Reid, 1999; Kandel et al. , 2001).

1.3 Fototransducción

Los fotorreceptores en la retina de los vertebrados consisten en un segmento externo conectado, a través de un cilio inmóvil, a un segmento interno o soma que contiene la terminal sináptica (Pérez-León y Salceda, 1998). En la oscuridad, la membrana plasmática del fotorreceptor en su porción externa es permeable a iones Na^+ ; estos iones fluyen a través del receptor hasta alcanzar el segmento interno donde es expulsado por la ATPasa de $\text{Na}^+\text{-K}^+$. Este flujo continuo de corriente, conocido como corriente oscura, mantiene el potencial de membrana del fotorreceptor alrededor de -30 mV a diferencia del resto de las neuronas en las que el estado basal es de una polarización aproximada de -70 mV. (Pérez-León y Salceda, 1998; Kandel et al. , 2001). El proceso visual empieza en los segmentos externos de los fotorreceptores con la absorción de fotones por el pigmento visual rodopsina (Kandel et al. , 2001). Una vez estimulada, la rodopsina activa a la proteína G transducina, que a su vez estimula la acción de la fosfodiesterasa, enzima encargada de hidrolizar al guanosín monofosfato cíclico (GMP_c) en GMP. La reducción de los niveles de GMP_c provoca el cierre de canales de Na^+ y Ca^{++} lo que reduce la entrada de estos iones al fotorreceptor. El descenso en la concentración de cationes induce la hiperpolarización del fotorreceptor lo que lleva a la disminución del neurotransmisor liberado.

El tejido retiniano se caracteriza por un alto requerimiento energético para abastecer principalmente los procesos de transporte activo que mantiene los gradientes iónicos necesarios para que la retina se mantenga en un estado óptimo de sensibilidad a la luz. Antes de adentrarnos en el análisis de los mecanismos del metabolismo energético en la retina, parece apropiado revisar algunos aspectos del

metabolismo de la glucosa, debido a que esta molécula es un sustrato energético particularmente importante en la retina (Winkler, 1989; Hsu y Molday, 1994).

1.4 El Metabolismo de la glucosa.

La glucosa ingresa a las células a través de un sistema de difusión facilitada que involucra la acción de proteínas membranales denominadas transportadores de glucosa (GLUT 1-12). Una vez en el interior de la célula la glucosa es fosforilada a glucosa-6-fosfato (G6P) por la hexocinasa. La G6P representa un punto de ramificación importante en el metabolismo de la glucosa, debido a que es un sustrato común para las enzimas involucradas en las vías glucolíticas, oxidativas y de la síntesis y degradación del glucógeno (Clarke y Sokoloff, 1994; Wiesinger, 1997) (figura 3). En la glucólisis, la glucosa es transformada en piruvato, que resulta en la producción neta de dos moléculas de alta energía en forma de ATP (figura 3). En condiciones anaerobias el piruvato es convertido a lactato, permitiendo la regeneración del dinucleótido de adenina y nicotinamida en su forma oxidada (NAD^+) que es esencial para mantener el flujo glucolítico. Por otro lado, bajo condiciones aerobias, el piruvato es descarboxilado oxidativamente para formar acetil-coenzima A (acetil-CoA) en una reacción catalizada por la piruvato deshidrogenasa. La acetil-CoA se condensa con el oxaloacetato para producir citrato; este es el primer paso del ciclo de los ácidos tricarboxílicos por el cual a través de cuatro pasos de oxido-reducción se transfieren tres pares de electrones al NAD^+ y un par al flavín adenin dinucleotido (FAD^+) formándose NADH y FADH_2 (figura 4). Tanto el NADH como el FADH_2 transfieren sus electrones a un oxígeno molecular en la cadena transportadora de electrones produciendo un total de 36 moléculas de ATP en el proceso de fosforilación oxidativa. Así, bajo condiciones aerobias se regenera el NAD^+ y no se produce lactato. (Whikehart, 1994; Stryer, 1995; Voet y Voet, 1995; Magistretti, 2003).

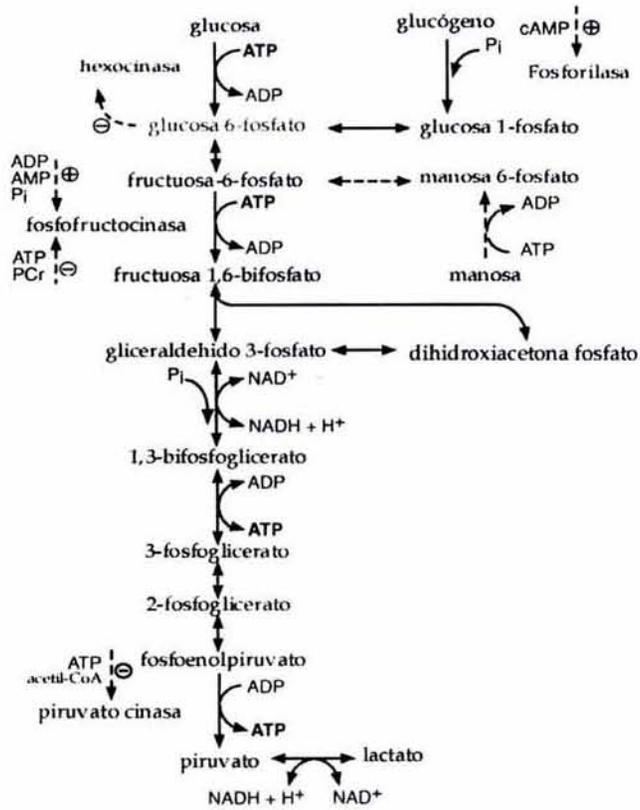


Figura 3. Visión simplificada de la glucólisis en la que se muestran las reacciones e intermediarios claves de esta vía. El rompimiento de polisacáridos de almacenamiento como el glucógeno así como el metabolismo de oligosacáridos producen glucosa y azúcares-fosfato y todos ellos entran a la vía glucolítica. Las 10 reacciones que convierten la glucosa en piruvato pueden ser consideradas en dos distintas fases. Las primeras cinco reacciones constituyen la fase que consume energía en la cual son sintetizados 2 azúcares-fosfato de 3 carbonos a expensas de 2 moléculas de ATP. Las 5 reacciones restantes representan la fase generadora de energía en la cual las triosas-fosfato se convierten en compuestos de alta energía en forma de 4 moléculas de ATP y 2 equivalentes reducidos en forma de NADH. (Modificada de Magistretti 2003).

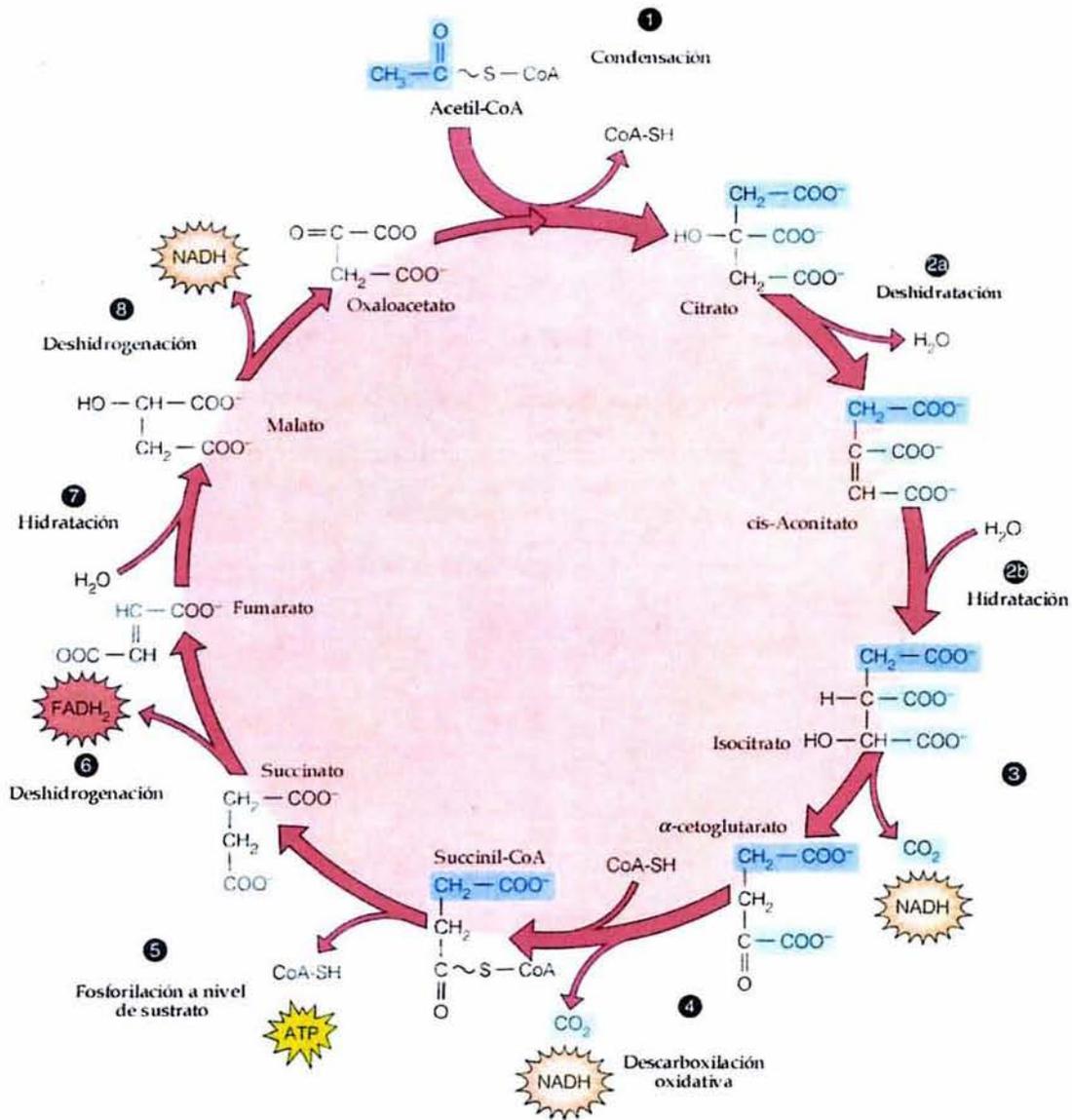


Figura 4. El ciclo del ácido cítrico, ácidos tricarbóxicos o ciclo de Krebs, donde se muestran las estructuras de cada intermediario. Los carbonos de la acetil-CoA que entra en el ciclo son marcados en azul para mostrar su destino metabólico. Después de la reacción 5 los átomos de carbono ya no se señalan debido a que el succinato es una molécula simétrica. Los grupos carboxilo que salen del ciclo como CO₂ en las reacciones 3 y 4 se muestran en verde. El ciclo comienza con la adición de 2 átomos de carbono (acetil-CoA) a un compuesto de 4 carbonos (oxaloacetato) que resulta en la formación de un anión de 6 carbonos, el citrato. Este continúa con la pérdida de 2 carbonos en forma de CO₂ y la regeneración del oxaloacetato. Entre los intermediarios del ciclo se forman una molécula de ATP así como cuatro pares de hidrógenos que pueden ser tomados por la cadena respiratoria para llevarlos al oxígeno y sintetizar una mayor cantidad de ATP (Modificada de Mattews et al. 2000).

1.4.1 Metabolismo de la glucosa en la retina.

La retina requiere de un continuo suministro de glucosa y oxígeno. Las retinas de rata (Winkler 1981), y conejo (Ames et al. 1992) incubadas en medios sin glucosa, presentan una disminución en su actividad eléctrica, así como una disminución paulatina en los niveles de ATP. Estudios de las vías del metabolismo de la glucosa en la retina de los mamíferos, han demostrado que este tejido convierte la glucosa en ácido láctico con admirable rapidez, consume oxígeno más rápido que otros tejidos, y que la formación de ácido láctico ocurre, aún en presencia de oxígeno (Winkler, 1981; Winkler 1989; Berman, 1991). A pesar de que la retina neural posee la tasa más alta de consumo de oxígeno que cualquier otro tejido incubado *in vitro*, la mayoría de la glucosa utilizada es convertida a lactato. Se ha calculado que el consumo de glucosa en la retina en presencia de oxígeno es de 0.73 $\mu\text{Mol/mg}$ de peso seco/hora, de la cual cerca del 70 % es convertida a lactato. Este fenómeno de producción de lactato con un suministro normal de oxígeno es referido como glucólisis aerobia (Winkler 1989).

La actividad eléctrica de la retina registrada mediante el electroretinograma (ERG), permanece estable por varias horas cuando es incubada en un medio con bicarbonato equilibrado con una mezcla de 95% O_2 y 5% CO_2 y 5.5 mM de glucosa. Sin embargo, la actividad eléctrica de la retina disminuye en condiciones de anoxia o por la presencia de iodoacetato, (un inhibidor de la glucólisis) en el medio de incubación, lo cual sugiere que la energía requerida para la actividad retiniana provienen tanto de la glucólisis como de la oxidación completa de la glucosa (Winkler, 1981).

En la retina del conejo, la ausencia de oxígeno provoca un incremento de 2.7 veces la tasa normal de glucólisis (Ames et al. 1992). Este efecto es mas prominente en el caso de la retina de la rana, donde la falta de oxígeno origina un aumento de 8.5 veces la tasa glucolítica (Fliesler et al. , 1997). Este incremento en la tasa de

tasa de glucólisis anaerobia es la respuesta metabólica de las células por compensar la pérdida de ATP generado por la mitocondria. Este cambio metabólico drástico es conocido como efecto Pasteur (Berman, 1991; Ames, 1992; Fliesler et al. , 1997; Winkler et al. , 2003a).

La producción de energía por la retina puede ser calculada por la tasa de consumo de oxígeno y producción de lactato. El tejido se encuentra en dos estados fisiológicos completamente distintos al estar sujeta a condiciones de luz u oscuridad. La luz constante disminuye la corriente oscura, con ello también la actividad de la ATP-asa de $\text{Na}^+\text{-K}^+$ y dado que este transporte de iones consume cerca de la mitad de la energía generada en la retina, podrían suponerse cambios en el metabolismo de la glucosa a diferentes intensidades luminosas. Efectivamente, un aumento en los requerimientos de oxígeno y glucosa se observa en las retinas de conejo y gato adaptadas a la oscuridad (Ames et al. , 1992; Wang et al. , 1997). En la retina del gato (Wang et al. ,1997) se demostró un aumento en la producción de lactato de $0.253 \mu\text{Mol}/\text{min}$ en la luz a valores de $0.409 \mu\text{Mol}/\text{min}$ en la oscuridad, lo cual sugiere una mayor actividad energética de la retina en condiciones de oscuridad. En la retina de la rata, no se encontró cambio significativo en la producción de lactato en condiciones de luz u oscuridad (Winkler 1981), sin embargo, Coffe (2000) demostró que los niveles de lactato en retinas de ratas adaptadas a la oscuridad fueron mayores de aquellas adaptadas en la luz. De igual modo, las retinas incubadas en la oscuridad liberan una mayor cantidad de lactato al medio de incubación que aquellas incubadas en la luz (Coffe, 2000).

La idea clásica de que todas las células retinianas, en particular los fotorreceptores, metabolizan la glucosa hacia lactato y CO_2 , ha sido recientemente confrontada con una propuesta completamente distinta de la utilización de la glucosa en la retina. Mediante una combinación de técnicas autorradiográficas y bioquímicas, Poitry-Yamate y Tsacopoulos (1991) reportaron, en la retina del cobayo, una toma de glucosa predominante por las células de Müller y su posterior

conversión a lactato en estas mismas células. Con estos resultados los autores concluyeron que solo en las células gliales de Müller se lleva a cabo la glucólisis y formación de lactato. En un estudio posterior (Poitry-Yamate y Tsacopoulos, 1995) en una preparación en la que las células gliales de Müller permanecen unidas a células fotorreceptoras aisladas de las retinas de cobayo, estos mismos autores reportaron una liberación predominante de lactato por parte de las células de Müller el cual en presencia de células fotorreceptoras disminuye en un 70%. Los autores proponen una transferencia de lactato, modulada por la luz, de las células gliales a los fotorreceptores. Debido a que las células gliales no son activadas directamente por la luz, debería existir una señal liberada por los fotorreceptores que induce la captura y fosforilación de la glucosa en las células de Müller con la subsiguiente liberación de lactato. Evidencia obtenida en cultivos de astrocitos de cerebro (Pellerin y Magistretti, 1994) apunta al glutamato como la señal de acoplamiento entre la activación neural y la toma de glucosa por las células gliales. Dentro de este marco se ha propuesto una teoría alterna para el acoplamiento entre la actividad neuronal y el metabolismo energético (Magistretti et al. , 1999). El glutamato, el neurotransmisor excitador dominante del SNC , es liberado por cerca del 90 % de las neuronas durante la excitación, para luego difundir a lo largo de la hendidura sináptica y ser reconocido por receptores en la postsinapsis. El glutamato liberado debe ser rápidamente removido de la hendidura sináptica; esto se logra principalmente por el sistema de captura presente en la glia que rodean las sinapsis glutamatérgica. El glutamato es tomado por la glia a través de transportadores que utilizan el gradiente electroquímico de Na^+ . Las células gliales son confrontadas a una doble tarea: eliminar del espacio sináptico altas concentraciones de glutamato y reestablecer el gradiente iónico de Na^+ .

liberación de lactato como substrato energético para las neuronas (Pellerin y Magistretti, 1994; Tsacopoulos y Magistretti, 1996; Magistretti et al., 1999; Magistretti, 2003).

