

DEPARTAMENTO DE MEDICINA PREVENTIVA Y SALUD
PÚBLICA

APLICACIÓN DE MODELOS GENÉTICAMENTE
MANIPULADOS “KNOCK-OUT” EN NEURO-
OFTALMOLOGÍA

ENRIQUE LÓPEZ SÁNCHEZ

UNIVERSITAT DE VALENCIA
Servei de Publicacions
2005

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 26 de Novembre de 2004 davant un tribunal format per:

- D. Manuel Vidal Sanz
- D^a. María Paz Villegas Pérez
- D^a. Elena Vecino Cordero
- D. José J. González Arraez
- D^a. Carmen Saiz Sánchez

Va ser dirigida per:

D. José Luis Menezo Rozalen

©Copyright: Servei de Publicacions
Enrique López Sánchez

Depòsit legal:

I.S.B.N.:84-370-6128-8

Edita: Universitat de València
Servei de Publicacions
C/ Artes Gráficas, 13 bajo
46010 València
Spain
Telèfon: 963864115

Universidad de Valencia.
Facultad de Medicina

Aplicación de modelos genéticamente
manipulados (knock-out) en Neuro-
Oftalmología.



Trabajo de Investigación que presenta
el Licenciado en Medicina y Cirugía
Don Enrique V. López Sánchez
para optar al grado de Doctor en
Medicina y Cirugía Valencia 2004.

Dedico este trabajo a mi abuela
Brígida (q.e.p.d) y a mi hijo
Quique, quien comienza ahora su
vida.

A la Dra. Ester Francés, mi mujer, médico oftalmólogo, compañera en la vida y amiga. Juntos descubrimos el mundo de la oftalmología, de las guardias, las primeras intervenciones...y hoy seguimos juntos ...los tres. Gracias por tu ayuda en TODO.

A la Dra. Sánchez Benavent, mi madre, médico oftalmólogo. Gracias a ti elegí la oftalmología como especialidad y hoy seguimos compartiendo las experiencias que ella nos brinda.

Al Dr. López Bayo, mi padre, médico estomatólogo. Quien en años más difíciles consiguió abrirse camino en la medicina y hacer a los que vinimos detrás que todo fuera más fácil.

Al Dr. Enrique Sánchez Vicent, mi abuelo, de quien a pesar de no conocer en vida, siempre admiré la sacrificada profesión de médico rural que ejerció en tiempos ya lejanos.

A las tías y a mi hermana.

AGRADECIMIENTOS.

A mis directores de Tesis:

- Al **Prof. Menezo**, Catedrático de Oftalmología y Jefe del Servicio del Hospital "La Fe", donde me formé como oftalmólogo. Por haber confiado en mí a la hora de trabajar en este tema.
- A la **Dra. Pinazo**, motor de esta Tesis, por haberme iniciado y estimulado en el campo de la investigación básica en oftalmología.
- Al **Dr. Chaqués**, por ayudarme en el día a día de nuestra especialidad.
- Al **Dr. Marín Montiel**, quien además ha sido mi maestro en el complejo campo del glaucoma.

A los miembros del Servicio de Oftalmología del Hospital "La Fe" donde pasé cuatro de los mejores años de mi vida: A mi suegro y amigo, el Dr. Juan Francés, al Dr. Harto con quien sigo compartiendo buenos momentos, al Dr. Martínez-Costa, Dr. Riquelme, Dr. España, Dr. Aviñó, Dra. Navea, Dr. Vila, Dra. Illueca, Dr. Ferrer, Dr. Taboada, Dr. Cisneros, Dra. Serra, Dra. Hurtado, Dr. Gómez y a la Dra. Falomir. A todos mis compañeros de residencia, muy especialmente al Dr. Ramos y a los Dres. Mondéjar, Risueño y Tovar, quienes se apiadaron de mí en los primeros momentos de desconcierto durante la residencia.

A los miembros del departamento de Medicina Preventiva de la Facultad de Medicina de Valencia, especialmente a la Dra. Saiz Sánchez, quien en todo momento me ha facilitado su ayuda y a la que siempre estaré agradecido.

A los miembros del servicio de oftalmología del Hospital Arnau: al Dr. Chaqués, Dra. Sánchez, Dr. Marín, Dr. Duch, Dra. Arroyo, Dra. Fdez. de Córdoba y al Dr. Pérez, con quienes comparto los avatares diarios de nuestra profesión así como las dificultades del sistema...

Al personal de enfermería del Hospital la Fe y Arnau.

A los miembros de la Unidad de Investigación "Santiago Grisolia", especialmente a Vicente Zanón, por su ayuda.

A los investigadores del departamento de Biología Vasculare del Instituto de Investigaciones Biomédicas, al Dr. V. Andrés, al Dr. A. Díez y a Silvia Sanz. Sin ellos esta Tesis no se hubiera podido realizar.

A la Dra. Carmen Muñoz y a Amparo Soto, gracias a ellas debo la gran calidad de la iconografía presentada en este trabajo.

A los ratones, seres vivos que se han sacrificado en pro de la investigación.

Índice.

**Aplicación de modelos
genéticamente manipulados
(knock-out) en Neuro-
Oftalmología.**

OBJETIVOS

OBJETIVOS	3
------------------	----------

INTRODUCCIÓN

¿Qué es un ratón <i>Knockout</i> ?	9
Construcción de ratones <i>Knockout</i>	9
Estado actual de la tecnología <i>Knockout</i>	14
Modelos <i>Knockout</i> en neuro-oftalmología	17

EL MODELO ApoE **KNOCKOUT** 23

Lipoproteínas y apolipoproteínas	25
Función de las lipoproteínas y apolipoproteínas	
Apolipoproteína E	27
-Acción de la Apolipoproteína E sobre el sistema nervioso periférico y central	29
-Perfil lipídico y lipoproteico de los ratones ApoE <i>Knockout</i>	31
-Homocisteína plasmática y niveles de glucosa	31
-Capacidad antioxidante	31
-Esperanza de vida	32
-Enfermedad aórtica y coronaria	32
-Expresión y síntesis local de la ApoE en la retina	34
-ApoE y desprendimiento de retina	36
-ApoE y glaucoma	36
-ApoE y drusas	37
-ApoE y DMAE	37
La retina de los ratones APOE <i>Knockout</i>	39
-Estudio de la membrana de Bruch	41
El nervio óptico en los ratones ApoE <i>Knockout</i>	41

EL MODELO P27^{kip1} **KNOCKOUT** 43

El ciclo celular	45
-Factores que actúan regulando el ciclo celular	45
La proteína del retinoblastoma	46
El gen P27 ^{kip1}	47
-Regulación de señales fisiológicas	49
-Interacción de P27 ^{kip1} con determinadas oncoproteínas	50
-Función de P27 ^{kip1} en la Apoptosis	51
Los ratones P27 ^{kip1} <i>Knockout</i>	52
-Fenotipo de los ratones P27 ^{kip1} <i>Knockout</i>	52
-Morfología retiniana de los ratones P27 ^{kip1} <i>Knockout</i>	53

EL MODELO PTEN KNOCKOUT	55
Introducción	55
Una fosfatasa “perezosa”	58
Apoptosis y control del ciclo celular	59
Relación entre PTEN y P27 ^{kip1}	60
PTEN ¿Detención del ciclo celular o apoptosis?	61
Ratones PTEN <i>Knockout</i> -/-	62
Ratones PTEN <i>Knockout</i> +/-	62
Oftalmología y PTEN. Desarrollo del ojo en un modelo experimental de <i>Drosophila</i>	63
Síndromes humanos asociados a la alteración del gen PTEN	64
- <i>Síndrome de Cowden</i>	64
- <i>Síndrome de Bannayan</i>	635
- <i>Enfermedad de Lhermitte-Duclos</i> .	65

MATERIAL Y MÉTODOS

Material y métodos	69
Animales de experimentación	69
Obtención de las muestras	77
Procesamiento de los globos oculares para microscopía óptica y electrónica	78
Procesamiento de los globos oculares para inmunocitoquímica	80

ESTUDIO MORFOMÉTRICO 83

Cálculo del área axonal	85
Cálculo de las superficies de los nervios ópticos	89
Cálculo del índice de mielinización	92
Cálculo del número de fibras totales por nervio óptico	95
Cálculo de grosores retinianos por capas y globales	96
Recuento de núcleos celulares retinianos	100
Estudio morfométrico, mediante microscopía electrónica, de la retina	102

ESTUDIO MORFOLÓGICO 107

Estudio morfológico de los nervios ópticos y las retinas	109
--	-----

INMUNOCITOQUÍMICA 111

WESTERN-BLOT (SDS PAGEL) 117

Determinación de la concentración proteica	119
Protocolo Western-blot “invitrogen”	120
Protocolo de inmunoblotting	121

TEST DE ESCAPE 125

ANÁLISIS ESTADÍSTICO	131
-----------------------------	------------

RESULTADOS

PESO Y NIVELES LIPÍDICOS SÉRICOS DE LOS ANIMALES	137
---	------------

Resultado del cálculo del área axonal	143
Resultado del cálculo de las superficies de los nervios ópticos	156
Resultado del cálculo del índice de mielinización	158
Resultado del cálculo del número de fibras totales por nervio óptico	170

Resultado del cálculo de grosores retinianos por capas y globales	172
--	-----

ESTUDIO MORFOLÓGICO	193
----------------------------	------------

Resultado del estudio morfológico de los nervios ópticos	195
---	-----

-Estructura de los nervios ópticos de los ratones del grupo Control	195
--	-----

-Alteraciones morfológicas halladas en la vaina de mielina de los axones de los nervios ópticos	205
---	-----

-Alteraciones morfológicas halladas en el interior de los axoplasmas	211
--	-----

-Alteraciones morfológicas halladas en las células macrogliales	214
---	-----

Resultado del estudio morfológico de las retinas	217
--	-----

-Las retinas de los ratones control	217
-------------------------------------	-----

-Las retinas de los ratones de los grupos ApoE y ApoE+D Knockout	225
---	-----

-Las retinas de los ratones del grupo PTEN Knockout	228
--	-----

-Las retinas de los ratones Knockout P27	229
---	-----

RESULTADOS DE LA INMUNOCITOQUÍMICA	235
---	------------

RESULTADOS DEL WESTERN-BLOT (SDS PAGEL)	247
--	------------

RESULTADOS DEL TEST DE ESCAPE	253
--	------------

DISCUSIÓN

1. El grupo ApoE Knockout	266
---------------------------	-----

-Los nervios ópticos de los ratones <i>ApoE Knockout</i>	267
- Las retinas de los ratones <i>ApoE Knockout</i>	271
2. El grupo <i>P27^{kip1} Knockout</i>	277
-Los nervios ópticos de los ratones <i>P27^{kip1} Knockout</i>	277
-Las retinas de los ratones <i>P27^{kip1} Knockout</i>	282
3. El grupo PTEN	287
Los nervios ópticos y las retinas de ratones <i>PTEN Knockout</i>	288

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES	295
---------------------	------------

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA	299
---------------------	------------

ABREVIATURAS

- DAME (Degeneración macular asociada a la edad)
- EPR (Epitelio pigmentario de la retina)
- GFAP (Proteína fibrilar ácida de la glia)
- IM (Índice de mielinización)
- MB ((membrana basal)
- ME (Microscopía óptica)
- MO (Microscopía electrónica)
- NO (nervio óptico)
- MBP (Proteína básica de la mielina)
- PRB (Proteína de retinoblastoma)
- RB (Retinoblastoma)
- SNC (Sistema nervioso central)
- SNP (Sistema nervioso periférico)
- VM (Vacuolas membranosas)
- VNM (Vacuolas no membranosas)

Objetivos

El desarrollo de las actuales técnicas de ingeniería genética nos ha posibilitado trabajar con modelos experimentales *Knockout*, animales de experimentación a los que alteramos su genoma para que no expresen un determinado gen. Estudiando las alteraciones que se han producido en ellos, podremos atribuirles a la no expresión de ese gen, y por tanto podremos deducir cuál es su función.

Las posibilidades que brinda la utilización de estos modelos, aún con sus limitaciones, son tan numerosas como la cantidad de genes y la función que realizan sobre cada uno de los órganos de un ser vivo.

Para el desarrollo de este proyecto de tesis doctoral, hemos utilizado tres modelos experimentales, con el fin de analizar las características de la retina y nervio óptico en relación a sus peculiaridades genómicas:

1. Ratones ApoE *Knockout*: La Apolipoproteína E, cuya función ha estado siempre ligada al metabolismo lipídico, se muestra hoy como una importante proteína ligada a los procesos de mantenimiento y reparación neural. Dado que estos animales presentan cierto grado de aterosclerosis, hemos utilizado además, animales ApoE *Knockout* alimentados con dietas hipercolesterolemiantes. Esto nos ha permitido, por un lado estudiar la repercusión de la hiperlipemia en el aparato visual y por otro lado intentar distinguir hasta qué punto esas alteraciones son debidas a la hiperlipemia y cuáles a la ausencia de la ApoE. Existen trabajos recientes centrados en las retinas de estos animales, pero las repercusiones sobre el nervio óptico aún están por estudiar.
2. Ratones p27^{kip1} *Knockout*: La proteína P27 es un factor inhibidor del complejo "ciclina-quinasa dependiente de ciclina", encargado de la fosforilación de la proteína del retinoblastoma, evento crucial para el desarrollo del ciclo de las células eucariotas. Los animales *Knockout* muestran una mayor tendencia a la proliferación celular que se refleja en un aumento de su tamaño y mayor tendencia al desarrollo de ciertos tipos de tumores. El conocimiento de las características oftalmológicas de este modelo se limita a la descripción de un

tipo de distrofia retiniana. Las características de sus nervios ópticos están todavía por analizar.

3. Ratones PTEN *Knockout*: PTEN es un gen encargado del control de la proliferación celular, la apoptosis y de alguna forma controla también la actuación de p27^{kip1}. Los ratones estudiados son heterocigotos Pten -/+ ya que la forma homocigota no es viable. Los ratones *Knockout* presentan un mayor tamaño y tendencia a padecer tumores malignos. En el campo de la oftalmología únicamente se ha estudiado la influencia de este gen sobre un modelo muy elemental de mosca *Drosophila*, valorando el desarrollo del globo ocular.

LOS OBJETIVOS DE ESTE PROYECTO DE TESIS DOCTORAL SON:

1- La descripción y caracterización tanto morfométrica como morfológica de estos modelos genéticamente manipulados. Para ello hemos utilizado:

- Técnicas de microscopía óptica y electrónica con el procesamiento y digitalización de las imágenes obtenidas.
- Estudio inmunocitoquímico utilizando los anticuerpos frente a la proteína ácida fibrilar de la glía (GFAP) y proteína básica de la mielina (MBP). Esta técnica nos ha permitido estudiar la influencia de estos genes sobre las proteínas citadas, que son componentes fundamentales de los nervios ópticos y retina.
- Confirmación de los resultados obtenidos mediante las técnicas

inmunohistoquímicas, utilizando técnicas de *Western-blot* e *immunoblotting*.

2- El estudio de la influencia de las alteraciones descritas a lo largo de este trabajo, sobre la capacidad visual de los animales genéticamente manipulados. Para ello hemos utilizado una modificación del "test de escape" de Morris.

Introducción.

¿QUÉ ES UN RATÓN *KNOCKOUT*?

Hablamos de ratones *Knockout* refiriéndonos a ratones que han sido manipulados genéticamente mediante la técnica del DNA recombinante de tal manera que ha sido suprimida la función de un gen concreto (que utilizamos para estudio). Con esto producimos una alteración genética recesiva. Gracias a estos ratones podemos estudiar cuál es la función de un gen en condiciones normales, ya que en los ratones *Knockout* ese gen pierde su función y produce un fenotipo distinto en el animal. La técnica de producción de *Knockout* es compleja y resulta de una combinación de la tecnología del DNA recombinante, de cultivos celulares y de manipulaciones de embriones.

Nos referimos a animales "transgénicos" cuando en ellos integramos un nuevo gen en el genoma de un ovocito fecundado, sin alterar los propios genes del animal. Conseguimos así una mutación que de alguna manera produce una "ganancia" funcional, produciendo alteraciones fenotípicas o incluso enfermedades, que se manifiestan cuando se afecta incluso uno solo de los dos alelos.

La capacidad de anular o alterar con precisión uno entre los miles de genes del cuerpo y transmitir esta mutación a los descendientes parecía ciencia ficción tan solo hace unos años. Distintos avances científicos independientes unos de otros, culminaron en la capacidad de alterar un solo gen de la cadena completa del DNA del ratón.

CONSTRUCCIÓN DE RATONES *KNOCKOUT*.

Existen diversos protocolos de fácil acceso, incluso vía Internet, donde quedan detallados todos los pasos a seguir para producir la mutación. En resumen, el proceso podría sintetizarse en los siguientes pasos:

1-. *Aislamiento del gen de interés:* Consiste en el aislamiento del gen y secuencias aledañas de un banco de genes de células embrionarias "madre" o de la cepa que le dio origen.

2-. *Construcción de los vectores para "gene targeting":* La misión principal del procedimiento "*Knockout*" es reemplazar un gen específico por otro inactivado. Con el fin de facilitar la sustitución e integración del nuevo gen, los dos extremos de este, deben estar flanqueados por secuencias de DNA idénticas a las secuencias que flanquean el gen a reemplazar. Al haber construido el vector de esta manera, permitimos una mayor capacidad de la nueva cadena de ADN para la unión en el lugar donde se ha producido la rotura y debe producirse la sustitución (recombinación homóloga).

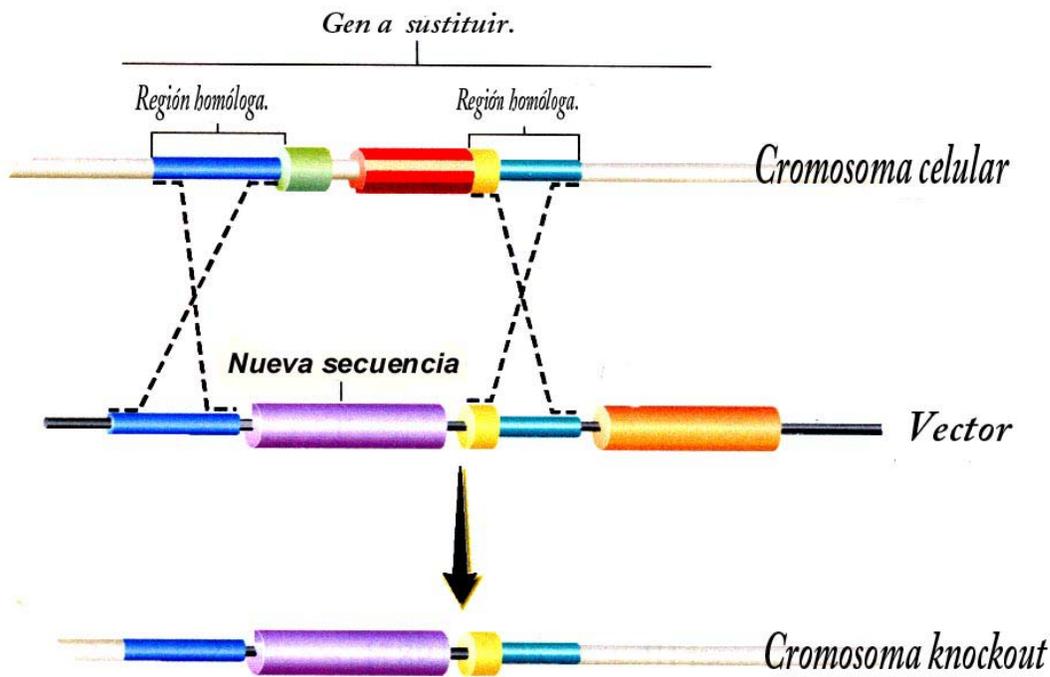


Figura 1.- Una célula madre embrionaria contiene un gen que debe ser sustituido. Como muestra la figura este gen está formado por un exón (secuencia codificante, verde), un intrón (secuencia no codificante) y otro exón (rojo). El vector *Knockout*

está formado en ambos lados por secuencias idénticas al gen original (azul) y por una secuencia irrelevante o diferente (morado). Se produce una doble recombinación en ambas regiones homólogas resultando de ello la incorporación de un vector inactivo *Knockout* al genoma de la célula.

3.- *Recombinación homóloga*: La probabilidad de que se produzca la incorporación de los vectores a las células dando lugar a la recombinación homóloga es baja, así debemos de utilizar algún sistema que nos permita reconocer en qué células se ha producido.

4.- *Sondaje de las clonas recombinadas*: Para reconocer aquellas células en las que se ha producido correctamente el proceso de recombinación podemos utilizar marcadores de selección. Si al crear el vector reemplazamos el gen que queremos inactivar por un gen que produzca protección frente a determinadas drogas como el ganciclovir (Fig.-1 morado), y posteriormente cultivamos las células embrionarias en un medio con ganciclovir, podremos decir que las células supervivientes son aquellas que han adquirido protección frente al ganciclovir y por lo tanto en las que ha tenido éxito el proceso de recombinación. Una vez aisladas las células resistentes llevaremos a cabo un sondeo de las clonas mediante técnicas como "*Southern blot*" y/o "PCR", que definitivamente confirmaran que se ha producido un cambio en el genoma celular.

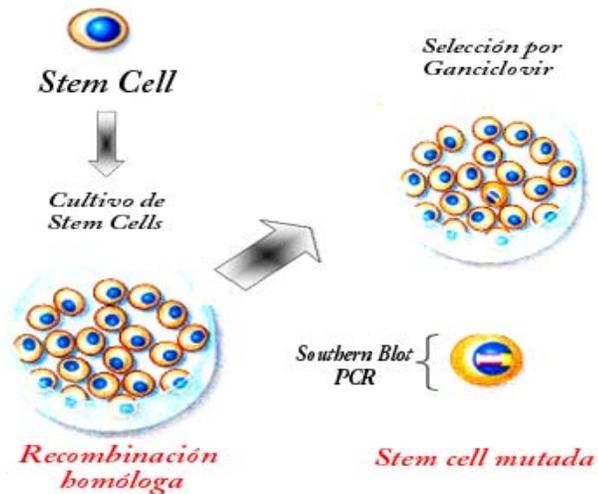


Fig. 2.- Recombinación homóloga: En esta fase se incorporan por electroporación los vectores a las células madre para que se produzca la mutación y se procede a la selección de células por su resistencia a determinados fármacos (ganciclovir en el ejemplo), posteriormente procedemos a sondear las clonas supervivientes con técnicas tipo "Southern Blot" o "PCR" para asegurarnos de que se ha llevado a cabo el proceso de recombinación en cada célula. Las células seleccionadas se cultivan para ser utilizadas en la siguiente fase.

5.- *Producción de ratones quiméricos:* Las células embrionarias "madre" pluripotenciales ya genéticamente alteradas, pueden ser ahora microinyectadas en la cavidad de un blastocito de una hembra en su tercer día de gestación (de un total de 20 días). Sus descendientes son quiméricos en el sentido de que parte de sus células son derivadas de las células mutadas y parte del blastocito receptor, si el quimerismo afecta a las células germinales obtendremos una descendencia que presentará la mutación. Para reconocer que el "mapeo" genético se ha producido es interesante utilizar células madre embrionarias que codifiquen distintos colores de piel entre las células manipuladas y las del blastocito.



Fig. 3.- Las células mutadas se incorporan a los embriones mediante la microinyección en los blastocitos receptores. Los blastocitos se incorporan a madres pseudopreñadas donde continuarán su desarrollo hasta el nacimiento. Los ratones obtenidos serán quiméricos pues parte de sus células son derivadas de las células mutadas y parte de las células originales del blastocito.

6.- *Producción del ratón mutante:* El ratón quimérico en el que la mutación ha afectado a sus células germinales es cruzado con un ratón normal de cuya descendencia obtendremos ratones genéticamente normales y ratones que han asumido ya la mutación en uno de sus alelos de todo su genoma, es decir, heterocigotos. Estos ratones heterocigotos son cruzados con otros ratones heterocigotos obtenidos por idéntico procedimiento y el resultado será según las leyes de Mendel, ratones genéticamente normales, ratones heterocigotos y ratones homocigotos para la mutación, es decir, *Knockout*. Mediante técnicas tipo "Southern blot" o "PCR" identificaremos cuáles son los ratones *Knockout* heterocigotos y los *Knockout* homocigotos.

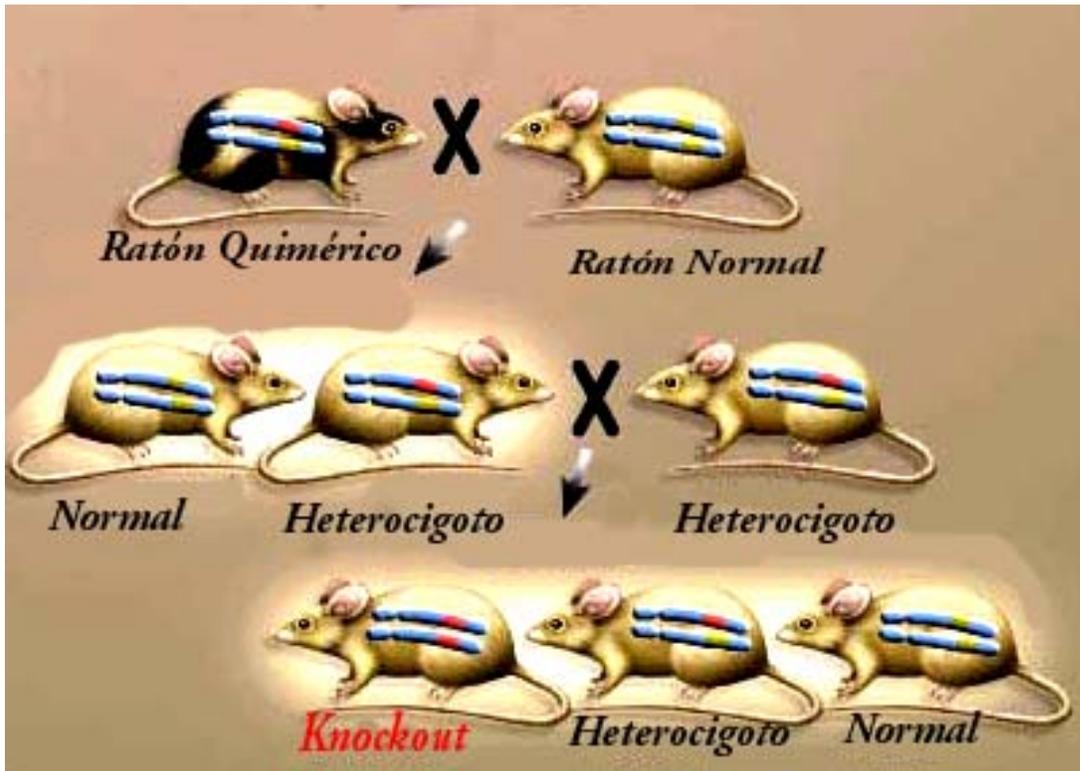


Fig. 4.- Los ratones quiméricos de la fase anterior, se cruzan con un ratón silvestre para producir los ratones donde uno de los alelos incluirá la mutación específica (heterocigoto). Posteriormente los ratones heterocigotos se cruzan entre si para obtener el ratón *Knockout*.

