

Universidad de Salamanca
Facultad de Medicina
Departamento de Anatomía e Histología Humanas
Laboratorio de Neuroendocrinología del Instituto de Neurociencias de
Castilla y León
Laboratorio de Neuroendocrinología y Obesidad del IBSal



IRS2 es necesario para el mantenimiento de la organización estructural de la Retina.

Jesús Fraile Maya

Salamanca 2016

José CARRETERO GONZÁLEZ, Catedrático de Embriología y Anatomía Humana, y Manuel RUBIO SÁNCHEZ, Profesor Titular de Embriología y Anatomía Humana, como directores del presente trabajo de Tesis Doctoral,

HACEN CONSTAR:

Que D. Jesús FRAILE MAYA ha realizado el trabajo "IRS2 ES NECESARIO PARA EL MANTENIMIENTO DE LA ORGANIZACIÓN ESTRUCTURAL DE LA RETINA" en el laboratorio de Neuroendocrinología del Instituto de Neurociencias de Castilla y León, con financiación pública competitiva.

Que a nuestro juicio, el trabajo reúne los requisitos de originalidad, dedicación y labor investigadora; así como de formación investigadora de su autor, que pueden ser exigibles a un trabajo de Tesis Doctoral.

Igualmente reúne todos los requisitos legales en la manipulación de animales.

Por todo ello, dan el visto bueno para la presentación del trabajo para su defensa y lectura.

En Salamanca a 15 de diciembre de 2015.

José Carretero González

Manuel Rubio Sánchez

Índice

Prólogo	7
Agradecimientos	11
Introducción	15
La Insulina y su Receptor.	17
Glucosa e Insulina	17
El receptor de insulina (IR)	18
Vía del sustrato 2 del receptor de la insulina (IRS-2)	19
Mecanismo de regulación.....	21
Regulación sobre el receptor de la insulina	22
Regulación sobre el sustrato del receptor (IRS)	23
Regulación en las vías de señalización activadas por IRS	24
Resistencia a la insulina.	24
Anatomía de la Retina.	27
Histología de la Retina.	28
Epitelio pigmentario de la Retina.	28
Retina sensorial o neurorretina.....	29
Células neuronales	29
Fotorreceptores	29
Células Horizontales	30
Células Bipolares	31
Células Ganglionares	32
Células Interplexiformes	33
Células Amacrinas	33
Capas o estratos retinianos.....	33
Células gliales.....	34
Astrocitos.....	35
Glía retiniana.....	36
La barrera hematorretiana	40
Hipótesis y Objetivos del Estudio	41
Hipótesis del estudio.	45
Objetivo general:	45
Objetivos específicos:	45
Materiales y Métodos empleados	47
Animales empleados para el estudio.....	49
Genotipaje	49
Extracción, aislamiento y purificación del DNA.....	49
Amplificación del DNA purificado, PCR.	50
Sacrificio de los animales y Extracción de las muestras.....	50
Histoquímica.....	51
Hematoxilina de Mayer.....	51
Inmunocitoquímica	51
Protocolo de detección inmunocitoquímica.....	51
Controles de las reacciones inmunocitoquímicas.....	52
Morfometría y Cuantificación celular.....	52
Análisis morfométrico de los cortes histológicos.....	53
Análisis Estadístico de los resultados.....	53
Tratamiento de los Textos y figuras. Edición final.....	54

Resultados.....	55
Espesor radial de la retina neural y su morfología. Estudios con Hematoxilina de Mayer.....	58
Hallazgos morfométricos.	58
Ratones wild type.	60
Ratones IRS2-ko.	64
Efectos de la ausencia de IRS2 sobre la expresión inmunocitoquímica de GFAP.....	68
Retina de los ratones wild type.....	68
Retina de los ratones IRS2-ko.	72
Efectos de la ausencia de IRS2 sobre la expresión inmunocitoquímica de Vimentina.....	78
Ratones wild type.	78
Ratones IRS2-ko.	82
Efectos de la ausencia de IRS2 sobre la expresión inmunocitoquímica de Aromatasa P450.	88
Ratones wild type.	88
Ratones IRS2-ko.	98
Efectos de la ausencia de IRS2 sobre la expresión inmunocitoquímica de Glutamina sintetasa.	106
Ratones wild type.	106
Ratones IRS2-ko.	110
Efectos de la ausencia de IRS2 sobre la expresión de Tyrosín hidroxilasa (TyrHD).	112
Ratones wild type.	112
Ratones IRS2-ko.	116
Efectos de la ausencia de IRS2 sobre la apoptosis. Expresión de caspasa 3 activa.	122
Ratones wild type.	122
Ratones IRS2-ko.	124
Discusión	129
Comentarios sobre la Metodología empleada.	131
Inmunocitoquímica.....	131
Empleo de la Caspasa 3 activa como marcador de apoptosis.....	132
Morfometría y Planimetría.	133
Los ratones knock out para la IRS2.	135
Comentarios en relación con los resultados obtenidos.....	136
Efectos de la ausencia de IRS2 sobre el espesor radial de la retina neural y su morfología.	136
Ausencia de IRS2 y cambios gliales, GFAP y Vimentina.	137
Efectos de la ausencia de IRS2 sobre la expresión inmunocitoquímica de glutamina sintetasa.	144
Posible relevancia de los cambios en la expresión de aromatasa por ausencia de IRS2.	146
Efectos de la ausencia de IRS2 sobre las células amacrinas dopaminérgicas.	148
Apoptosis en la retina de ratones adultos IRS2-ko. Expresión de caspasa 3.	150
Conclusiones	153
Referencias Bibliográficas	157

Prólogo

Prologar un trabajo de investigación siempre conlleva una satisfacción personal por cuanto se desea poner de relieve la valía del mismo y de su autor; pero si se trata de hacerlo sobre el trabajo realizado por tu hijo, en este caso su tesis doctoral, la felicidad es plena (teniendo en cuenta que sus padres también pasarán por su misma situación).

Todos sabemos que con la tesis doctoral se culmina la carrera académica, no la actividad investigadora, a todas luces necesarias para el desarrollo del saber y de la ciencia, en este caso en el campo de la medicina, en donde la salud, el bienestar, la dicha humana y la calidad de vida son las metas a alcanzar. En nuestros días, los logros conseguidos en este campo han sido muchos y excelentes; sin embargo, todavía quedan parcelas importantes por explorar y conocer en todas sus dimensiones.

La elección del tema para llevar a cabo este trabajo de tesis, se ajusta al terreno elegido por él para desarrollar su actividad profesional como es el campo de la oftalmología. De ahí el reto que tiene ante sí desde ahora.

Además, el hecho de culminar su carrera en la Universidad de Salamanca, en la que obtuvo su licenciatura en medicina y en donde siempre tuvo el deseo de finalizar sus estudios con la tesis doctoral, debe ser un acicate que le acompañe en toda su actividad profesional a lo largo de su vida.

Agradecimientos

La realización de esta investigación no hubiera sido posible llevarla a cabo, sin la colaboración de las personas que a continuación señalamos, cuya aportación ha sido imprescindible para culminar este trabajo de Tesis Doctoral.

En primer lugar quiero hacer una mención muy especial a los directores de esta tesis: Dres. José Carretero González y Manuel Rubio Sánchez, en los que siempre he encontrado una excelente disponibilidad y cuya orientación a nivel científico y aliento a nivel personal han sido un importante estímulo para poder llevar a cabo este trabajo. Sus consejos oportunos y su apoyo en todo momento tengo que agradecerles.

Así mismo quiero hacer una especial mención a la memoria de nuestro querido profesor D. Francisco Efrén Pastor quien me animó a la realización de los cursos de doctorado.

También quiero dar las gracias a todas las personas que han contribuido de una u otra forma a ver culminado este trabajo, al equipo del Instituto de Neurociencias que con su incansable trabajo hacen posible el desarrollo de muchos proyectos para el avance de la ciencia. En especial a Dña. Marisa Fontanillo y Dña. Concepción Sánchez, por su inestimable colaboración en el laboratorio y cuidado y manipulación de los animales empleados en el estudio.

A mis padres, a mi abuela, hermanos y sobrina.

El trabajo de Tesis Doctoral que se presenta ha sido realizado en el Dpto. de Anatomía e Histología Humanas de la Facultad de Medicina, en el laboratorio de Neuroendocrinología del INCyL y en el de Neuroendocrinología y Obesidad del IBSal, financiado con cargo a los siguientes proyectos de investigación: SAF2002-00808, Ministerio de Ciencia y Tecnología. FIS PI030818, Instituto de Salud Pública Carlos III.

Los ratones heterocigotos necesarios para formar la colonia de ratones knock out, fueron gentilmente cedidos por la Dra. Burks desde el Instituto de Investigación Príncipe Felipe de Valencia (procedencia inicial, Dr. White, Joslin Diabetes Center de Boston, USA). Muchas gracias por su cooperación inestimable.

Introducción

La Insulina y su Receptor.

Glucosa e Insulina

La glucosa es la principal fuente de energía en los mamíferos y, la única en el feto y los tejidos glucodependientes (retina, eritrocitos y el epitelio germinativo de las gónadas). Además de ésta, tiene otras funciones de gran importancia, como almacenarse en forma de glucógeno, transformarse en lípidos, originar la ribosa para los ácidos nucleicos y formar complejos con proteínas. La regulación del metabolismo de la glucosa está determinado por la acción de una hormona, la insulina.

La insulina es una hormona liberada por las células beta de los islotes de Langerhans del páncreas en respuesta a niveles elevados de nutrientes en sangre. Estos islotes están integrados por células claras poligonales, están muy vascularizados e inervados. Dentro de cada islote se encuentran cuatro tipos de células: células A o alfa (10-40%), células B o beta (60-90%), células D o delta (10-20 %) y células F (2-3%). (Nolan y Prentki, 2008; Ashcroft y Rorsman, 2012).

La insulina es la hormona anabólica más potente conocida. Su función es indispensable para un correcto desarrollo tisular, para el crecimiento así como el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa en todo el cuerpo (Pessin y Sattiel, 2000). Controla funciones energéticas y metabólicas de lípidos e interviene en el mantenimiento del peso normal del cuerpo (Kanzaki y Pessin, 2001).

Desde el punto de vista bioquímico se trata de un polipéptido de 5,8 KDa, constituido por dos cadenas: A y B. La primera está formada por 21 aminoácidos y la otra por 30, unidas entre sí por tres puentes disulfuro de ubicación invariable (Eyzaguirre y Codner, 2006). Su síntesis se produce a partir de una molécula precursora, la proinsulina, y mediante la acción de unas enzimas proteolíticas conocidas como prohormonas convertasas (proproteína convertasa 1, proproteína convertasa 2, exoproteasa carboxipeptidasa E) se convierte en la insulina tal y como la conocemos (Steiner y Oyer, 1967).

Su producción se regula a lo largo de diferentes niveles de la cadena de síntesis como a nivel de la transcripción del DNA (gen de la insulina), sobre la estabilidad del RNAm, en la traducción del RNAm y en las modificaciones postransducción.

Su liberación se produce en dos fases bien diferenciadas, la primera, una liberación inmediata y rápida ante el aumento de los niveles de glucosa en sangre. En esta fase, la glucosa entra a la célula beta a través del transportador de glucosa GLUT2, glucosa que posteriormente pasa a la glucólisis y al ciclo respiratorio para producir varias moléculas de ATP. Posteriormente los canales de potasio (K^+) dependientes de ATP se cierran con lo que la membrana celular se despolariza. Esta despolarización de la membrana hace que los canales de calcio (Ca^{2+}) voltaje-dependientes se abran y entre calcio en el interior de la célula. El aumento en

los niveles de calcio intracelular produce la activación de la fosfolipasa C, enzima que se encarga de desdoblar los fosfolípidos de membrana fosfatidil inositol 4,5-bifosfato en inositol 1,4,5-trifosfato y en diacilglicerol. El inositol 1,4,5-trifosfato (IP3) se une a los receptores proteicos sobre la membrana del retículo endoplásmico, lo que a su vez permite más liberación de Ca^{2+} , ahora desde el retículo endoplásmico al citoplasma. Estas cantidades mayores de calcio dentro de las células provocan la activación de la sinaptotagmina (Li et al, 2007), que ayuda a la liberación de la insulina previamente sintetizada y almacenada en las vesículas secretoras (Saltiel y col. 2001; Myers y White. 2002; McCarthy y col. 2007; Olivares Reyes y col. 2008).

No solo los niveles de glucosa estimulan la liberación de insulina, otras sustancias, como los aminoácidos (alanina, glicina, leucina, glutamina y arginina), la acetilcolina, la colecistoquinina y el péptido insulínico dependiente de glucosa (IGP) (Zou y col. 2014).

La segunda fase, en cambio se trata de una liberación sostenida y lenta, a partir de una activación independiente de la cantidad de glucosa en sangre.

Si bien existen sustancias como hemos visto que activan la liberación de insulina, otras hacen lo contrario, disminuyendo los niveles de la misma en sangre. Este es el caso del sistema nervioso autónomo, concretamente la parte simpática. Este sistema, a través de la estimulación de receptores adrenérgicos α_2 , como agonistas de la clonidina o la alfametildopa, inhiben la liberación de la insulina (Pan y col. 2011). Sin embargo, es importante recalcar que una activación de los receptores β_2 de las células beta por la adrenalina circulante estimula la liberación de la insulina (Begg y Woods, 2013).

Cuando los niveles de glucosa disminuyen a su valor fisiológico, la liberación de insulina se detiene, si estos niveles siguen disminuyendo a valores muy inferiores a lo normal, poniendo incluso en peligro la vida, se produce la liberación de hormonas hiperglicémicas, con el objetivo de aumentar la glucosa a límites fisiológicos. La hormona más importante en estos casos es el glucagón, que produce un aumento de las concentraciones de glucosa en plasma. Esta glucosa la obtiene de los depósitos de glucógeno, como ocurre en las células del hígado. En estos casos la noradrenalina mantiene inhibida la liberación de insulina (Eyzaguirre y Codner, 2006).

El receptor de insulina (IR)

La insulina desarrolla su acción una vez que se une a su receptor y activa toda una serie de cascadas. El receptor de la insulina (IR), es una proteína heterotetramérica formada por dos subunidades α extracelulares y dos subunidades β transmembrana (con dominio extracelular, transmembrana e intracelular), conectadas por puentes disulfuro (Pessin y Saltiel, 2000). La porción intracelular de la subunidad β presenta tres regiones estructurales donde se hayan las tiro-

sinas con funciones diversas (Myers y White, 2002). La unión de la insulina a la subunidad α extracelular induce cambios de conformación en el receptor, que causan a su vez, la dimerización de los receptores adyacentes (Burks y col., 1997; White, 1994) y la activación del dominio tirosin-quinasa de la parte intracelular de la subunidad β (Ullrich y Schlessinger, 1990). El inicio de la actividad de tirosin-quinasa del receptor de la insulina fomenta la autofosforilación de la propia subunidad β y la fosforilación rápida de las denominadas «proteínas de acoplamiento» (docking), como los sustratos del IR (IRS) -1, -2, -3 y -4 (Taniguchi y col., 2006) y otras proteínas, incluidas las proteínas homólogas de colágeno (shc) y la homóloga de SRC 2 (SH2), que activan, a su vez, múltiples sustancias intermedias de señalización intracelular.

Las proteínas IRS, shc y SH2 desempeñan un papel regulador importante en la cascada de señalización de la insulina. En su forma fosforilada, estas proteínas se convierten en puntos de anclaje para las proteínas intracelulares que contienen dominios SH2 complementarios. Concretamente, la interacción entre las proteínas IRS-1 y la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) determina la activación de Akt (también denominada protein-quinasa B), que desempeña un papel crucial en el mecanismo de acción de la insulina para la translocación de GLUT-4, el transporte de glucosa y la activación de la óxido nítrico (NO) sintetasa, esta vía de señalización es conocida como la vía de señalización metabólica.

Esta actividad está estrictamente regulada, debido a que la activación sin control o la inactividad daría lugar a profundas consecuencias metabólicas. La internalización y la degradación del IR, estimulado por ligando, es una característica común de la mayor parte de las resistencias a la insulina y los estados de hiperinsulinemia, incluyendo la obesidad y la diabetes mellitus tipo 2 (Friedman y col., 1997).

En cambio, los efectos no metabólicos, proliferativos, mitógenos y proinflamatorios de la insulina se producen mediante la activación de la Ras (principalmente a través de shc y, en menor grado, de proteínas IRS), la Raf y las quinasas de proteína activada por mitógenos, conociéndose a esta vía de transducción como la vía de señalización de crecimiento o vía de las quinasas activadas por mitógenos (MAPK) (Virkamaky y col., 1999; Taniguchi y cols, 2006).

Vía del sustrato 2 del receptor de la insulina (IRS-2)

El desarrollo de la retina, como otras regiones del sistema nervioso, está regulada por factores de transcripción, factores de crecimiento y neuropéptidos que coordinan la proliferación, diferenciación y maduración de las células precursoras neuroepiteliales (Frade y col., 1999; Levine y col., 2000; Kumar, 2001; Takatsuka y col., 2004).

La retinopatía diabética, la complicación más frecuente de la diabetes y principal causa de ceguera en humanos, implica daños vasculares acompañados de apoptosis neural en la retina (Bronson y col., 2003).

Los sustratos del receptor de la insulina en los mamíferos, es una familia de proteínas formada por al menos cuatro tipos, IRS-1 a IRS-4, que juegan un papel muy importante en la señalización de la insulina. Concretamente actúan como un interfaz entre los receptores tirosin-quinasa y las proteínas efectoras como el fosfatidil inositol 3-fosfato (PI3K) y MAPK (White et al, 1994). Están caracterizados por la presencia de un dominio N-terminal pleckstrin homólogo (PH), un dominio de unión fosfotirosina (PTB) y un dominio C-terminal que contiene múltiples sitios de fosforilación de la tirosina. (Yenush et al, 1997).

El sustrato 2 del receptor de la insulina cuando se activa por interacción de la insulina o del factor de crecimiento de la insulina 1 (IGF-1) con el receptor de la insulina, lo que hace es activar toda una cascada de señales, concretamente actúa a nivel de la vía de señalización del crecimiento, cuyo fin último es la regulación de la maduración y de la supervivencia de los fotorreceptores desde el nacimiento. Este sustrato 2 se localiza principalmente en la capa plexiforme externa y en los segmentos internos de los fotorreceptores. También se localizan, pero en menor cuantía, en las células ganglionares y en la capa plexiforme interna. Por lo que un fallo o alteración de dicho sustrato determina que esa cascada de señalización interna se vea interrumpida o alterada con el consiguiente incremento de la apoptosis celular y desestructuración retiniana consiguiente.

Las deleciones en el gen que codifica el sustrato 2 del receptor de la insulina determina que el individuo que lo padece desarrolle un estado de resistencia a la insulina con el desarrollo de diabetes mellitus tipo 2.

Ratones con deleciones específicas en este gen, desarrollan diabetes tipo 2 mostrando ambas condiciones, resistencia a la insulina y fracaso de las células beta a una edad temprana (Withers et al, 1998; Kubota et al, 2000;).

La importancia de las vías de señalización de la insulina y del factor de crecimiento de la insulina en el crecimiento y desarrollo del organismo está bien establecido. La ablación de los receptores de la insulina o del IGF-1 resulta en una temprana muerte postnatal (Liu et al, 1993; Accili et al, 1996; Louvi et al, 1997).

Una deleción en dicho gen IRS2, precipita un número de efectos fisiopatológicos en órganos que típicamente son afectados por las complicaciones de la diabetes. Así a nivel retiniano se observa aumento de la apoptosis de las células fotorreceptoras con disminución de la maduración de las mismas y de su supervivencia (Yi et al, 2005).

También se ha visto como en ratones con esta deleción existe una disminución de la proliferación neuronal que conduce a una disminución del tamaño cerebral (Schubert et al, 2003). En el riñón, la insulina modifica algunas funciones a nivel de los túbulos renales (Nakamura et al, 1983; Marunaka et al, 1992; Feraille et al, 1994; Ito et al, 1994; Ruiz et al, 1998; Klisic et al, 2002), con una función del sustrato 2 sobre la estimulación de la insulina en el transporte de los túbulos proximales y una PKB/Akt fosforilación in vitro (Zheng et al, 2005).

A nivel retiniano, la falta de función de dicho sustrato con la interrupción de su vía de transducción da lugar a una degeneración de los fotorreceptores. En ratones con esta delección se ha visto como el IRS-2 constituye una molécula clave en la modulación del crecimiento del IGF-IR, así como en la supervivencia de las células beta. Así mismo se ha visto su papel clave en la coordinación de las señales de IGF-I/IGF-IR a nivel del sistema nervioso central, hecho imprescindible para la maduración del mismo en el desarrollo del ratón. (Arroba y col., 2013).

A pesar de que los cambios moleculares en el sustrato 2 del receptor de la insulina de la retina de ratón aún no han sido descritos, un reciente estudio (Albert-Fort y col., 2014) analizó los cambios degenerativos a nivel de las células neuronales y gliales de la retina de ratones adultos (de 9 y 12 semanas de edad Irs 2 (-)/(-)) mediante técnicas de inmunohistoquímica. A las 9 semanas de edad se observa un adelgazamiento significativo de las capas externas de la retina, así como activación de las células de Müller y de las células de la microglía. Las células fotorreceptoras mostraron diferentes signos de degeneración, como atrofia del segmento externo e interno, redistribución de las opsinas de conos y bastones y desorganización espacial de los conos. Esto fue acompañado por cambios sinápticos a nivel de la capa plexiforme externa, incluyendo la retracción de las esférulas de los bastones, la reducción de los bordes sinápticos de los fotorreceptores y la remodelación sináptica en las neuronas de segundo orden (es decir, pérdida y regeneración de los procesos dendríticos en células bipolares de bastones y células horizontales). A las 12 semanas de edad, se observó que el espesor de las capas de la retina interna se vio gravemente afectado. Aunque la capa plexiforme interna se mantuvo sin cambios en esta etapa, los axones terminales de las células bipolares de bastones se redujeron de manera significativa. Los ratones adultos mostraron características claras de la neurodegeneración y la interrupción de la retina interna con el aumento de edad. La estimulación farmacológica de la vía de señalización Irs2 puede proporcionar neuroprotección adicional en ciertas retinopatías degenerativas.

Mecanismo de regulación.

La duración así como la intensidad de las señales producidas por la unión de la insulina a su receptor son altamente reguladas para asegurar el correcto funcionamiento metabólico y el balance energético.

Este control se realiza gracias a mecanismos muy finos de autorregulación (desensibilización homóloga), en donde enzimas de la misma vía que fueron activadas por acción de la insulina inhiben la actividad de proteínas clave en el proceso de señalización, como son el propio IR o los sustratos IRS (Carpentier et al, 2002; Youngren, 2007).

De forma simultánea, otras señales que nada tienen que ver con la vía de la insulina inhiben su señalización a través de mecanismos de desensibilización hete-

róloga. De esta manera, el receptor de la insulina y sus sustratos se encuentran sujetos a unos mecanismos de desensibilización homóloga y heteróloga (Gual y col., 2005).

Regulación sobre el receptor de la insulina

Cuando la insulina se une a su receptor, forma el complejo insulina-receptor, desencadenándose el cambio conformacional y toda una serie de cascadas, descritas previamente. Posteriormente, este complejo insulina-receptor, incluido en unas vesículas recubiertas de clatrina es internalizado en los endosomas primarios. El receptor permanece activo y fosforilado y el pH ácido de los endosomas induce la disociación del complejo, para que posteriormente la insulina sea degradada por acción del enzima insulinasa ácida y el receptor reciclado para ser enviado nuevamente a la membrana celular. Sin embargo, cuando los niveles de insulina son patológicos, el receptor es degradado en los lisosomas. De esta forma se regula la cantidad de receptores presentes en la superficie celular atenuando los efectos nocivos de una concentración elevada de insulina en sangre (Desbuquois y Authier, 2014).

Este mecanismo de regulación de la cantidad así como de la activación del receptor de la insulina es crucial para determinar la sensibilidad celular a la insulina, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas, como observaremos en la resistencia a la insulina (Carpentier et al, 2002; Paz et al, 2002)

El receptor de la insulina presenta diferentes grados de activación, así en estudios recientes se ha observado como la desfosforilación de residuos clave de Tyr sobre el asa de activación del receptor por parte de proteínas fosfatasa de Tyr (PTPs) reducen la activación del mismo (Koren y Fantus, 2007; Zhang y col., 2009).

Estas PTPs se clasifican en dos categorías, unas las PTPs citosólicas y otras las PTPs de membrana, ambas son reguladoras de la actividad del receptor de la insulina. Las localizadas sobre la membrana juegan un papel importante en la regulación de la fosforilación del receptor, en particular, LAR (fosfatasa relacionada al antígeno común del leucocito) induce la desfosforilación del IR (Hashimoto y col., 1992).

Las PTPs citosólicas, como PTP-1B y SHP-2, han sido las más estudiadas y las que más evidencias experimentales han dado. En el caso de PTP-1B se ha observado que no sólo disminuye la señal de la insulina cuando está es patológicamente alta, sino que también se asocia al receptor en células intactas, sugiriendo que puede actuar como un regulador de las acciones de la insulina in vivo (Bodula y col., 2005).

En ratones “knock-out” con delección del gen que codifica por PTP-1B se ha observado un incremento de la sensibilidad a la insulina asociado al incremento en el estado de fosforilación de residuos Tyr del receptor. (Li y col. 2006).

Así mismo, se ha observado también que la desfosforilación del IR producida por esta fosfatasa induce una disminución en la incorporación de glucosa por parte del tejido muscular así como del tejido adiposo (Obanda y Cefalu, 2013). Con todos estos estudios experimentales se busca una nueva droga capaz de inhibir la actividad de la PTP-1B incrementando de esta manera la sensibilidad a la insulina. (Delibegovic, 2007; Pitschmann y col., 2013; Kandali y col., 2015).

La otra fosfatasa citosólica de interés, es la SHP-2, que presenta una estructura con dos dominios SH2 que le permiten unirse a distintas proteínas durante la cascada de señalización insulínica.

Las acciones reguladoras de SHP-2 son de dos tipos inversos, a diferencia de la acción de PTP-1B. Así se ha visto que tiene efectos reguladores tanto positivos como negativos, siendo estos últimos la inactivación del receptor por desfosforilación del receptor así como del sustrato 1 (Maegawa y col., 1999; Morris y col., 2009). Entre sus acciones reguladoras positivas, se ha visto su papel en la vía de Ras/MAPK. (Cheng y col., 2002).

Otros puntos de regulación sobre el receptor de la insulina lo encontramos en la fosforilación de residuos de Ser/Thr como respuesta a la insulina. Esta fosforilación altera la propia autofosforilación del receptor sobre sus residuos tyr. (Coppes y White, 2012; Hançer y col., 2014).

También otro punto clave en la regulación de este receptor es la proteína quinasa C (PKC) como quinasa clave en la fosforilación de regiones yuxtamembrana, catalítica y carboxilo-terminal (Karasik y col., 1990; Maeno y col., 2012).

Regulación sobre el sustrato del receptor (IRS)

Cuando se une la insulina a su receptor y éste se activa, dentro de esta activación encontramos la fosforilación notable del IRS-1 así como del IRS-2, tanto a nivel de residuos de Tyr como en residuos de Ser/Thr. El IRS-1 presenta 232 residuos de Ser/Thr, de los que 70 han sido identificados como sitios potenciales de fosforilación para diferentes quinasas, que son conocidas como quinasas de IRS (Coppes y White, 2012).

La fosforilación de estos residuos está implicada en mecanismos de atenuación de la señal de insulina produciendo una separación entre el IRS y las proteínas efectoras como puede ser la PI3K, su degradación o bien conversión en proteínas inhibitoras de la actividad quinasa del IR (Gual y col., 2005; Coppes y White, 2012).

Otro punto de regulación a este nivel lo encontramos en la familia de proteínas supresoras de proteínas de señalización de citoquinas (SOCS) que desempeñan un papel importante a la hora de regular negativamente la activación del IRS, ya sea por interacciones directas o indirectas. La expresión de estas proteínas es inducida por el tratamiento con insulina en varios tejidos y líneas celulares. Una vez se induce la síntesis de proteínas SOCS, éstas se asocian con IRS alterando su

estructura y la unión de IRS al IR así como a las proteínas efectoras PI3K. Así mismo promueven la degradación y disminución en el número de células positivas (Youngren, 2007).

Regulación en las vías de señalización activadas por IRS

Las enzimas fosfatasas de los lípidos, encargadas de la desfosforilación de los productos obtenidos tras la activación de PI3K están involucradas en esta regulación. Entre estas enzimas encontramos SHIP-2 (inositol fosfatasa con dominios SH2) y PTEN (fosfatasa y homólogo de tensina removido en el cromosoma 10), que son fosfatasas que inducen la desfosforilación del PIP3 en las posiciones 5' y 3' produciendo fosfatidilinositol 3,4 bifosfato y fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (Hori y col., 2002).

Estas desfosforilaciones sobre los lípidos de membrana tienen efectos biológicos diferentes, así PTEN funciona como un supresor de tumores ya que se ha observado que mutaciones en esta enzima producen síndromes neoplásicos sin efectos metabólicos (Chin y col., 2014). En cambio, observamos en ratones "knock out" de SHIP-2 un incremento en la sensibilidad a la insulina secundario al aumento en la producción de PIP3 y por lo tanto al aumento en la actividad de proteínas que actúan más allá de PI3K y que están involucradas en procesos relacionados con el transporte de glucosa (Hori y col., 2002; De Lorenzo y col., 2013).

Resistencia a la insulina.

La resistencia a la insulina es un estado patológico en el que las células que de forma habitual responden a la insulina dejan de hacerlo. Los individuos con resistencia a la insulina están predispuestos al desarrollo de diabetes mellitus tipo 2. Esta condición se asocia frecuentemente con otras alteraciones de la salud como la hipertensión, enfermedades cardiovasculares, infecciones y obesidad.

Comprender los mecanismos implicados en la fisiopatología de la resistencia a la insulina con el fin de generar tratamientos que actúen directamente sobre la diana, ha sido y seguirá siendo tarea de muchos grupos de investigación.

Desde el punto de vista metabólico la resistencia a la insulina se manifiesta por una disminución en el transporte de glucosa inducido por la insulina en adipocitos y músculo esquelético, un aumento de la producción de glucosa hepática y alteraciones en el metabolismo de lípidos en tejido adiposo y hepático (Le Roith y Zick, 2001; Sesti, 2006; Bhattacharya, 2007).

Molecularmente, los mecanismos que inducen resistencia a la insulina pueden ser diversos y variar de un individuo a otro. Sin embargo, la resistencia a la insulina es la consecuencia de una deficiente señalización de la insulina causada por mutaciones o modificaciones post-transduccionales del IR o de las moléculas efectoras de su activación (Bhattacharya, 2007).

Hay casos debidos a un defecto en la unión de la insulina a su receptor, pero más frecuentemente el problema va más allá del receptor, debido a alteraciones posteriores, que alteran desde la funcionalidad del propio receptor hasta la actividad de las proteínas efectoras que desempeñan funciones importantes en la señalización intracelular desencadenada por la insulina (Le Roith y col., 2003).

En los animales insulinoresistentes y en modelos in vitro, se puede demostrar una reducción de la activación de la señalización de la insulina a través de la vía de la IRS-1/IP3-quinasa, que da lugar a una disminución de la captación de glucosa con el consiguiente aumento de su concentración en el torrente circulatorio, reducción de la síntesis de óxido nítrico (NO) y reducción de la utilización de glucosa en los tejidos diana de la insulina. La misma reducción del transporte de glucosa se percibe en las células beta pancreática, induciendo a su vez un aumento compensatorio de la secreción de insulina y generando un círculo vicioso imparable. Sin embargo, al mismo tiempo, la vía de la insulina a través de la MAPK se mantiene inalterada (Montagnani y cols, 2002).

Es fácil comprender que este desequilibrio selectivo de las dos vías de transducción de señal en situaciones como la hiperinsulinemia puede conducir a una señal excesiva de proliferación/fomento del crecimiento, y al mismo tiempo permitir que se mantengan normales el transporte y la homeostasis de la glucosa. La hiperinsulinemia compensatoria estimula diversos fenómenos proliferativos y proaterogénicos en las células endoteliales y del músculo liso vascular. Estos efectos incluyen un aumento de la producción de inhibidor de activador de plasminógeno tipo 1 (PAI-1), endotelina, citoquinas proinflamatorias y un aumento de la expresión de las moléculas de adhesión (Montagnani y cols, 2002).

Las concentraciones plasmáticas elevadas de insulina en estados de resistencia a la insulina pueden desencadenar también un círculo vicioso que aumente aún más la resistencia a la insulina (Combettes-Souverain, 1998) mediante la supresión de los efectos que se producen a través del eje IP3K/AKT/NO, y ello puede desequilibrar el sistema como consecuencia de un aumento neto de los efectos relacionados con la activación de la MAPK. Dado que la insulina desencadena una serie de efectos biológicos a través de la unión y activación de su receptor (IR), dotado de actividad de tirosin-quinasa sobre sustratos específicos, como IRS -1 y -2 (Cheatham y col, 1995) los ratones con una delección específica de los genes de IRS-1 e IRS-2 muestran un fenotipo de resistencia a la insulina (Araki y cols, 1994). Todo esto a nivel retiniano se traduce en una serie de cambios celulares, y por ende histológicos en la retina, con los consiguientes signos clínicos en la misma, como los que observamos en la retinopatía diabética.

Así mismo, estudios recientes han demostrado que la insulina puede tener efectos profundos sobre la supervivencia de las neuronas dentro de la retina. En el estudio publicado por Fischer y colaboradores en el año 2010 se determinó

como el factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1) influye en las células retinianas, en particular, en las células gliales (Fischer y col. 2010).

Las células gliales de Müller, como ya hemos comentado anteriormente, son células predominantemente de apoyo en la retina, que proporcionan soporte estructural, nutritivo y metabólico a las neuronas. En consecuencia, la actividad de las células de Müller impacta en la función y en la supervivencia de las neuronas de la retina. La actividad alterada de dichas células a menudo ocurre en las enfermedades retinianas. (Bringmann and Reichenbach 2001; Bringmann y col. 2006; Giaume y col. 2007).

Dicha actividad se ve dramáticamente alterada en retinas dañadas o cuando son estimuladas por factores de crecimiento exógenos (Fischer, 2005; Bringmann y col. 2006; Giaume y col. 2007).

El conocimiento de dichos factores secretados que influyen en la actividad de las células de Müller en la retina están siendo descubiertos. Así por ejemplo, se ha visto que la insulina y FGF2 en combinación, y nunca por separado, hacen que las células de Müller se diferencien, proliferen, expresen factores de transcripción normalmente expresados por los progenitores de la retina y produzcan algunas neuronas nuevas. (Fischer y col. 2002).

Como conclusión, la hiperglucemia y la señalización de la insulina deteriorada son consideradas como importantes factores en la patología de la retina en la retinopatía diabética. Numerosos estudios apoyan que estos dos factores dañan la glía de la retina, así como las células neuronales al comienzo de la enfermedad, incluso antes de que observemos los primeros signos clínicos de la misma, como son los microaneurismas.

Anatomía de la Retina.

La retina es la capa más interna del globo ocular y es el asiento de los receptores visuales encargados de captar el estímulo luminoso y transformarlo en impulso nervioso para posteriormente enviarlo al cerebro.

Se divide a su vez en dos partes bien diferenciadas, una la retina posterior o visual, que es la más extensa y la verdadera parte funcional de la retina, y otra la retina anterior o ciega. La separación entre ambas viene delimitada por la ora serrata, línea que se sitúa aproximadamente a 6 mm de la unión esclerocorneal.

La retina ciega tapiza la cara posterior del cuerpo ciliar y del iris. Se caracteriza por la ausencia de neuronas, estando formada sólo por el estrato pigmentario y el cerebral (células gliales).

La retina visual a su vez se divide en otras dos partes: la retina central o polo posterior y la retina periférica. En el polo posterior es donde se localizan zonas muy importantes como la mácula y la papila.

La papila o disco del nervio óptico, es una estructura situada en posición nasal con respecto a la mácula. En el campo visual aparece como un punto ciego, pues carece de fotorreceptores. Se forma por la confluencia de los axones de las células ganglionares, formando una depresión central que se denomina excavación del nervio óptico.

La mácula es el punto focal del ojo, óptica, funcional o anatómicamente hablando. Es un área altamente especializada que permite la agudeza visual fina, la diferenciación de las formas, colores y la estereopsis o visión en tres dimensiones. Esta zona corresponde al área contenida entre las arcadas vasculares y tiene al menos dos capas de núcleos de células ganglionares. Tiene forma elipsoide con un diámetro aproximado de 5,5 mm que se corresponden con los 18° centrales del campo visual. La mácula a su vez se subdivide en otras partes. La fovea es una depresión en el centro de la mácula, mide 1,5 mm de diámetro en el borde y 400 micras en la base. Es la parte encargada de la visión central y de los colores. En el centro de la fovea se aprecia otra depresión denominada foveola o foveola foveal. Tiene una extensión de 0,2 mm y un grosor de 0,13 mm. Esta zona retiniana es extremadamente delgada y todo su espesor está integrado por fotorreceptores, concretamente conos, altamente especializados y adaptados careciendo de las capas más internas de la retina (Saraux y cols., 1985; Park y cols., 1998; Pulido, 2002; Kaufman y Alm, 2004; Armadá y cols., 2010).

La vascularización de todas estas estructuras depende de ramas de la arteria carótida interna. Así los dos tercios internos de la retina están irrigados por la arteria central de la retina, rama de la arteria oftálmica a su vez rama de la carótida interna. Esta arteria central penetra en el interior del ojo introduciéndose dentro del nervio óptico 12 mm por detrás del globo ocular. Ya dentro del ojo, a

nivel de la papila, se bifurca en ramas superior e inferior, y éstas a su vez en ramas temporal y nasal, las cuales se ramifican en vasos más pequeños en la capa de fibras nerviosas y células ganglionares por toda la retina, a excepción de la fovea. El tercio externo de la retina y la fovea central reciben irrigación a partir de la arteria coriocapilar (Clement, 1994; Vaughan y cols., 1997; Pulido, 2002).

Los capilares de la retina están formados por un endotelio continuo, estando las células selladas por uniones estrechas y posteriormente rodeadas de pericitos. Todo esto hace que se forme lo que se denomina barrera hematorretiniana, fundamental para el correcto desarrollo de la función retiniana.

Histología de la Retina.

Desde el punto de vista histológico, la retina se divide en dos partes bien diferenciadas, una más superficial que la forma el epitelio pigmentario de la retina y otra más profunda que es la porción neurosensorial o retina sensorial, siendo una membrana nerviosa altamente diferenciada.

Epitelio pigmentario de la Retina.

El epitelio pigmentario separa los segmentos externos de los fotorreceptores de la coroides, creando una barrera entre la circulación coroidea y la retiniana, pero permitiendo el intercambio de iones, agua y metabolitos. Esta separación real es debida a la existencia de complejos de unión (zonulae adherens, occludens y gap-junctions) entre las células del epitelio pigmentario, lo que hace que estas células estén unidas de forma eficaz. Esto junto a los mecanismos de transporte activo forman la “barrera hematorretiniana externa”.

Este epitelio está formado por una monocapa de células cúbicas, pigmentadas, pues alojan gránulos fusiformes de melanina en su interior. La función desempeñada por dicho pigmento es la de absorber la luz con una longitud de onda que oscila entre 400 y 800 nm, limitando con ello la cantidad de luz que se refleja o se dispersa, protegiendo de este modo a los fotorreceptores. La superficie apical de estas células tienen prolongaciones de hasta 7 micras de largo, que se relacionan con los segmentos externos de los fotorreceptores, siendo aquí donde se localizan los gránulos de melanina.

Otra de las funciones realizadas por este epitelio es la fagocitosis de los restos de los segmentos externos que se renuevan a diario. Este material fagocitado, pasa al interior de los lisosomas. Otras funciones desempeñadas son la regulación de la inmunidad intraocular y la captación de radicales libres oxidantes.

El epitelio pigmentario presenta una membrana basal que se integra dentro de la membrana de Bruch, membrana que marca la separación entre la retina y la coroides. A parte de dicha membrana basal, la membrana de Bruch tiene otras cuatro capas, entre las que se encuentran una banda interna de colágeno, una capa elástica, una banda externa de colágeno y la membrana basal del endotelio de la coriocapilar.

Cuando observamos estas estructuras al microscopio electrónico, observamos un aumento de la superficie basal del epitelio debido a la formación de invaginaciones, lo que genera un aumento de la superficie de intercambio con la capa coriocapilar (Saraux y cols., 1985; Geneser, 2000; Armadá y cols., 2010).

Retina sensorial o neuroretina.

La retina sensorial o neuroretina es una estructura formada por un conglomerado de células con funcionalidad diversa. Podemos dividir estas células en dos grandes grupos: Neuronales, de transmisión vertical o de transmisión horizontal, y células gliales.

Células neuronales

Fotorreceptores

Los fotorreceptores son células altamente especializadas, encargadas de captar el estímulo luminoso y transformarlo en estímulo nervioso, proceso conocido como fototransducción. Existen dos tipos de células fotorreceptoras, los conos y los bastones, aunque morfológicamente varían de una a otra, la estructura funcional es semejante en ambas. Ambas son células alargadas con una expansión externa donde se localiza el segmento externo, el segmento interno y la unión entre ambos conocida como cilio conector. Después tienen un segmento interno y un cuerpo celular donde se aloja el núcleo y que forma parte de la capa nuclear externa.

La diferencia entre conos y bastones, radica en la forma de la expansión externa, en el pigmento fotosensible que contienen y en la forma de la parte terminal de la expansión interna. Así los bastones presentan una expansión externa de forma cilíndrica, con unos discos de 2 micras de diámetro en constante renovación que contienen el pigmento fotosensible, en este caso, la rodopsina, un pigmento muy sensible a bajas intensidades de luz del espectro azul-verde (500 nm de longitud de onda), siendo por tanto los responsables de la visión nocturna. La parte terminal de la expansión interna tiene una dilatación conocida como esférula de aproximadamente 3 micras de diámetro, siendo esta parte donde se realiza la sinapsis con las células bipolares. (Kolb y col., 1994).

Los conos son menos numerosos que los bastones, a excepción de la mácula. Existen 3 tipos de conos según su sensibilidad a diferentes longitudes de onda (L = roja, M = verde y S= azul). Su expansión externa, como su propio nombre indica, tiene forma cónica. El pigmento de estas células es la opsina y la terminación de la expansión interna tiene forma de meseta de aproximadamente 5 micras, llamada pie o pedículo del cono.

La retina es el verdadero órgano receptor, es la encargada de recibir el estímulo luminoso y transformarlo en impulso nervioso, para posteriormente enviarlo al

cerebro. Esta transformación del impulso se realiza a través de diferentes reacciones bioquímicas.

Cuando los rayos de luz, dentro del espectro visible para el ser humano, penetran en el interior del ojo, tras atravesar todas las capas de la retina, inciden sobre los fotorreceptores, células altamente especializadas, desencadenando el proceso de transformación de la señal, conocido como fototransducción.

En la oscuridad, los conos y los bastones se encuentran parcialmente despolarizados gracias a una corriente continua de iones sodio (-40 mV) y se libera L-glutamato que alcanza a las neuronas de segundo orden.

Cuando incide un haz de luz sobre los fotorreceptores, el pigmento que éstos contienen sufre una serie de reacciones. Así la rodopsina de los bastones (formada por la proteína escotopsina y el retineno, un pigmento carotenoide) se isomeriza de 11-cis-retinal a all-trans-retinal, descomponiéndose la rodopsina en escotopsina y alo-trans-retinal y produciendo el cierre de los canales de sodio, la hiperpolarización de la célula y la interrupción de la liberación basal de L-glutamato.

Este cierre se produce por la disminución de la concentración del guanosin monofosfato cíclico (cGMP), debida a la hidrólisis generada por la enzima fosfodiesterasa. Enzima previamente activada por el guanosin trifosfato (GTP) unido a la proteína transducina (Baylor, 1987; Atwell, 1986).

Este proceso es similar en los conos pero con el pigmento característico de cada uno de ellos tal y como se muestra:

FOTORRECEPTOR	PIGMENTO VISUAL	PROTEÍNAS
Bastón	Rodopsina	11-cis-retinal + escotopsina
Cono Rojo	Fotopsina I	11-cis-retinal + porfiropsina
Cono Verde	Fotopsina II	11-cis-retinal + iodopsina
Cono Azul	Fotopsina III	11-cis-retinal + cianopsina

Células Horizontales

La retina de los mamíferos contiene varios tipos de células de asociación lateral a nivel de la capa plexiforme externa, denominadas células horizontales. Estudios llevados a cabo mediante microscopía óptica combinada con microscopía electrónica y con el método de tinción de Golgi han demostrado que en la retina humana existen tres tipos de células horizontales (Kolb y col., 1994). Las células horizontales de tipo I no tienen axón y contactan preferentemente con conos rojos y verdes y en menor medida con conos azules. Las células horizontales de

tipo II o células horizontales con axón, contactan con conos azules a nivel de su axón terminal pero también con otros tipos de conos a nivel de sus terminaciones dendríticas. Las células horizontales de tipo III son similares a las células de tipo I, aunque de mayor tamaño y evitan cualquier contacto con conos azules (Ahnelt y Kolb, 1994). A nivel foveolar están ausentes.

Los fotorreceptores hacen sinapsis con las células horizontales y con las células bipolares. Cuando los fotorreceptores están en oscuridad despolarizados, las células horizontales también lo están y cuando se activan con la luz los primeros hiperpolarizándose, lo hacen las segundas. Las células horizontales regulan la actividad de la periferia. Esta transmisión sináptica usa el glutamato como neurotransmisor existiendo canales de calcio dependiente y canales de calcio independiente (Schwartz, 1986).

Células Bipolares

Las células bipolares como su propio nombre indica son células formadas por dos polos que se encuentran en direcciones opuestas. Así el núcleo de estas células se encuentra entre las dos prolongaciones o polos formando la capa nuclear interna. La prolongación externa o dendrítica hace sinapsis con los fotorreceptores formando la capa plexiforme externa, y la prolongación interna o axónica establece sinapsis con las células ganglionares y amacrinas formando la capa plexiforme interna.

Según hagan sinapsis con conos o bastones diferenciamos dos tipos de células bipolares: Células bipolares de bastones y de conos, y, entre ellas, células enanas y difusas.

Las células bipolares de los bastones, morfológicamente se caracterizan por tener un soma alargado verticalmente, con volumen, en el que se encuentra un citoplasma fino ocupado por un gran núcleo. Su prolongación dendrítica hace sinapsis con la expansión interna de los bastones, es decir, con las esférulas, pudiendo sinaptar varios bastones con una sola célula bipolar. La prolongación interna o axónica de estas células bipolares hace sinapsis con las células ganglionares, de modo, que una sola célula bipolar puede unirse con 4 células ganglionares, siempre por mediación de células amacrinas y no directamente.

Las células enanas, a diferencia, de las células bipolares para bastones, hacen sinapsis con un solo cono y con una sola célula ganglionar. La unión que establecen con el cono puede ser de dos tipos distintos según la morfología de la terminación dendrítica. Así unas células tienen una terminación aplanada que entra en contacto con la superficie plana del pedículo del cono y otras células tienen invaginaciones que se interdigitan con otras existentes en el pedículo del cono.

Las células difusas tienen la misma morfología en sus dendritas que las células enanas. La diferencia con aquellas es que estas células establecen sinapsis con varios conos y varias células ganglionares.

La sinapsis de los fotorreceptores con las células bipolares es diferente a la que hacen con las células horizontales. Estas células son las primeras neuronas del sistema visual que tienen organización espacial en campos receptivos, y modulan la actividad central. Cuando los fotorreceptores se hiperpolarizan y disminuye la liberación de glutamato, el efecto sobre las células bipolares dependerá del tipo de receptor que tengan. Si son células OFF, se produce una hiperpolarización de la célula bipolar y por tanto no transmite señal alguna. Por el contrario las células ON, se despolarizan con la consiguiente transmisión de señal hacia las células ganglionares.

Células Ganglionares

Las células ganglionares constituyen el tercer gran eslabón de células nerviosas retinianas. Son unas células de gran tamaño (10-30 micras), con un núcleo redondo, nucléolo visible al microscopio óptico y presencia de corpúsculos de Nissl. Son células multipolares, con múltiples proyecciones que se extienden lateralmente en la capa plexiforme interna. Sus axones son los que forman la capa de fibras nerviosas de la retina, dirigiéndose a la papila para formar el nervio óptico, siendo amielínicas hasta que no atraviesan la lámina cribosa. Existen al menos 18 tipos distintos de células ganglionares, pero los dos tipos principales son las células P o enanas, que proyectan a las capas parvocelulares del núcleo geniculado lateral. Poseen una única dendrita y hacen sinapsis con una única célula bipolar enana. Las células M o parasol, que proyectan a las capas magnocelulares y hacen sinapsis con las células bipolares para bastones y las células bipolares difusas.

Las células ganglionares en su funcionamiento son similares a las células bipolares, tienen una organización en campos receptivos con dos zonas anulares de respuestas opuestas. Su activación se produce por activación directa de las células bipolares o por la acción de las células amacrinas colinérgicas. Los impulsos inhibitorios se deben a la acción de células amacrinas glicinérgicas o gabaérgicas. Diferenciamos tres tipos de células ganglionares: las células ON, que responden con un pico de descarga breve a la aparición de la luz y mantienen la señal mientras dura el estímulo luminoso. Las células ON-OFF, que solo emiten descargas con el inicio y el fin del estímulo y las células ganglionares OFF que se mantienen quiescentes hasta que el estímulo desaparece y entonces empieza su actividad eléctrica (Armada y cols., 2010).

Posteriormente la señal va por los axones de las células ganglionares que conforman el nervio óptico y la información visual sale del globo ocular para alcanzar los centros superiores del sistema nervioso central donde la información será procesada y se hará consciente con el resultado final de la percepción visual.

En todo este proceso, a nivel intracelular se producen decenas de reacciones bioquímicas y activación de diferentes cascadas enzimáticas necesarias para el mantenimiento de la buena función celular, de su crecimiento, proliferación y diferenciación; entre las que se encuentra la vía desencadenada por activación del receptor de insulina, y concretamente en las funciones desarrolladas por el sustrato 2 (IRS-2).

Células Interplexiformes

Las células interplexiformes fueron descritas por primera vez por el Dr. Antonio Gallego en la retina de gato (1971). Posteriormente se han encontrado en la retina de casi todas las especies. Presentan un cuerpo situado a nivel de la capa nuclear interna desde donde salen una serie de ramificaciones que se extienden por la capa plexiforme interna y llegan hasta la capa plexiforme externa donde establecen sinapsis.

Células Amacrinas

Las células amacrinas, también conocidas como espongioblastos de asociación, fueron descritas por vez primera por Dogiel, si bien fueron los estudios de Ramón y Cajal (1892) los que permitieron precisar mejor su morfología, distribución y tipos celulares. Estas células tienen un cuerpo celular o soma de forma triangular situado en la parte más interna de la capa nuclear interna y unas prolongaciones que se extienden por la capa plexiforme interna. Están ausentes a nivel foveolar. No reciben conexiones directas de los fotorreceptores, sino sólo de células bipolares y de otras células amacrinas, estableciendo a su vez conexiones con células ganglionares y retroalimentando a las células bipolares, formando una vía de asociación lateral a nivel de la plexiforme interna. Algunos tipos de células amacrinas presentan largos procesos, que pueden actuar como verdaderos axones, pero estos procesos permanecen siempre dentro de la retina y no la abandonan por el nervio óptico como sucede con los axones de las células ganglionares.

Capas o estratos retinianos.

De este modo, la retina humana queda constituida a partir de las células descritas anteriormente, que se disponen formando diez capas o estratos. Esta organización fue descubierta por Santiago Ramón y Cajal, quien con el microscopio óptico fue capaz de identificar todas las capas. La retina, tiene un grosor medio de 0,3 mm, siendo más fina a nivel foveolar y periferia y más ancha alrededor del nervio óptico. (Saraux y col., 1985; Amat y col., 1995; Geneser, 2000).

Las diferentes capas desde lo más externo a lo más interno son:

Epitelio Pigmentario de la retina: descrito anteriormente, es una monocapa de células cuboideas, que está separada de la coriocapilar por la membrana de Bruch.

Capa de Fotorreceptores: aquí se localizan los segmentos externos de los conos y de los bastones.

Limitante Externa: se forma por la unión de los segmentos internos de los fotorreceptores a las células de Müller y por la unión de las prolongaciones de éstas entre sí.

Capa Nuclear Externa: en esta capa se alojan los núcleos de los fotorreceptores, es decir, de conos y bastones.

Capa Plexiforme Externa: es una capa de conexión. En esta capa sinaptan los axones de conos y bastones con las dendritas de células horizontales y de células bipolares. También aquí hay conexiones con las prolongaciones de las células de Müller.

Capa Nuclear Interna: en esta capa encontramos los núcleos de cuatro tipos celulares. Las células principales aquí son las células bipolares, encargadas de la transmisión vertical del impulso nervioso. A parte se encuentran los núcleos de células de asociación como son las células horizontales y las células amacrinas. El cuarto tipo celular que se aloja en esta capa son las células de Müller que tienen una función de soporte y nutrición.

Capa Plexiforme Interna: es otra capa de conexión. Aquí sinaptan las células bipolares con las dendritas de las células ganglionares, aunque también establecen contacto las células amacrinas y las prolongaciones de las células de Müller. Es una capa con gran concentración de acetilcolinesterasa, enzima muy importante en la neurotransmisión.

Capa de Células Ganglionares: en esta capa encontramos el núcleo de estas células.

Capa de Fibras Nerviosas: capa formada a partir de los axones de las células ganglionares. Forman fascículos de fibras que se disponen paralelos a la superficie retiniana y que están separados entre sí por las prolongaciones de las células de Müller. Estos axones que forman esta capa son amielínicos y convergen todos ellos en la papila óptica formando el nervio óptico.

Capa Limitante Interna: es la capa más interna de la retina. Establece la separación con el vítreo y funcionalmente es una membrana basal con autonomía propia.

Células gliales.

En 1846, Virchow describe un tejido existente en el cerebro y en la médula espinal, al que asigna la función de soportar y proteger las células ganglionares y sus prolongaciones; este tejido se denomina neuroglía o glía. La palabra glía deriva del griego bizantino γλία cuyo significado es “liga”, “unión”, “pegamento”.

Posteriormente, Ramón y Cajal (1913, 1916) y Río Hortega (1919, 1921), usando técnicas de impregnación metálica, sientan las bases para el estudio de la glía

mediante microscopía óptica, bases que años más tarde emplearían Penfield (1932), Glees (1955) y Windle (1958).