1.5 El glucógeno.

En una amplia gama de organismos el exceso de glucosa se convierte en formas poliméricas de almacenamiento. En los animales, la glucosa se almacena como glucógeno, un polímero altamente ramificado en el que los residuos de glucosa se unen por enlaces glucosídicos α ,1-4. Las ramificaciones se forman por enlaces glucosídicos α , 1-6 los cuales se presentan con una frecuencia aproximada de uno por cada diez residuos (figura 6). La microscopía electrónica revela la presencia de gránulos de glucógeno en diferentes tipos celulares pero los principales tejidos de almacenamiento son el hígado y el músculo esquelético en los que representa el 10% y el 2% de su peso respectivamente. Es por tanto, en estos tejidos donde se han estudiado con mayor detalle los procesos metabólicos por los cuales los niveles de glucógeno son regulados. Los residuos glucosídicos derivados de una glucogenólisis son utilizados de modo distinto en músculo esquelético e hígado. En músculo esquelético, funcionan como reservorio de glucosa para sus propias necesidades metabólicas; una demanda de ATP resulta en la conversión de glucógeno a glucosa-6-fosfato (G6P) para su incorporación en la vía glucolítica. En el hígado, bajas concentraciones de glucosa en plasma desencadenan la ruptura de glucógeno a G6P que en este tejido, por la acción de la G6-fosfatasa (G6Pasa), es convertida a glucosa y se libera al torrente sanguíneo (Rawn, 1989; Stryer, 1995; Voet y Voet, 1995; Harris 1999)

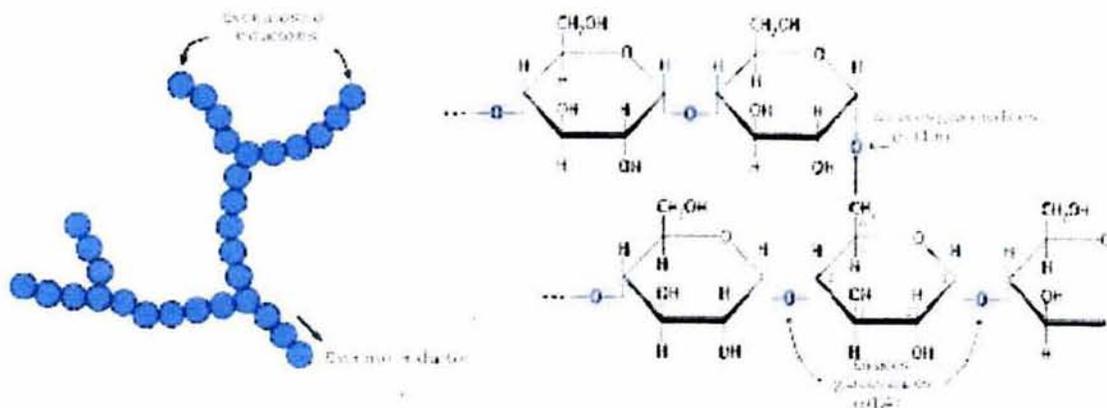


Figura 6. Estructura del glucógeno. A la izquierda se muestra una representación de su estructura ramificada donde se muestran el gran número de extremos no reductores que se requieren como sustrato para las enzimas de su síntesis y degradación. A la derecha se muestran la estructura en un punto de ramificación. (Modificada de Meisenberg y Simmons 1998)

1.5.1 Síntesis de glucógeno

La hexocinasa fosforila a la glucosa convirtiéndola en G6P y la fosfoglucomutasa la isomeriza a glucosa 1 fosfato (G1P) en una reacción reversible. Dado que la conversión directa de G1P en glucógeno y fósforo inorgánico es termodinámicamente desfavorable, la síntesis de glucógeno requiere de un paso exergónico adicional. Esto se logra por la combinación de la G1P con el uridin trifosfato (UTP) para formar uridin difosfato glucosa (UDP-glucosa), reacción catalizada por la UDP-glucosa pirofosforilasa (figura 7).

La síntesis de glucógeno se inicia con la participación de la glucogenina. La glucogenina es una hexosiltransferasa autocatalítica a la que se unen un promedio de ocho residuos glucosídicos provenientes de la UDP-glucosa. El primer residuo de glucosa se une en la tirosina 194, y a partir de este residuo se continúa la polimerización hasta una malto-octaosa. En el siguiente paso de la síntesis de glucógeno, la glucógeno sintetasa (UDP-glucosa:glucógeno 4- α -D glucosiltransferasa) incorpora unidades de UDP- glucosa y genera un enlace

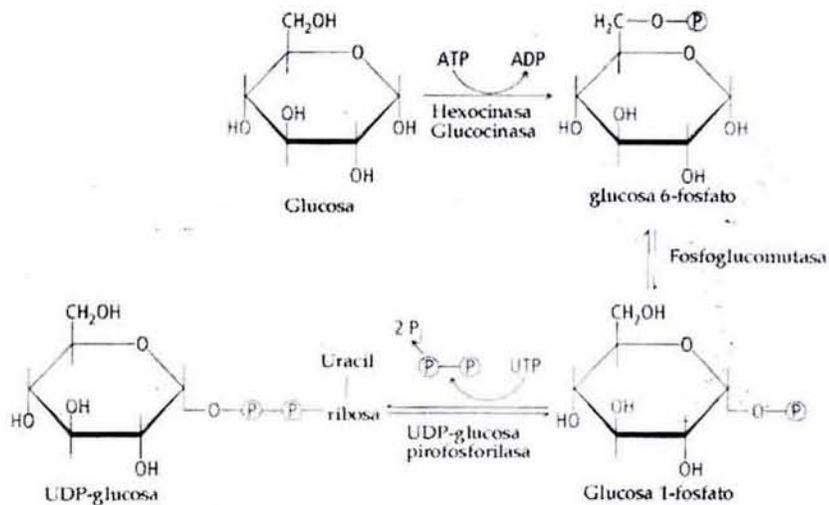


Figura 7. Síntesis de UDP glucosa. La UDP-glucosa es la forma activada de la glucosa para la síntesis de glucógeno. (Modificada de Meisenberg y Simmons 1998).

glucosídico α 1-4 entre el carbono 1 del grupo glucosilo que entra y el carbono 4 del extremo no reductor en la cadena de glucógeno (Stryer, 1995; Voet y Voet, 1995) (Figura 8). En esta reacción se cree que el ión glucosil oxonio interviene como estado de transición, ya que la reacción es inhibida por la 1,5 gluconolactona, un análogo con la misma geometría en media silla del ión oxonio. Las ramificaciones ocurren por la acción de la enzima ramificante amilo-(1,4-1,6)-transglucosilasa que transfiere una porción terminal de 6 o 7 residuos de un extremo de al menos 11 residuos de longitud, a un grupo hidroxilo en la posición 6 de una glucosa al interior del polímero, formándose así dos extremos en los que actúa la glucógeno sintetasa.

A partir de estudios realizados en cultivos de astrocitos (Lomako et al. 1993) se han caracterizado dos formas de glucógeno que se distinguen por sus solubilidades en ácido tricloroacético (TCA). El primero, es un glucógeno soluble en TCA denominado proglucógeno con un M_r de 400 kDa que se propone es un intermediario estable tanto en la síntesis como en la degradación del macroglucógeno soluble en TCA con un M_r de 10^7 .

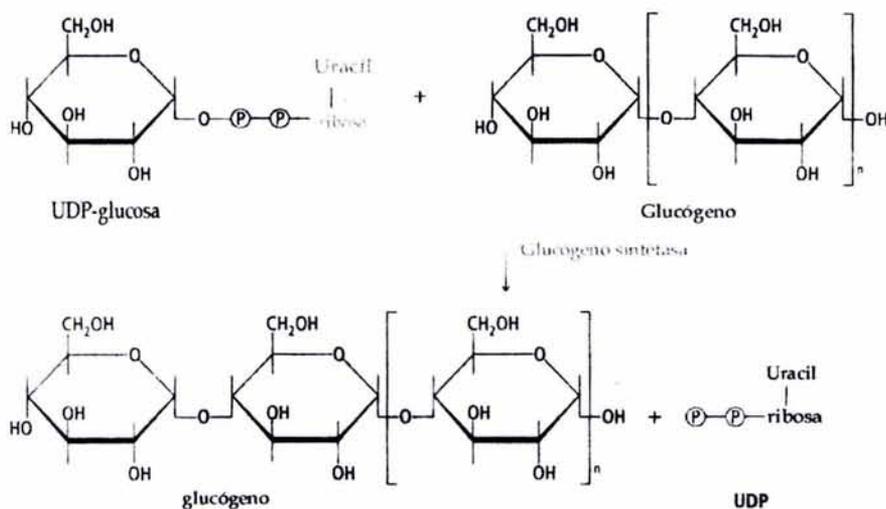


Figura 8. Reacción catalizada por la glucógeno sintetasa. (Modificada de Meisenberg y Simmons 1998).

Según el modelo propuesto por Lomako et al. 1993 para la síntesis de glucógeno, la malto-octaosa formada por la glucogenina es la molécula cebadora para la formación del proglucógeno por medio de la proglucógeno sintetasa. El proglucógeno a su vez funciona como molécula cebadora para la síntesis del macroglucógeno por medio de la glucógeno sintetasa. Así, en condiciones fisiológicas el glucógeno parece no degradarse totalmente hasta la glucogenina, sino que parece fluctuar entre el proglucógeno y el macroglucógeno (Lomako et al. 1993).

1.5.2. Rompimiento de la molécula de glucógeno.

La movilización de los residuos de glucosa a partir del glucógeno requiere la acción de tres enzimas. La glucógeno fosforilasa, que cataliza la fosforólisis del glucógeno (rompimiento de un enlace α , 1,4 por la adición de un grupo fosfato) para formar glucosa-1-fosfato. La fosforilasa sin embargo, detiene su proceso de degradación a los 4 residuos de glucosa de un punto de ramificación. El proceso

desramificador requiere la acción de una segunda enzima, la α 1,4- α 1,4 glucantransferasa que cataliza dos reacciones. En una de ellas la enzima elimina los residuos adyacentes al punto de ramificación y los transfiere intactos al extremo de alguna otra ramificación; además, el residuo que permanece unido por el enlace α 1-6 es liberado por la α 1-6 glucosidasa (figura 9). El proceso resulta en una molécula de glucosa libre y una ramificación susceptible a la ruptura por la fosforilasa. Por último, la fosfoglucomutasa cataliza el paso de G1P a G6P que puede ser incorporada en la vía glucolítica o ser hidrolizada a glucosa.

1.5.3 Regulación recíproca entre la síntesis y la movilización de glucógeno.

La glucógeno sintetasa y fosforilasa son las enzimas reguladoras de la síntesis y degradación del glucógeno respectivamente. Ambas enzimas están sujetas a control por efectores alostéricos (Harris 1999). La glucógeno fosforilasa es activada por AMP e inhibida por ATP y G6P. Por otro lado, la glucógeno sintetasa es activada por G6P. Así, cuando hay una gran demanda de ATP en la célula, prevalecen concentraciones bajas tanto de ATP como de G6P y altas concentraciones de AMP, que estimulan a la glucógeno fosforilasa mientras que la glucógeno sintetasa permanece inactiva. Paralelo a las interacciones alostéricas mencionadas, se superpone un control aún mas complejo que conlleva modificaciones covalentes de la glucógeno sintetasa y fosforilasa (Rawn, 1989; Voet y Voet , 1995).

Rompimiento de la molécula de glucógeno

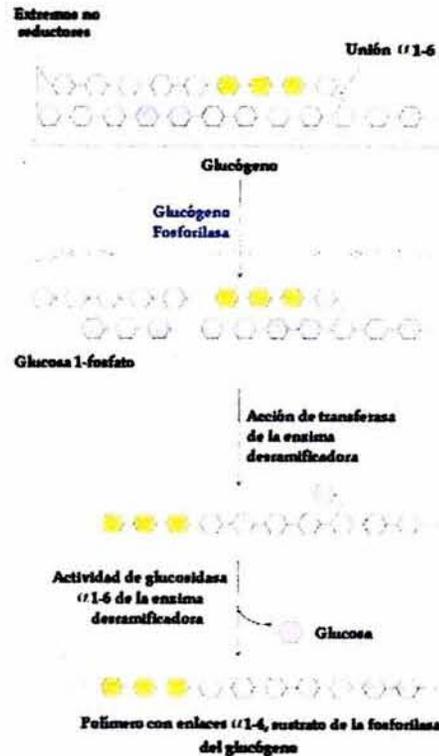


Figura 9. Acción conjunta de la glucógeno fosforilasa y de la enzima desramificadora en la degradación de la molécula de glucógeno.

La fosforilación de la glucógeno fosforilasa provoca su conversión desde una forma débilmente activa (b) a una forma activa (a). En esta forma, la enzima induce el rompimiento del glucógeno a glucosa-1-fosfato. Por el contrario, la fosforilación de la glucógeno sintetasa induce su conversión de un estado activo (a) a uno de menor actividad (b). Los estados de fosforilación de la sintetasa y fosforilasa del glucógeno están regulados por hormonas. El glucagon induce la degradación de glucógeno, en el hígado, pero no en el músculo, cuando los niveles de glucosa en plasma se encuentran disminuidos (Figura 10). Por el contrario, la insulina estimula la síntesis de glucógeno en músculo esquelético e hígado. El efecto de la

Respuesta hormonal

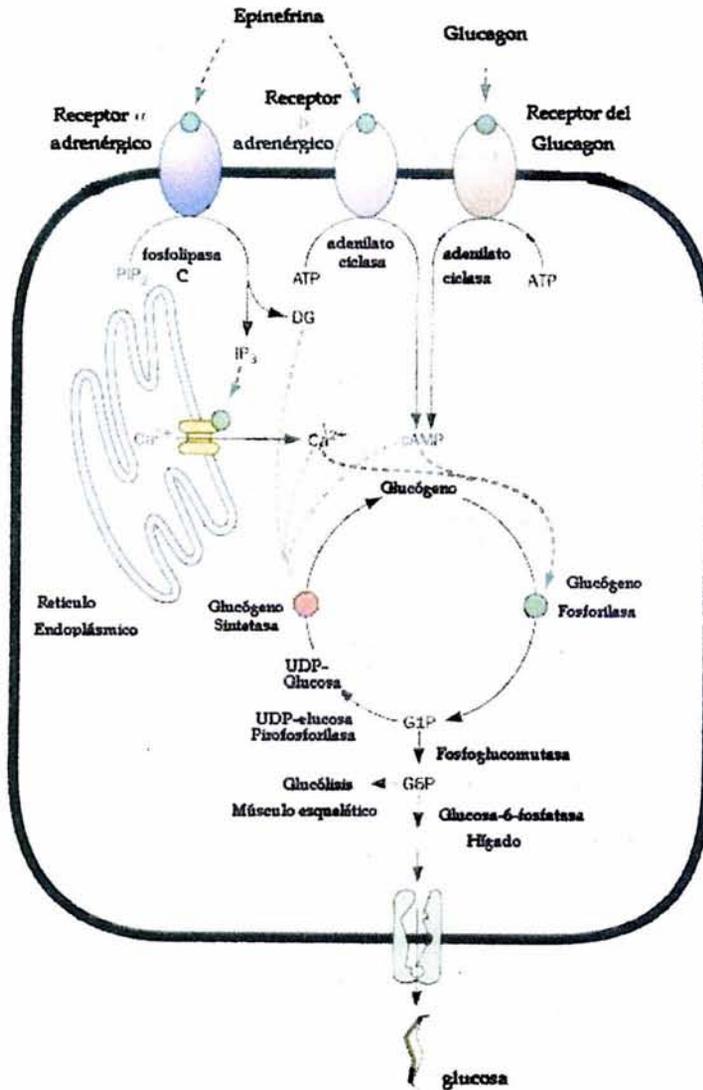


Figura 10. Cascadas reguladoras que afectan la síntesis y movilización del glucógeno. Estas cascadas se producen por la activación de la adenilato ciclasa y la fosfolipasa C que promueven tanto la degradación del glucógeno (flechas punteadas en verde) como la inhibición de la síntesis del mismo (flechas punteadas en rojo).

insulina es mediado a través de cascadas de fosforilaciones, que para el caso del músculo esquelético son bien conocidas. La vía de señalización, involucra la activación de la fosfatidil-inositol-3-cinasa (PI3K). Los fosfolípidos producidos por la acción de esta enzima (fosfatidil inositol trifosfato) activan a la proteína cinasa dependiente de fosfoinosítidos (PDK-1). La PDK-1 fosforila la región reguladora de la Akt o proteína cinasa B (PKB) así como las isoformas atípicas de la proteína cinasa C (PKC ξ y PKC λ) contribuyendo a su activación. Estas enzimas son las responsables de fosforilar y por tanto inhibir a la glucógeno sintetasa cinasa 3 (GSK-3), lo que lleva a la activación de la glucógeno sintetasa (Saltiel y Pessin, 2002).

