



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

## ESTUDIO DE POSIBLES ALTERACIONES OXIDATIVAS DURANTE LA DIABETES EXPERIMENTAL EN LA RETINA DE LA RATA.

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
B I Ó L O G A  
P R E S E N T A :  
C L A U D I A A R A C E L I  
H E R N Á N D E Z E S P I N O S A

DIRECTOR DE TESIS:  
DRA. ROCÍO SALCEDA SACANELLES



2005



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

Estudio de posibles alteraciones oxidativas  
durante la diabetes experimental en la retina de  
la rata

Claudia Araceli Hernández Espinosa



Por fin, según el cable, la semana pasada la Tortuga llegó a la meta.

En rueda de prensa declaró modestamente que siempre temió perder, pues su contrincante le pisó todo el tiempo los talones.

En efecto, una diezmiltrillonésima de segundo después, como una flecha y maldiciendo a Zenón de Elea, llegó Aquiles.

Augusto Monterroso  
La Oveja Negra y demás fábulas



Este trabajo fue apoyado por el programa de Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, UNAM, proyecto No. IN204000-3.





# Agradecimientos

Hubo un largo camino para llegar a esta página, la última, la más conmovedora y la que todos leen. Involucradas en el trecho están algunas personas, a quienes más que enlistar, brindo un agradecimiento profundo y sincero por ser parte de mi vida e incluyo un abrazo para cada uno de los mencionados. Para empezar, a mis padres, gracias por la información genética y por todo lo demás.

A mi ma, por las mitocondrias, tu tenacidad y amor. A mi tía, gracias, por patrocinar la Fundación de apoyo a sobrinos en apuros y por tu gran espíritu. También gracias al resto de los Espinosa dispersados. Gracias, con todo el amor que puede salir de mi ser a Cin (mi hermana favorita) y a Paco (mi hermano favorito), por su maravillosa existencia. A Karlita, mi hermana por elección.

A Manuel y a Claudia por dirigirme hacia este camino.

A Tziran, gracias.

A mis amigos de la Fac., Bernardo, Vania, Erika, Aijo y Eugenia, e incluidos en este grupo van dos sujetos particularmente extraños: Adrianus y Enriquebo, amigos en todo momento. Gracias impulsivamente.

A quien es el que es (en tres dimensiones) no-gracias por tus letras, por ser y estar.

De *La Ciencia en tu escuela*, a las maestras Angélica, Lorena y Leticia, a sus alumnos y a Rafa por tu amistad. A la AMC por la beca.

A Fernando, por todo el apoyo y la opinión.

A mis amigas de siempre: Ana Laura y Paty.

A mis maravillosos amigos del laboratorio: Biólogos Luisillo, Ismaelo, Cecilia, Miguelito y Jethro; a C.D. Shirley, por el corte histológico de la retina y a Naty por su ayuda. A todos gracias por el trabajo, la convivencia y porque a los locos hay que tratarlos con cariño.

Al Biól. Gustavo Sánchez Chávez por su asistencia técnica. También por tus soluciones fáciles a problemas complejos, tu locura y tus pasteles deliciosos.

A Félix Sierra, a la Sra. Sara y al MVZ Héctor Malagón por su apoyo durante el tratamiento de los animales.

A los revisores de este trabajo, Dr. Julio Morán, Dr. Mauricio Díaz, Dra. Ma. Eugenia Gonsebatt y Dra. Rocío Cruz.

Definitivamente este trabajo no sería posible sin la tutela de la Dra. Rocío Salceda, gracias por su confianza, su tiempo y finita paciencia.

A los chicos de la Casita de la Ciencia y de Universum. También a los de la Dante, por las porras.

A Luis, por tus figuras y dibujos que engalanan esta tesis y por entrar en el proyecto.

# Contenido

<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>XI</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>XIII</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>EL OJO DE LOS VERTEBRADOS.....</b>	<b>3</b>
ANATOMÍA .....	3
ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LA RETINA.....	5
<i>Fototransducción</i> .....	7
<i>Metabolismo</i> .....	10
ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DEL EPR.....	13
<i>Metabolismo</i> .....	14
<b>REGULACIÓN DE LA GLUCEMIA.....</b>	<b>17</b>
MECANISMO DE ACCIÓN DE LA INSULINA .....	18
<b>DIABETES MELLITUS .....</b>	<b>21</b>
RETINOPATÍA DIABÉTICA .....	22
RADICALES LIBRES Y RETINOPATÍA DIABÉTICA.....	25
<i>Lipoperoxidación</i> .....	27
<b>HIPÓTESIS.....</b>	<b>31</b>
<b>OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>33</b>
<b>OBJETIVOS PARTICULARES.....</b>	<b>33</b>
<b>MÉTODOS.....</b>	<b>35</b>
REACTIVOS.....	35
ANIMALES .....	35
DETECCIÓN DE DIENOS CONJUGADOS.....	35
DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS .....	36
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>37</b>
MODELO DE DIABETES MELLITUS.....	37
DETERMINACIÓN DE DIENOS CONJUGADOS .....	38
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>43</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>49</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>51</b>

# Lista de abreviaturas

ATP	Adenosín trifosfato
CCG	Capa de células ganglionares
CNE	Capa nuclear externa
CNI	Capa nuclear interna
CSE	Capa sináptica externa
CSI	Capa sináptica interna
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EPR	Epitelio pigmentario de la retina
ERG	Electrorretinograma
GDP	Guanosín monofosfato
GMPc	Guanosín monofosfato cíclico
GTP	Guanosín trifosfato
ins	insulina
IR	Receptor de insulina
IRS	Substrato del receptor de insulina
PC	Fosfatidilcolina
PDE	Fosfodiesterasa de GMPc
PE	Fosfatidiletanolamina
PI3-K	Fosfatidilinositol 3 cinasa
PS	Fosfatidilserina
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SE	Segmento externo
SI	Segmento interno
SOD	Superóxido dismutasa
STZ	Estreptozotocina



# Resumen

Durante la diabetes mellitus aparecen alteraciones microvasculares especialmente en los nervios periféricos, el riñón y la retina. En la retinopatía diabética se ha demostrado que además del daño al sistema vascular se presentan alteraciones en las neuronas y en la glia retinianas, y se postula que estos trastornos son causados por el estrés oxidativo. Con el objeto de identificar si el estrés oxidativo es capaz de inducir alguna de estas alteraciones, en este trabajo se analizó la lipoperoxidación como un indicador de estrés oxidativo en la retina y otros tejidos que se afectan durante la diabetes a través de la determinación de dienos conjugados. Los niveles de lipoperoxidación se estudiaron en ratas control, tratadas con estreptozotocina (STZ) (diabéticas) y diabéticas a las que se administraron dosis bajas de insulina. Las ratas diabéticas presentaron hiperglucemia desde el día siguiente al tratamiento con STZ y no presentaron aumento en el peso corporal y el tratamiento con insulina no disminuyó los niveles de glucosa en el plasma de las ratas diabéticas. Los resultados obtenidos indican que la lipoperoxidación no aumenta significativamente en los tejidos estudiados sino hasta los 45 días de inducida la diabetes, niveles que disminuyen con el tratamiento de insulina. La lipoperoxidación observada en la retina de animales diabéticos es un indicador de estrés oxidativo, el cual aparentemente es causado por la falta de insulina y no sólo por la hiperglucemia.

# Introducción

La actividad humana depende en gran medida de la capacidad visual de los individuos. Por diversas causas, el número de débiles visuales y ciegos en la población mundial está aumentando, lo que lleva a problemas sociales y económicos relevantes, particularmente en los países en desarrollo. Ante esta situación, la Organización Mundial de la Salud y el Organismo Internacional de Prevención de la Ceguera, conjuntamente organizaron en 1999 un proyecto llamado *Visión 20/20: el derecho a ver*, con el objetivo de eliminar las principales causas de ceguera adquirida prevenibles (World Health Organization, 2005).

El proceso visual inicia en la retina, tejido nervioso que se localiza en el interior del ojo de los vertebrados. Las alteraciones en este tejido pueden causar desde problemas visuales tenues hasta ceguera. Dentro de las patologías retinianas que pueden producir ceguera están la retinitis pigmentosa, la degeneración macular (Liang y Godley, 2003), el glaucoma y la retinopatía diabética (Davis, 1988; Frank, 1995). Ésta última, es la primera causa de ceguera en México y se presenta en pacientes con diabetes mellitus después de algunos años de diagnosticada la enfermedad. En el informe anual de la Secretaría de Salud (Secretaría de Salud, 2004) se estimó que en la población adulta mexicana existen alrededor de 5 millones de enfermos de diabetes mellitus, de los cuales se espera que el 4.5% presentará ceguera como última consecuencia de la retinopatía diabética (Hernández Ávila y Olaíz Fernández, 2002).

Existe una larga lista de trabajos concernientes a la retinopatía diabética, tanto clínicos (Davis, 1988; Frank, 1995) como experimentales (Lorenzi y Gerhardinger, 2001; Kowluru, 2002; Barber, 2003). La retinopatía diabética es una enfermedad muy bien caracterizada en cuanto a sus manifestaciones vasculares, tales como la disminución del flujo sanguíneo, microangiopatía y edema; en otros estudios, se demostró que además de las células vasculares retinianas, también las neuronas de la retina se encuentran dañadas y presentan cambios en su

metabolismo (Salceda et al, 1998; Baynes y Thorpe, 1999; Lorenzi y Gerhardinger, 2001). Conocer las causas que llevan a estas alteraciones será importante tanto para conocer la fisiología de la retina, como para evitar el daño y/o reestablecer la actividad visual de los individuos.

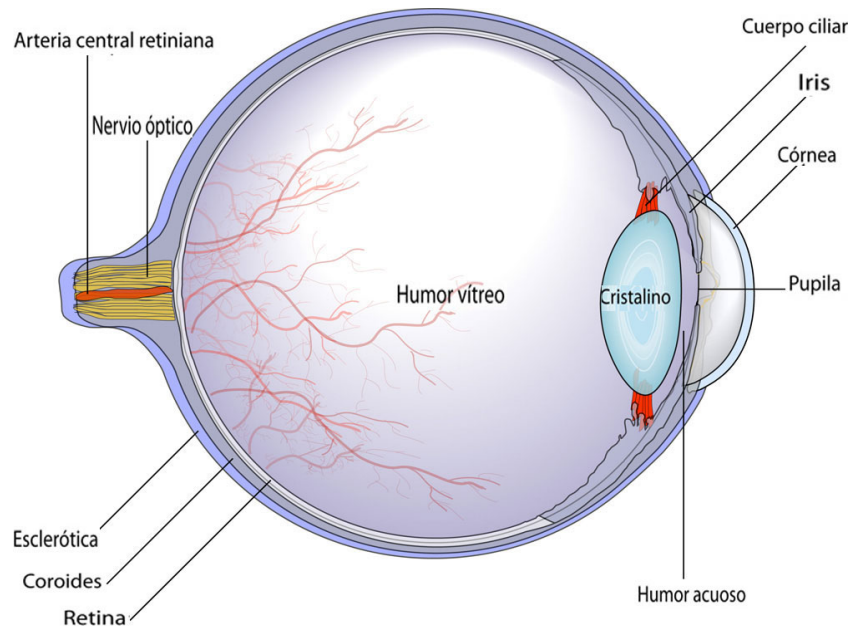


# El ojo de los vertebrados

El ojo es el aparato en el que se lleva a cabo el primer paso en el proceso visual, en él se forman las imágenes que posteriormente serán transmitidas al cerebro.

## **Anatomía**

En todos los grupos de vertebrados, el ojo presenta la misma estructura general, consta de tres capas o tunicas concéntricas: esclerótica, vascular (coroides) y neural (retina) (Fig.1).



La capa más externa del ojo es la esclerótica, es blanca, opaca y densa,

Fig. 1. Esquema del ojo de mamíferos donde se muestran las estructuras de las que está formado.

proporciona soporte y protección al globo ocular y es el sitio de inserción de los seis músculos oculares. Está compuesta por tejido conjuntivo, colágeno y fibras elásticas; en la superficie se encuentran pequeños vasos sanguíneos y nervios

que la penetran hasta alcanzar las estructuras internas. La esclerótica está cubierta por un epitelio continuo del tipo estratificado escamoso, el cual forma una mucosa llamada conjuntiva, ésta ayuda a mantener el ojo humectado. En la parte anterior del globo ocular cambia el arreglo y tipo de las fibras de colágena, lo que resulta en una capa totalmente transparente: la córnea, a través de la cual entran los haces de luz al ojo. Esta capa es avascular y carece de conjuntiva, por lo que obtiene el oxígeno y nutrimentos necesarios de las lágrimas que fluyen por su superficie (Martin, 1996; Campbell, 1999).