La glía se localiza fundamentalmente en el Sistema Nervioso Central, donde el número de sus elementos celulares varía de unas zonas a otras, pero además, también podemos encontrar glía en el Sistema Nervioso Periférico, envolviendo a las células nerviosas.

La clasificación clásica de la glía se la debemos a Ramón y Cajal quien allá por 1909-1911 realizó las primeras clasificaciones, que se han mantenido bastante inalteradas a lo largo de los años por falta de consenso entre los grandes expertos, si bien gracias al desarrollo de las técnicas de inmunohistoquímica, biología molecular y genética la clasificación tradicional de la glía ha cambiado un poco.

Ramón y Cajal así confirmó estudios previos realizados por Nissl en 1899, Robertson en 1900 y Alzheimer en 1904. Años más tarde Río Hortega (1919, 1932) usando el método del carbonato de plata, corrobora plenamente estas observaciones. Así pues en la clasificación clásica se distinguen tres tipos celulares diferentes: los astrocitos, denominados así por su aspecto estrellado, los oligodendrocitos, pequeñas células con prolongaciones arborescentes y las células microgliales o microglía.

Las clasificaciones actuales de la glía diferencian entre glía del sistema nervioso central y glía del sistema nervioso periférico.

La glía central diferencia la glía intersticial de la glía epitelial. La astrogλία, la oligodendrogλία y la microglía son glía intersticial. Mientras que las células ependimarias, las de los plexos coroideos y los tanicitos son glía epitelial.

La glía periférica la constituyen las células de Schwann, las células capsulares o satélites, las células terminales o capsulares de receptores, las células telogliales o capsulares motoras y las células de soporte de epitelios sensoriales.

En la retina, existen tres clases principales de células gliales: los astrocitos, las células de Müller y la Microglía (Ogden, 1994; Park y col., 1998; Geneser, 2000).

Astrocitos.

Hay dos tipos principales de astrocitos, los fibrosos y los protoplásmicos.

Los astrocitos fibrosos se localizan en la sustancia blanca, entre los axones de las neuronas. Se caracterizan por tener un citoplasma más escaso que los astrocitos protoplásmicos, con un núcleo más grande, reniforme o irregular y una cromatina laxa. Tienen gran cantidad de filamentos, que constituyen el componente fundamental y que se disponen de forma paralela en las prolongaciones citoplasmáticas. Dichas prolongaciones son menos numerosas que en los otros astrocitos, más finas, más largas y con menos ramificaciones. Son semejantes a los neurofilamentos pero más compactos y de menor tamaño (Wuerker, 1970), lo que hace que al contener muchas gliofibrillas, sea PGFA positiva muy marcada.

Los orgánulos aparecen en la periferia del citoplasma, a excepción de las mitocondrias que están próximas al núcleo (Mugnaini y Walberg, 1964; Peters y Vaughn, 1967; Holtzman y col., 1973).

Los astrocitos protoplásmicos se localizan en la sustancia gris entre las células nerviosas. Pueden aparecer tanto de forma aislada como formando grupos, en los que los cuerpos están próximos y las numerosas expansiones, de corto tamaño, gruesas y muy ramificadas se disponen de forma radial. Su citoplasma es un poco más abundante que los anteriores astrocitos, donde podemos encontrar numerosas mitocondrias (gliosomas) y gliofibrillas pero en menor cantidad que en los astrocitos fibrosos, lo que hace que la tinción de la misma sea positiva pero más débil comparada con los primeros. Tiene un núcleo un poco más pequeño y centrado con cromatina laxa.

Además se reconocen como astrocitos, la glía Held que emite prolongaciones que se ponen en contacto con la piamadre. Las células de Müller: se encuentran en la retina. Forman un tronco que ocupa todo el grosor retiniano, presentando función de sostén. La glía de Bergman del cerebelo: emite distintas prolongaciones que rodean a las dendritas de las células de Purkinje. Las células en velo y las células en candelabro.

Glía retiniana

En la retina podemos diferenciar básicamente dos tipos celulares que forman parte de la macroglía, por un lado los astrocitos y por otro las células de Müller (Newman, 1996, 2001).

Aunque ambos tipos celulares son neuroectodérmicos, sus orígenes son diferentes. Las células de Müller se generan a partir de las células neuroepiteliales de la retina y pueden compartir un progenitor común con las neuronas (Turner y Cepko, 1987) mientras que los astrocitos se generan fuera de la retina y la invaden a través de la cabeza del nervio óptico, por los axones de las células ganglionares de la retina, en la semana 13 de la gestación (Seiler y Aramat, 1994).

Los astrocitos, generalmente, no invaden las regiones donde no hay células precursoras vasculares, como la fovea o las capas más externas de la retina (Ramírez y col., 1994, 1996; Gariano y col., 1992, 1997).

Los astrocitos son las células más grandes de toda la glía. Fueron descritas por Ramón y Cajal en 1913 utilizando la técnica de sublimado de cloruro aurico. Tienen una forma estrellada, de ahí su nombre, con un tamaño que puede alcanzar las 40 micras.

Presentan un cuerpo celular más o menos redondeado del cual emergen prolongaciones en todas las direcciones del espacio. Su núcleo ocupa dos terceras partes del citoplasma, de localización central y forma redondeada u oval. En su citoplasma, escaso, presenta todos los orgánulos, pero llama la atención la presencia de filamentos intermedios específicos denominados gliofibrillas (8nm).

Este tipo de filamentos intermedios pertenecen al tipo III de los mismos (descritos en los trabajos de Lazarides (1982), Osborn (1983) y Steinert (1984)), formados preferentemente por la proteína gliofibrilar ácida (GFAP), presente únicamente en la astrogliá (Rueger y col., 1979), por desmina (Dahl y Bignami, 1982) y periferina.

Estos filamentos intermedios se caracterizan por ser mucho menos solubles que el resto de los filamentos. Están formados por una familia de proteínas que se distinguen unas de otras, tanto por su tamaño como por su secuencia de aminoácidos, cuyas características antigénicas se conservan en todos los filamentos intermedios (Pruss y col., 1981). Su relativa insolubilidad y su lento turnover determinan que las funciones de los mismos sean más mecánicas que dinámicas (Steinert y col., 1984).

La GFAP puede teñirse específicamente con anticuerpos, lo que permite establecer la cantidad existente de dichas células (Dahl y Bignami, 1973; Juanes y col., 1989; Schnitzer, 1990), aunque al microscopio pueden identificarse los astrocitos según el número de fibrillas que tienen en su citoplasma y según la formación de pedicelos (Mugnaini y Walberg, 1964; Maxwell y Kruger, 1965; Palay, 1966; Vaughn y Peters, 1967, 1971; Chan-Pala y Palay, 1972; Kudo, 2007).

Los astrocitos también tienen microtúbulos, microfilamentos y gran cantidad del enzima glutamina sintetasa (Noremborg y Martínez-Hernández, 1979), enzima encargada de la síntesis de glutamina a partir de glutamato, ATP y amonio. Se ha visto como algunas de las prolongaciones de estas células se ponen en contacto con la membrana basal de los capilares sanguíneos, rodeándolos con su parte terminal, aplanada, formando lo que se denomina pies vasculares, terminales o pedicelos, que son la base de la barrera hemato-encefálica.

Cuando algunas prolongaciones de los astrocitos entran en contacto con la superficie del sistema nervioso central forman la membrana limitante glial. Si entran en contacto con la piamadre, forman la barrera piogial.

A nivel retiniano, los astrocitos se encuentran casi exclusivamente a nivel de la capa de fibras del nervio óptico. Su morfología cambia según su localización, de manera que podemos diferenciar básicamente dos tipos de astrocitos.

Los astrocitos elongados situados en la retina central, con múltiples prolongaciones que se sitúan paralelas a la capa de fibras nerviosas sin contactar con los vasos, y otros, los astrocitos estrellados, situados en la retina periférica (Schnitzer, 1990), con múltiples prolongaciones finas, que cruzan la capa de fibras nerviosas y entran en contacto con los vasos.

Wolter en 1959 describió un tercer tipo de astrocitos que rodean las fibras nerviosas y no contactan con los vasos. Los núcleos de los astrocitos se localizan en la capa de fibras nerviosas y envían sus prolongaciones hasta la capa nuclear interna. Ramírez y col. (1998), localizaron astrocitos en la capa de fibras nerviosas y en la capa de células ganglionares de la retina humana, no encontrando estas

células ni en la plexiforme ni en la nuclear externa. Tampoco se encuentran astrocitos en la fovea avascular o en la ora serrata, por lo que podemos concluir que no existen donde no hay vasos retinianos.

Müller describió, en 1851, unas células alargadas y orientadas radialmente, que hoy se conocen en honor a él como células de Müller.

Estas células suponen el principal elemento glial de la retina de los animales vertebrados. Presentan una densidad electrónica mayor que los astrocitos, debido a una mayor concentración de glicógeno y filamentos.

Las células de Müller son células de gran tamaño, con un soma situado a nivel de la capa nuclear interna y sus prolongaciones citoplasmáticas extendidas desde la membrana limitante externa a la interna. Presentan un importante número de microtúbulos (Ikui y col., 1976), aunque el resto de las características son muy similares a las de los astrocitos (Reale y Luciano, 1974).

La unión de los procesos celulares de las células de Müller entre sí y con los fotorreceptores forma la membrana limitante externa. Así mismo, las membranas basales de las prolongaciones terminales de las células de Müller (pies terminales) se incorporan a la membrana limitante interna.

Las células de Müller son glía radial, y como tal, se encargan de rellenar los huecos entre las células neuronales y envolver los somas de éstas a nivel de las capas nucleares. Presentan prolongaciones horizontales, más numerosas en las capas retinianas donde hay sinapsis (capas plexiformes externa e interna).

Las células de Müller anatómica y funcionalmente están íntimamente asociadas con las células nerviosas de la retina y los vasos sanguíneos. Entre sus funciones están la orientación y posicionamiento de las neuronas durante el desarrollo embrionario de la retina, y, ya en la vida adulta, se encargan del mantenimiento del potasio extracelular y de otros iones, de la degradación de neurotransmisores como el glutamato, el GABA (Sarthy, 1982) y también la glicina (Barnett y Pow, 2000; Bringmann y col., 2006). Intervienen en la regulación de los niveles de glutamina a través de la glutamina sintetasa (Riepe y Norenburg, 1977).

Las células de Müller también expresan y liberan factores tróficos que contribuyen a la supervivencia de las neuronas así como intervienen en la regulación del flujo sanguíneo y en la angiogénesis (Bringmann A. y col., 2009).

De este modo, una disfunción en las células de Müller o su propia muerte en el contexto de una hiperglucemia conllevan a la aparición de complicaciones nerviosas y vasculares en la retina, con el consiguiente desarrollo de la retinopatía diabética.

Las células microgliales derivan del mesodermo (Kershman, 1949) circundante a las vesículas ópticas, por lo que estrictamente no son células neurogliales como el resto de células, que derivan del epitelio del tubo neural.

Estas células pueden encontrarse en cualquier parte de la retina, siendo más numerosas en las capas plexiformes.

En las tinciones de Golgi, aparecen como células multipolares, con pequeños cuerpos celulares y unos procesos irregulares y cortos. Al microscopio óptico se observan como células muy pequeñas y muy oscuras, siendo fáciles de identificar.

Tienen un cuerpo celular más o menos redondeado y pequeño, de donde salen muchas prolongaciones cortas, muy finas, irregulares y muy ramificadas. Tanto el cuerpo como las prolongaciones presentan muchas espinas.

El núcleo de pequeño tamaño puede ser oval o triangular característico, con cromatina condensada al microscopio electrónico. Tienen un citoplasma escaso, donde destacan la presencia de lisosomas y cuerpos multivesiculares. También se observan microtúbulos, filamentos y gránulos de glucógeno. Esto hace que sea relativamente fácil confundirlas con las células nerviosas de la retina, especialmente cuando su cuerpo celular se sitúa a nivel de una de las capas nucleares y sus procesos a nivel de las capas plexiformes.

La función principal de estas células es la fagocitosis, por lo que también se las conoce como histiocitos del sistema nervioso central, aunque también desempeñan la función de células presentadoras de antígeno, siendo una de las primeras líneas de defensa frente a una invasión.

Cuando examinamos un tejido retiniano normal observamos como las células de la microglía se disponen como si fuesen arañas sobre una red, con una forma dendrítica en situación de reposo. En cambio cuando se activan ante un microorganismo invasor o la presencia de daño celular, cambian la forma, adquiriendo un aspecto ameboide.

Están involucradas en el proceso de apoptosis de las células y la eliminación de las células muertas. Diferentes estudios sugieren que la inhibición de la activación de las células microgliales en el caso de daño del nervio óptico por ejemplo, puede aumentar el número de células supervivientes ganglionares de la retina y por lo tanto puede ser neuroprotector (Wang y col., 2015).

En el caso de la diabetes mellitus, dada la situación de inflamación crónica que esta patología supone, se produce la activación de la microglía estimulando ésta a su vez un ciclo de inflamación local con el consiguiente reclutamiento de leucocitos y la ruptura vascular, que a su vez produce la disfunción directa de la glia, con la muerte celular neuronal asociada a la liberación de sustancias citotóxicas, produciéndose así un círculo vicioso (Yang y col., 2009; Grigsby y col. 2014).

La barrera hematorretiniana

La retina mantiene una cierta separación o independencia del torrente circulatorio gracias a la presencia de una barrera hematorretiniana localizada en dos partes, la barrera hematorretiniana externa y la interna.

La barrera hematorretiniana externa está formada por el epitelio pigmentario de la retina. La parte de la célula que limita con la membrana de Bruch presenta numerosos pliegues y tiene una gran concentración de mitocondrias. La función de estas células es realizar el transporte y acumulación activa de metabolitos y excretar los productos de desecho hacia la capa coriocapilar del globo ocular.

La difusión libre desde la coriocapilar a la retina neuronal se ve impedida gracias a la existencia de uniones estrechas entre las células integrantes del epitelio pigmentario. La microscopía electrónica ha confirmado la rápida diferenciación de las células de este epitelio, poniendo de manifiesto la formación de complejos de unión (zonulae adherens, occludens y gap-junctions), desde los primeros estadios, antes de la invaginación de la cúpula óptica (Saraux y col., 1985). En la rata se ha comprobado que las células de este epitelio están bien desarrolladas en el momento del nacimiento (Weidman y Kuwabara, 1968). Estas uniones y los mecanismos de transporte activos forman la barrera hematorretiniana externa.

Por el contrario, la barrera hematorretiniana interna está formada por los capilares de los vasos de la retina, que histológicamente están formados por un endotelio continuo, presentan uniones estrechas entre sus células, una membrana basal y pericitos murales. Estas uniones estrechas limitan la difusión extracelular y los metabolitos sólo pueden alcanzar la retina neural mediante transporte activo (Park y col., 1998).

Esta barrera no es funcionante en el momento del nacimiento, habiéndose descrito que la formación y maduración de los vasos retinianos en la rata existe aproximadamente a partir del décimo día de vida (Bellhorn y col., 1981).

Hipótesis y Objetivos del Estudio

La retina es la capa más interna del globo ocular y forma el verdadero órgano receptor, pues es la encargada de recibir el estímulo luminoso y transformarlo en impulso nervioso para posteriormente enviarlo al cerebro.

La retina sensorial o neuroretina es una estructura formada por un conglomerado de células con funcionalidad diversa, por un lado las células neuronales, encargadas de transmitir la señal nerviosa generada a partir del estímulo lumínico y las células gliales que aportan sostén y sustrato a las anteriores y de cuyo buen funcionamiento dependerá la buena función de dicho órgano.

A nivel retiniano podemos encontrarnos con tres clases principales de células gliales: los astrocitos, las células de Müller y la Microglía.

Una disfunción a nivel de las células de Müller o su propia muerte en el contexto de una hiperglucemia conllevan a la aparición de complicaciones nerviosas y vasculares a nivel de la retina, con el consiguiente desarrollo de la retinopatía diabética.

En todo este proceso, a nivel intracelular se producen decenas de reacciones bioquímicas y activación de diferentes cascadas necesarias para el mantenimiento de la buena función celular, de su crecimiento, proliferación y diferenciación. Entre todas las vías de activación celular existentes nos vamos a centrar en una en concreto, la vía del receptor de la insulina, y concretamente en las funciones desarrolladas por el sustrato 2 (IRS-2).

Las proteínas IRS, shc y SH2 desempeñan un papel regulador importante en la cascada de señalización de la insulina. En su forma fosforilada, estas proteínas se convierten en puntos de anclaje para las proteínas intracelulares que contienen dominios SH2 complementarios.

En cambio, los efectos no metabólicos, proliferativos, mitógenos y proinflamatorios de la insulina se producen mediante la activación de la Ras (principalmente a través de shc y, en menor grado, de proteínas IRS), la Raf y las quinasas de proteína activada por mitógenos.

Dado que la insulina desencadena una serie de efectos biológicos a través de la unión y activación de su receptor (IR), dotado de actividad de tirosin-quinasa sobre sustratos específicos, como IRS1 e IRS2, los ratones con una delección específica de los genes de IRS1 e IRS2 muestran un fenotipo de resistencia a la insulina. Todo esto a nivel retiniano se traduce en una serie de cambios celulares, y por ende histológicos en la retina, con los consiguientes signos clínicos en la misma, como los que pueden ser observados en la retinopatía diabética.

Así mismo, estudios recientes han demostrado que la insulina puede tener efectos profundos sobre la supervivencia de las neuronas dentro de la retina. En el estudio publicado por Fischer y colaboradores en el año 2010 se determinó como el factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1) influye en las células retinianas, en particular, en las células gliales.

Dicha actividad se ve dramáticamente alterada en retinas dañadas o cuando son estimuladas por factores de crecimiento exógenos.

Como conclusión, la hiperglucemia y la señalización de la insulina deteriorada son consideradas como importantes factores en la patología de la retina en la retinopatía diabética. Numerosos estudios apoyan que estos dos factores dañan la glía de la retina, así como las células neuronales al comienzo de la enfermedad, incluso antes de que observemos los primeros signos clínicos de la misma, como son los microaneurismas.

En este estudio queremos determinar los cambios histológicos que observamos en ratones knock-out con una delección específica en el gen que codifica por el sustrato 2 (IRS-2) del receptor de la insulina y como su ausencia influye notablemente en la anatomía de la retina, su estructura y organización así como en las células gliales y las células amacrinias retinianas. Teniendo en cuenta que los animales estudiados no desarrollaron aún la hiperglucemia que acompaña a la resistencia periférica a la insulina, los cambios observados guardarían relación con la no activación de las rutas de señal intracelular que se desencadena tras la fosforilación de IRS2 que han quedado suficientemente detalladas en el capítulo de introducción.

En estudios recientes se ha observado que cuando tenemos ratones knock out con una delección del gen que codifica por IRS-2 se ve facilitada la apoptosis de los fotorreceptores, resultando en una pérdida del 50% de células a las dos semanas de edad y una pérdida casi completa de las mismas a los 16 meses, por lo que podemos concluir que la señalización debida al IRS-2 contribuye al mantenimiento de una visión normal promoviendo la supervivencia de los fotorreceptores de la retina. Por ello, en los animales adultos de nuestro estudio hemos analizado si aún persiste o no apoptosis.

Hipótesis del estudio.

Los ratones knock out para IRS2 presentan alteraciones del desarrollo en el sistema nervioso central y procesos neurodegenerativos con la edad, estas alteraciones son muy ubicuas y, entre otras estructuras, afectan también a la retina pues se han descrito defectos en la cantidad de fotorreceptores.

Dado que estos animales desarrollan en el tiempo diabetes tipo 2 y que la fosforilación de IRS2 está implicada en una gran cantidad de rutas de señal intracelular, es sumamente interesante constatar el papel que esta proteína pueda tener en la instauración de patología retiniana, así como en los procesos degenerativos retinianos.

Con la finalidad de comprobar los cambios estructurales de la retina se realizará un estudio inmunocitoquímico y morfométrico de la retina de ratones knock out para la proteína de sustrato insulínico IRS2 y se comparará con la retina de ratones wild type.

Objetivo general:

El estudio se enmarca dentro de una línea general del laboratorio sobre papel neuroprotector de las hormonas, en particular para este estudio del papel de la insulina y el IGF-1.

Objetivos específicos:

- 1.- Analizar si la ausencia de IRS2 afecta a otras estructuras retinianas diferentes de la capa de fotorreceptores.
- 2.- Analizar si la ausencia de IRS2 provoca anomalías estructurales y de distribución neuronal en la retina.
- 3.- Analizar si la ausencia de IRS2 se asocia a alteraciones de células gliales estructurales. Comprobando si el defecto crónico de señales intracelulares activados por IRS2 induce gliosis reactiva en la retina.
- 4.- Analizar si la ausencia de IRS2 afecta a mecanismos reguladores tan importantes como la acción de la dopamina en la sensibilización de los fotorreceptores, mediante el estudio de las células amacrinas productoras de dicho neurotransmisor.
- 5.- Analizar si la ausencia de IRS2 se acompaña de apoptosis en ratones adultos.

Materiales y Métodos empleados

Animales empleados para el estudio.

Para alcanzar los objetivos propuestos y llevar a cabo el diseño experimental, hemos estudiado 20 ratones machos de los que 10 eran ratones wilde type y 10 eran ratones knock out para IRS2, de 12 semanas de edad. Dado que los progenitores knock out son estériles, los animales se obtuvieron a partir de progenitores heterocigotos.

Genotipaje

La determinación de la delección-sustitución de IRS2 se realizó mediante PCR. Para ello, cuando los ratones tenían 20 días de edad, se tomó el fragmento distal de la cola para aislar el DNA.

Extracción, aislamiento y purificación del DNA.

La extracción, aislamiento y purificación del DNA se realizó empleando el kit de Roche(R) siguiendo las instrucciones del fabricante.

En un tubo de microcentrífuga de 1.5mL y libre de nucleasas se añadieron: 2 a 5 mm de la cola del ratón, 200µl del tampón de lisis de tejidos y 40 µl de proteína K reconstituida. Se mezcló e incubó durante 3 horas a 55°C. Transcurrido ese tiempo, con una jeringa de 1 mL, se aspiró la muestra dentro de la jeringa y luego se expulsó, en repetidos ocasiones hasta obtener el lisado. Se añadieron 200µl de tampón de unión y 100 µl de isopropanol; para después centrifugar 5 minutos a 13000 xg.

Tras insertar un tubo de alto filtrado en un tubo de recogida, se pipeteó el líquido de la muestra en el reservorio superior del tubo de filtrado. Todo el tubo ensamblado se centrifugó 1 minuto a 8000 xg. Después de centrifugar, se retiró el tubo de filtrado del tubo de recogida y se desecharon el líquido filtrado y el tubo de recogida.

Se colocó de nuevo el tubo de filtrado en un nuevo tubo de recogida y se añadieron 500µl del tampón inhibidor de remoción al reservorio superior del tubo de filtrado, para centrifugar 1 minuto a 8000xg. Después de centrifugar y retirar el tubo de filtrado del tubo de recogida y desechar el tubo de recogida y el líquido filtrado, se colocó de nuevo el tubo de filtrado en un nuevo tubo de recogida y se añadieron 500 µl de tampón de lavado al reservorio superior del tubo de filtrado. Posteriormente se centrifugó 1 minuto a 8000x g. Esta operación se realizó dos veces. Se centrifugó durante 10 segundos a velocidad máxima y se desechó el tubo de recogida.

Tras insertar el tubo de filtrado en un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL limpio y estéril, se añadieron 200 µl del tampón de elución precalentado en el reservorio superior del tubo de filtrado y se centrifugó durante 1 minuto a 8000 xg. Centrifuga empleada: centrifuga para eppendorf Hermle Z233 M-2.

Después de esta sucesión de pasos, el tubo de microcentrifuga contenía ya el DNA eluido que se utilizó inmediatamente o bien, fue almacenado entre 2-8°C o bien entre -15° y -25° para análisis posteriores (dependiendo del tiempo a transcurrir hasta la realización del análisis).

Amplificación del DNA purificado, PCR.

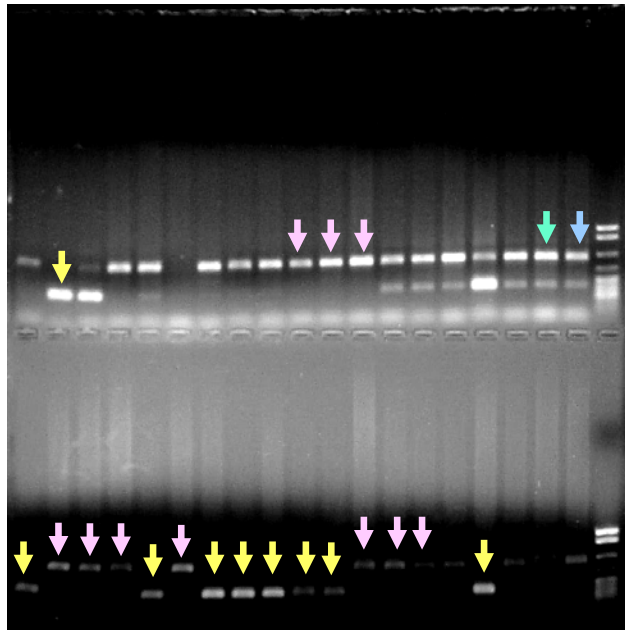
Una vez aislado el DNA se procedió a realizar la amplificación del fragmento de DNA para detectar la delección-sustitución del gen de IRS2 por el recombinante, Empleando el kit PCR Master mix de Promega[®], con un volumen de 5 µl de DNA aislado y empleando como primers:

Superior-Recombinante: ctt ggc tac cat gtt gtt att gtc

Inferior-Silvestre: agc tct gga ggt tta ctt tcc tag

La reacción de amplificación se realizó mediante 30 ciclos (94°C-65°C-72°C) en un termociclador PTC-100 Peltier Thermal Cycler[®].

Una vez amplificado, se realizó una electroforesis en gel de agarosa a 150mV, utilizando una muestra de 20µl de cada producto amplificado en tampón de carga, con bromuro de etidio. Las bandas obtenidas se fotografiaron bajo luz ultravioleta. La figura muestra los resultados obtenidos tras la electroforesis, las flechas rosas indican los animales knock out (IRS2-ko), las amarillas los animales wild type, siendo la verde y la azul las bandas de los dos progenitores.



Sacrificio de los animales y Extracción de las muestras.

Antes el sacrificio, se procedió a realizar tomas de sangre en condiciones de ayuno y postprandiales para la determinación de las glucemias. Todos los animales empleados en el estudio presentaron glucemias preprandiales normales entre 85 y 105 mg/ml.

Bajo anestesia con isoflurane, los animales fueron decapitados y, entre otras muestras, se procedió a extraer mediante disección cuidadosa los globos oculares que se fijaron por inmersión en paraformaldehído al 4% en tampón fosfato (0,1M, pH: 7.4) durante 24 horas a 4°C.

Una vez fijados, se lavaron en el mismo tampón durante 4 horas y se procedió a su deshidratación en etanoles crecientes en concentración (70, 80, 96 y 100%).

Ya deshidratados se procedió a su aclaramiento en xilol para su posterior inclusión en parafinas. La deshidratación, el aclaramiento y la inclusión se realizó en un procesador histológico Leica[®].

De los bloques obtenidos se obtuvieron secciones de 5 µm de grosor empleando un micrótopo Microm HM35.

Histoquímica.

Hematoxilina de Mayer.

Los cortes desparafinizados en xilol y rehidratados en concentraciones descendentes de etanol se sumergieron en agua destilada y posteriormente se sumergieron durante 10 minutos en hematoxilina de Mayer (1g de hematoxilina se disuelve en 1000ml de agua y se le añaden 0.2g de IO₃Na, 50 g de alumbre potásico, 50g de hidrato de cloral y 1g de ácido cítrico) seguido de un lavado en agua destilada y un lavado de 15 minutos en agua corriente.

Tras la tinción, las muestras se deshidrataron rápidamente en 3 baños de etanol 100% (diferenciando la tinción), las muestras se aclararon en xilol y se montaron con DePeX.

Inmunocitoquímica

La inmunocitoquímica se ha empleado para detectar la proteína glial fibrilar ácida (GFAP), la vimentina. La glutamina sintetasa, la tirosin hidroxilasa, la acetil colinesterasa, el antígeno nuclear de proliferación celular PCNA y el marcador de apoptosis caspasa 3 activa.

Anticuerpos primarios empleados:

Anti GFAP. Suero policlonal anti-GFAP, obtenido en conejo, (Dako[®], diluido 1:500 en TBS).

Anti-Vimentina. Suero policlonal anti-Vimentina, obtenido en conejo, (Dako[®], diluido 1:500 en TBS).

Anti-Glutamina sintetasa. Sueromonoclonal anti-glutamina sintetasa, obtenido en ratón, (Chemicon international[®], diluido 1: 100 en TBS).

Anti-Tirosin hidroxilasa. Suero primario monoclonal anti-THD, obtenido en ratón, (Boehringer Mannheim[®], diluido 1:250 en TBS).

Anti-Caspasa 3 activa. Suero policlonal anti-Caspasa 3 activa, obtenido en conejo, (Sigma[®], diluido 1:1000 en TBS).

Protocolo de detección inmunocitoquímica.

Las muestras se incubaron en estufa a 58°C durante 1 hora, tras lo que se procedió a la desparafinización y rehidratación, con lavado en agua destilada y desionizada durante 5 minutos.

Se bloqueó la peroxidasa endógena sumergiendo las muestras en un baño de Metanol-Agua oxigenada al 3% (200ml/30ml), durante 10 minutos.

Posteriormente se sumergieron en TBS (Trizma base 0.01M, pH 7.4, con 0.09% de NaCl), durante 10 minutos.

Para inhibir reacciones inespecíficas, se incubaron con suero no inmune obtenido en cabra (diluido 1:30 en TBS), durante 20 minutos.

A continuación, se procedió con la reacción inmunocitoquímica, para lo que las muestras se incubaron con el anticuerpo primario, a 4°C toda la noche. Seguido de dos lavados en TBS de 5 minutos.

El suero monoclonal se detectó incubando con suero biotinado de cabra anti Ig G de ratón (Caltag®, diluido 1:150 en TBS), en el caso de que los anticuerpos primarios fueran monoclonales; o con suero biotinado de cabra anti Ig G de conejo (Caltag®, diluido 1:150 en TBS), si el anticuerpo primario era policlonal, durante 45 minutos a temperatura ambiente; seguido de dos lavados en TBS de 5 minutos.

Por último se procedió a incubar con estrepto-avidina-peroxidasa (Caltag®, diluido 1:150 en TBS) durante 45 minutos a temperatura ambiente; seguido de dos lavados en TBS de 5 minutos.

El revelado de la reacción se hizo con 3-3'diaminobencidina (Sigma al 25% en solución acuosa de Trizma base 0.01M, pH 7.4) a la que se añadió un 0.03% de agua oxigenada inmediatamente antes de su empleo.

Tras lavado en agua destilada, las preparaciones fueron contrastadas con Hematoxilina de Mayer y tras su lavado en agua, se deshidrataron y aclararon en etanol-xilol y se montaron con DePeX.

Controles de las reacciones inmunocitoquímicas.

Se procedió a realizar un test de dilución de los anticuerpos primarios, comprobando como diluciones óptimas las empleadas en el estudio para cada anticuerpo.

Se sustituyó el suero primario específico por suero no inmune de ratón o conejo, diluido en TBS a la misma concentración que se diluyó el suero inmune.

En todos los casos, no se obtuvo positividad al finalizar el proceso.

Morfometría y Cuantificación celular.

Todos los estudios morfométricos realizados en este estudio se hicieron empleando el software libre de NIH ImageJ.

Para ello se trabajó sobre imágenes digitales a máxima resolución (4080x). Las micrografías obtenidas por microscopía óptica se obtuvieron con un microscopio Zeiss-Axiophot (R) con iluminación estándar halógena unificada por un estabilizador de corriente en habitación oscura, mediante captación con una cámara

digital Olympus DP70® y el software de captura de imagen Olympus DP Controller 1.1.1.65®. Todo el estudio se realizó con un ordenador dotado de un procesador PentiumV doble core® y 16Mb de RAM, tarjeta gráfica Nvidia de 5Mb y monitor Sony Bravia de alta resolución.

Las mediciones fueron realizadas a doble ciego, por el doctorando y los directores de la Tesis Doctoral, con un error intraensayo de 0.176%.

Los valores obtenidos se expresan en píxeles.

Análisis morfométrico de los cortes histológicos.

Para el análisis morfométrico de los cortes histológicos se eligieron 4 secciones perpendiculares parasagitales del globo ocular, próximas a la línea media y separadas entre 25 y 40 mm, de cada animal, bien conservadas en su estructura.

En cada sección se trazaron perfiles radiales de la retina desde el borde escleral de la capa de conos y bastones hasta el borde vítreo de la capa de células ganglionares.

Los perfiles radiales pudieron abarcar toda la retina, como el expuesto, o bien sólo una de las capas de la retina desde el borde escleral al vítreo de cada capa.

De esta manera se analizaron 50 perfiles por sección elegida, lo que supuso el estudio aleatorio de 200 perfiles por animal (100 de la retina periférica y 100 de la retina central).

Con estos criterios se analizó la altura o espesor de la retina y de cada una de sus capas, en el capítulo de resultados se exponen los valores encontrados en la retina central, ya que la retina periférica presentó una gran variabilidad intra-grupo debido principalmente a que la zona próxima a la ora serrata es muy variable de un corte a otro y los perfiles más próximos a la ora serrata se adelgazan demasiado siendo prácticamente imposible determinar las capas de la retina.

La capa de fibras del nervio óptico no fue considerada, pues al obtener los cortes, en muchos casos se origina un desplazamiento del cristalino que provoca variaciones físicas en dicha capa retiniana. El desplazamiento se produce por ausencia de humor acuoso en la cámara anterior del ojo, que se pierde en el proceso de deshidratación.

Análisis Estadístico de los resultados.

Empleando la aplicación SPSS, de los valores obtenidos se obtuvieron medidas de centralización y dispersión. Las diferencias observadas entre los ratones wild type y los ratones knock out se contrastaron aplicando el análisis de la t de Student, aceptando como significativos valores menores de $p < 0.05$.

Tratamiento de los Textos y figuras. Edición final.

Las micrografías fueron digitalizadas empleando una cámara digital Olympus DP70® y el software de captura de imagen Olympus DP Controller 1.1.1.65®, exportadas a un ordenador Apple IMac® y procesadas mediante el programa Adobe PhotoShop CS 5.0® (resolución final 4000 ppp).

El procesado de los textos, los gráficos y la edición final se realizó con el programa Microsoft Word:Mac v 14.5.8.

La impresión se realizó con una impresora OKI C5600 a color.

Resultados

Para una mejor comprensión de los resultados obtenidos, este capítulo lo hemos dividido en los siguientes apartados.

1. Efectos de la ausencia de IRS2 sobre el espesor radial de la retina neural y su morfología. Estudios en Hematoxilina de Mayer.
2. Efectos de la ausencia de IRS2 sobre la expresión inmunocitoquímica de GFAP.
3. Efectos de la ausencia de IRS2 sobre la expresión inmunocitoquímica de Vimentina.
4. Efectos de la ausencia de IRS2 sobre la expresión inmunocitoquímica de Glutamina sintetasa.
5. Efectos de la ausencia de IRS2 sobre la expresión inmunocitoquímica de Tirosín hidroxilasa.
6. Efectos de la ausencia de IRS2 sobre la apoptosis. Expresión inmunocitoquímica de caspasa 3 activa.

Espesor radial de la retina neural y su morfología. Estudios con Hematoxilina de Mayer.

Hallazgos morfométricos.

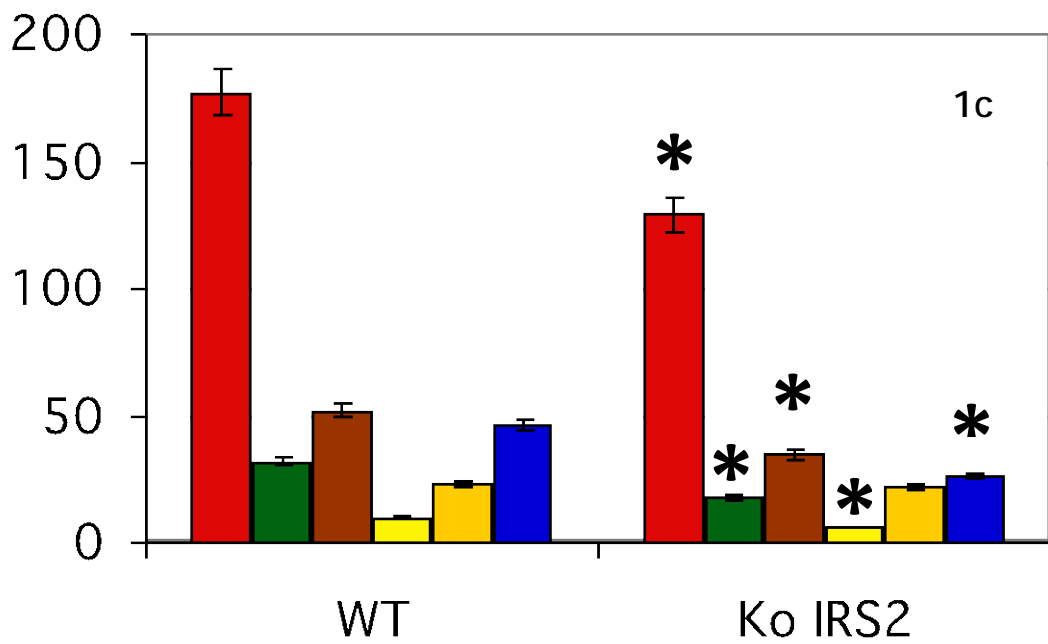
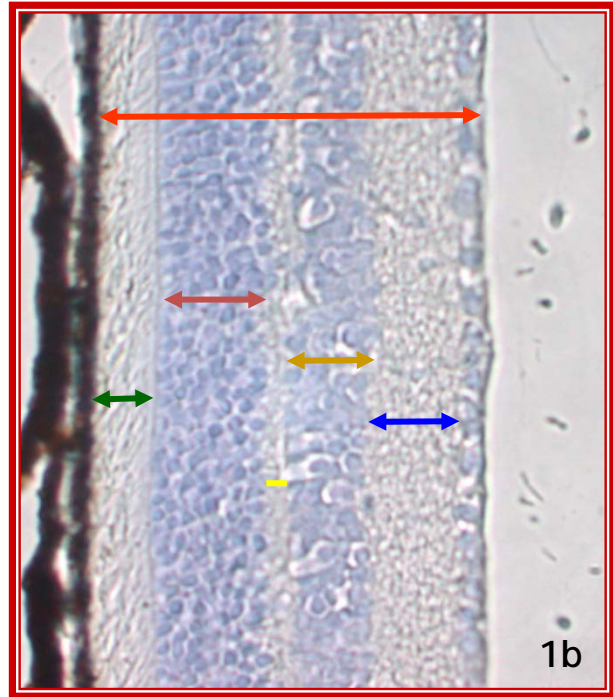
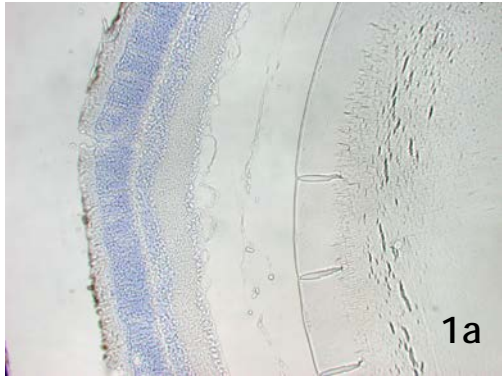
La figura 1a muestra en una panorámica el aspecto general que se observó en la retina de los ratones wild type. A mayores aumentos en 1b pueden apreciarse las capas de dicha retina y cómo se realizó el análisis morfométrico de las mismas. La gráfica 1c muestra los valores en píxeles de la altura de la retina en los machos wild type (WT) y en los IRS2-KO, obtenidos en la zona central de la retina. Los colores en las líneas de las capas de la figura 1b se corresponden con los de la barra de la figura 1c.

De fuera adentro, contactando con el estrato pigmentario, se sitúa la capa de los fotorreceptores (línea verde), a continuación la capa nuclear externa (línea ocre), luego la plexiforme externa (línea amarilla), seguida de la nuclear interna (línea naranja) y ésta de la plexiforme interna (línea azul). La altura total de la retina neural está representada por la línea en color rojo.

Las capas más internas, la de células ganglionares y la de fibras del nervio óptico no se consideraron debido a que las luxaciones del cristalino observadas en algunas muestras podían inducir variaciones que no se relacionaran con la ausencia o presencia del gen de IRS2, alterando los resultados y las conclusiones a extraer de los mismos.

Como puede apreciarse claramente en la gráfica de la figura 1c, los ratones IRS2-KO presentaron una retina que globalmente considerada fue significativamente ($p < 0.01$) menos gruesa que la de los ratones wild type.

La disminución de tamaño se debió a disminuciones significativas ($p < 0.01$) en la altura de las capas de fotorreceptores, nuclear externa, plexiforme externa y plexiforme interna, sin que existieran variaciones significativas en la altura de la capa nuclear interna.



- Retina
- Fotoreceptores
- Nuclear externa
- Plexiforme externa
- Nuclear interna
- Plexiforme interna

Ratones wild type.

El análisis de cortes radiales de la retina teñidos con hematoxilina de Mayer nos permitió definir las características morfológicas generales de esta estructura neural en los ratones wild type, para luego poder establecer comparaciones y valorar los cambios que se observaron en los ratones IRS2-KO.

La estructura radial permite diferenciar en cada capa un extremo más superficial que llamaremos escleral y otro más profundo que llamaremos vítreo.

Como muestran las figuras 2 y 3 y tal y como cabría esperar, los fotorreceptores fueron muy evidentes presentando una capa externa de conos y bastones dispuestos paralelos y radiales, dejando imágenes vacuolares entre ellos (CB).

Esta capa quedaba separada por una membrana limitante externa (flechas finas en figura 2) muy evidente de la capa nuclear externa, formada principalmente por los núcleos de la células de los fotorreceptores.

La capa nuclear externa (NE) estaba formada por columnas paralelas radiales que desde la limitante externa hasta la capa plexiforme externa tenía de 12 a 17 núcleos apilados columnarmente (línea discontinua en figura 2). En la retina periférica, la disposición columnar se encuentra inclinada y no es radial (línea discontinua en figura 3)

La capa plexiforme externa (PE) es relativamente fina, generalmente anucleada, y se sitúa entre las dos capas nucleares.

La capa nuclear interna (NI) configura un mosaico irregular de núcleos y células, en la que destaca la presencia de células con amplio y claro citoplasma (flecha gruesa en figura 2). La mayoría de las células del borde vítreo de esta capa suelen tener un núcleo basal con un citoplasma que se dirige escleralmente.

La capa plexiforme interna (PI) puede llegar a ser hasta 3 ó 4 veces más ancha que la externa. La malla fibrilar que la constituye es más compacta que la de la plexiforme externa, lo que le da, al corte, un aspecto granular. A diferencia de la plexiforme externa, la interna suele presentar algún núcleo de células aisladas.

La capa celular más profunda o vítreo de la retina es la capa de células ganglionares (G). En realidad no está formada sólo por células ganglionares pues éstas se entremezclan con células gliales. Las células suelen disponerse siguiendo el contorno vítreo de la retina, como si estuvieran perpendiculares al eje radial del resto de las capas. En su borde vítreo se sitúa la capa de fibras del nervio óptico (NO), generalmente fina y a veces luxada por la tracción o presión que hace el cristalino en el momento de obtener los cortes. La membrana limitante interna es casi inapreciable en esos animales.

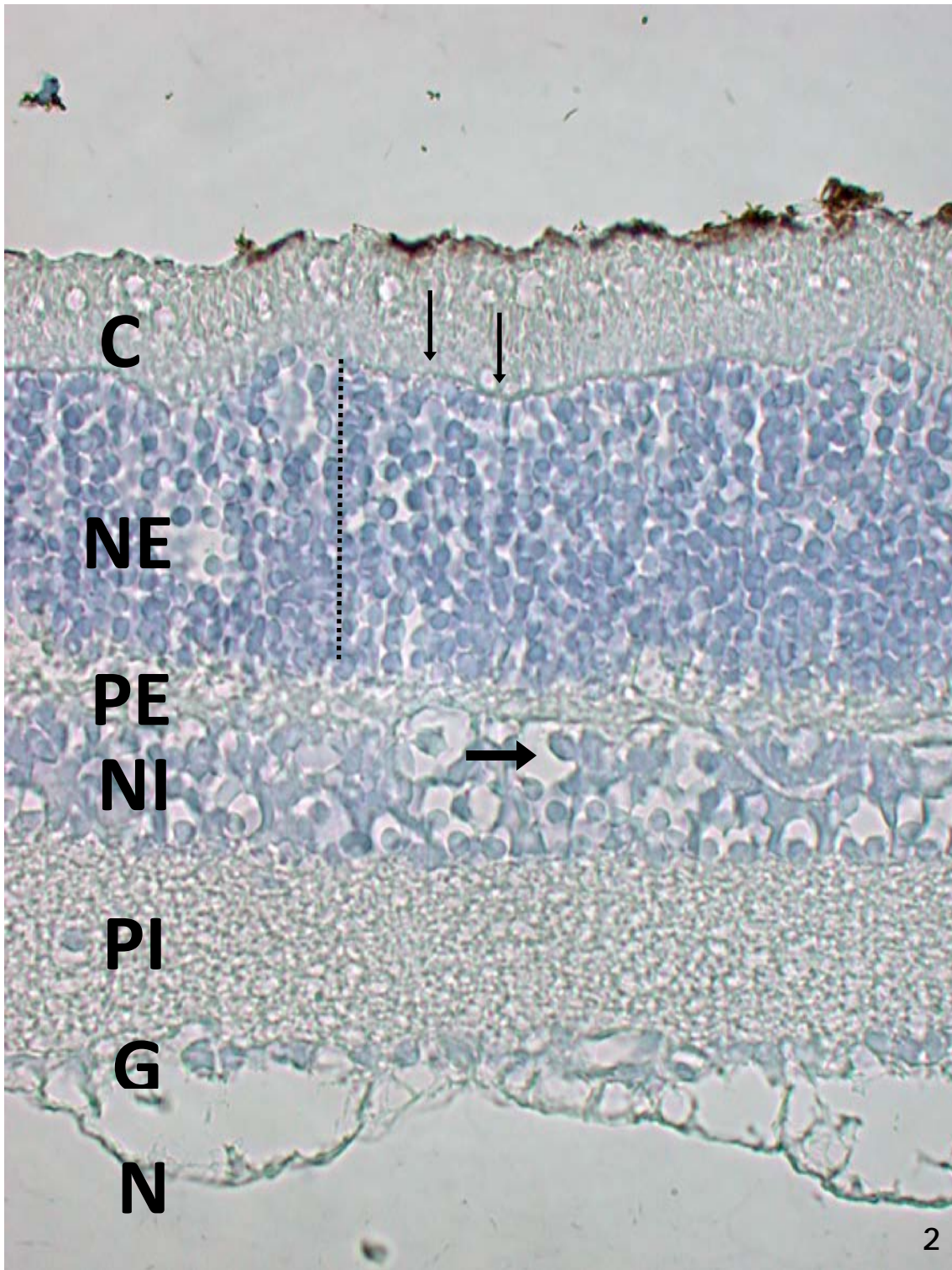


Figura 2. Micrografía mostrando la retina central de un ratón wild type teñida con hematoxilina de Mayer.

CB: conos y bastones, NE: nuclear externa, PE: plexiforme externa, NI: nuclear interna, PI: plexiforme interna, G: células ganglionares, NO: nervio óptico

La figura 3 se corresponde con la imagen típica del corte radial de una retina periférica en un animal wild type.

Cuyas principales características se han descrito previamente.

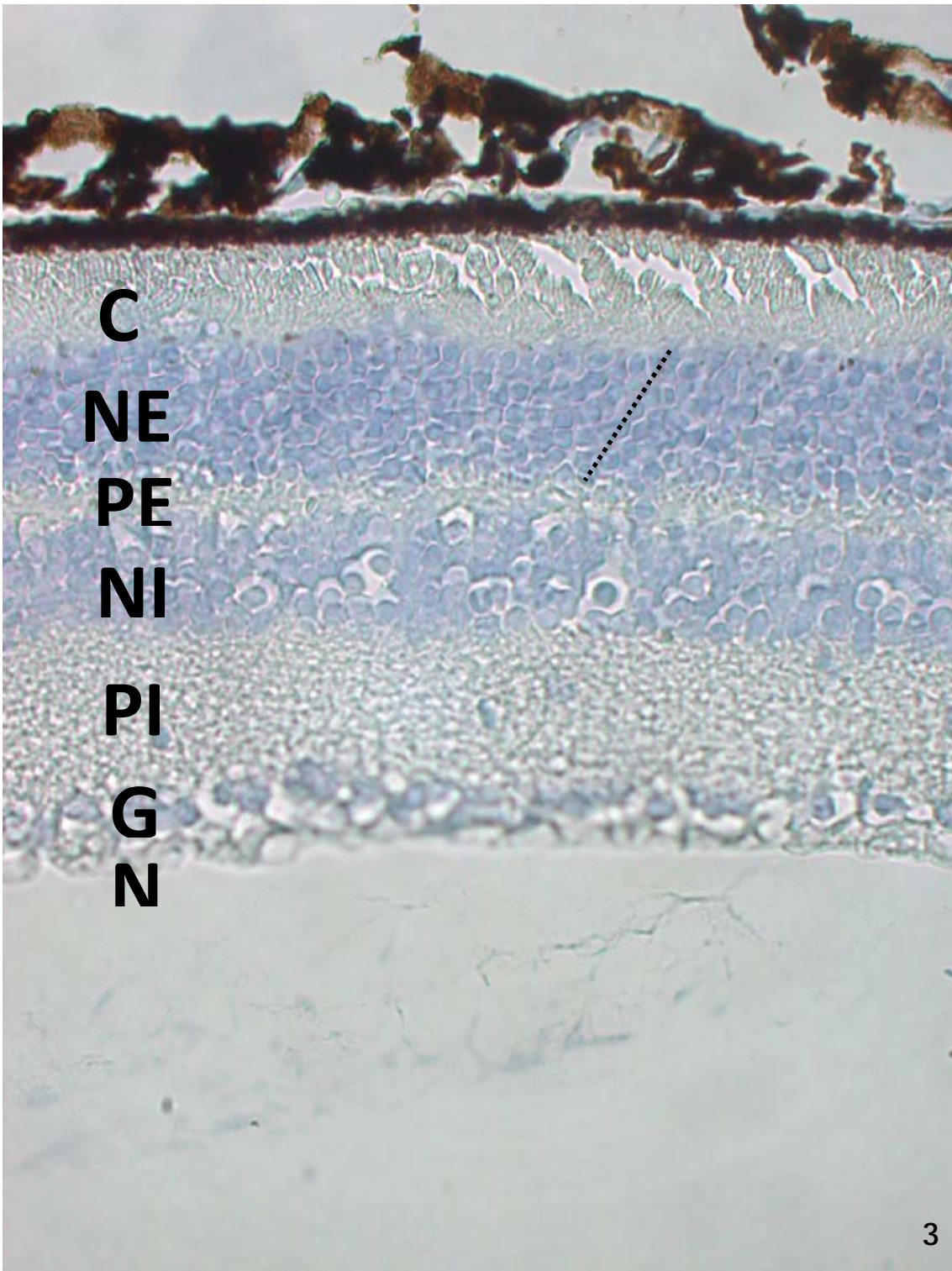


Figura 3. Micrografía mostrando la retina periférica de un ratón wild type teñida con hematoxilina de Mayer.

CB: conos y bastones, NE: nuclear externa, PE: plexiforme externa, NI: nuclear interna, PI: plexiforme interna, G: células ganglionares, NO: nervio óptico

Ratones IRS2-ko.

La figura 4 muestra el aspecto general de la retina central de los ratones IRS2-KO, tomada a los mismos aumentos que la figura 11 de los wild type.

Al margen de las diferencias en el tamaño de cada una de las capas, que ya han sido descritas, también se observaron diferencias estructurales.

La limitante externa que separa los conos y bastones de la capa nuclear externa se desdibujaba e incluso a tramos no era apreciable o cambiaba de dirección (flecha desdoblada en figura 4).

La capa nuclear externa, formada por apilamientos de 5 a 8 núcleos, perdió el aspecto columnar o en hilera que se describió en los wild type. En los ratones IRS2-KO los núcleos de esta capa no aparecieron alineados sino que formaban más bien una imagen en mosaico y, a tramos, se desorganizaban totalmente.

En esos animales fue muy frecuente observar cúmulos nucleares que desde la nuclear externa invadían la capa de conos y bastones (flecha fina en figura 4).

En la capa plexiforme externa aparecían células que, de vez en cuando, interrumpían la continuidad de la capa y parecían establecer puentes celulares entre las capas nucleares externa e interna (flechas gruesas en figura 4).

Aunque parecían células procedentes de la capa nuclear interna, no había detalles morfológicos que permitieran establecer si dichas células pertenecían a la capa nuclear externa o a la nuclear interna.

Las células con citoplasma de aspecto claro fueron menores en tamaño y menos numerosas en los IRS2-KO que en los wild type.

La presencia de células interpuestas en la capa plexiforme interna que ya aparecían en los animales wild type, era más evidente en los IRS2-KO (flechas a puntitos en figura 4).