La acción de los agentes glucogenolíticos son bien conocidos en el músculo esquelético e hígado. Las catecolaminas norepinefrina y epinefrina son dos potentes activadores de la hidrólisis de glucógeno tanto en el hígado como en el músculo. Su acción es iniciada cuando la hormona se une al receptor β -adrenérgico en la membrana plasmática. Esta interacción conduce a la activación de la adenilato ciclasa, enzima que sintetiza al segundo mensajero AMP_c. Este nucleótido es un activador de la proteína cinasa dependiente de AMP_c (PKA); ésta, una vez activa fosforila a la fosforilasa cinasa que a su vez fosforila tanto a la sintetasa como a la fosforilasa del glucógeno. La fosforilasa cinasa también se activa por el aumento de Ca⁺⁺ intracelular causado por los receptores α_1 -adrenérgicos (Figura 10). De tal forma que las dos enzimas que participan en la síntesis y degradación del glucógeno se encuentran en un estado desfosforilado cuando la insulina es abundante, y en un estado fosforilado cuando el glucagón y las catecolaminas prevalecen.

1.5.4 Glucógeno en el SNC.

La presencia de glucógeno en el SNC se ha demostrado por técnicas bioquímicas e histoquímicas, sin embargo poco se conoce sobre la regulación de su síntesis y degradación. Los depósitos de glucógeno en el cerebro son considerablemente reducidos (3.3 mmol/kg de cerebro en la rata), comparados con aquellos en el hígado y músculo esquelético resultan ser 100 y 10 veces menores respectivamente (Magistretti, 2003). Sin embargo, el glucógeno representa la principal reserva energética en el cerebro y se encuentra localizado principalmente en astrocitos, aunque se tiene evidencia de su presencia en células endoteliales, de los plexos coroideos, así como en ciertas neuronas del tallo cerebral (Cataldo y Broadwell 1986). Las vías para la síntesis y degradación de glucógeno en el SNC, son las mismas que las observadas en otros tipos celulares (Alonso et al. 1995) y las enzimas responsables de su síntesis y degradación han sido caracterizadas en el cerebro. Estudios inmunocitoquímicos han demostrado la presencia de la fosforilasa predominantemente en astrocitos, tanto en rebanadas de cerebro (Pfeifer et al. 1990) como en cultivos primarios (Reinhart et al. 1990). La presencia de la sintetasa se demostró en neuronas, astrocitos, células endoteliales, oligodendrocitos y células del plexo coroideo (Inoue et al. 1987). El glucógeno en el SNC, a pesar de su baja concentración, posee una alta tasa de degradación y sus niveles se encuentran finamente regulados por la actividad sináptica (Magistretti 2003). Por ejemplo, en condiciones de baja actividad sináptica como la inducida por anestesia, hibernación, y sueño de onda lenta, se observa un incremento en el contenido de glucógeno en el cerebro (Phelps, 1972). Por otro lado, usando autorradiografía cuantitativa se demostró que una estimulación sensorial lleva a la degradación del glucógeno en regiones particulares del cerebro (Swanson et al. , 1992). Asimismo, se observó que el metabolismo del glucógeno es regulado por

neurotransmisores, tales como la noradrenalina (NA), histamina y la serotonina que inducen glucogenólisis en rebanadas de corteza cerebral (Quach et al. , 1978, 1980, 1982). Magistretti y colaboradores demostraron el efecto glucogenolítico del péptido intestinal vasoactivo (VIP), el péptido activador de la adenilato ciclasa de la pituitaria (PACAP) y de la adenosina (Magistretti et al., 1981; Magistretti et al. , 1986). El efecto glucogenolítico de los neurotransmisores mencionados, es mediado por receptores específicos acoplados con sistemas de segundos mensajeros bajo el control de la adenilato ciclasa o de la fosfolipasa C. La tasa inicial de glucogenólisis activada por el VIP y la NA es de 5 a 10 nmol/mg de proteína/minuto, valor que es muy cercano a la tasa de utilización de la glucosa en la corteza cerebral demostrado por autorradiografía con 2-desoxiglucosa. Esta correlación sugiere que las unidades glucosilo movilizadas en respuesta a los neurotransmisores proveen de sustratos metabólicos para las demandas energéticas del cerebro, sin embargo aún no es claro si las unidades de glucosa son utilizadas por los astrocitos para compensar sus propias necesidades energéticas durante la activación neuronal, o si son metabolizadas a lactato, el cual sería liberado para su utilización por las neuronas (Magistretti, 1993).

En estudios realizados en cultivos de astrocitos, resulta interesante el que, paralelo a su acción glucogenolítica efectuada en un lapso de minutos, el VIP, la NA y la adenosina, inducen un aumento de 6 a 10 veces en los niveles de glucógeno en un lapso aproximado de 9 horas (Allaman et al. 2003).

Otros neurotransmisores como el ácido γ -aminobutírico y el glutamato no tuvieron efecto alguno en los niveles de glucógeno en rebanadas cerebrales ni en astrocitos en cultivo (Magistretti et al. 1993). Por el contrario, Swanson et al. (1990) reportaron que la incubación prolongada (4 horas) de cultivos de astrocitos en presencia de 1 mM de glutamato provoca un aumento en los niveles de glucógeno. Los autores sugieren que el glutamato es utilizado por las células como sustrato oxidativo preferencial dirigiendo parte de la glucosa disponible a la síntesis de glucógeno. De igual modo, Hamai et al. (1999) demostraron un aumento en los

niveles de glucógeno en cultivos de astroglia incubados con altas concentraciones de glutamato (1 y 2 mM), además observaron que la insulina provoca un aumento dosis-dependiente de los niveles de glucógeno con un aumento máximo a una concentración de 1 μ M; este aumento fue sensible a wortmanina lo cual sugiere que la vía de señalización de la insulina en estas células involucran la acción de la PI3K.

En tejidos como el músculo esquelético e hígado el metabolismo del glucógeno es sensible a cambios en los niveles de glucosa en plasma, de este modo, se ha propuesto que el glucógeno en el SNC funciona como reserva de carbohidratos que se utilizan cuando las concentraciones de glucosa en plasma disminuyen. De acuerdo con esto, el contenido de glucógeno en cultivos de astroglia de ratón es degradado rápidamente (con una vida media de 7 minutos) en ausencia de glucosa (Dringen y Hamprecht, 1992). Sin embargo, esta glucogenólisis no está acompañada por la liberación de glucosa al medio de incubación por lo que los autores sugieren que al menos en estas células no existe actividad de la G6P-asa (Dringen y Hamprecht 1992). La producción de lactato en vez de glucosa ha llevado a sugerir que el glucógeno en los astrocitos funciona como una reserva de lactato para las neuronas (figura 11) (Dringen, et al. , 1993). Por otro lado, se ha demostrado en cocultivos de neuronas y astrocitos que la presencia de glucógeno en éstos representa un factor de sobrevivencia neuronal en un medio sin glucosa (Swanson y Choi 1993).

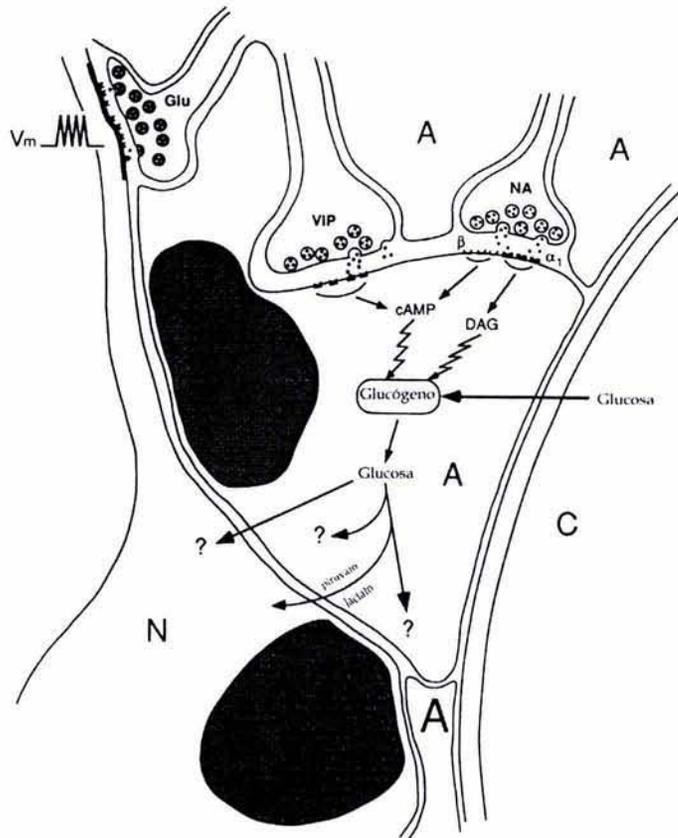


Figura 11. Función propuesta del glucógeno en el SNC. El pie terminal de los astrocitos rodean los capilares del cerebro (C) por lo que probablemente parte de la glucosa capturada por el cerebro sea almacenada como glucógeno en los astrocitos (A). La evidencia *in vitro* señala que estas reservas energéticas pueden ser movilizadas en respuesta a ciertos neurotransmisores como la norepinefrina (NA) y el péptido intestinal vaso activo (VIP). El destino metabólico de los residuos glucosídicos resultado de la ruptura de la molécula de glucógeno, se desconoce. Se sugiere que algunos intermediarios glucolíticos como el lactato o el piruvato son exportados hacia el neuropilo (N) y son degradados oxidativamente estableciendo así una interacción metabólica entre los astrocitos y el neuropilo. (Modificada de Magistretti et al. 1993)

1.5.5 El glucógeno en la retina.

La presencia de glucógeno en la retina, se ha demostrado mediante técnicas histoquímicas y bioquímicas siendo menos abundante en la retina vascularizada de la rata, el ratón y el humano que en la retina avascular de conejo y cobayo (Saari, 1988; Ames et al. , 1992). Existe una gran discrepancia en cuanto a la localización

celular del glucógeno en la retina. Se ha propuesto que en la retina de los mamíferos se encuentra principalmente confinado en las células de Müller (Poitry-Yamate y Tsacopoulos, 1992; Kuwabara y Cogan, 1961). No obstante, Runger-Brändle et al. (1996) demostraron en la retina del gato, la presencia de glucógeno en neuronas de segundo orden del circuito de los bastones así como en las células amacrinas A22. Por otro lado en un estudio realizado en la retina de la rata se demostró la presencia de glucógeno en los conos pero no en los bastones (Okubo et al. 1998). En un estudio reciente llevado a cabo en nuestro laboratorio se demostró, por técnicas bioquímicas, la presencia de glucógeno en la retina de la rata (Coffe 2000), el cual está localizado en todas las capas de la retina (Hernández 2003). De igual modo en la retina de la rana Schabadasch y Schabadasch (1972) demostraron la presencia de glucógeno en todas las capas de la retina a excepción de los segmentos externos de los fotorreceptores.

Por otra parte, mediante técnicas inmunocitoquímicas, se ha demostrado la presencia de glucogenina en todas las capas de la retina del pollo a excepción de un débil marcado en las capas de células ganglionares y el segmento externo de las células fotorreceptoras (Miozzo et al. 1996).

La literatura acerca de los mecanismos que regulan el glucógeno presente en la retina es escasa. Schabadasch y Schabadasch (1972) demostraron que existe un patrón dinámico de cambios en la cantidad y localización de glucógeno en la retina de la rana que depende de la magnitud del estímulo luminoso. En un estudio llevado a cabo en nuestro laboratorio, Coffe (2003), observó que los niveles de glucógeno en retinas de ratas adaptadas a la oscuridad son 50% menores que en aquellas adaptadas a la luz. Asimismo, demostró que los niveles de glucógeno en retina aumentan cuando se simulan condiciones de hiperglucemia en el medio de incubación.

1.6 Problemas relacionados con el metabolismo: Diabetes Mellitus.

La diabetes mellitus es uno de los principales problemas de salud pública en el mundo (Khan, 1998). Fundamentalmente, es un síndrome que se debe a la deficiencia absoluta o relativa de insulina o a una función inadecuada de la misma. En condiciones normales, la insulina estimula la captura y almacenamiento de la glucosa en algunos tejidos por lo que en el paciente diabético la utilización de la glucosa se encuentra alterada, al mismo tiempo hay una estimulación de la glucogenólisis, que en condiciones normales es inhibida por la insulina. Ambas alteraciones conducen a la acumulación de glucosa en sangre (hiperglucemia) al extremo en que se excede el umbral renal para la reabsorción de glucosa y aparece la glucosuria. Los ácidos grasos movilizados a partir de los triglicéridos se convierten en la principal fuente de energía del organismo; en el hígado, los ácidos grasos se oxidan a cuerpos cetónicos (ácido acetoacético, acetona y ácido β -hidroxibutírico) que en condiciones normales son utilizados por el músculo, el corazón, el riñón y en menor cantidad en el cerebro. En la diabetes, la velocidad de formación de cuerpos cetónicos excede a la de su utilización lo que origina cetosis y acidosis metabólica. Como resultado, el estado diabético que se inicia con un defecto en la acción de la insulina se despliega en círculos crecientes de anormalidades metabólicas (Pérez-Tamayo, 1987; Fariña, 1990; Robbins y Kumar, 1990). La diabetes mellitus se clasifica en dos tipos según los síntomas y la etiología de la enfermedad. La diabetes de tipo I o insulino-dependiente corresponde al 10% de los casos y se debe a una falta de insulina en plasma debido a la destrucción de las células β del páncreas, las responsables de la síntesis de insulina. Se cree que la autoinmunidad es el principal mecanismo implicado en la destrucción de las células β , dado que en el 90 % de los pacientes puede observarse una infiltración linfocítica en los islotes de Langerhans así como anticuerpos circulantes contra la membrana y elementos del citoplasma de las células de los islotes; además en algunos pacientes se han demostrado anticuerpos contra la propia insulina. En

algunos casos se ha observado la aparición de diabetes tipo I después de infecciones virales, de modo más común con los virus Coxsackie, de la varicela, rubéola y del sarampión por lo que también se ha considerado un origen viral de la enfermedad. Aunque algunos virus pueden dañar y destruir las células β en ciertos casos, se cree que el daño provocado por el virus inicia un proceso autoinmune que produce la necrosis selectiva de las células β pancreáticas. Algunos tóxicos también son capaces de dañar a las células β como el aloxan y la estreptozotocina. La diabetes de tipo II o insulino-independiente se caracteriza por un estado de resistencia a la insulina. La resistencia a la insulina es un estado patológico donde se encuentra una disminuida captura de glucosa estimulada por insulina en tejidos periféricos como el músculo esquelético y adipositos. Asimismo, se pierde el control de la producción de glucosa por parte del tejido hepático. Inicialmente, un aumento en la secreción de insulina compensa la resistencia de los tejidos periféricos, sin embargo el estado diabético aparece con el tiempo cuando a pesar de la presencia de insulina los tejidos no responden a ésta (Pérez-Tamayo, 1987; Khan, 1988; Le Roith y Zick, 2001). Aunque el tratamiento eficaz de los trastornos metabólicos primarios de la diabetes ha prolongado la vida de los pacientes, los individuos que han sufrido la enfermedad por largo tiempo presentan complicaciones secundarias. Por ejemplo, la duración del estado diabético es el principal factor de riesgo para el desarrollo de la retinopatía diabética. Después de 20 años de diabetes prácticamente todos los pacientes con diabetes tipo I y más del 60 % de pacientes con diabetes tipo II tienen algún grado de retinopatía.

La característica clínica mejor conocida de la retinopatía es la microangiopatía, que conlleva a un edema macular, así como una angiogénesis no controlada. El edema macular se desarrolla cuando una permeabilidad anormal de los capilares retinianos provoca un flujo excesivo de sangre hacia la retina que sobrepasan los mecanismos normales de transporte. El edema macular se ha correlacionado con el grado de pérdida de la visión. El factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) es un poderoso factor de permeabilidad que cuando es administrado de

manera exógena induce a un edema retiniano; el VEGF se encuentra en concentraciones elevadas en modelos animales de diabetes (Sone, 1997).

Se ha puesto mucho énfasis en el estudio de los cambios en la vasculatura retiniana en la diabetes, sin embargo hay evidencia que la función de la retina se altera en etapas muy tempranas del establecimiento del estado diabético lo cual sugiere un efecto directo en la retina neural y no sólo de un proceso secundario debido a la alteración de la barrera hematorretiniana (Barber 2003; Lieth et al. 2000). Así, se tienen reportes de registros electroretinográficos anormales en pacientes diabéticos que aún no presentan alteraciones vasculares detectables en la retina. Estas anormalidades son acompañadas de una capacidad deteriorada para discriminar contrastes además de una visión nocturna disminuida (Della-Sala, 1985). Estudios realizados en ratas con diabetes inducida por estreptozotocina demuestran un incremento en la apoptosis de células retinianas luego de un mes de tratamiento, con esto se ha sugerido que la diabetes induce una neurodegeneración crónica de la retina (Barber, 2003). Por otro lado, se ha observado la disminución de células amacrinas que contienen la enzima óxido nítrico sintetasa. Los autores sugieren que una disminución en la disponibilidad de vasodilatadores tales como el óxido nítrico podría contribuir con la reducción del flujo sanguíneo reportado en pacientes diabéticos (Roufail et al. ,1998). Se ha sugerido que las anormalidades funcionales y anatómicas presentes en la retinopatía diabética podrían ser consecuencia de cambios en el metabolismo de la retina durante la diabetes. Se tienen reportes del aumento en los niveles de sorbitol (Macgregor et al. , 1985) y de lactato (Salceda et al. , 1998) en ratas a las que se les indujo diabetes por estreptozotocina. En nuestro laboratorio, se ha demostrado que en ratas tratadas con estreptozotocina, el contenido de glucógeno en la retina aumenta cerca de 4 veces los valores normales (Coffe, 2000; Hernández, 2003). Estos resultados sugieren que el metabolismo del glucógeno en la retina se modifica durante el estado diabético. En el presente trabajo se estudiaron algunos

de los posibles factores que modulan los niveles de glucógeno en la retina de la rata y su relación con el estado diabético.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVO.