ESTADO ACTUAL DE LA TECNOLOGÍA *KNOCKOUT*.

El aporte fundamental del estudio de los ratones *Knockout* se basa en que los déficits presentes en estos pueden revelar o clarificar la función del gen mutante y por tanto de la proteína que sintetizan.

El estudio mediante la inactivación de determinados genes implicados en la organogénesis ha demostrado por ejemplo que el gen SF-1 (encoding steroidogenic factor) es esencial para el desarrollo adrenal y gonadal, el WT-1 (Wilms tumor locus)

para la organogénesis renal o el gen *GATA-1* para el desarrollo de los eritrocitos.

Estos modelos experimentales también son de gran valor en el estudio de la patogénesis y en el tratamiento de determinadas enfermedades (Tabla 1). Por otro lado la manipulación farmacológica de los animales *Knockout* puede ser utilizada con éxito en el estudio de agentes terapéuticos.

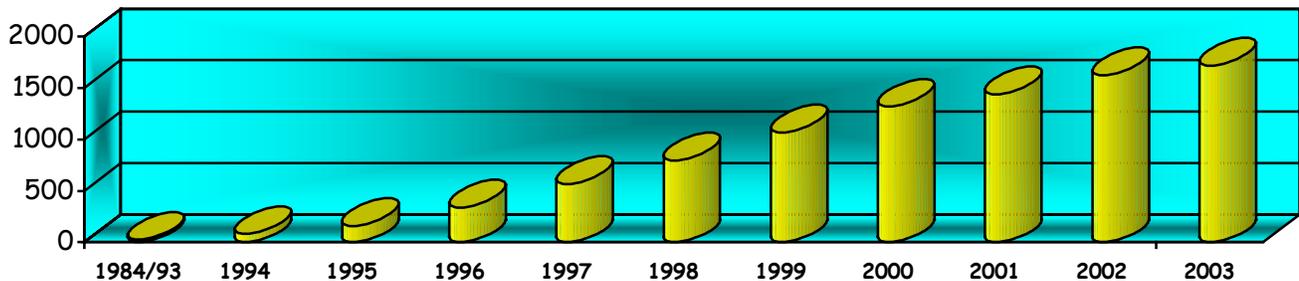
Sin embargo debemos tener siempre presente ciertas consideraciones a la hora de obtener conclusiones sobre estudios basados en animales *Knockout*:

1. El hecho de que la mutación se haya producido en el momento de la concepción puede hacer difícil el distinguir si los cambios son debidos a la influencia del propio gen sobre el fenotipo o a los mecanismos compensadores secundarios a la mutación.
2. Si el gen se expresa en diferentes tejidos donde tiene diferentes funciones, su inactivación puede tener múltiples consecuencias.
3. Si la inactivación de un gen produce la muerte fetal o la muerte tras el nacimiento, obtendremos importante información sobre la función de ese gen en el desarrollo pero deberemos tenerlo en cuenta para futuras investigaciones.
4. Dos diferentes genes pueden solapar sus funciones en cuyo caso la mutación de uno solo de ellos puede no revelar un fenotipo anormal.

ENFERMEDAD	GEN ALTERADO DEL RATON.
<u>CARDIOLOGÍA</u>	
Arteriosclerosis. Hipertensión sensible a la sal	Apolipoproteina E y receptor para la LDL Peptido arterial natriurético
<u>ENDOCRINOLOGÍA.</u>	
Hipercalciuria Hipercalcémica Familiar Retraso del crecimiento intrauterino. Obesidad	Receptor del calcio Insuline-Like Growth Factor Receptor β 3- Adrenérgico
<u>GASTROENTEROLOGÍA</u>	
Enfermedad de Hirshprung Colitis ulcerosa.	Receptor endotelial Interleukina 2
<u>HEMATOLOGÍA</u>	
α -Talasemia Hemofilia A	α -Globina Factor VIII
<u>INMUNOLOGÍA</u>	
S. Linfoproliferativo autoinmune S. Hiper IgG-M Deficiencias Severas Combinadas Inmunes	FAS CD40 Ligand JAK3 y receptor 2 de la Interleukina
<u>METABOLISMO</u>	
Enf. de Gaucher Homocistinemia S. Lesh Nyham Enf de Nieman Pick Enf Tay Sachs	β -Glucocerebrósido Cistationina β -sintetasa Hipoxantin Fosforibosil transferasa Esfingomielinasa ácida α -Hexosaminidasa
<u>NEUROLOGÍA</u>	
Déficit de memoria temprana	Calmodulín kinasa II
<u>ONCOLOGÍA</u>	
Neurofibromatosis Retinoblastoma	NF-1 RB
<u>NEUMOLOGÍA</u>	
Fibrosis Quística.	Regulador de la conducción transmembranosa

Tabla 1.- Muestra algunos ejemplos de las primeras patologías donde se utilizaron modelos *Knockout* para el estudio de la patogénesis y tratamiento de algunas enfermedades en humanos.

La tecnología *Knockout* que comenzó en la década de los 80 ha experimentado a finales de los 90 un impulso definitivo con la introducción de nuevas técnicas (Gráfica.- 1) como la utilización de células totipotenciales, mejora de los procedimientos de microinyección, ampliación del conocimiento del genoma de ciertos animales...Por otro lado las ventajas que ofrece el ratón como animal de experimentación (pocos requerimientos de espacio, alimentarios, económicos...) ha hecho que el estudio de la función de determinados genes y proteínas se haya centrado definitivamente en este animal.



Gráfica 1.- Muestra el incremento constante anual en el número de publicaciones sobre estudios basados en ratones *Knockout* desde 1984 hasta hoy. El método de cuantificación de las publicaciones se basó en una búsqueda por "Medline" utilizando las palabras clave "*Knockout*" y "*Mice*", y se diseñó personalmente.

MODELOS *KNOCKOUT* EN OFTALMOLOGÍA.

Con el aumento del interés por el estudio de los modelos *Knockout* han ido apareciendo diferentes publicaciones, en las que se estudia la influencia de determinados genes sobre la estructura y función de las distintas partes de la

anatomía oftálmica, sin embargo y a pesar del considerable aumento de los conocimientos en el campo de la oftalmología y de los *Knockout*, nos encontramos aún en el comienzo del conocimiento de un campo que se anuncia sin duda, prometedor para el futuro.

Estos son algunos de los genes cuya función en el aparato visual ha sido estudiada por medio de animales *Knockout*:

Rho y Rhd: Ya en 1997 fueron apareciendo publicaciones donde se describe la retinopatía inducida por la supresión del gen que traduce la Rhodopsina (Rho), el pigmento fotorreactivo de los bastones que se ve alterado en patologías como la retinosis pigmentaria. Los ratones *Knockout* Rho^{-/-} no elaboraban este pigmento y presentaban un electroretinograma prácticamente plano así como importantes alteraciones morfológicas de los fotorreceptores (1). Posteriormente en el año 2001 Jaissel y cols. (2) estudian el periodo ventana en estos *Knockout* entre el tiempo transcurrido desde que la retina ha quedado completamente desarrollada y el momento en el que comienzan a aparecer las diferentes alteraciones en los conos, concluyendo que este periodo es de 6 semanas desde el momento del nacimiento y por tanto pueden ser utilizados durante este periodo como un modelo de estudio de retinas con funcionamiento puro de los conos. Liang y cols (3) utilizan ratones Rhd^{-/-} para demostrar que el Factor Ciliar Neurotrófico (CNTF *Ciliary Neurotrophic factor*) aumenta la supervivencia de los fotorreceptores carentes de Rodopsina.

TGF beta 2: Sanford y cols describen en 1997 (4) las características del fenotipo de ratones *Knockout* para el gen TGF beta 2, importante factor de crecimiento y diferenciación (*transforming growth factor beta 2*), mostrando estos ejemplares importantes malformaciones en los ojos, corazón, pulmones, espina dorsal...que los hacen incompatibles con la vida.

Bmp7: También en 1997 Jena y cols. (5) describen en ratones *Knockout* para el gen Bmp7 (miembro de la superfamilia del TGF beta) la falta de pigmento en la retina y

retraso en el desarrollo del cristalino junto con otras alteraciones a nivel de esqueleto y riñones que producen la muerte de los animales a las pocas semanas de vida.

c-fos: El gen c-fos es expresado en subpoblaciones de neuronas retinianas bajo condiciones fisiológicas del ciclo de la luz y la oscuridad y aumenta la síntesis del RNAm del c-fos en las células de Müller tras producirse daños locales en la retina, la no expresión de este gen induce alteraciones morfológicas y funcionales de la retina (6).

IRBP: La proteína transportadora del retinoide entre los fotorreceptores IRBP (*interphotoreceptor retinoid-binding protein*) regula el proceso de intercambio de los retinoides entre los fotorreceptores y epitelio pigmentario de la retina, Ripps y cols. (7), demostraron que la no expresión de este gen produce en los ratones *Knockout* anomalías en cuanto a la morfología de la retina, a pesar de lo cual no pudieron demostrar ningún cambio en el funcionamiento del ciclo visual, no presentando ninguna alteración ni en el electroretinograma ni en la medición de la densidad de rhodopsina.

e-NOS y hsp70.1: Brooks y cols. (8) investigan en el año 2001 la posible relación entre la retinopatía del prematuro y el papel de la sintetasa del óxido nítrico. Utilizan en su investigación modelos de ratones *Knockout* para esta sintetasa (e-NOS), las conclusiones mostraron que, exponiendo a estos ratones *Knockout* y a otro grupo de ratones control a un modelo experimental de retinopatía del prematuro, los ratones que no sintetizaban óxido nítrico mostraban menor obliteración vascular y la neovascularización del vítreo se reducía sustancialmente más que en los animales control. Ese mismo año, Choi y cols. (9) estudian el efecto de la proteína hsp70.1 (heat shock protein 70.1) también sobre modelos experimentales de retinopatía del prematuro con hiperoxigenación en ratones neonatos, algunos de los cuales eran *Knockout* para esta proteína. El resultado mostró una mayor gravedad de la retinopatía en los ratones *Knockout* en comparación al grupo control.

Rpe65: Los retinoides presentes en el epitelio pigmentario de la retina juegan un papel importante en la formación de la lipofucsina, sin embargo el exacto mecanismo

por el cual estos regulan su formación estaba aún por describir. Katz y Redmond (10) estudiaron el gen *Rpe65* que sintetiza la proteína que facilita la isomerización de los enlaces "trans" a los "cis" del retinol. En el estudio de ratones *Knockout* que no expresaban este gen se observó una reducción importante en la formación de lipofucsina, demostrándose así la relación de la isomerización del retinol con la formación de la lipofucsina.

CRBP1: Saari y cols. (11) estudiaron por medio de ratones *Knockout*, la función sobre el ciclo visual del gen que sintetiza la proteína transportadora intracelular del retinol tipo I, sugiriendo en las conclusiones de su trabajo que esta proteína participaba en el proceso que regulaba la difusión de todas las moléculas de trans - retinol desde los fotorreceptores a las células del EPR.

Rara y Rarb: El ácido retinoico es también un elemento fundamental para la diferenciación y formación del ojo. Zhou y cols. (12) estudiaron el efecto de los receptores alfa y beta para el ácido retinoico (*Rara* y *Rarb*) sobre la proliferación de células retinianas y tamaño del ojo. Para su investigación utilizaron ratones control así como *Rara* *-/-* y *Rarb* *-/-*. Demostraron que el gen *Rarb*, expresado en el cromosoma 14 tiene un importante efecto sobre la proliferación celular embrionaria de la retina.

AQP4: Las Aquaporinas son una familia de proteínas transportadoras de los canales de agua, fundamentales para el transporte de fluidos entre los epitelios. Las células de Müller y los astrocitos del ratón expresan receptores para estas acuaporinas. Para estudiar la función de la acuaporina-4 (AQP4) sobre la visión, Jiang y cols. (13) realizaron electrorretinogramas y potenciales visuales evocados sobre un grupo de ratones *Knockout AQP4* *-/-*, así como un completo estudio morfológico de sus retinas y nervios ópticos. Aunque el estudio morfológico no mostró diferencias estructurales entre los ratones *Knockout* y los controles, sí existieron diferencias significativas en los patrones neurofisiológicos, sugiriéndose un papel importante de la AQP4 de las células de Müller en el balance de fluidos implicado en la traducción de los estímulos eléctricos de las células excitables.

RS1: Weber y cols. estudiaron el papel del gen RS1 en la retinosquiasis juvenil ligada al sexo. Describieron en estos animales *Knockout* una alteración completa de la retina que afectaba tanto a las capas de células retinianas como a sus sinapsis (14).

ApoE, P27 y PTEN: En este proyecto de Tesis se ha desarrollado particularmente el estudio de las funciones de estos genes sobre la retina y nervios ópticos.

1. El modelo ApoE Knockout

1.1 LIPOPROTEÍNAS Y APOLIPOPROTEÍNAS.

LIPOPROTEÍNAS: Son partículas que constan de lípidos y proteínas asociados de forma no covalente, estas funcionan en el plasma sanguíneo como vehículos transportadores de triacilglicérols y colesterol.

ESTRUCTURA: Forman partículas globulares de tipo micelar formadas por un núcleo apolar de triacilglicéridos y ésteres de colesterol rodeados por una cubierta anfifílica de proteínas, fosfolípidos y colesterol. Se clasifican en función de sus propiedades en (Esquema.-1) (15):

- ✓ Quilomicrones (transportan triacilglicéridos y colesterol externo).
- ✓ Lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), densidad intermedia (IDL) y baja densidad (LDL), estas transportan triacilglicérols y colesterol endógenos (suministrados internamente), desde el hígado a los tejidos.
- ✓ Lipoproteínas de densidad elevada (HDL): Transportan colesterol endógeno desde los tejidos al hígado.

APOLIPOPROTEINAS: El componente proteico de las lipoproteínas se conoce como apolipoproteína o simplemente apoproteína. Existen nueve tipos de apolipoproteínas distribuidos entre las diferentes lipoproteínas humanas.

1.1.1 FUNCION DE LAS LIPOPROTEÍNAS Y LAS APOLIPOPROTEÍNAS.

Los quilomicrones que se forman en la mucosa intestinal, funcionan de modo que mantienen los triglicéridos y el colesterol exógeno suspendidos en una solución acuosa. Los quilomicrones se adhieren al endotelio de los capilares del músculo esquelético y del tejido adiposo. Allí los triacilglicérols se van hidrolizando, los restos de los quilomicrones son devueltos al torrente circulatorio y son captados por el hígado.

Las VLDL se sintetizan en el hígado y pasan a la circulación como IDL y luego LDL. Las células captarán el colesterol mediante endocitosis de la LDL facilitada por un receptor. Así pues la LDL es secuestrada por un receptor de LDL, glucoproteína transmembrana de la superficie celular, que fija especialmente la ApoB-100 y la ApoE. También parece claro que el hígado capta restos de quilomicrones a través de un receptor que fija específicamente la ApoE. (Fig.-5)

Clase de lipoproteína.	Lípidos principales.
QUILOMICRONES	Triacilglicéridos de la dieta
VLDL	Triacilglicéridos endógenos, ésteres de colesterol, colesterol.
IDL	Esteres de colesterol, colesterol, triacilglicerol.
LDL	Esteres de colesterol, colesterol, triacilglicerol.
HDL	Esteres de colesterol, colesterol.

Esquema.-1 Tipos de lipoproteínas y principales lípidos que contienen.

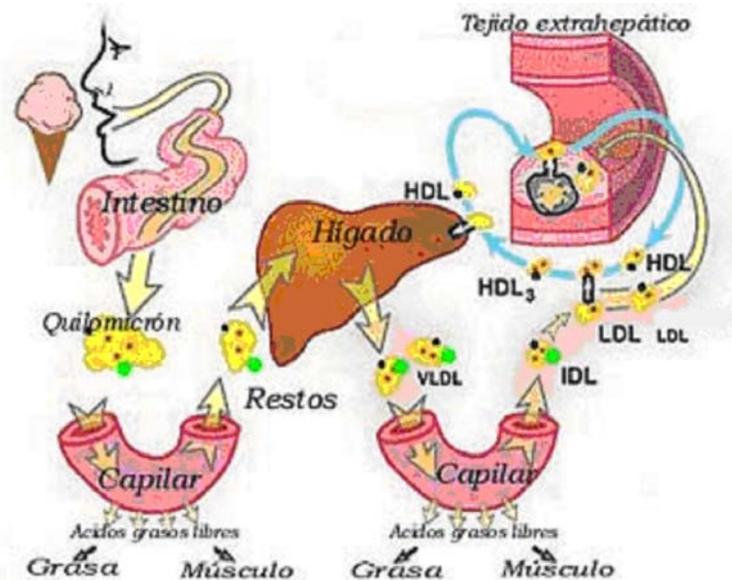


Fig. 5.- Modelo del transporte de triacilglicéridos y colesterol plasmático en el hombre.

1.2 APOLIPOPROTEINA E.

La Apoproteína E (ApoE), es una proteína de 34 kD, sintetizada en el locus 19q13.2. Al igual que otras apolipoproteínas esta formada por múltiples repeticiones de 21 aminoácidos que configuran una hélice alifática que facilita la unión a la superficie de la lipoproteína plasmática (16). La ApoE también contiene en su estructura una cantidad de aminoácidos residuales [150], que son fundamentales para la alta afinidad que ApoE demuestra con el receptor de la LDL y que es fundamental para iniciar el proceso de endocitosis de la lipoproteína por el tejido extrahepático (17). La ApoE regula la interacción de la LDL con la proteína receptora de la LDL a tres niveles, por un lado facilita la liberación de las partículas desde la lipoproteína hacia el receptor, por otro une el heparán sulfato, proteoglicano fundamental para completar la interacción con el receptor, y además interactúa directamente con el receptor para acelerar todo el proceso (18). Además la ApoE actúa sobre los receptores de las VLDL y otras lipoproteínas (19,20), así como sobre la lipasa hepática (21,22).

En los humanos el gen de la ApoE es polimórfico y posee tres alelos: ApoE*2, ApoE*3 y ApoE*4. Estos alelos presentan en la población normal una frecuencia del 7%, 77% y 15% respectivamente (23). El alelo ApoE*3 se codifica con la cisteína en la posición 112 y la arginina en la 158. El ApoE*2 se codificará con la cisteína en las dos posiciones y la ApoE*4 con la arginina también en las dos posiciones.

Hay varios estudios poblacionales que han sugerido que los distintos alelos de ApoE tienen diferentes influencias en el metabolismo lipídico humano. Así el alelo ApoE*2 se ha asociado con una mayor concentración plasmática de ApoE y menor de colesterol y LDL (24). También se ha asociado a un menor riesgo de enfermedad cardiovascular (25) exceptuando a un 5% de estos individuos que desarrollaran una hipertrigliceridemia familiar tipo III (26). El Alelo ApoE*4 se asocia con menor concentración de ApoE y al mismo tiempo con un incremento de la concentración plasmática de colesterol y LDL (24) junto a un aumento del riesgo cardiovascular (25).

Para terminar de definir las diferencias y funciones de la expresión de los distintos alelos de ApoE, Knouff y cols. (27) diseñan un estudio en el que generan un grupo de ratones que expresan la isoforma ApoE*4 humana y la comparan con otro grupo de ratones que expresan la isoforma ApoE*3. Comprueban que los niveles de apoproteína y lípidos plasmáticos no difieren entre los dos grupos ni siquiera al aumentar los contenidos lipídicos de las dietas, sin embargo el grupo ApoE*4 mostraba tres veces más cantidad de colesterol, ApoE y ApoB-48 en sus VLDL que el grupo ApoE*3, además la tasa de aclaramiento de estas VLDL era la mitad que en los ratones ApoE*3. En los ratones ApoE*4 se formaban placas de ateroma de mayor tamaño que en el otro grupo cuando todos los ratones eran alimentados con dietas hipercolesterolemiantes. Los autores demuestran con este experimento una correlación directa y muy significativa entre la tasa de aclaramiento de la VLDL y la formación de placas de ateroma, además constatan que la existencia de diferencias en la estructura de la ApoE son suficientes para producir alteraciones del aclaramiento de VLDL y por tanto

de aumentar el riesgo de formación de placas de ateroma y enfermedades cardiovasculares.

1.2.1 ACCIÓN DE LA APOPROTEÍNA E SOBRE EL SISTEMA NERVIOSO PERIFÉRICO Y CENTRAL.

La ApoE que durante años se ha caracterizado como una proteína transportadora de colesterol, aparece ahora además, como una importante proteína implicada en el correcto mantenimiento de las neuronas.

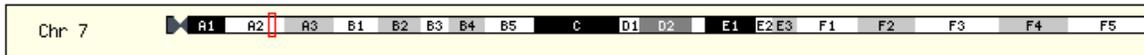
Sabemos que ApoE está presente en las células no mielinizadas de Schwann del sistema nervioso periférico (SNP) (28), y que es la principal proteína detectada en el muñón distal tras secciones del nervio ciático en animales de experimentación (29). A pesar de que se desconoce la función exacta que desarrolla ApoE en el SNP, se piensa que dada su influencia sobre la adhesión, la morfología y la supervivencia neural *in vitro* (30,31,32,33,34) e influir el genotipo de ApoE en la recuperación tras determinadas lesiones neurales (35,36,37,38,39), pudiera ser plausible pensar que ApoE fuera un importante "mantenedor" de la integridad neuronal en el SNP.

En el sistema nervioso central (SNC), la principal apoproteína sintetizada es ApoE (40) y está producida por las células gliales y macrófagos (41). También sabemos que la expresión del alelo ApoE*4 en humanos se asocia con un aumento del riesgo y precocidad de la enfermedad de Alzheimer (42,43).

En cuanto a la posible función "reparadora" de ApoE en el tejido neural, es interesante destacar que tanto en el SNC como en el SNP, las lesiones inducen un incremento de la producción y secreción por parte de la glía y macrófagos y sus niveles permanecen elevados durante todo el proceso de regeneración(44-46).

1.2.2 RATONES APOE *KNOCKOUT* (-/-).

Chromosome 7



Overview

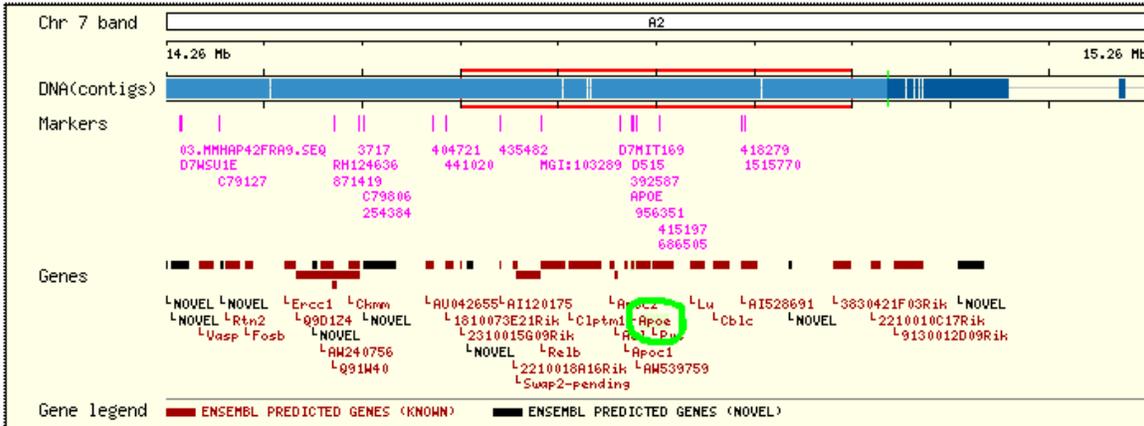


Fig. 6.- Parte del mapa del cromosoma donde se sintetiza la ApoE en el ratón. El conocimiento del genoma del ratón y la capacidad de la ingeniería genética para su manipulación se encuentran actualmente en una fase muy avanzada. Varias empresas publican en Internet el genoma del ratón y admiten encargos para manipular específicamente algún gen determinado (<http://www.ensembl.org/>).

La Apoproteína E fue la primera lipoproteína transportadora cuyo gen fue anulado en un ratón (47). Se piensa que la aterogénesis acelerada que sufren estos ratones es debida en parte a que las β -VLDL, VLDL enriquecidas en colesterol, son las principales lipoproteínas de los ratones ApoE *Knockout* (48), por otro lado, otros autores propusieron que, en parte, este proceso podría ser también debido a una alteración en la capacidad antioxidante del organismo (49).

Dejando de un lado las investigaciones sobre lípidos y arteriosclerosis, los ratones ApoE *Knockout* son también actualmente centro de numerosas investigaciones centradas en el estudio de la función de esta ApoE sobre el sistema nervioso central y periférico, también se han orientado las investigaciones hacia el estudio del papel de esta apoproteína en el sistema antioxidante y en la vía inflamatoria.

Perfil lipídico y lipoproteico de los ratones ApoE Knockout:

Los ratones *ApoE Knockout* presentan un incremento cuatro veces mayor en los niveles de colesterol plasmático total y un incremento dos veces superior de los niveles de triglicéridos en comparación con los ratones controles. Además, mientras que la mayoría del colesterol sérico se halla en los ratones *wildtype* en forma de HDL, en los ratones *ApoE Knockout*, la principal fuente del colesterol plasmático son las partículas β -VLDL (48), lo que supone una disminución de cerca del 90% en las proporciones HDL/TG.

Homocisteína plasmática y niveles de glucosa.

Los ratones *ApoE Knockout* presentan una disminución significativa de la homocisteína plasmática total así como de los niveles de glucosa. Estos son un factor de riesgo asociado a la enfermedad aterosclerótica vascular de los humanos (50,51). La razón y el significado de la reducción de los niveles séricos de factores aterogénicos en este modelo animal de experimentación permanece aún por aclarar.