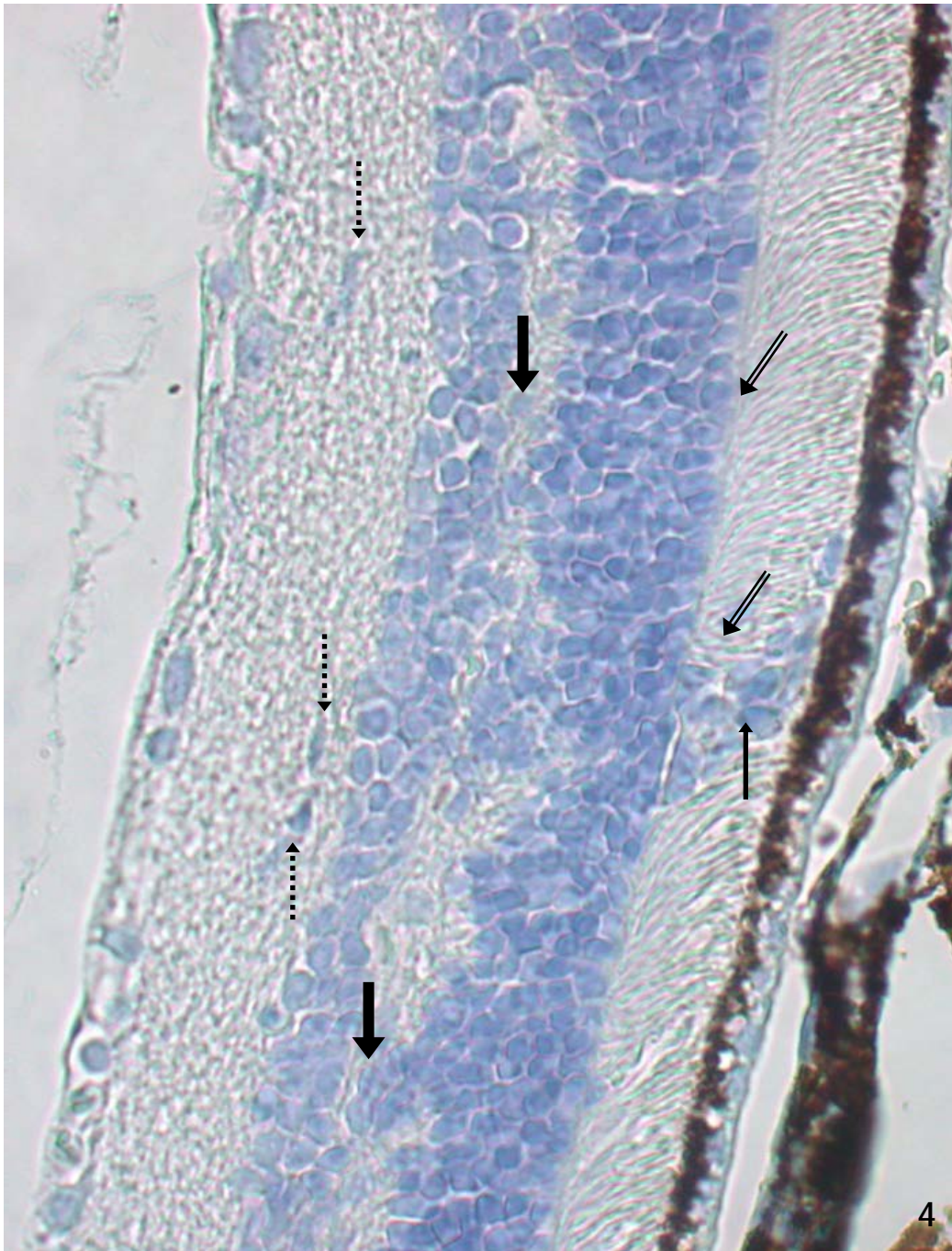


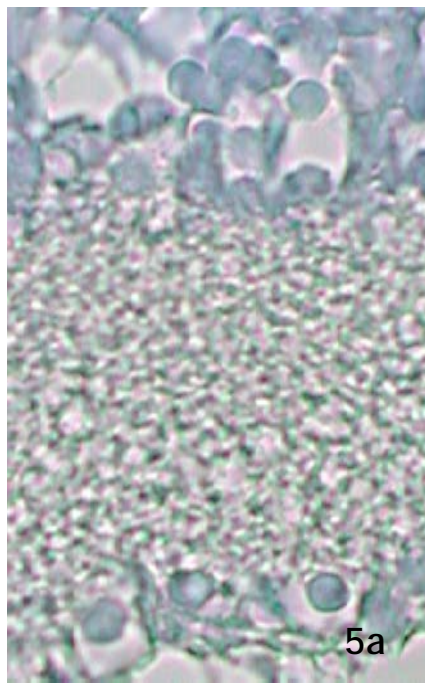
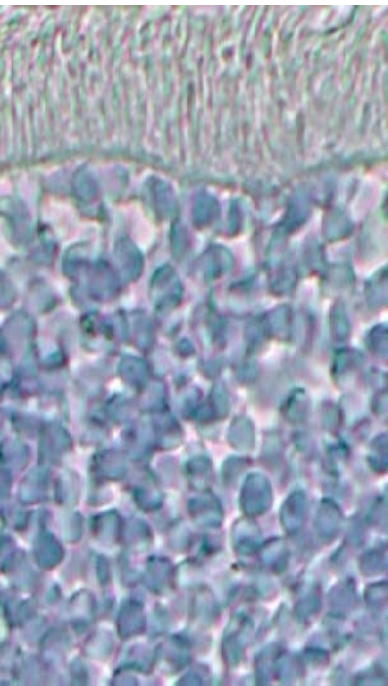
Figura 4. Micrografía mostrando la retina de un ratón wild type teñida con hematoxilina de Mayer.

Las micrografías que componen la figura catorce muestran a grandes aumentos los detalles de la organización y estructuración de la retina en los ratones wild type (figuras 5a y 5b), y en los ratones IRS2-ko (figura 5c).

La figura 5a muestra la alineación columnar de la capa nuclear externa, la continuidad y el grosor evidente de la membrana limitante externa y la disposición radial de los conos y bastones.

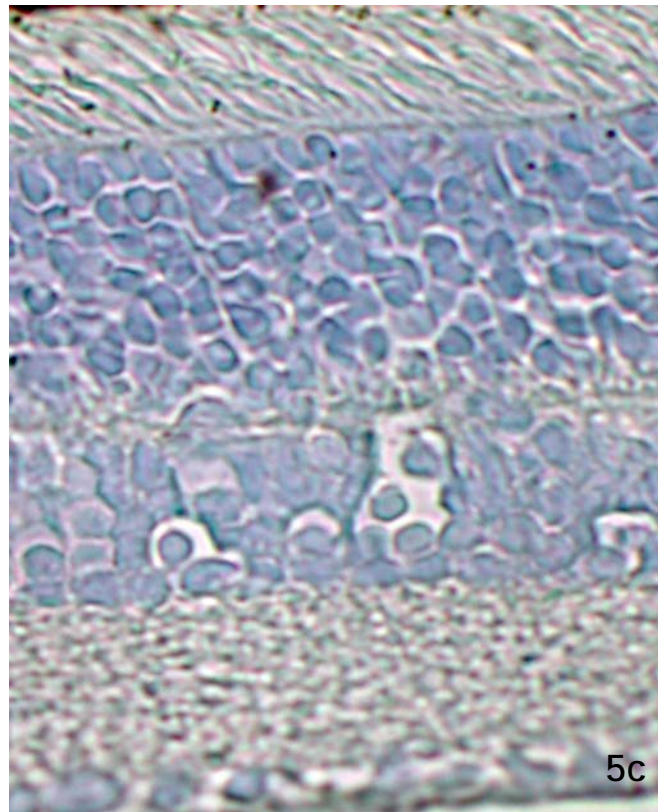
La figura 5b muestra el grosor de la capa plexiforme interna y la capa de células ganglionares dispuesta en su límite vítreo.

La figura 5c muestra todas las capas de la retina de un ratón IRS2-ko, con la desorganización de la capa nuclear externa, la disposición oblicua de los conos y bastones, la casi total desaparición de la capa plexiforme externa, y la evidente disminución de tamaño de la capa plexiforme interna y la de las células ganglionares.



5a

5b



5c

Figura 5. Micrografías mostrando a grandes aumentos las características principales de las distintas capas de las retinas de ratones wild type (14a y 14b) y las diferencias con las de las retinas de los ratones IRS2-KO (14c) teñidas con hematoxilina de Mayer.

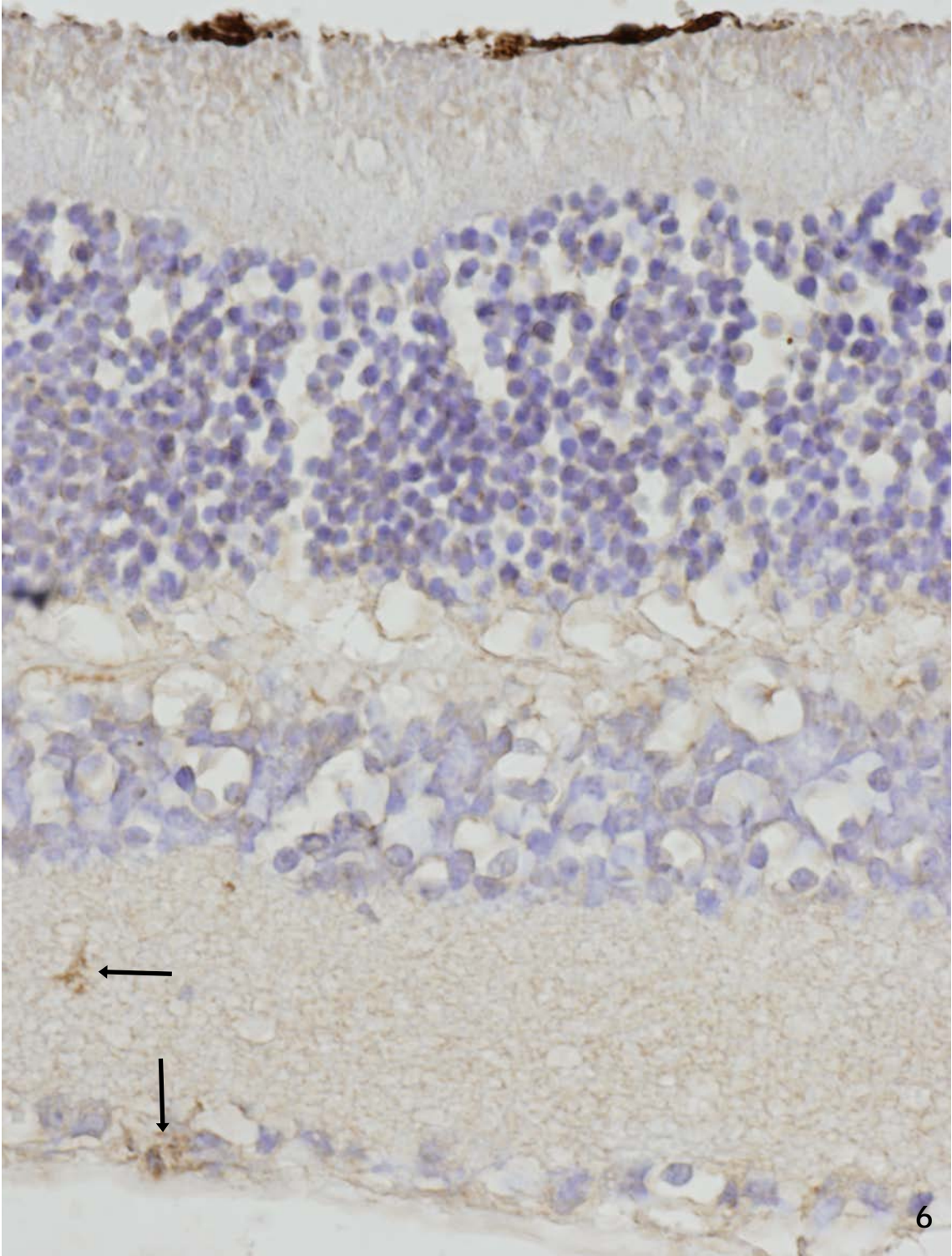
Efectos de la ausencia de IRS2 sobre la expresión inmunocitoquímica de GFAP.

Retina de los ratones wild type

Contrariamente a lo que en principio podía esperarse ya que la retina es sistema nervioso central y por las descripciones de la positividad a GFAP descrita por otros autores, aunque en otros modelos animales, la retina de los animales wild type ya sea en su parte periférica (figura 6) o en la central (figura 16) dicha positividad fue muy escasa.

La retina periférica (figura 6) mostró elementos celulares positivos a GFAP dispuestos en el borde vítreo de la capa de células ganglionares y alguna célula aislada en la capa plexiforme interna (flechas en figura 6).

Figura 6. Micrografía mostrando la retina periférica de un ratón wild type tras la tinción inmunocitoquímica para GFAP.

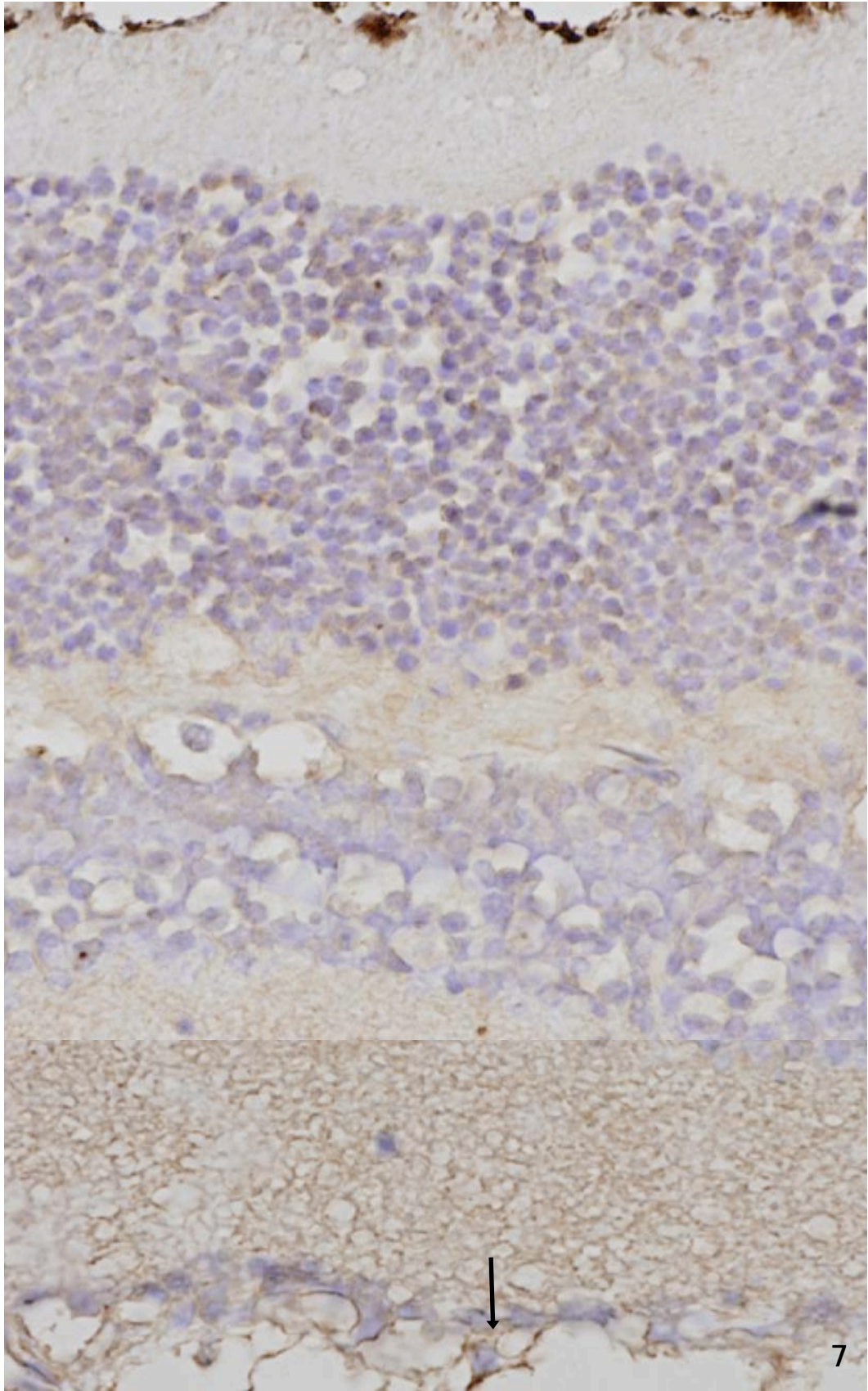


Si en la retina periférica de los ratones wild type apenas aparecieron células positivas a GFAP, en la retina central de estos animales fueron aún más escasas.

Como muestra la figura 7 (flecha) aisladamente se encontraron células positivas a GFAP en el borde vítreo de la capa de células ganglionares, junto a la membrana limitante interna.

No obstante, las preparaciones de la retina de estos animales presentaron un fondo reactivo que afectaba por igual a todas las capas sin que se definieran células de forma contrastada (figuras 6 y 7)

Figura 7. Micrografía mostrando la retina central de un ratón wild type tras la tinción inmunocitoquímica para GFAP.



Retina de los ratones IRS2-ko.

Las figuras 8 a 11 son claro exponente de la diferencia observada en la reactividad a GFAP en los animales IRS2-ko frente a los wild type.

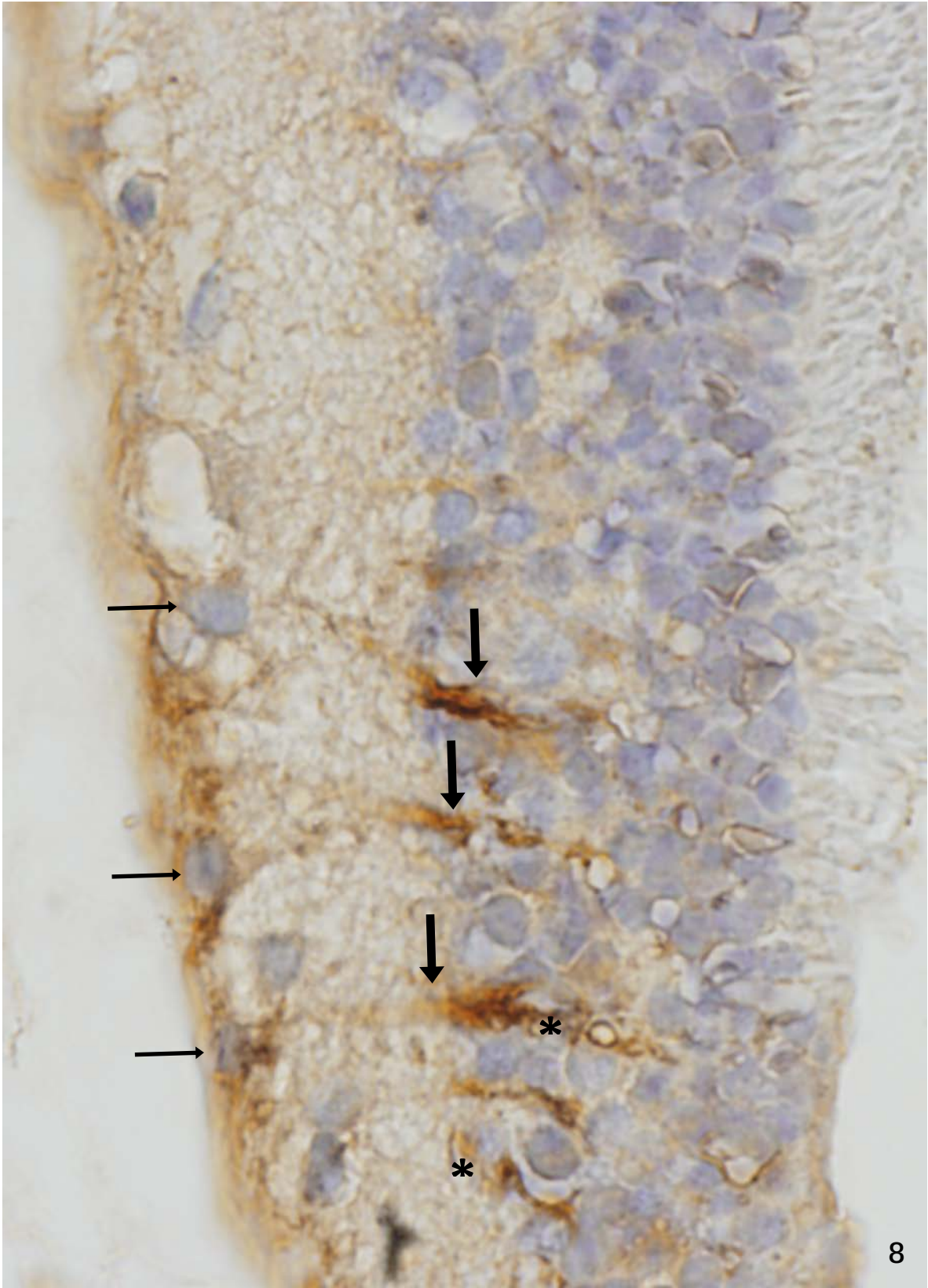
La retina periférica de los ratones IRS2-ko se caracterizó por presentar células dispuestas en el borde vítreo de la misma. Claramente reactivas y que parecían continuarse unas con otras lateralmente, como si formaran una empalizada (flechas finas en figura 8).

Desde ellas emergían prolongaciones relativamente gruesas que cruzaban radialmente la capa plexiforme interna, llegando hasta la capa nuclear interna.

En la capa nuclear interna se apreciaron tractos positivos gruesos que parecían llegar desde las células positivas de la capa de células ganglionares (flecha gruesa en figura 8).

Sin embargo, junto a ellos, también se vieron células positivas dispuestas principalmente en el borde vítreo de esta capa (asteriscos en figura 8) que emitían prolongaciones finas por la capa nuclear interna y alcanzaban la capa nuclear externa tras atravesar una casi inexistente capa plexiforme externa.

Figura 8. Micrografía mostrando la retina periférica de un ratón IRS2-ko tras la tinción inmunocitoquímica para GFAP.



8

Hay una zona de la retina periférica, la más próxima a la retina central, que podría considerarse como la transición entre ambas zonas de la retina, ya que no hay ningún elemento anatómico que permita diferenciarlas o separarlas más que el aumento progresivo de grosor.

Dicha zona es que aparece con mayor desestructuración en los animales IRS2-ko. En dicha zona se tomaron las micrografías de la imagen 18, la que presenta la positividad a GFAP y el insert seriado teñido con hematoxilina.

En el insert se muestra (flecha) como la capa plexiforme externa de la retina de estos animales tendía a desaparecer por la presencia de isletas de núcleos celulares.

La tinción con GFAP puso de manifiesto que en muchos casos esos núcleos pertenecían a células que luego se marcaban con GFAP (flechas blancas).

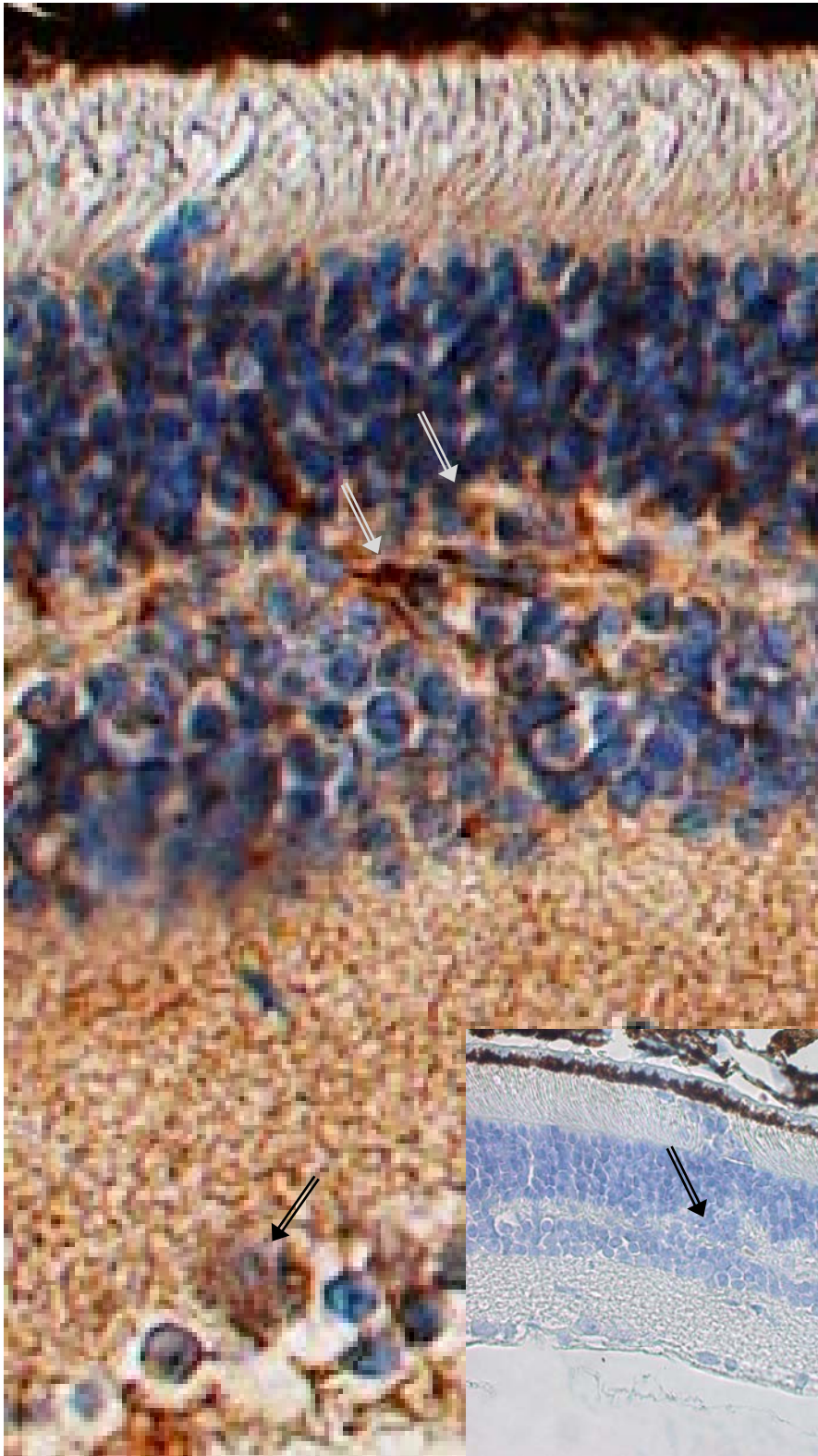
Desde estas células partían prolongaciones finas que invadían las capas nucleares externa e interna interponiéndose entre las células que conforman dicha capa.

Algunas células positivas a GFAP, más escasas que en la retina periférica propiamente dicha podía apreciarse en el borde vítreo de la capa nuclear interna.

Como en la retina periférica, en la capa de células ganglionares aparecieron células positivas a GFAP (flecha negra abierta), aunque las prolongaciones citoplásmicas gruesas que caracterizaban a estas células en la retina periférica, aquí no eran evidentes.

Figura 9. Micrografía mostrando la transición de la retina periférica a la central de un ratón IRS2-ko tras la tinción inmunocitoquímica para GFAP.

Insert , imagen tomada en un corte seriado al que se muestra teñido con GFAP, pero teñido exclusivamente con hematoxilina.



La retina central en los ratones IRS2-ko presenta características diferenciales con respecto a la retina central de los animales wild type, y, además, de la retina periférica o de la transición de periférica a central de los ratones knock out.

La figura 10 recoge las características principales que definieron a la positividad a GFAP en la retina central de los ratones IRS2-ko.

Al igual que en la retina periférica o en la zona de transición, aparecieron células positivas en el borde vítreo de la capa de células ganglionares (flechas finas en figura 10).

Estas células se disponían como una capa marginal que delimitaba la retina por dentro de la capa de fibras del nervio óptico, de forma que parecían células encadenadas a través de sus prolongaciones, prolongaciones que parecían acompañar a las fibras que conformarían el nervio óptico.

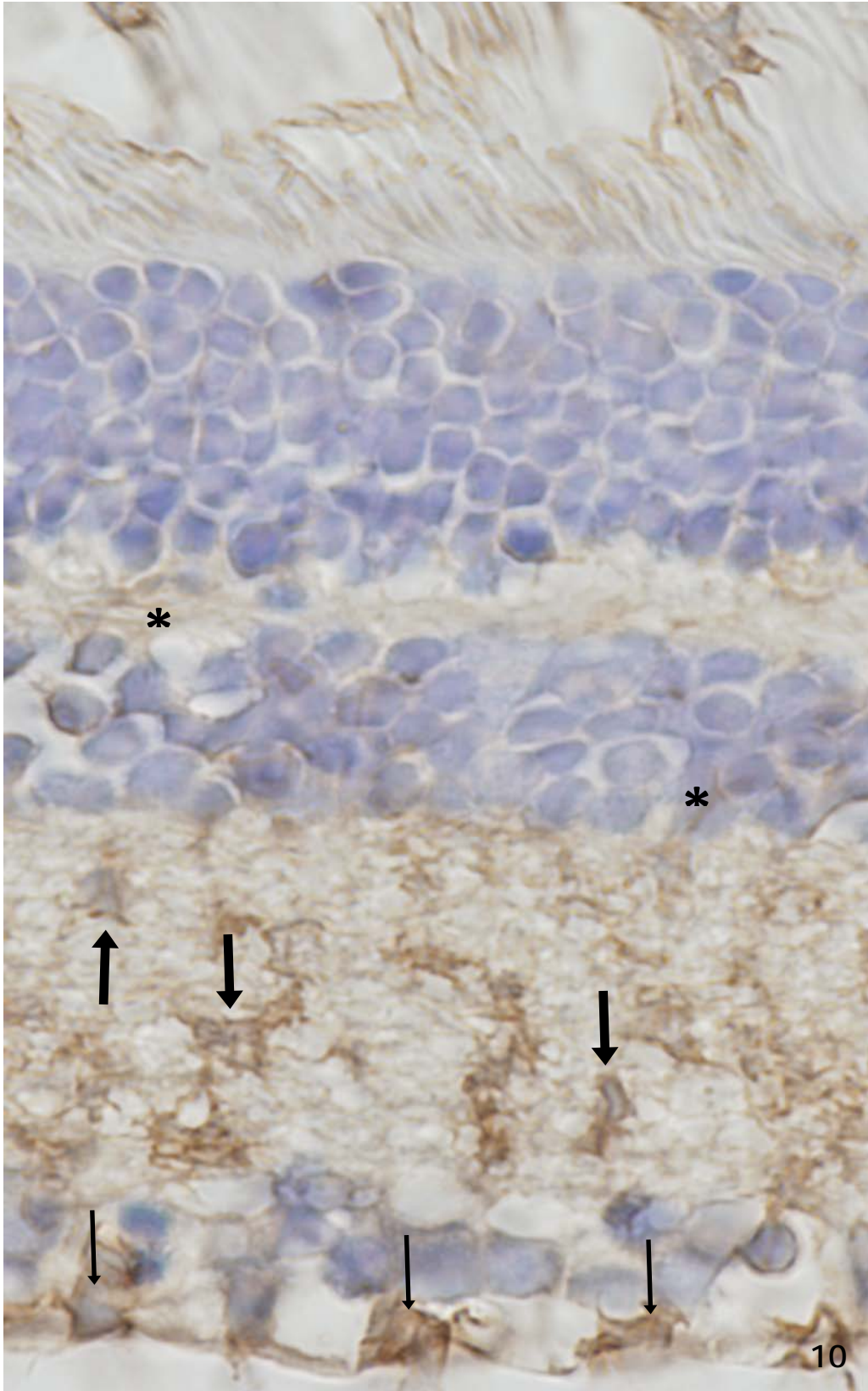
No pudimos apreciar que desde estas células partieran prolongaciones hacia capas más externas de la retina.

En la zona central de la retina, la capa plexiforme interna se veía invadida por células positivas a GFAP (flechas gruesas en figura 10), muy irregulares, de aspecto astrocitario por su gran cantidad de prolongaciones finas y retorcidas en el espacio. Lo que hace pensar que el aumento de núcleos que hemos descrito anteriormente podría deberse a la presencia de estas células.

El borde escleral de la capa plexiforme interna, contactando con el borde vítreo de la capa nuclear interna, presenta gran cantidad de prolongaciones finas positivas que parecen proceder de las células de la capa plexiforme interna.

Dado que no se observaron células positivas a GFAP en las capas nuclear interna y plexiforme externa, pero sí tractos fibrilares finos positivos (asteriscos en figura 10), muy probablemente dichos tractos procedan de las células de la capa plexiforme interna.

Figura 10. Micrografía mostrando la retina central de un ratón IRS2-ko tras la tinción inmunocitoquímica para GFAP.



Efectos de la ausencia de IRS2 sobre la expresión inmunocitoquímica de Vimentina.

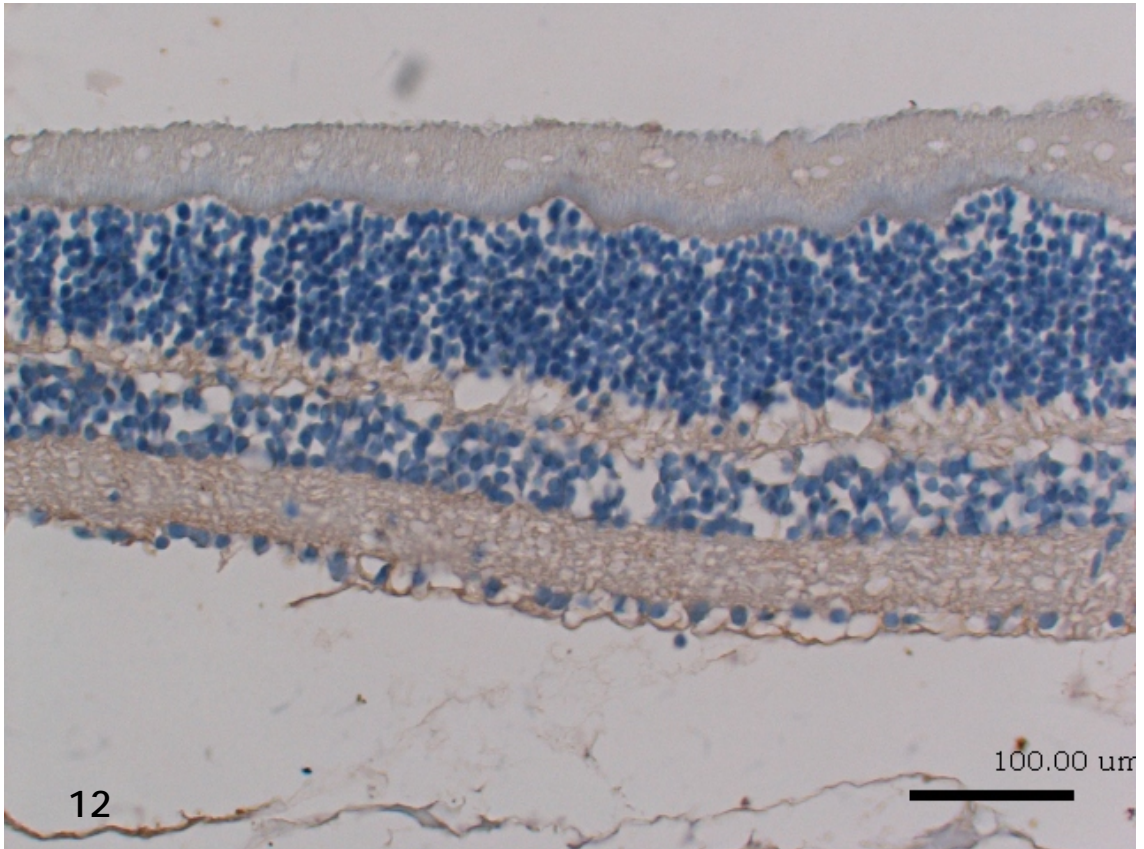
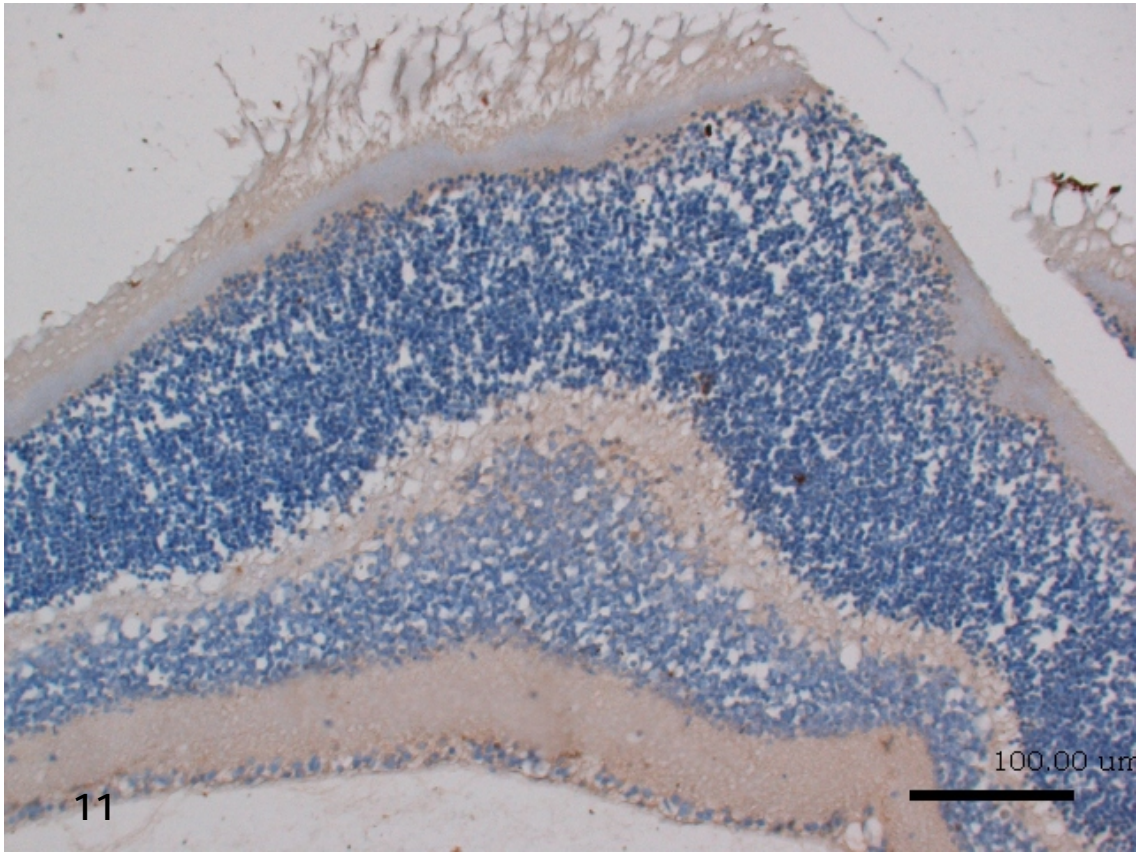
Ratones wild type.

Al igual que ocurría con el marcaje para GFAP, tanto la retina central (figura 11) como la periférica (figura 12) de los ratones wild type presentaron escasa positividad a vimentina.

Como puede observarse en ambas imágenes, representativas de los resultados encontrados en los diferentes animales, a pequeños aumentos la positividad es casi inapreciables, aunque a mayores aumentos, como describiremos al describir la figura 13, si se observamos elementos débilmente positivos, principalmente en la retina central.

Figuras 11 y 12. Micrografías que muestran la prácticamente ausencia de inmunoreactividad a Vimentina en la retina de los ratones wild type.

Figura 20, retina central, figura 21, retina periférica



La figura 13 muestra un corte radial de la retina central de un ratón wild type después del marcaje para vimentina.

En estos animales el marcaje inmunorreactivo dio lugar a una positividad débil que afectaba a células dispuestas en las capas: nuclear externa, nuclear interna y de células ganglionares.

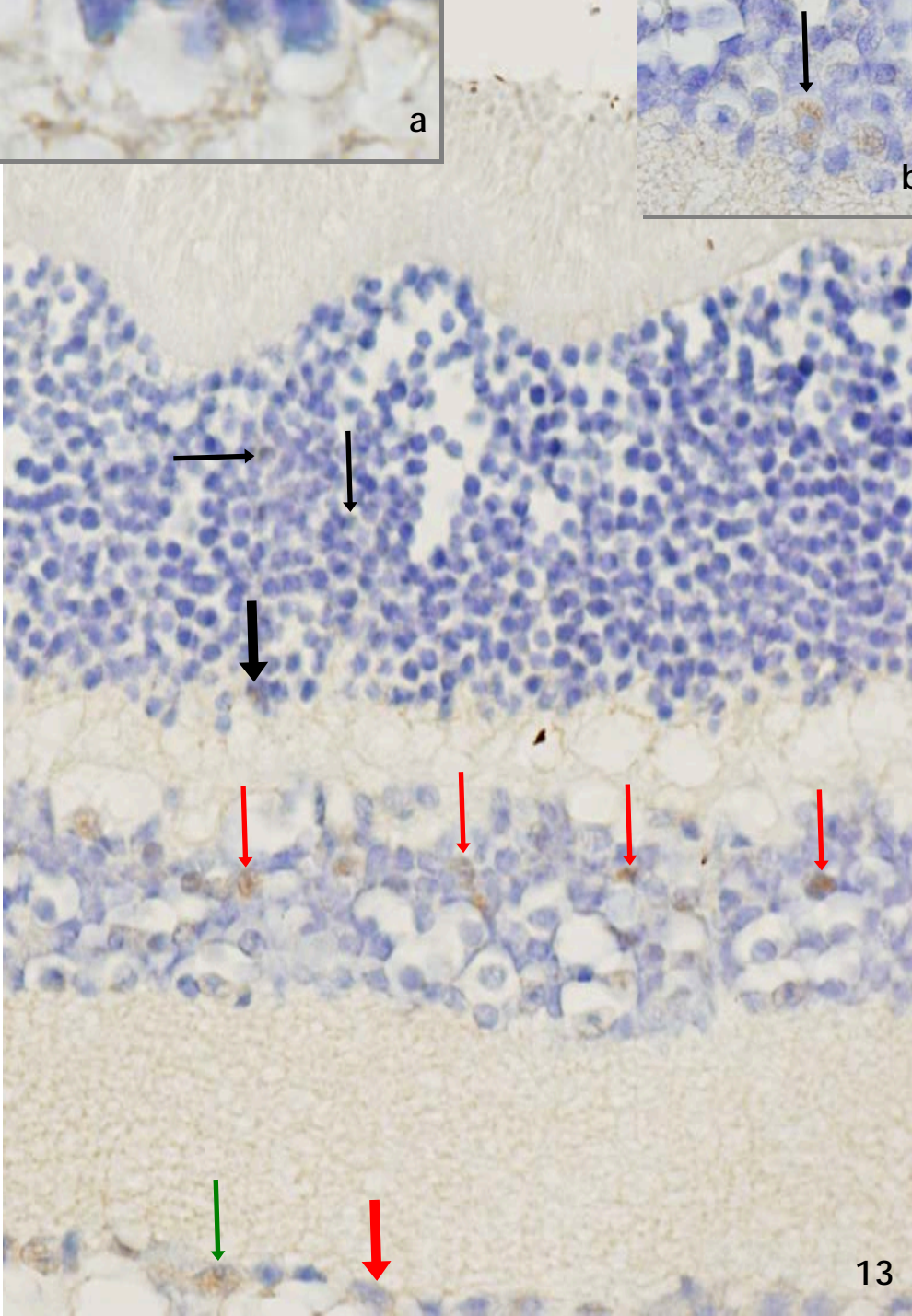
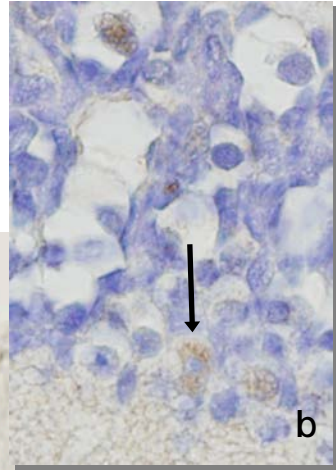
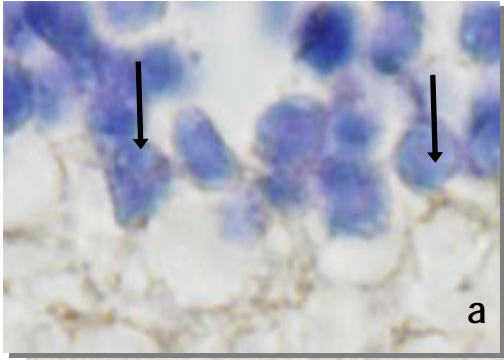
En la capa nuclear externa aparecieron algunas células positivas, escasas, aisladas y dispersas por el centro de la capa (flechas finas negras en figura 13). Además pudieron observarse, dispuestas en el borde vítreo de la capa otras células débilmente positivas de las que partían prolongaciones citoplásmicas finas con débil positividad (flecha gruesa negra en figura 13 y flechas finas en el inserta a).

La capa nuclear interna presentó dispersas por toda ella desde el borde escleral hasta el vítreo, células débilmente positivas, pero claramente diferenciables y delimitables (flechas finas rojas en figura 13 y flecha en insert b).

En la capa de células ganglionares se observaron dos tipos de células positivas. Uno de ellos estaba formado por células de aspecto glial con prolongaciones transversales al sentido radial de la retina (flecha roja gruesa en figura 13), y el otro, menos frecuente, lo conformaban células ganglionares aisladas (flecha fina verde en figura 13).

Figura 13. Micrografías que muestran la positividad a Vimentina en la retina central de los ratones wild type.

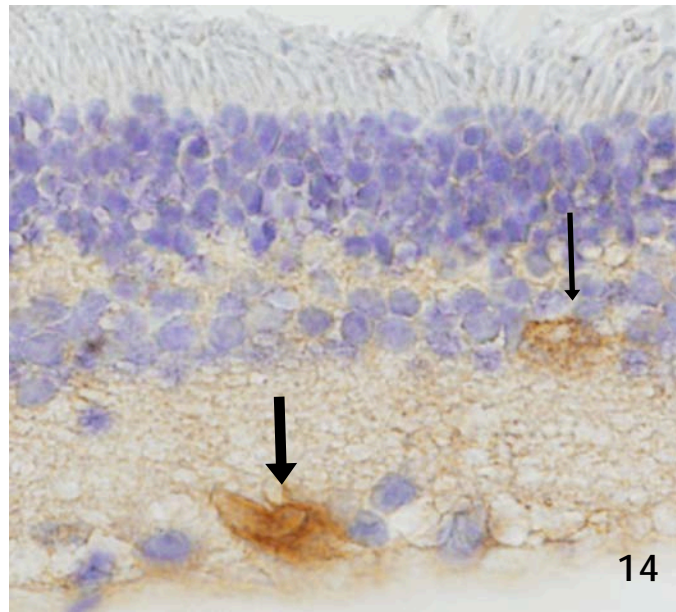
Insert a: borde vítreo de la capa nuclear externa. Insert b: capa nuclear interna.



Ratones IRS2-ko.

La reacción a vimentina en la zona más periférica de la retina de los ratones IRS2-ko, justo la que limita con la ora serrata, se disponía en dos planos:

Por un lado afectando a células grandes y dispuestas de forma transversal en el borde vítreo de la capa nuclear interna, recordando la disposición de las células amacrinas (flecha fina en figura 14).



El otro plano era más profundo y afectaba a células de aspecto glial en el borde vítreo de la capa de células ganglionares, células ganglionares que son muy escasas en esta zona de la retina (flecha gruesa en la figura 23).

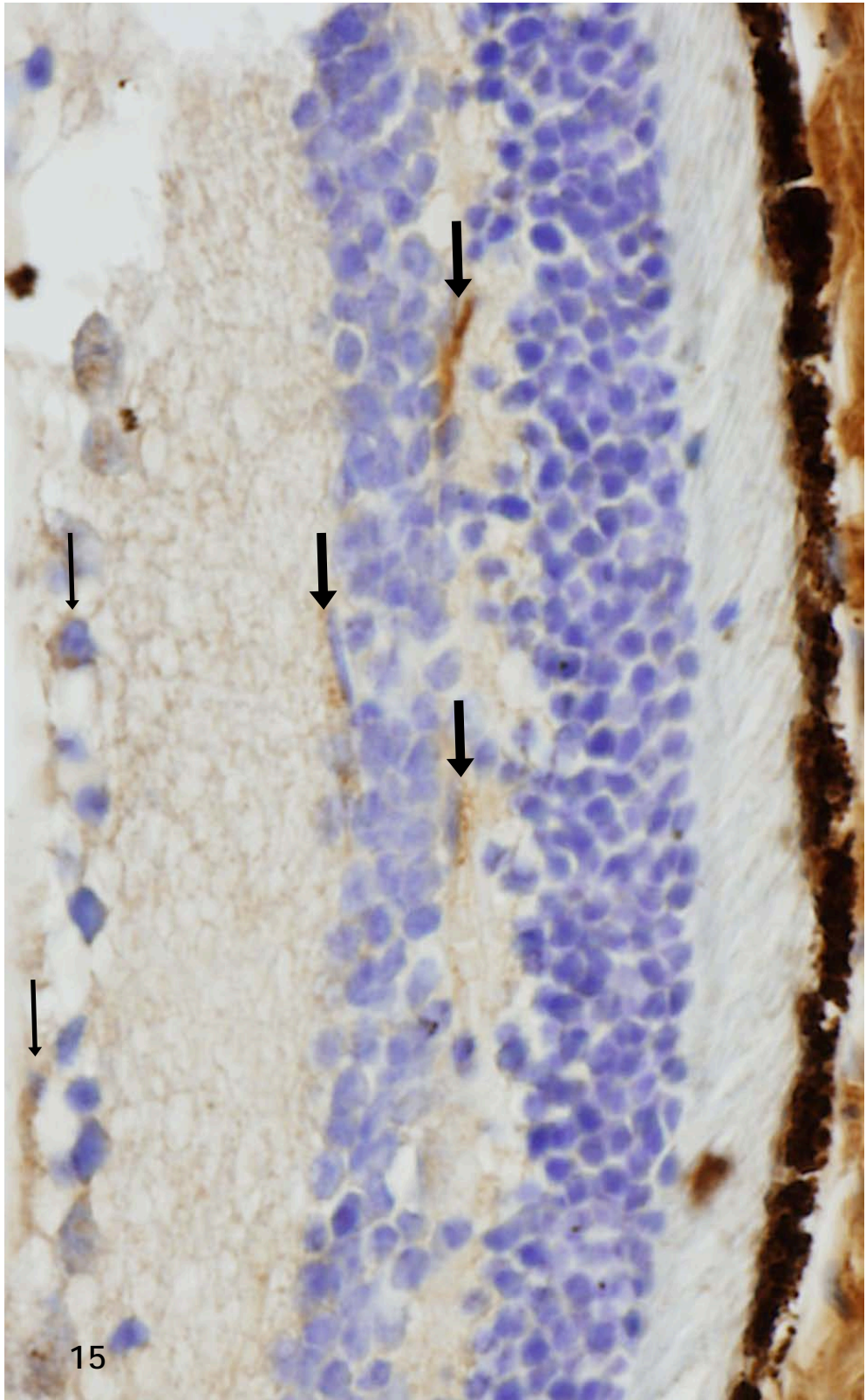
La figura 15 corresponde a lo que tradicionalmente se conoce como retina periférica, algo más alejada de la ora serrata.

En ellas se puede apreciar la presencia de células positivas en el borde vítreo de la capa de células ganglionares, con aspecto estrellado (flechas finas en figura 24).

Además, las capas plexiforme interna y externa, presentan células dispuestas en paralelo a los bordes convexo-cóncavos de la retina, en definitiva perpendiculares a la trama radial de la capas retinianas, dando la sensación de que estuvieran delimitando la capa nuclear interna por sus bordes escleral y vítreo (flechas gruesas en figura 24).

Figuras 14 y 15. Micrografías mostrando la positividad a vimentina en la retina periférica de los ratones IRS2-ko.

Figura 14, zona próxima a la ora serrata. Figura 15, retina periférica propiamente dicha.



La retina central de los ratones knock out, después del marcaje para vimentina, presentó marcadas diferencias con respecto a la retina periférica de estos animales y, sobre todo, con respecto a la retina central de los ratones wild type, como puede apreciarse si se comparan la figura 13 y la figura 16.

Aunque en la capa nuclear externa y la case de los conos y bastones presentaba positividad, ésta era débil y no bien definida. Sobre todo si se comparaba con la que presentaron las capas nuclear interna y la de células ganglionares.

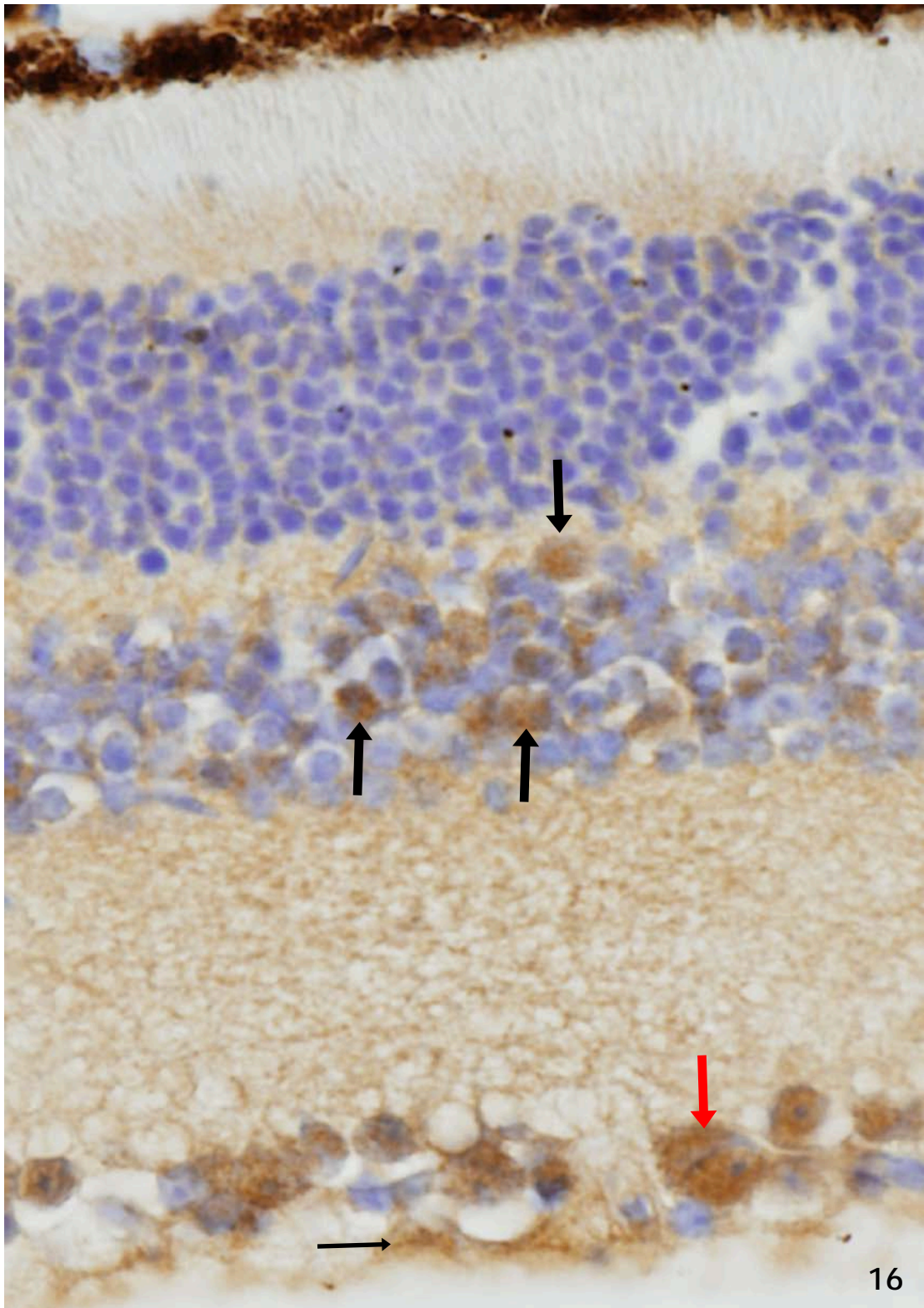
Distribuidas por toda la capa, desde el margen escleral hasta el vítreo, la capa nuclear interna presentó una células fuertemente positivas a vimentina de aspecto redondeado u oval (flechas gruesas negras en figura 16) que se intercalaban con otras células ovaladas de citoplasma claro no reactivas a vimentina.