En la parte media del ojo, se encuentra la capa vascular o coroides, en esta capa hay una extensa red de capilares en los que se transporta oxígeno y nutrimentos hacia la retina. La parte anterior de la coroides forma el iris y el cuerpo ciliar. El iris está formado por células pigmentadas, vasos sanguíneos y dos capas concéntricas de músculo liso, una capa es de fibras musculares radiales y la otra de fibras musculares circulares, que al contraerse selectivamente funcionan como un diafragma y forman la pupila, por medio de este mecanismo se regula la cantidad de luz que entra al ojo. Alrededor del iris se encuentra el cuerpo ciliar que consiste en ligamentos suspensores, músculos y procesos ciliares (Martin, 1996; Campbell, 1999).

Una vez que la luz pasa a través de la córnea y la pupila, cruza el cristalino, cuya función es concentrar los rayos luminosos hacia la retina al igual que una lente convergente; para lograr una imagen nítida, el cristalino cambia la forma de su superficie por acción del cuerpo ciliar que también lo sostiene (Kuszak, 2004). El cristalino es transparente, asimétrico y esferoide. Se encuentra rodeado por una cápsula porosa y delgada de elastina, colágena y mucopolisacáridos. Las unidades básicas de su estructura son fibras derivadas de células epiteliales; éstas se encuentran en una monocapa en la que se distinguen diferentes poblaciones (según su grado de diferenciación) ordenadas concéntricamente: células del polo anterior, células que rodean al polo anterior, las células que están en la fase de diferenciación localizadas en la zona ecuatorial y las fibras diferenciadas las cuales no presentan núcleo ni organelos y contienen cristalinas, las cuales representan el 90% de las proteínas totales. Entre las fibras existe una

alta concentración de uniones comunicantes. El cristalino carece de vasos, por lo que depende del tejido periférico para obtener sus nutrimentos y eliminar los productos de desecho (Spector, 1991; Kuszak, 2004). En cuanto a su contenido lipídico, posee gran cantidad de colesterol y esfingomiélin y niveles bajos de ácidos grasos poli-insaturados (Berman, 1991).

El interior del ojo se encuentra dividido en dos cámaras: la cámara anterior (entre el iris y la córnea) y la cámara posterior (entre el iris y el fondo del ojo). La cámara anterior contiene al humor acuoso que es secretado por el cuerpo ciliar y funciona como un medio de transporte de nutrimentos y desechos. La cámara posterior es más grande, guarda al humor vítreo y al cristalino. El humor vítreo tiene consistencia gelatinosa y ayuda a mantener la forma del ojo, protege de los impactos y brinda sostén a los tejidos que lo rodean además de acumular productos del metabolismo de la retina y del cristalino (Martin, 1996, Campbell, 1999).

Finalmente, los rayos de luz que entran a través de la pupila proyectan una imagen en el fondo del ojo y esta imagen es transducida a estímulos nerviosos en la capa neural: la retina (Martin, 1996; Campbell, 1999).

### ***Estructura y función de la retina***

La retina es la capa más interna del ojo, se encuentra entre la coroides y el humor vítreo. Está formada por varios estratos de células nerviosas comunicadas en circuitos y una capa de células epiteliales (epitelio pigmentario de la retina) en contacto con la coroides (Fig. 2).

Las neuronas son de seis tipos: fotorreceptores, células bipolares, horizontales, amacrinas, interplexiformes y ganglionares; las cuales están organizadas en cinco capas: capa nuclear externa (formada por los somas de los fotorreceptores), capa sináptica externa, capa nuclear interna (donde se encuentran los somas de las células bipolares, horizontales, amacrinas e interplexiformes), capa sináptica interna y capa de células ganglionares (Fig. 2). Inmediata al epitelio pigmentario de la retina (EPR) se encuentra la capa de los fotorreceptores, de los que existen dos tipos: conos y bastones; ambos están

formados por una terminal sináptica, un segmento interno (SI) que contiene al núcleo y a las mitocondrias, en él se realiza la mayor parte del metabolismo celular; el segmento externo (SE) conectado por medio de un cilio al SI y en contacto con en el EPR. El SE está formado por cientos de discos membranosos apilados, donde se lleva a cabo la fototransducción. En la capa sináptica externa, las terminales sinápticas de los conos y los bastones hacen sinapsis con las células bipolares, horizontales e interplexiformes. En la capa sináptica interna hacen sinapsis las células bipolares, amacrinas, interplexiformes y ganglionares. Las células ganglionares se encuentran en el límite interno de la retina, sus axones convergen en el disco óptico y forman el nervio óptico que sale del globo ocular hacia el cerebro (Farber y Adler, 1986).

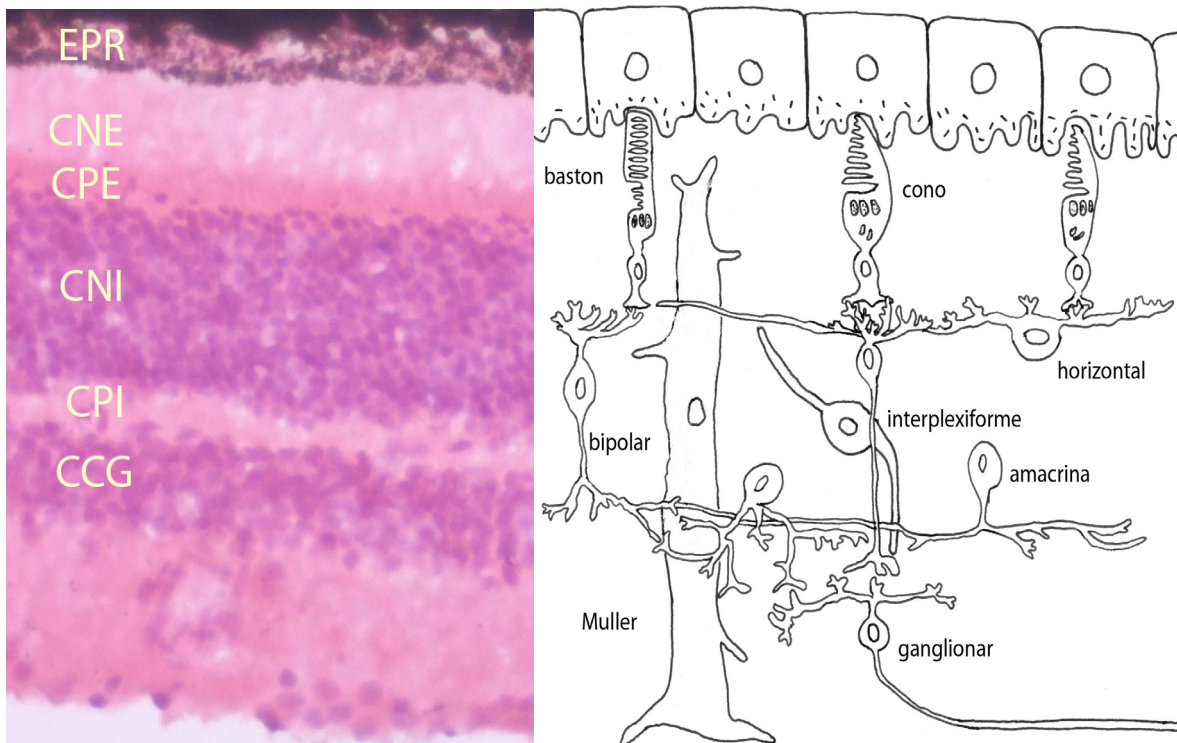


Fig. 2. Tipos celulares de la retina y sus conexiones. Derecha: Corte histológico de la retina. Izquierda: Esquema de la retina. C coroides; EPR, epitelio pigmentario de la retina; CNE, capa nuclear externa; CPE, capa plexiforme externa; CNI, capa nuclear interna; CPI, capa plexiforme interna; CG, capa de células ganglionares.

En la retina existen dos tipos de células gliales: las células de Müller y los astrocitos. Los somas de las células de Müller se localizan en la capa nuclear interna, sus procesos se extienden en toda la retina desde la membrana limitante externa donde hacen contacto con los SI de los fotorreceptores, hasta la membrana limitante interna que aísla a la retina del humor vítreo (Berman, 1991). Mientras que los astrocitos están confinados a la capa de las células ganglionares y al nervio óptico.

En algunos vertebrados, la retina externa recibe el suministro sanguíneo a través de los vasos de la coroides, y las capas internas son irrigadas por los vasos sanguíneos provenientes de la arteria central retiniana que desde el fondo del globo ocular se ramifica en forma radial y hacia la periferia (Guyton y Hall, 1996).

### **Fototransducción**

La fototransducción es el proceso por el que se convierte la energía luminosa en un impulso nervioso (Kandel et al, 1991) (Fig. 3).

Los fotorreceptores son las células especializadas en la fototransducción. En los discos membranosos de los SE se encuentra la rodopsina, la cual está formada por la opsina, proteína que consta de siete segmentos transmembranales y está unida covalentemente al cromóforo 11-cis-retinal (O'Brien, 1982).

En la oscuridad, la membrana plasmática de los fotorreceptores presenta un potencial de alrededor de -40mV (Kandel et al, 1991). Éste se debe a la entrada de  $\text{Na}^+$  al SE a través de un canal catiónico ( $\text{Na}^+$  o  $\text{Ca}^{2+}$ ) dependiente de guanósil monofosfato cíclico (GMPC), este flujo de iones es llamado corriente oscura. El  $\text{Na}^+$  que entra al SE fluye hacia el SI en donde es transportado hacia el exterior de la célula por la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  (O'Brien, 1982; Kandel et al, 1991).

Cuando la luz llega a los fotorreceptores el cromóforo de la rodopsina absorbe un fotón y se isomeriza rápidamente a la forma todo-trans retinal y es reducido a todo-trans retinol (vitamina A), el cual es transportado al epitelio pigmentario de la retina (EPR) donde es esterificado e isomerizado a 11-cis retinol que regresa al SE (Young y Bok, 1979).

La transformación de 11-cis retinal a todo-trans retinol lleva a la activación de la rodopsina, que a su vez interactúa con la proteína transducina. La

transducina es una proteína G formada por tres subunidades ( $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ). En la oscuridad la transducina se encuentra unida al GDP, y en presencia de luz, la transducina se une transitoriamente a la rodopsina activada, lo cual causa un intercambio de GDP por GTP y hace que la subunidad  $\alpha$  de la transducina se disocie de las subunidades  $\beta$  y  $\gamma$ . El complejo subunidad  $\alpha$ -GTP es la señal que activa a la fosfodiesterasa (PDE) de GMPC, enzima efectora que hidroliza GMPC en GMP. La disminución de los niveles de GMPC en el citoplasma tiene como resultado el cierre de los canales catiónicos y en consecuencia, la hiperpolarización de la membrana plasmática (O'Brien, 1982; Kandel et al, 1991).