Capacidad antioxidante.

Parece que existe una variación significativa entre los componentes antioxidantes endógenos de diferentes órganos. El riñón muestra una actividad GPx, Gred y catalasa aumentada, mientras que en plasma su actividad es mínima. Igualmente la actividad del SOD es máxima en corazón, riñones y pulmones mientras que es mínima en las células rojas y en plasma (52).

Esperanza de vida.

Mientras que los ratones *wildtype* pueden vivir libres de enfermedades durante varios años, los ratones ApoE *Knockout* presentan una esperanza de vida mucho más corta. Según aumenta su edad, estos ratones desarrollan lesiones cutáneas, en forma de xantomas en áreas como hombros o espalda (53), los lípidos y la matriz extracelular son los componentes predominantes de estas lesiones y la gravedad de ellas no permite mantener con vida a estos animales más de 18 meses y además un tercio de ellos muere espontáneamente antes de concluir este periodo, siendo la enfermedad coronaria una de las posibles causas de su muerte.

Enfermedad aórtica y coronaria.

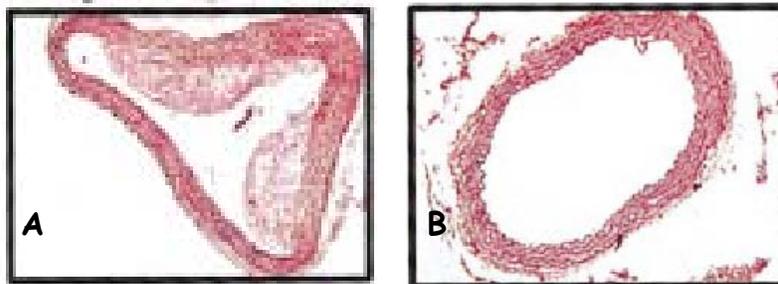


Fig 7.- Sección transversal del arco aórtico teñido con hematoxilina y eosina correspondiente a un animal ApoE *Knockout* (A) y *wildtype* (B). 25X. (Díez-Juan y cols.; 2001)

Los animales ApoE *Knockout* muestran, en los estudios histológicos, masivas lesiones ateromatosas con abundantes cristales de colesterol, lípidos y disminución de la matriz extracelular que se hacen patentes tanto en el cayado aórtico como en las arterias coronarias, también están presentes componentes inflamatorios.

El sistema nervioso periférico.

Fullerton y cols (54) estudian la función de ApoE sobre el SNP por medio de ratones ApoE *Knockout*. Observan con técnicas de microscopía electrónica la estructura de los axones no mielinizados de estos ratones anormal. Los axones no mielinizados del nervio ciático presentaban una morfología irregular y estaban separados por una disminuida cantidad de citoplasma de las células de Schwann. Además la diferenciación entre el límite axonal y el citoplasmático se veía dificultado por un aumento de la electrodensidad. También comprobaron una reducción en el número de axones no mielinizados. Los hallazgos histológicos observados en el grupo *Knockout* se traducían en una respuesta disminuida a los estímulos nociceptivos.

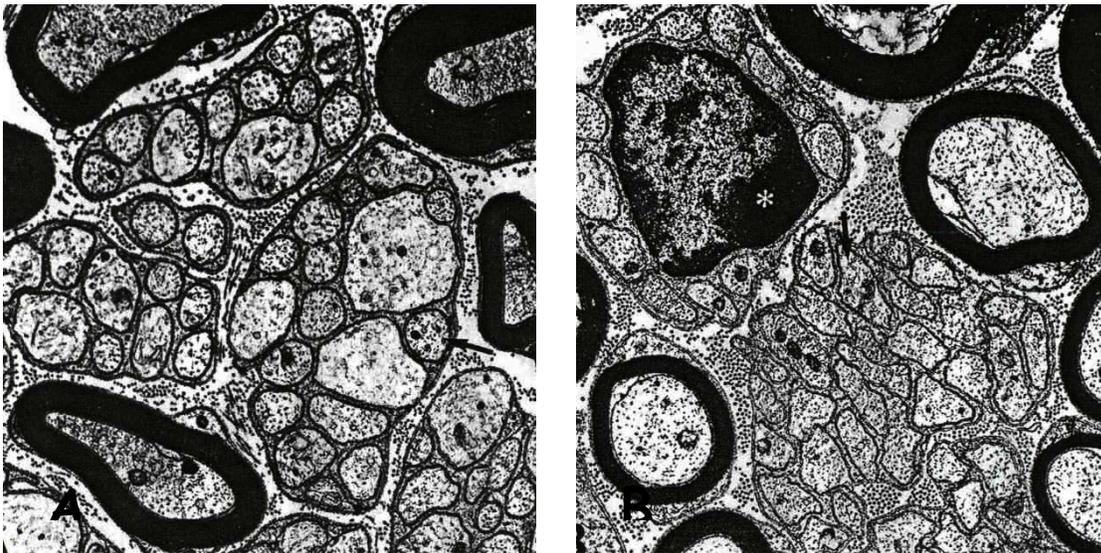


Fig. 8.- Los axones no mielinizados de los ratones *wildtype* (A) son de morfología circular, de baja electrodensidad y se hallan rodeados por el citoplasma de las células de Schwann. Sin embargo los ratones del grupo *Knockout* (B), son irregulares, electrodensos y no se encuentran claramente separados por el citoplasma de las células de Schwann. Flechas: Axones no mielinizados, Asterisco: célula de Schwann (Fullerton y cols.; 1998).

1.3.3 OFTALMOLOGIA Y APOPROTEÍNA E.

Si bien el estudio de la función de la Apolipoproteína E en el SNC y SNP se revela prometedor en el campo del conocimiento de determinadas patologías ya mencionadas como el Alzheimer y los procesos de regeneración neuronal, en cuanto al estudio de la función de esta Apoproteína sobre el nervio óptico y la retina a través de modelos experimentales *Knockout* nos encontramos aún en las fases más embrionarias de su conocimiento, existiendo en la literatura científica mundial apenas 10 referencias bibliográficas. Sin embargo, y a pesar de lo escaso del número de publicaciones, ya podemos apuntar las líneas básicas en cuanto al estudio de su función. Así, se ha asociado la expresión en humanos de determinados alelos de ApoE con la degeneración macular asociada a la edad (DMAE) o a patologías con afectación neural como el glaucoma y se han hallado numerosas alteraciones morfológicas en las retinas de los ratones ApoE *Knockout*. A continuación describiremos cuales son los conocimientos que se tienen actualmente en cuanto a la función de esta apoproteína sobre el NO y retina y que serán el punto de partida de mis actuales investigaciones sobre este gen.

Expresión y síntesis local de la ApoE en la retina.

Anderson y cols. (55) miden en la retina los niveles del RNAm de la ApoE mediante el estudio cuantitativo de la transcripción de ApoE en donantes de órganos humanos, además, localizan utilizando un microscopio confocal de inmunofluorescencia, las zonas de expresión de la ApoE en grupos celulares concretos y espacios extracelulares de la retina neural, EPR y coroides.

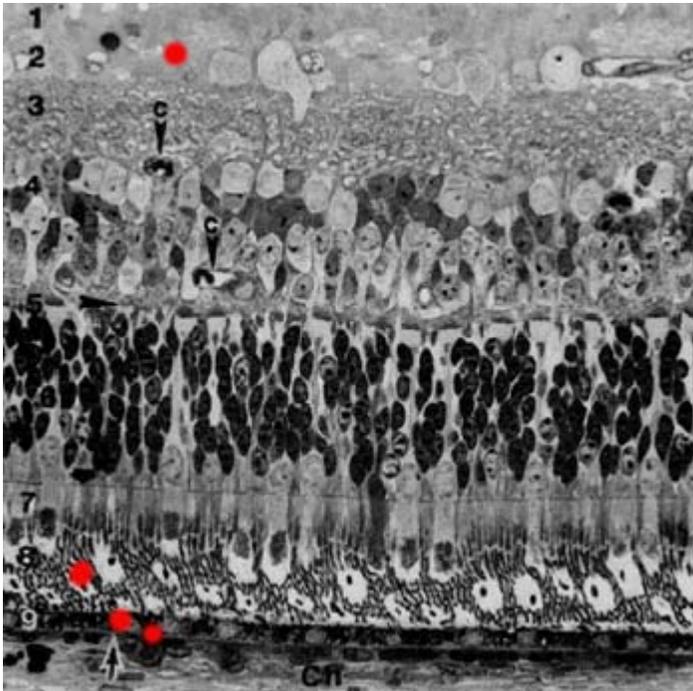


Fig. 9.- Los puntos en rojo marcan los zonas donde se encontró inmunoreactividad para la ApoE, hallándose esta en la capa de células ganglionares ,segmento externo de los fotorreceptores, EPR y membrana de Bruch.

c: capilares, Ch: coriocalyx, flecha hacia arriba: membrana de Bruch.

Esquema propio de trabajo.

Los puntos retinianos donde se encontró inmunoreactividad positiva quedan reflejados en la Fig. 9.- Por otro lado demuestran por medio de técnicas de transcripción inversa que la ApoE hallada en los fotorreceptores no tiene su origen en estos sino más bien es introducida desde el torrente sanguíneo o a partir de la sintetizada en el EPR, por un mecanismo similar al descrito por Amaratunga y cols. y que describiremos a continuación. Tampoco hallan síntesis local en las neuronas retinianas como cabría esperar por el hecho de que a nivel cerebral , y aunque los astrocitos sean los principales sintetizadores allí (56,57), también se ha probado la síntesis de ApoE a partir de las neuronas (58).

Amaratunga y cols. (59) demuestran , utilizando técnicas de marcaje con metionin/cisteina de la ApoE hallada en vítreo, que esta es sintetizada por las células de Müller y secretada hacia el vítreo e interiorizada y/o secretada por las células ganglionares de la retina y rápidamente transportada a través del nervio óptico y cerebro como una molécula intacta, hacia los cuerpos geniculados laterales. También demuestran que esta apolipoproteína de síntesis local retiniana tiene perfecta

capacidad para integrarse en partículas lipoproteicas que contienen triglicéridos, esterios de colesterol y colesterol libre (60).

Si tanto en el sistema nervioso central (SNC) como periférico (SNP), la expresión de la ApoE por las células macrogliales es estimulada por un daño o enfermedad degenerativa neural (61,62,63), también se ha propuesto que a nivel retiniano serían las células de Müller las que funcionarían a modo de "macroglía retiniana" en el sentido de que serían ellas las encargadas de sintetizar la ApoE ante situaciones de estrés sufridas por la retina como el desprendimiento de esta, las degeneraciones maculares o el glaucoma crónico (64).

ApoE y desprendimiento de retina:

Schneeberger y cols (65) estudian el fluido subretiniano obtenido a partir de ojos con desprendimientos exudativos y regmatógenos de retina. Por medio de técnicas de "western-blot" detectan y cuantifican la presencia de ApoE. Concluyen que la ApoE se halla implicada en los procesos de reparación retiniana desencadenados por su desprendimiento.

Existen también estudios que no han logrado establecer una asociación entre la expresión de los diferentes alelos y enfermedades degenerativas como la retinosis pigmentosa. Así Souied y cols. hacen un análisis por PCR del polimorfismo de la ApoE en 51 pacientes afectados de retinosis pigmentosa, no hallando ninguna diferencia en cuanto a la frecuencia de los alelos ApoE respecto a la población control. (66)

ApoE y glaucoma:

Copin y cols. (67) estudian la implicación de la ApoE en otro proceso de degeneración neuronal: el glaucoma crónico de ángulo abierto. Los autores concluyen detectando una

asociación entre la expresión de ApoE*4 y mayor riesgo de padecer tanto glaucoma crónico de ángulo abierto como glaucoma de tensión normal.

ApoE y drusas:

Uno de los marcadores de la DMAE es la acumulación de depósitos a lo largo de la membrana de Bruch (MB). Las drusas son el tipo de depósitos más frecuentes y se localizan en el límite entre la membrana basal del EPR (epitelio pigmentario de la retina) y la capa colágena interna de la MB. De entre las moléculas que componen estas drusas destacan la vitronectina, componentes del amiloide P, proteína C reactiva, y apolipoproteína E, componentes que a su vez están presentes en placas de ateroma, enfermedades degenerativas cerebrales,...(68,69,70). Anderson y cols. constataron que en los bordes basolaterales de las drusas duras quedaba interrumpido el patrón inmunorreactivo de la ApoE y demostraron que la ApoE hallada en el interior de estas procede de la sintetizada a nivel del EPR, aunque sin quedar claro si su presencia es la causa o la consecuencia de la formación de las drusas.

ApoE y DMAE.

Los factores ambientales y alimenticios son factores de riesgo para la DMAE constatados en diferentes estudios, y es bien conocido el efecto adverso del tabaco y los altos niveles de colesterol. Sin embargo, la teoría hereditaria de la DMAE cobra cada día más fuerza y se han sugerido recientemente teorías acerca de la implicación de determinados genotipos en ella (71,72).

Las drusas son un signo precoz de DMAE y se caracterizan por la presencia de proteínas y lípidos en la membrana de Bruch (73). Así la ApoE se convierte

intuitivamente en un candidato para el estudio de su relación con la DMAE por dos motivos, primero por su papel como regulador del metabolismo lipídico y segundo por su demostrada implicación en enfermedades neuro-degenerativas.

Klaver y cols. (74) y Souied y cols (75) han demostrado un efecto protector del alelo ApoE*4 en la DMAE. En su estudio, estos últimos, constataron que el alelo ApoE*4 se asociaba con una disminución estadísticamente significativa con la presencia de degeneraciones maculares seniles y el alelo ApoE*2 se asociaba con un moderado incremento del riesgo.

Otro estudio (76) no pudo demostrar estos hallazgos en un grupo poblacional chino afecto de la enfermedad.

Recientemente Schmidt y cols. (77) genotipan la ApoE en un número de 330 controles y 230 pacientes afectados de drusas blandas, atrofia geográfica o membranas neovasculares (MNV), a los que engloban como afectados de DMAE. De ellos 129 casos eran familiares y 101 esporádicos. Para el genotipado de los pacientes extrajeron DNA a partir de linfocitos aislados de muestras de sangre según habían descrito previamente Vance y cols. (78) y el genotipado de la ApoE se llevó a cabo según los protocolos publicados por Grubber y cols (79). No hallaron ninguna evidencia de que, ni en casos esporádicos ni en casos familiares, existiera un incremento del riesgo de desarrollar DMAE atribuible al alotipo ApoE*2. Tampoco hallaron ningún efecto protector del alotipo ApoE*4 en casos esporádicos.

El estudio concluye que el alelo ApoE*4 tiene un efecto protector moderado sobre la DMAE y que este queda limitado a los casos familiares y concretamente en pacientes jóvenes. Se sugieren dos hipótesis respecto al papel de este alelo como protector frente a la DMAE, la primera haría referencia a la posible asociación del ApoE*4 con la mutación de otro gen que fuera el responsable directo del efecto, la segunda posibilidad sería un efecto directo de la ApoE sobre la patogénesis de la DMAE, esta última teoría sería especialmente interesante ya que es absolutamente opuesta al efecto hallado sobre otras enfermedades neurodegenerativas,

concretamente en la enfermedad de Alzheimer, donde el ApoE*4 aumenta las posibilidades de que la enfermedad sea desarrollada.

1.3.4 LA RETINA DE LOS RATONES APOE KNOCKOUT.

El primer trabajo publicado respecto a la posible influencia de la ApoE en la morfología de la retina aparece en el año 2001 por Ong y Cols. (80). Los autores utilizaron para sus investigaciones ratones ApoE *Knockout* y *wildtype* separados en cuatro grupos de estudio clasificados en orden creciente según los niveles de colesterol plasmático, así los animales control se separaron en dos grupos según fueran alimentados o no con dieta hipercolesterolémica, en los ratones ApoE *Knockout* se procedió de la misma manera. El objeto de la división en estos cuatro grupos era discernir entre la hipercolesterolemia o la ausencia de expresión de la ApoE como responsables de las alteraciones morfológicas halladas.

En el estudio electrofisiológico (electrorretinograma) de los cuatro grupos de animales, los autores encontraron un aumento significativo en las latencias de las ondas a y b cuando se comparaban los grupos ApoE con los controles, además hubo una reducción de la amplitud del potencial oscilatorio en el grupo ApoE alimentado con dieta hipercolesterolemia. No se halló diferencia en cuanto a las amplitudes de las ondas a y b en ninguno de los otros tres grupos. Estos resultados electrofisiológicos demuestran una disfunción neural retiniana que afectaría a las capas más internas de ésta.

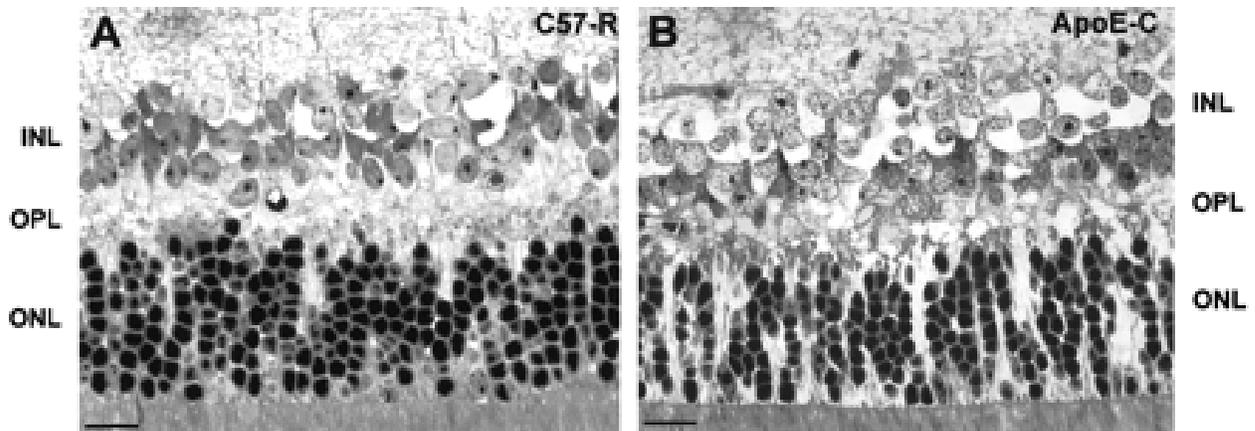


Fig. 10.- Microscopía óptica de las secciones de las retinas de los ratones del grupo control (izquierda) y ApoE alimentado con dieta hipercolesterolémica (derecha), observándose en esta última, la presencia de procesos de vacuolización y disminución de la celularidad. INL: Capa nuclear interna OPL: Capa plexiforme externa. ONL: Capa nuclear externa. (Ong y cols.; 2001)

En el estudio con microscopía óptica comparativo entre los grupos de ratones control alimentados con dieta normal y el grupo de ratones ApoE *Knockout* alimentados con una dieta hipercolesterolémica, se halló en este segundo grupo una condensación de la cromatina nuclear así como una vacuolización periventricular focal en la capa nuclear interna, sugiriéndose por su localización que se trataba de células amacrin. En los otros grupos de estudio las diferencias fueron intermedias entre las halladas en los dos grupos mostrados. Así mismo el análisis morfométrico reveló una disminución en cuanto al número de células de la nuclear interna de los grupos respecto al grupo control alimentado con una dieta normal, resultados idénticos se obtuvieron en el conteo de la nuclear externa. Estos resultados se correlacionaban con el hallazgo de unos grosos retinianos menores también de los tres grupos respecto al control, grosos disminuidos a expensas de la disminución celular en las nucleares tanto externas como internas.

Estudio Inmunohistoquímico: En el grupo control se estudió la expresión de la anhidrasa carbónica II a nivel de la nuclear interna, más concretamente en los núcleos de las células de Müller y se observó como esta fue disminuyendo su expresión a lo

largo de los tres grupos. El estudio de la expresión de la calretinina, proteína neural ligadora de calcio, demostró su presencia en la capa de células ganglionares y nuclear interna así como en algunos puntos de la plexiforme interna (células bipolares), marcando la presencia de sinapsis entre células bipolares y amacrinas. También se encontró una disminución de la expresión de esta proteína de los tres grupos respecto al control.

1.3.5 ESTUDIO DE LA MEMBRANA DE BRUCH.

Dibmar y cols. realizan un trabajo centrado en el estudio de la membrana de Bruch (MB) (81). Utilizan ratones control y ApoE *Knockout* que a su vez dividen en dos grupos: jóvenes y viejos. En su estudio hallan diferencias significativas en cuanto al grosor de la MB entre el grupo de ratones control jóvenes y el resto de los grupos.

El análisis ultraestructural reveló dos clases de degeneraciones vacuolares en la MB. Se hallaron vacuolas no rodeadas por membranas y vacuolas que sí presentaban una delimitación formada por membranas, estos últimos hallazgos estaban presentes en todas la MB de los ratones ApoE *Knockout* y prácticamente ausentes en el grupo de los ratones control, por el contrario las vacuolas no delimitadas por membranas fueron un hallazgo presente en todos los grupos excepto en el de los ratones control jóvenes. Las vacuolas membranosas halladas en la MB parecen ser un marcador específico de la degeneración macular asociada a la edad.

1.3.6 EL NERVIÓ ÓPTICO DE LOS RATONES APOE *KNOCKOUT*.

Si como hemos mencionado anteriormente, el conocimiento de las funciones de la ApoE en la retina y el estudio de esta en los ratones ApoE *Knockout*, se encuentra en las fases más precoces de su entendimiento, aún nos hallamos en un desconocimiento más profundo si nos referimos a su función sobre el nervio óptico. Prácticamente no

existen trabajos centrados en el estudio de la función de la ApoE en el nervio óptico (NO), de tal forma que esta debe ser deducida de los trabajos publicados sobre la función de la ApoE en cerebro o SNP.

Stoll y cols. (82) son los únicos que realizan un estudio centrado en el nervio óptico. Parten de la base del conocimiento de que a nivel molecular, uno de los fenómenos más importantes tras la sección de un nervio central o periférico es la estimulación de la síntesis y secreción local de ApoE (83,84,85,86). En el segmento distal de un nervio ciático seccionado de rata, se identificaron a los macrófagos como la fuente principal de producción de ApoE local (84). A nivel del SNC Boyles (87) centrando sus investigaciones en el cerebro y haciendo un estudio rápido sobre el NO demuestra que en condiciones normales existe inmunorreactividad para la ApoE en los astrocitos de los NO pero tras producirse una lesión del NO, esta inmunorreactividad desaparece rápidamente de la astroglia pero simultáneamente empieza a ser detectada en una sustancia granular de origen desconocido acompañándose de una estimulación de su síntesis global. Stoll y cols (82) pretenden descubrir cuales son las células encargadas de la síntesis de la ApoE en situaciones de estrés, para ello utilizan criosecciones semifinas de NO previamente dañados. Utilizan diferentes anticuerpos en las técnicas de inmunocitoquímica: antiApoE, GFAP (glial fibrillary acidic protein) para identificar a los astrocitos, CNP (2' 3' -cyclin nucleotide-3' phosphodiesterase) para los oligodendrocitos y ED1 para los macrófagos. Comprobaron que tras la sección del NO la inmunorreactividad para los anticuerpos antiApoE era solo patente en los oligodendrocitos, además hallaron la presencia de ApoE en los aparatos de Golgi de estas células indicando su síntesis a este nivel. Concluyen que la ApoE derivada de los oligodendrocitos es la que participa en la redistribución de los lípidos de la mielina tras una lesión en el NO.

2. El modelo p27^{kip1} Knockout

2.1 EL CICLO CELULAR

El ciclo celular es un conjunto ordenado de eventos que culmina con el crecimiento de la célula y la división en dos células hijas.

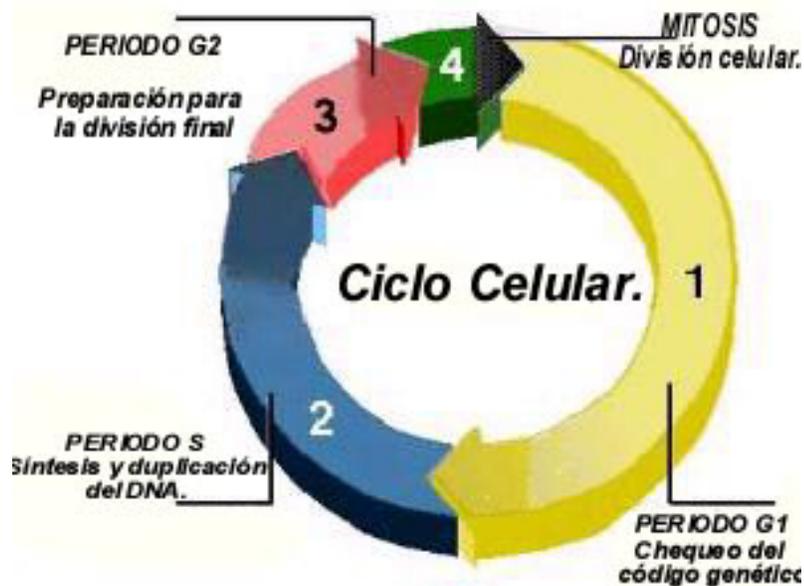


Fig.11.- El ciclo celular se divide en varias etapas o estadios. El estadio G1 quiere decir "GAP 1" (Intervalo 1). El estadio S representa "Síntesis". Esta es la etapa en la que ocurre la replicación del ADN. El estadio G2 representa el "GAP 2"(Intervalo 2). El estado M representa la "mitosis", y es el momento en el que ocurre la división nuclear (los cromosomas se separan) y citoplasmática (citocinesis).

Factores que actúan regulando el ciclo celular:

Ciclinas y Quinasas dependientes de ciclinas (CDKs): La maquinaria básica del ciclo celular está constituida por proteínas capaces de fosforilar a otras proteínas (proteínas quinasas o, abreviadamente, quinasas) mediante la transferencia de grupos fosfato a aminoácidos específicos. El resultado de la fosforilación de una proteína es

generalmente un cambio en su actividad o en su capacidad para formar parte de una estructura. Las quinasas que coordinan los complejos procesos de control del ciclo celular se denominan quinasas dependientes de ciclina (CDKs, del inglés "Cyclin-Dependent Kinases") porque su actividad de fosforilar proteínas es regulada por la asociación reversible de otras proteínas: las ciclinas. Estas junto a las CDKs, son las mayores llaves de control para el ciclo celular, causando que la célula se mueva de G1 a S, o G2 a M.