Tanto la capa plexiforme interna como la externa presentaron una reacción difusa y generalizada, sin que se apreciaran las células aplanada de núcleo alargado que se observaban en la retina periférica de estos mismos animales.

La capa de células ganglionares y la de fibras del nervio óptico presentaron una fuerte positividad más intensa a vimentina. Células claramente ganglionares por su forma y disposición aparecieron intensa y homogéneamente positivas (flecha roa gruesa en figura 16). Lo que no excluía que alguna célula glial, menos intensamente reactiva, también apareciera positiva.

La capa de fibras del nervio óptico (flecha fina en figura 16) apareció claramente positiva a vimentina.

Figura 16. Micrografía mostrando la positividad a vimentina en la retina de un ratón IRS2-ko.



Aunque los detalles que se muestran en las figuras 26 y 27 han sido descritos al comentar las características que presenta el marcaje a vimentina en la retina central de los ratones IRS2-ko, hemos creído conveniente mostrar estas dos imágenes a altos aumentos ya que así dichas características pueden ser más fácilmente comprobadas.

La figura 26 muestra las células positivas a vimentina en la capa nuclear interna (flechas), como puede apreciarse la mayoría de las células bipolares y/o amacri- nas presentaron un citoplasma positivo, con una reacción granular fina irregularmente distribuida.

La zona más profunda de la retina, la correspondiente a la capa de células ganglionares y a la de fibras del nervio óptico, es la que presentó mayor intensidad de reacción, como puede apreciarse en la figura 27.

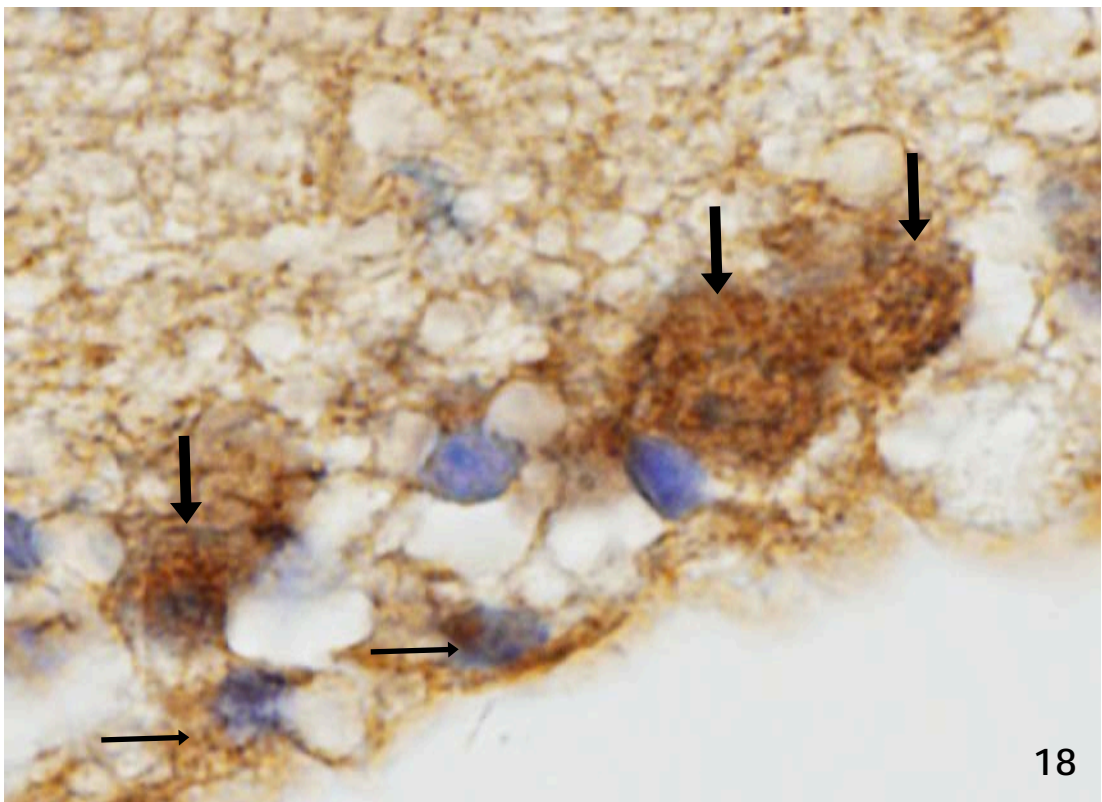
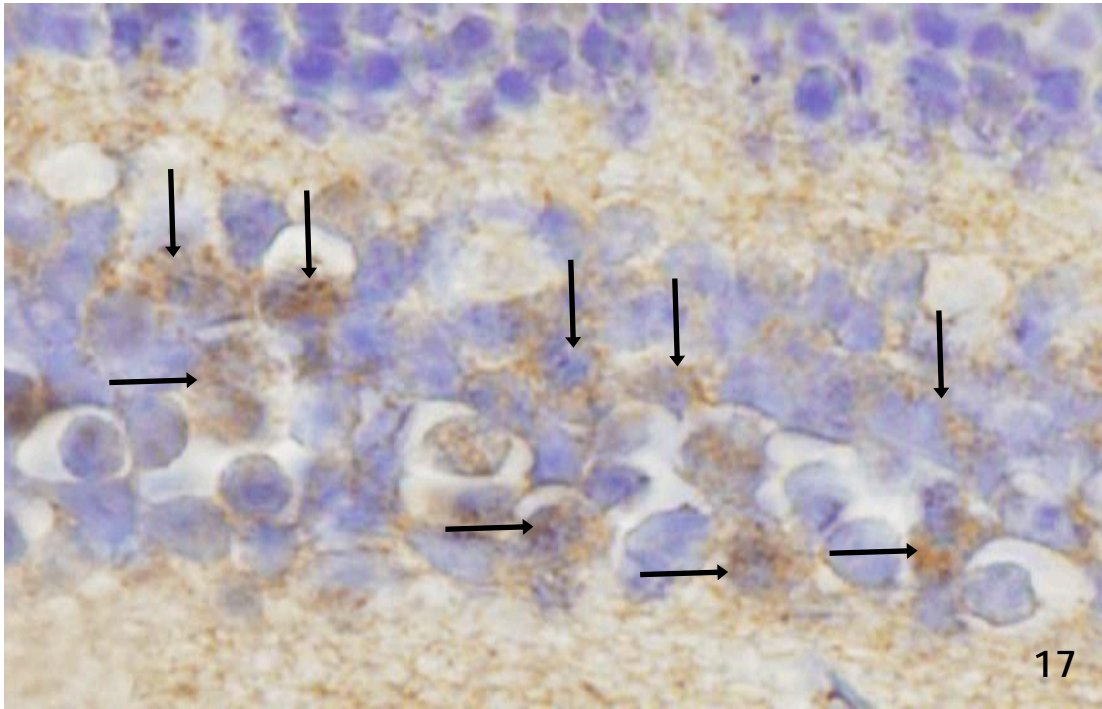
Las células ganglionares aparecieron intensamente reactivas (flechas gruesas) con una reacción que ocupaba todo el citoplasma e incluso llegaba a enmascarar al núcleo.

Junto a ellas, las células de aspecto glial más basales (flecha fina) también aparecieron positivas, si bien esta positividad era menos intensa.

Hacia el humor vítreo, en profundidad a las células antes descritas, las fibras que constituyen el nervio óptico también aparecían positivas.

Figuras 17 y 18. Micrografías mostrando la positividad a vimentina en la retina de un ratón IRS2-ko.

Figura 17, capa nuclear interna. Figura 18, capas plexiforme externa, de células ganglionares y de fibras del nervio óptico.



Efectos de la ausencia de IRS2 sobre la expresión inmunocitoquímica de Aromatasa P450.

Ratones wild type.

La retina periférica de los ratones wild type se caracterizaron por presentar una reacción difusa a la aromatasa por casi toda ella (figura 19).

La capa de conos y bastones presentó dos franjas de reacción, una apical, próxima al epitelio pigmentario y otra más basal, próxima a la limitante externa. De las dos, la más apical también fue más intensamente reactiva.

En la capa nuclear externa se apreció la presencia de células con citoplasma positivo a aromatasa, como describiremos más ampliamente al hablar de la figura 21.

La capa plexiforme externa presentó tractos reactivos a aromatasa, aunque la reacción no afectaba a toda la capa.

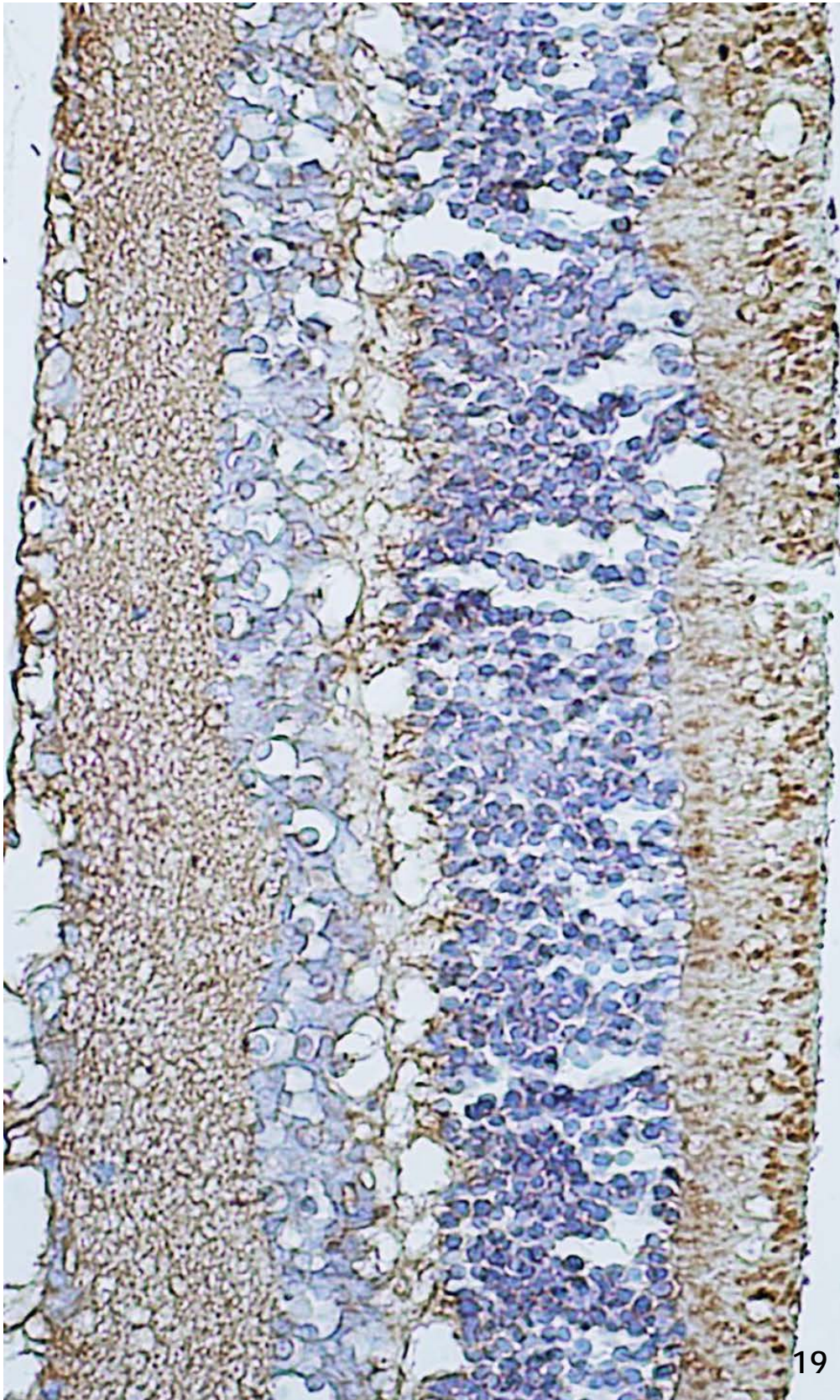
La capa nuclear interna presentó alguna célula positiva en las proximidades de la capa plexiforme externa, pero muy pocas células aparecieron positivas al enzima.

A diferencia de la capa plexiforme externa, la interna presentó una positividad generalizada que la afectaba a toda ella por igual, dándole un aspecto granular.

Algunas células de la capa ganglionar eran positivas a aromatasa, aunque la reacción no era generalizada y los citoplasmas aparecían débilmente positivos.

El aspecto de las fibras del nervio óptico fue de elevada positividad.

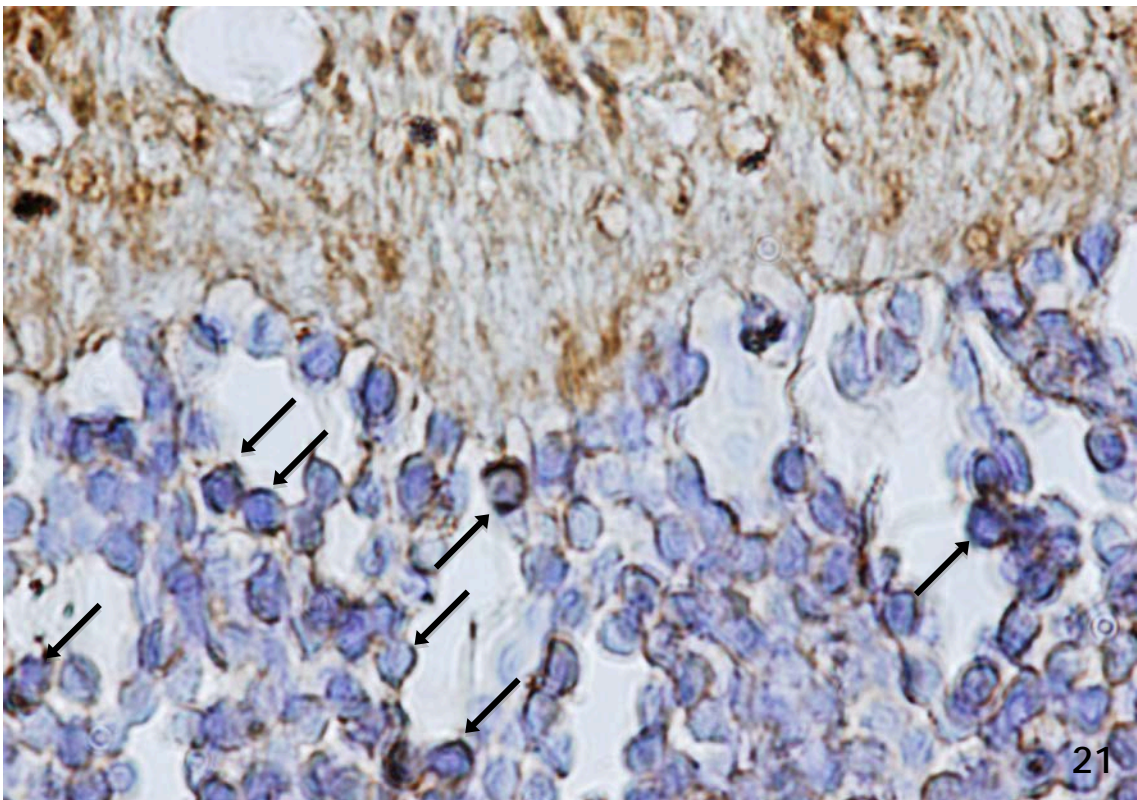
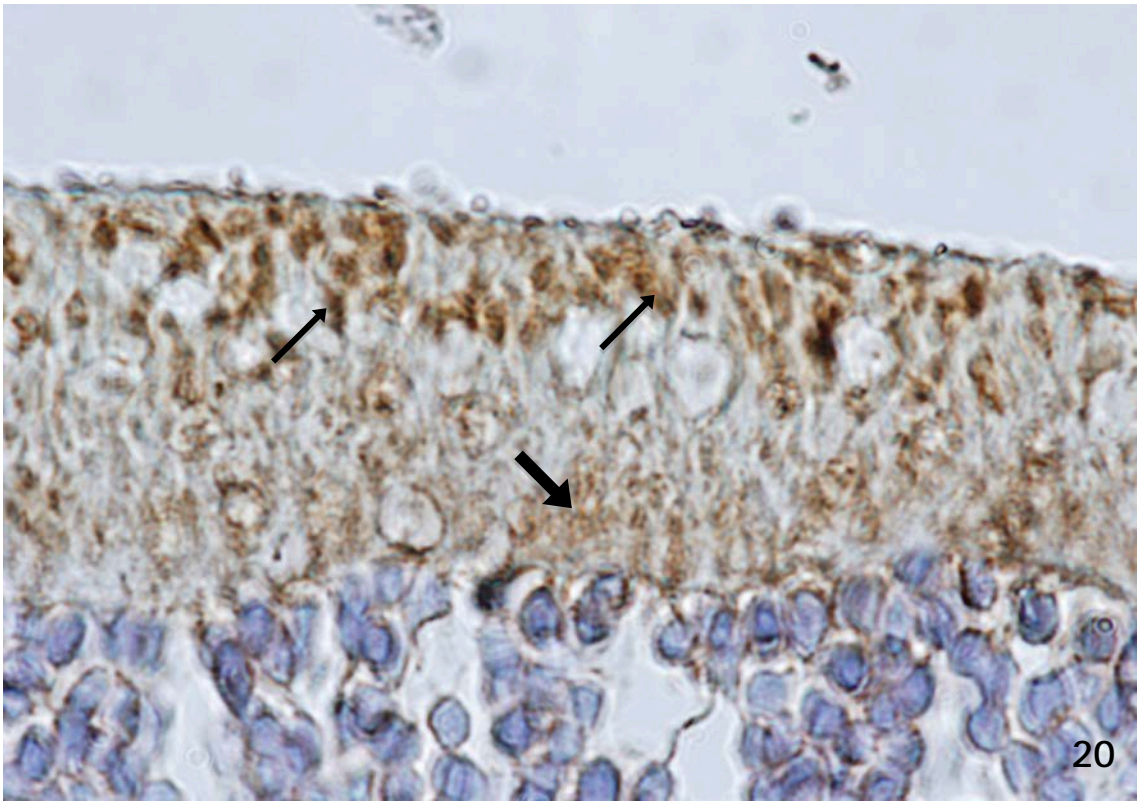
Figura 19. Micrografía mostrando la positividad a la aromatasa en la retina periférica de un ratón wild type.



A mayores aumentos, puede observarse como la retina periférica de los ratones wild type presentaba dos niveles de reacción bien diferenciados en la capa de conos y bastones (flechas en figura 20).

La capa nuclear externa de la retina periférica de estos animales mostró la presencia de células redondeadas o poligonales positivas al enzima (flechas en figura 21). Estas células presentaban un citoplasma como un anillo perinuclear muy reactivo.

Figuras 20 y 21. Micrografías a grandes aumentos en las que se aprecia la positividad a la aromatasa en los fotos receptores (capa de conos y bastones y capa nuclear externa) en la retina periférica de un ratón wild type.

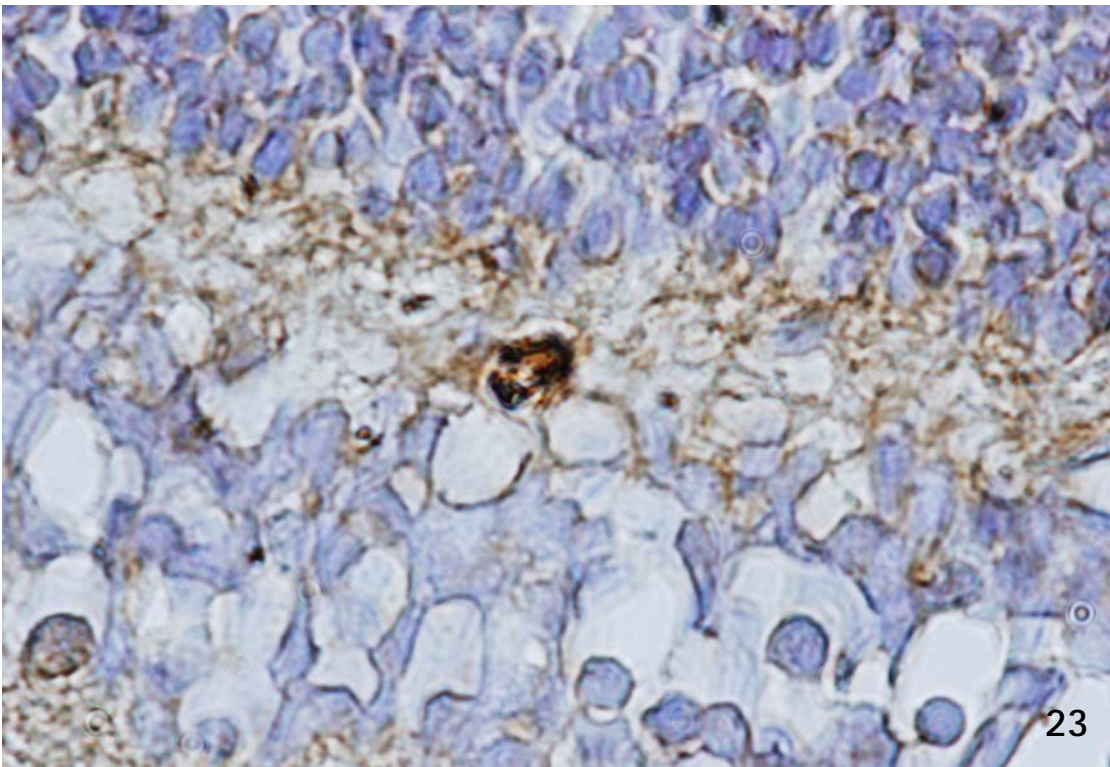
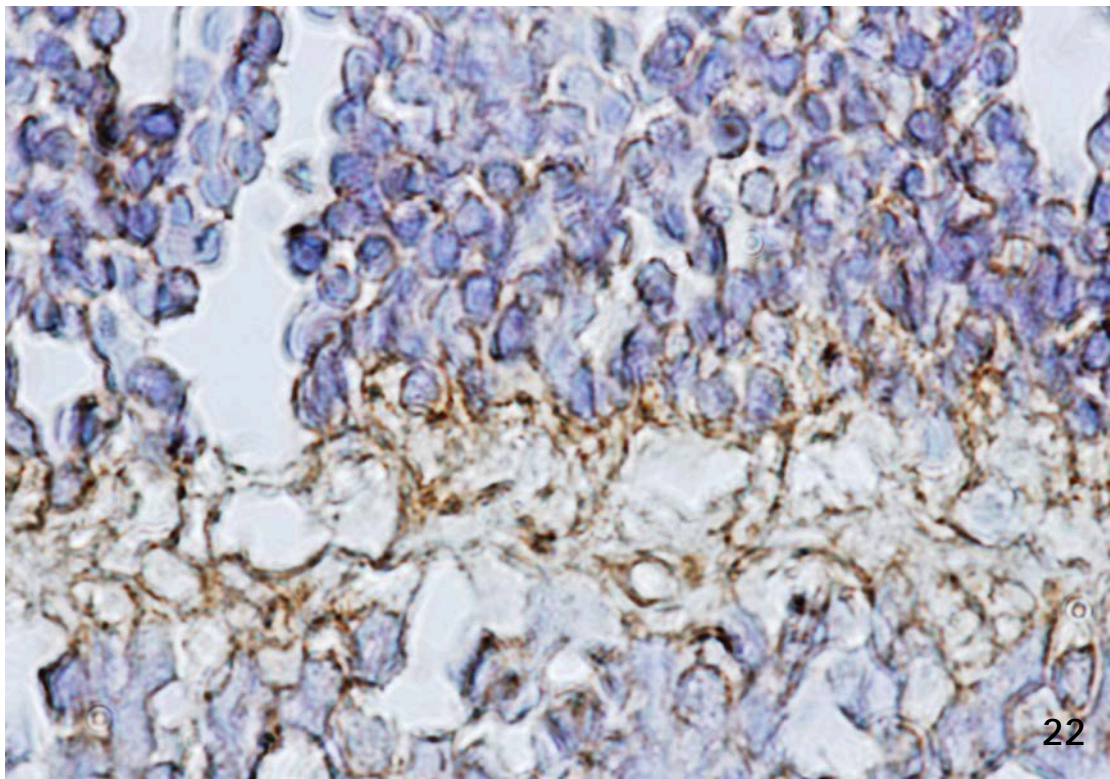


Con el marcaje para aromatasa, la capa plexiforme externa adquirió un aspecto de malla muy laxa con tractos positivos que dejaban entre ellos grandes espacios no reactivos (figura 22).

La capa nuclear interna (figura 23) presentó alguna célula positiva a aromatasa, la mayoría de las veces situadas en los límites escleral o vítreo de dicha capa.

Estas células eran poco numerosas y aparecían aisladas de manera que la mayoría de las células de esta capa no fueron positivas.

Figuras 22 y 23. Micrografías a grandes aumentos en las que se aprecia la positividad a la aromatasa en las capas plexiforme externa y nucleares interna y externa que la delimitan en la retina periférica de un ratón wild type.



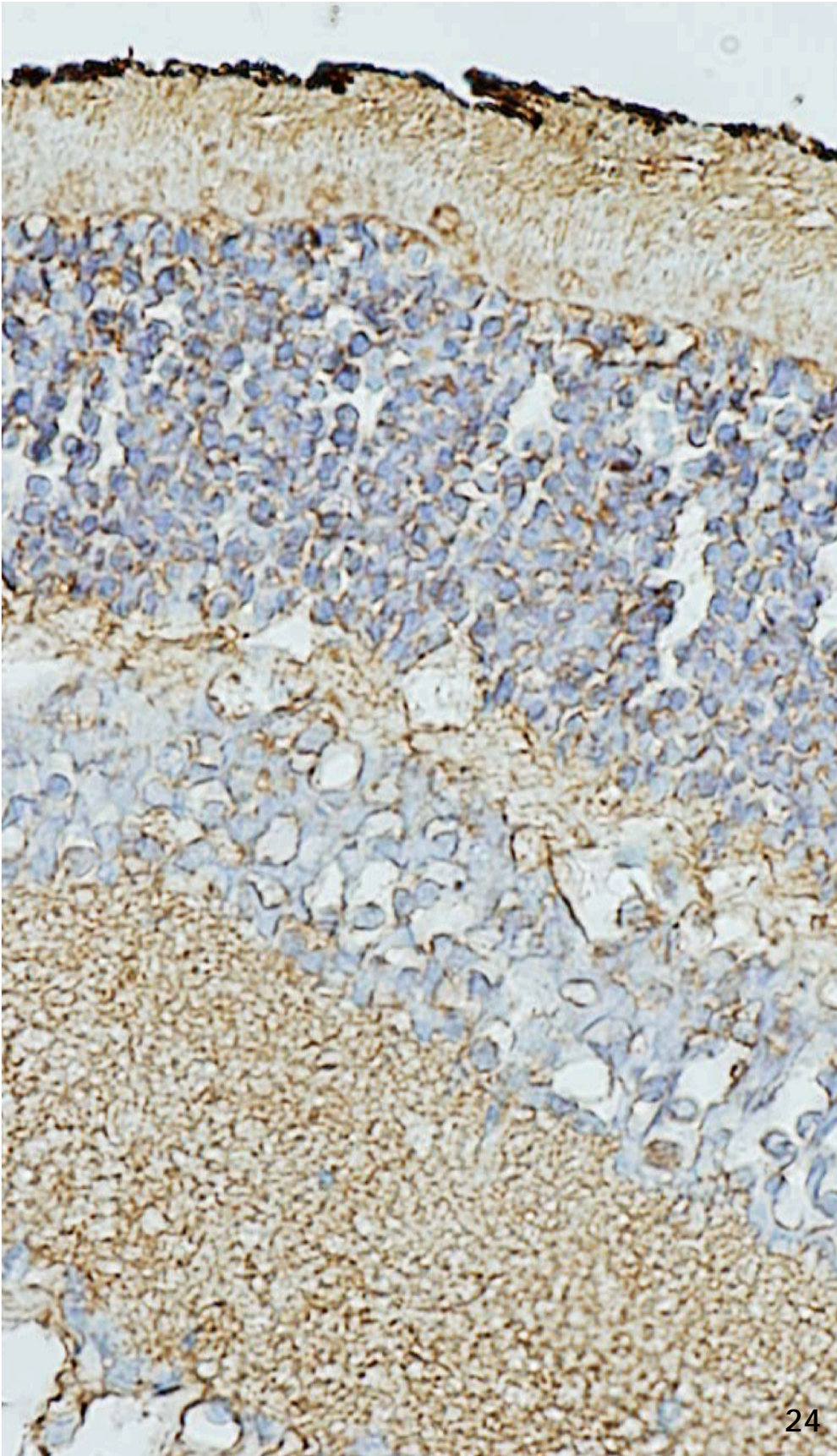
Las características del patrón inmunocitoquímico para la aromatasa que acabamos de describir para la retina periférica de los ratones wild type se repite en la retina central aunque con pequeñas diferencias que afectaron sobre todo a la localización de la reacción (figura 24).

Las diferencias más notables fueron un ligero descenso en la intensidad de reacción en la capa de conos y bastones, sobre todo en la zona que está próxima a la membrana limitante externa.

Apenas aparecían células positivas a la aromatasa en la capa nuclear interna.

La positividad en la capa de células ganglionares afectó sobre todo a células de aspecto glial.

Figura 24. Micrografía mostrando la positividad a aromatasa en las diferentes capas de la retina central de un ratón wild.



Las características que definen la positividad a la aromatasa en la retina central de los ratones wild type pueden apreciarse claramente a altos aumentos como se muestra en las figuras 25 a 27.

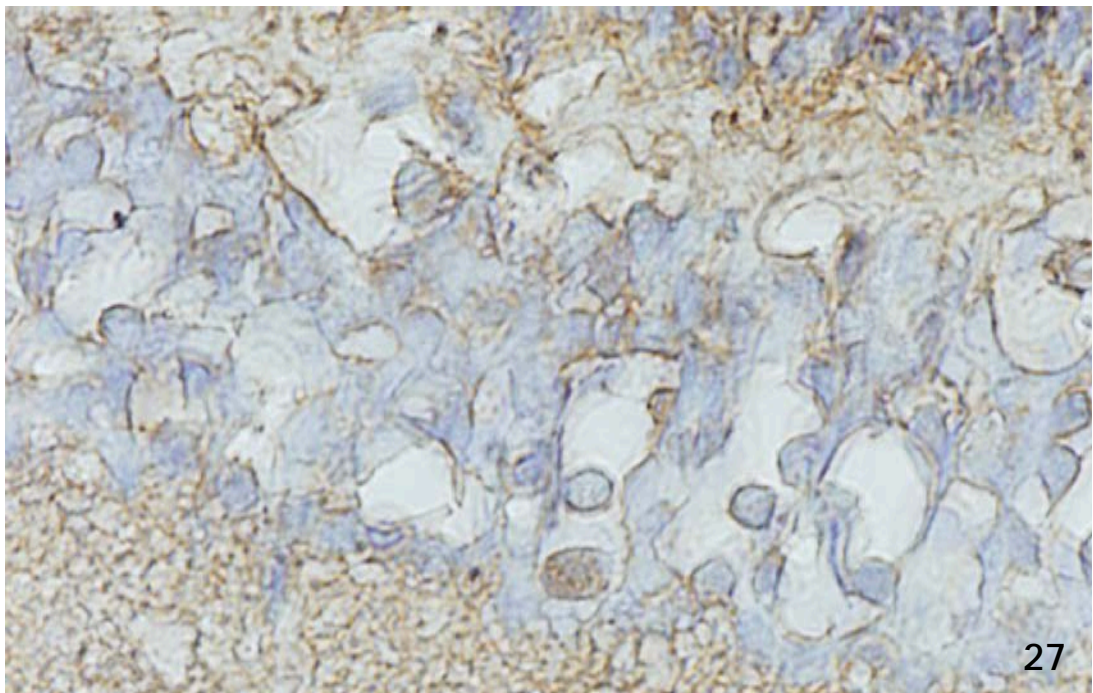
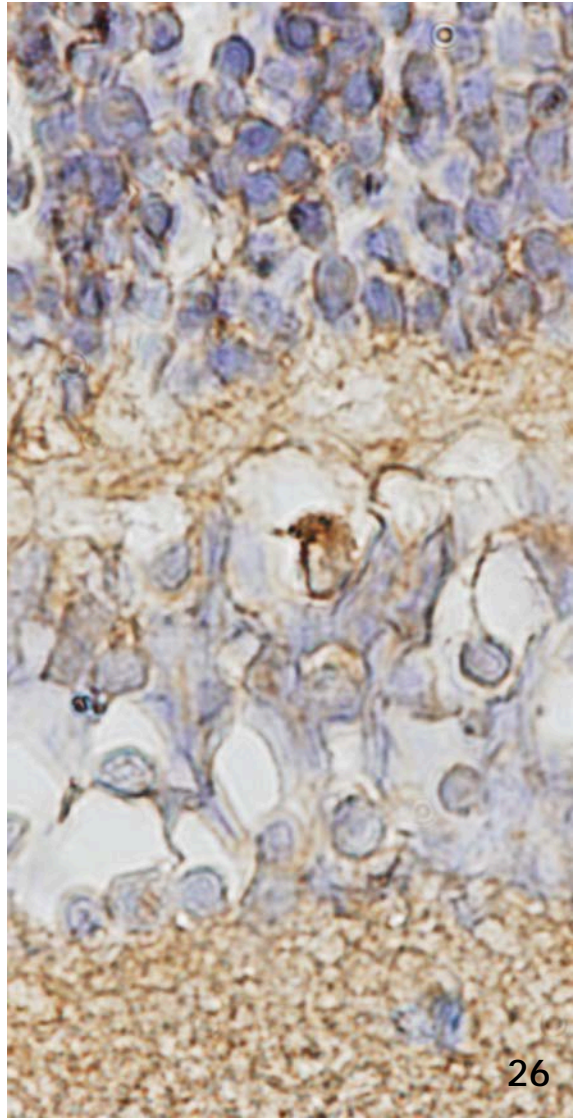
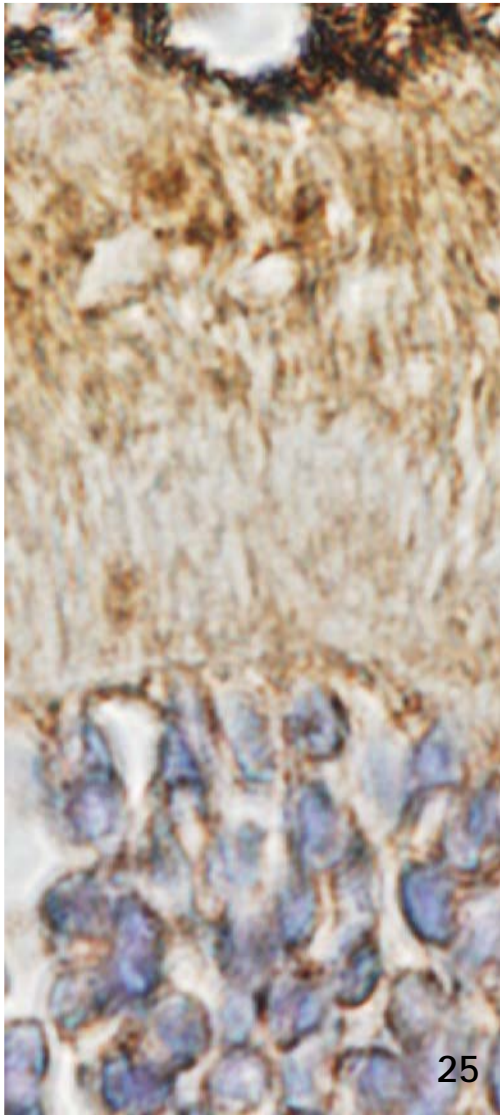
La positividad en los conos y bastones apareció fundamentalmente en el polo apical de los mismos, el que se relaciona con el epitelio pigmentario (figura 25).

La membrana limitante externa apareció positiva, aunque no en su totalidad, dejando soluciones de continuidad, en la porción central de la retina este rasgo fue más evidente que en la retina periférica.

La positividad en la capa nuclear externa fue semejante a la descrita para la retina periférica (figuras 25 y 26).

Las capas plexiforme externa y nuclear interna fueron semejantes a la retina periférica (figuras 26 y 27).

Figuras 25 a 27. Micrografías a grandes aumentos que muestran la positividad a aromatasa en los fotorreceptores y la capa nuclear interna de la retina central de un ratón wild type.



Ratones IRS2-ko.

La retina periférica de los ratones IRS2-KO presentó mayor positividad a aromatasa que la de los ratones wild type (figura 28).

La positividad se apreció en los fotorreceptores, aunque a diferencia de lo que ocurría en los animales wild type, la capa de conos y bastones apenas presentaba reacción apical.

La capa plexiforme externa apareció mucho más reactiva en estos animales, al igual que la capa nuclear interna, y la de células ganglionares.

La capa plexiforme interna presentó el aspecto granular semejante al descrito en los animales wild type.

En los IRS2-KO, la capa de fibras del nervio óptico, también apareció intensamente teñida.

Figura 28. Micrografía en la que se aprecia la positividad a aromatasa en las diferentes capas de la retina periférica de un ratón IRS2-KO.



28

Al margen de la distribución de la positividad a la aromatasa en la capa de conos y bastones que comentaremos con mayor profundidad al hablar de la retina central de estos animales, las diferencias más llamativas con respecto a los ratones wild type se apreciaron en la capa nuclear interna (figura 29) y en la de células ganglionares (figura 30).

Como se aprecia en la figura 29, muchas células de la capa nuclear interna aparecieron positivas a la aromatasa, si bien se diferenciaron bien tres tipos de células o de patrones de positividad al enzima:

Las células del borde escleral de la capa o dispuestas inmediatamente por dentro, con una reacción citoplásmica de aspecto irregular y con una intensidad media de reacción (cabezas de flecha en figura 29).

Los otros dos tipos aparecieron en el borde vítreo de la capa nuclear interna.

Células con un citoplasma intensamente reactivo de aspecto granular fino y núcleos desplazados hacia un polo. En ocasiones con nucleolo (flechas finas en figura 29).

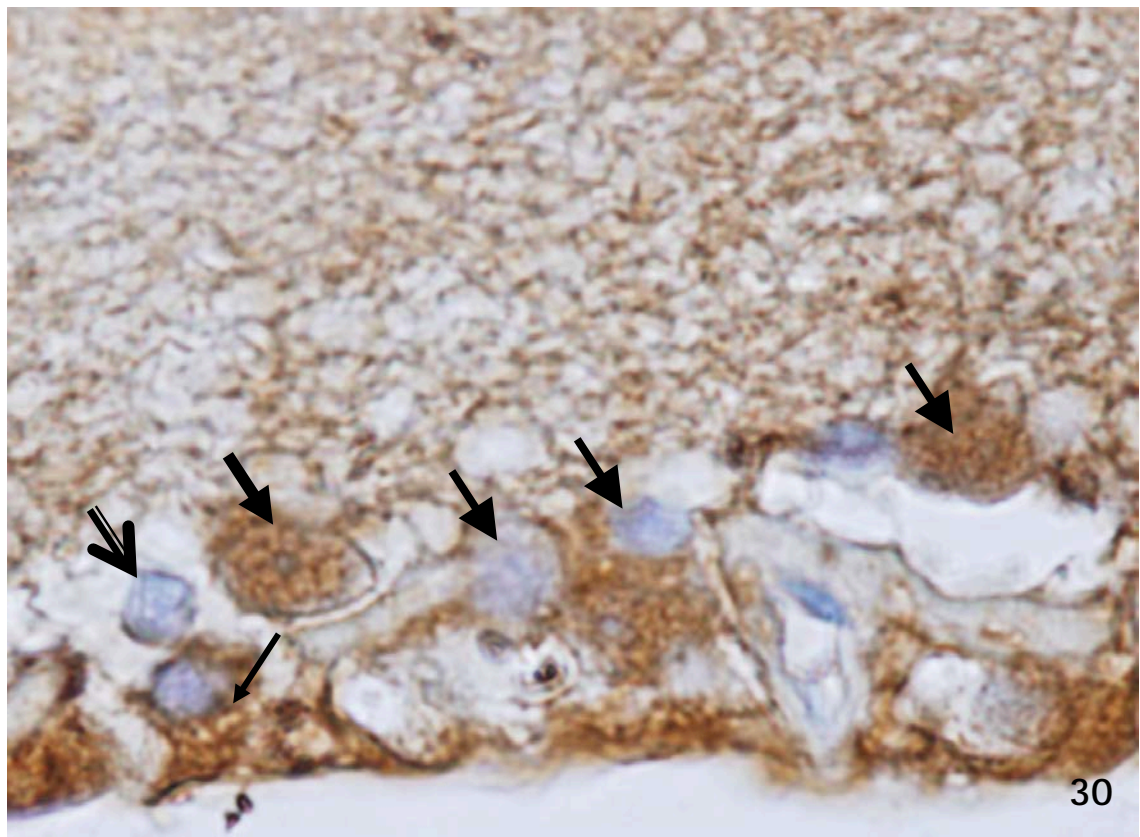
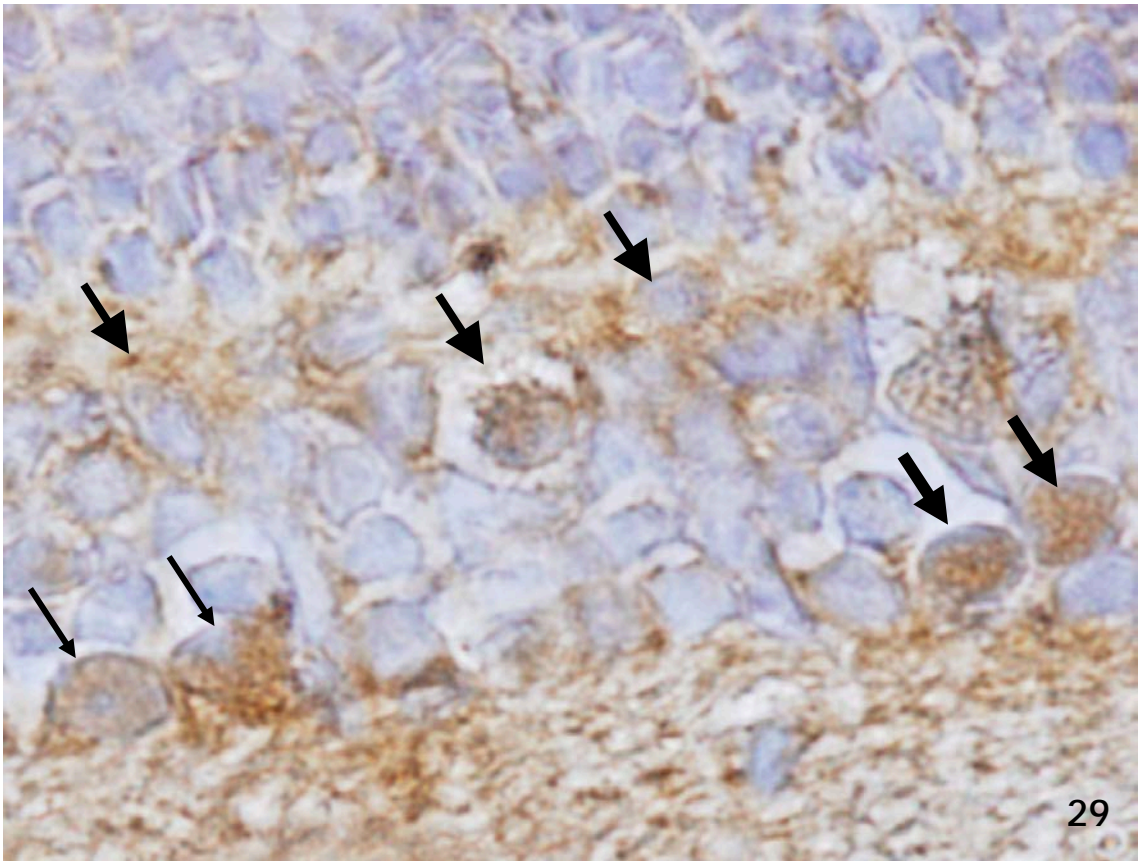
Células redondeadas con una reacción que parecía superponerse al núcleo (flechas gruesas en figura 29).

La capa de células ganglionares presentó células con citoplasmas bien teñidos y de morfología irregular o poligonal (cabezas de flecha en figura 30), células ovoides de núcleos grandes y tinción que afectaban al núcleo y al citoplasma (flecha gruesa en figura 30) que se disponían junto a células que no se marcaban para el enzima (flecha abierta en figura 30).

También se apreciaron células de aspecto glial con citoplasmas muy reactivos (flecha fina en figura 30).

Figuras 29 y 30. Micrografía mostrando la retina de un ratón wild type teñida con hematoxilina de Mayer.

Figura 29: capa nuclear interna. Figura 30: capa de células ganglionares.



La retina central de los animales IRS2-KO (figura 31) presentó características muy parecidas a las descritas para la región periférica:

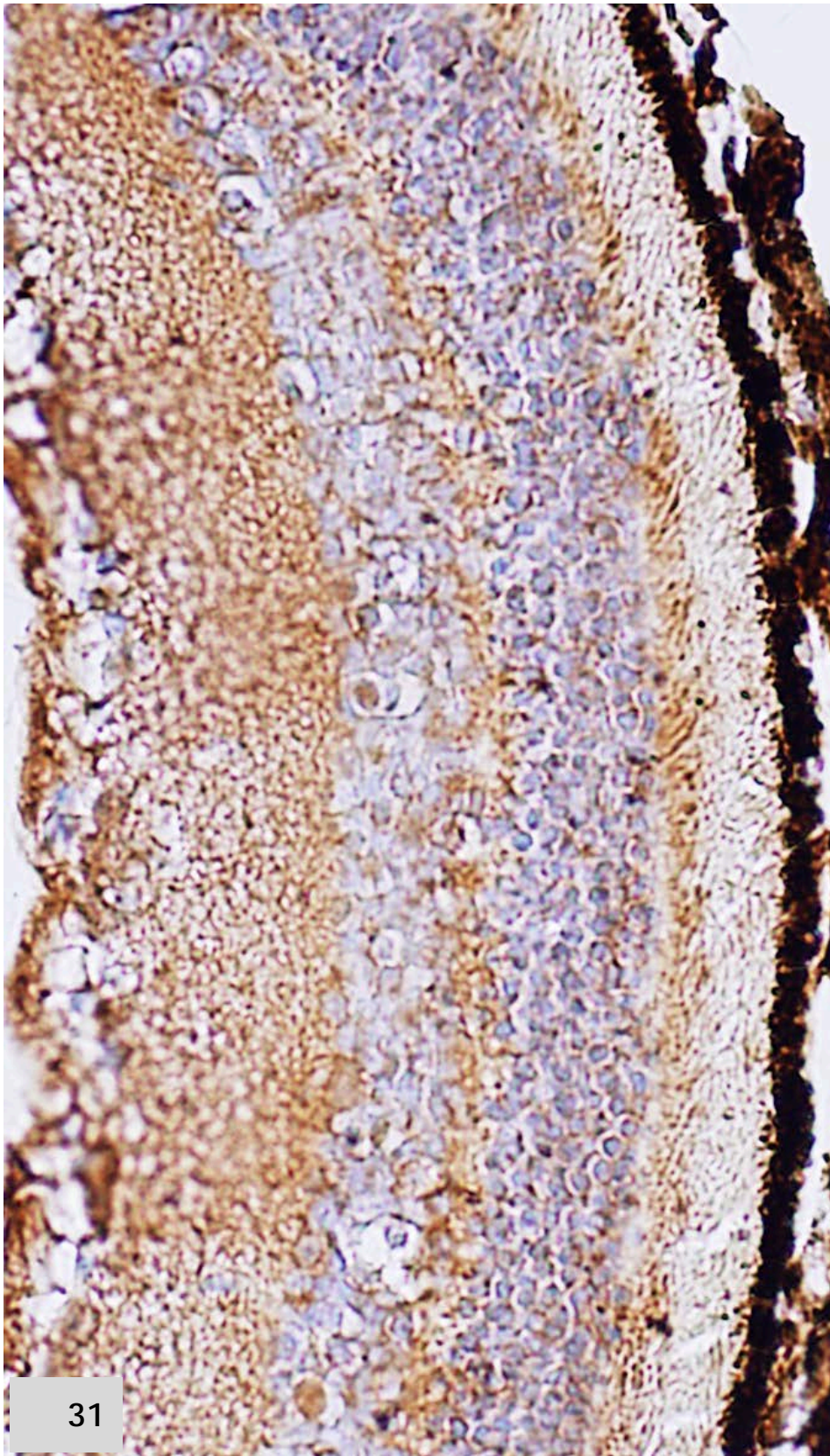
Un aumento de positividad y de intensidad de la reacción en casi todas las capas.

La capa de conos y bastones apenas presentaba reacción apical.

La capa plexiforme externa, la nuclear interna, la de células ganglionares y la de fibras del nervio óptico eran claramente positivas.

A diferencia de la retina periférica, en la central, la capa plexiforme interna era más reactiva que en los wild type, principalmente en la zona más próxima a la capa nuclear interna.

Figura 31. Micrografía en la que se aprecia la positividad a aromatasa en las diferentes capas de la retina central de un ratón IRS2-KO.



En las figuras 32 y 34 puede observarse de forma demostrativa el ribete de conos y bastones presentando muy escasa positividad en el polo apical próximo al epitelio pigmentario, mientras que el polo basal por encima de la membrana limitante externa apareció teñido. La intensidad de tinción observada es claramente menor que la descrita para los animales wild type.

La figura 32 y la 34 permiten apreciar como en la capa nuclear interna de fotorreceptores la intensidad de la positividad a la aromatasa en la retina central fue menos intensa, sin que se apreciara la presencia con un citoplasma totalmente reactivo, lo que daba un aspecto puntiforme y deslavazado a la reacción en esta capa de la retina.

La positividad en la capa plexiforme externa fue evidente, pero debido a la disminución de tamaño de esta capa en los animales IRS2-KO la reacción se confundía con la de las células positivas del margen escleral de la capa nuclear interna, bien evidentes en la micrografía de la figura 34.

Alguna célula dispuesta en el borde vítreo de la capa nuclear externa que por su disposición y morfología podría ser una célula de Müller, apareció positiva a aromatasa (figura 32).

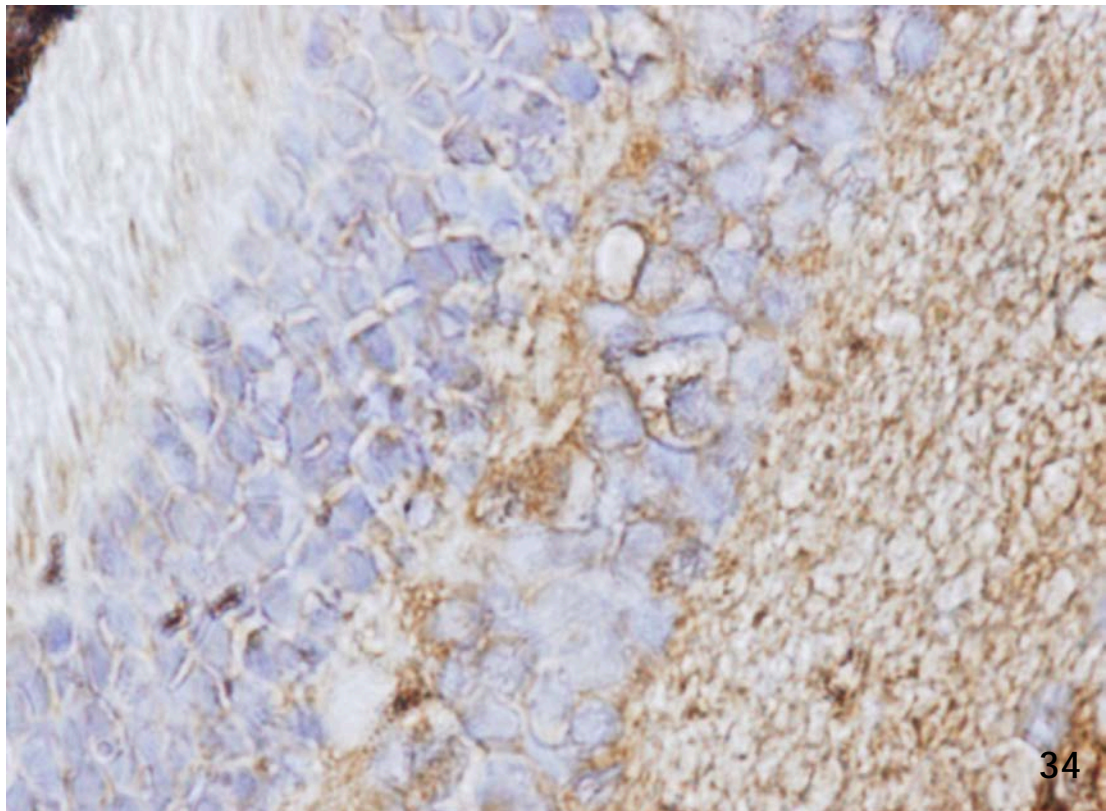
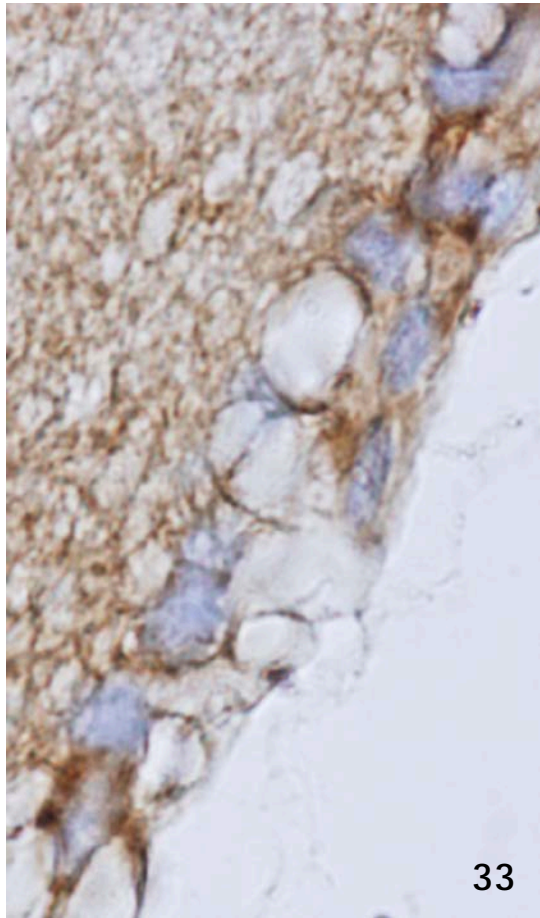
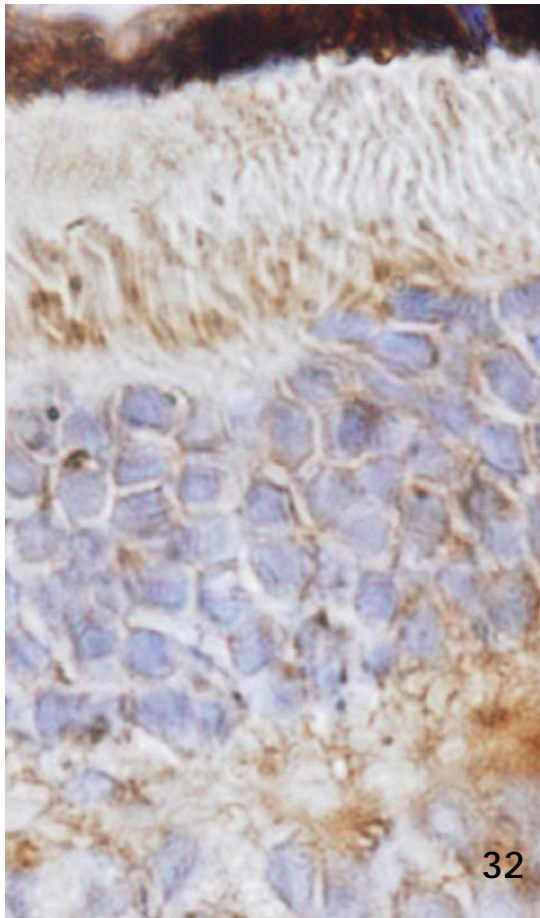
En la capa nuclear interna al margen de las células ya descritas, también aparecieron células de citoplasma claro positivas al enzima (figura 34) y alguna célula situada en el borde vítreo de dicha capa.