Hipótesis.

El metabolismo del glucógeno en la retina, al igual que en tejidos como músculo esquelético e hígado, es sensible a cambios en el suministro de glucosa y puede estar regulado por el estado energético de la célula y por la presencia de insulina.

Objetivos.

Determinar el efecto de insulina e inhibidores metabólicos en los niveles de glucógeno en la retina de la rata.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 Animales

En todos los experimentos se utilizaron ratas Long-Evans de 150 a 200 gramos las cuales se mantuvieron en un ciclo de 12 horas luz 12 horas oscuridad y sin ninguna limitación de agua y alimento. En algunos experimentos las ratas se adaptaron a la oscuridad al menos 3 horas antes de sacrificarlas y el tejido se aisló bajo luz roja tenue. La inducción de la diabetes se realizó por la inyección intraperitoneal de estreptozotocina (97.4 mg/Kg) dividida en dos dosis en días consecutivos; el día siguiente a este tratamiento se consideró como el primer día de diabetes. Un grupo de ratas diabéticas se les administró un tratamiento de insulina (5 unidades/animal cada tercer día) a partir del primer día de diabetes durante 20 o 45 días. Los niveles de glucosa en plasma se obtuvieron al momento de sacrificar los animales, con un medidor de glucemia (Accu-chek Active de Roche). Los animales con niveles de glucosa en plasma iguales o superiores a 300 mg/dl se consideraron diabéticos.

Los animales se sacrificaron por decapitación entre las 10:00 y 12:00 hrs; de inmediato los ojos se enuclearon y seccionaron en su porción media, la retina se separó de la copa óptica y ambas se colocaron en frío en un Ringer-Krebs (RKB) que contenía en mM: NaCl 118; KCl 4.7; KHPO₃ 1.2; CaCl₂ 2.5; MgSO₄ 1.17; glucosa 5.6; NaHCO₃ 25. La corteza cerebral, hígado y riñón se colocaron en una solución de NaCl al 0.9% en frío.

3.2 Medios de incubación

La wortmanina, el forbol-12 miristato 13-acetato (PMA) y la estaurosporina se disolvieron en dimetil sulfóxido (DMSO) y se mantuvieron como soluciones concentradas hasta el momento del experimento en que se disolvieron en el RKB. En todos los casos la concentración final de DMSO en el medio de incubación no

fue mayor del 0.5 % y los resultados se compararon con un control que contenía la misma cantidad de DMSO.

Las retinas y las copas ópticas se incubaron durante diferentes tiempos bajo distintas condiciones a 37° C con agitación suave. Al finalizar el periodo de incubación, las retinas y el EPR (que se desprendía de la copa óptica con unas pinzas de disección) se homogenizaron en 0.4 ml de agua, se tomó una alícuota para la determinación de proteína y el resto del homogenado se le adicionó NaOH a obtener una concentración final de 100 mM. Los tejidos de corteza cerebral, hígado y riñón se homogenizaron al momento de aislarse. Los homogenados se guardaron en congelación hasta el momento de la determinación del glucógeno.

3.3 Determinación bioquímica del glucógeno.

La determinación de glucógeno se realizó siguiendo los métodos de Lust et al. (1975) y Keppler y Decker (1983).

Las muestras se incubaron a 80° C durante 1 hora, se dejaron a temperatura ambiente al menos media hora y se les agregó 1 ml de etanol absoluto frío y se dejaron a -20 °C toda la noche. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 4 °C (Eppendor centrífuga 5417 R) por 15 minutos a 14000 g, el sobrenadante se desechó y el precipitado se colocó en una liofilizadora (Maxi Dry Lyo) para su secado total al vacío. Las muestras así obtenidas se resuspendieron por sonicación en 0.49 ml de un buffer de acetato de sodio (50mM) pH 4.5. El glucógeno fue convertido en sus monómeros correspondientes añadiendo a cada muestra 0.01 ml de una solución de amiloglucosidasa 140 U/ml e incubando a 37° C durante 1 hora.

La cuantificación de los residuos glucosídicos presentes en las muestras, se determinó por la aparición del NADPH producido por las reacciones enzimáticas acopladas según el procedimiento de Kepler y Decker (1983). El sistema consiste de un buffer 300 mM de trietanol amina-HCl pH 7.6, 2 mM de ATP, 2 mM de NADP⁺,

4 mM de $MgSO_4$, 3 U/ml de hexocinasa, 8.5 U/ml de glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa, y la muestra (retina 150 μ l; EPR, corteza y riñón 50 μ l; hígado 10 μ l), en un volumen final de 300 μ l que se obtuvo con la adición del buffer en que se encontraba la muestra. El sistema se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente y la absorbancia se midió a 340 nm en un lector de microplacas (Ceres 900 UV Bio-Tek instruments) utilizando una solución de glucosa como estándar.

3.4 Determinación de proteínas.

La determinación de proteínas se llevó a cabo en microplacas con una reacción basada en el método de Lowry et al. (1951) con reactivos adquiridos de Bio-Rad, Labs. utilizando albúmina de bovino como estándar.

3.5 Análisis Estadístico.

Los cambios en los niveles de glucógeno con respecto al tiempo se compararon por medio de un análisis de varianza de una vía seguido por una prueba de Tukey. Las demás comparaciones se realizaron por una prueba de t tomando como significativos para ambos casos una $p < 0.05$.

3.6 Reactivos.

Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico. La glucosa-6-fosfato deshidrogenasa fue adquirida de Roche (Mannheim Germany), la insulina, wortmanina, estaurosporina, PMA, estreptozotocina, ATP, amiloglucosidasa, hexocinasa y el $NADP^+$ se adquirieron de Sigma Chemical Co. (St Louis MO).

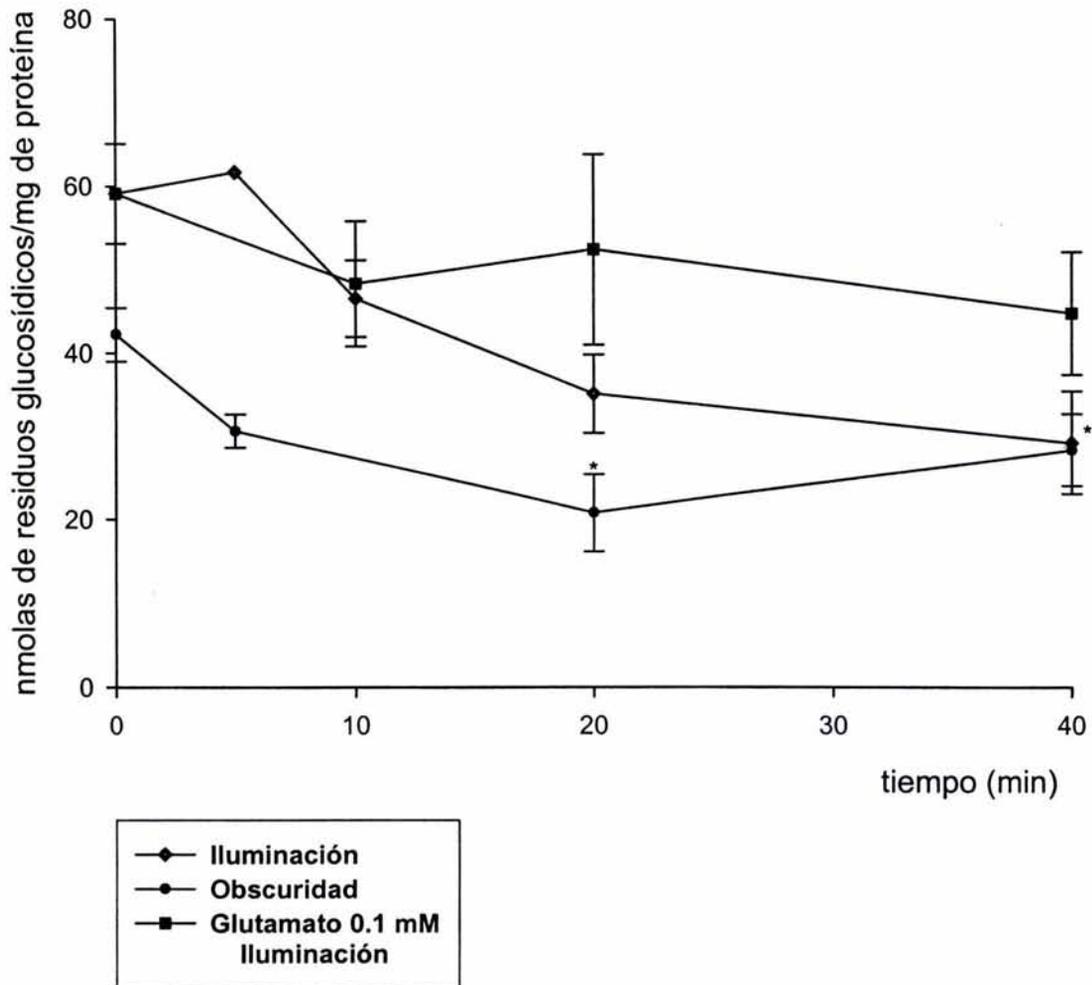
4. RESULTADOS.

Se estudiaron los niveles de glucógeno en las retinas de ratas adaptadas a la luz u oscuridad. Estos resultados muestran que el contenido de glucógeno en la retina recién aislada de ratas adaptadas a la luz u oscuridad es de 59.1 ± 5.9 nmolas/mg de proteína y de 42.2 ± 7.24 nmolas/mg de proteína, respectivamente.

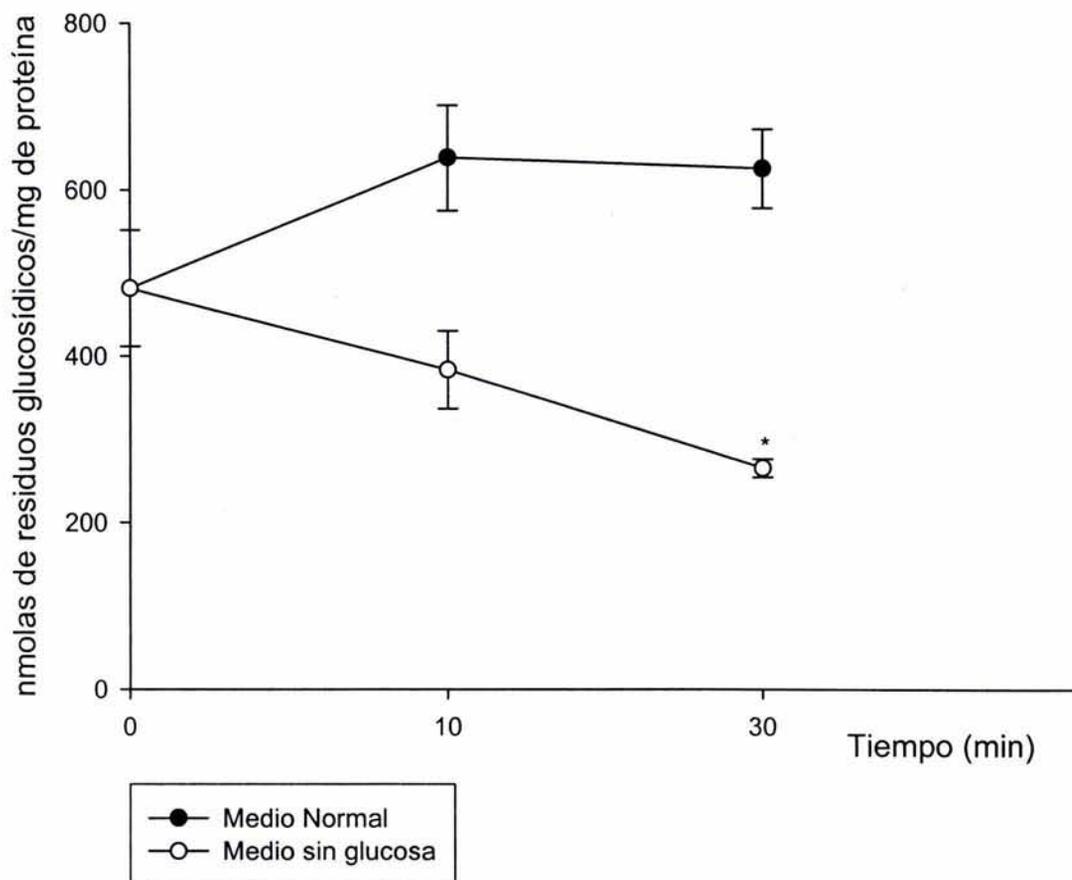
Con el fin de conocer si el glucógeno contenido en la retina es utilizado como reserva energética, las retinas se incubaron en un medio carente de glucosa. En las retinas incubadas en la luz, se observó una disminución del 36% en los niveles de glucógeno a los 10 minutos de incubación. Los niveles de glucógeno mostraron una disminución máxima del 42% a los 20 minutos y permanecieron constantes hasta los 40 minutos (gráfica 1). La adición de 100 μ M de glutamato no modificó significativamente el contenido de glucógeno en estas condiciones (gráfica 1).

Las retinas incubadas durante 5 minutos en la oscuridad en ausencia de glucosa presentaron una reducción del 27% en los niveles de glucógeno respecto al tejido recién aislado. Una disminución máxima del 67% se presentó a los 20 minutos de incubación, valores que se mantuvieron constantes hasta los 40 minutos (gráfica 1).

Por otra parte, el EPR recién aislado, presenta niveles de glucógeno 10 veces mayores que los encontrados en la retina. Estos niveles disminuyeron un 32 y 45% a los 10 y 30 minutos respectivamente, cuando el tejido se incubó en un medio sin glucosa en condiciones normales de iluminación. Como se observa en la gráfica 2, el EPR incubado en RKB normal exhibe un aumento del 32% en sus niveles de glucógeno a los 10 minutos de incubación, valor que permaneció constante hasta los 30 minutos.



Gráfica 1. Curva contra tiempo de los niveles de glucógeno en retinas incubadas en un medio sin glucosa. Las retinas de ratas adaptadas a la luz u oscuridad se incubaron en la misma condición por diferentes intervalos de tiempo. Las retinas incubadas en la luz se incubaron en presencia o ausencia de 0.1 mM de glutamato. Los valores muestran la media \pm SEM de 2-7 experimentos. * $p < 0.05$ con respecto al tiempo cero.



Gráfica 2. Niveles de glucógeno en el epitelio pigmentario de la retina incubado en un RKB normal y sin glucosa. El tejido se incubó los tiempos indicados en condiciones normales de iluminación. Los datos muestran la media \pm SEM de por lo menos 5 experimentos. * $P < 0.05$ con respecto al tiempo cero.

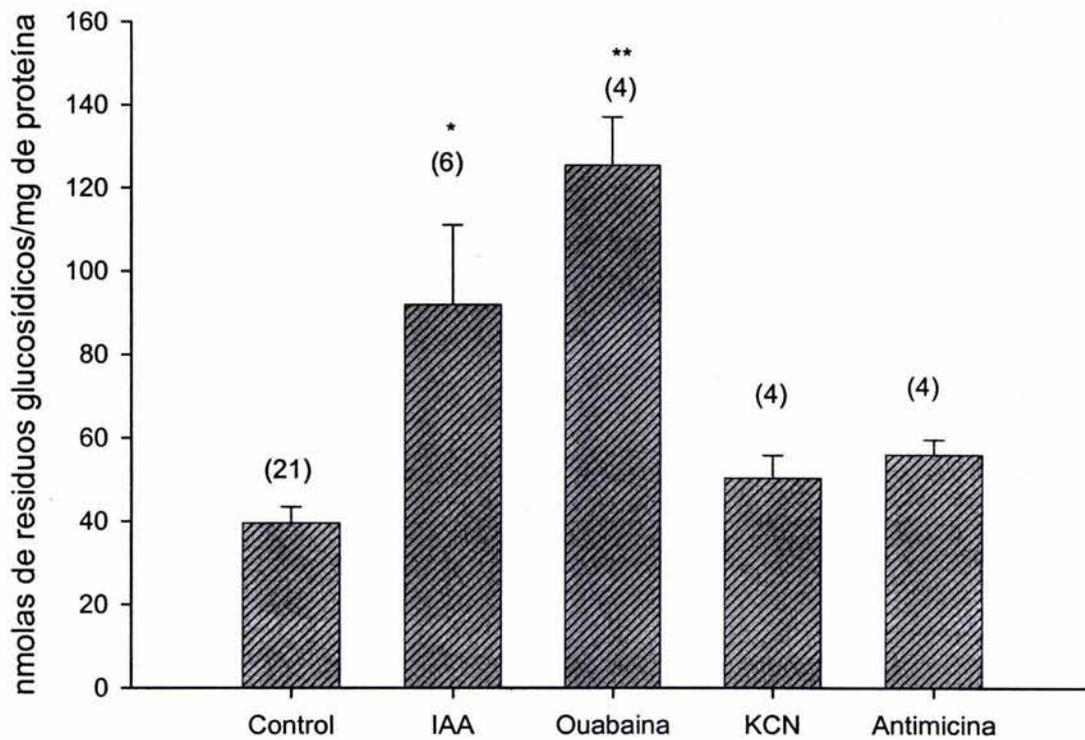
4.1 Inhibidores metabólicos.