FPM (Factor Promotor de la Maduración): incluye la CdK y ciclinas que desencadenan la progresión del ciclo celular.

p53: Es una proteína que funciona bloqueando el ciclo celular si el ADN está dañado. Si el daño es severo esta proteína puede causar apoptosis.

p27: Es una proteína que se une a ciclinas y CdK bloqueando la entrada en fase S.

2.2. LA PROTEINA DEL RETINOBLASTOMA.

El estudio de la biología molecular de la proteína del retinoblastoma ha inducido la aparición de un nuevo concepto en el campo de la genética oncológica. El retinoblastoma es el prototipo de tumor causado por la mutación de un gen supresor de tumores, el gen que sintetiza la proteína del retinoblastoma y que se halla en el cromosoma 13 q14.

La proteína del retinoblastoma (Rb) es una fosfoproteína con afinidad por el DNA que se localiza en el núcleo celular. Contiene 928 aa con un peso molecular de 110Kd (88,89).

- ✓ Parece ejercer su actividad supresora de tumores regulando la proliferación y la división celular. Inhibe la división celular uniéndose a factores de transcripción celular como E2F. Una vez que la proteína del Rb queda fosforilada, se inactiva quedando el E2F libre para ejercer su actividad favorecedora de la proliferación celular (90,91,92).

- ✓ Además de E2F, parece que la proteína del RB interactúa con un número de proteínas vitales que intervienen en la transformación celular como el adenovirus E1A,(93) SV40 antígeno T,(94) papilomavirus humano E7 (95) y virus EBNA-5 Epstein-Barr (96,97). La unión de estas oncoproteínas virales a la proteína del retinoblastoma inactiva su actividad supresora de tumores, llevando a la célula a la transformación y tumorigénesis.
- ✓ Parece que existe una familia de factores "proteína del RB-like" como p107, p130, p300 que juegan un papel en la regulación del ciclo celular similar (98,99,100).
- ✓ Los ratones homocigotos alterados genéticamente para la mutación del gen del retinoblastoma mueren en el útero con un gran número de defectos del desarrollo que afectan al sistema nervioso y hematopoyético (101,102), sugiriéndose así que la proteína del Rb es vital para el desarrollo. Curiosamente los ratones heterocigotos no parecen padecer retinoblastomas pero sí tumores pituitarios (103,104).
- ✓ La alteración en la síntesis de la proteína del RB parece ser un factor pronóstico en otras muchas formas de cáncer humano como vejiga, mama, testicular y sarcomas (105 a 120).

2.3 EL GEN P27^{kip1}

Se cree pues, que la fosforilación de la proteína del retinoblastoma es crucial en la progresión del ciclo de las células eucariotas. Su fosforilación es favorecida por las ciclinas y las quinasas dependientes de ciclinas (Cdks). En la fase G1 del ciclo celular, el complejo ciclina-Cdk son las ciclinas D (D1,D2 y D3)-Cdk4 o Cdk6 y la ciclina E-Cdk2. La ciclina D se regula fundamentalmente por señales extracelulares, la ciclina E es ,al menos en parte, regulada por señales internas. La ciclina D actúa en tiempos

precoces de la fase G1 uniéndose y activando a Cdk4 y 6 e inicia la fosforilación e inactivación de la proteína del RB. La ciclina E se asocia con Cdk2 y realiza la fosforilación a mitad de la fase G1 (121). La proteína del Rb es pues secuencialmente fosforilada anulándose así su influencia negativa sobre factores de transcripción como E2F y la Histona deacetilasa (122). De este proceso resulta un aumento de la transcripción de ciclinas D y E así como la progresión de la fase G1 a la S del ciclo celular. Este feed-back positivo llevado a cabo por la ciclina E-Cdk2 puede asegurar la completa fosforilación de la proteína del RB y la irreversible progresión del ciclo celular. (123). Incluso se ha demostrado que la sobreexpresión a la ciclina E puede, por si misma, hacer entrar a la célula en el ciclo celular ignorando el complejo proteína del RB-E2F (97).

Los complejos ciclina D-Cdk4 y -Cdk6 están sujetos a una regulación negativa tanto por Ink4 como por las familias de inhibidores Cip/Kip, mientras que el complejo ciclina E-Cdk2 está negativamente regulado solo por la familia Cip/Kip.

Los inhibidores Cip/Kip como p21^{Cip/Walf}, p27^{kip1} y p57^{kip2} trabajan pues sobre los complejos Ciclina D-Cdk4y6 y Ciclina E-Cdk2. Cuando los niveles de ciclina D aumentan, p27^{kip1} se balancea hacia esta, redistribuyéndose este desde E-Cdk2 hacia los complejos de la ciclina D, disminuyéndose así el influjo negativo de p27 sobre el complejo de la ciclina E y de alguna manera el complejo ciclina D-Cdk4 estimula al complejo E-Cdk2 al liberarlo de sus inhibidores (106,116). Además recientemente se ha demostrado como p21 y p27 activan a bajas concentraciones al complejo D-Cdk4 facilitando su ensamblaje y posiblemente su traslocación nuclear. De esta forma los embriones de ratones a los que se les ha anulado la expresión de p21 y p27 muestran a su vez una muy disminuida cantidad de complejo D-Cdk4 ensamblado activo (89).

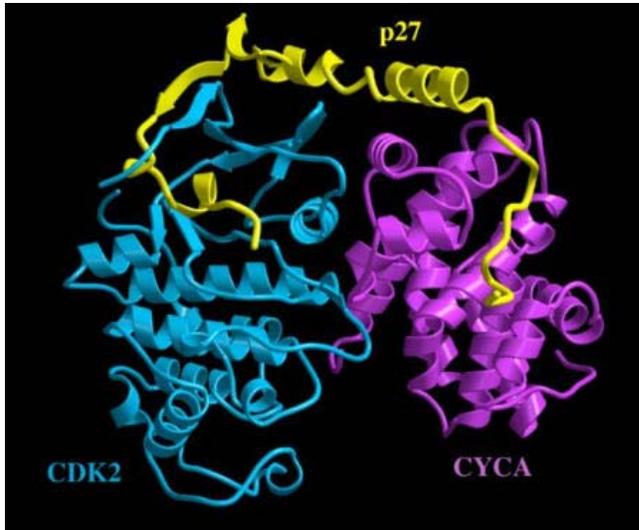


Fig. -12. El complejo fosforilado ciclina E-Cdk2 puede ser completamente inhibido por la familia de inhibidores Cip/Kip. En este caso, p27^{kip1} se encuentra unido al complejo ciclina-Cdk2 produciendo importantes cambios en el lugar activo de la quinasa transformándolo en inactivo.

P27 también interactúa dentro de la ciclina, en el lugar de reconocimiento del sustrato secundario.

En conclusión, P27 es un importante inhibidor de los complejos "ciclinas-quinasa dependientes de ciclinas", por lo que su papel es fundamental para enlentecer la entrada de la célula en el ciclo celular y controlar su mitosis.

2.3.1 REGULACIÓN POR SEÑALES FISIOLÓGICAS.

Existen varios factores que inducen la detención del ciclo celular, y a su vez, aumentan los niveles de P27: TGFβ (Factor de crecimiento tumoral): Favorece la detención del ciclo celular en las células epiteliales. Lo que hace es estimular la síntesis y unión de la proteína P15 a D1/CDK4, con ello se produce un balanceo de P27 en el sentido contrario al que hemos visto anteriormente con el aumento de concentración de ciclina D, en este caso P27 se desplaza inhibiendo con mayor fuerza al complejo E/CDK2 lo que inducirá una mayor inhibición a la célula para su entrada en el ciclo celular (124-126). También aumenta los niveles de P27, la ausencia de interleuquina (124) o del inhibidor mediado por contacto N-Carderín (125,126).

La sobreexpresión del gen supresor de tumores PTEN conduce a la supresión de la proliferación celular al bloquear la progresión del ciclo celular, produciendo un

aumento de los niveles de P27, un descenso de los niveles proteicos de ciclina D1 y la inhibición de la fosforilación de Akt (ver funciones de PTEN más adelante) (127).

Algunos factores de crecimiento, por el contrario, provocan una rápida disminución de la expresión de P27. En las células del cáncer de mama, los estrógenos estimulan la progresión del ciclo celular al disminuir la expresión de P27 y P21 (128,129). La Interleuquina 2 produce un descenso de la expresión de P27 en los linfocitos T, permitiéndose la activación del CDK2 y facilitando la entrada de la célula en la fase S (130). La mitosis inducida por el oncogén Ras reduce la expresión de P27 (131,132).

2.3.2 INTERACCIÓN DE P27^{kip1} CON DETERMINADAS ONCOPROTEINAS.

Los virus tumorales desarrollan ciertos mecanismos por los cuales disregulan el crecimiento celular normal. Los papilomavirus humanos (HPV) son responsables del carcinoma cervical y los productos de sus dos genes, E6 y E7, parecen ser las principales proteínas de la transformación (133). Diferentes estudios sobre cultivos celulares han mostrado que la oncoproteína E7 de los HPV tipo 16 es capaz de neutralizar o ignorar los efectos enlentecedores que sobre el ciclo celular producen los inhibidores de las ciclinas dependientes de quinasas, induciendo a las células malignas a la entrada en la fase S a pesar de la presencia de agentes antiproliferativos (134). Se ha comprobado que E7 puede antagonizar la capacidad de P27 para bloquear la unión de la ciclina E a la quinasa (135).

Recientemente se ha descrito un nuevo mecanismo por el cual las proteínas virales pueden superar los mecanismos de control de crecimiento celular. El herpes virus humano 8 (herpesvirus asociado al sarcoma de Kaposi), es capaz de codificar una ciclina que confiere resistencia al complejo CDK frente a sus inhibidores, se trata de la ciclina K. Esta forma un complejo activo con CDK6 que resiste la acción de los inhibidores P16^{INK4A}, P21^{CIP1} y P27^{KIP1}, al favorecer su fosforilación (136,137).

2.3.3 FUNCIÓN DE P27^{kip1} EN LA APOPTOSIS.

La apoptosis en los tumores ha sido objeto de interesantes estudios en los últimos años. Un balance entre la proliferación celular, el secuestro del ciclo celular y la apoptosis, regulan el número de células en un tejido. Existen evidencias que sugieren que la apoptosis suele ocurrir cuando las células se encuentran en la fase G1 del ciclo (138). La primera sugerencia sobre que P27 podría jugar un papel en los procesos apoptóticos proviene de las observaciones obtenidas de la sobreexpresión de P27 utilizando un sistema adenoviral en líneas celulares cancerosas (139). Los Adenovirus recombinantes que sobreexpresan P27 inducen apoptosis y secuestro del ciclo celular y la pérdida de la actividad de la ciclina CDK en células de cáncer de mama humano (140). La aparición de fenómenos espontáneos de apoptosis "*In vivo*", en algunos cánceres humanos con alta expresión de P27 es significativamente mayor a la detectada en cánceres con baja expresión de P27 (141).

En contraste a lo expuesto hasta ahora, otros autores han detectado un papel antiapoptótico de P27. En células carcinomatosas y en líneas celulares leucémicas, P27 se ha comportado como un antagonista de la apoptosis inducida por fármacos (142,143,144,145).

Dando cabida a los dos grupos de teorías sobre el papel de P27 en la apoptosis, Dimanche-Boitrel y cols. publican los resultados de sus investigaciones en las que comprueban como la sobreexpresión de P27 en células HT29 de cáncer de colon humano hace decrecer la tumorogénesis. Sin embargo, esta sobreexpresión de P27, hacía a los tumores significativamente más resistentes a la apoptosis inducida por doxorubicina (146).

2.4 LOS RATONES P27^{kip1} *KNOCKOUT*

2.4.1 FENOTIPO DE LOS RATONES P27^{kip1} *-/- KNOCKOUT.*

En los ratones homocigotos P27^{kip1}*-/-* no se aprecia una mayor tasa de letalidad embrionaria. En el momento del nacimiento son indistinguibles de los ratones *wildtype*, sin embargo, a partir de la 4^a o 5^a semana de vida se evidencia en muchos, aunque no en todos, un aumento de peso que se manifestará aún más con el aumento de la edad del animal. A pesar de su mayor tamaño, estos mutantes P27^{kip1}*-/-* guardan unas proporciones adecuadas a excepción de un aumento en el volumen de la bolsa escrotal de los machos adultos. Esta diferencia de tamaño no es secundaria a la obesidad ya que la mayoría de los órganos guardan también un aumento proporcional al aumento global del tamaño. Existen sin embargo, algunos órganos que presentan un agrandamiento aún mayor al que cabría esperar por este aumento total y son el timo, bazo, testículos, ovarios, glándula pituitaria, glándula adrenal y próstata. Los niveles séricos de hormona del crecimiento en estos mutantes *-/-* fue comparable a la hallada en otros ratones *wildtype* (147).

-Alteraciones en el timo: En las necropsias de los P27^{kip1}*-/-*, el timo se muestra agrandado globalmente y en ocasiones llega a cubrir totalmente el corazón, así mismo se encuentra igualmente aumentada la cantidad de timocitos. La histopatología muestra una arquitectura relativamente conservada. Se piensa que un 97% de los timocitos mueren durante la selección (148), y la responsable del agrandamiento del timo pudiera ser una menor sensibilidad a los procesos de apoptosis, (147).

-Hiperplasia testicular y ovárica: Un examen macroscópico muestra un aumento del doble de tamaño para los testículos y ovarios de los ratones P27^{kip1}*-/-*. El estudio histopatológico, al igual que en el timo, no muestra grandes desestructuraciones a excepción de una remarcable hiperplasia. Los machos *Knockout* son fértiles indicando un desarrollo estructural y funcional normal de los espermatozoides, sin embargo, las

hembras mutantes son estériles. En ellas es posible detectar a partir de la cuarta semana de vida la presencia de folículos atípicos con hiperplasia de células granulosas, así mismo el endometrio y tejido intersticial intrauterino aparece hiperplásico, lo que sugiere una alta producción de estrógenos desde los folículos ováricos (147).

-Alta incidencia de tumores pituitarios: Los ratones heterocigotos para la mutación del gen de la proteína del Rb, o los homocigotos quiméricos, pues como hemos visto anteriormente los homocigotos totales no son viables, tienen una alta predisposición a desarrollar tumores del lóbulo pituitario intermedio (149-151). Dada la conexión biológica entre P27 y la proteína del Rb, es lógico pensar que la glándula pituitaria pudiera estar afectada también en estos.

Los ratones P27 $-/-$ muestran un desarrollo hiperplásico de la glándula, a las cuatro semanas de vida, el tamaño de esta es dos veces superior al de los ratones *wildtype*. El estudio histopatológico muestra una hiperplasia del lóbulo hipofisario intermedio, estructura vestigial en los humanos, mientras que los lóbulos anteriores y posteriores mantienen una arquitectura conservada. En la mitad de los ratones mutantes se encuentran tumores pituitarios, originados a las 12 semanas de vida desde el lóbulo intermedio, tumores que histológicamente pueden ser clasificados como "adenomas pituitario benignos" que no muestran tendencia a la invasión o metástasis al menos en los primeros siete meses de vida (147).

2.4.2 MORFOLOGÍA RETINIANA EN RATONES P27^{kip1} $-/-$ KNOCKOUT.

Nakayama y cols (147) estudian la morfología y electrofisiología de las retinas de los ratones P27 $-/-$. Los resultados de los estudios histopatológicos con microscopía óptica de estos ratones, mostraron una marcada desorganización de las capas celulares de la retina neural. La capa granular externa, compuesta por los núcleos de los fotorreceptores, invadía la capa de conos y bastones más allá de la membrana limitante externa (Fig.-13).

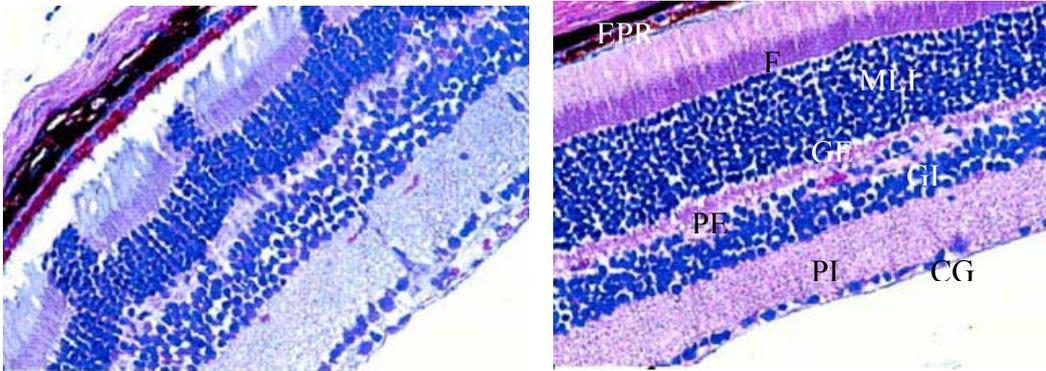


Fig.13.- Secciones histológicas de las retinas de dos ratones de 3 semanas de edad P27+/+ (derecha) y P27 -/- (izquierda). En la figura de la izquierda obsérvense las rosetas formadas por la penetración de los núcleos de los receptores en la capa de conos y bastones. (Nakayama y cols.; 1996). Abreviaturas CG: capa de células ganglionares, PI: plexiforme interna, GI: granular interna, PE: plexiforme externa, GE: granular externa, MLE: membrana limitante externa, F: fotorreceptores, EPR: epitelio pigmentario de la retina.

La membrana limitante externa era irregular y poco reconocible en algunas zonas. La granular interna presentaba un aumento en el número de células amacrinas y de células de soporte de Müller así como desorganización de la malla de fibras celulares. El epitelio pigmentario se mostraba engrosado y las células que lo componen, de mayor tamaño.

En cuanto a la electrofisiología de las retinas de los P27-/-, los electrorretinogramas realizados mostraban la existencia de dos ondas, la "a" generada principalmente por los fotorreceptores y la "b" generada por la células bipolares. Los electrorretinogramas de los P27-/- mostraron una reducción dos veces inferior de la onda "a" y "b" a la hallada en los ratones *wildtype* y estas alteraciones eran más marcadas según correspondieran a los animales con alteraciones más importantes en la histología.

En ningún caso se detectó la presencia de retinoblastomas en estos animales *Knockout*.

3. El modelo PTEN *Knockout*

3.1 IDENTIFICACIÓN Y FUNCIÓN DEL PTEN.

En 1997, dos grupos de investigación, del Columbia University Cancer Center y del MD Anderson Cancer Center identificaron un nuevo gen supresor de tumores: PTEN/MMAC1 (phosphatase and tensin homologue deleted from chromosome ten/ mutated in multiple advanced cancers) (152,153), cuya inactivación puede producir la progresión maligna en tumores de mama, próstata y cerebro. El gen PTEN se localiza en el locus cromosómico 10q23. Su cDNA codifica una proteína de 403 aminoácidos y 47KD.

PTEN es una proteína citoplasmática observable mediante inmunofluorescencia (154,155). Al ser una fosfatasa lipídica, actúa con su diana, el PIP3 (phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate). PIP3 es un mensajero interno para ciertos estimuladores del crecimiento celular como insulina y el factor de crecimiento epidérmico (EGF). La unión de estas moléculas a sus receptores de la membrana celular activa una enzima que genera PIP3 mediante la adición de un tercer fosfato a su predecesor, PIP2. PIP3 activa otras kinasas, y éstas hacen que la célula entre en el ciclo celular progresando en él, e impidiendo la iniciación del programa de apoptosis. PTEN, como fosfatasa que es, puede retirar el fosfato de PIP3, frenándose así la señal de crecimiento celular (156) Fig. 14.-

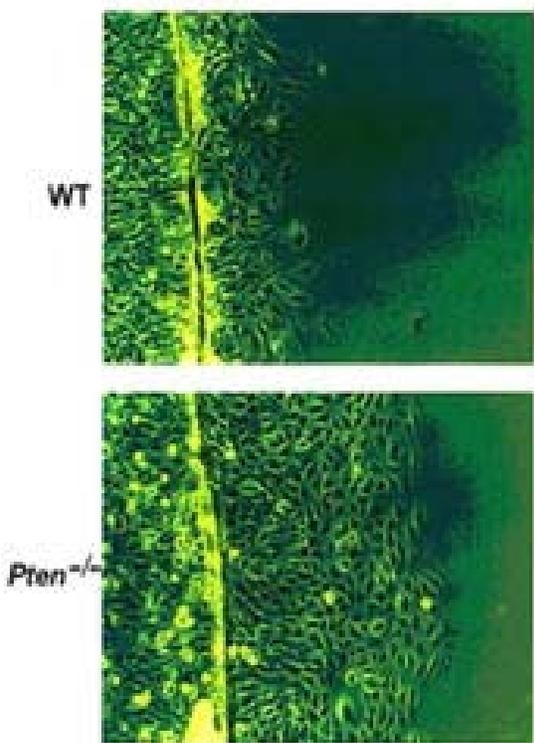


Fig.14.- La anulación del gen PTEN en cultivos celulares, sobre células madre induce un aumento de la división celular al quedar inhibida la capacidad de este gen para inducir al secuestro celular en las fases iniciales de la mitosis, así como también su capacidad de inducción de apoptosis. (de LI DM, SUN H; 1998).

Se han identificado algunas deleciones y mutaciones del gen PTEN en una larga lista de tumores que incluyen glioblastomas y cánceres de endometrio o de próstata. Los ratones heterocigotos para una mutación que inactiva uno de los dos genes PTEN desarrollan procesos de hiperplasia y displasia y una alta incidencia de tumores espontáneos de diversos orígenes histológicos (157-159).

3.1.2 UNA FOSFATASA "PEREZOSA".

PTEN contiene un dominio de protein-tirosín-fosfatasa con funciones semejantes a la "fosfatasa de especificidad dual" que es capaz de desfosforilar tanto la tirosina como la serina/treonina residuales. Sin embargo PTEN es una proteín-fosfatasa inactiva *in vitro*, pero muy activa frente a sustratos altamente ácidos, lo que sugiere que el sustrato de PTEN pudieran no ser las proteínas sino el fosfatidinositol [3,4,5]-trifosfato (PIP-3) como parece probado (160).

3.1.3 APOPTOSIS Y CONTROL DEL CICLO CELULAR.

El descubrimiento del PIP-3 como el principal sustrato de PTEN, hizo comprensible su actuación en determinadas vías del ciclo celular. (Fig. 15).

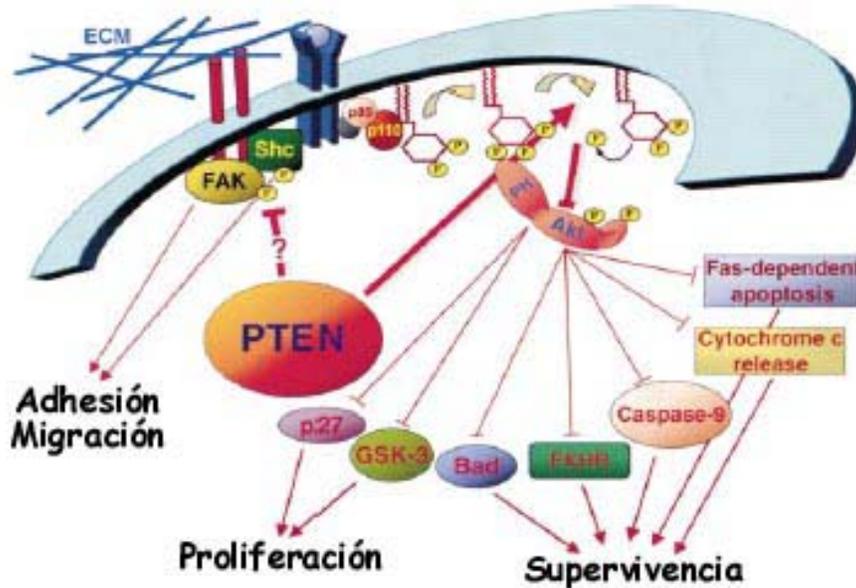


Fig.15. - Papel de PTEN en el control celular, muerte y proliferación: La activación de la quinasa PIP-3 por el factor de crecimiento o la matriz extracelular, inicia la síntesis del PIP3, el cual a su vez puede ser desfosforilado por PTEN, pasando a fosfatidilinositol (4,5)-difosfato (PIP2). La Akt que se une a PIP-3 queda fosforilada y activada. En ausencia de PTEN, la Akt activada fosforila e inactiva a los FKHR (forkhead), familia de factores de transcripción, a la proteína proapoptótica BAD y Caspase-9, y bloquea la liberación del citocromo c y la apoptosis dependiente de FAS por mecanismos aún desconocidos. El resultado de todo esto es la protección celular frente a determinados estímulos apoptóticos. Por otro lado, la activación de Akt, también disminuye los niveles de P27 e inactiva GSK-3, resultando esto en una estabilización de las ciclinas D1 y produciéndose así un incremento en la proliferación celular. PTEN debe interactuar de algún modo aún desconocido, en la desfosforilación de los factores FAK y Shc, disminuyéndose de esta manera la separación y motilidad celular al disminuirse la adhesión focal y las señales de la quinasa MAP (Di Cristofano and Pandolfi; 1998).

Los niveles de PIP-3 son bajos en las células en reposo pero rápidamente aumentan sus niveles tras la activación de la quinasa PIP-3 por los factores de crecimiento. La acumulación del PIP-3 en la membrana celular facilita la unión de este a proteínas, entre ellas Akt. La activación de la Akt es un conocido mecanismo de supervivencia, la cual ejerce una importante actividad antiapoptótica al impedir la liberación del citocromo-c de la mitocondria e inactivar los factores de transcripción FKHR, de los cuales se sabe que inducen la expresión de los genes cruciales para el inicio de la apoptosis. Además, Akt fosforila e inactiva los factores proapoptóticos BAD y caspase-9 (161).

De todo lo visto hasta el momento, se desprende que, la función de PTEN es mantener bajos los niveles de PIP-3. De la pérdida de la función de PTEN resulta un incremento de la concentración de PIP-3 y por lo tanto la hiperactivación de Akt, protegiendo a la célula de la apoptosis y facilitando su entrada en el ciclo celular (162).

La sobreexpresión de PTEN en gliomas y cánceres de mama produce la inactivación de Akt y la inducción del proceso de apoptosis por una determinada vía conocida como "anoikis", la cual consiste en la inducción a la apoptosis iniciada tras la separación de la célula de la matriz extracelular. De esta forma, el papel de PTEN sobre el control de la "anoikis" es particularmente relevante porque las mutaciones PTEN se asocian frecuentemente a tumores con gran capacidad metastática (163).