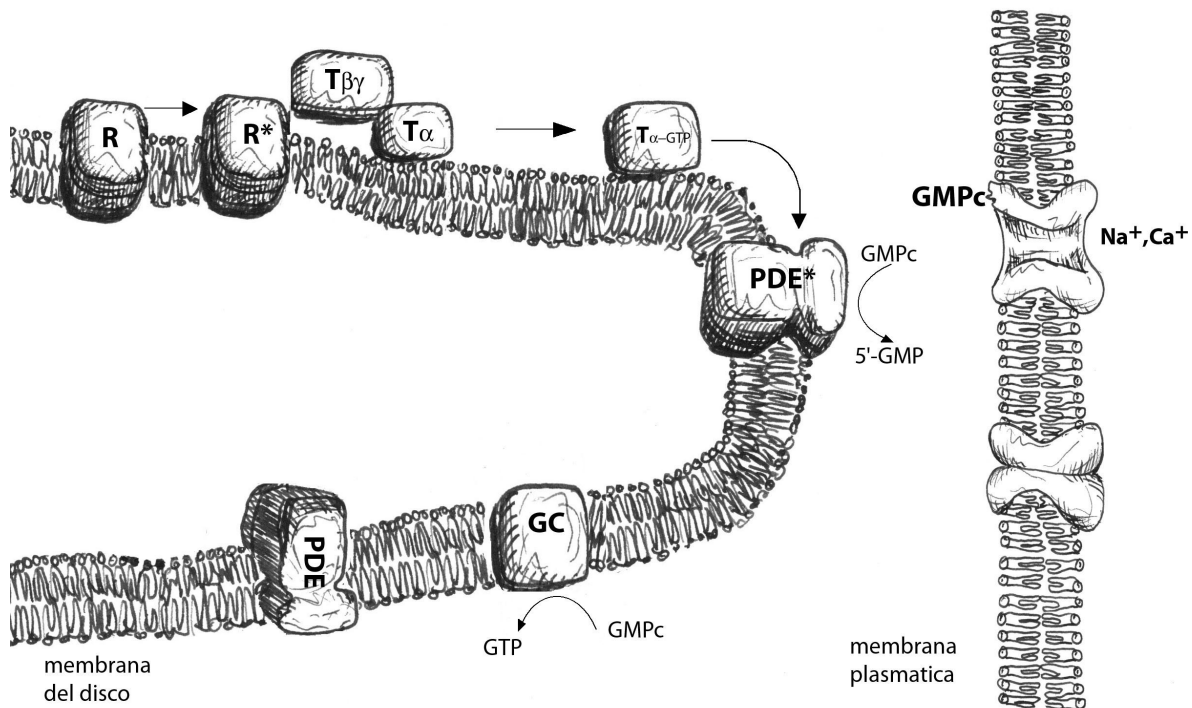


Fig. 3 Fototransducción. R, rodopsina; R\* Rodopsina activada, T, transducina; PDE, fosfodiesterasa; T $\alpha$ -GTP, complejo subunidad  $\alpha$ -GTP; GC, guanilato ciclasa.

El proceso de la fototransducción tiene un alto requerimiento de ATP para la síntesis de GMPC por la guanilato ciclasa, así como para mantener la actividad de la ATPasa Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>.



## Metabolismo

La retina, presenta un alto consumo de O<sub>2</sub> (Tabla 1), su tasa de respiración es la mayor de entre todos los tejidos y es sensible al efecto Pasteur (Berman, 1991).

**Tabla 1. Comparación en el consumo de O<sub>2</sub> de algunos tejidos**

Tejido	Consumo de O <sub>2</sub>
	(O <sub>2</sub> /mg tejido seco/hora)
Retina	31.0
Cristalino	0.5
Corteza cerebral	21.0
Hígado	12.0

(Berman, 1991)

La retina también tiene una alta tasa de glucólisis tanto aeróbica como anaeróbica, produce lactato activamente y es el tejido con mayor tasa de oxidación de glucosa *in vitro* (Young y Bok, 1979; Berman, 1991).

La retina posee moléculas y mecanismos que equilibran la producción de radicales libres, como:  $\alpha$ -tocoferol, ácido ascórbico, catalasa, superóxido dismutasa (SOD), glutatión y glutatión peroxidasa (Berman, 1991).

En cuanto a su composición química, en la retina los lípidos representan el 2.74% del peso del tejido, de los cuales más de la mitad son fosfolípidos (Tabla 2).



**Tabla 2. Proporción de los principales componentes químicos de la retina**

	% del peso del tejido
Agua	80.6
Proteínas	7.7
DNA	0.79
Lípidos totales	2.74
Fosfolípidos	1.67

(Berman, 1979)

Los lípidos son un grupo de sustancias solubles en solventes polares e insolubles en agua. En cuanto a los ácidos grasos, sus características principales están determinadas por el largo de la cadena, el grado de insaturación (número de dobles enlaces) y el tipo de grupos sustituyentes. Los ácidos grasos saturados son moléculas altamente flexibles que pueden tomar conformaciones muy diversas, en los lípidos con ácidos grasos poli-insaturados la fluidez aumenta de acuerdo con el grado de insaturación (Voet y Voet, 1995).

En un análisis más detallado sobre la cuantificación y distribución de los lípidos en la retina, se obtuvo que éstos representan alrededor del 20% del peso seco del tejido, del cual, el 12% se encuentra en la capa nuclear externa, del 20 al 25% en los fotorreceptores y 34% en los axones de las células ganglionares. La mayoría de los lípidos son fosfolípidos (65-75%) y el resto son: colesterol, diglicéridos, triacilglicéridos, ácidos grasos libres y esfingolípidos (Tabla 3). Los principales ácidos grasos saturados son el ácido palmítico (16:0) y el estereárico (18:0). De todos los tejidos, la retina tiene el mayor contenido de ácidos grasos insaturados de los cuales aproximadamente el 60% son poli-insaturados (Tabla 4). Los SE de los fotorreceptores contienen la mayor cantidad de fosfolípidos en la retina y son ricos en ácidos grasos poli-insaturados (Berman, 1991).

**Tabla 3. Principales fosfolípidos de la retina de la rata**

Fosfolípidos	mol% del total de fosfolípidos
Fosfatidilcolina	43.7
Fosfoetanolamina	32.3
Fosfatidilserina	11
Fosfatidilinositol	4.3
Esfingomielina	3.8

(Berman, 1991)

**Tabla 4.- Principales ácidos grasos en la retina completa y en los segmentos externos de los bastones**

Ácidos grasos	Retina completa			Segmentos externos de los bastones		
	PC	PE	PS	PC	PE	PS
Ácido mirístico (14:0)	0.3	-	-	0.9	0.2	-
Ácido palmítico (16:0)	36.5	8.6	2.2	29.5	5.9	2.5
Ácido palmitoléico (16:1)	-	-	0.5	1.0	0.3	-
Ácido esteárico (18:0)	27.9	38.7	37.6	11.7	29.3	29.1
Ácido oléico (18:1)	13.8	1.8	2.2	8.3	3.2	1.9
Ácido linoléico (18:2)	0.5	0.1	0.2	0.8	0.6	-
(20:2)	-	-	-	0.8	0.8	0.4
(20:3)	0.8	-	-	-	-	-
Ác. Araquidónico (20:4)	3.3	7.6	2.4	3.4	2.9	1.9
(22:3)	0.2	1.1	3.4	-	0.2	-
(22:4)	-	-	-	3.2	1.1	-
(22:5)	-	-	0.8	-	-	-
(22:6)	29.2	42.2	50.0	38.4	54.8	61.8

%mol

PC fosfatidilcolina, PE fosfoetanolamina, PS fosfatidilserina

(Berman, 1991)

## ***Estructura y función del EPR***

El EPR se localiza entre los SE de los fotorreceptores y la coroides, está compuesto por una capa de células cúbicas, cuyas membranas apicales se encuentran en contacto a través de uniones estrechas, lo que les confiere propiedades específicas relacionadas con el paso de moléculas de la coroides hacia las neuronas de la retina, es decir, el EPR constituye una parte importante de la barrera hematoretiniana (BHR) (Do Carmo et al, 1998 )

Las células del EPR (Fig. 4) en su parte apical, presentan microvellosidades que envuelven parcialmente a los SE de los fotorreceptores, en esta región de la célula se encuentra la mayor concentración de gránulos de melanina. La melanina puede actuar como un estabilizador de radicales libres y fijación de algunas toxinas. En el citoplasma de las células también se encuentran gotas de retinol y fagosomas que contienen las membranas fagocitadas de los fotorreceptores (Clark, 1986; Berman, 1979).

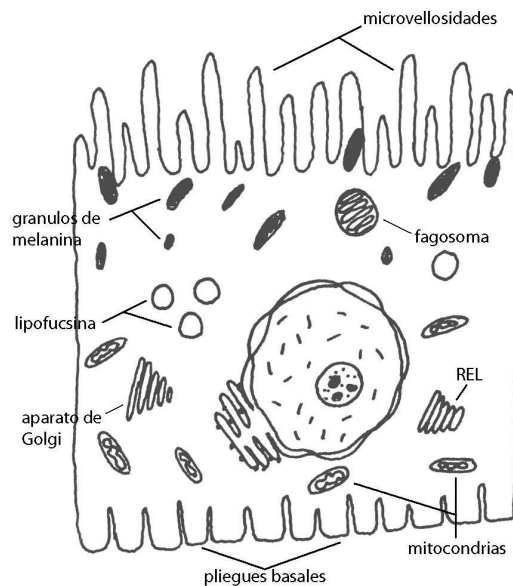


Fig. 4. Célula del epitelio pigmentario de la retina (EPR). Retículo endoplásmico liso (REL) Basado en Berman (1991).

La lámina basal de las células del EPR o membrana de Bruch, está formada principalmente por una red de fibras de colágena y es permeable a moléculas pequeñas y a algunas macromoléculas.

El EPR cumple con numerosas funciones de gran importancia para el desempeño adecuado del proceso visual. Participa en el control de la dispersión y absorción de la luz, en la adhesión de la retina por medio de la secreción de la matriz del espacio subretiniano y participa en el intercambio de nutrientes y desechos entre los SE de los fotorreceptores y la coroides. Dentro de las funciones que realiza el EPR, destacan la fagocitosis y degradación de las membranas de los SE de los fotorreceptores y el metabolismo de retinoides necesarios en la fototransducción (Berman, 1991). El proceso de fagocitosis es necesario para el mantenimiento de los fotorreceptores y la renovación de los SE. En mamíferos, cada célula del EPR es capaz de procesar diariamente 300 extremos de SE que contienen aproximadamente 30000 discos cada uno. Estas membranas son degradadas oxidativamente en los fagosomas de las células del EPR y cualquier anomalía durante el proceso pone en alto riesgo la viabilidad de los fotorreceptores (Hoppe et al, 2004). Cuando la fagocitosis de los SE no se lleva a cabo correctamente, los fotorreceptores continúan reemplazando sus membranas, lo que puede llevar a la acumulación de los SE en el espacio entre los fotorreceptores y el EPR (subretiniano), esto impide el paso de nutrientes del EPR a la retina y favorece el desprendimiento de la misma (Clark, 1986).

### **Metabolismo**

El EPR contiene una alta concentración de mitocondrias y un elevado metabolismo oxidativo. Al igual que la retina, el EPR, consume grandes cantidades de oxígeno (Young y Bok, 1979).

Las células del EPR contienen el 3% de su peso en lípidos, de los cuales aproximadamente el 50% son fosfolípidos (Tabla 5).

**Tabla 5. Composición química del EPR de bovino**

	% peso de tejido
Agua	81.4
Proteínas	8.1
DNA	0.72
Lípidos totales	3.0
Fosfolípidos	1.59

(Berman, 1979)

La fosfatidilcolina es el principal fosfolípido del EPR, al igual que en la retina (Tabla 6).

**Tabla 6. Principales fosfolípidos en las células del EPR de rata**

Fosfolípidos	%mol del total de fosfolípidos
Fosfatidilcolina	44.6
Fosfoetanolamina	23.2
Fosfatidilserina	5.8
Fosfatidilinositol	5.7
Esfingomielina	14.2

(Berman, 1991)

El EPR además de oxidar a los ácidos grasos en la mitocondria, los utiliza para esterificar el retinol. En las células del EPR el ácido graso más abundante es el ácido docosahexónico, seguido por los ácidos grasos saturados palmítico y esteárico, en cuanto a los insaturados la mayor proporción la presentan el oléico, el linoléico y el araquidónico (Berman, 1991).

En el EPR, el ácido araquidónico (20:4), se encuentra en concentraciones aun mayores que en la retina (Tabla 7).