Los niveles de glucógeno se estudiaron en retinas incubadas en presencia de compuestos que afectan diversas vías metabólicas. Los resultados de la gráfica 3 muestran un aumento significativo del glucógeno en las retinas incubadas durante 20 minutos en presencia de iodoacetato (IAA) y de ouabaina, inhibidores de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH), y de la ATPasa $\text{Na}^+\text{-K}^+$ respectivamente. La presencia de cianuro (KCN) y de la antimicina A, inhibidores de la cadena respiratoria, no causaron cambios significativos en los niveles de glucógeno (gráfica 3).

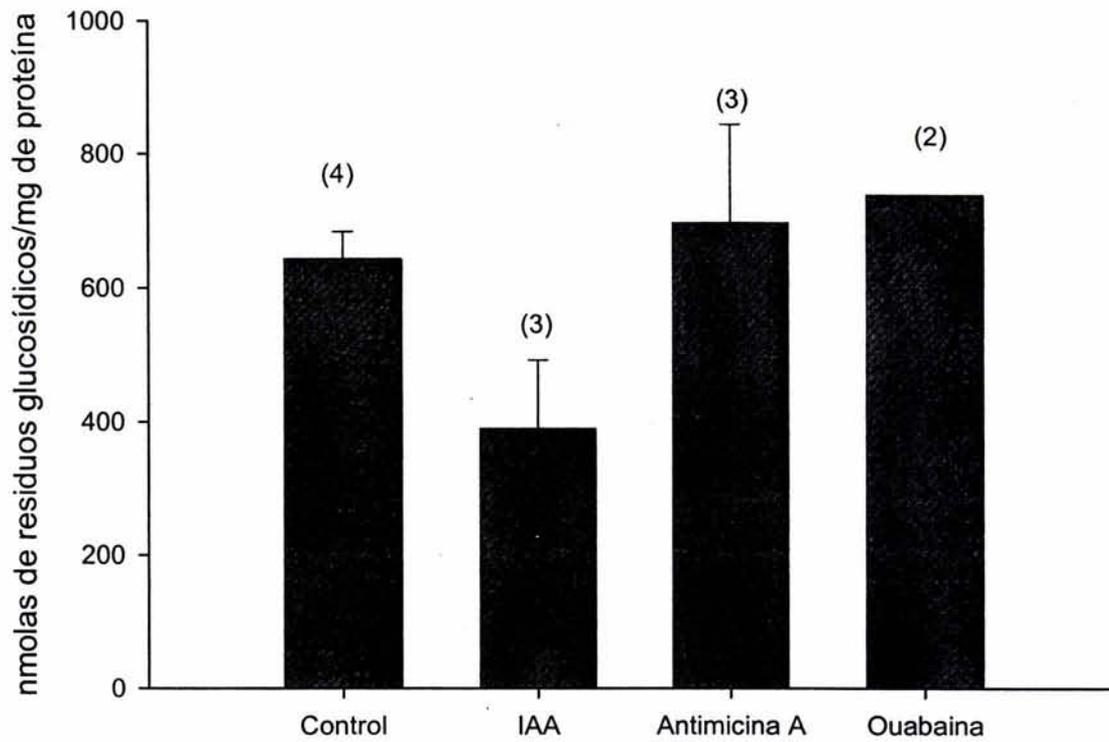
Los niveles de glucógeno en el EPR no se modificaron de manera significativa en presencia de ninguno de estos inhibidores metabólicos (gráfica 4).

4.2 Regulación del glucógeno en la retina.

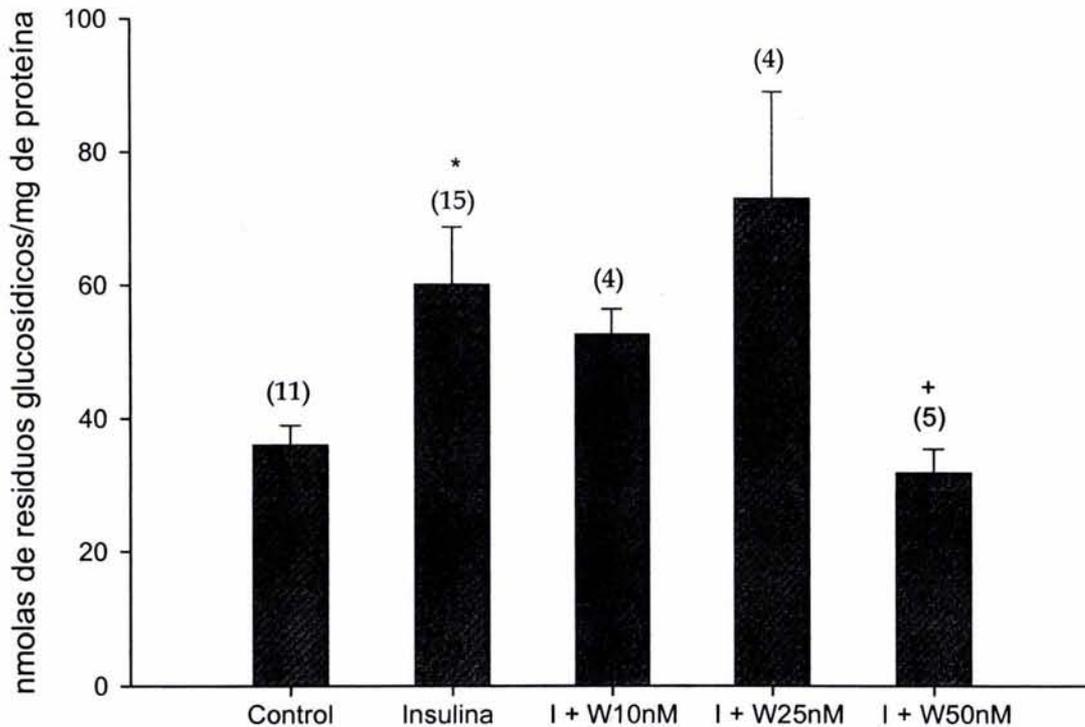
Los niveles de glucógeno en la retina se incrementaron en un 40% cuando el tejido se incubó en presencia de 10 ng/ml de insulina (gráfica 5). Con el fin de conocer el posible mecanismo por el cual la insulina incrementa los niveles de glucógeno, la retina se incubó en presencia de wortmanina, compuesto que se conoce inhibe a la PI3K. La gráfica 5 muestra que la estimulación por insulina en los niveles de glucógeno se inhibió a concentraciones relativamente altas de wortmanina (50 nM).



Gráfica 3. Contenido de glucógeno en retinas incubadas durante 20 minutos en RKB (control) ó en presencia de 1 mM de IAA, ouabaina ó cianuro ó con 10 μ M de antimicina A. Los datos representan la media \pm SEM, el número entre paréntesis muestra el número de experimentos. * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$ con respecto al control.



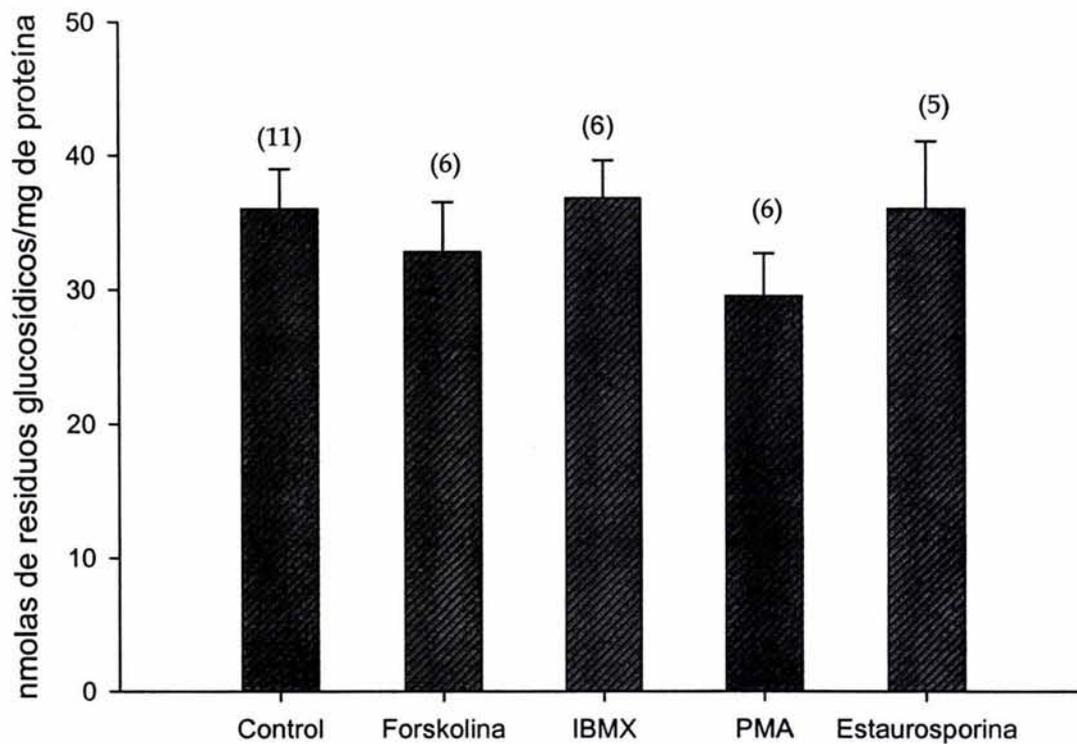
Gráfica 4. Niveles de glucógeno en el EPR incubado por 20 minutos en RKB normal (control) o en presencia de 1 mM de IAA ó ouabaina ó 10 μ M de antimicina A. Los valores representan la media \pm SEM, el número entre paréntesis indican el número de experimentos.



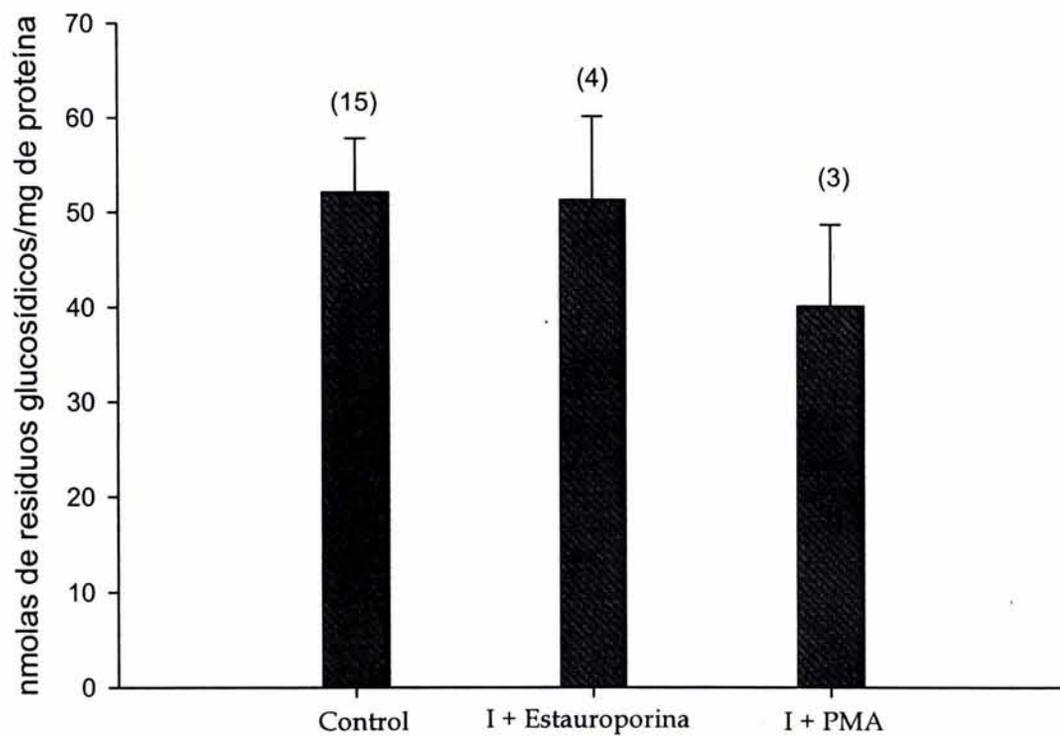
Gráfica 5. Niveles de glucógeno en retinas incubadas con insulina y diferentes concentraciones de wortmanina (W). Las retinas se incubaron durante 10 minutos en RKB normal o en presencia de wortmanina, a este tiempo se adicionó insulina (10 ng/ml) y se continuó la incubación por 10 minutos. Los valores muestran la media \pm el error estándar, el número entre paréntesis muestra el número de experimentos. * $p < 0.05$ con respecto al control, + $p < 0.05$ con respecto al valor con insulina.

El contenido de glucógeno basal (gráfica 6) y estimulado por insulina (gráfica 7) en la retina, no se modificó por la adición en el medio de incubación de compuestos que modifican la actividad de la PKC (estauroporina y PMA) y de la PKA (forskolina e IBMX= isobutil metil xantina).

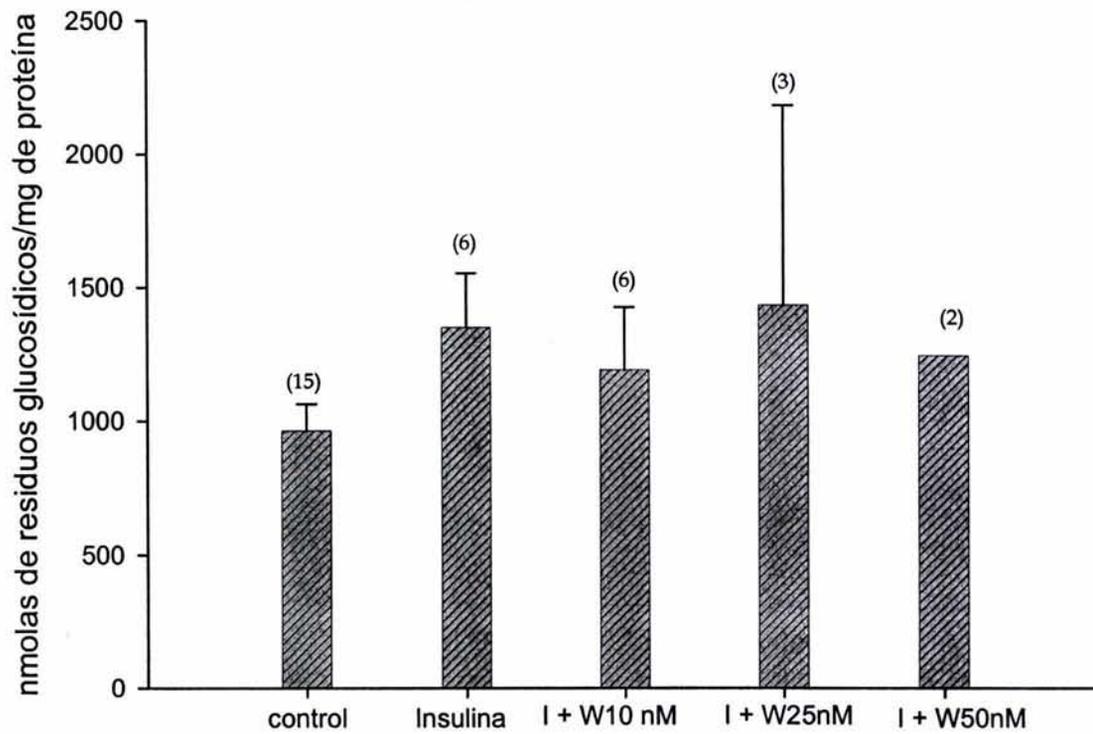
En el EPR, la insulina no causó una modificación significativa en los niveles de glucógeno (gráfica 8). Estos valores no se modificaron en presencia de wortmanina (gráfica 8), estaurosporina ó PMA (gráfica 9).



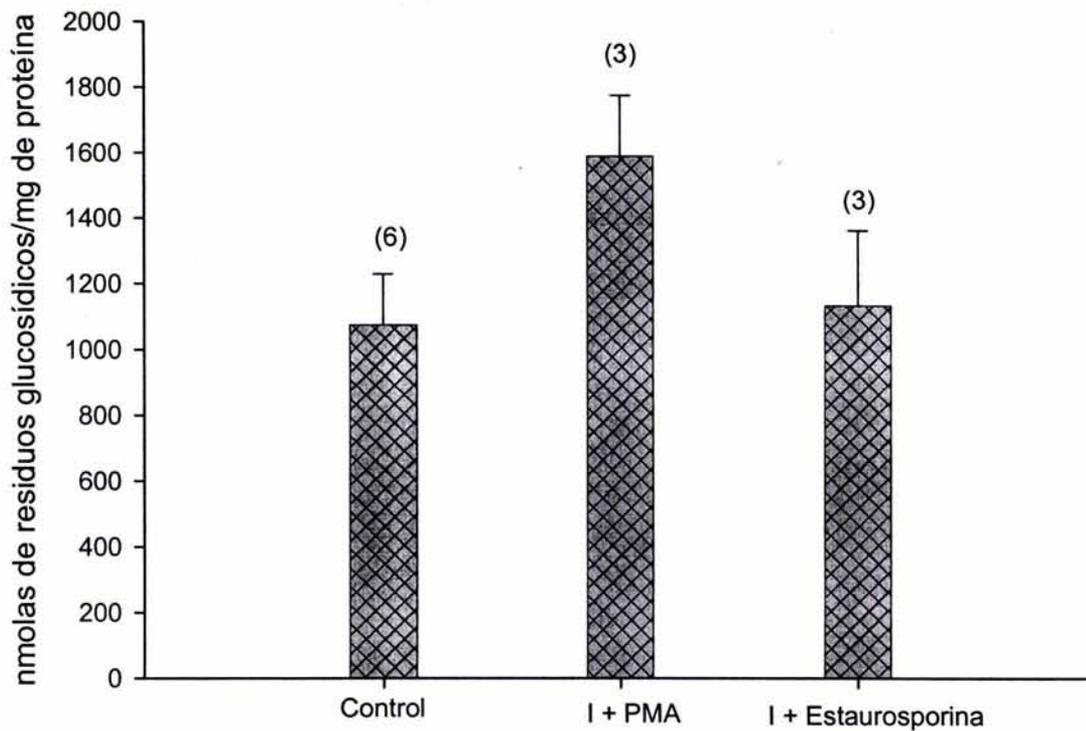
Gráfica 6. Niveles basales de glucógeno en retinas incubadas durante 10 minutos en presencia de 10 μ M de forskolina, 1 mM de IBMX, 200 nM de PMA o 100 nM de estaurosporina. Los resultados muestran la media \pm error estándar, el número entre paréntesis muestra el número de experimentos.