3.1.4 RELACIÓN ENTRE PTEN Y P27^{kip1}.

También la sobreexpresión de PTEN en determinadas variedades de líneas celulares cancerosas ha permitido ampliar más el conocimiento de su función en el ciclo celular y la supresión de tumores. Así en ausencia de estímulos apoptóticos externos y en presencia de factores de crecimiento, la restauración del gen PTEN de células *wildtype* en líneas celulares PTEN -/- incluyendo a glioblastomas y células cancerosas

de riñón y mama, produce la inmediata detención del ciclo celular en la fase G1 (164). Esta detención en la fase G1 se realiza por la influencia positiva que PTEN realiza sobre P27, que a su vez inhibía la fosforilación sobre la proteína del retinoblastoma, como ya estudiamos en el anterior modelo experimental P27^{-/-}. Por tanto, los niveles de la proteína P27 se reducen en células PTEN^{-/-} (165), y además se ha comprobado como PTEN no induce la detención del ciclo celular en la fase G1 en líneas celulares Rb^{-/-} (*Knockout* para el gen del retinoblastoma) hasta que esta proteína es transferida (166). En relación con esto, se vio como la sobreexpresión de PTEN en determinadas líneas celulares cancerosas de glioblastoma (LN229), no inducía la detención del ciclo celular, pensándose que en este caso debe existir también alguna alteración en la vía de la fosforilación de la proteína del Rb.

Por otro lado Di Cristofano y cols. (167) demuestran la cooperación entre PTEN y P27 en el cáncer prostático a partir de un modelo de ratón doble *Knockout* para estos dos genes.

3.1.5 PTEN, ¿DETENCIÓN DEL CICLO CELULAR O APOPTOSIS?.

De los diferentes estudios sobre líneas cancerosas celulares, parece deducirse que en ausencia de estímulos apoptóticos concretos, como el "despegamiento entre las células", FAS,...PTEN ejerce su poder supresor al menos inicialmente a través de su capacidad de secuestro celular en la fase G1. En determinados modelos, PTEN puede inducir al proceso de apoptosis tras el secuestro en la fase G1 como consecuencia de la inhibición mediada por PTEN de los factores de crecimiento.

3.2 RATONES KNOCKOUT PTEN -/-.

Los ratones PTEN *knockout* revelan un papel fundamental de este gen en el desarrollo embrionario. Así la completa inactivación del gen trae como consecuencia la muerte del embrión entre los días 6 y 9 postcoito. Las células madre embrionarias muestran una profunda alteración en la capacidad de diferenciación hacia cuerpos embrionarios *in vitro*. El estudio de los embriones mutantes muestra una pobre organización del ectodermo y mesodermo y un sobrecrecimiento de las regiones cefálica y caudal con patrones de crecimiento aberrantes. Sin embargo, sigue sin estar claro qué línea primaria de diferenciación es disregulada tras la mutación PTEN. Tampoco está claro si la diferenciación celular aberrante contribuye a la transformación neoplásica en tumores mutantes PTEN. (157,158).

3.3. RATONES KNOCKOUT PTEN +/-.

Los ratones mutantes heterocigotos PTEN muestran a partir de los 6 meses lesiones semejantes a las observadas en el síndrome de Cowden en los humanos. El 50% de estos ratones hembras desarrollan cánceres de mama, prácticamente en el 100% aparecieron hiperplasias endometriales y de ellos el 22% evolucionó a cáncer. También es frecuente observar hamartomas dispersos a lo largo del tracto gastrointestinal así como neoplasias adrenales y prostáticas. El modelo experimental PTEN +/- brinda pues una herramienta inmejorable para el estudio de los síndromes asociados a hamartomas así como del papel de PTEN en la carcinogénesis de mama y endometrio (168,169).

3.4 OFTALMOLOGÍA Y PTEN. DESARROLLO DEL OJO EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE DROSOPHILA.

He Huang y cols. (170) estudian el efecto de la anulación y sobreexpresión del gen PTEN sobre el ojo de la mosca *Drosophila*, llegando a las siguientes conclusiones:

-La pérdida de la función del gen PTEN de la mosca, afecta al tamaño aunque no al patrón evolutivo y estructural del ojo en desarrollo. Desarrollan un modelo quimérico de mosca donde en diferentes grupos celulares se les suprime la funcionalidad de PTEN por medio de radiación. De esta forma obtienen insectos con ojos quiméricos que poseen ommatidias (cada una de las 700 unidades individuales de las que se compone el ojo de este insecto y que contienen idénticas cantidades de fotorreceptores y células accesorias) con una carga genética completa y otras con la mutación de PTEN. Los autores demuestran como las ommatidias mutantes presentan un tamaño mayor que sus vecinas normales, sin embargo el estudio microscópico de las secciones reveló en las ommatidias mutantes una composición y orientación de los fotorreceptores normales, aún con un aumento de su tamaño y la presencia de estructuras vacuolares.

-La sobreexpresión del gen PTEN inhibe la proliferación celular durante el desarrollo ocular: Los autores sobreexpresan el gen PTEN durante el desarrollo ocular, para ello utilizan un sistema de sobreexpresión génico descrito por Brand y Perrimon (171). El resultado es la comprobación final de una espectacular reducción en el tamaño del disco ocular, hasta el punto de que si aumentaba considerablemente la expresión de este gen se llegaba incluso a casos de anoftalmia. Además, concluyen los autores que esta reducción en el tamaño es consecuencia del efecto sobre la inhibición de la proliferación celular impuesta por PTEN más que por un fallo en su diferenciación. Así comprobaron como en estos ojos, siendo su tamaño mucho menor, presentaban todos

los tipos de células fotorreceptoras, regularidad del Epitelio Pigmentario y una diferenciación neural conservada en la región retroocular.

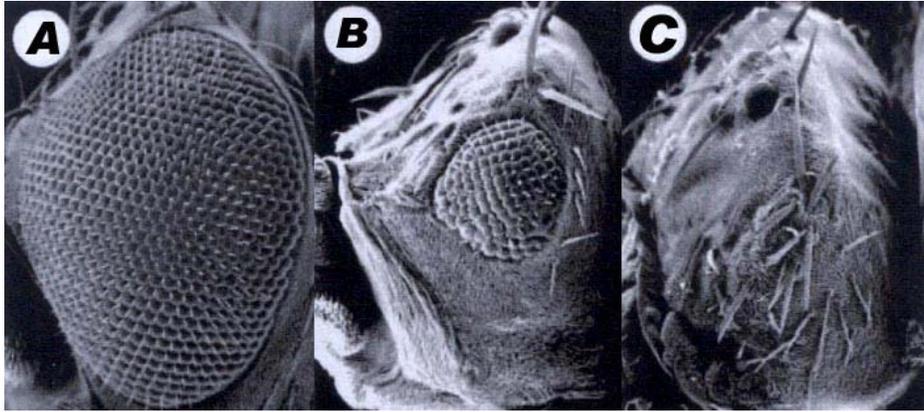


Fig. 17. - La sobreexpresión del gen PTEN produce la disminución en el tamaño del disco ocular (b) al compararlo con los ojos *wildtype* (a) o incluso la anoftalmia (c). He Huang y cols. ; 1999.

3.5 SÍNDROMES HUMANOS ASOCIADOS A LA ALTERACIÓN DE PTEN.

Síndrome de Cowden

También llamado "Síndrome de múltiples hamartomas", fue descrito por primera vez por Lloyd y Dennis en 1963 y puede ser considerado parte de otras enfermedades sistémicas hamartomatosas como la esclerosis tuberosa o el Von-Hippel-Lindau. Los hamartomas son por definición tumores benignos o proliferaciones de células o tejidos maduros en sus lugares originarios en contraposición a los coristomas.

El síndrome de Cowden es una enfermedad genética rara, de herencia autosómica dominante y causada por un defecto en el gen supresor de tumores PTEN.

Su cuadro clínico se caracteriza por: Afectación idéntica sobre varones y mujeres. Edad de detección entre la 1ª y 3ª década de la vida. Presencia de hamartomas

cutáneos y en mucosa, tracto gastrointestinal, hueso, SNC, etc..., cáncer de mama, cáncer tiroideo, hiperplasia gingival y papilomatosis perioral (172). En oftalmología se ha asociado a miopía, cataratas, estrías angioides, uveítis y glaucoma (173).

Síndrome de Bannayan.

Síndrome de herencia autosómica dominante. Muy cercano al Cowden, junto a múltiples hamartomas se caracteriza por la presencia de macrocefalia, e hipotonía muscular. Los hamartomas crecen a modo de pólipos intestinales, lipomas subcutáneos y viscerales, así como malformaciones vasculares frecuentes. La base genética de este síndrome está también ligado a una alteración del gen PTEN (174).

Enfermedad de Lhermitte-Duclos.

También muy cercana al síndrome de Cowden, se caracteriza por la presencia de hamartomas cerebrales y por el sobrecrecimiento de células granulares hipertrofiadas en el cerebelo (175).

Material y **Métodos.**

MATERIAL Y METODOS.

En este apartado describiremos la procedencia de los animales de experimentación, sus características en cuanto a peso y niveles séricos de colesterol y triglicéridos, la descripción de los medios e instrumental empleado, así como los protocolos en cada uno de los ensayos efectuados y los métodos de obtención y procesamiento de los datos.

ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.

Para llevar a cabo este trabajo experimental se han empleado un total de 200 ratones divididos en cinco grupos experimentales:

- Grupo control, compuesto por ratones *wildtype* y cuya denominación a lo largo del trabajo será "CONTROL".
- Grupo ApoE *Knockout*, formado por ratones homocigotos -/- para el gen ApoE y cuya denominación de ahora y en adelante será "Apo E".
- Grupo ApoE *Knockout*, formado por ratones homocigotos -/- que además han sido alimentados con una dieta hipercolesterolémica y que llamaremos "ApoE + D".
- Grupo PTEN *Knockout*, formado por ratones heterocigotos -/+, dada la no viabilidad de los homocigotos y cuyo nombre será "PTEN"
- Por último contaremos con un grupo P27 *Knockout* formado por ratones homocigotos -/- para el gen P27 y se denominará grupo "P27".

Además para facilitar la rápida identificación de cada uno de los grupos en las tablas y gráficas que mostraremos a lo largo de esta tesis, hemos asignado a cada grupo un color, configurando entre ellos un "código de colores" identificativo y que mostraremos a continuación.



Fig. 17.- Código de colores identificativo de cada grupo del estudio.

Todos los ratones procedieron del estabulario del Instituto de Biomedicina del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (Valencia), donde fueron cedidos por el departamento de biología vascular. Cada uno de los animales fue utilizado también, y una vez sacrificados, para estudios de investigación llevados a cabo por ese departamento, respetándose siempre la cabeza de los ratones que nos fue proporcionada para el desarrollo de este proyecto de tesis. El trabajo de genotipado por análisis "PCR" de las camadas fue llevado a cabo por los Drs. Díez-Juan y V. Andrés, del citado departamento.

Los animales crecieron en condiciones constantes de luz y oscuridad, temperatura, humedad, etc.. Todos los experimentos se efectuaron de acuerdo a la normativa vigente (European Communities Council Directive of November 24th, 1986, 86/609/EEC), con el fin de minimizar el sufrimiento animal y reducir el número de animales sacrificados. Todos ellos dispusieron de alimentos y agua "*ad libitum*".

Los ratones pertenecientes al grupo ApoE y ApoE+D procedían de la cepa C57BL/6X129Sv de J Osada, (Zaragoza) y fueron genotipados previamente para su estudio. Dado el doble efecto que sufren estos ratones, por un lado su alteración genética y por otro los altos niveles de colesterol y triglicéridos, nos planteamos en nuestro trabajo introducir un grupo de ratones ApoE que presentaran niveles aún más altos de lípidos con el fin de tratar de hallar diferencias significativas entre estos dos grupos ApoE -/- y que nos orientaran, en cierto modo, a atribuir la responsabilidad de las alteraciones halladas más a su hiperlipidemia que a la no expresión de ApoE. A

tal fin alimentamos al grupo de ratones ApoE+D con una dieta hipercolesterolémica (colesterol 1.25%, grasa 15.8%. TD 88051, Harlan/Teklad, Madison, WI). Las muestras de sangre para la determinación de colesterol y triglicéridos plasmáticos se obtuvo de las colas de los ratones y fueron procesadas por métodos enzimáticos (Sigma, St. Louis, MO).

Dieta Harlan!Teklad, TD 88051	
Purina Mouse Chow	750 g/kg
Casein, High protein	75 g/kg
Dextrose, monohydrate	25 g/kg
Sucrose	16,25 g/kg
Dextrin	16,25 g/kg
Cocoa Butter	75 g/kg
Cholesterol	12,5 g/kg
Sodium Cholate	5 g/kg
Cellulose (fiber)	12,5 g/kg
Mineral Mix	8,75 g/kg
Vitamin Mix	2.5 g/kg
Choline Chloride	1.25 g/kg

Tabla 2.- Dieta hipercolesterolémica utilizada en el grupo ApoE+D.

Los ratones del grupo PTEN fueron cedidos por Pier Paolo Pandolfi, y procedían de la cepa C57BL/6J.

Los ratones del grupo P27, de la cepa C57BL/6, provistos por Serrano (Madrid), eran heterocigotos para la mutación P27 -/+, dado que las hembras homocigotas de este grupo son estériles. Así se fueron apareando machos homocigotos con hembras heterocigotas. Cada camada tuvo que ser genotipada por análisis de "PCR" para identificar a los individuos homocigotos, incluyéndolos en el estudio y rechazando a los heterocigotos.

A continuación mostraremos cinco tablas (Tablas 3,4,5,6,7) en las que quedan reflejadas, por grupos, las características de cada uno de los ejemplares utilizados. En la primera columna figura el número identificativo de cada animal, al que haremos referencia posteriormente cuando utilicemos un animal en concreto para algún

experimento. En las columnas siguientes figura la edad, sexo y peso de cada ratón. Adicionalmente, en los grupos Control, ApoE y ApoE+D se muestran los niveles séricos de colesterol y triglicéridos (mg/dl). En la columna de la derecha de cada tabla consta el experimento para el que se utilizó al animal: MO y ME corresponden a las observaciones realizadas bajo microscopía óptica o electrónica, INMUNOS hace referencia a las técnicas de inmunocitoquímica, ESCAPE corresponde a los animales que fueron sometidos al "test de escape" y por último, "*western-blot*" al estudio de anticuerpos sobre retinas y nervios ópticos realizados con esta técnica.

Wildtype						
Ejemplar	Edad.	Sexo	Peso (gr.)	Coolesterol.	Tgs.	Experimento
001	5 m.	♂	28.6	118	45	MO y ME
002	5 m.	♂	29	117	44	MO y ME
003	5 m.	♂	26	121	42	MO y ME
004	5 m.	♂	27.7	124	55	MO y ME
005	5 m.	♂	28.6	123	61	MO y ME
006	5 m.	♂	26	112	42	MO y ME
007	5 m.	♂	29	111	49	MO y ME
008	5 m.	♂	27.5	121	51	MO y ME
009	5 m.	♂	26.5	98	53	MO y ME
010	5 m.	♂	28.1	121	43	MO y ME
011	5 m.	♂	26	117	44	MO y ME
012	5 m.	♂	25.5	109	48	MO y ME
013	5 m.	♂	26.2	112	51	MO y ME
014	5 m.	♂	24	124	43	MO y ME
015	4 m.	♂	26.5	112	44	MO y ME
016	4 m.	♂	26.4	114	42	INMUNOS
017	4 m.	♂	26.7	126	47	INMUNOS
018	4 m.	♂	26.8	118	43	INMUNOS
019	5 m.	♂	27.5	114	46	INMUNOS
020	5 m.	♂	26.5	121	51	INMUNOS
021	5 m.	♂	26.7	119	53	INMUNOS
022	5 m.	♂	27.6	126	49	INMUNOS
023	5 m.	♂	28.1	119	42	ESCAPE
024	5 m.	♂	27.6	123	61	ESCAPE
025	5 m.	♂	27	117	45	ESCAPE
026	4 m.	♂	26.5	126	43	ESCAPE
027	5 m.	♂	30	117	48	ESCAPE
028	5 m.	♂	26.7	114	51	ESCAPE
029	5 m.	♂	24.5	118	52	Western-Blot
030	5 m.	♂	27.3	128	52	Western-Blot
031	5 m.	♂	26.7	97	42	Western-Blot
032	5 m.	♂	28.3	119	44	Western-Blot
033	4 m.	♂	27.2	108	42	Western-Blot
034	4 m.	♂	28.1	129	46	Western-Blot
035	5 m.	♂	26.9	131	49	Western-Blot
036	5 m.	♀	22	101	50	Western-Blot
037	5 m.	♀	21	132	46	Western-Blot
038	5 m.	♀	23.4	121	48	Western-Blot
039	5 m.	♀	23	111	43	Western-Blot
040	5 m.	♀	24.5	117	51	Western-Blot

Tabla 3. - Descripción de los animales del grupo Control.

ApoE						
Ejemplar	Edad.	Se xo	Peso (gr.)	Coolest erol.	Tgs.	Experimento
001	5 m.	♂	28,6	298	70	MO y ME
002	5 m.	♂	29	304	68	MO y ME
003	5 m.	♂	26	287	74	MO y ME
004	5 m.	♂	27,7	312	65	MO y ME
005	5 m.	♂	31	309	71	MO y ME
006	5 m.	♂	27,1	302	70	MO y ME
007	5 m.	♂	27,6	298	84	MO y ME
008	5 m.	♂	31,9	301	59	MO y ME
009	5 m.	♂	31,3	295	61	MO y ME
010	5 m.	♂	27,1	287	71	MO y ME
011	5 m.	♂	27,6	342	74	MO y ME
012	5 m.	♂	31,9	267	79	MO y ME
013	5 m.	♂	26,5	297	72	MO y ME
014	5 m.	♂	26,9	298	74	MO y ME
015	4 m.	♂	24,9	231	67	MO y ME
016	4 m.	♂	23,4	321	59	INMUNOS
017	4 m.	♂	27,1	323	69	INMUNOS
018	4 m.	♂	25,6	312	62	INMUNOS
019	5 m.	♂	23,5	321	64	INMUNOS
020	5 m.	♂	22,6	387	65	INMUNOS
021	5 m.	♂	27,5	312	74	INMUNOS
022	5 m.	♂	24,3	321	79	INMUNOS
023	5 m.	♂	26,5	215	72	ESCAPE
024	5 m.	♂	26	245	75	ESCAPE
025	5 m.	♂	27	287	73	ESCAPE
026	4 m.	♂	28,3	231	68	ESCAPE
027	5 m.	♂	28,5	275	64	ESCAPE
028	5 m.	♂	26,5	279	65	ESCAPE
029	5 m.	♂	24,4	321	71	Western-Blot
030	5 m.	♂	28,5	309	75	Western-Blot
031	5 m.	♂	29,2	310	74	Western-Blot
032	5 m.	♂	25,6	321	73	Western-Blot
033	4 m.	♂	28,5	305	71	Western-Blot
034	4 m.	♂	26,5	312	74	Western-Blot
035	5 m.	♂	27,4	301	73	Western-Blot
036	5 m.	♀	23,3	245	74	Western-Blot
037	5 m.	♀	22,5	267	65	Western-Blot
038	5 m.	♀	26,4	298	64	Western-Blot
039	5 m.	♀	21,1	276	66	Western-Blot
040	5 m.	♀	19,6	265	69	Western-Blot

Tabla 4.- Descripción de los animales del grupo ApoE.

ApoE + Dieta						
Ejemplar	Edad.	Se xo	Peso (gr.)	Colest erol.	Tgs.	Experimento
001	5 m.	♂	25	1543	521	MO y ME
002	5 m.	♂	25,5	1678	543	MO y ME
003	5 m.	♂	30,4	1567	574	MO y ME
004	5 m.	♂	26,1	1587	543	MO y ME
005	5 m.	♂	26,3	1543	523	MO y ME
006	5 m.	♂	24,7	1698	609	MO y ME
007	5 m.	♂	26,1	1589	479	MO y ME
008	5 m.	♂	25,8	1583	532	MO y ME
009	5 m.	♂	24,4	1648	587	MO y ME
010	5 m.	♂	24,3	1634	532	MO y ME
011	5 m.	♂	24,7	1522	543	MO y ME
012	5 m.	♂	25,2	1698	598	MO y ME
013	5 m.	♂	25,9	1732	523	MO y ME
014	5 m.	♂	26,8	1548	467	MO y ME
015	4 m.	♂	25,9	1687	654	MO y ME
016	4 m.	♂	24,5	1698	523	INMUNOS
017	4 m.	♂	25,5	1673	587	INMUNOS
018	4 m.	♂	24,4	1787	578	INMUNOS
019	5 m.	♂	25,4	1537	598	INMUNOS
020	5 m.	♂	26,1	1587	538	INMUNOS
021	5 m.	♂	27,3	1698	530	INMUNOS
022	5 m.	♂	26,4	1698	467	INMUNOS
023	5 m.	♂	24,7	1673	423	ESCAPE
024	5 m.	♂	25,1	1764	543	ESCAPE
025	5 m.	♂	24,9	1654	533	ESCAPE
026	4 m.	♂	24,6	1795	547	ESCAPE
027	5 m.	♂	24,8	1641	675	ESCAPE
028	5 m.	♂	25,7	1765	654	ESCAPE
029	5 m.	♂	26,7	1654	543	Western-Blot
030	5 m.	♂	25,9	1683	537	Western-Blot
031	5 m.	♂	25,9	1721	573	Western-Blot
032	5 m.	♂	23,9	1643	593	Western-Blot
033	4 m.	♂	29,7	1733	547	Western-Blot
034	4 m.	♂	26,7	1722	436	Western-Blot
035	5 m.	♂	26,7	1543	576	Western-Blot
036	5 m.	♀	27,1	1546	587	Western-Blot
037	5 m.	♀	23	1622	536	Western-Blot
038	5 m.	♀	22,1	1723	537	Western-Blot
039	5 m.	♀	19,7	1678	587	Western-Blot
040	5 m.	♀	16,7	1632	536	Western-Blot

Tabla 5. - Descripción de los animales del grupo ApoE+D.

PTEN				
Ejemplar	Edad.	Sexo	Peso (gr.)	Experimento
001	5 m.	♂	30	MO y ME
002	5 m.	♂	28,2	MO y ME
003	5 m.	♂	29,8	MO y ME
004	5 m.	♂	29,8	MO y ME
005	5 m.	♂	28,9	MO y ME
006	5 m.	♂	28,7	MO y ME
007	5 m.	♂	28,6	MO y ME
008	5 m.	♂	29,2	MO y ME
009	5 m.	♂	29,5	MO y ME
010	5 m.	♂	29,9	MO y ME
011	5 m.	♂	28,3	MO y ME
012	5 m.	♂	29,5	MO y ME
013	5 m.	♂	29,9	MO y ME
014	5 m.	♂	28,4	MO y ME
015	4 m.	♂	28,6	MO y ME
016	4 m.	♂	28,5	INMUNOS
017	4 m.	♂	29,7	INMUNOS
018	4 m.	♂	29,5	INMUNOS
019	5 m.	♂	31,4	INMUNOS
020	5 m.	♂	30,8	INMUNOS
021	5 m.	♂	29,5	INMUNOS
022	5 m.	♂	30,3	INMUNOS
023	5 m.	♂	31,3	ESCAPE
024	5 m.	♂	29,2	ESCAPE
025	5 m.	♂	28,8	ESCAPE
026	4 m.	♂	28,4	ESCAPE
027	5 m.	♂	29,6	ESCAPE
028	5 m.	♂	27,8	ESCAPE
029	5 m.	♂	29,36	Western-Blot
030	5 m.	♂	3	Western-Blot
031	5 m.	♂	29,5	Western-Blot
032	5 m.	♂	30,8	Western-Blot
033	4 m.	♂	28,6	Western-Blot
034	4 m.	♂	28,5	Western-Blot
035	5 m.	♂	28,4	Western-Blot
036	5 m.	♀	26,3	Western-Blot
037	5 m.	♀	25,5	Western-Blot
038	5 m.	♀	27,9	Western-Blot
039	5 m.	♀	26,2	Western-Blot
040	5 m.	♀	27,4	Western-Blot

Tabla 6. - Descripción de los animales del grupo ATEN.

P27				
Ejemplar	Edad.	Sexo	Peso (gr.)	Experimento
001	5 m.	♂	32,8	MO y ME
002	5 m.	♂	31,4	MO y ME
003	5 m.	♂	31,5	MO y ME
004	5 m.	♂	30,2	MO y ME
005	5 m.	♂	30,3	MO y ME
006	5 m.	♂	31,8	MO y ME
007	5 m.	♂	31,6	MO y ME
008	5 m.	♂	32,6	MO y ME
009	5 m.	♂	31,4	MO y ME
010	5 m.	♂	32,3	MO y ME
011	5 m.	♂	31,3	MO y ME
012	5 m.	♂	32,1	MO y ME
013	5 m.	♂	30,4	MO y ME
014	5 m.	♂	28,9	MO y ME
015	4 m.	♂	29,9	MO y ME
016	4 m.	♂	29,7	INMUNOS
017	4 m.	♂	30,3	INMUNOS
018	4 m.	♂	31,9	INMUNOS
019	5 m.	♂	32,9	INMUNOS
020	5 m.	♂	33	INMUNOS
021	5 m.	♂	32,8	INMUNOS
022	5 m.	♂	32,9	INMUNOS
023	5 m.	♂	28,6	ESCAPE
024	5 m.	♂	32	ESCAPE
025	5 m.	♂	31,9	ESCAPE
026	4 m.	♂	27,5	ESCAPE
027	5 m.	♂	27,6	ESCAPE
028	5 m.	♂	27,4	ESCAPE
029	5 m.	♂	29,5	Western-Blot
030	5 m.	♂	28,4	Western-Blot
031	5 m.	♂	29,2	Western-Blot
032	5 m.	♂	32,3	Western-Blot
033	4 m.	♂	32,1	Western-Blot
034	4 m.	♂	31,6	Western-Blot
035	5 m.	♂	31,4	Western-Blot
036	5 m.	♀	28,9	Western-Blot
037	5 m.	♀	26,8	Western-Blot
038	5 m.	♀	28,9	Western-Blot
039	5 m.	♀	28,4	Western-Blot
040	5 m.	♀	27,8	Western-Blot

Tabla 7. - Descripción de los animales del grupo P27.

OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS.

Las muestras de los globos oculares y nervios ópticos se obtuvieron tras anestesiarse a los ratones en cámara de éter, posteriormente eran sacrificados por medio de una guillotina e inmediatamente extraíamos los globos oculares bajo control con lupa de grandes aumentos.

El párpado del animal ya sacrificado era abierto y por medio de unas pinzas curvas, que deslizábamos hasta la región retrobulbar, el globo ocular era luxado obteniéndose una muestra que contenía el propio globo y el nervio óptico correspondiente a la región intraorbitaria, (Fig.- 18A). Posteriormente, los globos eran separados de los nervios ópticos, aislando cuidadosamente algunos restos de grasa orbitaria que pudiera quedar adherida (Fig.- 18B). En las córneas de los globos oculares realizamos una amplia paracentesis con un cuchillete quirúrgico de 15° a fin de facilitar el proceso de fijación de los tejidos (Fig. 18C).

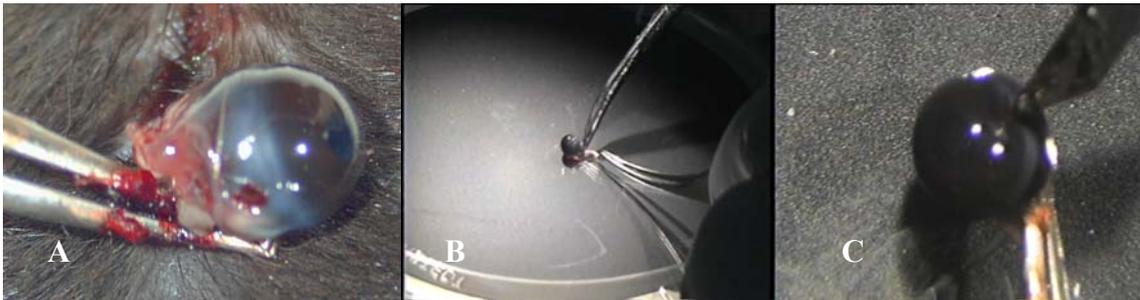


Fig. 18.- A: Extracción por luxación del globo ocular y nervio óptico. **B:** Separación de globo ocular y nervio. **C:** Paracentesis corneal para facilitar la fijación de los tejidos.

PROCESAMIENTO DE LOS GLOBOS OCULARES PARA MICROSCOPIA ÓPTICA Y ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN.

El protocolo se basa en la fijación en una solución de glutaraldehído y formaldehído y posterior inclusión en una resina epoxi alifática, el EPON 812, que tiene un WPE de 145 a 160 y densidad de 1.22-1.15 g/ml, menor que la araldita y esto le permite mayor conservación y le confiere una mejor visualización combinando con el tetraóxido de osmio. Los pasos son los que siguen:

- 1.- Enucleación del globo ocular, limpieza del mismo, disección cuidadosa de restos de inserciones musculares, conjuntiva, etc y sección del nervio óptico retrobulbar. Lavado en tampón cacodilato 0.1M pH 7.4 frío. (3 lavados de 5 minutos cada uno, conservando la muestra en nevera a 4°C).
- 2.- Fijación del globo ocular completo o nervio óptico, en una solución de glutaraldehído 2% (glutaraldehído ultrapure tem grade 25%) y formaldehído 3% (formaldehído ultrapure tem grade 16%) en tampón cacodilato 0.1M y pH 7.4 durante media hora. Posteriormente seguir fijándolo en la misma solución durante 90 minutos más moviendo constantemente. La muestra se conservó en nevera a 4°C.
- 3.- Sumergir el globo ocular en tampón cacodilato 0.1M y pH 7.4 frío y efectuar 3 lavados de 10 minutos cada uno, conservando en nevera a 4°C. En el último lavado la muestra puede quedar almacenada en tampón en la nevera hasta su utilización.
- 4.- Osmización mediante introducción del casquete de globo ocular o nervio óptico en una solución de tetraóxido de osmio (1.0% OsO₄) en agua bidestilada, conteniendo ferricianuro potásico (1% FeCnK) y mantenerla durante 60 minutos en nevera a 4°C y en completa oscuridad. A los 30 minutos, sin mostrarlos a la luz, agitar levemente las muestras en la solución de tinción. Si se precisan piezas más pequeñas se puede proceder a la sección del casquete de globo ocular previo a la osmización.
- 5.- Tres lavados en agua bidestilada de 5 minutos cada uno, conservando en nevera a 4°C.

6.- Sumergir en una solución de ácido tánico (0.15%) en tampón durante 1 minuto a temperatura ambiente.

7.- Lavado en agua bidestilada de 5 minutos a temperatura ambiente. Inmersión en una solución de acetato de uranilo 20% en agua bidestilada durante 120 minutos a temperatura ambiente y completa oscuridad.

8.- Tres lavados de 5 minutos cada uno a temperatura ambiente.

9.- Deshidratación en concentraciones crecientes de etanol (50%, 70%, 90%, 95%, 100%, 100% y 100%) 5 minutos cada una en nevera a 4°C.

10.- Inclusión en EPON 812 recientemente preparado, siguiendo el protocolo que se expone a continuación: Colocar los frascos que contienen la resina epoxi, el endurecedor, una probeta de cristal graduado y un frasco Erlenmeyer en estufa a 60°C durante 10 minutos. Verter la cantidad requerida de resina en la probeta precalentada y añadirle endurecedor. Pasar la mezcla al frasco Erlenmeyer. Agitar manualmente la mezcla unos minutos. No utilizar agitadores. Añadir la cantidad requerida para el experimento del acelerador EDMA. Agitar el frasco 2 minutos y el EPON ya se puede utilizar.

a) Solución de EPON/Etanol 1/2 durante 1 hora a temperatura ambiente

b) EPON/Etanol 1/1, una hora a temperatura ambiente.

c) EPON/ Etanol 2/1, una hora a temperatura ambiente.

d) EPON completo durante toda la noche en nevera a 4°C.

e) Al día siguiente incluir en EPON completo recién preparado durante 48 horas en estufa a 60°C. Colocando las muestras convenientemente orientadas en recipientes horizontales y rellenando bien con la resina. Cuando polimerice la resina se pueden separar de los recipientes y los bloques obtenidos se clasifican y registran hasta su utilización.

Para el microscopio óptico se requieren secciones transversales seriadas semifinas (0.5-1 μm de espesor) que se cortan en el ultramicrotomo (Ultratome LKB) y que tras

teñir con azul de toluidina y secar en plancha a 60°, se pueden observar y fotografiar en microscopio óptico OLIMPUS y cámara OLIMPUS digital

Para visualización en microscopio electrónico de transmisión, se precisaron secciones transversales seriadas ultrafinas 0.5µm, que se depositaron en rejillas de cobre filmadas con formvar. En el caso de las secciones ultrafinas, las rejillas se tiñeron colocándolas con una pinza de relojero sobre gotas que contienen una solución de acetato de uranilo durante 20 minutos a temperatura ambiente y posteriormente durante 1 minuto se colocaron sobre gotas con una solución de citrato de plomo, para examinarlas y fotografiarlas en microscopio electrónico de transmisión JEOL, soft imagin system-Mega view Joel.

PROCESAMIENTO DE LOS GLOBOS OCULARES PARA INMUNOCITOQUIMIA.

Las muestras de los nervios ópticos, que se encontraban ya procesadas hasta el punto 3 del apartado anterior y que fueron destinadas al estudio inmunocitoquímico fueron sometidas al protocolo de inclusión en lowicryl, que a continuación reflejamos:

- 1.- Glutaraldehido 0.5%, formaldehido 4% tampón cacodilato 0.1 molar. Ph 7.4 20 minutos a temperatura ambiente.
- 2.- Trocear el tejido o sedimento y continuar fijación 100 minutos a temperatura ambiente.
- 3.- Lavado con tampón cacodilato 0.1 molar. pH 7.4 cada 15 minutos tres veces.
- 4.- Tampón cacodilato 0.1 molar pH 7.4 conteniendo 50 mM NH₄CL 50 minutos a temperatura de 4°C .
- 5.- 3 lavados en Tampón cacodilato 0.1 molar pH 7.4 cada 10 minutos.
- 6.- Deshidratación en Metanol (MetOH) 30% 5 minutos. Temperatura 5°C
- 7.- Deshidratación en Metanol (MetOH) 50% 5 minutos. Temperatura 5°C
- 8.- Deshidratación en Metanol (MetOH) 70% 5 minutos. Temperatura -10°C

- 9.- Deshidratación en Metanol (MetOH) 90% 30 minutos. Temperatura -20°C
- 10.- Metanol 90%: lowicryl (1:1) 60 minutos. Temperatura -20°C
- 11.- Lowicryl sólo 60 minutos. Temperatura -20°C
- 12.- Lowicryl sólo toda la noche. Temperatura -20°C
- 13.- Encapsular en gelatina trasparente cerrada sin aire, colocar en caja forrada de papel aluminio. Polimerizar bajo lámpara UV (366 nm) (Philips TL6/05) situada a unos 30 cm de las cápsulas de luz indirecta 5 a 7 días, temperatura -20°C.

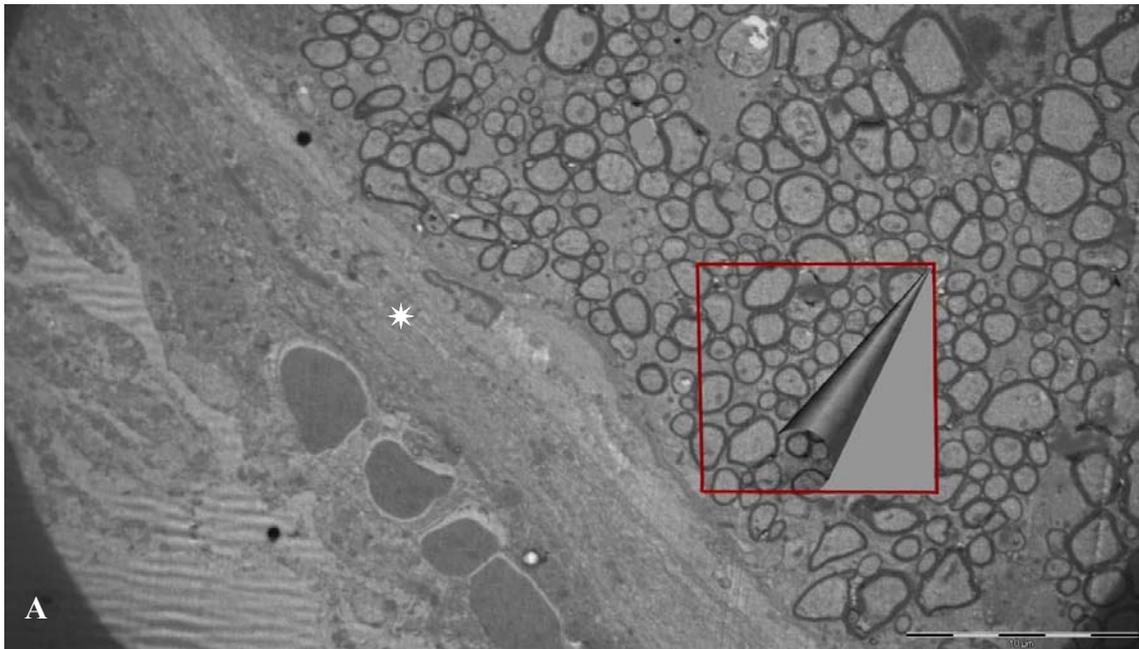
Posteriormente, tras realizar las secciones, se procedió a la tinción con anticuerpos monoclonales MBP (proteína básica de la mielina) y GFAP (proteína fibrilar ácida de la glía) para pasar al estudio microscópico.

Estudio Morfométrico

Cálculo del área axonal

A partir de las muestras obtenidas de los NO de los diferentes grupos y tras su procesamiento, se ha procedido al cálculo del área media axonal.

Para la realización de este procedimiento utilizamos 7 ratones para cada uno de los 5 grupos. Utilizamos el programa informático "*Scion Image*" de "*Scion Corporation*", y digitalizamos las imágenes obtenidas a partir de los NO, micrografiados a 3000X con el microscopio electrónico. En cada una de las muestras estudiamos un área de $100 \mu\text{m}^2$ que tal como se muestra en la Fig. 19.- fueron obtenidas alternativamente de la zona periférica, es decir, de la región del NO próxima a la vaina meníngea, y de la zona central, alejada de esta vaina. En total fueron analizadas $700 \mu\text{m}^2$ para cada uno de los grupos y $3500 \mu\text{m}^2$ en total.



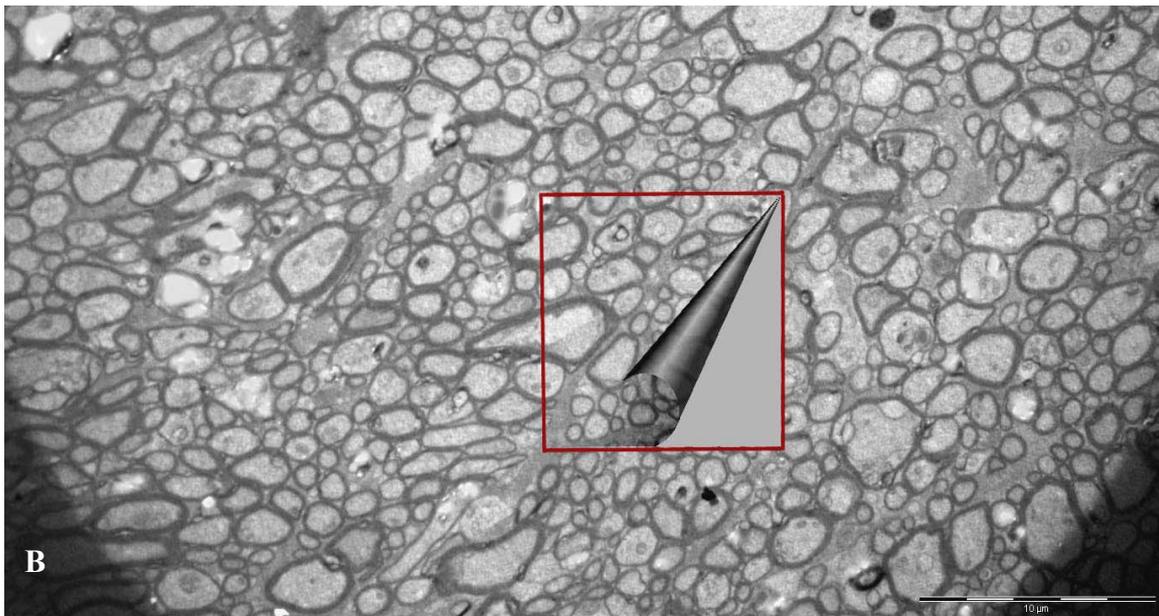


Fig. 19.- Muestra las áreas de $100 \mu\text{m}^2$ obtenidas para el estudio en dos animales del Grupo Control, A: sección obtenida a partir de la zona periférica , junto a la vaina meníngea (*).B: Sección obtenida a partir de la zona central.

A partir de las superficies obtenidas y utilizando el programa "*scion image*", se procedió al conteo y medición de las superficies de cada uno de los axones, el área axonal corresponde a la superficie contenida por la vaina de mielina sin contabilizar esta. La Fig. 20.- A muestra la negativización de la micrografía con el conteo axonal realizado por el programa informático, junto con la imagen real de la superficie analizada (Fig.-20.B). En la tabla.-8 se muestra el resultado de la medición de cada una de las áreas obtenidas. Es importante al utilizar este sistema de medición, el comparar cada uno de los negativos que el programa utiliza para el cálculo con la imagen real, con el fin de descontar posibles áreas contabilizadas por el programa y que en realidad correspondan a espacios interaxonales o células gliales como es el caso de las áreas 1,8,11,48 y 58 que aparecen en la tabla y que están marcadas en rojo.

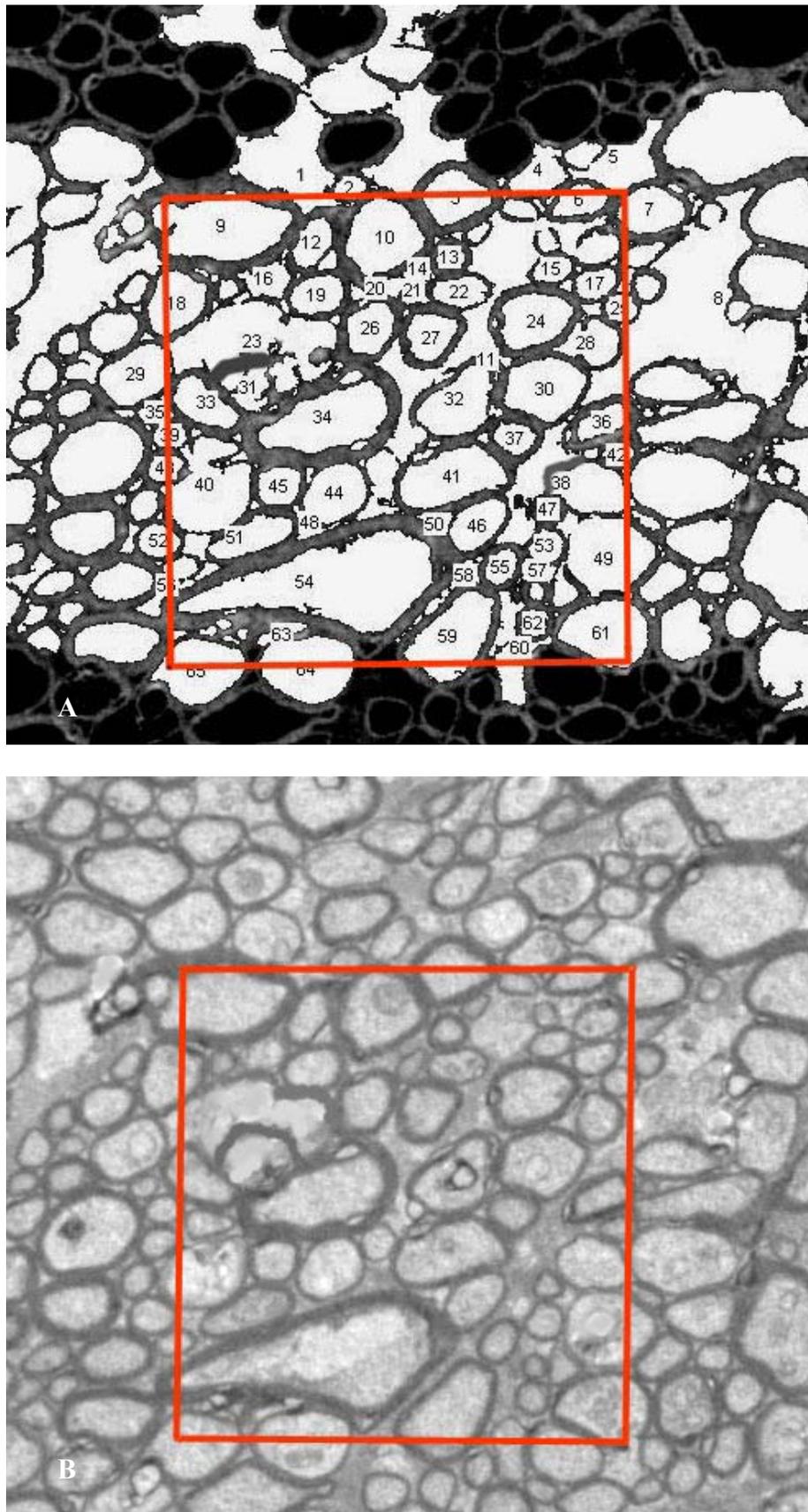


Fig. 20.- (A) Digitalización utilizada por el programa Scion para el contaje y cálculo de superficies. (B) Imagen real del área analizada.

N° de Axón	Área del Axón μ^2	N° de Axón	Área del Axón μ^2	N° de Axón	Área del Axón μ^2
1	16.07	23	4.05	45	0.62
2	0.24	24	1.4	46	0.92
3	1.19	25	0.29	47	0.14
4	0.8	26	0.87	48	0.16
5	1.63	27	0.81	49	2.62
6	0.56	28	0.81	50	0.18
7	1.09	29	1.42	51	1.19
8	9.24	30	1.77	52	0.48
9	3.13	31	0.48	53	0.38
10	1.99	32	1.4	54	6.41
11	5.95	33	0.9	55	0.36
12	0.6	34	2.69	56	0.52
13	0.23	35	0.2	57	0.23
14	0.16	36	0.52	58	0.19
15	0.34	37	0.44	59	2.21
16	0.55	38	2.85	60	1.17
17	0.43	39	0.29	61	2.03
18	1.27	40	2.58	62	0.24
19	0.75	41	2.06	63	0.18
20	0.28	42	0.19	64	2.29
21	0.17	43	0.3	65	1.97
22	0.58	44	1.36		

Tabla 8.- Muestra cada uno de los axones contabilizados por el programa con su superficie en la celda de su derecha. Los números marcados en rojo corresponden a zonas que no deben ser contabilizadas pues pertenecen a espacios interaxonales que el programa ha considerado como zonas intraxonales.

CÁLCULO DE LAS SUPERFICIES DE LOS NERVIOS ÓPTICOS.

Con el programa Scion se procedió al cálculo de las áreas de los nervios ópticos. Se utilizaron micrografías digitalizadas de los cortes semifinos teñidos con azul de Toluidina obtenidos con el microscopio óptico Olympus. El cálculo de las áreas se realizó directamente de las micrografías por medio del programa informático y sin la necesidad de calcular el diámetro mayor y menor para calcular posteriormente el área indirectamente

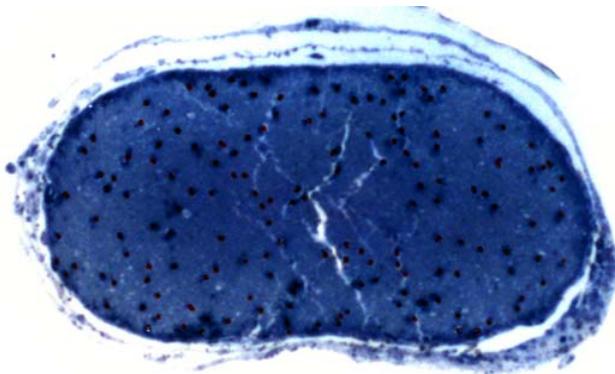
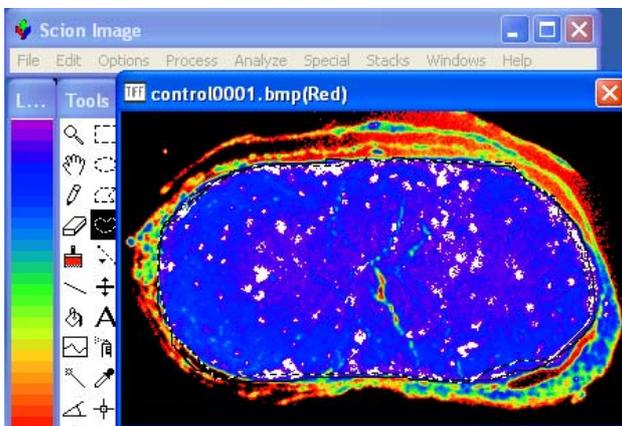


Fig. 21.- Arriba sección del nervio óptico, abajo análisis del área de la superficie transversal del nervio óptico. La muestra ha sido sometida a un tratamiento digital de los colores para facilitar la delimitación del área.



Para la correcta medición de las áreas de los nervios ópticos es fundamental la adecuada colocación del NO en el momento de ser incluido en la resina de EPON, separando previamente el globo del nervio óptico e incluyendo este de forma vertical, tal y como se muestra en la Figura 22.-, de esta forma obtendremos un corte semifino perpendicular al NO, como marca la flecha, perfectamente válido para la medición.

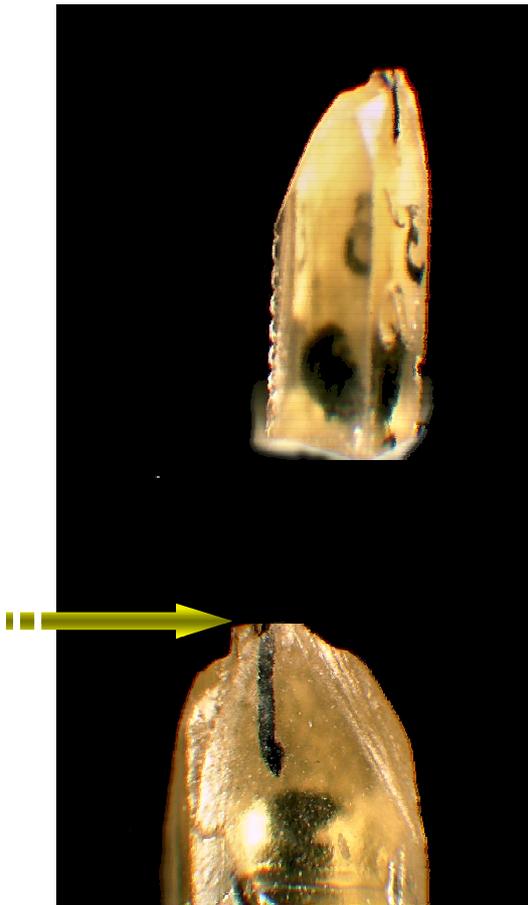


Fig. 22.- Arriba colocación adecuada del NO en la resina EPON. Abajo corte perpendicular para el correcto cálculo del área.

Una mala inclusión de globo y nervio, con un mal posicionamiento de este en la pieza de EPON puede llevarnos a la hora de realizar las secciones, a practicar los cortes en planos no perpendiculares al nervio, como mostramos en la Fig. 23.-, lo que aumentaría por error el área obtenida y desvirtuaría los resultados.