**Tabla 7. Principales ácidos grasos en las células del EPR de bovino y el porcentaje en fosfatidilcolina (PC) y**

Ácidos grasos	%mol	PC		PE
		%/peso	%/peso	%/peso
Ác. Palmítico (16:0)	21.9	61.3	40.1	
Ác. Palmitoléico (16:1)	1.6	1.9	0.3	
Ác. Estearico (18:0)	22.9	17.0	20.1	
Ác. Oléico (18:1)	14.6	11.1	6.1	
Ác. Linoléico (18:2)	6.9	10.2	2.6	
Ác. Araquidónico (20:4)	19.1	2.5	11.4	
(22:6)	5.9	2.7	7.5	

(Berman, 1991)

# Regulación de la glucemia

Los carbohidratos son los elementos más abundantes de la alimentación y son los intermediarios principales entre la energía solar y las funciones celulares (Peña *et al*, 1988). La glucosa es una molécula precursora, capaz de proveer los esqueletos de carbono de muchos intermediarios metabólicos para las reacciones biosintéticas. Puede ser oxidada a piruvato por medio de glucólisis o por la vía de las pentosas fosfato o almacenada como glucógeno (Nelson y Cox, 2000).

A través del torrente sanguíneo la glucosa, como todos los monosacáridos, es absorbida en el intestino, vertida en la sangre y distribuida a los tejidos. La concentración de glucosa circulante es estrictamente regulada, en humanos se consideran normales los valores en el intervalo entre 60 y 90mgdl<sup>-1</sup> (4-7mM), este control se logra por el balance que existe entre la absorción de glucosa en el intestino, su almacenamiento y producción en el hígado y captación en el resto de los tejidos. En este proceso de regulación intervienen varias hormonas; la insulina, el glucagon y la adrenalina. (Peña *et al*, 1988; Nelson y Cox, 2000).

La adrenalina es secretada por las glándulas suprarrenales cuando la actividad de un individuo aumenta, los requerimientos energéticos de los tejidos se cubren cuando la adrenalina provoca un incremento en el ritmo cardíaco, la presión sanguínea y la frecuencia respiratoria. En el hígado, la adrenalina activa a la glucógeno fosforilasa e inhibe a la glucógeno sintasa; promueve la degradación anaeróbica del glucógeno en el músculo y en el páncreas estimula la secreción de glucagon e impide la de insulina (Nelson y Cox, 2000).

Por otro lado, en la etapa posprandial, los niveles de glucosa circulante disminuyen y por acción del glucagon son restaurados, éste es secretado por las células  $\alpha$  del páncreas. En el hígado, esta hormona favorece la gluconeogénesis, evita la glucólisis y permite exportar glucosa al flujo sanguíneo, además, el glucagon aumenta los niveles de glucosa sanguínea por medio de la inactivación

de la glucógeno sintasa y el aumento en la actividad de la glucógeno fosforilasa (al igual que la adrenalina).

En el caso opuesto, en el que la concentración de glucosa sanguínea aumenta, el páncreas incrementa la secreción de insulina al mismo tiempo que decrece la de glucagon.

La insulina secretada por las células  $\beta$ -pancreáticas estimula la captación de glucosa principalmente en el músculo y en el tejido adiposo. Al contrario de la adrenalina y el glucagon, la insulina activa la glucógeno sintasa e inhibe la glucógeno fosforilasa (Nelson y Cox, 2000).

### ***Mecanismo de acción de la insulina***

La insulina es la hormona anabólica de mayor importancia, promueve la síntesis y almacenamiento de carbohidratos, lípidos y proteínas mientras inhibe su degradación y liberación al torrente sanguíneo; estimula el transporte de glucosa, aminoácidos y ácidos grasos dentro de la célula, como factor trófico, la insulina estimula el crecimiento celular y la diferenciación (Saltiel y Kahn, 2001).

La insulina interactúa con la célula a través de su receptor (IR), perteneciente a la subfamilia de receptores del tipo de la cinasa de tirosina. Está formado por dos subunidades  $\alpha$  y dos subunidades  $\beta$ . La insulina se une al dímero  $\alpha$  y provoca un cambio conformacional que promueve la activación de las subunidades  $\beta$  y en consecuencia la autofosforilación del receptor. Se conocen varias proteínas sustrato del receptor de insulina, principalmente las proteínas sustrato del receptor de insulina (IRS), interactúan con la subunidad  $\beta$ , las cuales tienen numerosos sitios de fosforilación y funcionan como proteínas de anclaje para otras moléculas que participan en la señalización (Saltiel y Kahn, 2001).

El receptor de insulina se expresa en todas las capas de la retina y en las células endoteliales de sus vasos, éste es homólogo al expresado en el cerebro (Reiter, 2003; Reiter et al, 2003).



La retina responde a la insulina: el RI se fosforila después de administrar insulina al organismo (Kondo y Kahn, ), *in vitro* la presencia de insulina aumenta la síntesis de glucógeno (Luna Ulloa, 2004) y el transporte de D-Glucosa (Vilchis y Salceda, 1996).



# Diabetes mellitus

La diabetes mellitus es una enfermedad crónica que se caracteriza por la alteración en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas, es un padecimiento que va en aumento a nivel mundial (se estima que habrá 300 millones de diabéticos en 2025) y en México también ha alcanzado proporciones epidémicas, en 1955 fue la causa de 1 500 muertes y en el 2000 de más de 47 000 (Hernández Ávila y Olaíz Fernández, 2002).

En la diabetes no ocurre síntesis de insulina o ésta no puede ser utilizada de forma adecuada. Con base en estas características, en su etiología y tratamiento, se clasifica en dos formas: la tipo 1 es dependiente de insulina, debido a la ausencia de ésta, causada por la pérdida de las células  $\beta$ -pancreáticas. Esta destrucción puede ser desencadenada por una infección viral e inducir autoinmunidad hacia las células; se presenta generalmente en niños y adultos jóvenes. La diabetes tipo 2 se presenta de forma más común en adultos mayores de 40 años, en este caso la secreción basal de insulina puede ser normal o un poco baja, sin embargo, se presenta resistencia en el receptor de insulina; puede ser hereditaria y las observaciones apuntan a que es favorecida por la obesidad y una dieta alta en grasas y baja en carbohidratos (Mancillas Adame et al, 2002).

La característica común para ambos tipos de diabetes es el aumento en la concentración de glucosa en la sangre. La hiperglucemia es generalmente controlada en la diabetes tipo 1 con la administración de insulina exógena y con hipoglucemiantes en la diabetes tipo 2.

Cuando la falta de insulina es severa o su acción no es apropiada, como en la diabetes tipo 2, hay fallas en la síntesis de ácidos grasos a partir de carbohidratos o aminoácidos, provocando aumento en la tasa de oxidación de grasas y en la formación de cuerpos cetónicos, lo que lleva a la pérdida de peso (Nelson y Cox, 2000). Asimismo, el metabolismo de la glucosa cambia, la vía de

los polialcoholes aumenta en respuesta a la hiperglucemia y se observa una mayor producción de sorbitol.

Como resultado de las anomalías metabólicas en la diabetes puede presentarse la unión no enzimática de glucosa a proteínas por medio de la reacción de Amadori. Algunas proteínas que forman estos conjugados son: la hemoglobina, la ATPasa  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ , la colágena y las cristalinas (Baynes y Thorpe, 1999).

Desde etapas tempranas de la diabetes hay anomalías en el flujo sanguíneo y aumento en la permeabilidad vascular. La actividad de agentes vasodilatadores disminuye y la de los vasoconstrictores aumenta, como en el caso de la angiotensina II y la endotelina-1. Con el tiempo ocurre la pérdida de células vasculares, decrece la producción de factores tróficos de las células endoteliales, se presenta una oclusión progresiva de los capilares y hay sobreproducción de la matriz extracelular. En conjunto, estos cambios llevan a edema, isquemia e hipoxia, los cuales inducen proteinuria, neovascularización en la retina (retinopatía), degeneración de los nervios periféricos (neuropatía) y en el riñón expansión de la matriz mesangial y glomeruloesclerosis (nefropatía) (Brownlee, 2001).

### ***Retinopatía diabética***

La retinopatía diabética es una de las tres principales complicaciones a largo plazo en pacientes diabéticos; en México causa entre 12 000 y 24 000 casos de ceguera cada año (Hernández Ávila y Olaíz Fernández, 2002).

La retinopatía diabética puede ser de tipo proliferativo o no proliferativo. En ambas el resultado es la ceguera. En la retinopatía diabética no proliferativa la primera manifestación es un aumento en la permeabilidad vascular a causa del rompimiento de la BHR. Típicamente, lo siguiente es la aparición de microaneurismas y la oclusión de capilares. El principal mecanismo causal de la ceguera es el adelgazamiento de la retina en el centro de la mácula en consecuencia del edema (Davis, 1988).

En la retinopatía diabética proliferativa también se observa un aumento importante en la permeabilidad de los capilares, aunado a la pérdida de células endoteliales y de pericitos. La pérdida de los capilares provoca isquemia, proliferación de vasos sanguíneos y de tejido fibroso en la superficie de la retina. Estos nuevos vasos sanguíneos son más débiles de lo normal, rozan con el humor vítreo y causan hemorragias con lo que surgen problemas de visibilidad y eventualmente el desprendimiento de la retina (Frank, 1985; Davis, 1988).

Aunque la retinopatía diabética es una enfermedad fundamentalmente vascular, se ha demostrado que ocurren alteraciones fisiológicas y bioquímicas en las neuronas retinianas. El electroretinograma (ERG) de pacientes diabéticos aun sin alteraciones vasculares en la retina, presenta los potenciales oscilatorios reducidos. La amplitud de la onda *b* generada por las células de Müller, decrece conforme la enfermedad avanza hasta desaparecer. Se presenta una deficiencia en la agudeza visual, especialmente en la discriminación del contraste azul-amarillo y en la visión nocturna (Doly et al, 1992; Lorenzi et al, 2001; Barber, 2003).

La incidencia de la retinopatía está relacionada con el tipo y la duración de la diabetes; en personas con diabetes tipo 1, se detectó retinopatía diabética sólo en el 13% después de 5 años y hasta el 90% entre los 10 y 15 años (Davis, 1988).

En pacientes a los que se diagnosticó diabetes mellitus después de 30 años de edad, se observó una relación proporcional entre la cantidad de hemoglobina glucosilada y el porcentaje de pacientes con retinopatía diabética. Estas observaciones muestran que existe una relación causal entre la hiperglucemia y la retinopatía y que el daño vascular en la retina aumenta con respecto al tiempo de diabetes. Algunos autores han señalado a la hiperglucemia como la causa principal de la retinopatía diabética, ya que desencadena alteraciones secundarias a su establecimiento (Brownlee, 2001; Kowluru y Kennedy 2001; Baynes y Thorpe, 1999).

Por otro lado, se ha estudiado extensivamente el efecto del tratamiento de insulina en los pacientes con diabetes tipo I sobre la retinopatía diabética; en general el tratamiento de insulina se administra proporcionalmente al peso del

individuo, pero existen otras formas de control, que básicamente se clasifican en tratamientos con bajas dosis de insulina y tratamientos intensivos de insulina (Davis, 1991; Reiter 2003). En estudios a largo plazo, se observa que el porcentaje de pacientes que desarrollan retinopatía diabética es significativamente menor en aquéllos que recibieron altas dosis de insulina (Reiter, 2003).

Existen diferentes modelos de diabetes en los que se estudia la retinopatía, los más utilizados son: en cuanto a diabetes tipo I, ratas tratadas con aloxan o con estreptozotocina (STZ) (Salceda et al, 1998) y para diabetes tipo II, ratas resistentes a insulina (Portha et al, 1991) y ratas o ratones galactosémicos (Kowluru, 2002). La STZ es una toxina transportada selectivamente por las células  $\beta$ -pancreáticas, y les provoca la muerte a través de dañar su DNA.

En estos modelos se ha comprobado que la hiperglucemia es suficiente para causar retinopatía diabética (Kowluru, 2002) y se reportó un aumento en la permeabilidad de la BHR a fluoresceína a los 8 días de inducida la diabetes con STZ (Do Carmo et al; 1998).

En ratas, se demostró un decremento en la amplitud del ERG a los cuatro meses de inducida la diabetes, la onda *a* disminuye 40% y la onda *b* 37%. Esta alteración en la funcionalidad de las neuronas esta directamente relacionada con la duración de la diabetes (Doly et al, 1992). Se observó en la retina un pequeño adelgazamiento en la retina interna después de pocas semanas de diabetes y una reducción muy marcada de la capa nuclear externa después de 24 semanas (Park et al, 2003).