La capa plexiforme externa presentó el aspecto típico de punteado fino que la caracteriza.

Casi todas las células de capa de células ganglionares aparecieron positivas a la aromatasa (figura 33).

Figuras 32 a 34. Micrografías que muestran a mayores aumentos las características de la positividad a la aromatasa en la retina central de los machos IRS2-KO.

Figura 32, zona escleral de la retina central. Figura 33: zona vítreo de la retina. Figura 34: zona intermedia.



Efectos de la ausencia de IRS2 sobre la expresión inmunocitoquímica de Glutamina sintetasa.

Ratones wild type.

La positividad a glutamina sintetasa ha sido tradicionalmente la metodología empleada para el estudio de las células de Müller, células gliales especializadas que dan soporte a la disposición radial de la retina y su estructura en capas. Estas células confluyen en la base de los conos y bastones y en profundidad a las células ganglionares para formar, respectivamente las membranas limitantes externa e interna.

La figura 35 muestra el patrón típico de reacción, de aspecto radial, que se observó en la retina periférica de los ratones wild type.

Básica hay dos puntos en los que pueden apreciarse células positivas:

En el borde vítreo de la capa nuclear externa donde se configura una franja circunferencial que recorre toda la retina y de la que parten prolongaciones citoplásmicas que se interponen entre la células que constituyen la capa nuclear externa, hasta llegar a la base de los conos y bastones, donde desaparece la positividad a la altura de la membrana limitante externa.

También aparecieron células positivas aisladas en la capa de células ganglionares.

Cruzando las capas plexiforme externa, nuclear interna y plexiforme interna se apreciaron prolongaciones positivas finas, con una reacción de aspecto arrosariado. Estas prolongaciones fueron menos numerosas y menos evidentes que las de la capa nuclear externa. En ocasiones parecen originarse a partir de las células situadas en el borde vítreo de la capa nuclear externa y, en otras ocasiones parecen proceder de las células de la capa de células ganglionares.

Figura 35. Micrografía mostrando la positividad a glutamina sintetasa en la retina periférica de un ratón wild type.



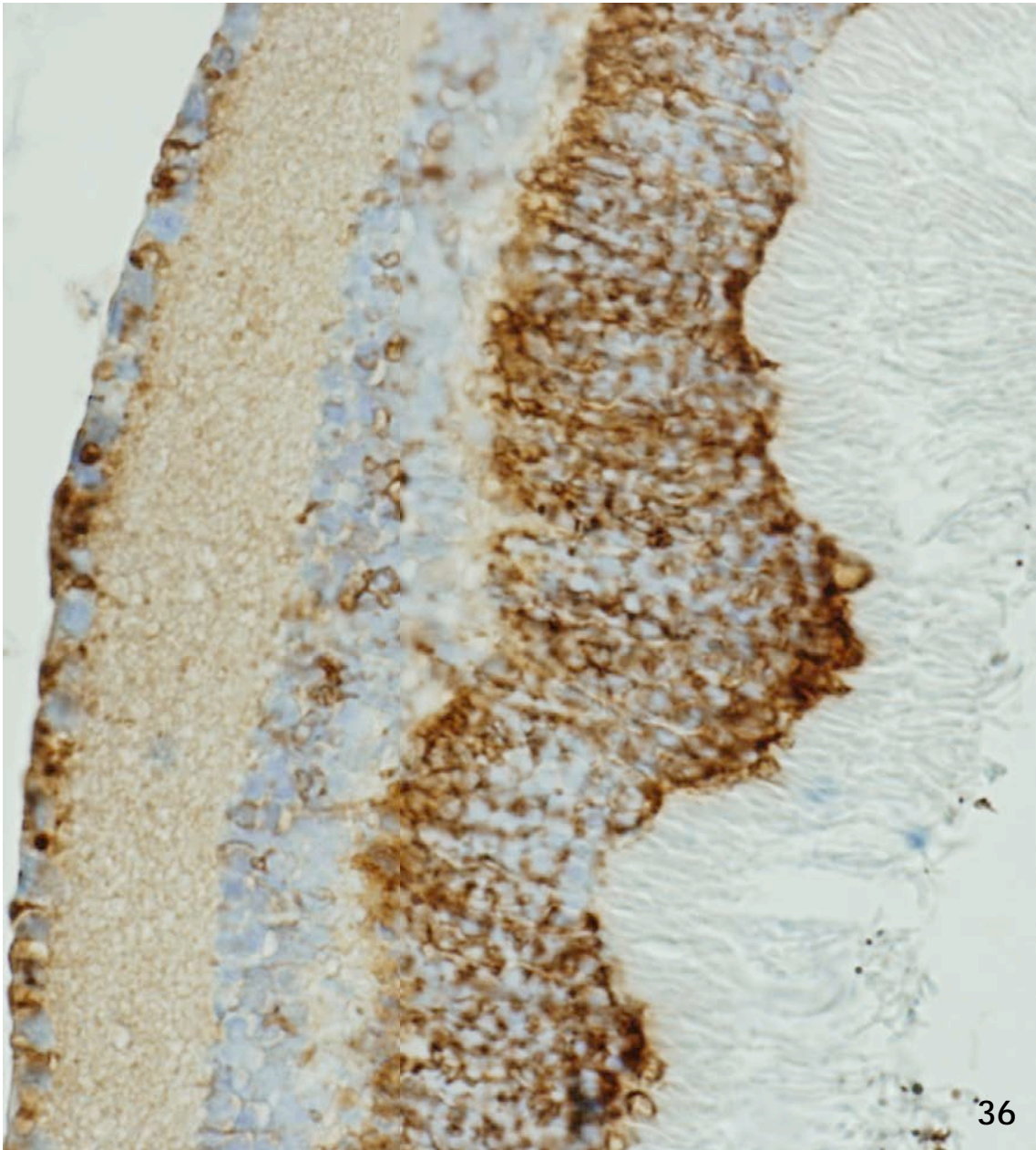
35

Como se aprecia en la figura 36, la retina central de los ratones wild type fue muy semejante a la retina periférica.

Sin embargo, la retina central, a diferencia e la periférica, presentó células positivas en la capa nuclear interna (figura 36).

Estas células aparecieron con un citoplasma bien teñido, no parecía emitir largas o gruesas prolongaciones y se dispusieron de forma irregular por dicha capa.

Figura 36. Micrografía mostrando la positividad a glutamina sintetasa en la retina central de un ratón wild type.



Ratones IRS2-ko.

Los ratones IRS2-ko también presentaron positividad a la glutamina sintetasa (figuras 37 y 38), no obstante esta positividad presentó diferencias destacables con respecto a los ratones wild type.

Como se aprecia en la figura 37, las diferencias más destacables en la retina periférica afectaron a la positividad en la parte más superficial de la retina.

Las células dispuestas en el margen vítreo de la capa nuclear externa no forman una estructura continua y circunferencial como en los animales wild type, presentando zonas con solución de continuidad, a la vez, los tractos citoplásmicos radiales eran mucho menos numerosos.

Las células positivas de la capa nuclear externa prácticamente ocupaban gran parte de lo que en los animales wild type es la capa plexiforme externa.

Quizás como consecuencia de lo anterior, la membrana limitante externa no era una estructura bien definida y tampoco era continua, presentando zonas en las que estaba claramente ausente.

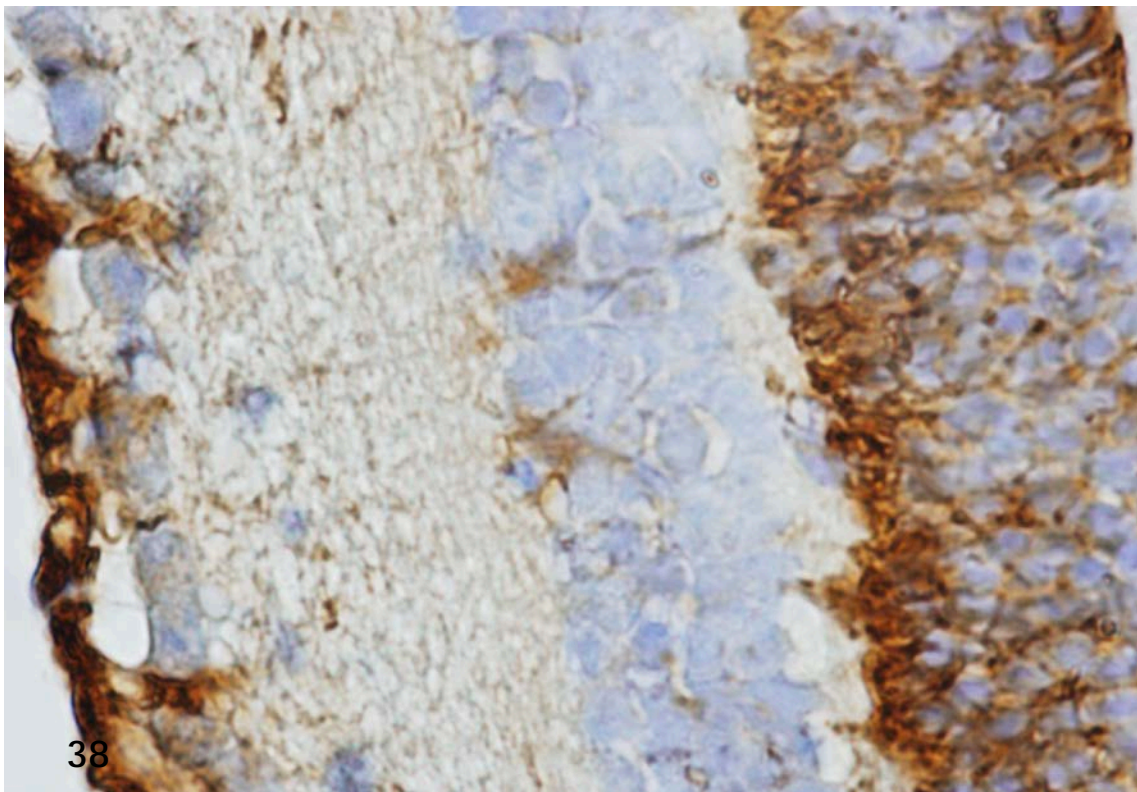
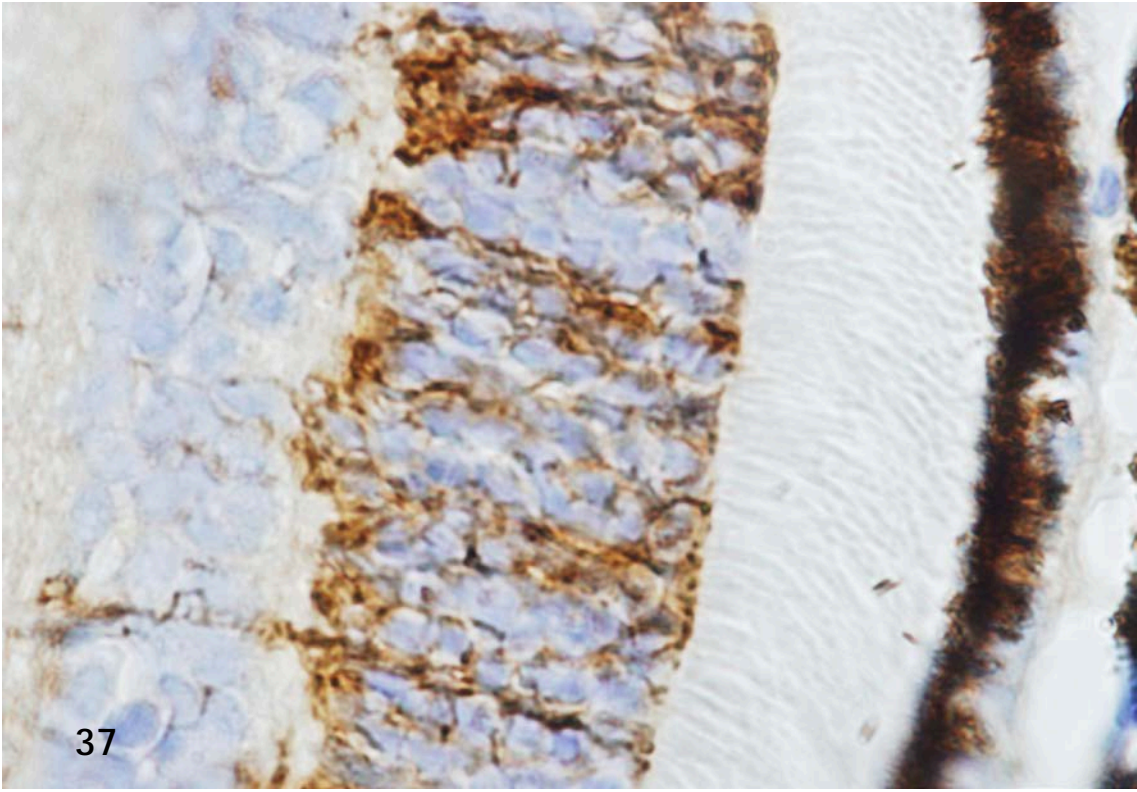
Los escasos tractos que atravesaban entre las células de la capa nuclear interna, claramente procedían de las células dispuestas en la nuclear externa.

En la figura 38 se observa como la retina central de estos animales presentó más células positivas en el borde vítreo de la capa nuclear externa, pero sus prolongaciones no seguían la disposición radial de los wild type.

La células positivas de la capa nuclear interna que se observaban por toda la capa en los ratones wild type, en los IRS2-ko fueron mucho menos abundantes y aparecían en el borde vítreo de esta capa, con un marcado aspecto glial y prolongaciones citoplásmicas finas. La positividad de estas células fue más débil que la de la capa nuclear externa.

La mayor intensidad de reacción apareció en la capa de fibras del nervio óptico y en alguna célula de la capa de células ganglionares.

Figuras 37 y 38 Micrografías mostrando la positividad a glutamina sintetasa en la retina periférica y central de ratones IRS2-ko.



Efectos de la ausencia de IRS2 sobre la expresión de Tyrosín hidroxilasa (TyrHD).

Ratones wild type.

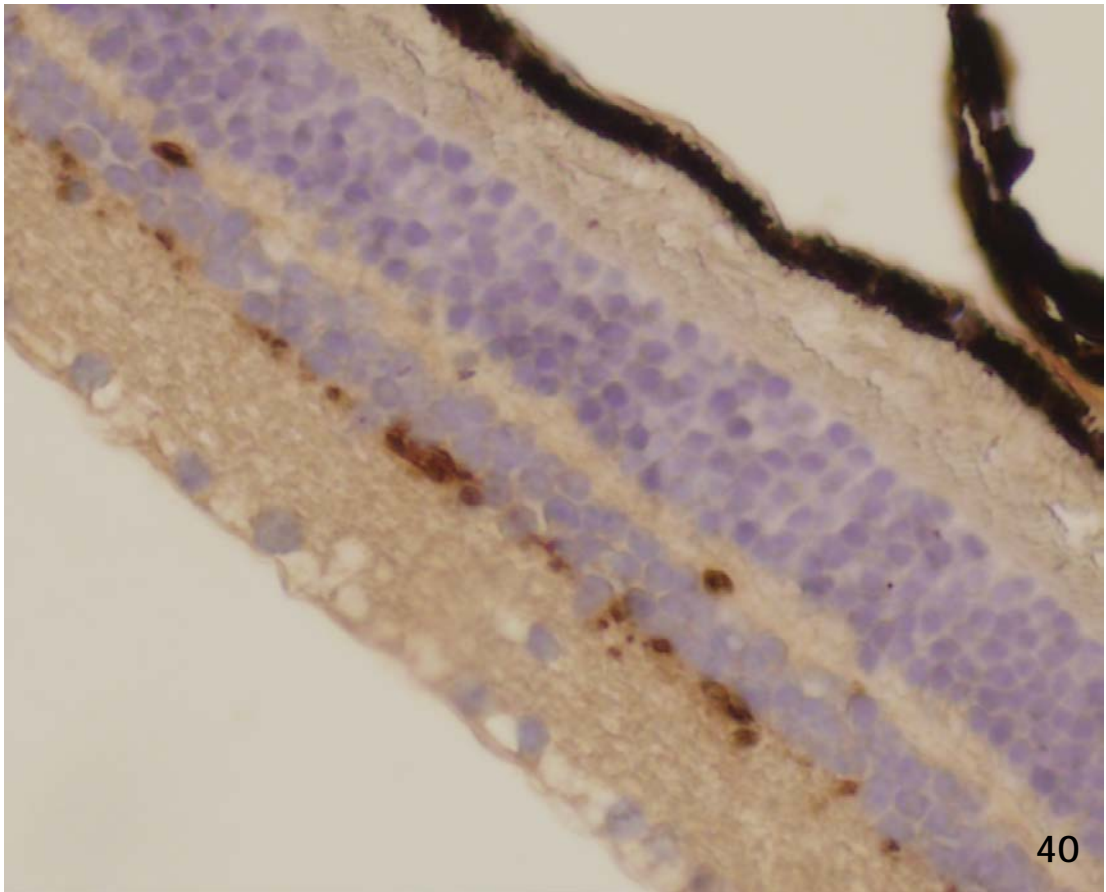
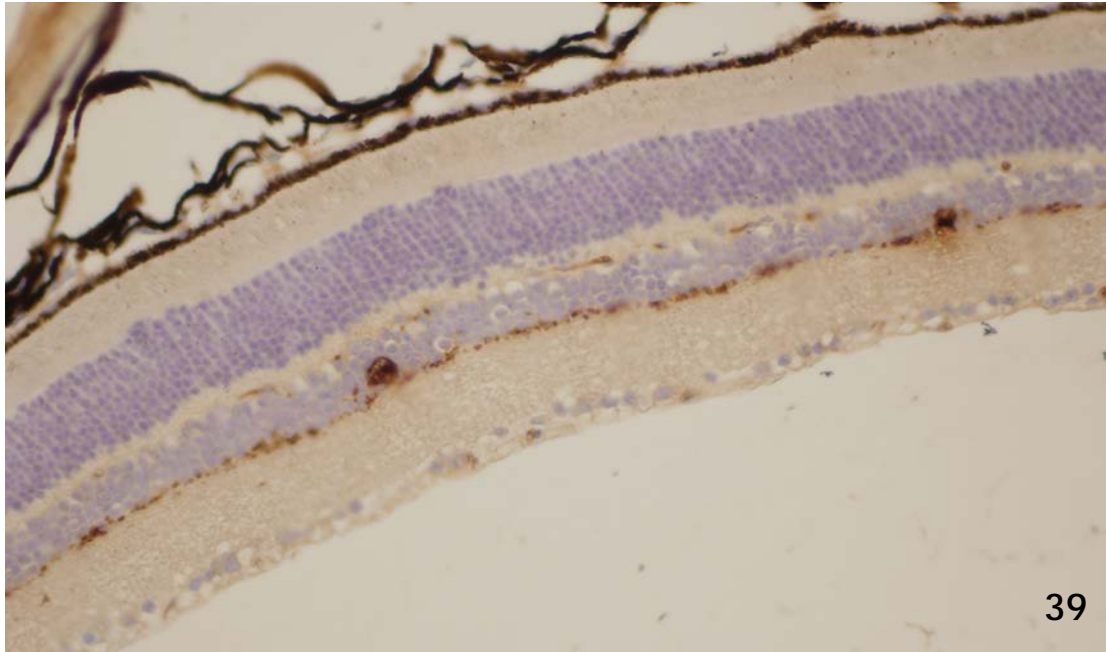
La retina periférica de los ratones wild type se caracterizó por presentar células amacrininas positivas a TyrH que se disponían en el margen vítreo de la capa nuclear interna.

Estas células aparecían como células globulosas (figura 39) dispuestas a cierta distancia unas de otras y partiendo de ellas se originan prolongaciones que en su conjunto forman una estructura arrosariada y discontinua que recorre todo el borde vítreo de la capa nuclear interna (figuras 39 y 40).

En el borde vítreo de la capa plexiforme externa se observaron tractos positivos a TyrHD, reativamente gruesos, que partían de somas celulares más pequeños que los que se encontraban en la capa nuclear interna.

La imagen global de la positividad a TyrHD en la retina periférica era que dos sistemas perfilaban la capa nuclear interna por ambos márgenes, el escleral y el vítreo. A grandes aumentos (figura 40) no se apreciaron conexiones entre uno y otro sistema.

Figuras 39 y 40. Micrografías mostrando la positividad a la tyrosín hidroxilasa en la retina de un ratón wild type.

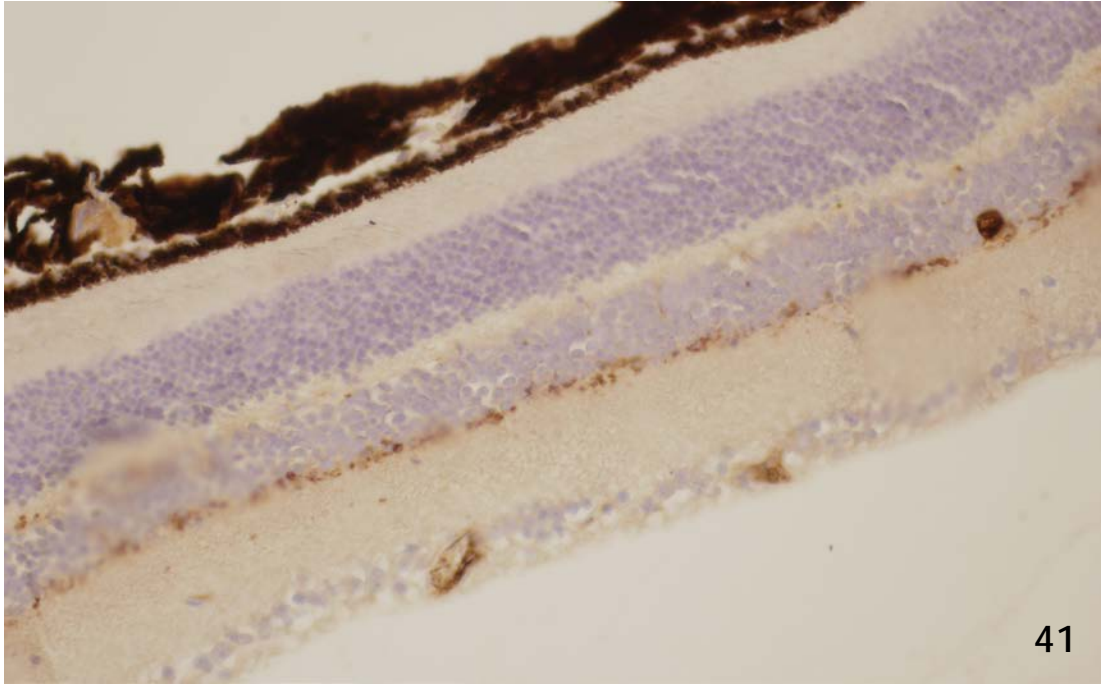


A diferencia de la retina periférica, en la retina central de los ratones wild type la positividad a TyrHD se daba en las células amacrinas globulosas de la capa nuclear interna y los tractos positivos que perfilaban el margen vítreo de dicha capa (figuras 41 y 42).

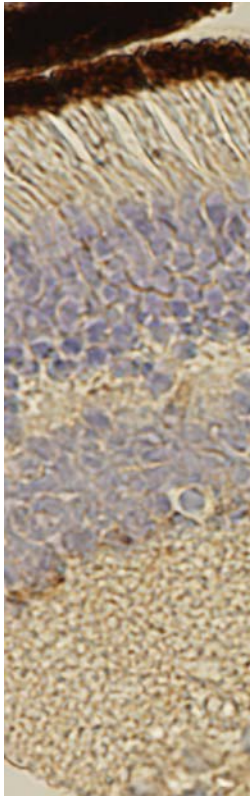
En ocasiones y de forma aislada podía apreciarse algún pequeño botón positivo en el margen vítreo de la capa plexiforme externa.

Otro rasgo característico es que como puede apreciarse en la figura 42, a mayores aumentos, algunos tractos serpenteaban entre las células de la capa nuclear interna y se dirigían hacia la capa plexiforme externa.

Figuras 41 y 42. Micrografías mostrando la positividad a la tirosín hidroxilasa en la retina central de ratones wild type.



41



42

Ratones IRS2-ko.

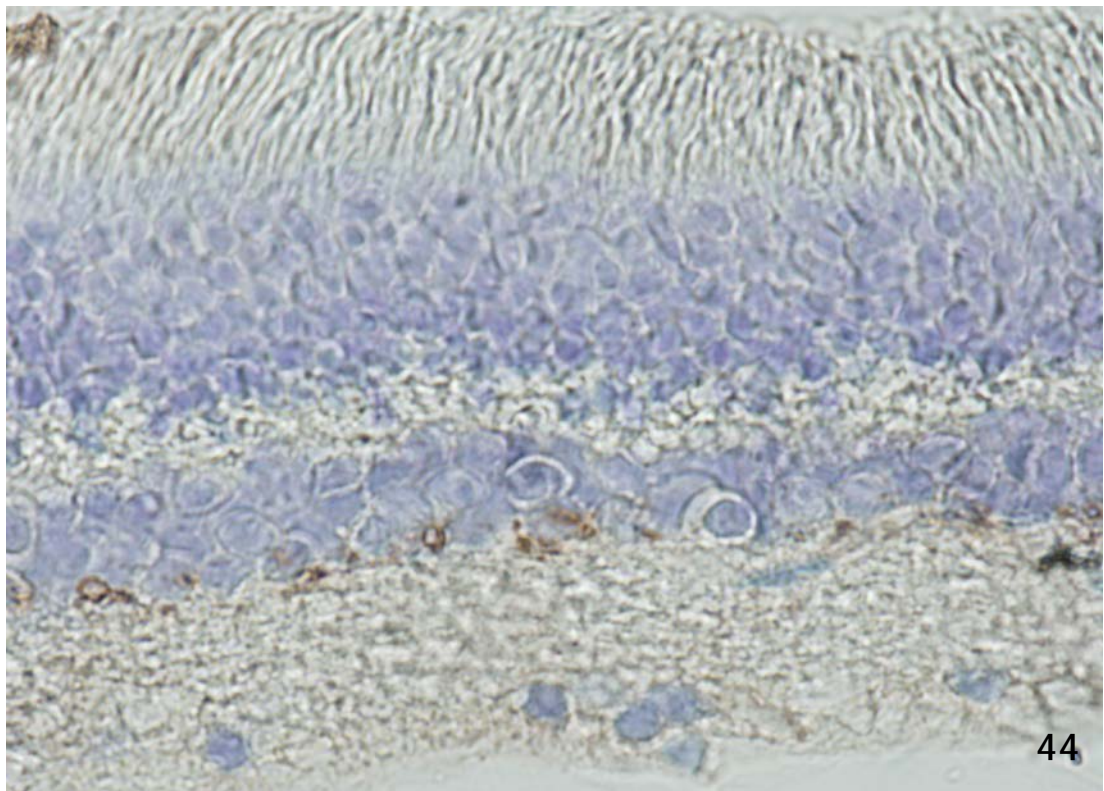
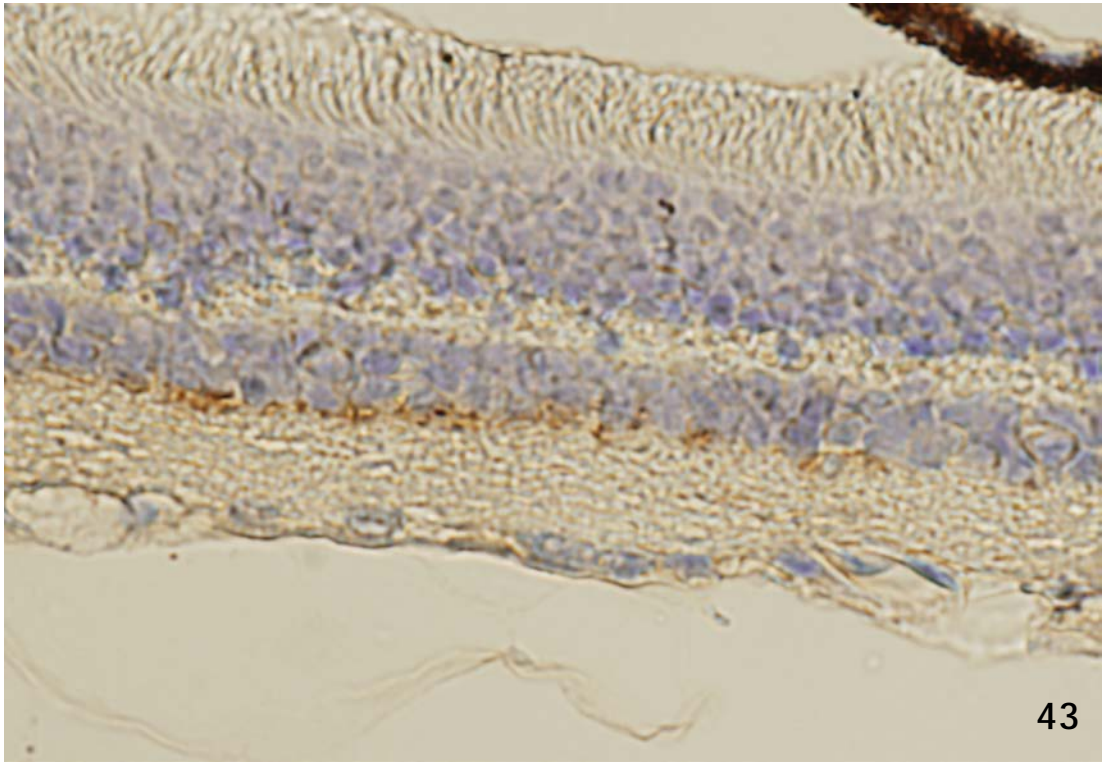
Los ratones IRS2-ko mostraron una clara diferencia en la positividad a TyrHD al compararlos con los wild type.

La primera diferencia notable es que la retina periférica sólo presentaba tractos positivos a TyrHD dispuestos en el borde vítreo de la capa nuclear interna (figuras 43 y 44).

Las células amacrinas fueron muy escasas, pequeñas y aplanadas (figura 44) y en ninguno de los animales estudiados pudimos apreciar la presencia de tractos positivos en la capa plexiforme externa o en el borde escleral de la nuclear interna.

Además, los tractos positivos observados perdían su aspecto arrosariado y se transformaban en una estructura granular discontinua.

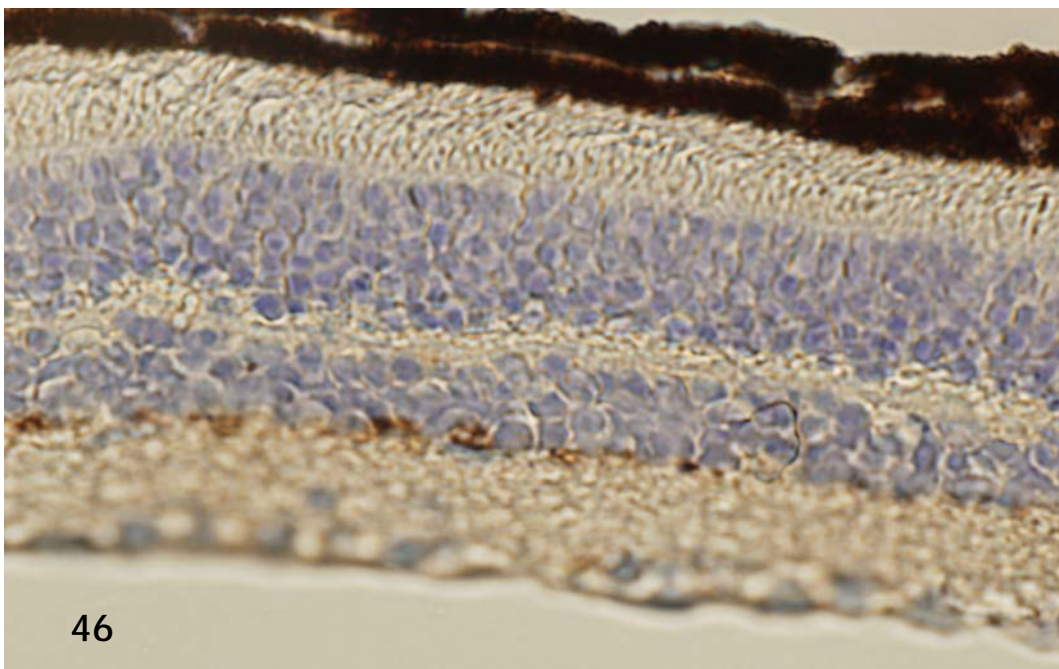
Figuras 43 y 44. Micrografía mostrando la positividad a la tirosín hidroxilasa en la retina periférica de un ratón IRS2-ko.



Las células amacrinas positivas a TyrH fueron más frecuentes en la retina central que en la periférica, aunque seguían siendo escasas y aparecían como células aplanadas (figura 45).

Los tractos positivos situados en el margen vítreo de la capa nuclear interna fueron muy escasos y discontinuos (figuras 45 y 46).

El resto de las capas de la retina fueron negativas a la tinción.



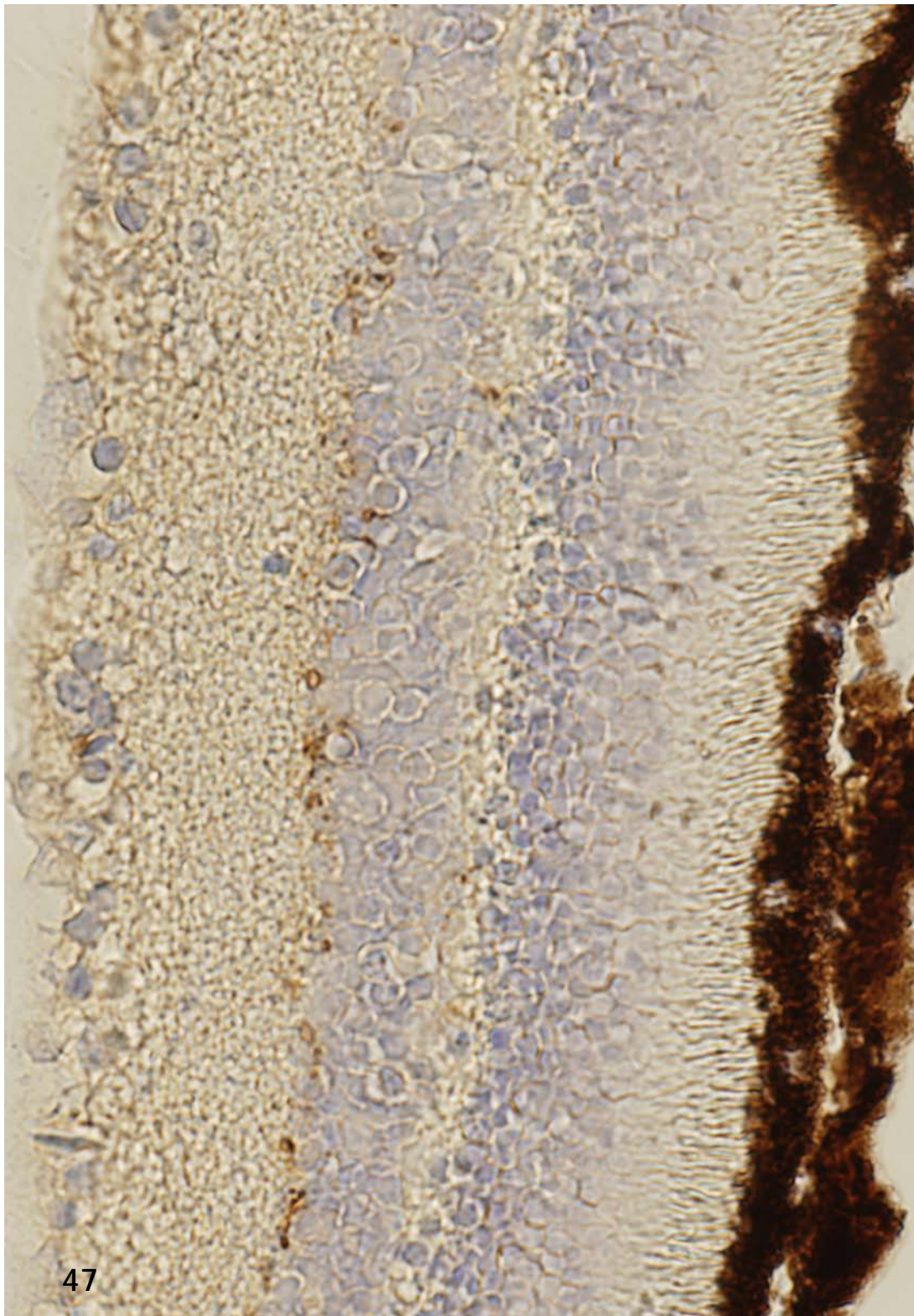
Figuras 45 y 46. Micrografías mostrando la positividad a la tyrosín hidroxilasa en la retina central de un ratón IRS2-ko.

La figura 47 muestra a grandes aumentos la retina central de uno de los ratones IRS2-ko.

Como puede apreciarse la positividad fue muy escasa y se formaban tractos puntiformes de manera que globalmente se perdía el aspecto de delimitación del margen vítreo observado en los ratones wild type.

Aunque muy esporádicamente y de forma aislada, en esta región de la retina a veces aparecía algún botón positivo a TyrH en la capa plexiforme externa.

Figura 47. Micrografía mostrando la positividad a la tyrosín hidroxilasa en la retina central de un ratón IRS2-ko.



Efectos de la ausencia de IRS2 sobre la apoptosis. Expresión de caspasa 3 activa.

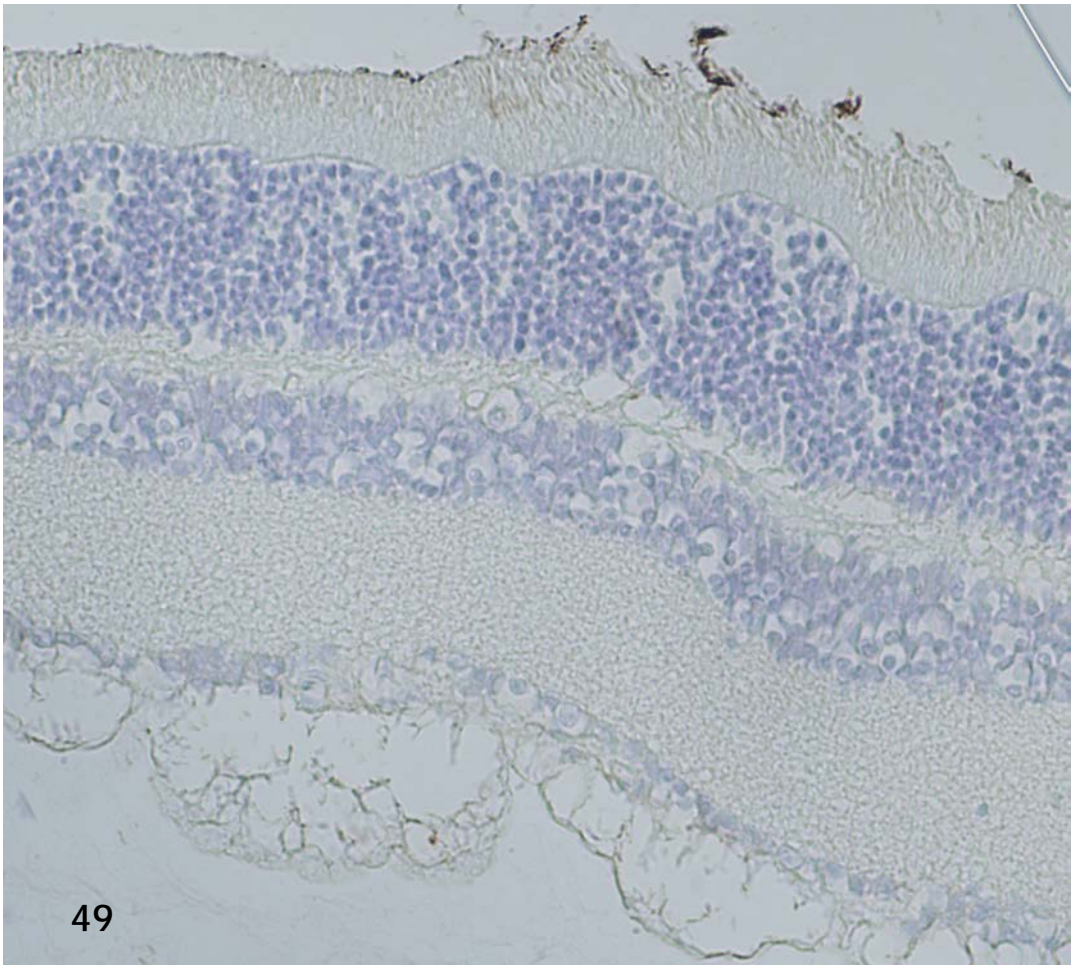
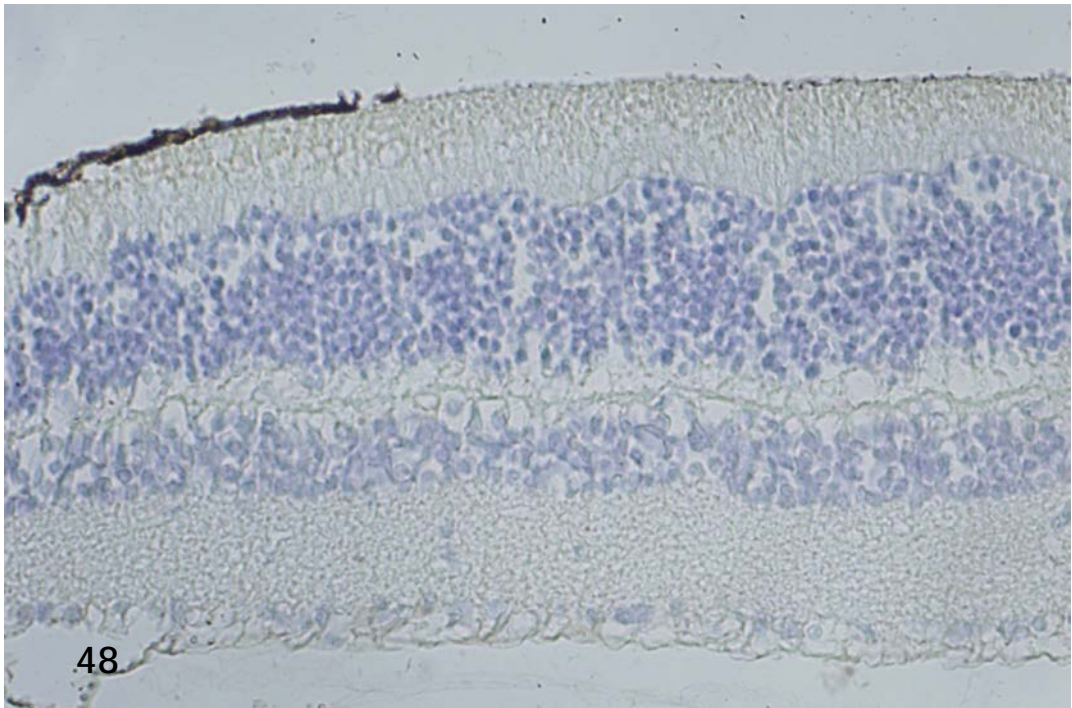
Ratones wild type.

Como muestran las figuras 48 y 49 el resultado del marcaje inmunocitoquímico a caspasa 3 activa en los ratones wild type fue negativo.

No se hallaron células positivas en la retina periférica (figura 48) o en la retina central (figura 49).

Figuras 48 y 49. Micrografía mostrando la positividad a la caspasa 3 activa en la retina de un ratón wild type.

Figura 48: retina periférica. Figura 49: retina central.



Ratones IRS2-ko.

Al contrario de lo que se observó al estudiar los ratones wild type, en los ratones IRS2-ko aparecieron células positivas a caspasa 3 activa en la retina periférica próxima a la ora serrata (figura 50 y 52), en la retina periférica próxima a la retina central (figuras 51 y 53) y en la retina central (figuras 54, 55 y 56).

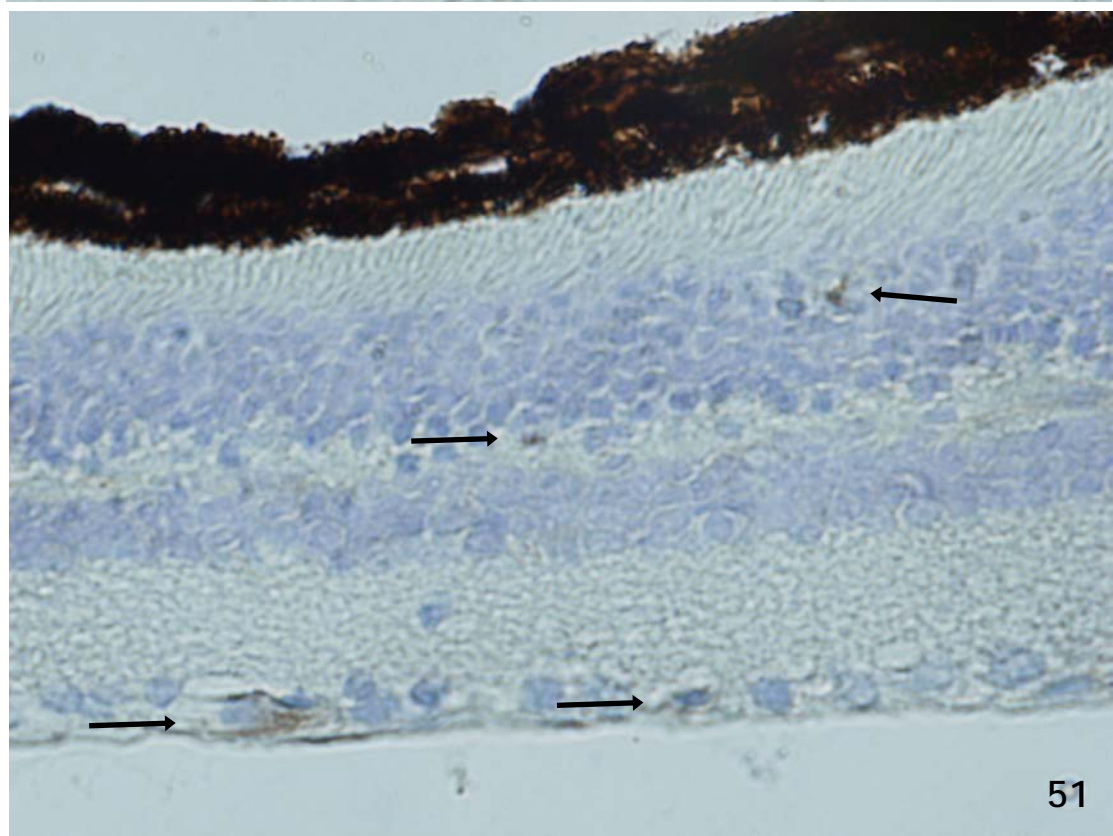
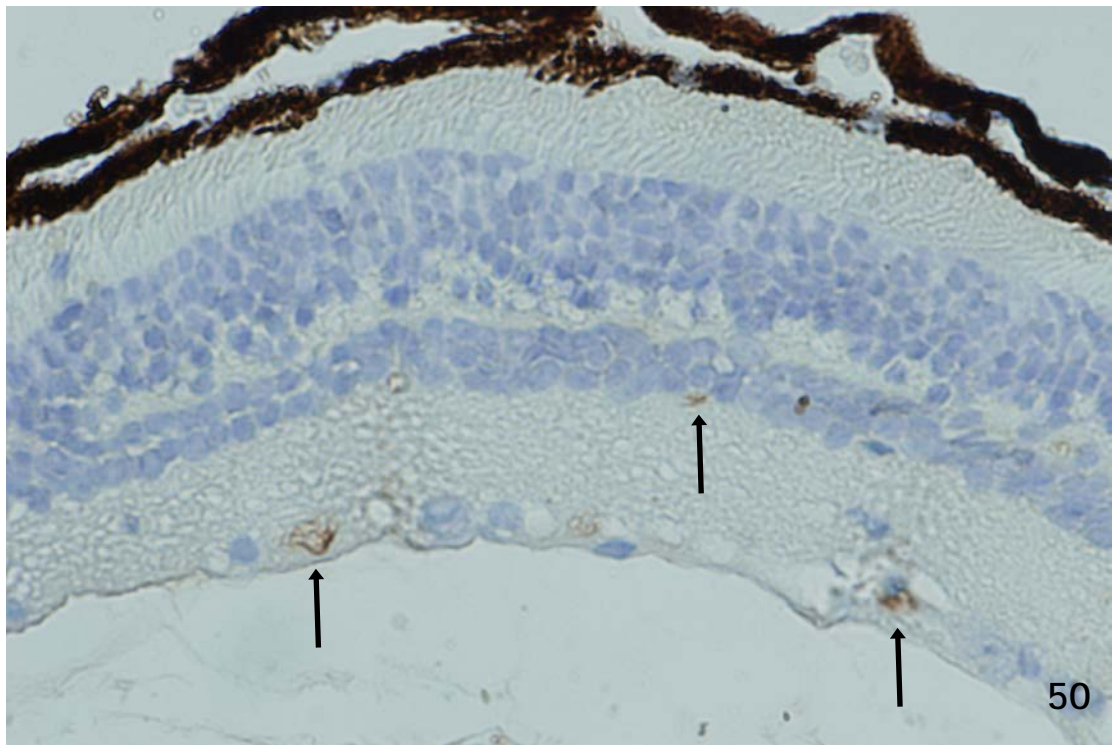
La localización de las células positivas fue muy variable. El porcentaje de células positivas fue muy pequeño y la intensidad de la reacción fue débil.

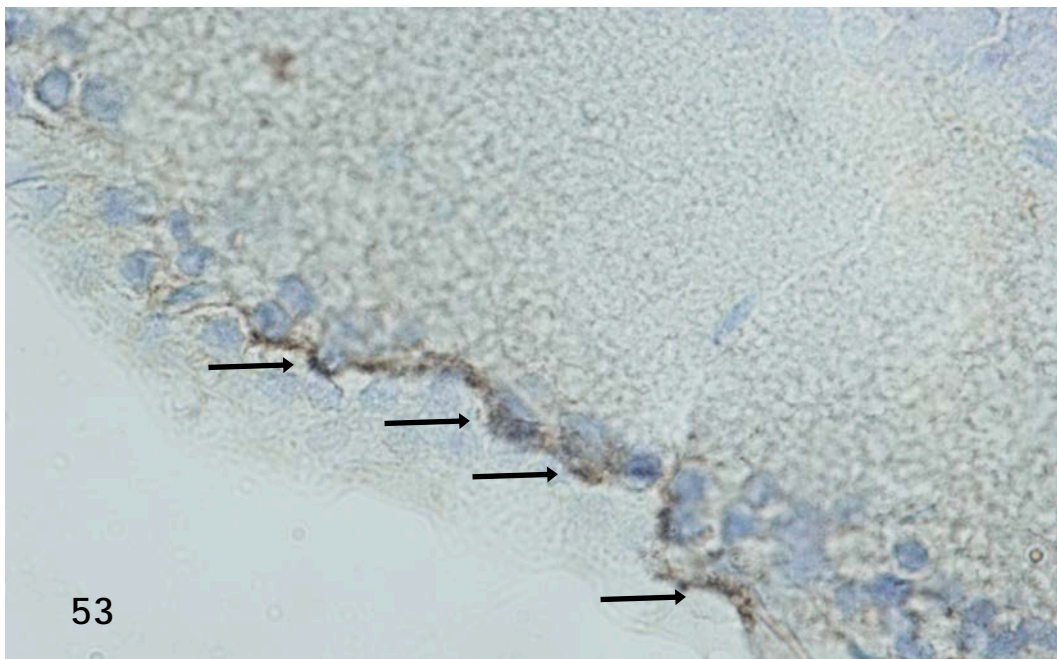
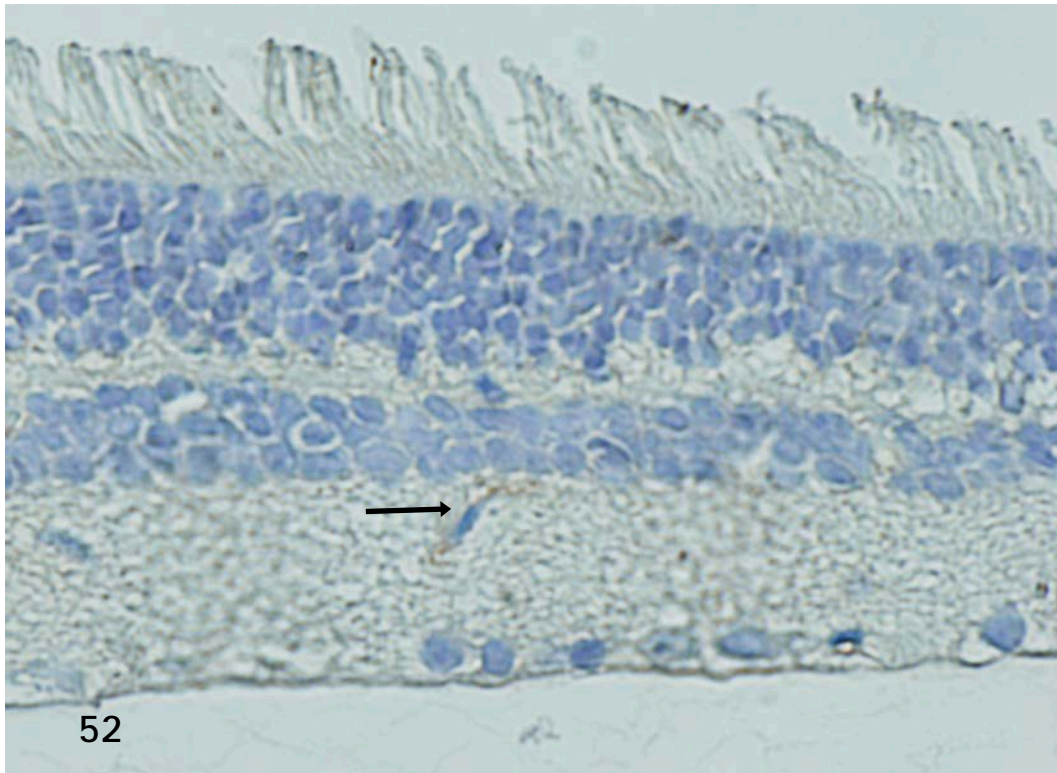
En la retina próxima a la ora serrata se observaron células en el borde vítreo de la capa nuclear interna y en la capa de células ganglionares (flechas en figura 50). También se observó alguna célula positiva alargada y de núcleo aplanado en la capa plexiforme interna (flecha en figura 52).