Grafica 7. Efecto de la estaurosporina y PMA en los niveles de glucógeno en la retina. El tejido se preincubó en presencia o ausencia de 200 nM de PMA o estaurosporina por 10 minutos, a este tiempo se adicionó insulina (10 ng/ml) y se continuó la incubación por 10 minutos. Los valores muestran la media \pm SEM, el número entre paréntesis indica el número de experimentos.



Gráfica 8. Efecto de la insulina y wortmanina en los niveles de glucógeno del EPR. El experimento se realizó como se describe en la gráfica 5. Los valores representan la media \pm SEM, el número entre paréntesis indican el número de experimentos.



Gráfica 9. Efecto del PMA y de la estaurosporina en los niveles de glucógeno del EPR. El experimento se realizó como se describe en la gráfica 6. Los valores representan la medias \pm SEM, el número entre paréntesis indica el número de experimentos.

4.3 Ratas Diabéticas.

Con el objeto de conocer el significado fisiológico del efecto de la insulina sobre los niveles de glucógeno en la retina, estos se compararon con aquellos de ratas a las que se les indujo diabetes por estreptozotocina y de ratas diabéticas tratadas con insulina. Estos valores se compararon con los de otros tejidos (EPR, corteza cerebral, hígado y riñón).

En los animales diabéticos tratados con insulina no tuvieron cambios en el peso corporal respecto al que tuvieron al inicio del tratamiento (tabla I). Asimismo, la concentración de glucosa en plasma disminuyó en un 30% con respecto a los animales diabéticos (tabla II).

4.3.1 Niveles de glucógeno.

Los niveles de glucógeno aumentaron significativamente en la retina y riñón de ratas diabéticas de 20 y 45 días. Por el contrario los niveles de glucógeno disminuyeron en un 48% en el hígado de ratas diabéticas y no se modificaron en la corteza cerebral y el EPR. El tratamiento con insulina disminuyó considerablemente el aumento en los niveles de glucógeno causados por la diabetes en la retina y el riñón, mientras que no tuvieron efecto en el hígado ni en el EPR (gráfica 10 y 11).

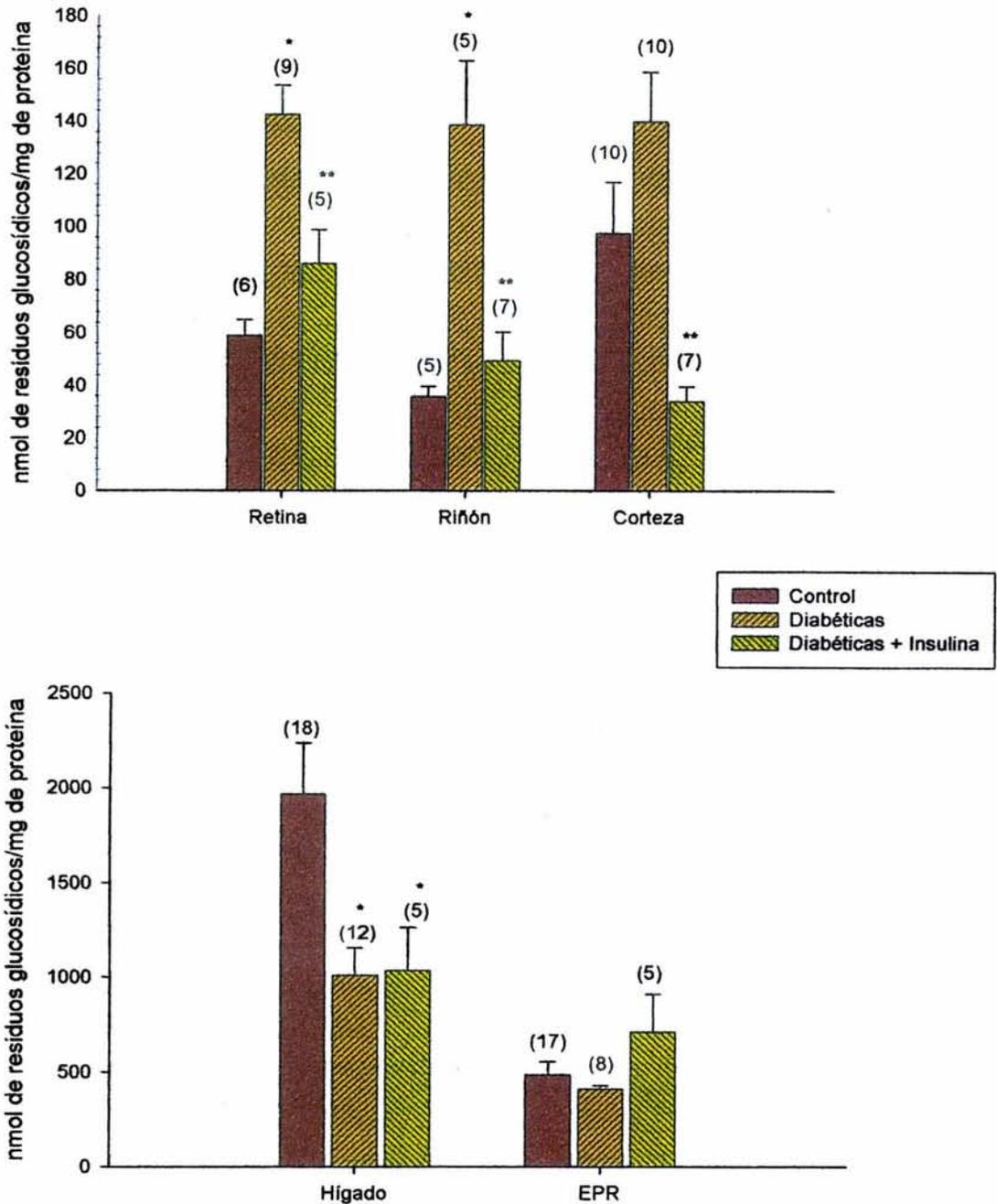
Peso corporal de ratas tratadas con Insulina	
	Peso corporal (gramos)
Inicial	180.8 ± 5.69
Tratamiento 20 días	212.17 ± 8.15
Tratamiento 45 días	213 ± 7.98

Tabla I. Peso corporal inicial y después del tratamiento con insulina de ratas con diabetes inducida por estreptozotocina. Los valores muestran las medias +/- SEM de por lo menos 5 animales.

Ratas diabéticas		Ratas diabéticas + Insulina	
20 días	45 días	20 días	45 días
mg de glucosa/dl			
536±19	734±30	423.86±33	487±12

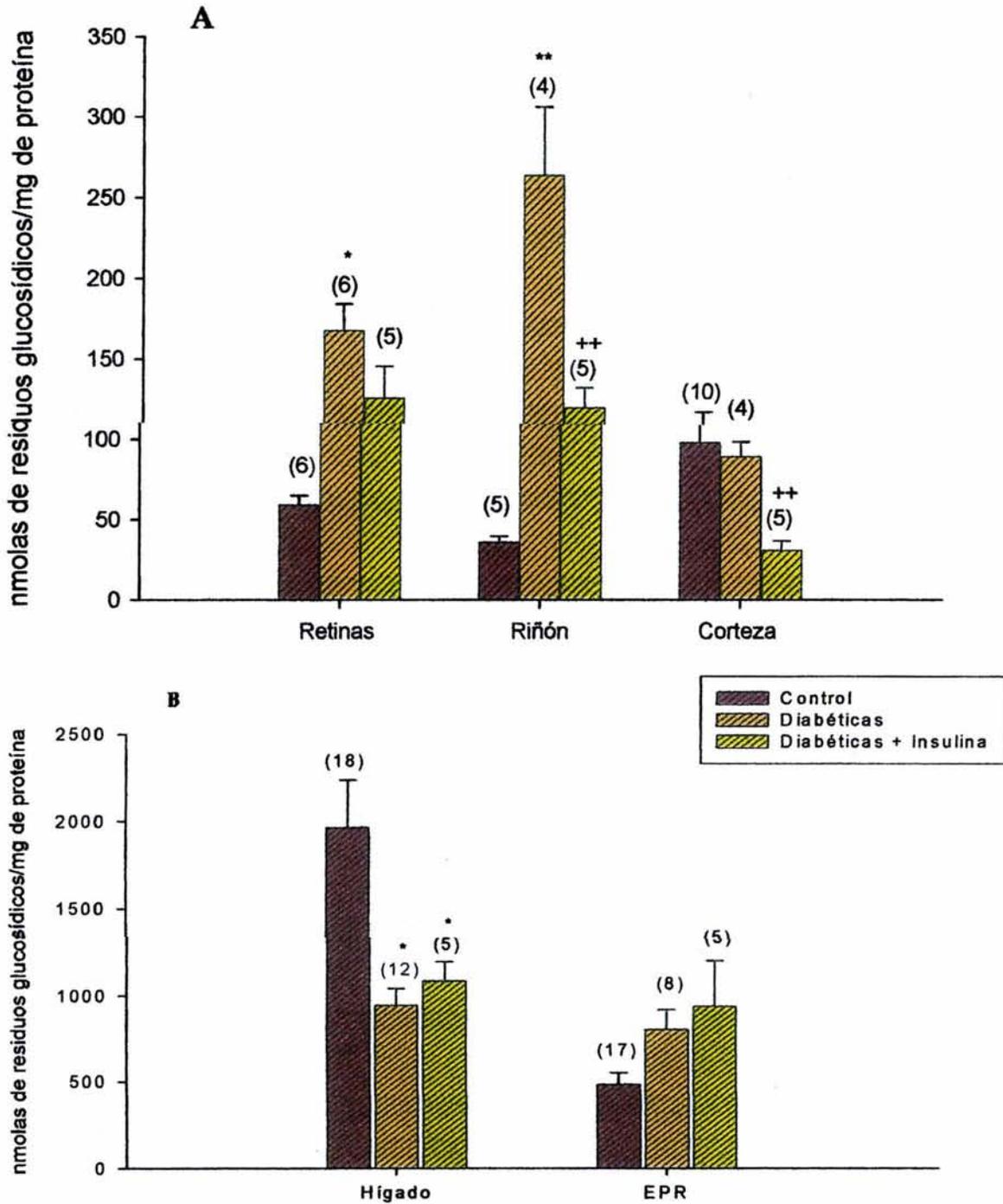
Tabla II. Comparación de los niveles de glucosa en plasma de ratas diabéticas y diabéticas tratadas con insulina. Los valores expresan las medias +/- SEM de por lo menos 5 animales. Valores control 83.7 +/- 4.9

Diabéticas 20 días



Gráfica 10. Niveles de glucógeno en diferentes tejidos de ratas diabéticas y diabéticas tratadas con una dosis de insulina. Los valores son las medias \pm SEM. Los números entre paréntesis muestran el número de experimentos. $p < 0.05$ respecto al control. $** p < 0.01$ respecto al diabético no tratado con insulina. A y B denotan la diferencia de escalas entre las dos figuras.

Diabéticas 45 días



Gráfica 11. Niveles de glucógeno en diferentes tejidos de ratas diabéticas y diabéticas tratadas con una dosis de insulina. Los valores son las medias \pm SEM. Los números entre paréntesis muestran el número de experimentos. * $p < 0.05$ respecto al control. ** $p < 0.01$ respecto al control. ** $p < 0.01$ respecto al no tratado con insulina. A y B denotan la diferencia de escalas entre las dos figuras.

Falta página

N° 52

5. DISCUSIÓN.

El glucógeno, descrito desde 1850 por Claude Bernard, es una reserva energética en muchos tejidos, principalmente en hígado y músculo esquelético, que puede ser utilizado cuando el suministro de glucosa es limitado. Aunque presente en bajas concentraciones, el glucógeno representa la principal reserva energética en el cerebro. El glucógeno en el cerebro se encuentra localizado predominantemente en los astrocitos y sus niveles parecen ser regulados por la actividad sináptica, hormonas y ciertos neurotransmisores; sin embargo aún existe una gran controversia en cuanto a la función que desempeña en el metabolismo del cerebro. Su papel como reserva energética ha sido debatido en la literatura puesto que se ha calculado que en condiciones de isquemia y en ausencia de otro sustrato energético, el glucógeno podría mantener el flujo glucolítico normal en el cerebro por tan sólo 5 minutos (Clarke y Sokoloff, 1994).

Al igual que en el cerebro, la retina posee cantidades limitadas de glucógeno. Desde los primeros reportes de la presencia de glucógeno en la retina de la rana realizados por Ehrlich y Frerichs en 1883, han surgido controversias respecto a la localización celular del polisacárido. Con la utilización de técnicas histoquímicas a nivel de microscopía de luz se demostró la presencia de glucógeno exclusivamente en las células de Müller (Kuwabara y Cogan, 1961). Posteriormente, el análisis con microscopía electrónica realizado por Dowling (1968), reveló que el glucógeno no está confinado a las células gliales de la retina, sino que además se encuentra distribuido en las neuronas y en sus procesos sinápticos (células amacrinas, bipolares y ganglionares). Resultados similares se han reportado en distintas especies (Magalhães y Coimbra, 1970; Schabadash y Schabadash, 1972; Sosula, et al. , 1974; Rüniger-Brandle et al. , 1996). Sin embargo, hasta ahora no se conoce la función que desempeña el glucógeno en la retina. El paradigma de la función del glucógeno en el músculo esquelético e hígado, ha llevado a proponer al glucógeno en la retina como una reserva energética en ausencia del suministro de glucosa

(Ripps y Witkovsky, 1985; Poitry-Yamate y Tsacopoulos, 1992). A este respecto se tiene evidencia de que el glucógeno en la retina del conejo desaparece casi en su totalidad a los 20 minutos de incubación en un medio sin glucosa (Magalhães y Coimbra, 1970), lo cual sugiere que el glucógeno efectivamente actúa como reserva energética. No obstante, la función de la retina del conejo, definida como su habilidad para generar una señal eléctrica en respuesta a la estimulación por la luz, se ve afectada a los 5 minutos de incubación en un medio sin glucosa (Ames et al., 1992). Asimismo, Winkler (1981) observó que la incubación de la retina de la rata en un medio sin glucosa lleva a un decremento del 50 % en la actividad eléctrica del fotorreceptor en sólo 6 minutos, con la pérdida total de la actividad a los 30 minutos, paralelo a un decremento del contenido de ATP.

En contraste con los resultados reportados por Magalhães y Coimbra (1970) para la retina del conejo, en el presente estudio se observó una utilización limitada del glucógeno en la retina de la rata, dado que el 52% del glucógeno permanece después de 40 minutos de incubación sin glucosa. Una posible causa de las diferencias observadas es el tipo de vascularización de la retina en estas especies. A diferencia de la rata, la retina del conejo es avascular y esto se ve reflejado en la presencia casi exclusiva de enzimas glucolíticas en sus capas internas, mismas donde se encuentra la mayor cantidad de glucógeno (Magalhães y Coimbra, 1970). La rápida pérdida de glucógeno observada en la retina del conejo podría deberse a un destino exclusivamente glucolítico mientras que en nuestro estudio la utilización predominantemente oxidativa de los residuos glucosídicos, sería la responsable de la menor pérdida de glucógeno. Nuestros resultados están de acuerdo con lo reportado en el cerebro de la rata y nervio óptico. De esta forma, estudios de espectroscopía magnética nuclear (NMR), demostraron que la señal del glucógeno no se eliminó aún cuando el tejido se mantuvo por 2 horas en condiciones de hipoglucemia (Young-Choi 2003). De igual modo, el contenido de glucógeno en el nervio óptico de la rata disminuyó un 60% después de 30 minutos de incubación sin glucosa y luego se mantuvo constante hasta los 60 minutos de

incubación (Wender et al. , 2000). Asimismo, Niemeyer (2001) observó que el glucógeno en la retina del gato disminuyó parcialmente después de 80 minutos en un medio sin glucosa. De estos estudios se puede concluir que el glucógeno en la retina y en el cerebro se degrada cuando no hay glucosa en el medio, pero que existe una proporción que no puede ser degradada. Esta podría corresponder al proglucógeno propuesto por Lomako et al (1993) en el músculo esquelético como intermediario estable tanto en la síntesis como en la degradación del macroglucógeno. En el músculo esquelético, no se ha encontrado la glucogenina en su forma libre, y no se ha demostrado un crecimiento continuo de la molécula desde la glucogenina al proglucógeno; es decir que *in vivo* el glucógeno oscila entre el proglucógeno y el macroglucógeno (Lomako et al. , 1993; Alonso et al. , 1995).