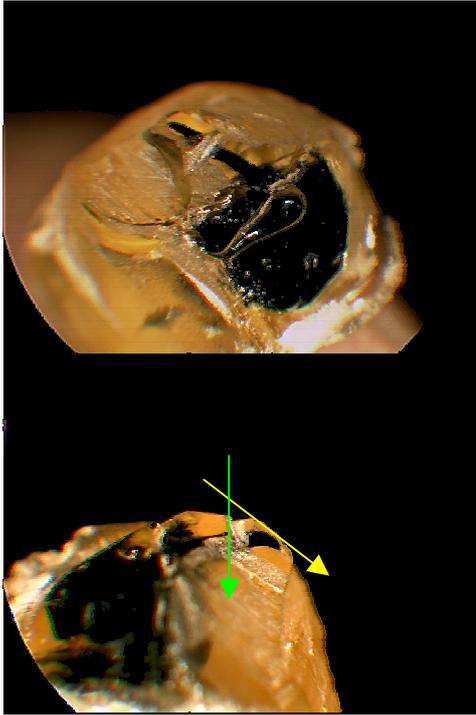


Fig. 23.- Arriba: colocación incorrecta del NO en la resina EPON. Abajo: la flecha amarilla muestra la dirección en la que se ha realizado el corte semifino, la flecha verde marca la correcta dirección en la que debió realizarse el corte.

CÁLCULO DEL ÍNDICE DE MIELINIZACIÓN.

El Índice de Mielinización (IM) de un axón se obtiene a partir de la siguiente fórmula:

$$IM = \frac{\text{Espesor de la capa de mielina axonal}}{D+d/2}$$

Donde el espesor de la capa de mielina axonal queda reflejado en micras, siendo el espesor total de la vaina de mielina sin incluir el axolema. D y d representan respectivamente el diámetro mayor y menor del área citoplasmática axonal sin incluir la cubierta milinizada. La Figura 24.- muestra gráficamente estos valores.

El Índice de Mielinización viene a representar la cantidad de mielina que contiene el axón en función de su superficie total y nos es útil para determinar en axones de parecido tamaño, cómo de adelgazada o engrosada se encuentra la cubierta de mielina.

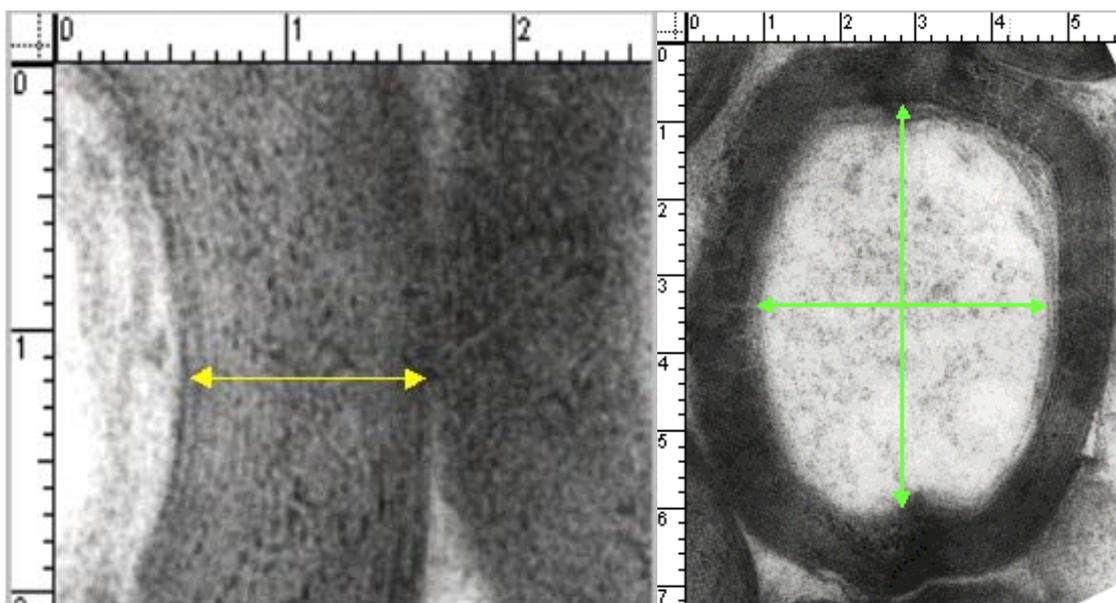


Fig. 24.- A la izquierda el numerador: Espesor de la vaina de mielina. A la derecha se muestran los diámetros mayores y menores del axón.

Para el cálculo del IM hemos valorado los axones que estaban situados en áreas de $100 \mu\text{m}^2$, cada una de las cuales se seleccionaba sobre la superficie del NO del espécimen, se fueron utilizando áreas de $100 \mu\text{m}^2$ hasta contabilizar un total de 224 axones. El número de ratones utilizado fue de 25, es decir, 5 ejemplares por grupo.

Para el cálculo del IM hemos dividido los axones de los 5 grupos de ratones estudiados en 3 subgrupos dependiendo del diámetro medio axonal que presentaran. Así el grupo de axones pequeños está formado por los axones cuyo diámetro mayor era siempre menor de $1 \mu\text{m}$, el grupo de axones medianos estaba formado por los axones con diámetros medios entre 1 y $1.7 \mu\text{m}$ y por último en los axones grandes los diámetros eran siempre superior a $1.7 \mu\text{m}$

Como hemos explicado anteriormente, el ajuste de los axones por tamaño es fundamental para el estudio comparativo de los índices de mielinización. En los axones pequeños la cubierta mielínica es proporcionalmente mayor, con respecto a la superficie total del axón, que en los axones de tamaño grande, es decir, los axones de tamaño pequeño poseen más cantidad de mielina por unidad de superficie que los axones de gran tamaño. Esto es así debido a que los axones grandes lo son fundamentalmente a costa de su axoplasma y presentan una vaina meníngea proporcionalmente menor.

En las tablas de resultados figuran los datos en el siguiente orden: diámetro medio del axón, espesor de la vaina de mielina y por último IM del axón, según mostramos en la Tabla 9.-.

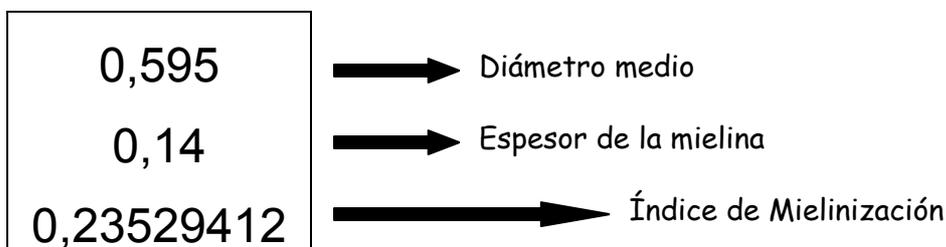


Tabla 9. - Muestra el orden en que figuran los datos de las tablas de resultados.

DISTRIBUCIÓN POR TAMAÑO DE LOS AXONES					
	Control	ApoE	ApoE+D	PTEN	P27
Axones pequeños	142	132	131	114	114
Axones medianos	65	74	54	64	62
Axones grandes	17	18	39	46	48
Total	224	224	224	224	224

La Tabla 10.-Muestra el número absoluto de axones estudiados para cada grupo de estudio y según tamaños.

CÁLCULO DEL NÚMERO DE FIBRAS TOTALES POR NERVIO ÓPTICO.

Para calcular el promedio de fibras axonales presentes en cada uno de los nervios ópticos de los diferentes tipos de ratones estudiados nos hemos basado en los datos obtenidos anteriormente, es decir, como para el cálculo del área axonal media hemos numerado los axones que existían en cada uno de los 5 grupos en una superficie de $700 \mu\text{m}^2$, y por otro lado hemos calculado el área media de los nervios ópticos, nos es fácil pues aproximar qué número total de axones constituirán los nervios ópticos de cada grupo de animales.

CÁLCULO DE GROSORES RETINANOS POR CAPAS Y GLOBALES.

El análisis morfométrico de las retinas de los globos oculares de los ratones pertenecientes a cada uno de los cinco grupos del estudio se llevó a cabo a partir del estudio bajo microscopía óptica y electrónica de las preparaciones semi y ultrafinas obtenidas de las secciones transversales realizadas a nivel retroecuatorial, llevándose a cabo el estudio a partir de la retina media de cada una de las muestras. Como en los procedimientos anteriores, la obtención de micrografías digitales y la posterior utilización del programa "Scion Image" permitió efectuar la medición de las diferentes capas coriorretinianas y registrar los resultados.

El estudio morfométrico de la retina bajo microscopía óptica se ha centrado en la medición del grosor de las capas retinianas y su estudio comparativo entre los grupos.

Para cada grupo de animales hemos utilizado 7 ratones cuyo número identificativo figura en las posteriores tablas.

En cada uno de los animales hemos realizado seis medidas de cada una de las capas retinianas estudiadas, lo que hace un total de 42 medidas para cada una de las capas dentro de un mismo grupo de animales y 210 si consideramos el conjunto total de animales analizados. En total se estudiaron 7 capas retinianas, con lo que para el conjunto de la retina, la cantidad de medidas realizadas para cada grupo de animales fue de 294 y 1470 fue el número total de medidas que se realizaron en este estudio.

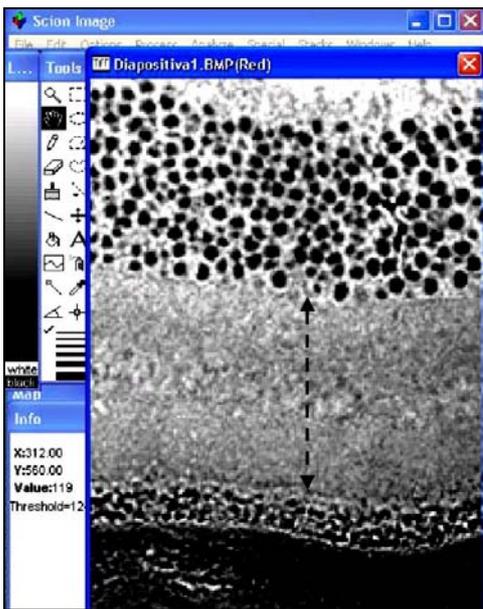


Fig. 25.-Muestra una medición realizada (flecha negra), por medio del programa "Scion", en este caso, sobre la capa de los segmentos de los fotorreceptores. De cada uno de los animales obtuvimos 7 medidas de una de las capas retinianas.

Las capas de la retina estudiadas fueron: capa de segmentos de los fotorreceptores, capa nuclear externa, plexiforme externa, nuclear interna, plexiforme externa, capa de células ganglionares y capa de fibras nerviosas.

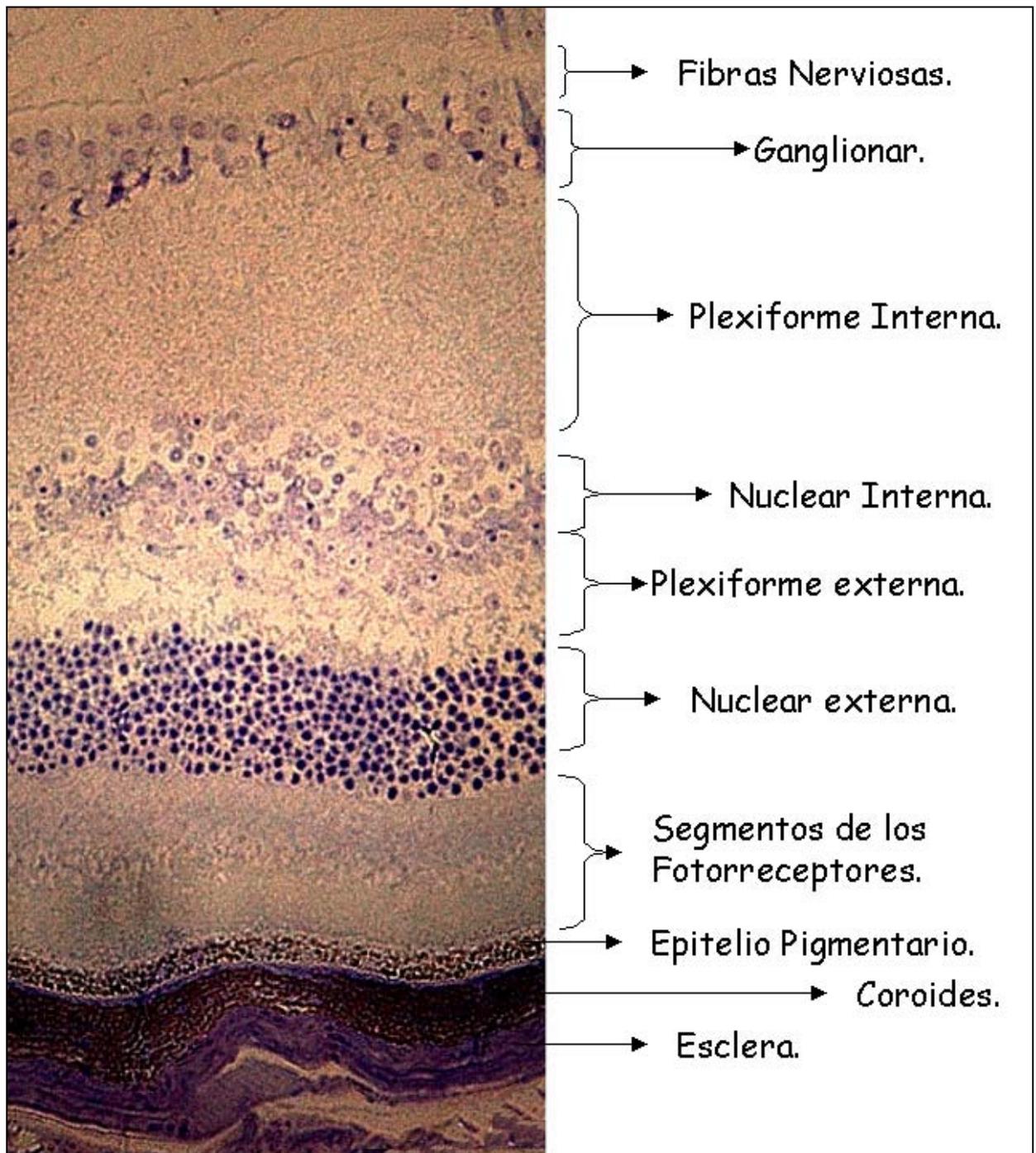


Fig. 26.-. Micrografía y esquema de un corte trasversal de la retina de un animal perteneciente al grupo control. Se hallaron medidas del espesor de cada una de las capas de la retina y del total de la retina. . (Sección semifina, 1 μ m, azul de toluidina 20X).

A pesar de la necesidad de la utilización de métodos informáticos para llevar a cabo estudios morfométricos, en nuestro trabajo no hemos dejado de lado la utilización de los métodos utilizados no hace tantos años, consistente en el revelado en papel fotográfico y el posterior montaje. Desde nuestro punto de vista, aunque con menos fiabilidad a la hora de realizar la mediciones, aportan al investigador una capacidad de visión global y comparación difícilmente obtenible con los medios actuales, tal y como se muestra en la Fig. 27.

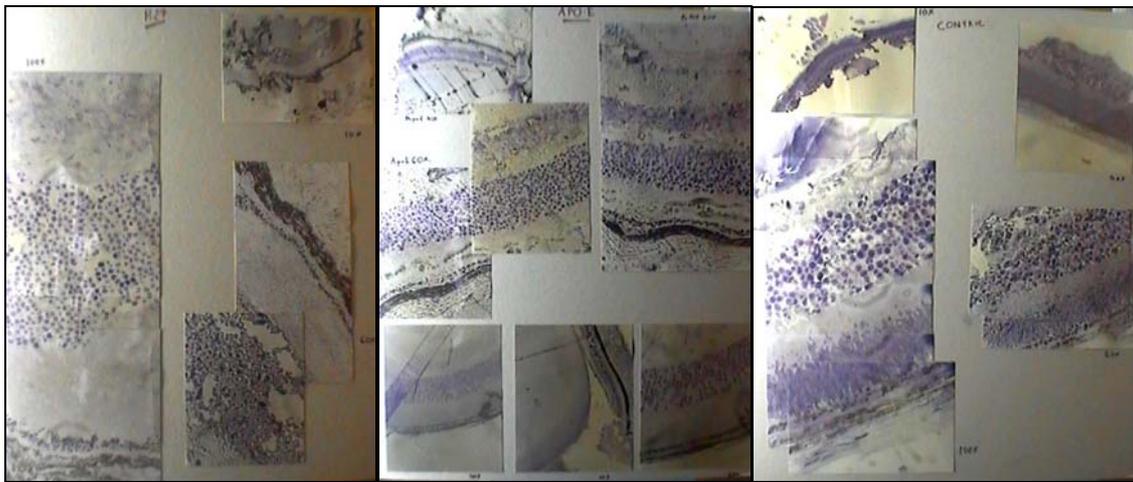


Fig.27-. Muestra algunos de los montajes realizados a lo largo del estudio mediante la utilización de papel fotográfico y cartulinas. Estas técnicas tienen la ventaja de ofrecer una mejor visión global y capacidad comparativa que la que se obtiene con la fotografía digital.

RECUESTO DE NÚCLEOS CELULARES RETINIANOS.

El recuento de los núcleos celulares por unidad de superficie en cada capa retiniana nos da una idea aproximada de la densidad y cantidad de células existentes en cada una de ellas y en cada uno de los modelos experimentales.

El análisis morfométrico retiniano centrado en el recuento de núcleos celulares, se realizó con las secciones semifinas obtenidas a partir de las retinas retroecuatoriales, y cuyas muestras fueron también utilizadas para el resto de las mediciones y recuentos expuestos en la presente tesis.

Hemos seleccionada para cada uno de los animales, dos áreas de $1.000 \mu\text{m}^2$, en el interior de las cuales eran contabilizados todos los núcleos celulares existentes en las capas retinianas Nuclear Externa e Interna. Utilizamos siete ratones para cada grupo de animales, de modo que en cada animal de experimentación procedimos al recuento de los núcleos celulares existentes en $2.000 \mu\text{m}^2$ y en $14.000 \mu\text{m}^2$ si consideramos el grupo en total y por cada una de las capas retinianas estudiadas. Para los cinco grupos de ratones hemos analizado un total de $70.000 \mu\text{m}^2$ para la capa Nuclear Externa y otras tantas para la Nuclear Interna.

Hemos utilizado, también en este procedimiento, micrografías digitales y el programa informático "*Scion Image*" (Fig. 28).

Todas las micrografías utilizadas fueron obtenidas a partir de secciones semifinas ($1 \mu\text{m}$), teñidas con Azul de Toluidina y con un aumento bajo el microscopio óptico de 20X.

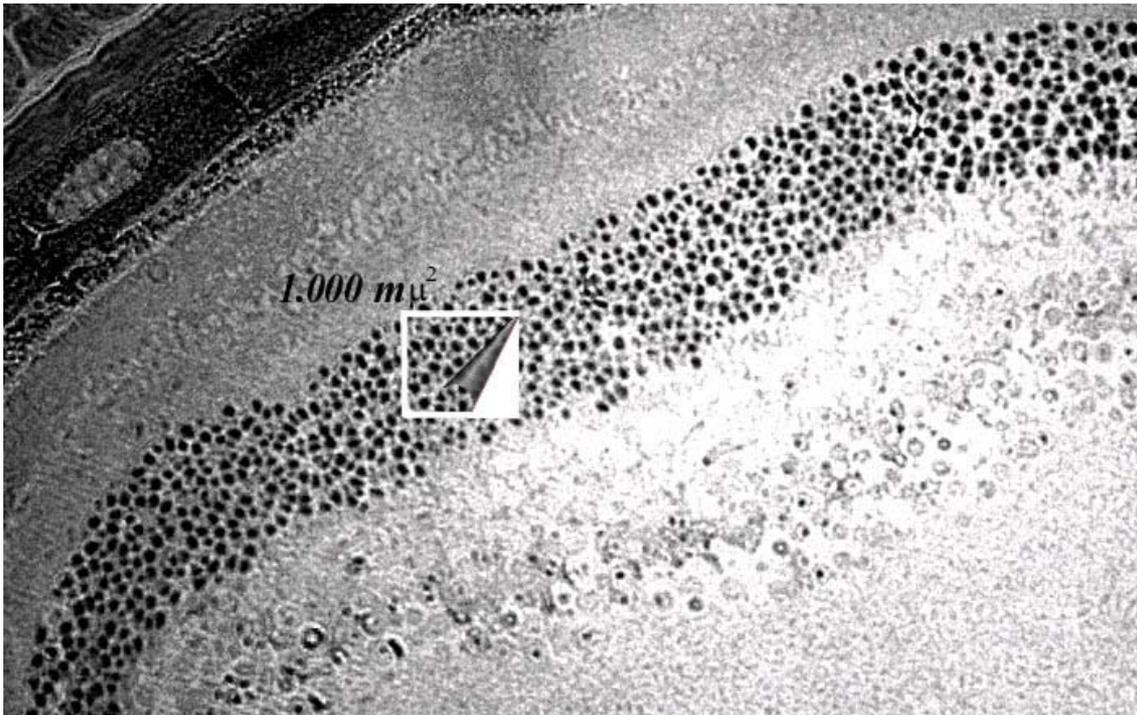


Fig. 28. - Preparación retiniana en la que se muestra el área de $1.000 \mu\text{m}^2$ donde se procedió al recuento de núcleos celulares de la capa Nuclear Externa en este animal control. Microscopía óptica, Azul de Toluidina, 20X.

ESTUDIO MORFOMÉTRICO, MEDIANTE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA, DE LA RETINA.

El estudio morfométrico mediante microscopía electrónica de la retina, se realizó a partir de las secciones ultrafinas utilizadas anteriormente para el análisis bajo microscopía óptica de los grosores retinianos. Así pues, se utilizaron las preparaciones obtenidas a nivel retroecuatorial del globo ocular, es decir, de la retina media. Al igual que en los estudios previos, utilizamos el sistema informático "*Scion Image*" para la realización de las mediciones.

Hemos utilizado la alta resolución que ofrece la microscopía electrónica para realizar una documentación más exhaustiva de la morfometría de determinadas estructuras retinianas como son: membrana de Bruch, núcleos del EPR, grosor del EPR, así como el área de los núcleos que componen la capa nuclear externa e interna.

Como anteriormente, utilizamos 7 animales para cada uno de los grupos: control, ApoE, ApoE+D, PTEN y P27, es decir, el número total de animales analizados entre los 5 grupos fue de 35.

- *Membrana de Bruch:* Se realizaron 7 medidas del grosor de la membrana de Bruch de cada animal, lo que significa que se realizaron 35 mediciones para cada uno de los grupos y 175 mediciones en total. En todos los casos la magnificación utilizada por el microscopio electrónico fue de 100.000 X. El grosor de la Membrana de Bruch se definió como la longitud de una línea trazada perpendicularmente a los límites superior e inferior de la membrana, tal y como se muestra en la Fig. 29. El resultado se expresó en μm .

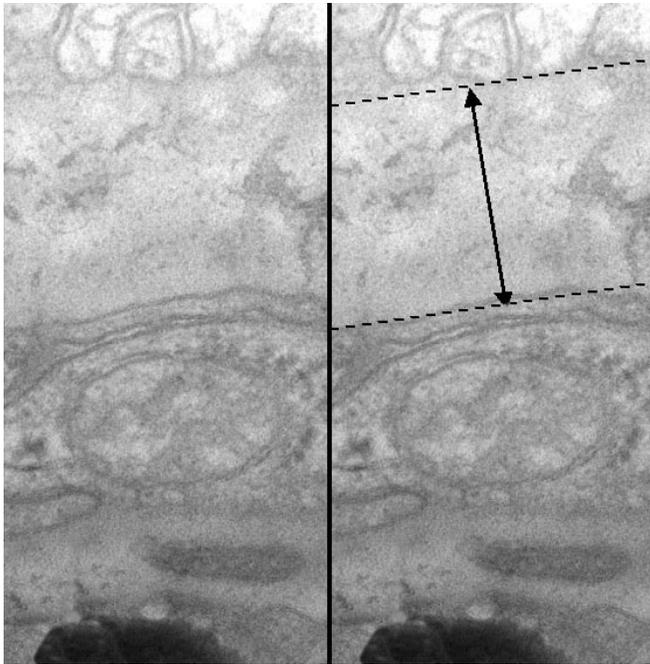


Fig. 29.- A la izquierda imagen bajo microscopía electrónica de la membrana de Bruch a 100.000X aumentos, en un animal control. A la derecha representación esquemática sobre la misma imagen, del grosor de dicha membrana.

- *Área de los núcleos del EPR:* Medimos el área de un núcleo celular del EPR de cada uno de los animales utilizados. En conjunto, calculamos el valor de la superficie de 35 núcleos celulares. El resultado se expresó en μm^2 . En la Fig. 30.- se muestra una de las mediciones realizadas.

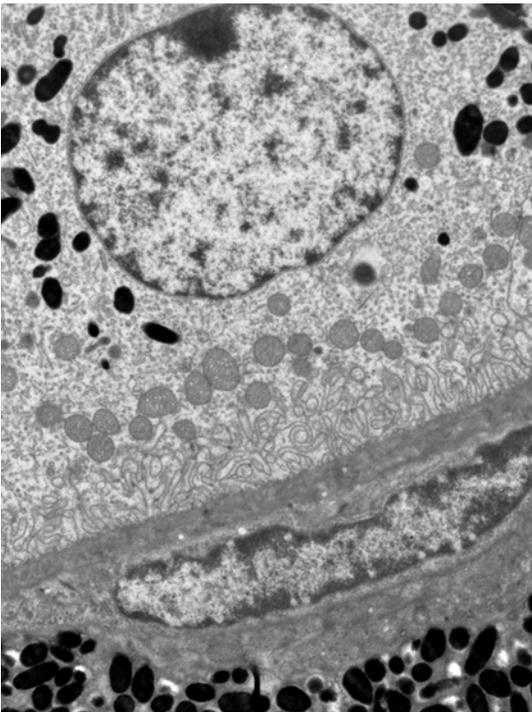


Fig. 30.- A la izquierda imagen bajo microscopía electrónica de un núcleo celular del EPR. 10.000X aumentos, en un animal control.

- *Epitelio Pigmentario de la Retina.* Se realizaron 3 medidas del grosor del EPR para cada uno de los animales. El total de medidas realizadas fue de 105. Los aumentos utilizados fueron de 6.000X. En todos los casos se midió la distancia existente entre la membrana de Bruch y la zona de las proyecciones apicales de la membrana del EPR, donde empieza a producirse la fagocitosis de los fotorreceptores (Fig.-31).