En la retina periférica se observaron células positivas en la capa nuclear interna, en la capa plexiforme externa y en la de células ganglionares (flechas en figura 51). Como muestra la figura 53, en ocasiones la positividad afectó a hileras celulares dispuestas en el borde vítreo de la capa de células ganglionares.

En la retina central las células positivas se observaron principalmente en la capa nuclear interna, la capa plexiforme interna y la de células ganglionares (flechas en figura 54) y en el borde vítreo de la capa nuclear interna (flechas en figuras 55 y 56).

Figuras 50 y 51. Micrografías mostrando la positividad a la caspasa 3 activa en la retina periférica de un ratón IRS2-ko.





Figuras 52 y 53. Micrografías mostrando la positividad a la caspasa 3 activa en la retina periférica de un ratón IRS2-ko.

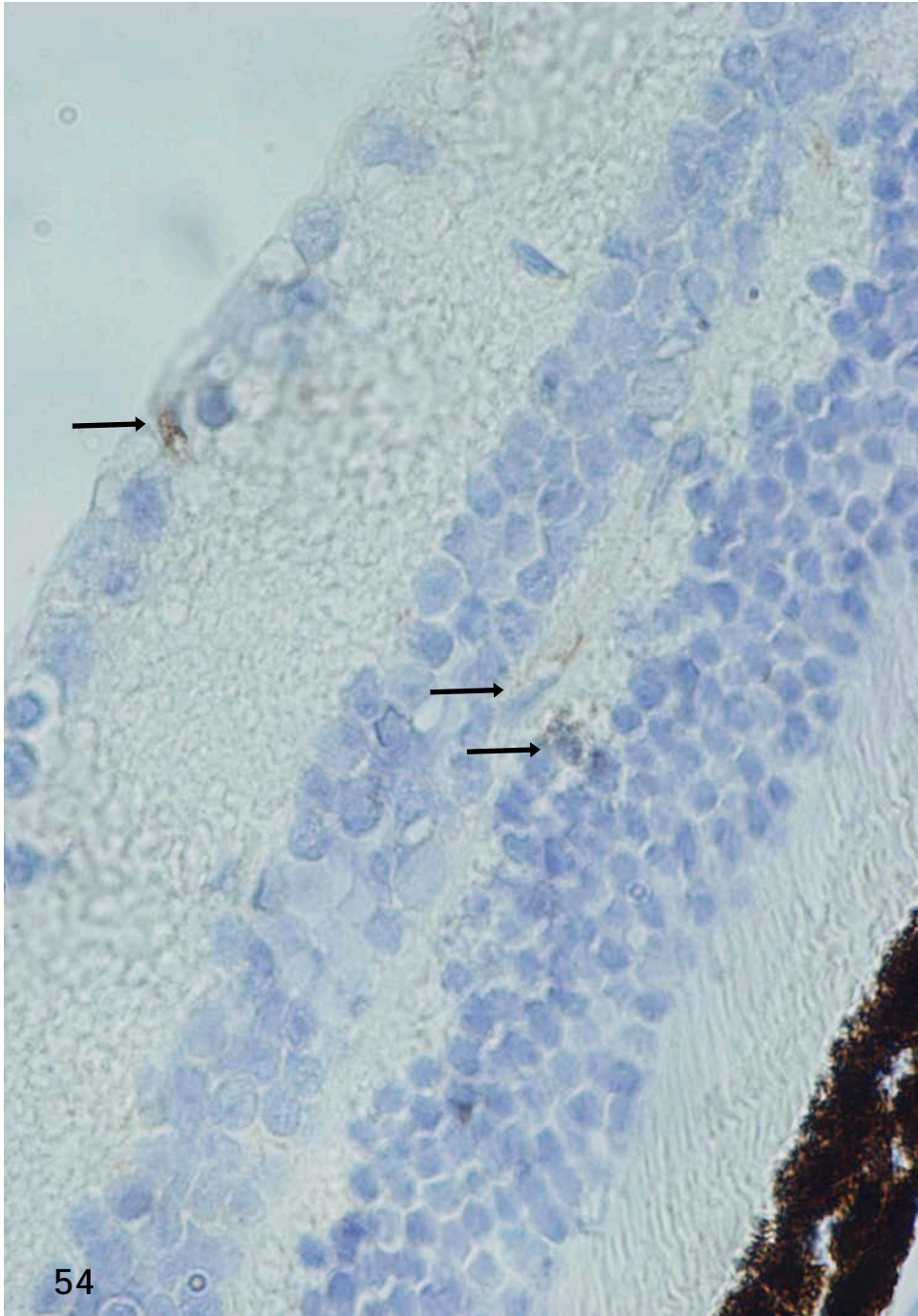
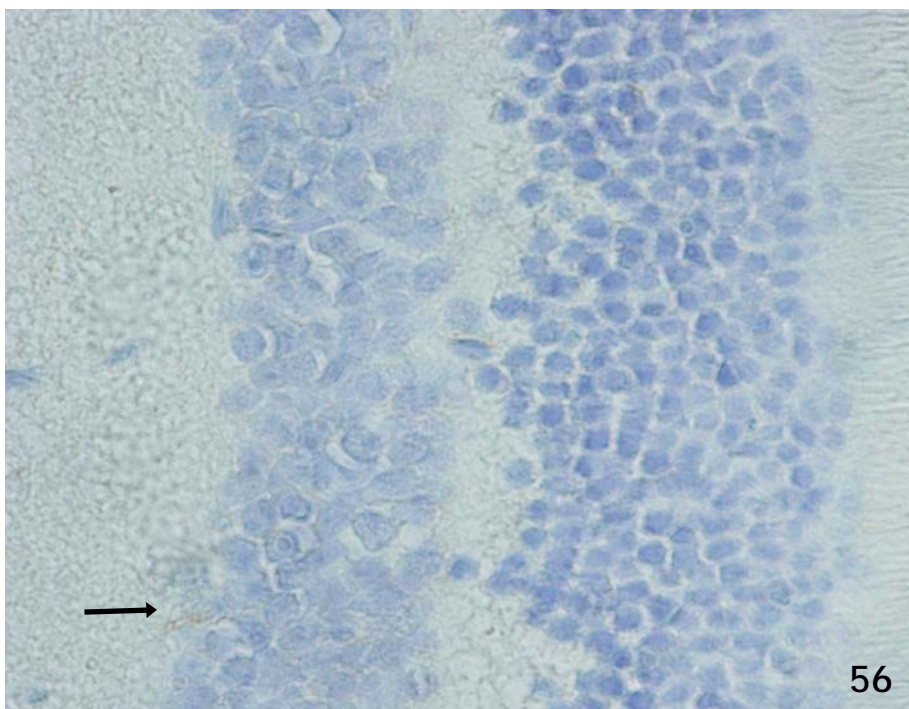
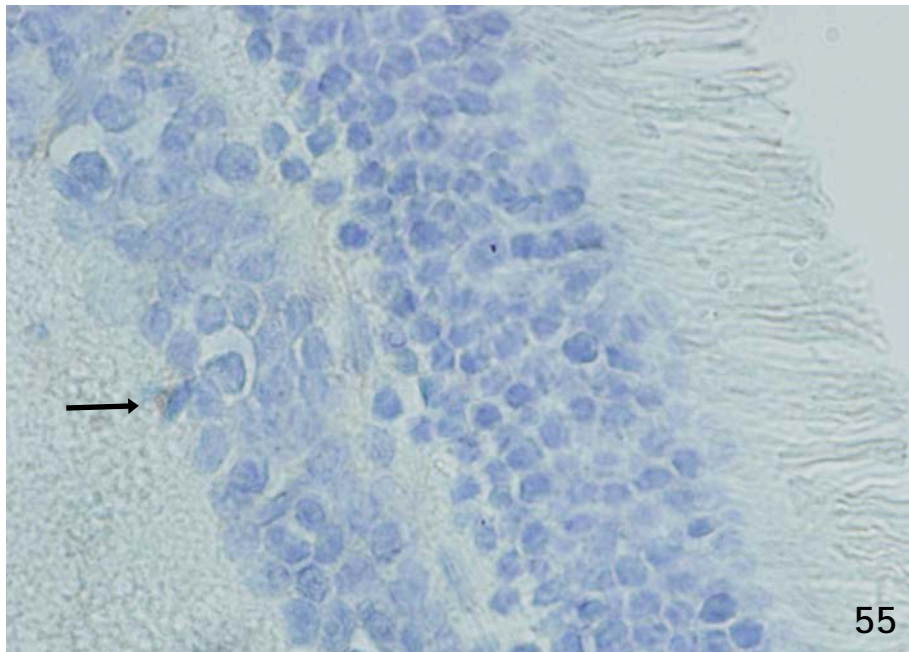


Figura 54. Micrografía mostrando la positividad a la caspasa 3 activa en la retina central de un ratón IRS2-ko.



Figuras 55 y 56. Micrografías mostrando la positividad a la caspasa 3 activa en la retina central de un ratón IRS2-ko.

Discusión

Comentarios sobre la Metodología empleada.

Gran parte de los objetivos de esta Tesis Doctoral estaban dirigidos a comprobar si la deficiencia de la proteína de sustrato de receptor insulínico IRS2, dada la infertilidad de los animales, inducía cambios en la estructura del testículo.

En el estudio hemos utilizado técnicas inmunocitoquímicas para valorar la proliferación celular en el epitelio ductal, y morfométricas, para comprobar de manera objetiva los cambios habidos en los tubos seminí.

Por ello en esta discusión, comentaremos estas técnicas, para pasar a comentar después los resultados obtenidos.

Inmunocitoquímica.

Mediante los métodos de la inmunocitoquímica in vivo o in vitro, se pueden caracterizar las células de la hipófisis anterior que contienen hormonas o péptidos.

Para nuestro estudio hemos utilizado el método de la Estrepto-Avidina Biotina Peroxidasa (Stav-Pox), considerada una técnica sándwich porque necesita de tres complejos de reacción para su realización.

La Stav-Pox es una variante del método de la peroxidasa-antiperoxidasa (PAP), más moderna y específica. Emplea un primer antisuero (procedente de ratón o conejo) contra el antígeno que se desea estudiar, semejante a la PAP pero normalmente de 5 a 10 veces más diluido; un segundo antisuero (obtenido generalmente de cabra o cerdo) anti-inmunoglobulina (fracción Fc) del primario y que lleva incorporado a su brazo largo varias moléculas de Biotina (proteína de alta afinidad por las inmunoglobulinas) y, finalmente, un complejo de Estrepto-Avidina conjugado con varias moléculas de peroxidasa, que se une a la Biotina (por la alta afinidad de la Estrepto-Avidina por la Biotina).

Para la conservación de la morfología y de la antigenicidad es fundamental el proceso de fijación. Las características de las reacciones inmunocitoquímicas después del empleo de fijadores diferentes han sido analizadas por muchos autores, como Nakane y col. (1989), Hall y col. (1990), Landerbg y Groos (1991), Golick y Rice (1992).

En nuestro estudio hemos utilizado una solución fijadora ampliamente experimentada en nuestro laboratorio, el paraformaldehído al 4% en tampón fosfato, como demuestran gran número de publicaciones sobre el estudio inmunohistoquímico de la hipófisis y el cerebro, algunas de las cuales se recogen en este trabajo. Así comprobamos que, aún cuando la cantidad de hormona o péptido era pequeña, dicha solución se revelaba como un excelente fijador para el estudio inmunocitoquímico de la retina.

Los controles que hemos realizado están enmarcados dentro de los clásicamente descritos: test de dilución (Sternberger, 1979; Petrusz y col., 1976),

test de sustitución de reactivos (Hutson y col., 1979; Forssmann y col., 1981) y, el más común de todos, el test de preabsorción (Hutson y col., 1979; Buffa y col., 1979; Forssmann y col., 1981).

Al sustituir los anticuerpos primarios por tampón de ensayo y por suero normal de conejo o ratón, obtuvimos como resultado la abolición total del producto de reacción.

Realizamos controles de dilución tanto para obtener la concentración más adecuada del primer antisuero como para eliminar tinciones de fondo y otras reacciones; después de meticulosos test de dilución comprobamos las distintas diluciones óptimas de los sueros específicos empleadas en el estudio.

De esta manera, en nuestro laboratorio se han caracterizado, mediante su expresión inmunocitoquímica, las células productoras de varias hormonas hipofisarias (Carretero y col., 1989b; 1990b; 1992c; Montero y col., 1990; Rubio y col., 1992; 1994; Sánchez y col., 1993) o productores de péptidos como GRF (Carretero y col., 1991c), somatostatina (Gil, 1992) o VIP (Carretero y col., 1995b; 1997b).

También se pueden detectar enzimas intracelulares mediante inmunohistoquímica, como hemos hecho en nuestro laboratorio con la aromatasa P450 (Carretero y col., 1999a, 1999b; 2003b).

Empleo de la Caspasa 3 activa como marcador de apoptosis.

El número de células en un organismo está determinado por los niveles de la inmigración celular, división celular y muerte celular (Raff, 1996). La muerte celular en los organismos multicelulares está sujeta a control genético (Ellis y Horvitz, 1986; Vaux y col., 1988) habiéndose demostrado que anomalías en la regulación de la muerte celular es causa de alteraciones como el cáncer (Strasser y col., 1990) enfermedades autoinmunes (Strasser y col., 1991; Watanabe-Fukunaga y col., 1992) y posiblemente en alteraciones degenerativas (Thompson, 1995).

La muerte celular programada o apoptosis es una propiedad común de todos los organismos multicelulares (Krammer, 2000; Danial y Korsmeyer, 2004). El término fue acuñado por Currie y sus colaboradores (Kerr y col., 1972) para describir una determinada muerte celular observada en múltiples células y tejidos. Puede ser desencadenada por un gran número de factores, entre los que se incluyen, las radiaciones ultravioletas y radiaciones gamma, drogas utilizadas en la quimioterapia, factores de crecimiento o señales que provocan la muerte de receptores y sus ligandos (DRs), según Nagata, 1997; Ashkenazi y Dixit (1998) y Krammer (1998).

La apoptosis es un fenómeno fisiológico de muerte celular en el que se implican una gran variedad de rutas de señal intracelular, si bien estas rutas son tejidos dependientes, variando de unas células a otras.

Básicamente hay cinco elementos clave en el proceso apoptótico.

Algunos receptores dispuestos en la superficie celular y cuya activación se asocia con la activación de las caspasas.

En los estadios tempranos de la apoptosis ocurren cambios en la superficie celular y la membrana plasmática.

Las caspasas constituyen una familia de proteasas intracelulares, formada por al menos 11 miembros en las células de los mamíferos, que juegan un papel clave en el inicio y el desarrollo de la apoptosis inducida por diferentes estímulos. Siempre, el papel central de la regulación y de la ejecución de la muerte celular por apoptosis pertenece a las caspasas (Thornberry y Lazarek, 1998; Cohen, 1997; Nicholson, 1999).

La muerte celular se acompaña siempre de alteraciones en la fisiología mitocondrial. Durante la apoptosis se altera la permeabilidad de la membrana mitocondrial con lo que algunos activadores de proteasas específicas de la apoptosis se liberan al citosol desde la mitocondria. La liberación al citosol desde la mitocondria de citocromo C promueve la activación de las caspasas.

El cambio bioquímico intracelular más importante que acontece durante la apoptosis es la fragmentación de DNA genómico intranuclear, con carácter irreversible. En muchos casos es el resultado de la activación de una endonucleasa nuclear dependiente de Ca^{+2} y Mg^{+2} , que fragmenta el DNA actuando entre las unidades nucleosomales, lo que da lugar a fragmentos de DNA mono u oligonucleosomales.

Estos acontecimientos producen cambios celulares que son las dianas metodológicas usadas en el laboratorio para estudiar y detectar las células que entran en apoptosis.

Entre ellos está el análisis de la activación de la caspasa 3 mediante fluorimetría o inmunocitoquímica.

Este último método es el que hemos utilizado en nuestro estudio y nos ha permitido detectar con éxito la existencia de fenómenos apoptóticos en el interior del tubo seminífero de los ratones knock out a IRS2.

Morfometría y Planimetría.

La segunda técnica empleada en este apartado, la aplicación de métodos cuantitativos morfométricos y estereológicos, intenta resolver el problema de la valoración morfológica subjetiva de la actividad celular. Estos métodos han evolucionado a lo largo de los años; en sus inicios, hace más de treinta años, se empleaban métodos manuales, pero en la actualidad, el empleo de los ordenadores y la digitalización de imágenes permite hacer análisis automáticos o semiautomáticos en los que el operador no interfiere en la medida.

Alrededor de 1850, el geólogo francés Delesse y el microscopista inglés Sorby enunciaron, independientemente, el principio de que el promedio de un área fraccional de un tipo particular de componente, en una sección tomada de un cuerpo sólido, es directamente proporcional a la fracción de volumen de ese componente dentro del cuerpo sólido original (Delesse, 1847; Sorby, 1856).

Estos autores llegaron a esta conclusión por un proceso intuitivo, pero los esfuerzos de expertos en geometría integral y probabilidad han demostrado en varias ocasiones la validez del principio de Delesse (Crofton, 1877; Delthiel, 1926; Bonnesen y Fenchel, 1934; Santalo, 1936; Blaschke, 1949).

Mayhew y Cruz (1973) transformaron el principio de Delesse mediante la consideración de un modelo de esfera concéntrica (toscamente similar a una célula) y consiguieron formulaciones bastante claras de esta relación.

Otros autores también han dejado claro que las ecuaciones usadas en estereología son mera manifestación de un área mucho más amplia de las matemáticas, que se ha denominado geometría multidimensional (Miles, 1972) o simplemente probabilidad geométrica (Little, 1974).

La estereología, término acuñado por la Sociedad Internacional de Estereología (ISA) en 1961, está basada en la probabilidad geométrica y permite la evaluación de estructuras tridimensionales por extrapolación de mediciones realizadas en secciones bidimensionales, tras la aplicación de medidas llevadas a cabo en secciones bidimensionales y axiomas estereológicos, consiguiendo la medida de volumen, superficie y número de tejidos y componentes celulares con microscopía óptica o electrónica (Rohr y col., 1978).

Los métodos estereológicos son aquéllos que se usan para derivar información tridimensional a partir de la consideración de imágenes bidimensionales. En sentido amplio, esto incluirá métodos de reconstrucción tridimensional usando secciones seriadas así como métodos cuantitativos extrapolables tratados con determinaciones numéricas. Este último concepto ha sido denominado estereología cuantitativa (Underwood, 1970).

Existen bastantes revisiones y artículos que han tratado más a fondo estos temas y, entre ellos, destacamos los de Loud y col. (1965), Weibel y col. (1966), Weibel (1969), Elias y col., (1971), Weibel y Bolender (1973) y Elias y Hide (1980).

Los parámetros abiertos a estudio por los métodos estereológicos incluyen: volúmenes y áreas de superficie de componentes fraccionarios, volúmenes medios, áreas de superficie medias y densidad numérica de diferentes partículas o células dentro de un tejido, así como el tamaño y número de las mismas. Estos volúmenes, áreas, números y tamaños pueden ser estimados a partir de células o tejidos, o bien a partir de porciones de los mismos.

En estereología estricta, los valores para un componente dado son expresados como densidades que relacionan su volumen, superficie o número, con la uni-

dad de volumen de una superficie de referencia dada. En morfometría simple, los valores se expresan como la media aritmética de una población de valores que resulta de tratar estadísticamente las áreas o números referidos a áreas o a poblaciones totales de un parámetro concreto.

Los efectos de tratamientos experimentales sobre la estructura celular y el curso a lo largo del tiempo de distintos eventos morfológicos, pueden ser constatados de forma precisa por medio del volumen, superficie o número de células o de sus organelas. Con ello se evitan en gran medida los aspectos subjetivos y se pueden obtener datos cuantitativos fiables y comparables. Por ello, los métodos estereológicos y morfométricos representan un avance importante en la microanatomía y en la investigación básica morfológica en neuroendocrinología.

En nuestro laboratorio, han sido empleados en numerosas ocasiones técnicas y métodos estereológicos o morfométricos para el estudio de la hipófisis con gran eficacia y precisión, determinando el área celular y el área nuclear de forma semejante a como se ha realizado en este trabajo.

Es obvio que, para determinar la fracción celular en un tejido (porcentaje de células inmunopositivas y densidad numérica, en nuestro caso) es muy importante considerar el método empleado para su cuantificación. Los métodos histológicos suelen manejar muchas menos células que la citometría de flujo.

La cuantificación normal a través de microscopio es un método seguro si analiza un número suficiente de células, aunque tiene el inconveniente de consumir mucho tiempo, tanto más cuanto mayor sea la población celular considerada (Barnard y col., 1987; Sheperd y col., 1988; Karamitopoulou y col., 1993).

El mayor problema radica en dilucidar cuántas células o secciones es necesario contar o medir. Distintos estudios tratan de valorar esta aproximación (Aherne y col., 1977, 1982; García y col., 1987); habiendo empleado métodos semicuantitativos (Gatter y col., 1986; García y col., 1989), así como el análisis de imagen (Schwartz y col., 1989).

En nuestro caso, hemos optado por la medición manual en campos de grandes aumentos para determinar el grosor de la retina y sus capas, estimando que 200 perfiles por animal, elegidos aleatoriamente, fue un número suficiente para obtener resultados fiables estadísticamente.

Rechazando los perfiles de la retina periférica ya que la terminación cónica de la misma al alcanzar la ora serrata enmascaraban los resultados.

Los ratones knock out para la IRS2.

Un detalle importante, dentro del diseño experimental, es el modelo animal que hemos empleado y su aceptación y validación internacional como animal de experimentación.

Para entender la validación del modelo y su elección para la realización de este estudio, en este capítulo de discusión, citamos a continuación algunas de las publicaciones más relevantes en relación con el ratón knock out para IRS2.

Estudios sobre el hígado (Roncero y col., 2013; Tsuchiya y Accili, 2013; Alvarez-Pérez y col., 2014), neurodegeneración y longevidad (Irvine y col., 2011; Grote y col., 2011; Sadagurski y col., 2011; White, 2014); sistema cardiovascular (González-Navarro y col., 2007, 2008; Qi y col., 2013; Riehle y col., 2014; Martínez-ervás y col., 2014); páncreas y diabetes (García-Barrado y col., 2011; Ren y col., 2014; Oliveira y col., 2014a, 2014b; Hashimoto y col., 2015); aparato reproductor (Griffeth y col., 2013); retina (Arroba y col., 2013); Cerebro (Costello y col., 2012); médula espinal (Chirivella y col., 2012).

La bibliografía que acabamos de detallar pone de manifiesto que el modelo experimental empleado en nuestro estudio es un modelo de gran relevancia, aceptado y validado para el estudio.

Siendo éste el primer estudio realizado sobre los cambios que acontecen en la positividad a aromatasas y dopamina en la retina de este tipo de animal, modelo experimental de diabetes tipo 2, lo que le da una gran importancia en la investigación traslacional y otorga el carácter de originalidad que debe aportar todo trabajo de Tesis Doctoral.

Comentarios en relación con los resultados obtenidos.

Efectos de la ausencia de IRS2 sobre el espesor radial de la retina neural y su morfología.

Al igual que ocurre en el resto del sistema nervioso central, el desarrollo de la retina está regulado por factores de transcripción, factores de crecimiento y neuropéptidos que coordinan la proliferación, diferenciación y maduración de las células precursoras neuroepiteliales (Frade y col., 1999; Levine y col., 2000; Kumar, 2001; Takatsuka y col., 2004).

Las modificaciones en la vía de señalización intracelular de la insulina producen toda una serie de cambios que se traducen en cambios morfológicos de la retina, como parecen sugerir los hallazgos obtenidos estudiando ratones IRS2-ko.

La abolición de las rutas intracelulares que activa la fosforilación de IRS2 da lugar a la desorganización de las capas de la retina, con pérdida de fotorreceptores ya en la primera semana después del nacimiento, como consecuencia de un proceso apoptótico (Yi y col., 2004). Considerándose esencial a IRS2 para la maduración y supervivencia de los fotorreceptores (Yi y col., 2005).

Cuando estos animales alcanzan la edad adulta temprana, entre 9 y 12 semanas, presentan alteraciones en las células gliales y cambios degenerativos de la retina que se traducen en un adelgazamiento de las capas más externas de la retina

y la activación de las células de Müller y de la microglía. Los fotorreceptores presentan diferentes signos de degeneración, atrofia de los segmentos externos e interno, redistribución de las opsinas en conos y bastones y desorganización espacial, que se acompañan de cambios sinápticos en la capa plexiforme externa (Albert y col., 2014).

A medida que los ratones tienen más edad, 12 semanas, se observa más adelgazamiento de las capas retinianas internas, con apenas cambios en la capa plexiforme interna y pérdida de axones de las células bipolares. (Albert et al., 2014).

Nosotros en el presente estudio hemos podido corroborar el hecho de que en los animales IRS2-ko adultos se produce una atrofia de la retina que disminuye su grosor, esta atrofia afecta a todas las capas de la retina a excepción de la capa nuclear interna, en la que las variaciones observadas no fueron estadísticamente significativas.

Además, la organización morfológica de las diferentes capas retinianas varía considerablemente al compararlas con las de los ratones wild type, mostrando una clara desorganización. Así mismo los ratones IRS2-ko muestran ausencia parcial y cambios direccionales de la limitante externa. En la capa nuclear externa se pierde el aspecto típico en hilera de los núcleos, adoptando éstos un patrón más desorganizado pasando de columnar a en mosaico. La capa plexiforme externa, prácticamente desaparece en estos animales. Con la presencia o aumento de núcleos de células interpuestas en la capa de conos y bastones, y ambas capas plexiformes, interna y externa.

Ausencia de IRS2 y cambios gliales, GFAP y Vimentina.

La GFAP es la última proteína de filamento intermedio en expresarse durante el desarrollo ya que aparece en los últimos estadios de la gestación, hacia el día 18 en roedores, expresándose en los astrocitos y las células de Schwann (Duprey y Paulin, 1995).

Eng y colaboradores (1971), describen por primera vez su aislamiento a partir de las placas típicas de la esclerosis múltiple, desde entonces ha sido uno de los marcadores más específicos y más utilizados para el estudio de los astrocitos por ser el componente principal de los filamentos intermedios de la astrogliá (Antanitus y col., 1975; Schachner y col., 1977;; Raff y col., 1979; Eng, 1980; Chiu y col., 1981; Didier y col., 1986).

La presencia de GFAP ha sido demostrada en buen número de especies (Dahl y Bignami, 1973; Onteniente y col., 1983; Hernández, 1993; Kalman y col., 1993; Santos, 1993).

Es una proteína compuesta por 430 aminoácidos, con un peso de 60 kDa, que forma parte del tipo III de filamentos intermedios (Bignami y col., 1972; Maunoury y col., 1976; Lewis y col., 1984; Tardy y col., 1992). En ella se diferencian tres partes, la parte intermedia, la parte activa, con un peso molecular de

50 kDa, resistente a la proteólisis y tiene forma helicoidal. Esta parte es la específicamente reconocida por los antisueros de astrocitos. Las partes amino terminal y carboxi terminal, que tienen un peso molecular de 10 kDa, son más variables y no son helicoidales (Eng y col., 1971; Uyeda y col., 1972; Geisler y col., 1983; Dahl y col., 1984).

Desde el punto de vista bioquímico, existe un segundo tipo de GFAP, que se localiza en los nervios periféricos, con una porción similar a la GFAP existente en el sistema nervioso central de 18 kDa (Dahl y Bignami, 1976).

Después del nacimiento, la expresión de GFAP va aumentando progresivamente a la vez que va desapareciendo de forma gradual la de vimentina, si bien algunas células astrogliales de la rata adulta presentan ambas proteínas (Eng, 1980 y 1985; Lewis y Cowan, 1985; Mokuno y col., 1989; Sarthy y col., 1991; Tardy y col., 1992).

El que la GFAP permita la localización de astrocitos (Bignami y Dahl, 1973; Ghandour y col., 1979), ha servido para mapear su localización y así poder interpretar y valorar los cambios acontecidos en determinadas situaciones experimentales o patológicas (Suzuki y col., 1984; Graeber y Kreutzberg, 1986; Kamo y col.; 1987; Kalman y Hajos, 1989).

Se ha descrito marcaje con GFAP en los astrocitos fibrosos y, en menor grado, en los protoplasmáticos, en las células de la astroglia de los mamíferos adultos, en tanicitos, en células cerebelosas epiteliales de Golgi, en células de Müller de la retina; y, ocasionalmente, se ha detectado en células epiteliales del cristalino (De Vitry y col., 1981; Boyer y col., 1991).

La expresión de la GFAP en condiciones normales es muy constante y con pocas variaciones entre sexos, si bien se ha demostrado que en el cerebelo del hámster, existen diferencias sexuales de esta proteína, así como de la vimentina (Suárez y col., 1992).

En el sistema nervioso periférico, la GFAP se localiza en la glía no mielínica, sugiriendo una división similar a la que ocurre en el SNC entre los astrocitos y los oligodendrocitos (Jessen y col., 1984). En diversas localizaciones de la glía periférica también se ha detectado inmunorreactividad a la GFAP: Nervio olfatorio (Barber y Lindsay, 1982), sistema nervioso entérico (Jessen y Mirsky, 1980 y 1983; Jessen y col., 1984), ganglios sensoriales y simpáticos (Jessen y col., 1984), nervios periféricos (Yen y Fields, 1981), iris (Björklund y col., 1984), células de Kupffer (Gard y col., 1982).

En tejidos y homogeneizados, se ha demostrado que la GFAP es rápidamente degradada en especies acídicas, progresivamente más pequeñas (Dahl, 1976; Comings, 1982; Selkoe y col., 1982; Bigbee y col., 1983). Se ha demostrado una cascada similar de degradación para la vimentina (Bravo y col., 1982).

Esta proteína es un marcador útil para el estudio de la respuesta astrocitaria a injurias del sistema nervioso, gliosis reactiva (Mathewson y Berry, 1985; Schiffer

y col., 1993; Goodlett y col., 1993). Los astrocitos reactivos acumulan rápidamente GFAP y, en consecuencia, se tornan intensamente inmunorreactivos en zonas del cerebro en las cuales normalmente son difíciles de inmunodetectar. La reacción es difusa, no sólo afecta a la zona exacta de injuria y persiste indefinidamente. Además, lo que aumenta es la GFAP y no tiene porqué verse acompañada de un aumento en el número de astrocitos (Hatten y col., 1991).

La GFAP también permite identificar la patogénesis de diversos tumores del sistema nervioso (Bignami y col., 1980; Eng, 1980; Bignami y Schoene, 1981). La presencia de elementos GFAP, Vimentina y S-100-reactivos en oligodendrogliomas y ependimomas puede sugerir el origen mixto del tumor (oligodendroglioma) o el gran potencial de diferenciación astrocitaria (ependimoma), también confirmada por la presencia de inmunoreactividad a GFAP en el epéndimo después de determinadas injurias (Mckay y col., 1999). La presencia de marcadores para astrocitos y oligodendroglioma en la misma célula neoplásica sugeriría que el tumor se originaría de un precursor común, como han identificado (Raff y col., 1983), en cultivos primarios. También es útil como marcador tumoral la GFAP en: retinoblastomas, neuroblastomas, meduloblastomas (Schabet y col., 1997), condrosarcomas mesenquimatosos, algunos tumores ectópicos de partes blandas.

En la proximidad de la lesión, los astrocitos coexpresan GFAP y vimentina (Pixley y De Vellis, 1984; Schiffer y col., 1986; Takamiya y col., 1988) y es conocido que durante el desarrollo la vimentina es expresada en glioblastos previamente a la GFAP (Schnitzer y col., 1981).

En el cerebro neonatal las gliosis reactivas se producen de manera muy retardada. En el cerebro neonatal es conocido que la mayoría de los astrocitos son vimentina-positivos, siendo muy escasos los que contienen GFAP (Dahl y Bignami, 1985). Adicionalmente, los elementos vimentina-positivos tienden a localizarse en los bordes de la herida, sugiriendo que la expresión de vimentina estaría relacionada con la presencia de un espacio extracelular grande (Pixley y De Vellis, 1984).

La GFAP ha sido utilizada como un indicador de primera línea de neurotoxicidad (O'Callaghan, 1991a y 1991b; Evans, 1995; Fix y col., 1995; Miller y O'Callaghan 1995; Schabet y col., 1997). Habiéndose observado múltiples alteraciones en la síntesis de GFAP en situaciones patológicas degenerativas del sistema nervioso, tales como la enfermedad de Alzheimer (Delacourte, 1990), la epilepsia y la esclerosis múltiple (Eng y col., 1971 y Eng, 1980), o la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (Zhang y col., 2000). Estas patologías se caracterizan por la hiperplasia e hipertrofia de los astrocitos correlacionadas con un aumento marcado en la expresión de GFAP, lo cual puede también detectarse en células que rodean a los gliomas o a zonas postraumáticas (Beach y col., 1989).

Particularmente, en la retina, se desarrollan procesos de gliosis reactiva en respuesta a daños mecánicos, (Bignami y Dahl, 1979), desprendimiento de retina

(Okada y col., 1990), retinopatía diabética (Mizutani y col., 1998; Lieth, 1998), glaucoma (Wang y col., 2000), isquemia retiniana (Nishiyama y col., 2000), degeneraciones retinianas (Eisenfeld y col., 1984), en retinas con degeneración macular asociada a la edad (Madigan y col., 1994; Ramírez y col., 2001; Guidry y col., 2002) o en patología infecciosas (Lahmar y col., 2014). Fundamentalmente afectando a las células de Müller y a los astrocitos.

El déficit de insulina ocasiona alteraciones metabólicas en el glutamato glial, aumento de estrés oxidativo (Zuo y col., 2013) y, en condiciones de hiperglucemia in vitro, un aumento en la producción glial de GFAP (Layton y col., 2006)

La sobreexpresión de GFAP en las células de Müller se ha demostrado en las retinas de varios modelos animales con diabetes así como en los pacientes diabéticos, por lo que se acepta que es un indicador de estrés celular de la retina (Mituzani y col., 1998; Barber y col., 2000; Landiev y col., 2007). En la diabetes propiamente dicha, los cambios parecen derivar del deterioro de la barrera hematorretiniana (Rungger y col., 2000).

En aquellas patologías que producen una degeneración de las capas retinianas externas como consecuencia de la muerte de los fotorreceptores (retinitis pigmentaria, degeneración macular asociada a la edad, daño retiniano por agentes físicos) el daño de las capas externas se extiende hacia las internas con la consiguiente activación de la glía (células de Müller) y el posterior incremento de la expresión de GFAP (Vogler y col. 2013). La pérdida de neuronas en la retina puede comenzar en las primeras etapas de la retinitis pigmentaria, antes del descubrimiento de los cambios morfológicos en la retina (Laing y col., 2010).

En resumen, un aumento de GFAP en la retina, como el observado en nuestro estudio, puede asociarse a diversas causas. Los resultados obtenidos por nosotros no parecen estar ligados a infecciones o inflamaciones, ni tampoco a la hiperglucemia, ya que los niveles de glucosa preprandial observado en los ratones IRS2-ko no fueron estadísticamente significativos con respecto a los observados en los ratones wild type. Luego deberían estar asociados a problemas degenerativos dependientes de la no fosforilación de la proteína IRS2 tras la fijación de la insulina a su receptor.

En este sentido, IRS2 y, en particular su ausencia, ha sido asociado a procesos neurodegenerativos (Schubert y col., 2003; Sadagurski y col., 2011; White, 2014; Carretero, 2014) y particularmente en la retina (Albert-Fort y col., 2014).

La gliosis reactiva se acompaña de un aumento de GFAP concomitante con una activación y expresión de c-Fos que es modulada por IGF-1 (Fernández y col., 1997), que al igual que la insulina precisa para su actuación, entre otros mecanismos, de la fosforilación de IRS2.

Dado que la retina es sistema nervioso central y está ampliamente vascularizada y puesto que tanto los astrocitos como las células de Müller son capaces de expresar GFAP, al inicio del estudio esperábamos encontrar una mayor reactividad a GFAP; sin embargo, en los ratones wild type, la positividad de la retina a GFAP fue débil, tanto en la parte periférica como en la parte central.

La reactividad a GFAP encontrada en la retina de los ratones IRS2-ko sugiere que acontece una gliosis reactiva, probablemente por neurodegeneración retiniana.

La retina periférica mostró alta positividad a GFAP en la capa de las células ganglionares, formando una especie de empalizada con prolongaciones que cruzan hasta la nuclear interna, así como la presencia de células positivas en el espesor de la capa nuclear interna con finas prolongaciones que pueden alcanzar las capas más externas.

En la retina central también observamos positividad en las células ganglionares y gran cantidad de células positivas a GFAP en la plexiforme interna con finas prolongaciones, que por su morfología y localización pueden ser identificadas como astrocitos.

Estos hallazgos sugieren que la expresión de GFAP en la retina de ratones wild type es leve y que la GFAP es un indicador del daño neurodegenerativo que acontece en la retina de los ratones IRS2-ko, y sugiere que la ausencia de IRS2 induce la aparición de una gliosis reactiva retiniana.

La vimentina es la primera proteína del citoesqueleto que comienza a expresarse durante el desarrollo embrionario, formada por 464 aminoácidos y con un peso molecular de 58kDa, al igual que la GFAP, está incluida en los filamentos intermedios del tipo III. Así se hace presente en los precursores gliales y neuronales (Santos, 1993). Se une al DNA in vitro sugiriéndose un posible papel en diferentes procesos relacionados con el DNA (Traub y col., 1987), por lo que su presencia dentro de la célula puede ser nuclear o citoplásmica.

En contraste con otras proteínas de los filamentos intermedios, la expresión de vimentina no es relativa o específica de una línea celular única y puede detectarse en tejidos de origen ectodérmico y mesodérmico. En el embrión de ratón es característica una destacada expresión en precursores nerviosos y mesenquimatosos (Holtzer y col., 1982; Lazarides, 1982; Cochard y Paulin, 1984). En estas células, su expresión es compleja, debido a las rápidas variaciones dinámicas que presenta (Duprey y Paulin, 1995).

Se ha descrito que la vimentina puede estar presente en células mesodérmicas situadas entre la línea primitiva y el endodermo proximal (Jackson y col., 1981; Franke y col., 1982), en algunas células del mesénquima cefálico, en la notocorda, en el epimiocardio, en vasos sanguíneos, la somatopleura y la esplacnopleura.

Dentro del sistema nervioso, su expresión es temprana y comienza en la porción cefálica del tubo neural, posteriormente va apareciendo en los ganglios espinales y los ganglios simpáticos. Y se expresa en precursores neuronales y gliales (Cochard y Paulin, 1984).

Su localización ha sido mucho menos estudiada que la de la GFAP. Chouaf y col., (1989), detectaron la presencia de vimentina, especialmente en la capa ependimaria, dato éste concordante con resultados previos de nuestro laboratorio (Santos, 1993; Hernández, 1993). Adicionalmente, se detectó, un importante

número de fibras que se desprendían lateralmente de la pared del tercer ventrículo (de su zona ventral o inferior) para ir a buscar las partes laterales hipotálamicas y el límite pial inferior, presumiblemente tanicitos (Amat, 1991 y Santos, 1993).

Si bien la vimentina se considera tradicionalmente como marcador glial, en menor medida, se ha demostrado su presencia en elementos neuronales (Bignami y col., 1982; Santos, 1993; Hernández, 1993).

La expresión de vimentina en astrocitos, fuera ya del momento de desarrollo del tubo neural, podría guardar relación con procesos degenerativos del sistema nervioso ya que se ha descrito su presencia en las áreas afectadas durante la enfermedad de Alzheimer, el síndrome de Pick, la esclerosis lateral amiotrófica, la esclerosis múltiple o el infarto cerebral (Yamada y col., 1992).

A lo largo del desarrollo y maduración del sistema nervioso, la mayoría de las células gliales sufren un proceso de transformación en el que la vimentina va siendo sustituida por GFAP (Roessmann y Gambetti, 1986), no obstante persiste un porcentaje de células gliales en las que se coexpresan ambas proteínas (Eng, 1980 y 1985; Lewis y Cowan, 1985; Mokuno y col., 1989; Sarthy y col., 1991; Tardy y col., 1992). Células que perdieron la vimentina, son capaces de recuperar bajo determinadas condiciones la capacidad de reexpresar la proteína (Duprey y Paulin, 1995). Puede por tanto establecerse que la vimentina predomina en los astrocitos inmaduros mientras que la GFAP lo haría en los maduros (Chiu y col., 1981)., lo que se ve apoyado por el hecho de que las células positivas a vimentina predominan en las etapas tempranas del desarrollo y las de GFAP van apareciendo más lentamente en las etapas avanzadas (Norton y col., 1988; Schwartz y Wilson, 1992).

La transición progresiva de vimentina a GFAP (Voigt, 1989; Gary y col., 1995) supone que, durante un período temporal, vimentina y GFAP pueden localizarse en la misma célula, aunque en la mayoría de los astrocitos esta situación es pasajera (Voigt, 1989; Calvo y col., 1991), si bien se han descrito localizaciones específicas en las que ambas proteínas continúan expresándose, en particular en el ojo, principalmente en el nervio óptico y la capa plexiforme de la retina (Shaw y col., 1981 y Drager, 1983).

Los astrocitos que en condiciones normales co-expresan vimentina y GFAP, en ausencia de vimentina fracasan en el intento de formar la red del filamento. En estas células la vimentina es necesaria para la formación y estabilización del filamento de la GFAP y consecuentemente para la organización de la nueva red (Galou y col., 1996).

Bohn y col., (1992), valorando modelos específicos de especie de anticuerpos monoclonales anti-vimentina, observaron diferencias de la expresión de esta proteína.

Un detalle interesante radica en que, en la rata, durante las reacciones astrocitarias derivadas de lesiones cerebrales hay coexpresión de vimentina y GFAP (Calvo y col., 1991).

En lo referente a la glía retiniana, los estudios de Okada (1990) pusieron de manifiesto que las células de Müller de las retinas no lesionadas mostraban inmunorreactividad a vimentina y débil inmunorreactividad a GFAP; sin embargo, en desprendimientos de retina este patrón cambia. La observación por microscopía inmunoelectrónica reveló que los filamentos intermedios dentro de las células de Müller en retinas normales mostraban inmunorreactividad a vimentina y aquellos dentro de las células de Müller en retinas desprendidas mostraban inmunorreactividad tanto a vimentina como a GFAP. Estos resultados sugieren que los filamentos intermedios de las células de Müller humanas contienen vimentina bajo condiciones normales y que las células de Müller en retinas lesionadas contienen filamentos intermedios con ambas proteínas.

Luna y colaboradores (2010) analizaron la gliosis reactiva ante lesiones de la retina de la rata, constatando que en la retina no lesionada la GFAP marcaba sólo astrocitos mientras que, en un primer momento, la vimentina marcaba las células de Müller desde la membrana limitante interna a la externa, para posteriormente predominar el marcaje con GFAP.

La retina de los ratones wild type de nuestro estudio no mostraban positividad a vimentina en astrocitos o células de Müller. Sin embargo, los ratones IRS2-ko mostraban una importante positividad que afectaba de forma principal a la capa nuclear interna y a células, muy probablemente astrocitarias, situadas en torno a las células ganglionares.

Otro detalle interesante es que células ganglionares aparecieron positivas a vimentina y, dentro de ellas muchas presentaban reacción nuclear. Este hallazgo sugiere que la vimentina también puede unirse al DNA in vivo, hecho que ya fue descrito in vitro por Traub y colaboradores (1987). Aunque de nuestros resultados no se pueda establecer el grado de significación de este hecho, ni su trascendencia a posteriori.

Mientras que la reacción a GFAP sí ha sido estudiada en ratones IRS2-ko, no hay estudios en la literatura referentes al análisis de marcaje con vimentina en la retina de estos animales, por lo que cualquier elemento comparativo es preciso hacerlo frente a otras situaciones en las que la retina se encuentra lesionada.

Conjuntamente valorado, nuestros hallazgos del marcaje con GFAP y vimentina en la retina de los ratones IRS2-ko sugieren que el proceso neurodegenerativo de la retina que presentan estos animales se traduce en un aumento de la expresión de ambas proteínas de filamento intermedio y estaría en consonancia con los hallazgos que hemos descrito anteriormente para otros procesos degenerativos del sistema nervioso central.

Efectos de la ausencia de IRS2 sobre la expresión inmunocitoquímica de glutamina sintetasa.

En los elementos gliales, como sucede en otras células del organismo, el citoesqueleto es el encargado de ordenar la estructura interna de la célula para conseguir un adecuado funcionamiento celular. En la estirpe celular glial, los filamentos intermedios constituyen la mayor parte del citoesqueleto, por lo que las proteínas integrantes de los mismos son utilizadas como marcadores de estas células, como ocurre con GFAP o vimentina.

Como hemos visto anteriormente las células gliales responden con modificaciones en expresión de proteínas de filamento intermedio ante situaciones que modifican el medio endocrino. Así en estudios previos llevados a cabo en nuestro laboratorio, in vivo o in vitro, hemos detectado modificaciones en la expresión inmunocitoquímica de proteínas de filamento intermedio (fundamentalmente GFAP, vimentina y glutamina sintetasa) ante situaciones de ablación de glándulas periféricas como las suprarrenales, ovarios y testículos, o mediante la adición al medio de cultivo de sustancias como corticosterona, factores de crecimiento, estradiol o testosterona (Santos, 1993; Hernández, 1993; Hernández-Marcos, 1995, Sánchez y col, 1995).

A diferencia de esos marcadores fibrilares, la glutamina sintetasa, es un enzima intracelular, cuya acción es favorecer la síntesis de glutamina a partir de glutamato y amonio, por lo que interviene en la homeostasis del glutamato, neurotransmisor importante a nivel cerebral que en exceso puede llegar a ser neurotóxico. Participando además en el metabolismo de neurotransmisores de estirpe aminoácida como la glutamina y el GABA (Patel y col., 1985).

Ya en 1977 se determinó que había células gliales positivas al enzima (Martínez-Hernández y col., 1977), para poco después detectar que los astrocitos podían ser positivos a glutamina sintetasa (Norenberg, 1979).

Recientemente, se ha demostrado la presencia de glutamina sintetasa en las células de la microglía y que su expresión aumenta en procesos inflamatorios o patológicos del sistema nervioso (Nakajima y col. 2015).

Este enzima, considerado como un marcador de astrocitos, no es selectivo ya que también marca a las células de Müller y a algunas células ependimarias (Riepe y Norenberg, 1977; Norenberg y Martínez-Hernández, 1979; Roots, 1981), y a algunos oligodendrocitos (Cammer, 1990).

Dado que las células de Müller son células gliales propias de la retina, en nuestro estudio adquiere gran importancia para el estudio de dichas células. Habiendo sido éste el método que hemos empleado para su estudio.

La expresión o la actividad de la glutamina sintetasa se ha utilizado con el objetivo de determinar el potencial neurotóxico de diferentes compuestos (Reinhardt y Schein, 1995; Chang y col., 2007) o del glutamato, para lo que se ha estudiado los efectos de su inhibición (Balcar y Johnston, 1972; Pow y Robinson,

1994). También se ha analizado su posible participación en la lesión retiniana asociada al glaucoma (Chen y col., 2008).

En la diabetes, se produce un incremento de citoquinas proinflamatorias que, a su vez, inducen activaciones e inhibiciones de diferentes vías, entre ellas una disminución de la actividad de la glutamina sintetasa (Abu-El-Asrar y col., 2014).

Investigaciones recientes sobre el efecto de la diabetes en el tejido nervioso retiniano sugieren que la enfermedad afecta a las células nerviosas de las capas externas e internas de la retina (Hammes y col., 1995; Barber y col., 1998; Asnaghi y col., 2003; Park y col., 2003) provocando una activación de las células gliales (Lieth y col., 1998; Mizutani y col., 1998; Barber y col., 2000; Asnaghi y col., 2003; Layton y col., 2006) y reducción de la oscilación de los potenciales en el electroretinograma (Asi y Perlman; 1992), hechos que acontecen antes de que aparezca la afectación microvascular.

In vitro, las células de Müller expresan la glutamina sintetasa en los controles. La insulina disminuye la expresión, basal o estimulada por corticoides, del enzima en forma dosis-tiempo dependiente (Ola MS y col., 2011).

Los ratones wild type de nuestro estudio presentaron células positivas a glutamina sintetasa que por su aspecto radial y disposición claramente eran células de Müller y, junto a ellas, astrocitos positivos dispuestos basalmente a las células ganglionares. Lo que es coincidente con las descripciones previas de otros autores y valida el empleo de la positividad al enzima para el estudio de estas células.

En la literatura, no existen estudios que analicen las modificaciones que la ausencia de IRS2 provoca sobre estas células, en particular en la positividad a la glutamina sintetasa. Nosotros hemos podido constatar que en los ratones IRS2-ko la positividad a glutamina sintetasa disminuye en las células de Müller y se produce la disrupción de positividad en la membrana limitante externa. Este hallazgo podría explicar la desorganización estructural en mosaico que se observa al analizar la capa nuclear externa.

Sí que se ha descrito que la insulina desarrolla un papel protector para la supervivencia de las células de Müller y que la SIK2, una quinasa de la familia de las quinasas inducibles por sal, podría estar implicada como modulador negativo de estos hechos (Fischer y col., 2004; Küser-Abalt y col., 2013).

Esto junto a que la positividad a glutamina sintetasa en las células de Müller disminuya en los ratones IRS2-ko sugiere que la ruta de señal intracelular que se desencadena tras la fosforilación de IRS2 podría estar implicada en la supervivencia de estas células gliales.

Puesto que se ha descrito que en la patología ocular con aumento de glutamato éste induce la hiperexpresión de glutamina sintetasa (Shen y col., 2004), un descenso en la positividad al enzima podría indicar que los niveles de glutamato en la retina de los ratones IRS2-ko es menor que en los wild type.

Existen algunas controversias en la literatura en lo que respecta a la respuesta de las células gliales de la retina en la expresión de glutamina sintetasa ante in-

fecciones, isquemias retinianas, efectos de neurotóxicos o degeneraciones retinianas (Nishiyama y col., 2000; Chang y col., 2007; Lahmar y col., 2014; Hippert y col., 2015).

Los resultados obtenidos por dichos autores junto a los obtenidos por nosotros sugieren que la gliosis reactiva en la retina y los procesos asociados a la misma son variables y dependen de la enfermedad o del modelo experimental utilizado; probablemente si la gliosis se asocia a un fenómeno inflamatorio se produzca un aumento de la expresión de glutamina sintetasa asociado a aumentos de GFAP y vimentina; mientras que, como en nuestro caso, en el que no hay procesos inflamatorios asociados la gliosis se acompaña de aumento de GFAP y vimentina y descenso de glutamina sintetasa.

Por otro lado la disminución de glutamina sintetasa podría dar lugar a alteraciones en el metabolismo del glutamato, la glutamina y el GABA, con las consecuencias neurotóxicas y de disfuncionalidad que ello ocasionaría en la retina de estos animales, y que podría explicar la aparición de alteraciones en el retinograma antes de la aparición de la microangiopatía diabética que ya hemos comentado acontecen en la diabetes.

Otro hallazgo importante observado es la aparición de astrocitos positivos al enzima en la capa nuclear interna de la zona central de la retina, ausentes en la zona periférica, y que son más evidentes en los ratones wild type que en los IRS2-ko. Este hallazgo sugiere, por un lado, que el metabolismo de glutamato en los astrocitos de la retina central es más activo que en la retina periférica. Junto a ello, el descenso de marcaje de astrocitos con glutamina sintetasa en los IRS2-ko podría tener unas consecuencias semejantes a las del descenso de positividad en las células de Müller.

El hecho de que a diferencia de lo que ocurría con GFAP y vimentina, el marcaje para glutamina sintetasa disminuya, hace pensar que las células gliales positivas al enzima no participan en la gliosis reactiva que presentan estos animales y que hemos comentado al hablar de GFAP y vimentina y que, en lo que respecta a GFAP y la oligodendroglía, han sido descritos recientemente (Albert-Font y col., 2014).

Posible relevancia de los cambios en la expresión de aromatasa por ausencia de IRS2.

La aromatasa P450 es un enzima de localización muy ubicua cuya función es catalizar el paso de andrógenos aromatizables a estrógenos. Se sabe que se localiza en diversas partes del cerebro, incluida la retina, siendo la responsable de la síntesis de neuroestrógenos.

Los estrógenos son muy importantes para la maduración y supervivencia neuronal, este efecto puede llevarse a cabo a través de diferentes mecanismos. Uno de ellos implica a IGF1, sus receptores y las rutas de señal intracelular, la fosforilación de Akt y la de la PI3K (Cardona-Gómez y col., 2002, 2003; Méndez y col., 2003; García-Segura y col., 2007; Varea y col., 2010). Para sus efectos biológicos, estas rutas de señal intracelular son compartidas por IGF1 y por insulina, implicando en ella a la proteína de sustrato de receptor insulínico IRS2.