Otra posible explicación deriva del hecho de que diferentes tipos celulares en la retina contienen glucógeno y que éste puede ser utilizado de manera diferencial (Schabadasch y Schabadasch 1972), de este modo se puede suponer que en un medio sin glucosa sólo algunos tipos celulares utilizan su glucógeno.

Bajo estas circunstancias, el glucógeno en la retina probablemente funciona como un amortiguador entre cambios abruptos en las demandas metabólicas que se presentan durante un suministro de glucosa normal, y no solamente como una reserva energética para la función en la retina en periodos de hipoglucemia.

Las neuronas y las células gliales en el SNC comparten relaciones intrincadas que incluyen la captura y reciclamiento de neurotransmisores como el glutamato. Se conoce que las células gliales toman el glutamato extracelular y lo convierten a glutamina, que a su vez es liberada y convertida a glutamato por las neuronas. No obstante, diversas líneas de investigación han reportado que una proporción considerable de glutamato es metabolizado a través del ciclo de Krebs (McKenna et al. , 1996). El esqueleto de carbonos del glutamato puede entrar al ciclo del ácido cítrico como α -cetoglutarato y proveer así de un substrato metabólico alternativo en caso de falta de glucosa. Se ha demostrado que el L-glutamato estimula la síntesis de glucógeno en astrocitos en cultivo (Swanson et al. , 1990). Estos autores sugieren

que la utilización preferencial del glutamato como sustrato energético, dirige la glucosa hacia la producción de glucógeno. Por otro lado Magistretti (1993) no encontró cambios significativos inducidos por glutamato en el contenido de glucógeno de rebanadas de corteza cerebral de ratón. Sin embargo, reporta un incremento en la tasa glucolítica de astrocitos incubados durante 20 minutos con 0.2 mM de glutamato. En este estudio, demostramos que los niveles de glucógeno en la retina incubada en un medio sin glucosa son mayores cuando éste contiene glutamato. Estos resultados sugieren que el glutamato se metabolizó de manera preferente al glucógeno, lo que está de acuerdo con el hecho de que los niveles de glutamato disminuyen en retinas incubadas sin glucosa (Zeevalk y Nicklas, 2000).

El EPR posee 10 veces más glucógeno que la retina, y éste es parcialmente utilizado en un medio sin glucosa, lo cual podría sugerir que este tejido libera glucosa hacia la retina en condiciones de alto requerimiento energético. Los niveles de glucógeno en el EPR parecen ser estables ya que no se modificaron bajo una variedad de condiciones experimentales.

5.1 Inhibidores Metabólicos.

El metabolismo de la glucosa en la retina del mamífero posee propiedades interesantes que incluyen altos niveles en el consumo de oxígeno y la producción de lactato (Berman, 1991). Estudios previos demostraron que ni la glucólisis ni el ciclo de Krebs por separado, son suficientes para mantener a la retina en un estado óptimo de excitabilidad a la luz (Winkler, 1981). La presencia en el medio de incubación de inhibidores metabólicos llevan a una pérdida paulatina de los niveles de ATP, así como de la respuesta fisiológica a la luz (Winkler, 1981). La regulación de la actividad de las enzimas responsables de la síntesis y degradación del glucógeno se encuentra en una estrecha relación con el estado energético en la célula, por lo que en este estudio se determinaron los niveles de glucógeno en la

retina incubada en presencia de compuestos que alteran el estado energético celular.

El aumento en los niveles de glucógeno en presencia de IAA podría parecer contradictorio dado que al estar inhibida la glucólisis, la célula se encontraría en un estado energético desfavorable. Sin embargo, la inhibición de la glucólisis a nivel de la G3PDH llevaría a una acumulación de intermediarios tales como la G6P y la F1,6BP. Aunque bajas concentraciones de ATP mantendrían activas las enzimas encargadas de fosforilar y por tanto inhibir a la glucógeno sintetasa se ha demostrado que la G6P estimula su actividad catalítica aún cuando se encuentra en un estado altamente fosforilado (Srivastava y Pandey, 1998). Además, se ha demostrado que la G6P promueve la desfosforilación de la glucógeno sintetasa por la activación de la proteína fosfatasa-1 asociada al glucógeno (Miller et al. , 1986). Por otro lado, el aumento en los niveles de F1,6BP llevaría a la activación alostérica de la piruvato cinasa por lo que los almacenes en la retina de fosfoenolpiruvato (PEP) serían transformados en su totalidad a piruvato. Este proceso en conjunto con la incorporación de aminoácidos como la alanina o el glutamato en el metabolismo oxidativo, representarían la fuente de energía para la células en presencia del IAA.

Por otra parte, se ha reportado que la actividad de la ATP-asa de $\text{Na}^+\text{-K}^+$ que mantiene el gradiente iónico en la retina consume cerca de la mitad de la energía producida (Ames et al. , 1992). El aumento en los niveles de glucógeno en la retina incubada con oubaina podría deberse a la disminución de las demandas metabólicas que llevaría a un aumento en el contenido de ATP y/o de G6P, activadores alostéricos de la GS.

Se tiene bien documentado el aumento en la tasa glucolítica de la retina cuando se inhibe su metabolismo aerobio (efecto Pasteur)(Winkler 2003^a). Es probable que en presencia de los inhibidores del metabolismo oxidativo (KCN y antimicina A), la retina aumente el flujo glucolítico utilizando el suministro externo de glucosa y con esto las reservas de glucógeno quedarían intactas.

5.2 Efectos de la insulina en los niveles de glucógeno en la retina.

El conocimiento actual de la acción de la insulina se ha originado de estudios realizados en su mayoría en el músculo esquelético e hígado o en líneas celulares derivadas de éstos. Aunque en el cerebro y la retina se demostró la presencia de receptores de insulina su función se desconoce (Havrankova et al. , 1983; Rodríguez et al. , 1988). En el presente estudio se demostró que las retinas incubadas en presencia de insulina presentan un incremento en sus niveles de glucógeno y que este incremento fue inhibido por altas concentraciones de wortmanina (50 nM). La wortmanina inhibe específicamente a la PI3K (Saltiel y Khan, 2001). Las isozimas de la PI3K presentan diferente sensibilidad a la wortmanina; la PI3K-C2 β es inhibida por wortmanina con una IC₅₀ de 2 nM, la clase IA con una IC₅₀ de 10 a 30 nM, la PI3K-C2 α con una IC₅₀ de 420 nM mientras que la inhibición completa de la C2- γ requiere de 10 μ M de wortmanina (Furtado et al., 2002). Nuestros resultados sugieren que la vía de señalización de la insulina en la retina, involucra la acción de la PI3K probablemente de la clase IA. Resultados similares se observaron en hepatocitos en cultivo en los que una concentración similar de wortmanina inhibió la síntesis de glucógeno inducida por la insulina (Carlsen et al. , 1997). La PI3K lleva a la activación de la PDK-1 que a su vez inactiva a la GSK-3. La inactivación de la GSK-3 lleva a la desfosforilación de la GS y por tanto a la activación de la síntesis de glucógeno. Por otra parte, se ha observado que la PDK-1 fosforila a la PKC, por lo que en este trabajo se investigó el posible efecto en los niveles de glucógeno en la retina al activar o inhibir a la PKC y la PKA. Los resultados obtenidos sugieren que la PKC y la PKA no participan directamente en la regulación de los niveles de glucógeno en la retina de la rata. La glucógeno sintetasa también puede ser modulada por la proteína blanco de la rapamicina, la mTOR (Aspiazu et al. , 1996), y por medio de la activación de proteínas fosfatasa (Brady, 2001).

Estudios realizados por Von Gierke (1907) y Warren (1930) (citados en Sosula et al. , 1994), demostraron que durante la diabetes mellitus, algunos tejidos como músculo esquelético e hígado disminuyen sus niveles de glucógeno, mientras que otros como el riñón y la médula espinal lo acumulan. Este hallazgo indicó que durante la diabetes el metabolismo del glucógeno se encuentra alterado lo que llevó a sugerir que la acumulación patológica del glucógeno tiene un efecto deletéreo en las células. De acuerdo con esto, Sosula et al. (1972) encontraron un aumento de glucógeno en los capilares retinianos de ratas diabéticas y se ha observado una atrofia selectiva de estas células durante la diabetes no controlada. Las células del epitelio pigmentado del iris presentan de igual forma, una acumulación masiva de glucógeno durante la diabetes, y es bien conocida la condición atrofiada de estas células en pacientes diabéticos. Se ha demostrado por métodos histoquímicos (Sosula et al. , 1974) y bioquímicos (Coffe, 2000; Hernández, 2003) una acumulación de glucógeno en la retina de ratas a las que se les indujo la diabetes con estreptozotocina. En este estudio, se investigaron los niveles de glucógeno en la retina de ratas diabéticas a las que se les administró un tratamiento de dosis bajas de insulina. Aunque los niveles de glucosa en plasma se mantuvieron elevados en las ratas diabéticas tratadas con insulina, los niveles de glucógeno disminuyeron considerablemente en la retina y el riñón, órganos blanco de la diabetes. El tratamiento con insulina no tuvo ningún efecto en los niveles de glucógeno en el hígado y el EPR, mientras que en la corteza cerebral disminuyeron un 60% comparados con los de ratas no diabéticas.

En el hígado, durante la diabetes existe una mayor actividad en el metabolismo de las grasas, por lo que es posible que aumenten las concentraciones de ésteres de ácidos grasos, lo que llevaría a la activación de la G6Pasa (Mithieux y Zituon, 1996). Bajas concentraciones de G6P aunado a la presencia de glucagon en plasma serían responsables de la disminución de los niveles de glucógeno. Efectivamente, se ha demostrado que la hiperglucemia *per se* aumenta los niveles de RNA_m y

proteína de la G6Pasa en forma independiente de insulina (Massillon et al. , 1996; Argaud et al. , 1997) lo que puede explicar nuestros resultados.

A diferencia del hígado, en la retina y el riñón, los niveles de glucógeno aumentan durante la diabetes. Una posible causa sería un aumento en la captura y fosforilación de la glucosa, no obstante, Vilchis y Salceda (1996b) demostraron que por el contrario, hay un ligero descenso en la acumulación del análogo de la glucosa, la 2-desoxiglucosa, en la retina de ratas diabéticas. Sin embargo, la G6P en las células no sólo proviene de la glucosa extracelular sino que también puede ser sintetizada a partir de sustratos gluconeogénicos tales como el lactato, piruvato y una amplia gama de aminoácidos; en este sentido, se ha demostrado la presencia de las enzimas de la gluconeogénesis en retina (Goldman y Witkovsky, 1987) y cerebro (Schmoll et al. , 1997). Se ha demostrado que en la retina, los niveles de aminoácidos libres están disminuidos (Vilchis y Salceda, 1996a), lo cual sugiere que una parte de la poza de aminoácidos en la retina diabética es dirigida a la vía gluconeogénica. En la retina y el cerebro, la ausencia de G6Pasa participaría en la acumulación de G6P y por tanto de glucógeno.

En el riñón se tiene bien documentada su actividad gluconogénica, y un posible aumento en los niveles de ésteres de ácidos grasos podría inhibir a la G6Pasa (Mithieux y Zituon 1996), lo que llevaría a la acumulación de G6P y a su vez de glucógeno.

En la corteza cerebral, los niveles de glucógeno durante la diabetes no se modificaron; sin embargo en las ratas diabéticas tratadas con insulina los niveles de glucógeno fueron aún menores que los observados en ratas normales, mientras que en el EPR los niveles de glucógeno no se modificaron en las ratas diabéticas o diabéticas tratadas con insulina.

Se tiene documentado que la insulina inhibe la transcripción de los genes de proteínas clave en la vía gluconeogénica (Saltiel y Khan, 2001), reduciendo los niveles de G6P lo cual podría explicar la disminución de los niveles de glucógeno en retina, riñón y corteza cerebral de ratas diabéticas tratadas con insulina. Estos

resultados evidencian la alta capacidad gluconeogénica del cerebro. El reestablecimiento de los niveles de glucógeno en la retina sólo por periodos cortos de diabetes (20 días) sugiere que la hiperglucemia es un factor determinante en las complicaciones causada por la diabetes, provocando un efecto a largo plazo de forma independiente a las acciones de la insulina.

Aunque se ha demostrado la presencia de la insulina y sus receptores en la retina (Rodríguez et al. , 1988) su función se desconoce. Si bien la retina normal responde a insulina incrementando los niveles de glucógeno, el aumento de estos en la retina de ratas diabéticas así como su disminución cuando se administra insulina, son contrarios a la cascada de señalización causada por la insulina, lo cual sugiere que esta vía está alterada durante la diabetes.

Se requiere una variedad de estudios para esclarecer la función de la insulina en la retina y su relación con la retinopatía diabética.

6. CONCLUSIONES.

- En ausencia de glucosa, el contenido de glucógeno en la retina *in vitro* disminuye, lo cual sugiere que este funciona como reserva energética.
- El contenido de glucógeno en la retina, al igual que en otros tejidos, está regulado por los niveles de G6P y ATP.
- Los niveles de glucógeno en la retina son regulados por la presencia de insulina; este efecto parece ser mediado por la acción de la PI3K y no parece involucrar la acción de la PKA ni la PKC.
- La retina de ratas diabéticas presenta niveles de glucógeno tres veces mayores que los de ratas normales. El tratamiento de dosis bajas de insulina a las ratas diabéticas causó una disminución significativa en los niveles de glucógeno, efecto que solo se observó a tiempos cortos de establecida la diabetes. Los cambios observados en los niveles de glucógeno en la retina *in vivo* son resultado de los diversos efectos metabólicos causados por la insulina.

BIBLIOGRAFIA.

Adler, R. y Faber, D. 1986. The retina: a model for cell biology studies. Academic Press Inc. USA.

Alonso, M. , Lomako, J. , Lomako, W. , Whelan, W. 1995. A new look at the biogenesis of glycogen. *FASEB J.* 9: 1126-1137.

Allaman, I. , Lengacher, S. , Magistretti, P. , Pellerin, L. 2003. A_{2B} receptor activation promotes glycogen synthesis in astrocytes through modulation of gene expression. *Am. J. Physiol Cell Physiol.* 284: C696-C704.

Ames III, A. , Li, Y. , Heher, E. C. , Kimble, C. 1992. Energy metabolism of rabbit retina as related to function: High cost of Na⁺ transport. *J. Neurosci.* 12: 840-853.

Argaud, D. , Kirby, T. , Newgard, C. , Lange, A. 1997. Stimulation of glucose-6-phosphatase gene expression by glucose and fructose-2,6-bisphosphate. *J. Biol. Chem.* 272: 12854-12861.

Armstrong, J. , Bonavaud, S. , Toole, B. , Yeaman, S. 2001. Regulation of glycogen synthesis by amino acids in cultured human muscle cells. *J. Biol. Chem.* 276: 952-956.

Azpiazu, I. , Saltiel, A. , DePaoli-Roach, A. , Lawrence, C. (1996) Regulation of both glycogen synthase and PHAS-I by insulin in rat skeletal muscle involves mitogen activated protein kinase independent and rapamycin-sensitive pathways. *J. Biol. Chem.* 271: 5033-5039.

Barber, A. 2003. A new view of diabetic retinopathy: a neurodegenerative disease of the eye. *Prog. Neuro-Psicho & Biol. Psich.* 27: 283-290

Berman, E. 1991. *Biochemistry of the Eye*, Plenum Press New York.

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

Brown, A., 1989. Sensory Processes. En *Textbook of physiology: excitable cells and neurophysiology* (Patton, H., Fuchs, A. , Hille, B. Scher, A. , Steiner, R. eds) W B Sanders Company. Vol 1

Bui, B. , Kalloniatis, M. , Vingrys, A. 2003. The contribution of glycolytic and oxidative pathways to retinal photoreceptors function. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44: 2708-2715.

Campbell, N. 1990. *Biology*. The Benjamin/Cummings publishing company. USA

Cataldo, A. , Broadwell, R. 1986. Cytochemical identification of cerebral glycogen and glucose-6-phosphatase activity under normal and experimental conditions: Neurons and glia. *J. Elect. Micros. Tech.*, 3: 413-437.

Carlsen, J. , Christiansen, K. , Vinten, J. 1997. Insulin stimulated glycogen synthesis in isolated rat hepatocytes: effect of protein kinase inhibitors. *Cell. Signal.* 9: 447-450.

Clarke, D. , Sokoloff, L. 1994. Circulation and energy metabolism of the brain. En *Basic Neurochemistry* (Siegel, G. , Agranoff, B. , Albers, W. Molinoff, P. ed.) Raven Press USA.

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

Das, A. , Pansky, B. , Budd, G. , Kollartis C. 1984. Immunocytochemistry of mouse and human retina with antisera to insulin and S-100 protein. *Curr. Eye Res.* 3, 1397-1403

Das, A. , Pansky, B. , Budd, G. Reid, T. 1991. Human retinoblastoma Y79 cells contain both insulin- specific mRNA and insulin-binding sites. *Neurosci. Lett.* 121, 231-233.