La muerte apoptótica se comprobó en las células de la retina y en células endoteliales de ratas y pacientes que fueron diabéticos; el número de núcleos apoptóticos aumentó 10 veces en la retina de las ratas después de un mes de inducida la diabetes con STZ y hubo una disminución significativa en el número de células, ambas anomalías se redujeron con un tratamiento intensivo de insulina administrada subcutáneamente (Barber, 2003, Park et al, 2003). Otra demostración de apoptosis se realizó en ratas con ocho meses de inducida la diabetes, cuyas mitocondrias aisladas de su retina liberan citocromo c al

citoplasma al igual que en células vasculares retinianas incubadas con concentraciones altas de glucosa (Kowluru y Noor, 2003).

En la retina de ratas y ratones hiperglucémicos se observó un aumento en la actividad de la proteína cinasa C (PKC) y los niveles de óxido nítrico (NO), disminución de la concentración de transportadores de glucosa y aumento en la acumulación de sorbitol (Kowluru y Kennedy, 2001) Asimismo, la actividad de la catalasa y la superóxido dismutasa disminuyó en la retina de estos animales (Du et al, 2003).

### ***Radicales libres y retinopatía diabética***

Desde hace más de diez años, Feeney y Berman (Berman, 1991) predijeron la particular susceptibilidad de los tejidos oculares ante la toxicidad por el oxígeno, debido a sus características metabólicas y composición química.

En promedio, una persona consume 250g de oxígeno al día y de esto el 1-5% es convertido en especies reactivas de oxígeno (ROS). Un radical libre es cualquier átomo o molécula capaz de existir de forma independiente con uno o más electrones desapareados y en consecuencia es altamente reactiva. Las ROS son radicales basados en oxígeno como el superóxido, el radical hidroxilo, oxígeno singulete, ácido hipocloroso y ozono (Wiseman y Ridgway, 2000). Los tres primeros se forman *in vivo*, y junto con el óxido nítrico, están relacionados con más de 100 enfermedades, en las que aunque no son la causa esencial de la patología, son un componente importante en el desarrollo de la enfermedad debido a sus consecuencias sobre otras moléculas (Wiseman y Ridgway, 2000, Kowluru y Kennedy, 2001).

Las ROS son producidas por varias vías del metabolismo aeróbico, pero una de las fuentes principales de producción son las mitocondrias, cuyas proteínas, lípidos y ácidos nucleicos son blanco directo de estos radicales. Las mitocondrias dañadas por estrés oxidativo se convierten en disfuncionales y liberan mayor cantidad de ROS con una consecuente disminución en la síntesis de ATP (Liang et al, 2003).

El daño a lípidos, proteínas y ácidos nucleicos en la célula se refleja como peroxidación de lípidos, oxidación de proteínas, formación de compuestos carbonilados y/o alteración en la expresión genética. Cualquier célula en estas condiciones tendría dañada la membrana y desacoplados los sistemas enzimáticos. Lo anterior nos lleva a establecer una relación entre la generación de radicales libres y el daño celular como consecuencia del estrés oxidativo (Baynes y Thorpe 1999; Brownlee, 2001; Kowluru y Kennedy, 2001).

El estrés oxidativo se genera cuando existe un desequilibrio entre la producción de radicales libres y la de antioxidantes, éste puede ser causado porque la producción de radicales libres es exagerada y por lo tanto mayor que la de los mecanismos que los abaten, o porque la concentración de antioxidantes o sistemas enzimáticos disminuyan. Un antioxidante es cualquier sustancia que a bajas concentraciones, en comparación con el sustrato oxidable, previene o evita la oxidación del sustrato; donde los sustratos oxidables pueden ser proteínas, DNA, lípidos y carbohidratos (Wiseman y Ridgway, 2000).

Tanto la retina como el EPR están expuestos continuamente a la luz, lo que favorece la oxidación a causa de la foto-estimulación. Las ratas expuestas a la luz, muestran un aumento en la producción de radicales libres, lo que aunado a la elevada tensión de oxígeno y abundancia de ácidos grasos poli-insaturados, favorece la generación de estrés oxidativo (Hoppe, 2004). En el cristalino y en el humor vítreo los radicales libres también se generan por foto-oxidación, en reacciones que involucran a la riboflavina y al ascorbato, en ellas se consume  $O_2$ , se produce  $H_2O_2$  y ocasionalmente radicales hidroxilo (Spector, 1991).

En pacientes diabéticos y en modelos experimentales se demostró un incremento en el estrés oxidativo por lo que se considera como un posible responsable en el proceso de patogénesis de las complicaciones diabéticas (Baynes y Thorpe, 1999).

Como ya se mencionó, la retina posee una gran cantidad de ácidos grasos poli-insaturados y tiene la mayor tasa de respiración y consumo de oxígeno de todos los tejidos, lo que la hace susceptible a la generación de estrés oxidativo. En la retina se reportó una alta producción de radicales libres en comparación con



otros tejidos (Doly, 1992), así como mecanismos para regular estas moléculas: la presencia y actividad de enzimas como la catalasa, la superóxido dismutasa y la glutatión peroxidasa, la presencia de  $\alpha$ -tocoferol, ácido ascórbico y glutatión. En condiciones de diabetes, la producción de radicales libres en la retina aumenta y los mecanismos que los controlan se encuentran disminuidos en concentración o en actividad (Baynes y Thorpe, 1999; Kowluru y Kennedy, 2001). Un ejemplo de esto es un estudio en el que se comparó el ERG de ratas diabéticas con el de ratas diabéticas sometidas a un tratamiento basado en la administración de extractos de *Ginkgo Biloba* el cual contiene moléculas que funcionan como antioxidantes, incluyendo las vitaminas C y E. Las ratas diabéticas presentaron disminuidas las ondas *a* y *b* respecto del control y las tratadas con *Ginkgo Biloba* mostraron un ERG con la misma amplitud de las ondas *a* y *b* que el grupo control (Doly et al, 1992).

Asimismo en el EPR se demostró la formación de ROS cuando éste es expuesto a luz visible de alta intensidad, y como resultado de la fagocitosis de los SE (Liang et al, 2003). Cuando el EPR acumula productos oxidados, se inhibe el procesamiento interno de los SE, con lo que se obtienen más substratos oxidables y futuros generadores de estrés oxidativo (Hoppe et al, 2004).

### **Lipoperoxidación**

La lipoperoxidación es una reacción de oxidación que afecta a los ácidos grasos poli-insaturados. Es un proceso propagativo en el que se forman hidroperóxidos o peróxidos cíclicos y puede ser iniciada por los radicales hidroxilo ( $\text{OH}^\circ$ ), el radical hidropéroxilo ( $\text{HO}_2^\circ$ ) y por el oxígeno singulete ( $\text{O}_2^\circ$ ).

Tomando como ejemplo al ácido araquidónico (20:4) la reacción de lipoperoxidación es la siguiente (Zentella de Piña, 1994):

El ácido graso poli-insaturado pierde un átomo de hidrógeno de un metileno por efecto de alguna de las ROS (Fig. 6a), con lo que uno de los átomos de carbono queda con un electrón libre, es decir, forma un radical de ácido graso (Fig. 6b). En la cadena ocurre un cambio conformacional relativo al arreglo de los dobles enlaces que resulta en un dieno conjugado (Fig. 6c), capaz de reaccionar

con el oxígeno molecular y formar un radical lipoperoxilo (Fig. 6d). A continuación hay dos opciones, pueden formarse peróxidos cíclicos (Fig 6e1) o un hidroperóxido al tomar un hidrógeno de otro ácido graso (Fig. 6e2).

Los peróxidos cíclicos posteriormente podrían formar endoperóxidos cíclicos y dar lugar a prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos o degradarse a malondialdehído. En el caso de los hidroperóxidos, pueden iniciar esta cadena de reacciones sobre un ácido graso poli-insaturado vecino. En las membranas de las células, los hidroperóxidos lipídicos, favorecen la peroxidación de lípidos inducida por el ascorbato- $\text{Fe}^{2+}$ . En la superficie de las membranas plasmáticas, el  $\text{Fe}^{2+}$  reduce al hidroperóxido y da lugar a la formación del radical alcoxilo. Estos radicales pueden penetrar a la zona hidrofóbica de la bicapa de fosfolípidos y quitar un electrón a un ácido graso e iniciar la lipoperoxidación (Guajardo et al, 2002).

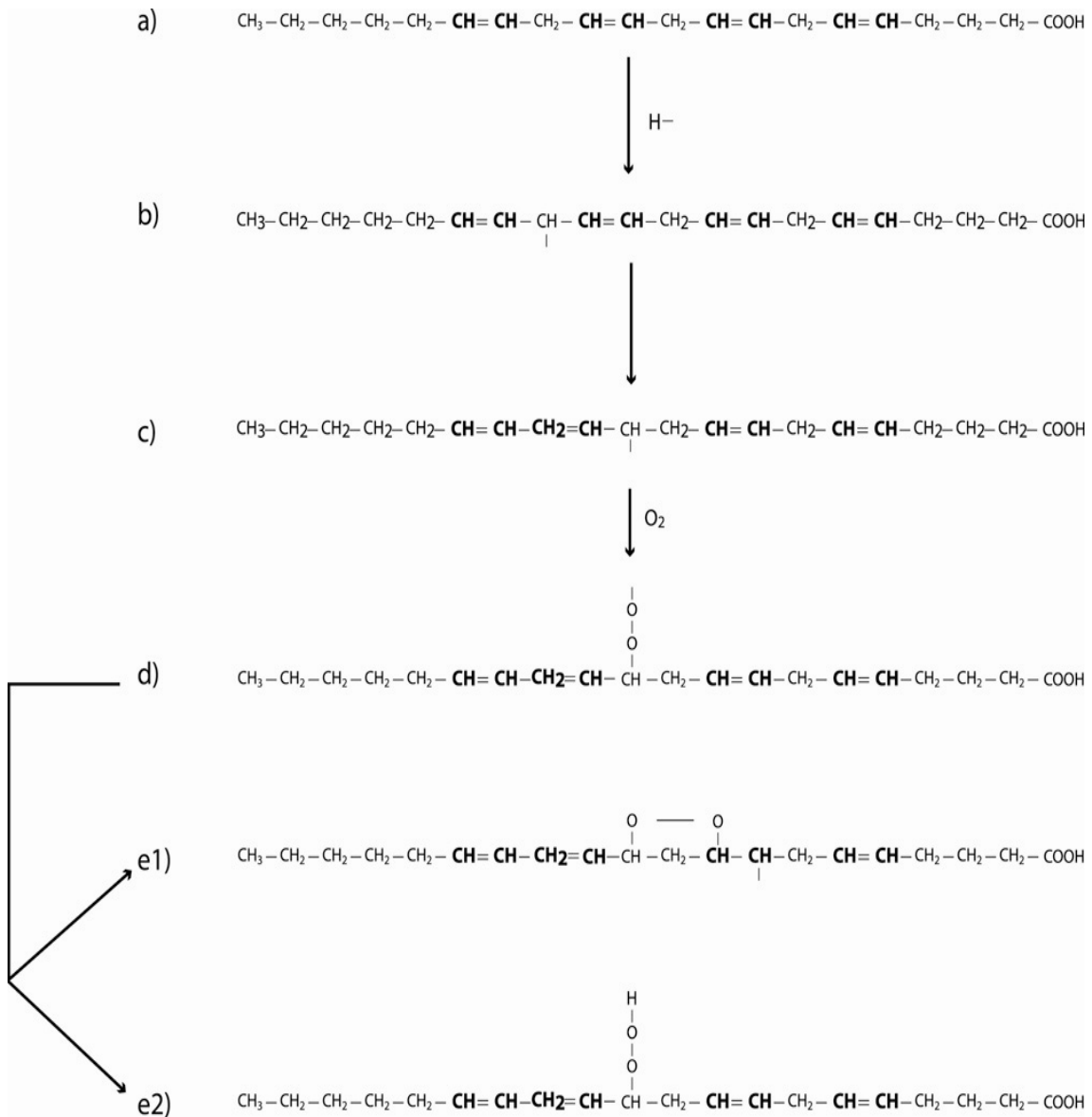


Figura 6. Serie de reacciones en la peroxidación del ácido araquidónico (20:4).  
Basado en Zentella de Piña (1994).