La síntesis de estrógenos y de IGF1 en células gliales acompaña a la gliosis reactiva a diversas injurias cerebrales (García-Estrada y col., 1992; García-Segura y col., 1999a; Hwang y col., 2004), el aumento de GFAP y vimentina en astrocitos está regulada por la interacción estrógenos-IGF1 (Fernández-Galaz y col., 1997; Avola y col., 2004) y los astrocitos expresan aromatasa P450 y sintetizan estrógenos (García-Segura y col., 1999b; Azcoitia y col., 2003, Roselli, 2007, Lepore y col., 2009).

Como parece existir una actuación sinérgica entre la activación del receptor de estrógenos y la del receptor de IGF1 (Cambiasso y col., 2000; Carrer y Cambiasso, 2002; Fernández-Galaz y col., 1996), ambos receptores coexisten en diferentes poblaciones neuronales y gliales en el sistema nervioso central (Cardona-Gómez y 2000; García-Segura y col., 2000), que permite la potenciación de ambos sistemas para activar la diferenciación y supervivencia neuronal (Dueñas y col., 1996; García-Segura y col., 2000; Topalli y Etgen, 2004; Picazo y col., 2000; Liu y col., 2007), no es descabellado pensar que ante la falta de respuesta a IGF1 se exacerbe el sistema estrogénico, con aumento de la expresión local de aromatasa y la ulterior síntesis de estrógenos.

Las interacciones entre glía y neuronas son esenciales para la función cerebral (Araque y col., 2001) y dichas interacciones, entre otras, involucra a los efectos de estradiol e IGF1 en el cerebro (García-Ovejero y col., 2005; García-Segura y col., 1996, 1999a, 2004).

En la literatura no hay muchos trabajos que analicen la expresión de aromatasa en la retina y, de los que hay, muchos de ellos no utilizan mamíferos como modelo experimental.

La retina del pez *carassius auratus* presenta cuerpos celulares neuronales inmunorreactivos a la aromatasa y fibras nerviosas. Entre éstas células inmunorreactivas a la aromatasa se encuentran algunas variantes de las células horizontales, células bipolares, y células amacrinas de la capa nuclear interna, también algunas fibras de las capas plexiformes externa e interna y en ciertas células de la capa de células ganglionares. En los fotorreceptores nunca fueron observados. Algunas proyecciones de las células ganglionares hacia el cerebro a través de la vía del nervio óptico y del tracto óptico fueron aromatasa positivas (Gelines y Callard, 1993; Callard y col., 1993).

Este es el primer estudio que analiza la expresión inmunocitoquímica de aromatasa P450 en la retina del ratón. Nuestros resultados demuestran la expresión del enzima en diferentes componentes estructurales de la retina. A diferencia de las descripciones realizadas en el pez, los ratones wild type los fotorreceptores presentaron positividad a la aromatasa, tanto en el citoplasma de las células que conforman la capa nuclear externa como el ribete de conos y bastones. Esta última capa presentó dos bandas de reacción una próxima al epitelio pigmentario y otra junto a la membrana limitante externa. También destaca la positividad en células aisladas de las capas nuclear interna y de células ganglionares y, de forma importante, las fibras del nervio óptico.

Junto a esta descripción de la distribución de la aromatasa en la retina del ratón, nuestros resultados a partir de los ratones IRS2-ko pone de manifiesto que la degeneración retiniana que presentan estos animales y la activación de GFAP y vimentina se acompaña de un aumento importante en la expresión de aromatasa P450.

Además del aumento de positividad al enzima, los animales IRS2-ko presentaron diferencias en la distribución de esta positividad al compararlos con los ratones wild type. Las diferencias más llamativas se centran en que la capa de conos y bastones perdía la banda positiva en zona próxima al epitelio pigmentario y había un gran aumento de positividad en la capa nuclear interna y la de células ganglionares.

El aumento de positividad a la aromatasa sugiere que en los ratones IRS2-ko se activa el mecanismo protector dependiente del estradiol, probablemente en un intento de suplir o estimular al dependiente de IGF1, no operativo por la ausencia de la proteína IRS2.

Efectos de la ausencia de IRS2 sobre las células amacrinas dopaminérgicas.

La tyrosin-hidroxilasa (tyr-HD) es el enzima limitante de la síntesis de dopamina, razón por la que se emplea el marcaje del enzima para la identificación de las células y neuronas dopaminérgicas, en particular en la retina, las células amacrinas dopaminérgicas. De manera que las células positivas al enzima permiten analizar el número de células amacrinas dopaminérgica disponibles en la retina (Brandies y Yehuda, 2008).

La adaptación a la luz permite que el sistema visual funcione en un rango muy amplio de intensidades de luz (Baylor y Hodgkin, 1974). En este proceso se implican muchos mecanismo que se ponen en marcha en la casi totalidad de los elementos que constituyen la retina (Young y Bok, 1969; Burnside y Nagle, 1983; Sperling, 1989; Dearry y col., 1990; Douglas y col., 1992; Ball y col., 1993; Cahill y Besharse, 1995). Regulados al menos parcialmente por el óxido nítrico (Wellard y Morgan, 2004) y la dopamina (Steinle y col., 2009), cuya ausencia provoca cambios estructurales y atrofia de la retina.

Las descargas dopaminérgicas retinianas están en relación con la adaptación del complejo sistema visual retiniano a la luz, a través de un ritmo circadiano, para cuyo mantenimiento no se precisan los fotorreceptores (Doyle y col., 2002), pero sí de la luz ya que se pierde en la oscuridad (Nir y col., 2000a), por lo que el metabolismo diurno de la dopamina retiniana se mantiene incluso en procesos degenerativos de los fotorreceptores (Nir y col., 2000b). La dopamina regula la adaptación regulando las concentraciones de cAMP en los fotorreceptores actuando sobre receptores dopaminérgicos. A este respecto hay alguna controversia sobre el tipo de receptor, habiéndose implicado al receptor D2 (Firsov y Astakhova, 2014) y al receptor D4 (Nir y col., 2001; Klitten y col., 2008) y se modifica según las condiciones de la iluminación (Vugler y col., 2007a).

En mamíferos, la producción y liberación de dopamina en la retina se realiza en las células amacrinas interplexiformes especializadas (Kramer, 1971; Iuvone y col., 1978). En la rata, son células grandes e intensamente positivas a tyr-HD

dispuestas en el borde entre la capa nuclear interna y la capa plexiforme interna y envían prolongaciones que forma un plexo grueso a lo largo de el límite escleral de la plexiforme interna, conocido como sublámina 1 de la capa plexiforme interna (Vugler y col., 2007b). También se ha descrito una localización semejante en el ratón (Savy y col., 1999).

Los ratones wild type empleados en nuestro estudio, muestran ligeras diferencias en la expresión inmunocitoquímica de tyr-HD dependiendo de la zona de retina que se observe. Mientras que en la retina central la positividad a tyr-HD es muy semejante a la descrita por otros autores, grandes células amacrinas dispuestas entre las capas nuclear interna y plexiforme interna y un grueso plexo en la sublámina 1 de la plexiforme interna; en la retina periférica se aprecia la presencia de otro plexo grueso, menos continuo en el borde vítreo de la capa plexiforme externa, que no había sido descrito hasta ahora.

Aunque estrictamente hablando los ratones IRS2-ko empleados en el estudio no son hiperglucémicos y por tanto no son diabéticos, la ausencia de IRS2 implica una resistencia periférica a la insulina y al IGF1, por ello comentaremos algunos datos que se recogen en la bibliografía sobre la retinopatía diabética y la afectación de las células amacrinas dopaminérgicas en la diabetes.

Históricamente la afectación retiniana por la diabetes ha sido considerada como una alteración vascular que generaba defectos en la vasculatura retiniana (Cai y Boulton, 2002). Si bien, la disfunción neuronal de la retina, que es anterior a las lesiones vasculares clínicamente detectables se reconoce cada día más (Barber, 2003; Antonetti y col., 2006). Se ha visto como las respuestas electroretinográficas están consistentemente disminuidas y retardadas en pacientes diabéticos sin patología vascular (Guirlanda y col., 1997; Shirao y Kawasaki, 1998). Además, algunos grupos celulares nerviosos son menos abundantes en las retinas diabéticas comparadas con retinas control (Abu-El-Asrar y col., 2004; Martin y col., 2004; Abu-El-Asrar y col., 2007; Fletcher y col., 2007; Kern y Barber, 2008). Disfunciones visuales tempranas similares se han observado en modelos animales de roedores con diabetes (Kirwin y col., 2011; Akimov y Rentería, 2012; Muir y col., 2012; Aung y col., 2013).

Se ha visto como en casos de diabetes se ve alterado el sistema dopaminérgico de la retina dependiendo del grado de hiperglucemia (Larabi y col., 1991) y el paso del tiempo (Mishimura y Kuriyama, 1985; Gastinger y col., 2006).

Se sabe que, in vitro, la insulina es un factor importante para la supervivencia de las células amacrinas de la retina, este efecto es dependiente de las concentraciones de glucosa (Politi y col., 2001; Nakamura y col., 2001).

Las células amacrinas se ven afectadas por un efecto citotóxico del glutamato cuya concentración en la retina aumenta en la diabetes (Li y col., 2002; Carrasco y col., 2008).

Los ratones IRS2-ko de nuestro estudio se caracterizaron por una clara disminución de la positividad a tyr-HD en la retina.

En estos animales desapareció el plexo que presentaba la retina periférica en la capa plexiforme externa de los ratones wild type. Junto a ello, el plexo de la sublámina 1 de la capa plexiforme interna se transformó en una estructura discontinua y las células amacrinas disminuyeron aparentemente número y tamaño, pasando a ser células aplanadas en vez de grandes células globulosas.

Las alteraciones de la parte interna de la retina se daban por igual en la retina periférica y en la central.

Estos resultados sugieren que la atrofia degenerativa de la retina que se observa en estos animales afecta también a las células amacrinas dopaminérgicas lo que alteraría aún más la funcionalidad retiniana en estos animales. IRS2 y la ruta de señales de desencadena se manifiesta así como un importante elemento regulador en la supervivencia de las células amacrinas dopaminérgicas, pudiendo ser su fosforilación, la responsable del efecto neuroprotector de la insulina sobre dichas células.

Apoptosis en la retina de ratones adultos IRS2-ko. Expresión de caspasa 3.

La apoptosis, como mecanismo de muerte celular programada, ha sido implicada como la forma más frecuente de desaparición de células retinianas en procesos degenerativos, oxidativos (Giradino y col., 1998), traumáticos y metabólicos, estando la diabetes y la hiperglucemia entre ellos (Bronson y col., 2003; Kusner y col., 2004; Jiang y col., 2013).

Como cabía esperar, los ratones wild type de nuestro estudio no presentan células positivas a la caspasa 3 activa, lo que sugiere que no se desarrollan procesos apoptóticos en la retina de estos animales.

Las lesiones que acontecen en la retina durante la instauración de la retinopatía diabética se acompañan de apoptosis que afecta a las células ganglionares de la retina (Barver y col., 2011) y que conducen a una atrofia y disminución del espesor de la retina (Lopes de Faria y col., 2002). No obstante, la apoptosis de las células ganglionares acontece antes incluso de que aparezca la retinopatía diabética (Van Dijk y col., 2011 y 2012).

Experimentalmente hay evidencias de que la apoptosis se desencadena por una estrés oxidativo previo (Kowluru y Koppolu, 2002; Cui y col., 2006; Aveleira y col., 2010; Li et al, 2011).

La caspasa 3 activa, es una proteasa mediadora de muerte celular que ha sido implicada en procesos neurodegenerativos, de envejecimiento y en la enfermedad de Alzheimer. También existen evidencias recientes sobre su papel en la modulación de la plasticidad sináptica celular (Snigdha y col., 2012).

Las caspasas se sintetizan en las células como zimógenos inactivos. Tras la proteólisis, las caspasas iniciadoras, tales como la caspasa -2, -8, -9 y -10 escinden a las caspasas ejecutoras -3, -6 y -7. Estas proteasas efectoras o ejecutoras entonces degradan a proteínas estructurales, a moléculas de señalización y a las enzimas de reparación del ADN. Entre las caspasas ejecutoras, la activación de la caspasa-3 desempeña un papel muy importante en la apoptosis neuronal y es

considerado el evento terminal que precede a la muerte de la célula. Caspasa-3 se activa principalmente por dos vías impulsadas por las caspasas iniciadoras 8 y 9, también conocidas como las vías intrínseca y extrínseca de la muerte celular, respectivamente (Marks y col., 1999; Salvesen y col., 1999; Fischer y col., 2003; Shi, 2004; Kumar, 2007).

Como ya hemos comentado anteriormente, el marcaje de la caspasa 3 activa por técnicas de inmunohistoquímica permite determinar las células que entran en apoptosis. (Newbold y col., 2014).

Diversos son los trabajos que han estudiado la muerte celular por apoptosis en la retina de diferentes modelos ante diversos estímulos nocivos, como la inducción de diabetes (Yang y col., 2013).

Habiéndose determinado que la ruta de la caspasa 3 es la primordial en la apoptosis retinianas en la diabetes (Valverde y col., 2013).

La sobreexpresión de IRS2 produce resistencia total a la activación de caspasa 3 en la apoptosis inducida por hiperglucemia a través de la PI3-quinasa y su efecto fosforilador sobre BAD activando a las proteínas antiapoptóticas que dimerizan con BAD (Stöhr y col., 2011).

Lo anteriormente expuesto explica fácilmente que las retinas de los ratones wild type no presenten positividad a caspasa 3, mientras que sí aparece en los ratones IRS2-ko.

Esta positividad no queda limitada a las células ganglionares o a una zona concreta de la retina, al contrario aparece en la retina central y en la periférica, en la capa de células ganglionares, en la capa plexiforme interna, en la capa nuclear interna, y en la capa plexiforme externa. Predominando la aparición de células positivas en la retina interna más que en la externa.

Probablemente debido a que el estudio se ha realizado en animales adultos, el porcentaje de células positivas a caspasa 3 activa en los ratones IRS2-ko fue muy bajo. Lo que sugiere que la muerte celular masiva se ha producido en etapas anteriores a la que ocupa en presente estudio.

Conclusiones

Después de analizar los efectos que la ausencia de la proteína de sustrato de receptor insulínico IRS2 ejerce sobre la morfología de la retina en ratones knock out para IRS2 de 15 semanas no hiperglucémicos y compararlos con las características morfológicas de los ratones wild type de la misma edad, mediante un estudio histológico con hematoxilina y su posterior análisis morfométrico; valorando las alteraciones en el marcaje inmunocitoquímico para GFAP, Vimentina, Glutamina sintetasa, Aromatasa P450, Tyrosín hidroxilasa y Caspasa 3 activa; contrastado los resultados obtenidos con la literatura existente, hemos llegado a las siguientes conclusiones:

- 1.- Este es el primer estudio que analiza los efectos de la ausencia de la proteína de receptor insulínico IRS2 sobre la expresión de vimentina, aromatasa y tyrosin hidroxilasa en la retina del ratón. Dada la relevancia clínica que tiene la diabetes tipo 2 y puesto que este modelo animal desarrolla una resistencia periférica a la insulina acompañada en el tiempo de diabetes tipo 2, los resultados obtenidos tienen gran relevancia puesto que ofrecen alteraciones retinianas no ligadas a la hiperglucemia. Alcanzando los objetivos propuestos al inicio del estudio.
- 2.- Los resultados obtenidos sugieren que la ausencia de IRS2 induce la aparición de una degeneración retiniana, no ligada a hiperglucemia o alteraciones vasculares, que afecta de forma difusa a la retina, a excepción de la capa nuclear interna.
- 3.- La degeneración retiniana se acompaña de una gliosis reactiva no inflamatoria que induce el aumento de expresión de GFAP y vimentina en los astrocitos.
- 4.- En el proceso degenerativo hay una clara disminución de las células de Müller y un descenso de positividad a glutamina sintetasa, que podría acompañarse de un descenso en la metabolización de glutamato lo que favorecería su efecto neurotóxico.
- 5.- Los animales IRS2-ko presentan un aumento de expresión de la aromatasa P450, lo que sugiere que en la retina aumenta la síntesis local de estradiol en un intento de mantener un efecto neuroprotector al fallar la neuroprotección de insulina e IGF1.
- 6.- En estos animales disminuye claramente la actividad dopaminérgica y las células amacrinas que producen dopamina, lo que sugiere que el sistema de adaptación a la intensidad lumínica está seriamente afectado.
- 7.- La ausencia de IRS2 supone un estímulo apoptótico en la zona neural profunda de la retina.

Referencias Bibliográficas

- Abu El-Asrar AM, Dralands L, Missotten L, Al-Jadaan IA, Geboes K (2004). Expression of apoptosis markers in the retina of human subjects with diabetes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 45: 2760-2766.
- Abu El-Asrar AM, Dralands L, Missotten L, Geboes K (2007). Expression of antiapoptotic and proapoptotic molecules in diabetic retinas. *Eye (Lond)* 21: 238-245.
- Abu El-Asrar AM, Siddiquei MM, Nawaz MI, Geboes K, Mohammad G (2014). The Proinflammatory Cytokine High-Mobility Group Box-1 Mediates Retinal Neuropathy Induced by Diabetes. *Mediators Inflamm*.
- Accili D, Drago J, Lee EJ, Johnson MD, Cool MH, Salvatore P, Asico LD, José PA, Taylor SI, Westphal H (1996). Early neonatal death in mice homozygous for a null allele of the insulin receptor gene. *Nat Gene*, 12:106-109.
- Aherne WA, Camplejohn RS, Wright NA (1977). An introduction to cell population kinetics. London: Edward Arnold.
- Aherne WA, Dunnill MS (1982). Morphometry. London: Edward Arnold.
- Ahnelt P, Kolb H (1994). Horizontal cells and cone photoreceptors in human retina: a Golgi-electron microscopic study of spectral connectivity. *J Comp Neurol*, 343(3):406-427.
- Ahnelt P, Kolb H (1994). Horizontal cells and cone photoreceptors in primate retina: a Golgi-light microscopic study of spectral connectivity. *J Comp Neurol*, 15; 343(3):387-405.
- Akimov NP, Rentería RC (2012). Spatial frequency threshold and contrast sensitivity of an optomotor behavior are impaired in the Ins2Akita mouse model of diabetes. *Behav Brain Res*, 226(2):601-605.
- Albert-Fort M, Hombrebueno JR, Pons-Vazquez S, Sanz-Gonzalez S, Diaz Llopis M, Pinazo-Durán MD (2014). Retinal neurodegenerative changes in the adult insulin receptor substrate-2 deficient mouse. *Exp Eye Res*, 124:1-10.
- Alvarez-Perez JC, Ernst S, Demirci C, Casinelli GP, Mellado-Gil JMD, Rausell-Palamos F, Vasavada RC, Garcia-Ocaña A (2014). Hepatocyte Growth Factor/c-Met Signaling Is Required for β -Cell Regeneration. *Diabetes*, 63(1): 216–223.
- Alzheimer, A (1904). Histologische studien zur differenzial-diagnose der progressiven paralyse. *Histol. Histopathol. Arb. Crosshirnrinde*, 1:18-314.
- Amat Muñoz P, Bernall Valls G, Doñate Oliver F, Ferres Torres R, Lancho Alonso JL, Muñoz Barragan L, Palomero Domínguez G, Rodríguez García S, Sarrat Torreguitart R, Smith Agreda JM, Smith Agreda V, Vazquez Rodríguez R (1995). Aparato de la vision. Sentido de la vista. Túnica interna del globo ocular: retina. En: Escolar. Anatomía humana funcional y aplicada. Vol 2: 1233-1237.

- Amat Peral G. (1991). Contribución al conocimiento morfofuncional de la region tuberoinfundibular. Tesina de licenciatura. Universidad de Salamanca.
- Antanitus DS, Choi BH, Lapham LW (1975). The demonstration of glial fibrillary acidic protein in the cerebrum of the human fetus by indirect immunofluorescence. *Brain Res*, 103:613-616.
- Antonetti DA, Barber AJ, Bronson SK, Freeman WM, Gardner TW, Jefferson LS, Kester M, Kimball SR, Krady JK, LaNoue KF, Norbury CC, Quinn PG, Sandirasegarane L, Simpson IA (2006). Diabetic retinopathy: seeing beyond glucose-induced microvascular disease. *Diabetes*, 55: 2401-2411.
- Araki E, Lipes MA, Patti ME, Bruning JC, Haag B, Johnson RS, Kahn CR (1994). Alternative pathway of insulin signalling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene. *Nature*, 372:186-190.
- Araque A, Carmignoto G, Haydon PG (2001). Dynamic signaling between astrocytes and neurons. *Annu Rev Physiol*, 63:795-813.
- Armada Maresca F, Fonseca Sandomingo A, Encinas Martín JL, García Arumí J, Gómez-Ulla F, Ruiz Moreno JM, Vilaplana (2010). Patología y cirugía de la mácula.
- Arroba AI, Revuelta-Cervantes J, Menes L, González-Rodríguez A, Pardo V, de la Vill P, Burks DJ, Valverde AM (2013). Loss of protein tyrosine phosphatase 1B increases IGF-1 receptor tyrosine phosphorylation but does not rescue retinal defects in IRS2-deficient mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 54 (6): 4215-4225.
- Ashcroft FM, Rorsman P (2012). Diabetes mellitus and the beta cell: the last ten years. *Cell*, 148: 1160-1171.
- Ashkenazi A, Dixit VM (1998). Death receptors: signaling and modulation. *Science*, 281 (5381): 1305-1308.
- Asi H, Perlman I (1992). Relationships between the electroretinogram awake, b-wave and oscillatory potentials and their application to clinical diagnosis. *Doc Ophthalmol*, 79:125-139.
- Asnaghi V, Gerhardinger C, Hoehn T, Adeboje A, Lorenzi M (2003). A role for the polyol pathway in the early neuroretinal apoptosis and glial changes induced by diabetes in the rat. *Diabetes*, 52:506-511.
- Atwell D (1986). The sharpey-schafer lecture: ion channels and signal processing in the outer retina. *Q J Exp Physiol*, 71: 497-536.
- Aung MH, Kim MK, Olson DE, Thule PM, Pardue MT (2013). Early visual deficits in streptozocin-induced diabetic Long-Evans rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 54: 1370-1377.
- Aveleira C, Castilho A, Baptista F, Simoes N, Fernandes C, Leal E, Ambrosio AF (2010). High glucose and interleukin-1beta downregulate interleukin-1

- type I receptor (IL-1RI) in tetinal endothelial cells by enhancing its degradation by a lysosome-dependent mechanism. *Cytokine*, 49(3): 279-286.
- Avola R, Di Tullio MA, Fisichella A, Tayebati SK, Tomassoni D (2004). Glial fibrillary acidic protein and vimentin expression is regulated by glucocorticoids and neurotrophic factors in primary rat astroglial cultures. *Clin Exp Hypertens*, 26(4):323-333.
- Azcoitia I, Sierra A, Veiga S, Garcia-Segura LM (2003). Aromatase expression by reactive astroglia is neuroprotective. *Ann N Y Acad Sci*, 1007: 298-305.
- Balcar VJ, Johnston GAR (1972). The structural specificity of the high affinity uptake of L-glutamate and L-aspartate by rat brain slices. *Journal of Neurochemistry*, 19:2657–2666.
- Ball AK, Baldrige WH, Fernback TC (1993). Neuromodulation of pigment movement in the RPE of normal and 6-OHDA-lesioned goldfish retinas. *Vis Neurosci*, 10(3):529-40.
- Barber AJ (2003). A new view of diabetic retinopathy: a neurodegenerative disease of the eye. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 27: 283-290.
- Barber AJ, Antonetti DA, Gardner TW (2000). Altered expression of retinal occludin and glial fibrillary acidic protein in experimental diabetes. The Penn State Retina Research Group. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 41: 3561–3568.
- Barber AJ, Gardner TW, Abcouwer SF (2011). The significance of vascular and neural apoptosis to the pathology of diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 52: 1156-1163.
- Barber AJ, Lieth E, Khin SA, Antonetti DA, Buchanan AG, Gardner TW (1998). Neural apoptosis in the retina during experimental and human diabetes. Early onset and effect of insulin. *J Clin Invest*, 102:783-791.
- Barber PC y Lindsay RM (1982). Schwann cells of the olfactory nerves contain glial fibrillary acidic protein and resemble astrocytes. *Neuroscience*, 7:3077-3090.
- Barnard NJ, Hall PA, Lemoine NR, Kadar NJ (1987). Proliferative index breast carcinoma determined in situ by KI 67 immunostaining and its relationship to pathological and clinical variables. *J. Pathol*, 152: 287-295.
- Barnett NL, Pow DV (2000). Antisense knockdown of GLAST, a glial glutamate transporter, compromises retinal function. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 41:585-591.
- Barr PJ, Tomei LD (1994). Apoptosis and its role in human disease. *Biotechnology (NY)*, 12(5):487-93.

- Baylor DA (1987). Photoreceptor signals and visión. *Invest Ophthalmol Vis Sci*; 28: 24-49.
- Baylor DA, Hodgkin AL, Lamb TD (1974). The electrical response of turtle cones to flashes and steps of light. *J Physiol*, 242(3):685-727.
- Beach T, Walku GR, Mcgeer EG (1989). Patterns of gliosis in Alzheimer's disease and aging cerebrum. *Glia* 2:420-436.
- Begg DP, Woods SC (2013). Interactions between the central nervous system and pancreatic islet secretions: a historical perspective. *Adv Physiol Educ*, 37(1):53-60.
- Bellhorn RW, Lipman DA, Confino J, Burns MS (1981). Effect of monosodium glutamate on retinal vessel development and permeability in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 21: 237-247.
- Bhattacharya S, Dey D, Roy SS (2007). Molecular mechanism of insulin resistance. *J Biosci*, 32: 405-413.
- Bigbee JW y Eng LF. (1982). Analysis and comparison of in vitro synthesized glial fibrillary acidic protein with rat CNS intermediate filament proteins. *J. Neurochem*, 38:130-134.
- Bigami A, Dahl D (1979). The radial glia of Müller in the rat retina and their response to injury. An immunofluorescence study with antibodies to the glial fibrillary acidic (GFA) protein. *Exp Eye Res*, 28:63–69.
- Bigami A, Raju T, Dhal D (1982). Localization of vimentin the non specific intermediate filament protein, in embryonal glia and in early differentiating neurons. *Dev Biol*; 91:286-295.
- Bigami A, Schoene WC (1981). Glial fibrillary acidic protein in human brain tumors. En: "Diagnostic Immunohistochemistry". R.A. Delellis, ed., pp: 213-225. Masson, New York.
- Bigami A, Dahl D (1973). Differentiation of astrocytes in the cerebellar cortex and the pyramidal tracts of the newborn rat. An immunofluorescence study with antibodies to a protein specific to astrocytes. *Brain Res*, 49(2):393-402.
- Bigami A, Dahl D, Seiler MW (1980). Neurofilaments in the chick embryo during early development. I. Immunofluorescent study with antisera to neurofilament protein. *Dev Neurosci*, 3(4-6):151-161.
- Bigami A, Eng LF, Dahl D, Uyeda CT (1972). Localization of the glial fibrillary acidic protein in astrocytes by immunofluorescence. *Brain Res*, 43(2):429-435.
- Björklund H, Dahl D, Seiger A (1984). Neurofilament and glial fibrillary acidic protein related immunoreactivity in rodent enteric nervous system. *Neuroscience*, 12: 277-288.

- Blaschke W (1949). Vorlesungen über Integralgeometrie. Chelsea Publishing Company.
- Boduła A, Wdowczyk M, Adamiec R (2005). The role of protein tyrosine phosphatase (PTP-1B) in insulin resistance. *Postepy Hig Med Dosw*, 59:203-207.
- Bohn W, Wiegers W, Beuttenmüller M, Traub P (1992). Species-specific recognition patterns of monoclonal antibodies directed against vimentin. *Exp. Cell. Res*, 201: 1-7.
- Bonnesen T, Fenchel W (1934). Theorie der konvexen Körper. *Ergebnisse der Mathematik und ihrer Grenzgebiete* 3, S. 1.
- Boyer S, Montagutell X, Gomes D, Simon-Chazotes D, Guenet JL, Dupouey P (1991). Recent evolutionary origin of the expression of the glial fibrillary acidic protein (GFAP) in lens epithelial cells. A molecular and genetic analysis of various mouse species. *Mol. Brain. Res*, 10: 159-165.
- Brandies R, Yehuda S (2008). The possible role of retinal dopaminergic system in visual performance. *Neurosci Biobehav Rev*, 32(4):611-656.
- Bravo R, Small JV, Fey SJ, Larsen PM, Celis JE (1982). Architecture and polypeptide composition of Hela cytoskeletons. Modification of cytoarchitectural polypeptides during mitosis. *J. Mol. Biol*, 154: 121-143.
- Bringmann A, Pannicke T, Biedermann B, Francke M, Landiev I, Grosche J, Wiedemann P, Albrecht J, Reichenbach A (2009). Role of retinal glial cells in neurotransmitter uptake and metabolism. *Neurochem Int*, 54:143-160.
- Bringmann A, Pannicke T, Grosche, Francke M, Wiedemann P, Skatchkov SN, Osborne NN, Reichenbach A (2006). Müller cells in the healthy and diseased retina. *Prog Retin Eye Res*, 25:397-424.
- Bringmann A, Reichenbach A (2001). Role of Müller cells in retinal degenerations. *Front Biosci*, 6:72-92.
- Bronson SK, Reiter CE, Gardner TW (2013). An eye on insulin. *J Clin Invest*, 111(12):1817-1819.
- Buffa R, Solcia E, Fiocca R, Crivelli O, Pera A (1979). Complement-mediated binding of immunoglobulins to some endocrine cells of the pancreas and gut. *J. Histochem. Cytochem*, 27: 1279-1280.
- Burks DJ, Pons S, Towery H, Smith-Hall J, Myers MG Jr, Yenush L, White MF (1997). Heterologous pleckstrin homology domains do not couple IRS-1 to the insulin receptor. *J Biol Chem*, 272(44):27716-27721.
- Burnside B, Nagle B (1983). Retinomotor movements of photoreceptors and retinal pigment epithelium: mechanisms and regulation. *Progress in retinal research* 2: 67-109.

- Cai J, Boulton M (2002). The pathogenesis of diabetic retinopathy: old concepts and new questions. *Eye (Lond)* 16: 242-260.
- Callard GV, Drygas M, Gelinas D (1993). Molecular and cellular physiology of aromatase in the brain and retina. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 44(4-6):541-547.
- Calvo JL, Carbonell AL, Boya J (1991). Co-expression of glial fibrillary acidic protein and vimentin in reactive astrocytes following brain injury in rats. *Brain Res*, 566: 333-336.
- Cambiasso MJ, Colombo JA, Carrer HF (2000). Differential effect of oestradiol and astroglia-conditioned media on the growth of hypothalamic neurons from male and female rat brains. *Eur J Neurosci*, 12(7):2291-2298.
- Cammer W (1990). Glutamine synthetase in the central nervous system is not confined to astrocytes. *J Neuroimmunol*, 26(2):173-178.
- Cardona-Gómez GP, DonCarlos L, Garcia-Segura LM (2000). Insulin-like growth factor I receptors and estrogen receptors colocalize in female rat brain. *Neuroscience*, 99(4):751-760.
- Cardona-Gómez GP, Mendez P, DonCarlos LL, Azcoitia I, Garcia-Segura LM (2002). Interactions of estrogen and insulin-like growth factor-I in the brain: molecular mechanisms and functional implications. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 83(1-5):211-217.
- Cardona-Gomez GP, Mendez P, Garcia-Segura LM (2002). Synergistic interaction of estradiol and insulin-like growth factor-I in the activation of PI3K/Akt signaling in the adult rat hypothalamus. *Brain Res Mol Brain Res*, 107(1):80-88.
- Carpentier JL, Hamer I, Foti M (2002). Insulin receptor trafficking. En: *Insulin signaling: from cultured cells to animal models*. Editor: Grunberger G, Zick Y, Taylor and Francis, New York: 243-258.
- Carrasco E, Hernández C, de Torres I, Farrés J, Simó R (2008). Lowered cortistatin expression is an early event in the human retina and is associated with apoptosis and glial activation. *Mol Vis*, 14:1496–1502.
- Carrer HF, Cambiasso MJ (2002). Sexual differentiation of the brain: genes, estrogen, and neurotrophic factors. *Cell Mol Neurobiol*, 22(5-6):479-500.
- Carretero J, Blanco E, Sánchez F, Riesco JM, Rubio M, Juanes JA, Vázquez R (1992). Morphometrical variations of prolactin cells in response to prolonged and systemic administration of Met-enkephalin in female rats. *Anat Embryol (Berl)*, 186(1):99-105.
- Carretero J, Rubio M, Sánchez F, Vázquez RJ, Santos M, Blanco J, Vázquez R (1995). In vitro morphometric and proliferative variations in VIP-

- immunoreactive pituitary cells induced by estradiol. *Neuroendocrinology*, 62(3):277-282.
- Carretero J, Rubio M, Vázquez-Perfecto RJ, Sánchez F, Torres JL, Pérez RM, Vázquez R (1997). Decreases in the size and proliferation rate of VIP-immunoreactive cells induced in vitro by testosterone are associated with decreases in VIP release. *Neuroendocrinology*, 65(3):173-178.
- Carretero J, Sanchez D, Sanchez F, Montero M, Blanco E, Gonzalez R, Vazquez R (1990). Morphometric study of immunoreactive GH-cells of the adenohypophysis of rats treated with Met-enkephalin. *Acta Histochem*, 89(2):121-130.
- Carretero J, Sánchez F, González R, Montero M, Juanes JA, Riesco JM, Vázquez R (1992). Morphometric analysis of GH-immunoreactive cells after GH release induced by treatment with estrogen in adult male rats. *Acta Histochem*, 93(1):271-276.
- Carretero J, Sánchez F, Montero M, Blanco E, Riesco JM, Carbajo E, González R, Vázquez R (1990). Morphological and functional study of the GH-immunoreactive adenohypophyseal cells in ovariectomized rats. *Histochem J*, 22(12):683-687.
- Carretero J, Sánchez F, Torres JL, Blanco E, Riesco JM, Vázquez R (1989). Study of h-TSH immunoreactive adenohypophyseal cells following treatment with methymlazole. *Histol Histopathol*, 4(1):71-76
- Carretero J, Sánchez F, Vázquez R, Cacicedo L, Sánchez-Franco F, Fernández G, Montero M (1991). In vivo and in vitro evidence of growth hormone-releasing factor-like produced locally in the adenohypophyseal cells of the rat. *Neuropeptides*, 19(4):223-229.
- Carretero J, Vázquez G, Blanco E, Rubio M, Santos M, Martín-Clavijo A, Torres JL, Vázquez R (1999). Immunohistochemical evidence of the presence of aromatase P450 in the rat hypophysis. *Cell Tissue Res*, 295(3):419-423.
- Carretero J, Vázquez G, Rubio M, Blanco E, Juanes JA, Pérez E, Burks D, Vázquez R (2003). Postnatal differentiation of the immunohistochemical expression of aromatase P450 in the rat pituitary gland. *Histol Histopathol*, 18(2):419-423.
- Carretero M (2014). Análisis de imagen in vivo, a partir de Resonancia Magnética, de los procesos neurodegenerativos que acontecen en ratones knock out para la proteína sustrato del receptor insulínico IRS-2. Tesis Doctoral por la Universidad de Salamanca.
- Chang ML, Wu CH, Jiang-Shieh YF, Shieh JY, Wen CY (2007). Reactive changes of retinal astrocytes and Müller glial cells in kainate-induced neuroexcitotoxicity. *J Anat*, 210(1):54-65.

- Chan-Palay V y Palay SL (1972). The form of velate astrocytes in the cerebellar cortex of monkey and rats. *Z. Anat Entwicklungsgsch.*, 137: 125-152.
- Cheatham B, Kahn CR (1995). Insulin action and the insulin signaling network. *Endocr Rev*, 16:117-142.
- Chen CT, Alyahya K, Gionfriddo JR, Dubielzig RR, Madl JE (2008). Loss of glutamine synthetase immunoreactivity from the retina in canine primary glaucoma. *Vet Ophthalmol*, 11(3):150-157.
- Cheng A, Dube N, Gu F, Tremblay ML (2002). Coordinated action of protein tyrosine phosphatases in insulin signal transduction. *Eur J Biochem* 269: 1050-1059.
- Chin YR, Yuan X, Balk SP, Toker A (2014). PTEN-deficient tumors depend on AKT2 for maintenance and survival. *Cancer Discov*, 4(8):942-955.
- Chirivella L, Cano-Jaimez M, Pérez-Sánchez F, Herraiz L, Carretero J, Fariñas I, Burks DJ, Kirstein M (2012). IRS2 signalling is required for the development of a subset of sensory spinal neurons. *Eur J Neurosci*, 35(3):341-352.
- Chiu FC, Norton WT, Fields KL (1981). The cytoskeleton of primary astrocytes in culture contains actin, glial fibrillary acidic protein and the fibroblast-type filament protein, vimentin. *J. Neurochem*, 37:147-155.
- Chouaf L, Didier-Bazes M, Aguera M, Tardy M, Sallanon M, Kitahama K, Belin MF (1989). Comparative marker analysis of the ependymocytes of the sub-commissural organ in four different mammalian species. *Cell Tiss. Res.*, 257: 255-262.
- Clement F (1994). *Oftalmología*. 2ª edición. Madrid. Luzán.
- Cochard P, Paulin D (1984). Initial expression of neurofilaments and vimentin in the central and peripheral nervous system of the mouse embryo in vivo. *J Neurosci*.42080-42094.
- Cohen GM (1997). Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J*, 326 (Pt 1):1-16.
- Combettes-Souverain M, Issad T (1998). Molecular basis of insulin action. *Diabetes Metab*, 24:477-489.
- Comings DE (1982). Two dimensional gel electrophoresis of human brain proteins. IV. Disorders of glial proliferation and a polymorphisms of glial fibrillary acidic protein. *Duarte Clin. Chem.*, 28:805-812.
- Copps KD, White MF (2012). Regulation of insulin sensitivity by serine/threonine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins IRS1 and IRS2. *Diabetologia*, 55(10):2565-2582.

- Costello DA, Claret M, Al-Qassab H, Plattner F, Irvine EE, Choudhury AI, Giese KP, Withers DJ, Pedarzani P (2012). Brain Deletion of Insulin Receptor Substrate 2 Disrupts Hippocampal Synaptic Plasticity and Metaplasticity. *PLoS One*.
- Crofton MW (1877). Geometrical theorems related to mean values. *Proc.Lond. Math. Soc.* 8: 304.
- Cui Y, Xu X, Bi H, Zhu Q, Wu J, Xia X, Qiushi Ren, Ho PC (2006). Expression modification of uncoupling proteins and MnSOD in retinal endothelial cells and pericytes induced by high glucose: the role of reactive oxygen species in diabetic retinopathy. *Exp Eye Res*, 83(4):807-816.
- Dahl D (1976). Glial fibrillary acidic protein from bovine and rat brain. Degradation in tissues and homogenates. *Acta Biochem. Biophys*, 420: 142-154.
- Dahl D, Bignami A (1973). Immunohistochemical and immunofluorescence studies of the glial fibrillary acidic protein in vertebrates. *Brain Res.*, 61:279-293.
- Dahl D, Bignami A (1976). Isolation from peripheral nerve of a protein similar to the glial fibrillar acidic protein. *FEBS Lett*, 66:281-284.
- Dahl D, Bignami A (1982). Immunohistological localization of desmin, the muscle type 100 A filament protein, in rat astrocytes and Müller glia. *J. Histochem. Cytochem*, 30:207-213.
- Dahl D, Rueger DC, Crosby CJ, Bignami A. (1984). Cell-specific domains of glial and muscle type intermediate filament proteins. *Exp. Cell Res*, 154:464-473.
- Dahl D, Bignami A (1985). Intermediate filaments in nervous tissue. *Cell Muscle Motil*, 6:75-96
- Daniel NN, Korsmeyer SJ (2004). Cell death: critical control points. *Cell*, 116(2):205-219
- De Lorenzo C, Greco A, Fiorentino TV, Mannino GC, Hribal ML (2013). Variants of insulin-signaling inhibitor genes in type 2 diabetes and related metabolic abnormalities. *Int J Genomics*.
- De Vitry F, Picart R, Jacques C, Tixier-Vidal A (1981). Glial fibrillary acidic protein therein: a Cellular marker of tanycytes in the mouse hypothalamus *Dev. Neurosci.* 4; 457-460.
- Deary A, Edelman JL, Miller S, Burnside B (1990). Dopamine induces light-adaptive retinomotor movements in bullfrog cones via D2 receptors and in retinal pigment epithelium via D1 receptors. *J Neurochem*, 54(4):1367-1378.
- Delacourte A (1990). General and dramatic glial reaction in Alzheimer brains. *Neurology* 40: 33-37.

- Delesse A. (1847). Procédé mécanique pour déterminer la composition des roches. *C R Acad Sci Paris*, 25: 544.
- Delibegovic M, Bence KK, Mody N, Hong EG, Ko HJ, Kim JK, Kahn BB, Neel BG (2007). Improved glucose homeostasis in mice with muscle-specific deletion of protein-tyrosine phosphatase 1B. *Mol Cell Biol*, 27(21):7727-7734.
- Delthiel R (1926). *Probabilités géométriques*. (Gauthier-Villars et Ge. eds.). Ecole Polytechnique. Paris.
- Desbuquois B, Authier F (2014). Involvement of the endosomal compartment in cellular insulin signaling. *Biol Aujourd'hui*, 208:137-150.
- Didier M, Harandi M, Aguera M, Bancel B, Tardy M, Fages C, Calas A, Stagaard M, Møllgård K, Belin MF (1986). Differential immunocytochemical staining for glial fibrillary acidic protein, S-100 and glutamine synthetase in the rat sub commissural organ, non-specialized ventricular ependyma and adjacent neuropil. *Cell. Tiss. Res.*, 245:343-351.
- Dogiel AS (1891). Ueber die nervösen Elemente in der Retina des Menschen. *Archiv für mikroskopische Anatomie*. Vol 38, (1): 317-344.
- Douglas RH, Wagner HJ, Zaunreiter M, Behrens UD, Djamgoz MB (1992). The effect of dopamine depletion on light-evoked and circadian retinomotor movements in the teleost retina. *Vis Neurosci*, 9(3-4):335-343.
- Doyle SE, McIvor WE, Menaker M (2002). Circadian rhythmicity in dopamine content of mammalian retina: role of the photoreceptors. *J Neurochem*, 83(1):211-9.
- Drager UC (1983). Coexistence of neurofilaments and vimentin in a neuron of adult mouse retina. *Nature* 303: 169-172.
- Dueñas M, Torres-Aleman I, Naftolin F, Garcia-Segura LM (1996). Interaction of insulin-like growth factor-I and estradiol signaling pathways on hypothalamic neuronal differentiation. *Neuroscience*, 74(2):531-539.
- Duprey P, Paulin D. (1995). What can be learned from intermediate filament gene regulation in the mouse embryo. *Int. J. Dev. Biol.* 39. P 443-457.
- Eisenfeld AJ, Bunt-Milam AH, Sarthy PV (1984). Müller cell expression of glial fibrillary acidic protein after genetic and experimental photoreceptor degeneration in the rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 25:1321-1328.
- Elias H, Henning A, Schwartz DE (1971). Stereology: applications to biomedical research. *Physiol Rev*, 51: 158-200.
- Elias H, Hide DM (1980). An elementary introduction to stereology (quantitative microscopy). *Am J Anat*, 159: 411-446.
- Ellis HM, Horvitz HR (1986). Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell*, 44(6):817-829.

- Eng L.F., Vanderhaegen JJ, Bignami A, Gerstl B. (1971). An acidic protein isolated from fibrous astrocytes. *Brain Res.*, 28: 351-354.
- Eng, L.F. (1980). The glial fibrillary acidic (GFA) protein. *Proteins of the nervous system*. R.A. Bradshaw and D. M. Schneider eds., 85-117.
- Eng, L.F. (1985). Glial fibrillary acidic protein (GFAP): the major protein of glial intermediate filaments in differentiated astrocytes. *J. Neuroimmunol.*, 8:203-214.
- Evans HL (1995). Markers of neurotoxicity: from behavior to autoantibodies against brain proteins. *Clin. Chem.* 41 (12 Pt 2). P 1874-1881.
- Eyzaguirre C F, Codner E. (2006). Análogos de insulina: en búsqueda del reemplazo fisiológico. *Rev. Méd. Chile.* 134:.2, pp. 239-250.
- Feraille E, Carranza ML, Rousselot M, Favre H (1994). Insulin enhances sodium sensitivity of Na-K-ATPase in isolated rat proximal convoluted tubule. *Am J Physiol*, 267:55-62.
- Fernandez AM, Garcia-Estrada J, Garcia-Segura LM, Torres-Aleman I (1997). Insulin-like growth factor I modulates c-Fos induction and astrocytosis in response to neurotoxic insult. *Neuroscience*, 76(1):117-122.
- Fernandez-Galaz MC, Morschl E, Chowen JA, Torres-Aleman I, Naftolin F, Garcia-Segura LM (1997). Role of astroglia and insulin-like growth factor-I in gonadal hormone-dependent synaptic plasticity. *Brain Res Bull*, 44(4):525-531.
- Fernandez-Galaz MC, Torres-Aleman I, Garcia-Segura LM (1996). Endocrine-dependent accumulation of IGF-I by hypothalamic glia. *Neuroreport*, 8(1):373-377.
- Fischer AJ (2005). Neural regeneration in the chick retina. *Prog Retin Eye Res*, 24(2):161-182.
- Fischer AJ, McGuire CR, Dierks BD, Reh TA (2002). Insulin and fibroblast growth factor 2 activate a neurogenic program in Müller glia of the chicken retina. *J Neurosci*, 22(21):9387-9398.
- Fischer AJ, Omar G, Eubanks J, McGuire CR, Dierks BD, Reh TA (2004). Different aspects of gliosis in retinal Muller glia can be induced by CNTF, insulin, and FGF2 in the absence of damage. *Mol Vis*, 22; 10:973-986.
- Fischer AJ, Scott MA, Zelinka C, Sherwood P (2010). A novel type of glial cell in the retina is stimulated by insulin-like growth factor 1 and may exacerbate damage to neurons and Müller glia. *Glia*, 58 (6): 633-649.
- Fischer U, Janicke RU, Schulze-Osthoff K (2003). Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ*, 10(1):76–100.

- Fix AS, Wightman KA, O'callaghan JP (1995). Reactive gliosis induced by MK-801 in the rat posterior cingulate/retrosplenial cortex: GFAP evaluation by sandwich ELISA and immunocytochemistry. *Neurotoxicology*. Summer. 16 (2): 229-237.
- Fletcher EL, Phipps JA, Ward MM, Puthussery T, Wilkinson-Berka JL (2007). Neuronal and glial cell abnormality as predictors of progression of diabetic retinopathy. *Curr Pharm Des*, 13(26):2699-2671.
- Forssmann WG, Pickel V, Reinecke M, Hock D, Metz J (1981). Immunohistochemistry and immunocytochemistry of nervous tissue. En: *Techniques in neuroanatomical research* (Heym C, Forssmann WG, Eds). Springer-Verlag., Berlín, pp: 171-205.
- Frade JM, Bovolenta P, Rodríguez-Tébar A (1999). Neurotrophins and other growth factors in the generation of retinal neurons. *Microsc Res Tech*, 45(4-5):243-251.
- Franke WW, Grund C, Kuhn O, Jackson BW, Illmensee K (1982). Formation of cytoskeletal elements during mouse embryogenesis: III primary mesenchymal cells and the first appearance of vimentin filaments. *Differentiation* 23:43-59.
- Friedman JE, Ishizuka T, Liu S, Farrell CJ, Bedol D, Koletsky RJ, Kaung HL, Ernsberg P (1997). Reduced insulin receptor signalling in the obese spontaneously hypertensive Koletsky rat. *Am J Physiol* 273:1014-1023.
- Gallego A (1971). Horizontal and amacrine cells in the mammalian's retina. *Vision Res*, 3:33.
- Galou M, Colucci-Guyon E, Ensergueix D, Ridet JL, Gimenez Y, Ribotta M, Privat A, Babinet C, Dupouey P (1996). Disrupted glial fibrillary acidic protein network in astrocytes from vimentin knockout mice. *J. Cell Biol.* 133 (4). P 853-863.
- García CF, Weiss LM, Lowder J (1987). Quantitation and stimulation of lymphocyte subsets in tissue sections. Comparison with flow cytometry. *Am J Pathol*, 87: 470-477.
- García RL, Coltrera MD, Gown AM (1989). Analysis of proliferative grade using anti PCNA/Cyclin monoclonal antibodies in fixed, embedded tissues. *Am J Pathol*, 134: 733-739.
- Garcia-Barrado MJ, Iglesias-Osma MC, Moreno-Viedma V, Pastor Mansilla MF, Gonzalez SS, Carretero J, Moratinos J, Burks DJ (2011). Differential sensitivity to adrenergic stimulation underlies the sexual dimorphism in the development of diabetes caused by Irs-2 deficiency. *Biochem Pharmacol*, 81(2):279-288.

- Garcia-Estrada J, Garcia-Segura LM, Torres-Aleman I (1992). Expression of insulin-like growth factor I by astrocytes in response to injury. *Brain Res*, 592(1-2):343-347.
- Garcia-Ovejero D, Azcoitia I, DonCarlos LL, Melcangi RC, Garcia-Segura LM (2005). Glia-neuron crosstalk in the neuroprotective mechanisms of sex steroid hormones. *Brain Res Brain Res Rev*, 48(2):273-286.
- Garcia-Segura LM, Cardona-Gómez GP, Chowen JA, Azcoitia I (2000). Insulin-like growth factor-I receptors and estrogen receptors interact in the promotion of neuronal survival and neuroprotection. *J Neurocytol*, 29(5-6):425-437.
- Garcia-Segura LM, Diz-Chaves Y, Perez-Martin M, Darnaudey M (2007). Estradiol, insulin-like growth factor-I and brain aging. *Psychoneuroendocrinology*, 32 Suppl 1:S57-61.
- Garcia-Segura LM, McCarthy MM (2004). Minireview: Role of glia in neuroendocrine function. *Endocrinology*, 145(3):1082-1086.
- Garcia-Segura LM, Naftolin F, Hutchison JB, Azcoitia I, Chowen JA (1999). Role of astroglia in estrogen regulation of synaptic plasticity and brain repair. *J Neurobiol*, 40(4):574-584.
- Garcia-Segura LM, Wise PM (2000). Introduction to the special issue on neuroprotection by steroids: new perspectives. *J Neurocytol*, 29(5-6):305-306.
- Garcia-Segura LM, Wozniak A, Azcoitia I, Rodriguez JR, Hutchison RE, Hutchison JB (1999). Aromatase expression by astrocytes after brain injury: implications for local estrogen formation in brain repair. *Neuroscience*, 89(2):567-578.
- Gard AL, White FP, Dutton GR (1982). GFAP in Kupffer cells. *Soc. Neurosci. Abstr*, 8: 240.
- Gariano RF, Sage EH, Kaplan HJ, Hendrickson AE (1996). Development of astrocytes and their relation to blood vessels in fetal monkey retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 37(12):2367-2375.
- Gariano RF., Kalina RE., Hendrickson AE. (1996). Normal and pathological mechanism in retinal vascular development. *Survey ophthalmology*; 40: 481-490.
- Gary KA, Sands SA, Chronwall BM (1995). Glial-like cells of the rat pituitary intermediate lobe change morphology and shift from 13 (6):555-565.
- Gastinger MJ, Singh RS, Barber AJ (2006). Loss of cholinergic and dopaminergic amacrine cells in streptozotocin-diabetic rat and Ins2Akita-diabetic mouse retinas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47: 3143-3150.
- Gatter KC, Dunnill MA, Gerdes J, Stein H, Mason DY (1986). New approach to assessing lung tumours in man. *J Clin Pathol*, 39: 590-593.

- Geisler N, Kaufmann E, Fischer S, Plessmann U, Weber K (1983). Neurofilament architecture combines structural principles of intermediate filaments with carboxyterminal extensions increasing in size between triplet proteins. *EMBO J*.
- Gelinas D, Callard GV (1993). Immunocytochemical and biochemical evidence for aromatase in neurons of the retina, optic tectum and retinotectal pathways in goldfish. *J Neuroendocrinol*, 5(6):635-641.
- Geneser F. (2000). *Histología sobre bases biomoleculares*. Panamericana. Madrid.
- Ghandour MS, Langley OK, Vincendon G, Gombos G (1979). Double labeling immunohistochemical technique provides evidence for the specificity of glial cell markers. *J. Histochem. Cytochem*, 27:1634-1637.
- Ghirlanda G, Di Leo MA, Caputo S, Cercone S, Greco AV (2007). From functional to microvascular abnormalities in early diabetic retinopathy. *Diabetes Metab Rev*, 13(1):15-35.
- Giaume C, Kirchhoff F, Matute C, Reichenbach A, Verkhratsky A (2007). Glia: the fulcrum of brain diseases. *Cell Death Differ*. 14(7):1234-1235.
- Gil J (1992). Estudio inmunocitoquímico de las estirpes celulares productoras de neuropéptidos: péptido intestinal vasoactivo (VIP), hormona liberadora de GH (GRF) y somatostatina (SRIF), en la hipófisis de la rata. Tesis Doctoral. Univ. de Salamanca.
- Glees P (1955). *Neuroglia. Morphology and function*. Charles C. Thomas, Publisher, Springfield.
- Golick ML, Rice M (1992). Optimum staining of PCNA in paraffin sections is dependent of fixation, drying and intensification. *J Histotechnol*, 15: 39-41.
- Gonzalez-Navarro H, Vila-Caballer M, Pastor MF, Vinue A, White MF, Burks D, Andres V (2007). Plasma insulin levels predict the development of atherosclerosis when IRS2 deficiency is combined with severe hypercholesterolemia in apolipoprotein E-null mice. *Front Biosci*, 12:2291-2298.
- González-Navarro H, Vinué A, Vila-Caballer M, Fortuño A, Beloqui O, Zalba G, Burks D, Díez J, Andrés V (2008). Molecular mechanisms of atherosclerosis in metabolic syndrome: role of reduced IRS2-dependent signaling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 28(12):2187-2194
- Goodlett CR, Leo JT, O'callaghan JP, Mahoney JC, West JR (1993). Transient cortical astrogliosis induced by alcohol exposure during the neonatal brain growth spurt in rats. *Develop. Brain Res.*, 72: 85-97.
- Graeber MB y Kreutzberg GW. (1986). Astrocytes increase in glial fibrillary acidic protein during retrograde changes of facial motor neurons. *J. Neurocytol.*, 15:363-373.