Della Sala, S. , Bertoni, G. , Somazzi, L. , Stubbe, F. , Wilkins, A. 1985. Impaired contrast sensitivity in diabetic patients with and without retinopathy: a new technique for rapid assessment. *Br. J. Ophthalmol.* 69: 136-142.

Díaz-Cintra, R. , Aguilar, A. , Cintra, L. 1995. Los receptores sensoriales. En *Neurobiología de los sistemas sensoriales.* (Meza G. ed) UNAM. México.

Dowling, J. E. 1968. Synaptic organization of the frog retina: an electron microscopic analysis comparing the retinas of frogs and primates. *Proc. R. Soc. Lond. (Biol.)* 170: 205-228.

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

Dringen, R. , Gebhardt, R. , Hamprecht, B. , 1993. Glycogen in astrocytes: possible function as lactate supply for neighboring cells. *Brain Res.,* 623: 208-214.

Fariña, J. 1990. Anatomía Patológica, Salvat. España.

Fliesler, S. , Richards, M. , Miller, C-Y, McKay, S. , Winkler, B. 1997. In vitro metabolic competence of the frog retina: effects of glucose and oxygen deprivation. *Exp. Eye Res.* 64: 683-692.

Furtado, M. , Somwar, R. , Sweeney, G. , Niu, W. , Klip, A. 2002. Activation of the glucose transporter GLUT4 by insulin. *Biochem. Cell. Biol.* 80: 569-578.

Ganong W. 1995. Review of medical physiology. Appleton & Lange USA

Goldman, S. y Witkovsky P. 1987. Evidence for gluconeogenesis in the amphibian retina. *Exp. Eye Res.* 44: 65-71.

Guyton, A. 1988. Fisiología Humana. Interamericana. México.

Hamai, M. , Minokoshi, Y. , Shimazu T. 1999. L-glutamate and insulin enhance glycogen synthesis in cultured astrocytes from the rat brain through different intracellular mechanisms. *J. Neurochem.* 73: 400-407

Harris, R. 1999. Metabolismo glucídico I: Principales rutas metabólicas y su control. En Bioquímica (Devlin, T. Ed). Reverté España.

Havarankova, J. , Roth, J. , Brownstein, M. 1978. Insulin receptors are widely distributed in the central nervous system of the rat. *Nature* 272: 827-829.

Hendry, S., Hsiao, S., Brown, C. 1999. Fundamentals of sensory Systems. En Fundamental Neuroscience (Zigmond, M. , Bloom, F. , Landis, S. , Roberts, J. , Squire, L. eds) pp.657-670 Academic Press USA.

Herly, D. , Phillips, J. , Berry, M. 1996. Supression of glycolisis is associated with an increase in glucose cycling in hepatocytes from diabetic rats. *J. Biol. Chem.* 271: 11268-11271.

Hernández, J. 2003. Niveles de glucógeno y actividad de las enzimas de su síntesis y degradación en la retina de la rata durante la diabetes experimental. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias UNAM.

Hole, J.,1993. Human anatomy & physiology. WMC Brown Publishers USA.

Hsu, S. , Molday, R. , 1994 Glucose metabolism in photoreceptor outer segment. *J. Biol. Chem.* 269: 17954-17959.

Inoue, N. , Matsukado, Y. , Goto, S. , Miamoto, E. 1987. Localization of glycogen synthase in brain. *J. Neurochem.* 50: 400-405.

Jacob, S. , Ashworth- Francone C. , Lossow, W. 1982. Anatomia y fisiología humana. Interamericana. México.

Kandel, E. Schwartz, J. , Jessell, T. 2001. Principios de neurociencia. McGraw-Hill Interamericana España.

Khan, B. (1998) Type 2 diabetes: When insulin secretion fails to compensate for insulin resistance. *Cell* 92: 593-596.

Kuwabara, T. y Cogan, D. 1961. Retinal glycogen. *Arch. Ophtalmol.* 66: 680-688.

Le Roith, D. , Zick, Y. (2001) Recent advances in our understanding of insulin action and insulin resistance. *Diabetes Care* 24: 588-597.

Lieth, E. , Barber, A. , Xu, B. 1998. Glial reactivity and impaired glutamate metabolism in short-term experimental diabetic retinopathy. *Diabetes* 47: 815-820.

Lieth, E. , Gardner, T. Barber, A. , Antonetti, D. 2000. Retinal neurodegeneration: early pathology in diabetes. *Clin. Exp. Ophthalmol.* 28:3-8.

Lorenzi, M. , Gerhardinger, C. (2001) Early cellular and molecular changes induced by diabetes in the retina. *Diabetologia.* 44: 791-804.

Lomako, J. Lomako, W. M. , Whelan, W. , Dombro, R. S. , Neary, J. T. , Norenberg, M. D. 1993. Glycogen synthesis in the astrocyte: from glycogenin to proglycogen to glycogen. *FASEB J.* 7: 1386-1393.

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

Magalhães, M. y Coimbra, A. 1970. Electron microscope radioautographic study of glycogen synthesis in the rabbit retina. *J. Cell. Biol.* 47: 263-275.

Magistretti, P. J. , Pellerin, L. , Douglas, L. , Rothman, R. 1999. Energy on demand. *Science*, 283: 496-497.

Magistretti, P.J. 2003. Brain Energy Metabolism. En *Fundamental Neuroscience* (Zigmond, M. , Bloom, F. , Landis, S. , Roberts, J. , Squire, L. eds) Academic Press USA. pp. 339-360.

Magistretti, P.J. , Sorg, O. , Martin, J. (1993). Regulation of glycogen metabolism in astrocytes: physiological, pharmacological, and pathological aspects. *En "Astrocytes Pharmacology and Function"* (S. Murphy ed.) pp 243-265. Academic Press Inc USA.

Marmor, M. , 1998. Structure, function, and disease of the retinal pigment epithelium: function and disease. Oxford University. New York.

Massillon, D. , Barzilai, N. , Chen, W. , Meizhu, H. , Rossetti, L. 1996. Glucose regulates *in vivo* glucose-6-phosphatase gene expression in the liver of diabetic rats. *J. Biol. Chem.* 271: 9871-9874.

Mathews C. van Holde K. Ahern, K. 2000. Biochemistry. Addison Wesley USA.

Matthews, 1998. Neurobiology: Molecules, cells and systems, Black well Science USA.

McKenna, M. , Sonnewald, U. , Huang, X. , Stevenson, J. , Zielke, R. 1996. Exogenous glutamate concentration regulates the metabolic fate of glutamate in astrocytes. *J. Neurochem.* 66: 386-393.

Meisenberg, G. , Simmons, W. 1998. Medical Biochemistry. Mosby USA.

Miller, T. , Garnache, A. , Cruz, J. , McPherson, K. , Wolleben C. (1986) Regulation of glycogen metabolism in primary cultures of rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 261: 785-790.

Mithieux, G. y Zituon, C. 1996. Mechanism by which fatty-acyl-CoA esters inhibit or activate glucose-6-phosphatase in intact and detergent-treated rat liver microsomes. *Eur. J. Biochem.* 235: 799-803.

Niemeyer G. 2001. Retinal research using the perfused mammalian eye. *Prog. Ret. Eye Res.* 20: 289-318.

Nordlie, R. Foster, J. , Lange, A. 1999. Regulation of glucose production by the liver. *Annu. Rev. Nutr.* 19: 379-406.

Nystrom, F. y Quon, M. 1999. Insulin signalling: metabolic pathways and mechanism for specificity. *Cell signal.* 11: 563-574.

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 *Anat. Anz.* (Abst).

Panskey, B. , Allen, D. , Budd, C. 1988. Review of neuroscience. Mcmillan publishing company. USA

Pellerin, L. , Magistretti, PJ. (1994) Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91: 10625-10629.

Pérez-León J. , Salceda, R. (1998) El proceso visual en invertebrados y vertebrados. En *Biología funcional de los animales* (Fanjul, M. Hiriart, M. , Fernández de Miguel, F. Eds). Siglo veintiuno editores México.

Pérez-Tamayo, R. 1987. Introducción a la patología. Médica-Panamericana. México.

Pessin, J. , Thurmond, D. , Elmendorf, J. , Coker, K. , Okada, S. 1999. Molecular basis of insulin-stimulated GLUT4 vesicle trafficking. Location! Location! Location! *J. Biol. Chem.* 274: 2593-2596.

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

Phelps, C. , 1972. Barbiturate-induced glycogen accumulation in brain: an electron microscopic study. *Brain Res.* 39: 225-234.

Poitry-Yamate, C.L. , Poitry, S. , Tsacopoulos, M. 1995. Lactate released by Müller glial cells is metabolized by photoreceptors from mammalian retina. *J. Neurosc.* 15: 5179-5191.

Poitry-Yamate, C.L. , Tsacopoulos, M. 1991. Glial Müller cells take up and phosphorylate (H^3)2-deoxy-D-glucose in a mammalian retina. *Neurosci. Lett.* 122:241-244.

Poitry-Yamate, C. y Tsacopoulos, M. 1992. Glucose metabolism in freshly isolated Müller glial cells from a mammalian retina. *J. Comp. Neurology* 320: 257-266.

Pulido, J. , 2002. Retina choroids and vitreus. Mosby, USA.

Quach, T. Rose, C. , Schwartz J. 1978. [H^3]Glycogen hydrolysis in brain slices: responses to neurotransmitters and modulation of noradrenaline receptors. *J. Neurochem.* 30: 1335-1341.

Quach, T. Duchemin, A. , Rose, C. , Schwartz J. 1980. ^3H -glycogen hydrolysis elicited by histamine in mouse brain slices: selective involvement of H_1 receptors. *Mol. Pharmacol.* 17:301-308.

Quach, T. , Duchemin, A. Rose, C. , Schwartz J. 1982. Glycogenolysis induced by serotonin in brain: identification of a new class of receptor. *Nature* 298:373-375.

Rawn, D. 1989. Bioquímica. McGraw Hill-Interamericana. España.

Reid, R. 1999. Vision. En *Fundamental Neuroscience* (Zigmond, M. , Bloom, F. , Landis, S. , Roberts, J. , Squire, L. eds) pp.821-851. Academic Press USA.

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

Reitner, Ch. , Gardner, T. 2003. Functions of insulin receptor signaling in retina: possible implications for diabetic retinopathy. *Prog Ret Eye Res.* 22: 545-562.

Ripps, H. y Witkovsky, P. 1985. Neuron-glia interaction in the brain and retina. *Prog. Retinal Res.* 4: 181-219.

Roach, P. (2002) Glycogen and its metabolism. *Curr Mol. Med.*, 2: 133-152

Robbins, S. y Kumar, V. 1990. Patología humana. McGraw-Hill-Interamericana México.

Rodríguez, M. , Waldbilling, R. , Rajagopalan, S. , Hackett, J. , LeRoith, D. , Chader, G. 1988. Retinal insulin receptors: localization using a polyclonal anti-insulin receptor antibody. *Brain Res.* 443: 389-394.

Rodríguez, T. , Alvarez, B. , Busquets, S. , Carbó, N. , López-Soriano, F. , Argilés, J. 1997. The increased skeletal muscle protein turnover of the streptozotocin diabetic rats is associated with high concentrations of branched-chain amino acids. *Biochem. Mol. Med.* 61: 87-94

Roufail, E. , Soulis, T. , Boel, E. , Cooper, M. , Rees, S. 1998. Depletion of nitric oxide synthase-containing neurons in the diabetic retina: reversal by aminoguanidine. *Diabetologia* 41: 1419-1425.

Rungger-Brändle, E. , Kolb, H. , Niemeyer, G. 1996. Histochemical demonstration of glycogen in neurons of the cat retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 37: 702-715.

Saari, J. Metabolismo y fotoquímica de la retina. En Adler fisiología del ojo. Aplicación clínica (Moses, R. , Hart, W. Ed) Médica Panamericana, Argentina.

Salceda, R. 1995. Procesamiento de la información visual: transmisión central. En Neurobiología de los sistemas sensoriales (Meza, G. Ed) UNAM. México.

Salceda, R. , Vilchis, C. , Cofee, V. y Hernández-Muñoz R. 1998. Changes in the redox state in the retina and brain during the onset of diabetes in rats. *Neurochem. Res.* 23: 893-897.

Saltiel, A. , Pessin, J. 2002 Insulin signaling pathways in time and space. *Trends in cell biology.* 12: 65-71.

Saltiel, A. Kahn, R. 2001. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*. 414:799-806.

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

Schmoll, D. , Middleditch, C. , Cesar, M. , Jungermann, K. , Hamprecht, B. Burchell A. 1997. Gluconeogenic enzymes in the rat brain *Dev Neurosci*.

Schwartz, M. , Sipols, A. , Kahn, S. , Lattemann, D. , Taborsky Jr. G. , Bergman, R.N. , Woods, S.C. , Porte Jr. D. 1990. Kinetics and specificity of insulin uptake from plasma into cerebrospinal fluid. *Am. J. Physiol.* 259, E378-E383.

Sone, H. , Kawakami, Y. , Okuda, Y. , Sekine, Y. , Honmura, S. , Matsuo, K. , Segawa, T. , Susuki, H. , Yamashita, K. 1997. Ocular vascular endothelial growth factor levels in diabetic rats are elevated before observable retinal proliferative changes. *Diabetologia* 40: 726-730.

Sosula, L. , Beaumont, P. , Hollows, F. , Jonson, K. , Hubert, L. (1974) Glycogen accumulation in retinal neurons and glial cells of streptozotocin -diabetics rats. *Diabetes*. 23:221-231.

Sosula, L. , Beaumont, P. , Hollows, F. , Jonson, K. 1972. Dilatation and endothelial proliferation of retinal capillaries in streptozotocin-diabetic rats: Quantitative electron microscopy. *Invest. Ophthalmol.* 11: 926-35.

Srivastava, A. , Pandey, S. 1998 Potential mechanism(s) involved in the regulation of glycogen synthesis by insulin. *Mol. Cell. Biochem.* 182: 135-141.

Standaert, M. , Bandyopadhyay, G. , Galloway, R. , Farese, R. 1996. Effects of phorbol esters on insulin-induced activation of phosphatidylinositol 3-kinase, glucose transport, and glycogen synthase in rat adipocytes. *FEBS Letters* 388: 26-28.

Sterling, P. 1998. Retina. En *The synaptic Organization of the Brain* (Shepherd G. ed.) Oxford University Press. USA. pp 205-253

Stryer, L. 1995. *Bioquímica*. Reverte. España

Swanson, R. y Choi, D. 1993. Glial glycogen stores affect neuronal survival during glucose deprivation in vitro. *J.Cereb. blood flow and metab.* 13:162-169.

Swanson, R. , Yu, A. , Chan, P. , Sharp, F. 1990. Glutamate increases glycogen content and reduces glucose utilization in primary astrocyte culture. *J. Neurochem.* 54: 490-496.

Swanson R. , Morton, M. , Sagar, S. Sharp, F. 1992. Sensory stimulation induces local cerebral glycogenolysis- demonstrating by autoradiography. *Neuroscience* 51:451-461

Tsacopoulos, M. , Magistretti, P. J. 1996. Metabolic coupling between glia and neurons. *J. Neurosci. Res.* 16: 877-885.

Vilchis, C. , Salceda R. 1996a. Effect of diabetes on levels of putative amino acids neurotransmitters in rat retina and retinal pigment epithelium. *Neurochem. Res.* 21:1167-71.

Vilchis, C. , Salceda, R. 1996b. Characterization of [2-3H]deoxy-D-glucose uptake in retina and retinal pigment epithelium of normal and diabetic rats. *Neurochem. Int.* 28: 213-219.

Voet, D. , Voet, J. 1995. *Biochemistry*. John Wiley & Sons. USA.

Wang, L. , Kondo, M. , Bill, A. 1997 Glucose metabolism in cat outer retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 38: 48-

Wäslle, H. , Boycott, B. 1991 Functional architecture of the mammalian retina. *Physiol. Rev.* 71(2)

Wender, R. , Brown, A. , Fern, R. , Swanson, R. , Farrell, K. , Ransom, B. 2000. Astrocytic glycogen influences axon function and survival during glucose deprivation in central white matter. *J. Neuroscience* 20: 6804-6810.

Whikehart, D. ,1994. *Biochemistry of the eye*. Butterworth-Heinemann USA.

Wiesinger, H. , Hamprecht, B. , Dringen, R. 1997. Metabolic pathways for glucose in astrocytes. *Glia* 21: 22-34.

Winkler, B. , Sauer, M. , Starnes, C. 2003a. Modulation of the Pasteur effect in retinal cells: implications for understanding compensatory metabolic mechanism. *Exp. Eye Res.* 76: 715-723.

Winkler, B.S. , Pourcho, R. , Starnes, C. , Slocum, J. , Slocum, N. 2003b Metabolic mapping in mammalian retina: a biochemical and ³H-2-deoxiglucose autoradiographic study. *Exp Eye Res.* 77:327-337.

Winkler, B.S. 1989. Retinal aerobic glycolysis revisited. *Invest.Ophthalmol. Vis. Sci.* 30: 1023.

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

Young-Choi I. , Seaquist, E. , Gruetter, R. 2003. Effect of hypoglycemia on brain glycogen metabolism in vivo. *J. Neuroscience Res.* 72: 25-32

Zeevalk, G. , Nicklas, W. 2000. Lactate prevents the alterations in tissue amino acids, decline in ATP, and cell damage due to aglycemia in retina. *J. Neurochem.* 75: 1027-1034.