La susceptibilidad a la lipoperoxidación crece de acuerdo con el número de dobles enlaces. El cambio conformacional que se produce en los ácidos grasos por la formación de los hidroperóxidos es posible percibirlo espectrofotométricamente por su absorbancia a 233nm (Recknagel y Glende, 1984). La lipoperoxidación es considerada como el proceso de mayor importancia con respecto al daño membranal (Zentella de Piña et al, 1994).

La interrupción de la cadena de reacciones la pueden realizar el  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E) y el ácido ascórbico (vitamina C). Los hidroperóxidos pueden ser reducidos enzimáticamente por la glutatión peroxidasa dependiente de selenio y la glutatión S-transferasa (Berman, 1991).

Cuando los fosfolípidos de la membrana se peroxidan, ocurre una pérdida de ácidos grasos poli-insaturados, lo que produce disminución en la fluidez membranal y cambios estructurales considerables, los cuales provocan pérdidas en la actividad de enzimas y receptores de membrana (Wiseman y Ridgway, 2000).

En la diabetes mellitus tipo 1 se presenta hiperglucemia por falta de insulina y en la retina se observa estrés oxidativo. Los mecanismos que llevan a las alteraciones observadas en la retinopatía diabética se desconocen y existe una hipótesis que vincula a la hiperglucemia con la generación de estrés oxidativo. La propuesta es que la ausencia de insulina es parte del proceso que genera el estrés oxidativo durante la diabetes.

## **Hipótesis**

Los niveles de lipoperoxidación en la retina de ratas diabéticas aumentarán en función del tiempo de establecida la hiperglucemia y disminuirán con un tratamiento de bajas dosis de insulina.



## **Objetivo general**

Determinar el papel de la insulina en la generación de estrés oxidativo en la retina durante la diabetes mellitus.

## **Objetivos particulares**

1. Determinar los niveles de lipoperoxidación en la retina y el EPR de ratas control y diabéticas.
2. Evaluar el efecto de un tratamiento de insulina sobre estos niveles de lipoperoxidación.

# Métodos

## ***Reactivos***

Todos los reactivos son de grado analítico. La STZ, la insulina y la albúmina sérica bovina se adquirieron de Sigma Chemical Co. El cloroformo, el metanol y el ciclohexano son de J. T. Baker.

## ***Animales***

Se utilizaron ratas Long-Evans entre 170 y 200g de peso, con las que se formaron tres grupos: ratas control, ratas a las que se indujo diabetes por la administración intraperitoneal de estreptozotocina (STZ) ( $48 \text{ mgKg}^{-1}$  en amortiguador de citratos 0.05M, pH 4.5) por dos días consecutivos y ratas diabéticas tratadas con insulina, a estos animales se les suministró insulina subcutáneamente (5U) cada tercer día a partir del día siguiente a la administración de la STZ.

Durante el tratamiento se mantuvieron en un ciclo de 12 horas luz y 12 oscuridad sin restricción de agua o alimento.

Los animales se sacrificaron por decapitación, se enuclearon los ojos y se separó la copa óptica, de la que se aisló la retina, el epitelio pigmentario de la retina y el cristalino; simultáneamente se tomaron muestras de corteza cerebral frontal, riñón e hígado.

La concentración de glucosa en sangre se determinó con el medidor de glucemia Accu Check Active (Roche).

## ***Detección de dienos conjugados***

Los dienos conjugados se determinaron según el método de Recknagel y Glende (1984). Los tejidos se homogenizaron (vidrio-teflón) con 1ml de



amortiguador de fosfatos 0.1M pH 7.4. Los lípidos del homogenado se extrajeron de la siguiente manera: a 0.8ml del homogenado se le agregaron 5ml de una mezcla cloroformo:metanol 2:1, se agitó y centrifugó a 167G durante 10 minutos a 4°C. La fase orgánica (3ml) se evaporó en un baño seco a 45°C. Una vez evaporado, el remanente se disolvió en 1.5ml de ciclohexano y se determinó la absorbancia a 233nm en un espectrofotómetro Ultrospec II 4050 (LKB Biochrom Ltd), utilizando ciclohexano como blanco.

La concentración de dienos conjugados se determinó con base en el coeficiente de extinción molar:  $2.52 \times 10^{-4} \text{M}^{-1}$  (Recknagel y Glende, 1984).

### ***Determinación de proteínas***

La determinación de proteínas se realizó según el método de Lowry y colaboradores (1951), con el reactivo comercial DC Protein Assay (BioRad) utilizando albúmina sérica bovina como estándar. La absorbancia a 690nm se midió en un lector de microplacas CERES 900 UV (Bio-Tek).

# Resultados

## **Modelo de diabetes mellitus**

Las ratas a las que se les administró STZ presentaron concentraciones significativamente mayores de glucosa en la sangre con respecto al grupo control (Tabla 8) y se consideraron diabéticas (Tabla 9) únicamente cuando la concentración de glucosa en sangre al primer día de diabetes fue mayor a 300 mgdl<sup>-1</sup>. En estas ratas hiperglucémicas el peso corporal no se incrementó durante el tiempo del experimento.

**Tabla 8. Niveles de glucosa en sangre y peso corporal de las ratas control**

	<i>1er. día</i>	<i>20 días</i>	<i>45 días</i>
Peso corporal (g)	207.1±15	307±10.2	393±9.16
Glucosa (mgdl <sup>-1</sup> )	143.7±4.2	146±5.3	138±8.4

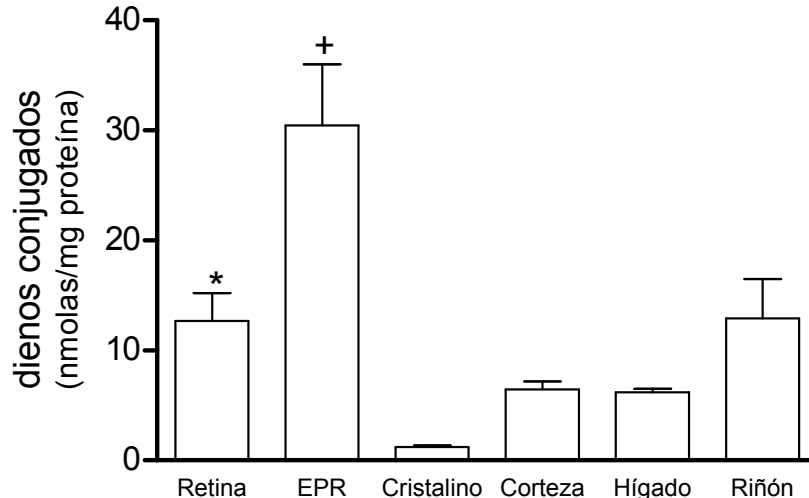
**Tabla 9. Peso corporal y niveles de glucemia en los dos grupos de ratas**

	<b>Días de tratamiento</b>			
	20 días	20 + ins	45 días	45 + ins
Peso corporal (g)	212.17±8.15	302.1±15.2	213±7.98	274.8±24.8
Glucosa (mgdl <sup>-1</sup> )	461.2±18.5	446±57	497.2±18.9	501.1±23.3

En las ratas diabéticas a las que se les administró insulina, la concentración de glucosa en la sangre no presentó cambios con respecto a las ratas diabéticas (Tabla 9). En cuanto al peso corporal, las ratas diabéticas tratadas con insulina durante 20 días, alcanzaron el mismo peso que el grupo control de 20 días; sin embargo, a los 45 días de establecida la hiperglucemia y el tratamiento de insulina, se observó menor ganancia de peso corporal.

### ***Determinación de dienos conjugados***

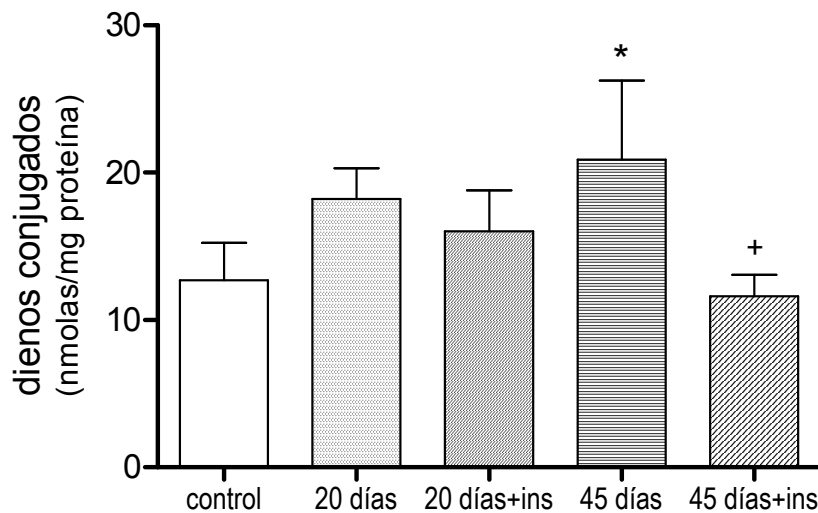
Los niveles de lipoperoxidación se determinaron de acuerdo con la cantidad de dienos conjugados en los tejidos. En las ratas control, el EPR y la retina presentaron niveles elevados de lípidos peroxidados, siendo éstos dos a diez veces mayores que los observados en los otros tejidos analizados (Gráfica 1).



Gráfica. 1 Niveles basales de lípidos peroxidados en todos los tejidos estudiados. Los valores representan la media  $\pm$  ES de al menos cuatro experimentos. \* con respecto de todos los tejidos ( $p \leq 0.01$ ). + con respecto del resto de los tejidos ( $p \leq 0.01$ ).

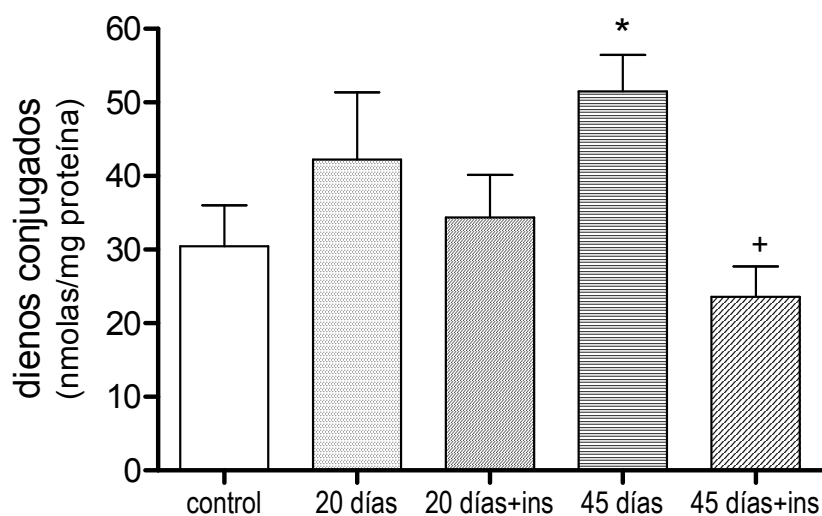
En ninguno de los tejidos estudiados, después de 20 días de inducida la hiperglucemia, los niveles de lipoperoxidación se modificaron significativamente.

En la retina, después de 45 días de inducida la diabetes se observó un aumento significativo (60%) en los niveles de lipoperoxidación con respecto al control (Gráfica 2). Cuando las ratas fueron tratadas con insulina durante 45 días, los niveles de dienos conjugados fueron iguales a los observados en la retina de animales control y significativamente diferentes a los de las diabéticas con los mismos días de tratamiento.



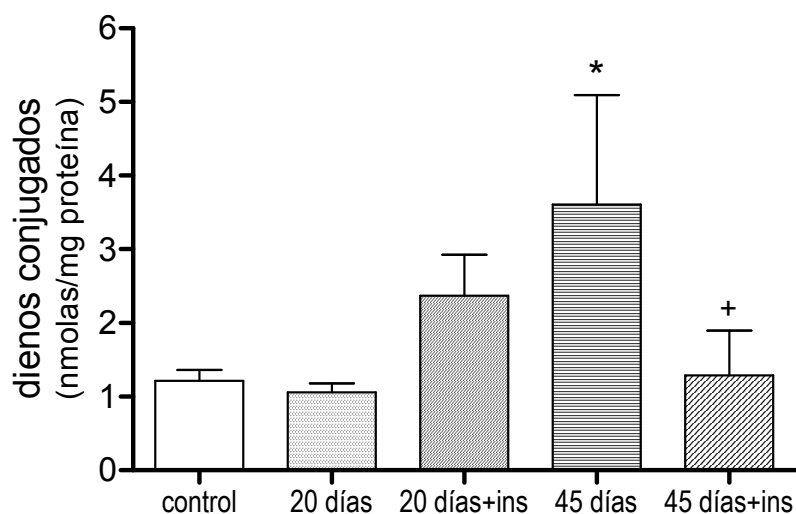
Gráfica 2. Niveles de dienos conjugados en la retina de las ratas control, diabéticas y diabéticas tratadas con insulina. Los valores representan la media  $\pm$  ES de al menos 6 experimentos. \* con respecto del control ( $p \leq 0.05$ ). + con respecto de 45 días ( $p \leq 0.05$ ).