- Griffeth RJ, Carretero J, Burks DJ (2013). Insulin Receptor Substrate 2 Is Required for Testicular Development. *PLoS One*.
- Grigsby JG, Cardona SM, Pouw CE, Muniz A, Mendiola AS, Tsin AT, Allen DM, Cardona AE. Grigsby JG (2014). The role of microglia in diabetic retinopathy. *J Ophthalmol*.
- Grote CW, Morris JK, Ryals JM, Geiger PC, Wright DE (2011). Insulin Receptor Substrate 2 Expression and Involvement in Neuronal Insulin Resistance in Diabetic Neuropathy. *Exp Diabetes Res*.
- Gual P, Marchand-Brustel YL, Tanti JF (2005). Positive and negative regulation of insulin signaling through IRS-1 phosphorylation. *Biochimie* 87:99-109.
- Guidry C, Medeiros N, Curcio C (2002). Phenotypic variation of retinal pigment epithelium in age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 43:267–273.
- Hall PA, Levison DA, Woods AL, Yu CCW, Kellock DB, Watkins JA, Barnes DM, Gillet CE, Camplejohn R, Dover R, Waseem NH, Lane DP (1990). Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalization in paraffin sections: a index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms. *J Pathol* 162: 285-294.
- Hammes HP, Federoff HJ, Brownlee M (1995). Nerve growth factor prevents both neuroretinal programmed cell death and capillary pathology in experimental diabetes. *Mol Med*, 1:527-534.
- Hançer NJ, Qiu W, Cherella C, Li Y, Copps KD, White MF (2014). Insulin and metabolic stress stimulate multisite serine/threonine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 and inhibit tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem*, 289(18):12467-12484.
- Hashimoto H, Kamisako T, Kagawa T, Haraguchi S, Yagoto M, Takahashi R, Kawai K, Suemizu H (2015). Expression of pancreatic and duodenal homeobox1 (PDX1) protein in the interior and exterior regions of the intestine, revealed by development and analysis of Pdx1 knockout mice. *Lab Anim Res*, 31(2): 93–98.
- Hashimoto N, Feener EP, Zhang WR, Goldstein BJ (1992). Insulin receptor protein-tyrosine phosphatases. Leukocyte common antigen-related phosphatase rapidly deactivates the insulin receptor kinase by preferential dephosphorylation of thereceptor regulatory domain. *J Biol Chem*, 267(20):13811-13814.
- Hatten ME, Liem RKH, Shelanski ML, Mason CA (1991). Astroglia in CNS injury. *Glia*, 4: 233-243.

- Hernández JM. (1993). Estudio in vivo e in vitro del efecto de dos factores de crecimiento (endotelial y ependimal) sobre las células gliales de la corteza cerebral. Tesis doctoral. Universidad de Salamanca.
- Hernández-Marcos M (1995). Estudio in vitro del comportamiento de la glia tras la administración de estrógenos y testosterona. Tesis Doctoral. Universidad de Salamanca.
- Hippert C, Graca AB, Barber AC, West EL, Smith AJ, Ali RR, Pearson RA (2015). Müller glia activation in response to inherited retinal degeneration is highly varied and disease-specific. *PLoS One*.
- Holtzer H, Bennett GH, Tapscott SJ, Toyama Y (1982). Intermediate-size filaments: changes in synthesis and distribution in cells of the myogenic and neurogenic lineages, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 46:317-329.
- Holtzman, E.; S. Teichberg; S.J. Abrahams; E. Citkowitz; S.M. Crain; N. Kawai y E.R. Peterson (1973). Notes on synaptic vesicles and related structures, endoplasmic reticulum, lysosomes, and peroxisomes in nervous tissue and the adrenal medulla. *J. Histochem. Cytochem*, 21: 349-385.
- Hori H, Sasaoka T, Ishihara H, Wada T, Murakami S, Ishiki M, Kobayashi M (2002). Association of SH2-containing inositol phosphatase 2 with the insulin resistance of diabetic db/db mice. *Diabetes*, 51(8):2387-2394.
- Hutson JC, Childs GV, Gardner PJ (1979). Considerations for establishing the validity of immunocytochemical studies. *J Histochem Cytochem*, 27: 1201-1202.
- Hwang IK, Yoo KY, Park SK, An SJ, Lee JY, Choi SY, Kang JH, Kwon YG, Kang TC, Won MH (2004). Expression and changes of endogenous insulin-like growth factor-1 in neurons and glia in the gerbil hippocampus and dentate gyrus after ischemic insult. *Neurochem Int*, 45(1):149-156.
- Iandiev I, Pannicke T, Reichenbach A, Wiedemann P, Bringmann A (2007). Diabetes alters the localization of glial aquaporins in rat retina. *Neurosci Lett* 421: 132–136.
- Ikui H, Uga S, Kohno T (1976). Electron microscope study on astrocytes in the human retina using ruthenium red. *Ophth. Res.*, 8:100-110.
- Irvine EE, Drinkwater L, Radwanska K, Al-Qassab H, Smith MA, O'Brien M, Kielar C, Choudhury A, Krauss S, Cooper JD, Withers DJ, Giese KP (2011). Insulin receptor substrate 2 is a negative regulator of memory formation. *Learn Mem*, 18(6): 375–383
- Ito O, Kondo Y, Takahashi N, Kudo K, Igarashi Y, Omata K, Imai Y, Abe K (1994). Insulin stimulates NaCl transport in isolated perfused MTAL of Henle's loop of rabbit kidney. *Am J Physiol*, 267:265-270.

- Jackson BW, Grund C, Winter S, Franke WW, Illmensee K (1981). Formation of cytoskeletal elements during mouse embryogenesis. Epithelial differentiation and intermediate-size filaments in early postimplantation embryos. *Differentiation* 20: 203-216.
- Jessen KR, Mirsky R (1980). Glial cells in the enteric nervous system contain glial fibrillary acidic protein. *Nature, London*, 286: 736-737.
- Jessen KR, Mirsky R (1983). Astrocyte-like glia in peripheral nervous system: An immunohistochemical study of enteric glia. *J. Neurosci*, 3: 2206-2218.
- Jessen KR, Thorpe R, Mirsky R. (1984). Molecular identity, distribution and heterogeneity of glial fibrillary acidic protein: An immunoblotting and immunohistochemical study of Schwann cells, satellite cells, enteric glia and astrocytes. *J. Neurocytol.*, 13: 187-200.
- Juanes, J.A, J.M. Riesco, J. Carretero, F. Sánchez, E. Blanco y R. Vázquez (1989). Etude morphologique avec le microscope electronique a balayage chez deux organes circumventriculaires: l'organum vasculosum de la lamina terminalis et l'organe subfornical de rat Spargue-Dawley. 71 congrés de l'Association de Anatomistes, Angers. Libro de Resúmenes: 29a.
- Kalman M, Hajos F (1989). Distribution of glial fibrillary acidic protein (GFAP)-immunoreactive astrocytes in the rat brain. *Forebrain Exp. Brain. Res.*, 78:147-163.
- Kalman M, Szekely AD, Csillag A (1993). Distribution of glial fibrillary acidic protein-immunopositive structures in the brain of the domestic chicken (*Gallus domesticus*). *J. Comp. Neurol*, 330:221-237.
- Kamo IH, Haebara H, Akiguchi I, Kameyama M, Kimura H, McGeer PL (1987). A distinctive distribution of reactive astroglia in the precentral cortex in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol*, 74: 33-38.
- Kandadi MR, Panzhinskiy E, Roe ND, Nair S, Hu D, Sun A (2015). Deletion of protein tyrosine phosphatase 1B rescues against myocardial anomalies in high fat diet-induced obesity: Role of AMPK-dependent autophagy. *Biochim Biophys Acta*, 1852(2):299-309.
- Kanzaki M, Pessin JE (2001). Signal integration and the specificity of insulin action. *Cell Biochem Biophys* 35:191-209.
- Karamitopoulou E, Perentes E, Melachrinou M, Maraziotis T (1993). Proliferating cell nuclear antigen immunoreactivity in human central nervous system neoplasms. *Acta Neuropathol* 85: 316-322.
- Karasik A, Rothenberg PL, Yamada K, White MF, Kahn CR (1990). Increased protein kinase C activity is linked to reduced insulin receptor autophosphorylation in liver of starved rats. *J Biol Chem*, 265(18):10226-10231

- Kaufman PL, Alm A (2004). Desarrollo y estructura de la retina. En: Adler. Fisiología del ojo. 10ª edición. Madrid. Mosby.
- Kern TS, Barber AJ (2008). Retinal ganglion cells in diabetes. *J Physiol*, 586:4401-4408.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 26(4):239-257.
- Kershman J (1949). Genesis of microglia in the human brain. *Arch Neurol Psychiat*, 41: 24-50
- Kirwin SJ, Kanaly ST, Hansen CR, Cairns BJ, Ren M, Edelman JL (2011). Retinal gene expression and visually evoked behavior in diabetic long evans rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 52(10):7654-7663.
- Kliscic J, Hu MC, Nief V, Reyes L, Fuster D, Moe OW, Ambühl PM (2002). Insulin activates Na/H exchanger 3: biphasic response and glucocorticoid dependence. *Am J Physiol Renal Physiol*, 283:532-539.
- Klitten LL, Rath MF, Coon SL, Kim JS, Klein DC, Møller M (2008). Localization and regulation of dopamine receptor D4 expression in the adult and developing rat retina. *Exp Eye Res*, 87(5):471-477.
- Kolb H, Fernandez E, Schouten J, Ahnelt P, Linberg KA, Fisher SK (1994). Are there three types of horizontal cell in the human retina? *J Comp Neurol*, 343(3):370-386.
- Koren S, Fantus IG (2007). Inhibition of the protein tyrosine phosphatase PTP1B: potential therapy for obesity, insulinresistance and type-2 diabetes mellitus. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 21(4):621-640.
- Kowluru RA, Koppolu P (2002). Diabetes-induced activation of caspase-3 in retina: effect of antioxidant therapy. *Free Radic Res*, 36(9):993-999.
- Kramer SG (1971). Dopamine: A retinal neurotransmitter. I. Retinal uptake, storage, and light-stimulated release of H3-dopamine in vivo. *Invest Ophthalmol*, 10(6):438-52
- Krammer PH (1998). The CD95 (APO-1/Fas)/CD95L system. *Toxicol Lett*, 102-103:131-137.
- Krammer PH (2000). CD95's deadly mission in the immune system. *Nature*, 407(6805):789-795.
- Kubota N, Tobe K, Terauchi Y, Eto K, Yamauchi T, Suzuki R, Tsubamoto Y, Komeda K, Nakano R, Miki H, Satoh S, Sekihara H, Sciacchitano S, Lesniak M, Aizawa S, Nagai R, Kimura S, Akanuma Y, Taylor SI, Kadowaki T (2000). Disruption of insulin receptor substrate 2 causes type 2 diabetes because of liver insulin resistance and lack of compensatory beta-cell hyperplasia. *Diabetes*, 49:1880-1889.

- Kudo Y (2007). New development in glial cell research. *Brain Nerve*, 59 (7):655-667.
- Kumar JP (2001). Signalling pathways in *Drosophila* and vertebrate retinal development. *Nat Rev Genet*, 2(11):846-857.
- Kumar S (2007). Caspase function in programmed cell death. *Cell Death Differ*, 14(1):32-43.
- Küser-Abali G, Ozcan F, Ugurlu A, Uysal A, Fuss SH, Bugra-Bilge K (2013). SIK2 is involved in the negative modulation of insulin-dependent muller cell survival and implicated in hyperglycemia-induced cell death. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 54(5):3526-3537
- Lahmar I, Pfaff AW, Marcellin L, Sauer A, Moussa A, Babba H, Candolfi E (2014). Müller cell activation and photoreceptor depletion in a mice model of congenital ocular toxoplasmosis. *Exp Parasitol*, 144:22-26.
- Landberg G, Gross G (1991). Antibodies to proliferating cell nuclear antigen as S-phase probes in flow cytometric cell cycle analysis. *Cancer Res*, 51: 4570-4574.
- Larabi Y, Dahmani Y, Gernigon T, Nguyen-Legros J (1991). Tyrosine hydroxylase immunoreactivity in the retina of the diabetic sand rat *Psammomys obesus*. *J Hirnforsch*, 32(4):525-531.
- Layton CJ, Becker S, Osborne NN (2006). The effect of insulin and glucose levels on retinal glial cell activation and pigment epithelium-derived fibroblast growth factor-2. *Mol Vis*, 18; 12:43-54.
- Lazarides, E. (1982). Intermediate filaments: A chemical heterogeneous, developmentally regulated class of proteins. *Ann. Rev. Biochem*, 51:219-250.
- Le Roith D, Quon MJ, Zick Y (2003). Molecular and cellular aspects of insulin resistance: implications for diabetes. En: *Signal transduction and human disease*. Editor: Finkel T, Gutkind JS. Hoboken, New Jersey Wiley-Interscience: 171-200.
- Le Roith D, Zick Y (2001). Recent advances in our understanding of insulin action and insulin resistance. *Diabetes Care*, 24(3):588-597.
- Lepore G, Gadau S, Mura A, Zedda M, Farina V (2009). Aromatase immunoreactivity in fetal ovine neuronal cell cultures exposed to oxidative injury. *Eur J Histochem*, 53(4):28.
- Levine EM, Close J, Fero M, Ostrovsky A, Reh TA (2000). p27 (Kip1) regulates cell cycle withdrawal of late multipotent progenitor cells in the mammalian retina. *Dev Biol*, 219(2):299-314.
- Levine EM, Fuhrmann S, Reh TA (2000). Soluble factors and the development of rod photoreceptors. *Cell Mol Life Sci*, 57(2):224-234.

- Lewis SA, Balcarek JM, Krek V, Shelanski M, Cowan NJ. (1984). Sequence of a cDNA clone encoding mouse glial fibrillary acidic protein: structural conservation of intermediate filaments Proc. Natl. Sci. USA 81: 2743-2746.
- Lewis SA, Cowan NJ (1985). Temporal expression of mouse glial fibrillary acidic protein mRNA studied by a rapid in situ hybridization procedure. *J. Neurochem*, 45:913-919.
- Li C, Baquiran G, Gu F, Tremblay ML, Fazel A, Bergeron JJ, Posner BI (2006). Insulin receptor kinase-associated phosphotyrosine phosphatases in hepatic endosomes: assessing the role of phosphotyrosine phosphatase-1B. *Endocrinology*, 147(2):912-918.
- Li P, Xu X, Zheng Z, Zhu B, Shi Y, Liu K (2011). Protective effects of rosiglitazone on retinal neuronal damage in diabetic rats. *Curr Eye Res*, 36(7):673-679
- Li Q, Puro DG (2002). Diabetes-induced dysfunction of the glutamate transporter in retinal Müller cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 43(9):3109–3116.
- Li Y, Wang P, Xu J, Gorelick F, Yamazaki H, Andrews N, Desir GV (2007). Regulation of insulin secretion and GLUT4 trafficking by the calcium sensor synaptotagmin VII. *Biochem Biophys Res Commun*, 362(3):658-664.
- Liang XY, Wang HZ, Wang NL (2010). Time course degeneration and expression of glial fibrillary acidic protein in mer-knockout mice. *Chin Med J (Engl)*, 123(7):949-953.
- Lieth E, Barber AJ, Xu B, Dice C, Ratz MJ, Tanase D, Strother JM (1998). Glial reactivity and impaired glutamate metabolism in shortterm experimental diabetic retinopathy. Penn State Retina Research Group. *Diabetes*, 47:815-20. Erratum in: *Diabetes* 1998; 47:1170.
- Little DV (1974). A third note on recent research in geometrical probability. *Advanc Appl Prob*, 6:103.
- Liu JP, Baker J, Perkins AS, Robertson EJ, Efstratiadis A (1993). Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type I IGF receptor (Igf 1r). *Cell* 75:59-72.
- Liu M, Hurn PD, Roselli CE, Alkayed NJ (2007). Role of P450 aromatase in sex-specific astrocytic cell death. *J Cereb Blood Flow Metab*, 27:135–141.
- Lopes de Faria JM, Russ H, Costa VP (2002). Retinal nerve fibre layer loss in patients with type 1 diabetes mellitus without retinopathy. *Br J Ophthalmol*, 86(7):725-728.
- Loud AV, Barany WC, Pack BA (1965). Quantitative evaluation of cytoplasmic structures in electron micrographs. *Lab Invest*, 14: 996-1008.

- Louvi A, Accili D, Efstratiadis A (1997). Growth-promoting interaction of IGF-II with the insulin receptor during mouse embryonic development. *Dev Biol*, 189:33-48.
- Luna G, Lewis GP, Banna CD, Skalli O, Fisher SK (2010). Expression profiles of nestin and synemin in reactive astrocytes and Müller cells following retinal injury: a comparison with glial fibrillar acidic protein and vimentin. *Mol Vis*, 16:2511-2523.
- Luvone PM, Galli CL, Garrison-Gund CK, Neff NH (1978). Light stimulates tyrosine hydroxylase activity and dopamine synthesis in retinal amacrine neurons. *Science*, 202(4370):901-2.
- Madigan MC, Penfold PL, Provis JM, Balind TK, Billson FA (1994). Intermediate filament expression in human retinal macroglia: histopathologic changes associated with age-related macular degeneration. *Retina*, 14:65–74.
- Maegawa H, Hasegawa M, Sugai S, Obata T, Ugi S, Morino K, Egawa K, Fujita T, Sakamoto T, Nishio Y, Kojima H, Haneda M, Yasuda H, Kikkawa R, Kashiwagi A (1999). Expression of a dominant negative SHP-2 in transgenic mice induces insulin resistance. *J Biol Chem*, 274(42):30236-30243.
- Maeno Y, Li Q, Park K, Rask-Madsen C, Gao B, Matsumoto M, Liu Y, Wu IH, White MF, Feener EP, King GL (2012). Inhibition of insulin signaling in endothelial cells by protein kinase C-induced phosphorylation of p85 subunit of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K). *J Biol Chem*, 287(7):4518-4530.
- Marks N, Berg MJ (1999). Recent advances on neuronal caspases in development and neurodegeneration. *Neurochem Int*, 35(3):195–220.
- Martin PM, Roon P, Van Ells TK, Ganapathy V, Smith SB (2004). Death of retinal neurons in streptozotocin-induced diabetic mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci*.
- Martínez-Hernández A, Bell KP, Norenberg MD (1977). Glutamine synthetase: glial localization in brain. *Science*; 195: 1356-1358.
- Martínez-Hervás S, Vinué A, Núñez L, Andrés-Blasco I, Piqueras L, Real JT, Ascaso JF, Burks DJ, Sanz MJ, González-Navarro H (2014). Insulin resistance aggravates atherosclerosis by reducing vascular smooth muscle cell survival and increasing CX3CL1/CX3CR1 axis. *Cardiovasc Res*, 103(2):324-336.
- Marunaka Y, Hagiwara N, Tohda H (1992). Insulin activates single amiloride-blockable Na channels in a distal nephron cell line. *Am J Physiol*, 263:392-400.
- Mathewson AJ, Berry M (1985). Observations on the astrocyte response to a cerebral stab wound in adult rats. *Brain Res*, 327: 61-69.

- Maunoury R, Delpech A, Delpech B, Vidard M, Vedrenne C. (1976). Presence of neurospecific antigen NSA1 in fetal human astrocytes in long term culture *Brain Res.* 112:383-387.
- Maxwell, D.S y L. Kruger (1965). The fine structure of astrocytes in the cerebral cortex and their response to focal injury produced by heavy ionizing particles. *J. Cell Biol.*, 25: 141-157.
- Mayhew TM, Cruz Orive LM (1973). Stereological correction procedures for estimating true volume proportions from biased samples. *J Microscopy*, 99: 287-299.
- McCarthy AM, Elmendorf JS (2007). GLUT4's itinerary in health & disease. *Indian J Med Res*, 125: 373-388.
- Mckay JS, Targett MP, Jeffery ND (1999). Histological characterization of an ependymoma in the fourth ventricle of a cat. *J Comp Pathol*, 120 (1):105-113.
- Mendez MF, Zangeronimo MG, Rocha LG, Faria BG, Pereira BA, Fernandes CD, Chaves BR, Murgas LD, Sousa RV (2013). Effect of the addition of IGF-I and vitamin E to stored boar semen. *Animal*, 7(5):793-798.
- Miles RE (1972). Multi-dimensional perspectives on stereology. *J Microscopy*, 95: 181.
- Miller DB, O'callaghan JP (1995). The role of temperature, stress, and other factors in the neurotoxicity of the substituted amphetamines 3,4-methylene dioxymethamphetamine and fenfluramine *Mol Neurobiol.* Aug-Dec. 11(1-3). P 177-192.
- Mizutani M, Gerhardinger C, Lorenzi M (1998). Müller cell changes in human diabetic retinopathy. *Diabetes* 47: 445-449.
- Mokuno K, Kamholz J, Behrman T, Black C, Sessa M, Feinstein D, Lee V, Pleasure P (1989). Neuronal modulation of Schwann cell glial fibrillary acidic protein (GFAP). *J. Neurosci.* 23: 396-405.
- Montagnani M, Golovchenko I, Kim I, Koh GY, Goalstone ML, Mundhekar AN, Johansen M, Kucik DF, Quon MJ, Draznin B (2002). Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase enhances mitogenic actions of insulin in endothelial cells. *J Biol Chem*, 277:1794-1799.
- Montero M, Sánchez F, Juanes JA, Blanco E, Gonzáles R, Vázquez R, Carretero J (1990). Morphometric study of the ACTH-immunoreactive adenohypophyseal cells. *An Anat*, 36: 47-54.
- Morris DL, Cho KW, Zhou Y, Rui L (2009). SH2B1 enhances insulin sensitivity by both stimulating the insulin receptor and inhibiting tyrosine dephosphorylation of insulin receptor substrate proteins. *Diabetes*, 58(9):2039-2047.

- Mugnaini E, Walberg F (1964). Ultrastructure of neuroglia. *Ergeb. Anat. Entwickl. Gesch*, 37: 193-236.
- Muir ER, Rentería RC, Duong TQ (2012). Reduced ocular blood flow as an early indicator of diabetic retinopathy in a mouse model of diabetes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 53(10):6488-6494.
- Müller H (1851) Zur histologie der netzhaut. *Z Wiss Zool*, 3: 234-237.
- Myers MG Jr, White MF (2002). The molecular basis of insulin action. En: *Insulin signaling: from cultured cells to animal models*. Editor: Gruenberg G, Zick Y. Taylor and Francis, New York: 55-87.
- Nagata S (1997). Apoptosis and diseases. *Nihon Naika Gakkai Zasshi*, 86(9):1579-1583.
- Nakajima K, Kanamatsu T, Takezawa Y, Kohsaka S (2015). Up-regulation of glutamine synthesis in microglia activated with endotoxin. *Neurosci Lett*, 591:99-104.
- Nakamura M, Barber AJ, Antonetti DA, LaNoue KF, Robinson KA, Buse MG, Gardner TW (2001). Excessive hexosamines block the neuroprotective effect of insulin and induce apoptosis in retinal neurons. *J Biol Chem*, 276(47):43748–43755.
- Nakamura R, Emmanouel DS, Katz AI (1983). Insulin binding sites in various segments of the rabbit nephron. *J Clin Invest*, 72:388-392.
- Nakane PK, Moriuchi T, Koji T, Taniguchi Y, Izumi S, Hui L (1989). Proliferating cell nuclear antigen (PCNA/Cyclin): review and some new findings. *Acta Histochem*
- Newbold A, Martin BP, Cullinane C, Bots M (2014). Detection of apoptotic cells using immunohistochemistry. *Cold Spring Harb Protoc*, (11):1196-1201.
- Newman E (2001). Glia of the retina. *Retina* (ed. Ryan SJ): 89–103.
- Newman E, Reichenbach A (1996). The Müller cell: a functional element of the retina. *Trends Neurosci*: 307–312.
- Nicholson DW (1999). Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ*, 6(11):1028-1042.
- Nir I, Haque R, Iuvone PM (2000). Diurnal metabolism of dopamine in dystrophic retinas of homozygous and heterozygous retinal degeneration slow (rds) mice. *Brain Res*, 884:13-22.
- Nir I, Haque R, Iuvone PM (2000). Diurnal metabolism of dopamine in the mouse retina. *Brain Res*, 870:118-125.
- Nir I, Haque R, Iuvone PM (2001). Regulation of cAMP by light and dopamine receptors is dysfunctional in photoreceptors of dystrophic retinal degeneration slow (rds) mice. *Exp Eye Res*, 73(2):265-72.

- Nishimura C, Kuriyama K (1985). Alterations in the retinal dopaminergic neuronal system in rats with streptozotocin-induced diabetes. *J Neurochem*, 45(2):448-455
- Nishiyama T, Nishukawa S, Hiroshi, Tomita, Tamai M (2000). Muller cells in the preconditioned retinal ischemic injury rats. *Tohoku J Exp Med*, 191:221–232.
- Nissl F (1899). Über einige Beziehungen zwischen. Nervenzellenerkrankungen und gliosen Erscheinungen bei verschiedenen Psychosen. *Arch. Psychiatr.*, 32: 656-676.
- Nolan CJ, Prentki M (2008). The islet beta-cell: fuel responsive and vulnerable. *Trends Endocrinol Metab*, 19:285-291.
- Norenberg, MD, Martínez-Hernández A (1979). Fine structural localization of glutamine synthetase in astrocytes of rat brain. *Brain Res.*, 161: 303-310.
- Norton WT, Farooq M, Chin FC, Bottenstein JE (1988). Pure astrocyte cultures derived from cells isolated from mature brain. *Glia*, 1: 403-414.
- Obanda DN, Cefalu WT (2013). Modulation of cellular insulin signaling and PTP1B effects by lipid metabolites in skeletal muscle cells. *J Nutr Biochem*, 24(8):1529-1537.
- O'callaghan JP (1991a). The use of glial fibrillary acidic protein in first-tier assessments of neurotoxicity. *J. Amer. Coll. Toxicol.*, 10: 719-726.
- O'callaghan JP (1991b). Assessment of neurotoxicity: Use of glial fibrillary acidic protein as a biomarker. *Biomed. Environ. Sci.*, 4: 197-206.
- Ogden TE (1994) Glia of the retina. En: *Retina*. Vol 1. (Ryan, Ed.) 54-57. Mosby, St Louis.
- Okada M, Matsumura M, Ogino N, Honda Y (1990). Müller cells in detached human retina express glial fibrillary acidic protein and vimentin. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 228:467–474.
- Ola MS, Hosoya K, LaNoue KF (2011). Influence of insulin on glutamine synthetase in the Müller glial cells of retina. *Metab Brain Dis*, 26(3):195-202.
- Olivares Reyes JA., Arellano A (2008). Bases moleculares de las acciones de la insulina. *Rev*, 27: 9-18.
- Oliveira RB, Carvalho CPF, Polo CC, Dorighello GG, Boschero AC, Oliveira HCF, Collares-Buzato CB (2014). Impaired compensatory beta-cell function and growth in response to high-fat diet in LDL receptor knockout mice. *Int J Exp Pathol*, 95(4): 296–308.
- Onteniente B, Kimura H, Maeda T (1983). Comparative study of the glial fibrillary acidic protein in vertebrates by PAP immunohistochemistry. *J. Comp. Neurol.*, 215: 427-436.

- Osborn, M. (1983). Intermediate filaments as histological markers: An overview. *J. Invest. Dermatol*, 81:104-109.
- Palay, S.L. (1966). The role of neuroglia in the organization of the central nervous system. In: K. Rodahl and B. Issekutz Jr. (Editors), *Nerve as a tissue*. Hoeber. Med. Div. Harper and Row, New York, pp. 3-10.
- Pan M, Yang G, Cui X, Yang SN (2011). Subthreshold α_2 -adrenergic activation counteracts glucagon-like peptide-1 potentiation of glucose-stimulated insulin secretion. *Exp Diabetes Res*, 2011:604989.
- Park SH, Park JW, Park SJ, Kim KY, Chung JW, Chun MH, Oh SJ (2003). Apoptotic death of photoreceptors in the streptozotocin-induced diabetic rat retina. *Diabetologia*, 46:1260-1268.
- Park SS, Sigelman J, Gragoudas ES. (1998). *Duane's Clinical Ophthalmology*. Tasman y Jaeger Eds. Lippincott-Raven Pub Inc. Philadelphia.
- Patel AJ, Weir MD, Hunt A, Tahourdin CSM, Thomas DGT (1985). Distribution of glutamine synthetase and glial fibrillary acidic protein and correlation of glutamine synthetase with glutamate decarboxylase in different regions of the rat central nervous system. *Brain Res*; 331:1-9.
- Paz K, Zick Y (2002). Ser/Thr phosphorylation of insulin receptor signaling molecules and insulin resistance. En: *Insulin signaling: from cultured cells to animal models*. Editor: Gruenberg G, Zick Y. Taylor & Francis, New York: 259-280.
- Penfield W (1932). Neuroglia: normal and pathological. En: *Cytology and cellular pathology of the nervous system*. Vol 2. Penfield Ed: 421-479. Hoeber. New York.
- Pessin JE, Saltiel AR (2000). Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. *J clin Invest* 106: 165-169.
- Peters A, Vaughn JE (1967). Microtubules and filaments in the axons and astrocytes of early postnatal rat optic nerves. *J Cell Biol*, 32: 113-119.
- Petrusz P, Sar M, Ordronneau P, Dimeo P (1976). Specificity in immunocytochemical staining. *J Histochem Cytochem*, 24: 1110-1115.
- Pitschmann A, Zehl M, Atanasov AG, Dirsch VM, Heiss E, Glasl S (2014). Walnut leaf extract inhibits PTP1B and enhances glucose-uptake in vitro. *J Ethnopharmacol*, 152(3):599-602
- Pixley SKR, De Vellis J (1984). Transition between immature radial glia and mature astrocytes studied with a monoclonal antibody to vimentin *Developmental Brain Research* 15, 201-209.
- Politi LE, Rotstein NP, Salvador G, Giusto NM, Insua MF (2001). Insulin-like growth factor-I is a potential trophic factor for amacrine cells. *J Neurochem*, 76(4):1199-1211.

- Pow DV, Robinson SR (1994). Glutamate in some retinal neurons is derived solely from glia. *Neuroscience*, 60:355–366.
- Pruss RM, Mirsky R, Raff MC, Thorpe R, Dowding AJ, Anderton BH (1981). All classes of intermediate filaments share a common antigenic determinant defined by a monoclonal antibody. *Cell.*, 27:419-436.
- Pulido JS (2002). Anatomía funcional de la retina, la coroides y el vítreo. En: *Retina, coroides y vítreo. Los requisitos en oftalmología*: 10-17. Mosby. Madrid.
- Qi Y, Xu Z, Zhu Q, Thomas C, Kumar R, Feng H, Dostal DE, White MF, Baker KM, Guo S (2013). Myocardial Loss of IRS1 and IRS2 Causes Heart Failure and Is Controlled by p38 α MAPK During Insulin Resistance. *Diabetes*, 62(11): 3887–3900.
- Raff MC (1996). Size control: the regulation of cell numbers in animal development. *Cell*, 86(2):173-175.
- Raff MC, Fields KL, Hakomori SL, Mirsky R, Pruss RM, Winter J (1979). Cell-type specific markers for distinguishing and studying neurons and the major classes of glial cells in culture. *Brain Res*, 174:283-308.
- Raff MC, Miller RH, Noble M (1983). A glial progenitor cell that develops in vitro into an astrocyte or an oligodendrocyte, depending on culture medium. *Nature*. London, 303: 390-396.
- Ramírez JM, Ramírez AI, Salazar JJ, de Hoz R, Triviño A (2001). Changes of astrocytes in retinal ageing and age-related macular degeneration. *Exp Eye Res*, 73:601–615.
- Ramírez JM, Triviño A, Ramirez AI, Salazar JJ, Garcia-Sanchez J (1994). Immunohistochemical study of human retinal astroglía. *Vision research*; 34: 1935-1946.
- Ramírez JM, Triviño A, Ramírez AI, Salazar JJ, García-Sánchez J (1996). Structural specializations of human retinal glial cells. *Vision research*; 36: 2029-2036.
- Ramírez, A.I., J.J. Salazar, J.M. Ramírez y A.A. Triviño (1998). Morfología y distribución de la astroglía retiniana en la rata albina. *Arch. Soc. Esp. Oftalmol*, 73: 434-438.
- Ramón y Cajal S (1909,1911). *Histologie du systeme nerveux de l’homme et des vertebres*. Norbert Maloine, Paris.
- Ramon y Cajal S. (1913). Sobre un nuevo proceder de impregnación de la neuroglía y sus resultados en los centros nerviosos del hombre y animales. *Trab lab invest biol. Universidad de Madrid*, 11:219-237.
- Ramon y Cajal S. (1916). El proceder del oro sublimado para la coloración de la neuroglía. *Trab lab invest boil. Universidad de Madrid*, 14: 155-162.

- Reale, E. y Luciano, L. (1974). Introduction to freeze-fracture method in retinal research. *Albrecht von Graefes Arch. Klin. Exp. Ophthalmol*, 192: 73-87.
- Reinhardt CA, Schein CH (1995). Glutamine synthetase activity as a marker of toxicity in cultures of embryonic chick brain and retina cells. *Toxicol in vitro*, 9:369-374.
- Ren D, Sun J, Mao L, Ye H, Polonsky KS (2014). BH3-Only Molecule Bim Mediates β -Cell Death in IRS2 Deficiency. *Diabetes*, 63(10): 3378–3387.
- Riehle C, Wende AR, Zhu Y, Oliveira KJ, Pereira RO, Jaishy BP, Bevins J, Valdez S, Noh J, Kim BJ, Moreira AB, Weatherford ET, Manivel R, Rawlings TA, Rech M, White MF, Abel ED (2014). Insulin Receptor Substrates Are Essential for the Bioenergetic and Hypertrophic Response of the Heart to Exercise Training. *Mol Cell Biol*, 34(18): 3450–3460
- Riepe, R.E y M.D. Noremburg (1977). Müller cell localization of glutamine synthetase in rat retina. *Nature*, 268: 654-655.
- Rio Hortega, P. (1919). El tercer element de los centros nerviosos. *Bol. Soc. Españ. Biol.*, 9: 69-120.
- Rio Hortega, P. (1921a). Histogénesis y evolución normal: Exodo y distribución regional de la Microglía. *Arch. Neurobiol.*, 2: 212-255.
- Rio Hortega, P. (1921b). Estudios sobre la neuroglía. La glía de escasas radiaciones (oligodendroglía). *Bol. Real Soc. Españ. Hist. Nat.*, 21: 63-92.
- Rio Hortega, P. (1932). Microglía. In: *Cytology and cellular pathology of the Nervous System*, Vol. 2. W. Penfield, Ed. New York, Hoeber, pp. 483-534.
- Robertson, F. (1900). A microscopic demonstration of the normal and pathological histology of mesoglia cells. *J. Ment. Sci*, 46: 724.
- Roessmann U, Gambetti P (1986). Astrocytes in the developing human brain. An immunohistochemical study. *Acta Neuropathol*, 70(3-4):308-313.
- Rohr HP, Bartsch G, Oberholzer M, Reith A, Hollinger O (1978). Stereology. En: *Electron microscopy in human medicine. 1. Instrumentation and techniques*. Johannessen JV; Ed. McGraw-Hill International Book Company. London pp: 285-309.
- Roncero I, Alvarez E, Acosta C, Sanz C, Barrio P, Hurtado-Carneiro V, Burks D, Blázquez E (2013). Insulin-receptor substrate-2 (*irs-2*) is required for maintaining glucokinase and glucokinase regulatory protein expression in mouse liver. *PLoS One*.
- Roots BC (1981). Comparative studies on glial markers. *J Exp Biol*; 95: 167-180.
- Roselli CF (2007). Brain aromatase: roles in reproduction and neuroprotection. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 106:143–150.

- Rubio M, Carretero J, Sánchez F, Riesco JM, Vázquez RJ, Vázquez R (1992). Estradiol influences the LH response to met-enkephalin. *Acta Anat* 145: 382-386.
- Rubio M, Sánchez F, Carretero J, Riesco JM, Cabo L, Vázquez R (1994). Immunohistochemical-morphometric study of the LH-adenohypophyseal cells following chronic treatment with met-enkephalin. *Histol Histopathol*, 9: 221-226.
- Rueger DC, Huston JS, Dahl D, Bignami A (1979). Formation of 100 A filaments from purified glial fibrillary acidic protein in vitro. *J. Mol. Biol.*, 135: 53-68.
- Ruiz OS, Qiu YY, Cardoso LR, Arruda JA (1998). Regulation of the renal Na-HCO₃ cotransporter: IX. Modulation by insulin, epidermal growth factor and carbachol. *Regul Pept*, 77:155-161.
- Rungger-Brändle E, Dosso AA, Leuenberger PM (2000). Glial reactivity, an early feature of diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 41(7):1971-1980.
- Sadagurski M, Cheng Z, Rozzo A, Palazzolo I, Kelley GR, Dong X, Krainc D, White MF (2011). IRS2 increases mitochondrial dysfunction and oxidative stress in a mouse model of Huntington disease. *J Clin Invest*, 121(10): 4070–4081.
- Saltiel AR, Kahn CR (2001). Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414: 799-806.
- Salvesen GS, Dixit VM (1999). Caspase activation: the induced-proximity model. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(20):10964–10967.
- Sánchez F, Carretero J, Rubio M, Riesco JM, Vázquez R (1993). Morphometric analysis of the hypoactivity of FSH-immunoreactive cells in estrogen-primed male rats. *Acta Histochem*, 94: 125-130.
- Sánchez F, Hernández G, Rubio M, Santos M, Carretero J, Riesco J, Juanes J, Vázquez R (1995). Adrenalectomy increases the glial fibrillary acidic immunoreactive-elements in the ventricular ependyma and adjacent neuropil of the rat third ventricle. *Acta Histochem*, 97(2):141-149.
- Santalo LA (1936). *Geometría integral* 15. *Abhandlungen* 12.
- Santos M (1993). Análisis inmunocitoquímico-morfométrico de la repercusión de la adrenalectomía sobre diferentes marcadores gliales: vimentina, desmina, glutamina-sintetasa y proteína S-100. Tesis doctoral. Universidad de Salamanca.
- Sarax H, Lemasson C, Offret H, Renard G (1985). La retina. En: *Anatomía e histología del ojo*: 175-202. Masson. Barcelona.
- Sarthy PV (1982). The uptake of ³H-gamma-aminobutyric acid by isolated glia (Müller) cells from the mouse retina. *J. Neurosci. Methods*, 5: 77-82.

- Sarthy PV, Fu M, Huang J (1991). Developmental expression of the glial fibrillary acidic protein gene in the mouse retina cell. *Mol. Neurobiol.* 11: 623-634.
- Savy C, Martin-Martinelli E, Simon A, Duyckaerts C, Verney C, Adelbrecht C, Raisman-Vozari R, Nguyen-Legros J (1999). Altered development of dopaminergic cells in the retina of weaver mice. *J Comp Neurol*, 412(4):656-68.
- Schabet M, Martos J, Buchholz R, Pietsch T (1997). Animal model of human medulloblastoma: clinical, magnetic resonance imaging, and histopathological findings after intra-cisternal injection of nude rats. *Med Pediatr Oncol*; 29 (2):92-97.
- Schachner M, Hedley-Whyte ET, Hsu DW, Schoonmaker G, Bignami A (1977). Ultrastructural localization of glial fibrillary acidic protein in mouse cerebellum by immunoperoxidase labeling. *J. Cell. Biol.*, 75:67-73.
- Schiffer D, Giordana MT, Cavalla P, Vigliani MC, Atanasio A (1993). Immunohistochemistry of glial reaction after injury in the rat: double stainings and markers of cell proliferation. *Int. J. Dvl. Neuroscience*, 11: 269-280.
- Schiffer D, Giordana MT, Migheli A, Giaccone G, Pezzotta S, Mauro A (1986). Glial fibrillary acidic protein and vimentin in the experimental glial reaction of the brain. *Brain Res.*, 347:110-118.
- Schnitzer J, Franke WW, Schachner M (1981). Immunocytochemical demonstration of vimentin in astrocytes and ependymal cells of developing and adult mouse nervous system. *J. Cell. Biol.*, 90: 435-447.
- Schnitzer J, Scherer J (1990). Microglial cell responses in the rabbit retina following transection of the optic nerve. *J. Comp. Neurol*, 302: 779-791.
- Schubert M, Brazil DP, Burks DJ, Kushner JA, Ye J, Flint CL, Farhang-Fallah J, Dikkes P, Warot XM, Rio C, Corfas G, White MF (2003). Insulin receptor substrate-2 deficiency impairs brain growth and promotes tau phosphorylation. *J Neurosci*, 23:7084-7092.
- Schwartz BR, Pinkus G, Bacus S, Toder M, Weinberg DS (1989). Cell proliferation in non-Hodgkin's lymphomas. Digital image analysis of KI 67 antibody staining. *Am J Pathol*, 134: 327-336.
- Schwartz EA (1986). Synaptic transmission in amphibian retinae during conditions unfavorable for calcium entry into presynaptic terminals. *J Physiol*, 376: 411-428.
- Schwartz JP, Wilson DJ (1992). Preparation and Characterization of Type 1 Astrocytes Cultured From Adult Rat Cortex, Cerebellum, and Striatum. *Glia* 5: 75-80.

- Seiler MJ, Aramat RB (1994). Photoreceptor and glial markers in human embryonic retina and in human embryonic retinal transplants to rat retina. *Development Brain research*; 80: 81-95.
- Selkoe DJ, Salazar FJ, Abraham C, Kosik KS (1982). Huntington's disease: changes in striatal proteins reflect astrocytic gliosis. *Brain Res.*, 245:117-125.
- Sesti G (2006). Pathophysiology of insulin resistance. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 20:665-679.
- Shaw G, Osborn M, Weber K (1981). An immunofluorescence microscopical study of the neurofilament triplet proteins, vimentin and glial acidic protein within the adult rat brain. *Eu J Cell Biol*; 26: 68-82.
- Shen F, Chen B, Danias J, Lee KC, Lee H, Su Y, Podos SM, Mittag TW (2004). Glutamate-induced glutamine synthetase expression in retinal Muller cells after short-term ocular hypertension in the rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 45(9):3107-3112.
- Sheperd NA, Richman PI, England J (1988). KI 67 derived proliferative activity in colorectal adenocarcinoma with prognostic correlations. *J Pathol*, 155: 1213-1219.
- Shi Y (2004). Caspase activation: revisiting the induced proximity model. *Cell*, 117(7):855-858.
- Shirao Y, Kawasaki K (1998). Electrical responses from diabetic retina. *Prog Retin Eye Res*, 17(1):59-76.
- Snigdha S, Smith ED, Prieto GA, Cotman CW (2012). Caspase-3 activation as a bifurcation point between plasticity and cell death: 14-24.
- Sorby H, (1856). On slaty cleavage as exhibited in the Devonian limestones of Devonshire. *Phil Mag*, 11: 20.
- Sperling G (1989). Three stages and two systems of visual processing. *Spat Vis*, 4(2-3):183-207.
- Steiner DF, Oyer PE (1967). The biosynthesis of insulin and a probable precursor of insulin by a human islet cell adenoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 57(2):473-480.
- Steinert PM, Jones JC, Goldman RD (1984). Intermediate filaments. *J. Cell Biol.*, 99: 22-27.
- Steinle JJ, Kern TS, Thomas SA, McFadyen-Ketchum LS, Smith CP (2009). Increased basement membrane thickness, pericyte ghosts, and loss of retinal thickness and cells in dopamine beta hydroxylase knockout mice. *Exp Eye Res*, 88(6):1014-1019.
- Sternberger L (1979). *Immunocytochemistry*. Wiley J, Sons, Eds. New York 2nd Ed.

- Stöhr O, Hahn J, Moll L, Leiser U, Freude S, Bernard C, Schilbach K, Markl A, Udelhoven M, Krone W, Schubert M (2011). Insulin receptor substrate-1 and -2 resistance to glucose-induced caspase-3 activation in human neuroblastoma cells. *Biochimica et biophysica acta*: 573-580.
- Strasser A, Harris AW, Bath ML, Cory S (1990). Novel primitive lymphoid tumours induced in transgenic mice by cooperation between myc and bcl-2. *Nature*, 348(6299):331-333.
- Strasser A, Harris AW, Cory S (1991). Bcl-2 transgene inhibits T cell death and perturbs thymic self-censorship. *Cell*, 67(5):889-899.
- Suárez I, Bodega G, Rubio M, Fernández B (1992). Sexual dimorphism in the hamster cerebellum demonstrated by glial fibrillary acidic protein and vimentin immunoreactivity. *Glia*, 5:10-16.
- Sulston JE, Horvitz HR (1977). Post-embryonic cell lineages of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.*, 56: 110–156.
- Suzuki M, Iwasaki Y, Yamamoto T, Konno H, Yoshimoto T, Suzuki J (1984). Disintegration of orthogonal arrays in perivascular astrocytic process as an early event in acute global ischemia. *Brain Res.*, 300: 141-145.
- Takamiya Y, Kohsaka S, Toya S, Otani M, Tsukada (1988). Immunohistochemical studies on the proliferation of reactive astrocytes and the expression of cytoskeletal proteins following brain injury in rats. *Devl. Brain Res.*, 38: 201-210.
- Takatsuka K, Hatakeyama J, Bessho Y, Kageyama R (2004). Roles of the bHLH gene *Hes1* in retinal morphogenesis. *Brain Res*, 1004(1-2):148-155.
- Taniguchi CM, Emanuelli B, Kahn CR (2006). Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7:85-96.
- Tardy M, Fages C, Riol H, Leprince G, Rataboul P, Charriere-Bertrand C, Nunez J. (1992). Developmental expression of GFAP mRNA in the central nervous system and culture astrocytes. *J. Neurochem.* 52:162-169.
- Thompson CB (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*, 267(5203):1456-1462.
- Thornberry NA1, Lazebnik Y (1998). Caspases: enemies within. *Science*, 281(5381):1312-1316.
- Topalli I, Etgen AM (2004). Insulin-like growth factor-I receptor and estrogen receptor crosstalk mediates hormone-induced neurite outgrowth in PC12 cells. *Brain Res*, 1030(1):116-124.
- Traub P, Plagens U, Kuhn S, Perides G (1987). Function of intermediate filaments. A novel hypothesis. *Fortschritte der Zoologie (Ed e wolfarth-bottermann)* 34: 275-287.

- Tsuchiya K, Accili D (2013). Liver Sinusoidal Endothelial Cells Link Hyperinsulinemia to Hepatic Insulin Resistance. *Diabetes*, 62(5): 1478–1489.
- Turner DL, Cepko CL (1987). A common progenitor for neurons and glia persists in rat retina late in development. *Nature*; 328: 131-136.
- Ullrich A, Schlessinger J (1990). Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell*, 61(2):203-212.
- Underwood EE (1970). *Quantitative sterology*. Addison Wesley, Massachusetts.
- Uyeda CT, Eng LF, Bignami A (1972). Immunologica study of the glial fibrillary acidic protein. *Brain Re.*, 37:81-89.
- Valverde AM, Miranda S, García-Ramírez M, González-Rodríguez Á, Hernández C, Simó R (2013). Proapoptotic and survival signaling in the neuroretina at early stages of diabetic retinopathy. *Mol Vis*, 19:47-53.
- Van Dijk HW, Verbraak FD, Kok PH, Stehouwer M, Garvin MK, Sonka M, DeVries JH, Schlingemann RO, Abràmoff MD (2012). Early neurodegeneration in the retina of type 2 diabetic patients. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 53(6):2715-2719.
- Van Dijk HW, Verbraak FD, Stehouwer M, Kok PH, Garvin MK, Sonka M, DeVries JH, Schlingemann RO, Abràmoff MD (2011). Association of visual function and ganglion cell layer thickness in patients with diabetes mellitus type 1 and no or minimal diabetic retinopathy. *Vision Res*, 51(2):224-228.
- Varea O, Arevalo MA, Garrido JJ, Garcia-Segura LM, Wandosell F, Mendez P (2010). Interaction of estrogen receptors with insulin-like growth factor-I and Wnt signaling in the nervous system. *Steroids*, 75(8-9):565-569.
- Vaughan DG, Asbury T, Riordan-Eva P (1997). *Oftalmología general. El manual moderno*. S A. Mexico.
- Vaughn, J.E. y A. Peters (1967). Electron microscopy of the early postnatal development of fibrous astrocytes. *Am. J. Anat.*, 121: 131-152.
- Vaughn, J.E. y A. Peters (1971). The morphology and development of neuroglial cells. In: *Cellular Aspects of Neural growth and differentiation*. D. C. Pease. Ed. Berkely University of California Press. Pp. 103-134.
- Vaux DL, Cory S, Adams JM (1988). Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature*, 335(6189):440-442.
- Virkamaki A, Ueki K, Kahn CR (1999). Protein-protein interaction in insulin signalling and the molecular mechanism of insulin resistance. *J Clin Invest* 103:931-943.
- Vogler S, Pannicke T, Hollborn M, Grosche A, Busch S, Hoffmann S, Wiedemann P, Reichenbach A, Hammes HP, Bringmann A (2013). Müller cell reactivity

- in response to photoreceptor degeneration in rats with defective polycystin-2. *PLoS One*. 2013
- Vogt C (1842). *Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte der Geburtshelferkroete (Alytes obstetricians)*. Jent & Gassman, Solothurn, Switzerland).
- Voigt T (1989). Development of glial cells in the cerebral wall of ferrets: direct tracing of their transformation from radial glia into astrocytes. *J. Comp. Neurol.*, 289: 74-88.
- Vugler AA, Redgrave P, Semo M, Lawrence J, Greenwood J, Coffey PJ (2007). Dopamine neurones form a discrete plexus with melanopsin cells in normal and degenerating retina. *Exp Neurol*, 205(1):26-35.
- Wang JW, Chen SD, Zhang XL, Jonas JB (2015). Retinal Microglia in Glaucoma. *J Glaucoma*.
- Wang X, Tay SS-W, Ng Y-K (2000). An immunohistochemical study of neuronal and glial cell reactions in retinæ of rats with experimental glaucoma. *Exp Brain Res*, 132:476–484.
- Watanabe-Fukunaga R, Brannan CI, Copeland NG, Jenkins NA, Nagata S (1992). Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature*, 356(6367):314-317.
- Weibel ER (1969). Stereological principles for morphometric in electron microscopic cytology. *Int Rev Cytol*, 26: 235-302.
- Weibel ER, Bolander RP (1973). Stereological techniques for electron microscopy. En: *Principle and techniques of electron microscopy* (Hyatt M.A. Ed.). Van Nostran-Reinhold. New York pp: 239-296.
- Weibel ER, Kistler GS, Tondury G (1966). A stereologic electron microscope study of "tubular myelin figures" in alveolar fluids of rat lungs. *Z Zellforsch Mikrosk Anat*, 69: 418-427.
- Weidman TA, Kuwabara T (1968). Postnatal development of the rat retina. *Arch Ophthalmol*; 79:470-484.
- White MF (2014). IRS2 integrates insulin/IGF1 signalling with metabolism, neurodegeneration and longevity. *Diabetes Obes Metab*, 16 Suppl 1:4-15.
- White MF, Kahn CR (1994). The insulin signaling system. *J Biol Chem*, 269:1-4.
- Windle WF (1958). *Biology of neuroglia*. Charles C. Thomas publisher: 340. Springfield.
- Withers DJ, Gutierrez JS, Towery H, Burks DJ, Ren JM, Previs S, Zhang Y, Bernal D, Pons S, Shulman GI, Bonner-Weir S, White MF (1998). Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature* 391:900-904.
- Wolter JR (1959) Glia of the human retina. *Am J Ophthalmol*, 48:370.

- Wuerker, R.B. (1970). Neurofilaments and glial filaments. *Tiss. Cell*, 2:1-10.
- Yamada T, Kawamata T, Walker DG, Mcgeer PL (1992). Vimentin immunoreactivity in normal and pathological human brain tissue. *Acta Neuropathol*, 84: 157-162.
- Yang JH, Guo Z, Zhang T, Meng XX, Sun T, Wu J (2013). STZ treatment induced apoptosis of retinal cells and effect of up-regulation of calcitonin gene related peptide in rats. *J Diabetes Complications*, 27(6):531-537.
- Yang L, Sun HL, Wu LM, Guo XJ, Dou HL, Tso MO, Zhao L, Li SM (2009). Baicalein reduces inflammatory process in a rodent model of diabetic retinopathy. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*; 50-5: 2319–2327.
- Yen SH, Fields KL (1981). Antibodies to neurofilament, glial filament and fibroblast intermediate filament proteins bind to different cell types of the nervous system. *J. Cell. Biol.*, 88: 115-126.
- Yenush L, White MF (1997). The IRS-signalling system during insulin and cytokine action. *Bioessays*, 19: 491-500.
- Yi X, Schubert M, Peachey NS, Suzuma K, Burks DJ, Kushner JA, Suzuma I, Cahill C, Flint CL, Dow MA, Leshan RL, King GL, White MF (2005). Insulin receptor substrate 2 is essential for maturation and survival of photoreceptor cells. *J Neurosci*, 25:1240-1248.1881-1897.
- Young RW, Bok D (1969). Participation of the retinal pigment epithelium in the rod outer segment renewal process. *J Cell Biol*, 42(2):392-403.
- Youngren J (2007). Regulation of insulin receptor function. *Cellular and molecular life sciences*. 64:873-891.
- Zhang L, Zhao W, Li B, Alkon DL, Barker JL, Chang YH, Wu M, Rubino DRW (2000). TNF- α induced over-expression of GFAP is associated with MAPKs. *Neuroreport*. 7; 11(2): 409-412.
- Zhang M, Riedel H (2009). Insulin receptor kinase-independent signaling via tyrosine phosphorylation of phosphatase PHLPP1. *J Cell Biochem*, 107(1):65-75
- Zheng Y, Yamada H, Sakamoto K, Horita S, Kunimi M, Endo Y, Li Y, Tobe K, Terauchi Y, Kadowaki T, Seki G, Fujita T (2005). Roles of insulin receptor substrates in insulin-induced stimulation of renal proximal bicarbonate absorption. *J Am Soc Nephrol*, 16:2288-2295.
- Zou CY, Gong Y, Liang J (2014). Metabolic signaling of insulin secretion by pancreatic β -cell and its derangement in type 2 diabetes. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 18(15):2215-2227.
- Zuo ZF, Zhang Q, Liu XZ (2013). Protective effects of curcumin on retinal Müller cell in early diabetic rats. *Int J Ophthalmol*, 6:422-424.