Como se muestra en la gráfica 3, en el EPR los niveles de lipoperoxidación, se elevaron 69% (proporción similar a la retina) a los 45 días de diabetes. En las ratas que recibieron el tratamiento con insulina la cantidad de lípidos peroxidados obtenidos es semejante a la observada en los niveles control.



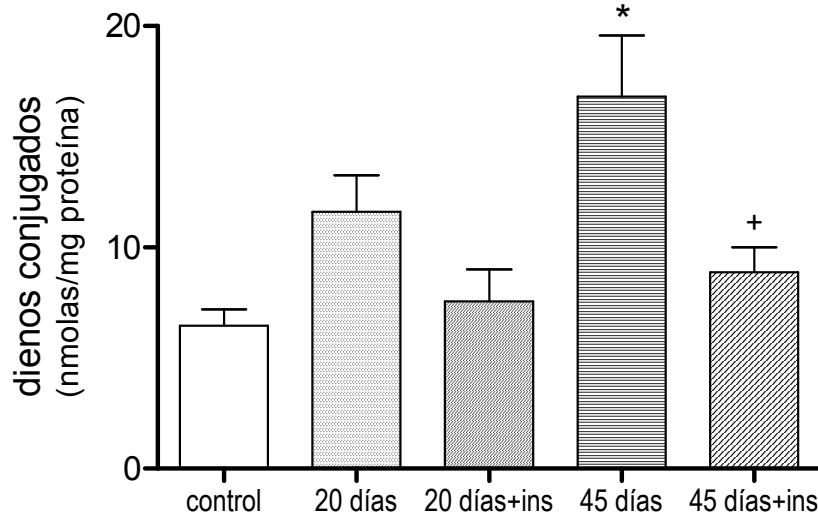
Gráfica 3. Niveles de lipoperoxidación en el EPR. Los valores corresponden a la media  $\pm$  ES de al menos 6 experimentos \* con respecto del control, + con respecto de 45 días ( $p \leq 0.05$ )

En el cristalino los niveles de lipoperoxidación después de 45 días de inducida la diabetes aumentaron significativamente con respecto del control, mientras que en las ratas tratadas con insulina durante este mismo periodo, no hubo diferencia (Gráfica 4).

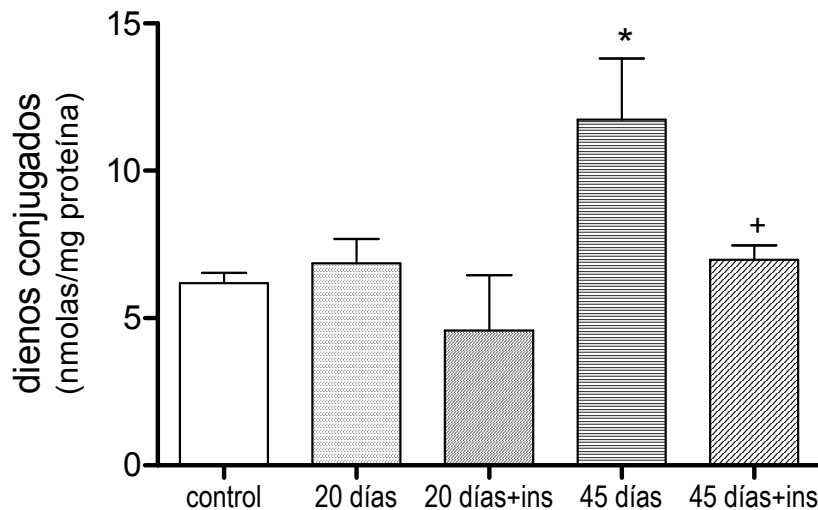


Gráfica 4. Niveles de lípidos peroxidados en el cristalino. Los valores muestran la media  $\pm$  ES de al menos cuatro experimentos \* con respecto del control + con respecto de 45 días ( $p \leq 0.05$ )

Tanto en la corteza cerebral frontal (Gráfica 5) como en el hígado (Gráfica 6), la cantidad de dienos conjugados aumentó aproximadamente 50% a los 45 días de inducida la diabetes, efecto que no se observó en los animales tratados con insulina.

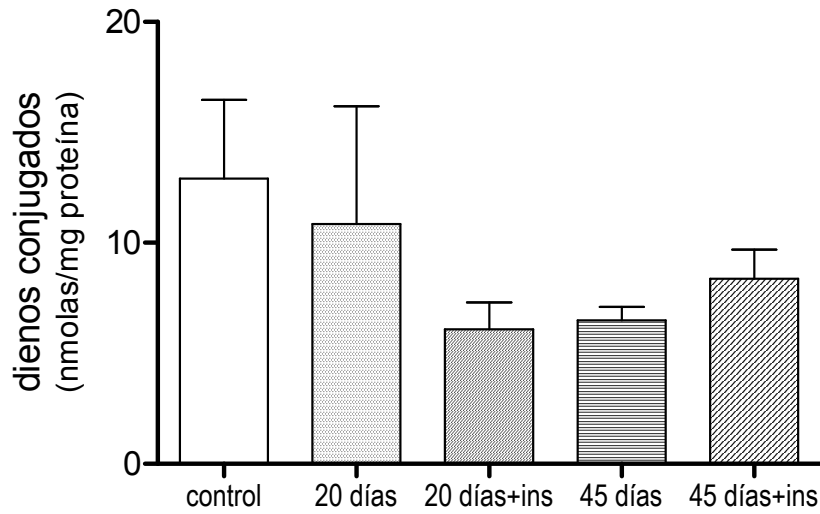


Gráfica 5 \* Niveles de lipoperoxidación en la corteza cerebral frontal. Los valores representan la media  $\pm$  ES de al menos 5 experimentos. \* con respecto del control + con respecto de 45 días ( $p \leq 0.01$ ).



Gráfica 6 Niveles de dienos conjugados en el hígado, los valores representan la media  $\pm$  ES de al menos 7 experimentos. \* con respecto del control + con respecto de 45 días ( $p \leq 0.01$ ).

El riñón, que se conoce como un tejido blanco de las complicaciones diabéticas, no presentó cambios significativos en los niveles de peroxidación en ninguna de las condiciones estudiadas (Gráfica 7).



Gráfica 7. En la gráfica se muestra la cantidad de dienos conjugados en el riñón de las ratas en cada una de las condiciones experimentales. Los valores representan la media  $\pm$  SE de al menos 7 experimentos y no presentan significancia entre ellos.

# Discusión

Partiendo del conocimiento que la diabetes mellitus es una enfermedad originada tanto por la destrucción de las células  $\beta$ -pancreáticas como la resistencia a insulina (Mancillas Adame et al, 2002), se utilizan modelos animales basados en estas dos etiologías. Para obtener un modelo de diabetes mellitus tipo 1, las células  $\beta$  del páncreas se destruyen selectivamente con estreptozotocina (STZ), por lo que cesa la producción de insulina y se genera hiperglucemia. Las ratas tratadas con STZ presentaron las características típicas de la diabetes mellitus, a partir del día uno posterior a la inducción de la diabetes, todos los animales presentaron hiperglucemia, durante el tratamiento no aumentaron de peso y presentaron poliuria. El tratamiento de insulina administrado, es considerado una dosis baja (Reiter, 2003; Kowluru, 2002), y en ningún caso revirtió la hiperglucemia, aunque después de 20 días bajo estas condiciones las ratas presentaron una ganancia de peso igual que los animales control, después de este periodo solo se mantuvo constante hasta los 45 días de tratamiento. La insulina administrada no fue suficiente para restablecer la glucemia dentro de los niveles del control, pero sí para restituir la tasa de oxidación de grasas y la formación de cuerpos cetónicos que llevan a la pérdida de peso (Nelson y Cox, 2000).

La generación de estrés oxidativo es una de las hipótesis con las que se trata de establecer un vínculo entre la hiperglucemia y las complicaciones diabéticas (Baynes y Thorpe, 1999). Está demostrado que durante la diabetes ocurre un estrés oxidativo en el organismo (Haskins et al, 2003) incluyendo la retina (Kowluru, 2002). Un indicador de estrés oxidativo son los niveles de lipoperoxidación, por lo que en este estudio los determinamos en animales control, diabéticos y diabéticos tratados con insulina. Además de la retina y el EPR, estudiamos otros tejidos con complicaciones durante la diabetes: el riñón y el cristalino. El primero es un tejido que al igual que la retina, presenta



alteraciones microvasculares a largo plazo (Frank, 1995; Brownlee, 2001). Por otro lado las fibras del cristalino se opacan e impiden el paso de luz, esta patología es conocida como catarata diabética (Spector, 1991). Asimismo, determinamos los niveles de lipoperoxidación tejido nervioso (corteza cerebral frontal) y en el hígado porque es un tejido implicado en el control de la glucemia.

Decidimos utilizar los dienos conjugados como parámetro de determinación de lipoperoxidación en lugar del método del ácido tiobarbitúrico en el que se detecta la formación de molondialdehído porque durante el proceso de lipoperoxidación, el molondialdehído es un producto que aparece al final de la cadena de reacciones y sólo cuando se sigue un camino, mientras que los dienos conjugados son resultado de un arreglo conformacional en los primeros pasos.

Al determinar los niveles de lipoperoxidación en los animales control, encontramos que el EPR y la retina, presentan concentraciones elevadas de dienos conjugados, esto puede deberse a la gran cantidad de ácidos grasos poli-insaturados que ambos poseen, y a su alta tasa respiratoria (Berman, 1991). Estos resultados están de acuerdo con la elevada tasa de lipoperoxidación observada en la retina *in vitro* (Murata et al, 1981). En el caso del EPR una de sus funciones es fagocitar a las membranas que continuamente se renuevan en los SE de los fotorreceptores, lo que aumenta la cantidad de ácidos grasos poli-insaturados en las células del EPR y su susceptibilidad al ataque de los radicales libres (Liang y Godley, 2003).

La función de la retina está basada en los cambios en el potencial de membrana, por lo que es necesario una estructura íntegra y la lipoperoxidación es la causa principal de daño membranal, el aumento en la formación de hidroperóxidos trae consigo alteraciones significativas para la función de las neuronas retinianas (Doly et al, 1992).

A diferencia de la retina y el EPR, el resto de los tejidos estudiados presentaron niveles bajos de dienos conjugados, esto seguramente se debe a que contienen menor cantidad de lípidos. En el caso del cristalino, 40% de su peso húmedo, corresponde a proteínas, sus fibras se conservan desde la fase

embrionaria y debido a que la oxidación de proteínas está asociada directamente con la formación de cataratas se postula que el estrés oxidativo inicia o es uno de los primeros eventos en el desarrollo de la catarata diabética (Spector, 1991).

Después de 20 días de inducida la diabetes, los tejidos estudiados no presentaron cambios en sus niveles de lipoperoxidación, lo que podemos interpretar como que aún no hay un desequilibrio entre la producción de radicales libres y la concentración de antioxidantes y por lo tanto la lipoperoxidación se mantiene en sus niveles basales.

Aunado a esto, las mitocondrias de la retina de ratas diabéticas están dañadas, hay una mayor producción de estos radicales y liberan citocromo c al citoplasma celular (Kowluru y Abbas, 2003).

En la corteza cerebral frontal y el hígado después de 45 días de inducida la diabetes se observó un aumento en la lipoperoxidación. En el riñón no se modificaron los niveles de lipoperoxidación, lo que indica que en este tejido el estrés oxidativo no es un factor que se desarrolle durante la diabetes o aparece a tiempos más largos.

Se ha sugerido que la función adecuada de la retina depende de la insulina, porque el porcentaje de pacientes que desarrollan retinopatía es significativamente menor en individuos que llevan un tratamiento intensivo de insulina comparados con los que se tratan con bajas dosis (Reiter et al, 2003).

Resultados similares se obtuvieron en un estudio realizado en pacientes, en los cuales se monitorearon sus condiciones oculares durante 10 años bajo un tratamiento con bajas dosis de insulina y al mismo tiempo un grupo de pacientes tratados con altas dosis de la misma (Frank, 1991), igualmente Kowluru (2002) observó en ratas diabéticas, que un tratamiento con altas dosis de insulina mejoró significativamente los efectos del estrés oxidativo en la retina.

En cuanto a la sensibilidad del receptor de insulina y la cascada de señalización que produce en la retina, Kondo y Kahn (2004) reportaron que el receptor de insulina en la retina no se encuentra alterado estructuralmente y es potencialmente funcional debido a que los substratos para la fosforilación del

receptor son los adecuados y la fosfatidil inositol-3 cinasa (PI3K), que es parte de la vía de señalización de insulina se encuentra en las mismas concentraciones que el control.

Partiendo de estas observaciones, al administrar insulina a nuestro modelo de diabetes tipo 1, asumimos que la retina es capaz de responder a ella, con lo que confirmamos que el efecto observado sobre la lipoperoxidación en las ratas diabéticas es por el tratamiento de insulina.

Está demostrado que la hiperglucemia es un factor suficiente para causar retinopatía diabética en ratas galactosémicas (Kowluru, 2002), en las cuales hay resistencia a insulina y los animales presentan alteraciones de tipo oxidativo. Este resultado sugiere que la hiperglucemia es el factor detonante de las alteraciones metabólicas.

Los resultados obtenidos, indican que el tejido se encontraba en bajo estrés oxidativo y en consecuencia observamos mayor peroxidación de lípidos. El tratamiento con insulina, no fue suficiente para mantener la glucemia dentro de los valores normales, pero sí para prevenir la lipoperoxidación. Por lo tanto, hasta los 45 días desde la instauración de la diabetes, la insulina es capaz de prevenir el daño oxidativo en la retina, el EPR, el cristalino, la corteza cerebral y el hígado. Lo que nos lleva a establecer que la hiperglucemia no es la única causa del estrés oxidativo, ya que los animales diabéticos no disminuyeron sus niveles de glucemia. La insulina está involucrada en varias vías de señalización, con lo que podemos plantear la posibilidad de la regulación del estrés oxidativo sea a través de alguna de ellas.

Desde hace más de 50 años, se han desarrollado métodos para controlar la retinopatía diabética y mejorar la visión de los pacientes. Existen tres tratamientos quirúrgicos principales: la fotocoagulación, la vitreoctomía e incluso la hipofisectomía (Frank, 1995). Actualmente el tratamiento más utilizado para evitar el avance de la retinopatía diabética y más eficaz es la fotocoagulación. Este método consiste en destruir con láser las zonas de la retina con vasos sanguíneos proliferantes, lo que mejora significativamente la visión; este

tratamiento aunque es el más recomendado, a largo plazo es efectivo sólo en el 50% de los casos (Frank, 1995; Barber, 2003).

Los tratamientos alternos a las cirugías son principalmente preventivos, con los que se pretende disminuir las complicaciones a largo plazo, dentro de estos métodos destaca el uso de antioxidantes (Kowluru y Kennedy, 2001). En modelos experimentales de diabetes mellitus se ha demostrado que algunas de las alteraciones en la retina pueden ser disminuidas por moléculas antioxidantes (Giardino et al, 1998;Obrosova 2000; Maritim et al, 2003).

# Conclusiones

El EPR de las ratas control, presentó niveles elevados de dienos conjugados.

Durante la diabetes, los tejidos estudiados aumentaron significativamente sus niveles de dienos conjugados.

El tratamiento de insulina administrado a las ratas diabéticas no disminuyó la hiperglucemia, aunque sí disminuyó los niveles de dienos conjugados.

El aumento en los niveles de dienos conjugados es un indicador de la generación de estrés oxidativo, por lo que éste es un factor que podría contribuir con el desarrollo de la retinopatía diabética.



# Bibliografía

Adler y Farber, D. 1986. The retina: a model for cell biology studies. Academic Press Inc. EEUU.

Aiello LM, Cavallerano JD, Aiello LP y Bursell SE Diabetic retinopathy. 316-324. retinal vascular diseases.

Barber, A. A new view of diabetic retinopathy: a neurodegenerative disease of the eye. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 27: 283-290 2003.

Baynes J W y Thorpe S R Role of oxidative stress in diabetic complications A new perspective on an old paradigm, *Diabetes*, 48, 1-9, 1999.

Berman, E R Biochemistry of the retinal pigment epithelium en *The retinal pigment epithelium*, Zinn KM y Marmor MF (eds). Harvard University Press, EEUU, 521, 1979.

Berman, E. Biochemistry of the eye. Plenum Press.1991pp 476.

Bok, D y Young RW Phagocytoc properties of the retinal pigment epithelium en *The retinal pigment epithelium*, Zinn KM y Marmor MF (eds). Harvard University Press, EEUU, pp 521, 1979.

Brownlee, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 414, 2001.

Cai J. Nelson KC, Wu M Sternberg P y Jones DP. Oxidative damage and protection of the RPE. *Progress in retinal eye research* 19, 2 205-221, 2000.

Campbell N, Reece J Mitchell L. Biology. Canada Addison-Wesley 1990.

Clark, 1996 The cell biology of the retinal pigment epithelium. En Adler R y Farber D (eds) *The Retina Part II*. Academic Press pp 129-168.

Davis, MD. Diabetic retinopathy: a clinical overview. *Diabetes/metabolism reviews*, 4, 4 291-322, 1988.

Demontis G C Longoni B, Marchiafava P L Molecular steps involved in light-induced oxidative damage to retinal rods. *Investigative ophthalmology and visual science*. 43, 7 2421-2427, 2002.

Do Carmo A Ramos P Reis A Proenca R y Cunha-Vaz JG *Experimental eye research* 67 569-575, 1998.

- Doly M Droy-Lefaix M T y Braquet P Oxidative stress in diabetic retina. *Free radicals and aging*. 299-307, 1992
- Du Y. Miller CM Kern TS. Hyperglycemia increases mitochondrial superoxide in retina and retinal cells. *Free radical biology & medicine*, 35, 11 141-1499, 2003.
- Frank, R. N., Diabetic Retinopathy. *Progress in retinal and eye research* Vol.14 No.2 pp 361-391 (1995)
- Giardino I Arman KF Diane LH y Brownlee M. Aminoguanidine inhibits reactive oxygen species formation, lipid peroxidation and oxidant-induced apoptosis. *Diabetes*, 47, 1114-1120, 1998.
- Guajardo MH, 2002 Terrasa AM Catalá A. Retinal fatty acid binding protein reduce lipid peroxidation stimulated by long-chain fatty acid hydroperoxides on rod outer segments. *Biochimica et biophysica acta* 1581 65-74 2002.
- Guyton A y Hall J, Textbook of Medical physiology EEUU Saunders Company 1996
- Haskins K, Bradley B, Powers K, Fadok V, Flores S, Ling X, Pugazhenth S, Reusch, Kench J. Oxidative stress in type 1 diabetes. *Ann NY acad sci* 1005 43-54 2003
- Hernández Ávila y Olaíz Fernández, La diabetes y el mexicano: un reto para la salud pública, *Ciencia* 53-3, 2002
- Kandel ER Phototransduction and information-processing in the retina en Kandel E. R., Schwartz JH Jessell TM (eds) Principles of neural science. 3a. ed. Appleton and Lange 1991 pp 1135
- Kondo y Kahn,
- Kowluru RA y Abbas SN, Diabetes-induced mitochondrial dysfunction in the retina. *Investigative ophthalmology of visual science* 44, 12, 5327-5334, 2003
- Kowluru RA y Kennedy A. Therapeutic potential of antioxidants and diabetic retinopathy. *Expert opinion investing drugs* 10, 9, 1665-1676, 2001.
- Kowluru, R. A. Effect of reinstition of good glycemic control on retinal oxidative stress and nitrate stress in diabetic rats. *Diabetes*. 52, 818-823 (2003)
- Kowluru, R. A., Retinal metabolic abnormalities in diabetic mouse: comparison with diabetic rat. *Current eye research*. 24,2, 123-128, 2002.
- Kuszak JR, Zoltoski RK, Sivertson C Fibre cell organization in crystalline lenses *Experimental Eye Research*. Mar;78(3):673-87 2004.
- Liang F Q y Godley BF Oxidative stress-induced mitochondrial DNA damage in human retinal pigment epithelial cells: a possible mechanism for RPE aging and age-related macular degeneration. *Experimental eye research* 76 397-403, 2003.



- Lorenzi M y Gerhardinger C , Early cellular and molecular changes induced by diabetes in the retina, *Diabetologia* 44; 791-804, 2001
- Lowry, O H Rosebroug N J Farr A L Randal R J protein measurement with the Folin-phenol reagent. *Journal of Biol Chem* 193: 265-275 1951
- Mancillas Adame, L.G. Gómez Pérez, F. J., Rull Rodrigo, Juan A. *Revista de Endocrinología y nutrición* Vol. 10, No. 2 abril-junio, 2002 pp 63-68
- Maritim AC, Sanders RA y Watkins III JB. Diabetes, Oxidative Stress and antioxidants: a review. *Journal of biochemical and molecular toxicology*. 17, 1 24- 38, 2003.
- Marmor, M. Structure, function, and disease of the retinal pigment epithelium: function and disease 1998.
- Martin J, Neuroanatomy. EEUU. Appleton and Lange 1996
- Murata T, Nishida T Eto S, Mukai N. Lipid peroxidation in diabetic rat retina. *Metabolic Pediatric Ophthalmology*, 5, 83-87, 1981.
- Nelson y Cox, Lehninger. Principles of Biochemistry. 2000.
- O'Brien DF The Chemistry of vision. *Science*, 218, 961-965 1982.
- Obrosova IG, Fathalla L, Greene DA. Early changes in lipid peroxidation and antioxidative defense in diabetic rat retina: effect of DL-a-lipoic acid. *European journal of pharmacology* 398 139-146, 2000.
- Park, SH, Park, JW, Park SJ, Kim KJ, Chung MH, Oh SJ. Apoptotic death of photoreceptors in the streptozotocin-induced diabetic rat retina. *Diabetologia* 46:1260-1268 2003
- Portha B, Serradas P, Bailbe D, Suzuki K, Goto Y, Giroix MH.. Beta-cell insensitivity to glucose in the GK rat, a spontaneous nonobese model for type II diabetes. *Diabetes* 1991 Apr;40(4):486-91
- Recknagel R.O. y Glende E. A. Spectrophotometric detection of lipid conjugated dienes. *Methods in enzymology* Vol. 105 331-337 1984
- Reiter C E N y Gardner T W. Functions of insulin receptor signaling in retina: possible implications for diabetic retinopathy, *Progress in retinal eye research* 22 545-562, 2003.
- Salceda R. Vilchis C. coffe V. Y Hernández-Muñoz R. Changes in the redox state in the retina and brain during the onset of diabetes in rats. *Nuerochem Res* 23:893-897
- Saltiel, A. R. y Kahn C. R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*. 414, 799-806, 2001.
- Salud: México 2004. Secretaría de Salud.
- <http://evaluacion.salud.gob.mx/saludmex2004/sm2004.htm>

Spector A, The lens and oxidative stress en *Oxidative stress: oxidants and antioxidants* Academic Press Ltd. 530-556 1991.

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

Wiseman H. y Ridgway T. Membrane lipid and lipoprotein injury: prevention by antioxidants, *Biomolecular Free Radical Toxicity: Causes and Prevention*. John Wiley and Sons, LTD. UK 2000 3-46

Zentella de Piña M, Corona garcía S y Saldaña Balmori, Y. Toxicidad del oxígeno: papel de los radicales libres en la peroxidación de los lípidos, *Boletín de educación bioquímica*, 13, 3, 87-93 1994.