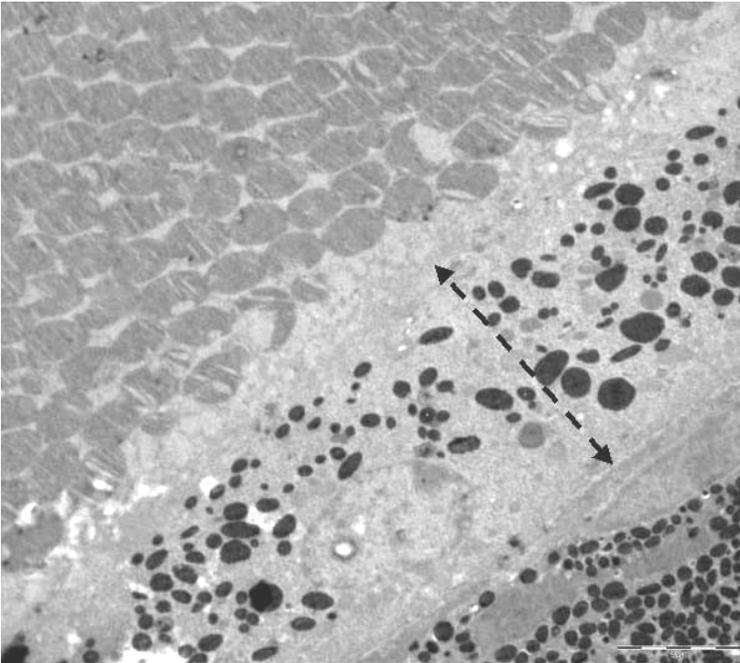


Fig. 31.- EPR, ME. 5.000X. La línea discontinua marca la distancia entre la membrana basal y las proyecciones apicales de la membrana del EPR.

- *Nuclear externa:* Se midieron las áreas de 4 núcleos celulares pertenecientes a la capa nuclear externa de cada uno de los ratones, siendo el total de núcleos estudiados de 140, entre los 5 grupos. El resultado se expresó en μm^2 y los aumentos utilizados en el microscopio electrónico de 6.000X (Fig. 32.-).

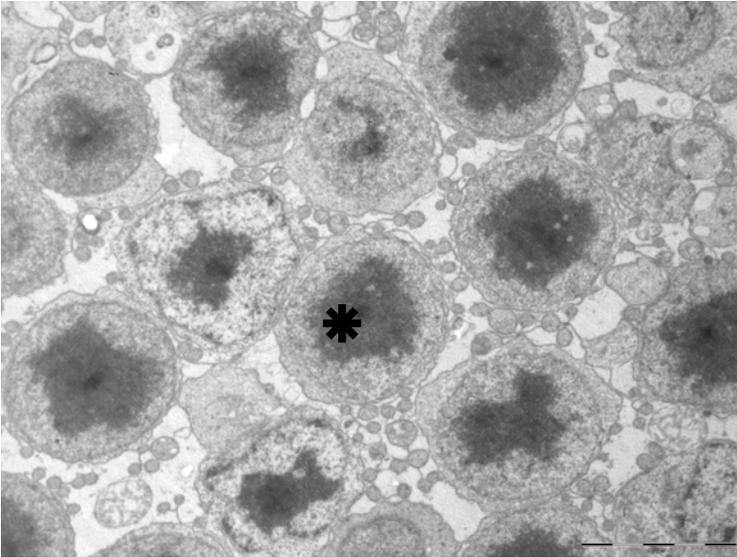


Fig. 32.- Núcleos celulares de la capa Nuclear Externa., ME. 6.000X. (*)

- *Nuclear Interna:* Al igual que en la Nuclear Externa, se midieron las áreas de 4 núcleos por animal y 140 en total. El resultado se expresó en μm^2 y los aumentos utilizados en el microscopio electrónico fueron de 6.000X (Fig. 33.-).

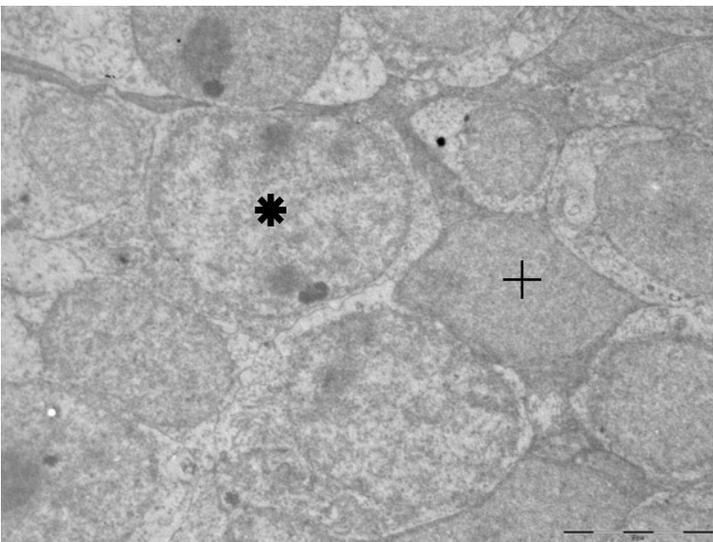


Fig. 33.- Núcleos celulares de la capa Nuclear Interna(*). ME. 6.000X. Células de Müller (+).

Estudio Morfológico

ESTUDIO MORFOLÓGICO DE LOS NERVIOS ÓPTICOS Y LAS RETINAS.

En un primer paso hacia la descripción morfológica de los nervios ópticos de los diferentes grupos de animales *Knockout*, procederemos a realizar una descripción de la estructura así como de los elementos y la disposición que componen el nervio óptico en los ratones del grupo control, para posteriormente y partiendo de este patrón de "normalidad" describir las variadas alteraciones morfológicas que se detectan en los distintos grupos del estudio.

Describiremos por medio de micrografías electrónicas cuáles son las alteraciones que hemos detectado, correspondientes a perfiles morfológicos no hallados o hallados en pequeño porcentaje en el grupo de ratones control y cuyo significado patológico trataremos de aclarar en la discusión.

En cuanto al estudio de la vaina de mielina, hemos considerado como perfiles morfológicos alterados hallazgos como: la ruptura de la vaina de mielina, las vesiculaciones en el espesor de esta o la mielinización alterada. Todas estas alteraciones fueron cuantificadas y expresadas como un porcentaje sobre el total de fibras estudiadas.

En el estudio de las alteraciones intraxonales, los perfiles morfológicos considerados como patológicos se refieren a la presencia de vacuolas internas. En este caso también fueron contabilizadas las alteraciones y expresadas como en el caso anterior, como un porcentaje sobre el total de las fibras analizadas.

Para la elaboración de esta documentación de los diferentes perfiles morfológicos expresados, hemos utilizado las micrografías sobre las que realizamos el estudio morfométrico. En cada uno de los grupos del estudio hemos analizado un total de 420 axones procedentes de 7 animales por cada uno de los grupos. Siendo de 60 el número de axones que hemos estudiado de cada uno de los animales individualmente. El número total de axones estudiado es de 2940.

Para finalizar mostraremos los hallazgos encontrados en las células macrogliales, refiriéndonos fundamentalmente a alteraciones existentes en los núcleos, como condensaciones que presentaba la cromatina.

En la descripción morfológica de las retinas de los 5 grupos del estudio hemos utilizado, al igual que en el estudio morfométrico, las preparaciones semi y ultrafinas obtenidas a partir de secciones transversales realizadas a nivel retroecuatorial. Para cada grupo de estudio hemos utilizado las secciones de 7 animales, que corresponden a los mismos individuos que utilizamos para el estudio morfométrico de la retina.

El estudio inmunológico de los tejidos es una herramienta valiosa para la detección de determinadas moléculas en los mismos. En este apartado hemos intentado la cuantificación de la proteína básica de la mielina (MBP) y de la proteína fibrilar ácida de la glía (GFAP) en el nervio óptico del ratón, dos proteínas fundamentales para el desarrollo y mantenimiento del tejido neural.

La mielina que envuelve los axones ópticos está compuesta aproximadamente de un 70% de lípidos, y un 30% de proteínas, de las cuales, las predominantes son la MBP y la proteína proteolipídica (PLP) (176). De entre las muchas funciones que se han atribuido a estas proteínas la principal es la formación y remodelación de la vaina de mielina (177). La MBP, una macromolécula de 18.000 kD, se sitúa en la cara citoplasmática de la membrana miélica (178).

Los astrocitos son células macrogliales que se caracterizan por sus núcleos ovals o ligeramente irregulares, con un patrón de cromatina laxa y una morfología estrellada espectacular, debida a las numerosas prolongaciones delgadas que irradian en todas direcciones. Estas prolongaciones conforman la red estructural del citoesqueleto celular, compuesto además por microtúbulos y microfilamentos. Estos filamentos intermedios tienen en los astrocitos un tamaño de 8 nm y están constituidos por la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), un polipéptido con un peso molecular de 51.000 kD (179). Así podemos decir que esta proteína es un marcador importante para la identificación y cuantificación de la línea astrogliar en el sistema nervioso (180).

Para la realización de los experimentos inmunocitoquímicos hemos utilizado 35 animales, con números identificativos del 016 al 022 de cada grupo, es decir 7 animales por grupo de estudio. Utilizamos el ojo derecho de cada ratón (en cada grupo) para el estudio de la MBP y el contralateral para la GFAP. Estudiamos las pequeñas piezas obtenidas de los nervios ópticos retrobulbares, que fueron fijados en una solución de 0,5% glutaraldehído y 4% formaldehído en tampón cacodilato 0.1 M y pH 7.4 durante 3 horas, deshidratadas en concentraciones crecientes de metanol e incluidas en resina Lowycriol K4M, cuyo protocolo detallado del procesamiento consta al

principio del apartado "Material y Métodos". Obtuvimos secciones ultrafinas (80 nm) de la sección transversal del nervio óptico y mediante el asa portamuestras colocamos las ultrasecciones sobre rejillas de níquel firmadas con carbón-formvar para estudios de inmunocitoquímica a microscopía electrónica de transmisión, procediendo a la localización y cuantificación en cada una de las secciones de las proteínas, alternativamente MBP o GFAP. Básicamente el método de tinción se basa en la aplicación de un anticuerpo primario que "localiza" y se fija a la proteína que estamos estudiando, posteriormente, aplicamos un anticuerpo secundario, que es una IgG marcada con una partícula de oro coloidal y que se une al primer anticuerpo, de modo que por medio del microscopio electrónico de transmisión podemos detectar estas partículas coloidales y por ende localizar y cuantificar la proteína en estudio.

* Anticuerpos primarios:

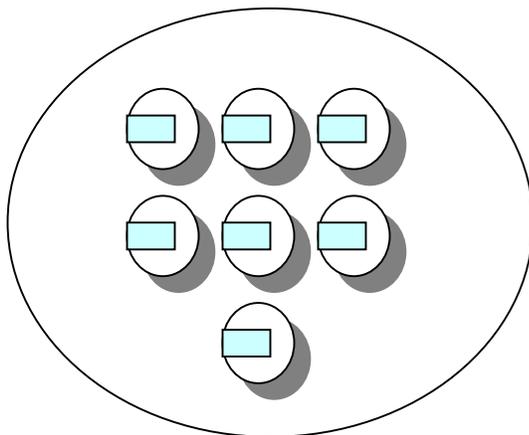
- Anti GFAP. (Ref. Sigma G9269). Anti-Glial Fibrillary Acidic Protein Antibody produced in rabbit. Este producto es un anticuerpo policlonal que reacciona específicamente contra la GFAP (filamentos intermedios del citoesqueleto astrogial) y marca los astrocitos. Solución en 0.01 M de buffer fosfato salino, pH 7.4, conteniendo 15 mM de ácido sódico. Temperatura de conservación -10°C. (181).
- Anti MBP. (Ref. Sigma M9559). Anti-Myelin Basic Protein Antibody produced in mouse. Este producto es un anticuerpo monoclonal, marcador específico de los aminoácidos 129-138 de la MBP, localizados en la vaina de mielina producida por los oligodendrocitos. Contiene 0.1% de ácido sódico. Temperatura de conservación -10°C. (182).

* Anticuerpos Secundarios:

- Anti mouse IgG (whole molecule)-Gold (5 nm) produced in goat (Ref. Sigma G7527).
- Anti rabbit IgG (whole molecule)-Gold (5 nm) produced in goat (Ref. Sigma G7277)

El oro coloidal es un marcador electrodenso de gran aplicación en microscopía óptica y electrónica. Esta partícula se caracteriza por su tamaño homogéneo (coeficiente de variación < 15%) de 5 nm. La solución contiene 0.01% HauCl_4 en una suspensión de ácido tánico al 0.01% con 0.04% de citrato trisódico, 0.26 mM carbonato potásico y 0.02 de ácido sódico como conservante.

La técnica comienza con la colocación de las rejillas (por la cara de la muestra) en flotación durante 30 minutos a temperatura ambiente, sobre un parafilm que contiene gotas de 0.1% BSA-tris (20 nmol/l tris HCl, ph 7,4; 0.9% NaCl, 0,1% BSA), suplementado con 5% de suero bovino fetal inactivado. Posteriormente las rejillas se transfieren a otro parafilm con gotas de 0.1% BSA-Tris conteniendo el anticuerpo primario (alternativamente anti-MBP o anti-GFAP, respectivamente) a dilución 1:200 durante 1 hora, en cámara húmeda a 37°C. Tras esta incubación las rejillas se transfirieron a gotas que contienen una solución de 1% BSA-Tris y 0.05% de suero bovino fetal con el anticuerpo secundario anti IgG que lleva el oro coloidal (5 nm) y a una dilución 1:50, durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente las secciones se lavaron con 0.1% BSA-Tris buffer (tres lavados de 10 minutos) y agua bidestilada (10 minutos), se secaron bajo un chorro de aire seco y se contrastaron con acetato de uranilo. Las secciones que se tomaron como controles de la técnica inmunocitoquímica se incubaron con suero preimmune o alternativamente sin el primer anticuerpo (183).



Esquema 2. -

Representación de las gotas depositadas sobre el *parafilm* en una placa de Petri.

Para realizar la localización y cuantificación de las proteínas en las muestras estudiadas, procedimos a la realización seriada de micrografías. En el caso del estudio de MBP, con una magnificación de 15.000 X, lo que representa un área de estudio de 65 μm^2 por micrografía. De cada uno de los animales realizamos 5 micrografías, lo que

representa un total de $325 \mu\text{m}^2$, estudiadas por muestra de nervio óptico, $2275 \mu\text{m}^2$ para cada grupo del estudio y $15.575 \mu\text{m}^2$ entre todos los animales. El análisis cuantitativo de las micrografías se realizó contabilizando la totalidad de las partículas de oro coloidal que se observaban a través del microscopio electrónico, teniendo en cuenta los aumentos y la superficie estudiada. La baja cantidad de aumentos utilizados, hacía prácticamente indetectables las partículas coloidales de 5 nm, por lo que las micrografías tuvieron que ser aumentadas digitalmente para su recuento. Los datos se expresaron como densidad de partículas de oro coloidal (o número de partículas de oro coloidal) por μm^2 (media \pm DT).

La técnica se realizó igualmente para el estudio de MBP y GFAP. Sin embargo, en el caso de GFAP, puesto que teníamos que focalizar el estudio sobre los astrocitos y las áreas de trabajo no eran tan amplias con respecto al total de la muestra, en este caso se realizaron las micrografías a un aumento de 40.000X, lo que suponen áreas de $8.3 \mu\text{m}^2$ y $1162 \mu\text{m}^2$ rastreadas en total.

Western-blot (SDS PAGE).

La técnica del *western-blot* (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis) se usa para identificar proteínas basándose en las características isoeléctricas de estas moléculas, que permiten a su vez, valorar la expresión de las mismas en un tejido analizado.

Esta técnica se complementa mediante la transferencia a membranas de nitrocelulosa e incubación con el anticuerpo correspondiente (immunoblotting).

Mediante este ensayo, obtendremos información cualitativa y cuantitativa de la expresión de las proteínas a estudio.

A diferencia de las técnicas de inmunocitoquímica empleadas en este estudio, las técnicas del *western-blot* e *immunoblotting*, ofrecen una visión global del comportamiento de las proteínas en toda la muestra, mientras que la distribución histológica, celular y subcelular nos viene determinada por el estudio microscópico. En nuestro caso, hemos decidido realizar ambas técnicas para obtener mayor información de la expresión de las proteínas GFAP y MBP en el sistema visual, tanto en el animal control como en los modelos genéticamente manipulados.

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN PROTEICA.

En cada uno de los tubos tipo Eppendorf de 1.000 μ l correspondientes a cada grupo experimental, se introducen 12 muestras de nervio óptico retrobulbar, y en otros tantos lo haremos con las muestras de retina. El número identificativo, de cada animal, según consta en el apartado de animales de experimentación, va desde el 029 al 040, para cada uno de los grupos.

Para homogeneizar las muestras (sistema homogeneizado de cristal SHEATON - USA) se añade el tampón de lisis D4 lysis buffer (4°C) para 1000 μ l:

- A) 100 μ l complete Roche (inhibidor de proteasas)
- B) 900 μ l de tampón 50 mM HEPES pH 7.5 \rightarrow 25 ml.

150mM NaCl → 15ml.
2.5 mM de EDTA → 125 ml.
1mM de EDTA → 1ml.
10 mM de b glycerophosphate → 5ml.
0.1 mM de NaKo3 → 0.5ml.
1 mM de NaFe → 1ml.
0.1% de tween20 → 0.5ml.
10 % glycerol → 50ml.
0.1% de NP40(detergente) → 3μl.

Tampón para insoluble: 0.5% de tritón X100 y 0.5% de Deoxicolato sódico 20mM de tris clorhídrico 7.5 pH y 150 mM de ClNa.

Se realiza la curva estándar para la determinación de la concentración de proteínas mediante la técnica de Bradford. (194).

PROTOCOLO WESTERN-BLOT "INVITROGEN"

Calculamos el volumen de la muestra homogeneizada en cada Eppendorf necesario para cargar 30 μg de proteína. Añadimos azul de bromofenol según el volumen de muestra (relación 1:5). Añadimos agua bidestilada para asegurarnos que tendremos el suficiente volumen para cargar. Tapar los tubos con parafilm y hacer unos agujeros para impedir el vacío. Someterlos a ebullición durante un mínimo de 3 minutos. Preparar los tampones URNG al 1% (25 ml de tampón en 500 ml de agua). Elegir el gel en función del tamaño de la proteína que queremos determinar (BIS-Tris es para proteínas pequeñas... tampón MES y para medianas... tampón MOPS y el Tris-acetate es para proteínas grandes, según el catálogo de Invitrogen pág. 420). A continuación se elige el gel de acrilamida en función del tamaño de la proteína que queremos determinar y una vez que se ha elegido el gel se le extrae con mucho cuidado la etiqueta y se monta el aparato para realizar la electroforesis, según técnica habitual. Se procede a cargar 15 μl de muestra en cada pocillo y 5 μl de marcador (2 pocillos,

uno al principio y el otro a mitad del gel). Una vez puesta en marcha la fuente de alimentación (invitrogen life technologies) se procede de la siguiente forma:

- NuPAGE gel para electroforesis
- Introducir numero de geles para correr las proteínas
- Introducir el tiempo para correr las proteínas (1 h. 30 min)

Para realizar la transferencia a las membranas de nitrocelulosa hay que seccionar 2 porciones del papel de blotting del tamaño de nuestra membrana y hacerle una muesca para saber con exactitud el orden de los pocillos que hemos introducido. Se humedece con tampón de transferencia en una batea tanto las almohadillas, como el papel y también la membrana. Se extrae el gel del cassette y se corta la parte superior (stacking) y la parte inferior, sujetándolo con mucho cuidado con uno de los trozos del papel de blotting y colocándolo en la batea. Se realiza la aposición (sándwich) de cada una de las siguientes estructuras con el fin de que la corriente se dirija hacia el polo positivo de la fuente de alimentación: esponja - esponja - papel blotting - papel blanco de la membrana- gel - membrana de transferencia - papel blanco de la membrana - papel blotting - esponja - esponja, y así de forma generalizada para este procedimiento.

A continuación se prepara el tampón de transferencia al 1% evitando la formación de burbujas. Se enciende de nuevo la fuente de alimentación (NuPage blot, introducir numero de unidades a transferir, introducir tiempo de transferencia en este caso 1 hora).

PROTOCOLO DE IMMUNOBLOTTING

El gel se sumerge en Simple Blue en agitación durante 1 hora (aunque para algunas proteínas es conveniente que se sumerja "overnight"). Después se lava con agua bidestilada por 3 veces consecutivas y se procede a "scanear" el gel.

La membrana se sumerge en 10 ml de la Blocking Solution durante 30 minutos en agitación y se decanta. Se realizan dos lavados con 10 ml de agua bidestilada por 5 minutos cada uno y se decanta. Se incuba con 10 ml de solución del anticuerpo primario a estudio durante 1 hora a temperatura ambiente. Se realizan 3 lavados de 5 minutos cada uno con 10 ml del atc-wash y se decanta. A continuación se incuba la membrana con 10 ml de solución del anticuerpo secundario durante 30 minutos y se decanta y se realizan 3 lavados de 5 minutos cada uno con 10 ml del atc-wash, dos lavados de 2 minutos con 10 ml de agua y se decanta. Incubamos la membrana con 5 ml de cromógeno hasta que las bandas violetas se revelen (de 1 a 60 minutos). Y se realizan dos lavados de 2 minutos con 10 ml de agua bidestilada. Secamos la membrana con papel de filtro en un ambiente cálido o bajo una lámpara de infrarrojos.

Preparación de soluciones para la membrana de nitrocelulosa:

- 1) Blocking solution: agua ultrafiltrada (14 ml), blocker diluent A (4 ml) y blocker diluent B (2 ml) ... total 20 ml.
- 2) Primary antibody diluent (relación 1:1000 y 1:5000): 10 ml de blocking solution y 10 μ l de atc primario.
- 3) Antibody wash: agua ultrafiltrada (75 ml) y antibody wash solution (16 x) 5 ml total ... 80 ml.



Fig. 34.- A: animales de experimentación previamente a su sacrificio. B: sistema homogeneizado de cristal SHEATON -USA. C: Proceso de homogenización de las muestras.



Fig. 35. - A: Eppendorf mostrando la porción soluble e insoluble del homogeneizado de una muestra de retina. B: Espectrofotómetro DYNATECH NR 7.000 sistema para la determinación colorimétrica de la concentración de proteínas. C: Realización de la electroforesis XCELL SURELOCK (invitrogel).

Test de escape.

Con el presente experimento hemos tratado de valorar cuales pudieran ser, a groso modo, las repercusiones que sobre la capacidad funcional del sistema visual tuvieran las mutaciones genéticas que hemos estudiado con sus alteraciones anatómicas descritas.

El "test de escape" de Morris es un test diseñado en principio para el estudio de las conductas de aprendizaje y memoria asociadas a la región del hipocampo cerebral. Consiste en una cubeta de agua en la que se sitúa una plataforma sobrelevada y donde el sujeto debe aprender a localizar la plataforma. La realización del "test de escape" de Morris depende de diferentes mecanismos, desde la atención, memoria y aprendizaje hasta la propia visión o la coordinación motora. Además el proceso cognitivo que fundamenta la realización de este test, también es directamente dependiente de diversos procesos bioquímicos (184, 185).

Hemos adaptado el modelo del "test de escape", para estudiar los cambios en el comportamiento asociados a estímulos luminosos, que ha sido descrito y utilizado por Diloreto, del Cerro y Navea. (186-189). Este modelo ha resultado ser satisfactorio para cuantificar la diferencia en cuanto al comportamiento entre ratas adultas que presentaban distrofias retinianas (ratas del Royal College of Surgeons) y ratas control, así como para detectar diferencias comportamentales entre ratas distróficas y ratas de este mismo grupo a las que les fueron trasplantadas células del EPR.

Hemos utilizado 6 ejemplares para cada uno de los grupos identificados con los números del 023 al 028.

El sistema utilizado en este test de escape está compuesto por un tanque de agua de 90X60 cm. de superficie y 35 cm. de altura. Una fuente de luz era fijada aleatoriamente en el punto opuesto al lugar de salida del ratón o en un punto equidistante a este punto de salida y que se situaba en uno de los laterales del tanque. (Fig. 36.-). En el décimo y último intento, la fuente luminosa junto a su plataforma se situó siempre según se indica en la Fig. 36.- A.

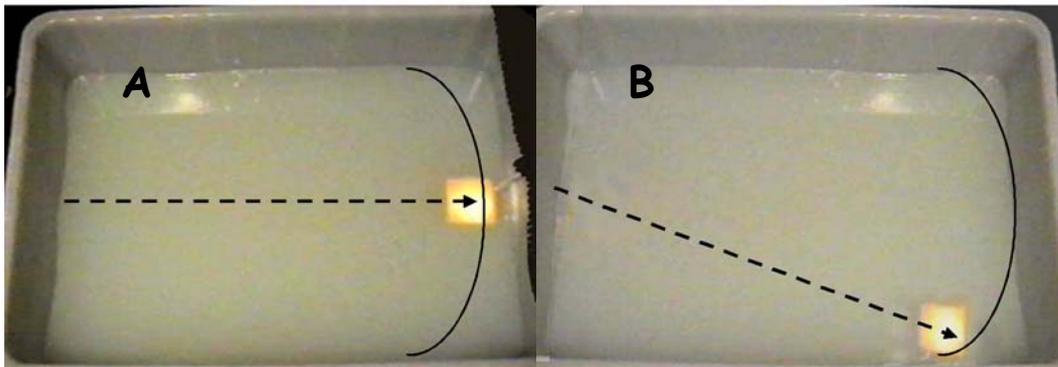


Fig.36- Esquemática de la posición de las fuentes luminosas, siempre equidistantes al punto de salida del ratón (flecha discontinua).

El tanque se llenó con agua a $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Bajo la fuente luminosa, colocamos una plataforma sumergida a 1.5 cm bajo el nivel del agua. La profundidad total del agua en el tanque era de 15 cm. En ningún punto del tanque el ratón podía hacer pie a excepción, claro está, de la plataforma sumergida.

En cada uno de los intentos del test apagábamos la luz ambiente, siendo en ese momento la única luz visible para el ratón la de la fuente luminosa que marcaba la posición de la plataforma sumergida donde el animal podía descansar. Colocábamos al ratón en el punto de salida y registrábamos los tiempos transcurridos entre este momento y la llegada del animal a la plataforma sumergida. Cuando el animal era capaz de alcanzar la plataforma, se le dejaba un tiempo de reposo sobre la misma de 30 segundos, de modo tal que el animal acabara relacionando la fuente luminosa con la plataforma sobre la que podía descansar y "escapar" así del agua. Con cada uno de estos ratones se realizó esta prueba 10 veces y de forma sucesiva.

En el caso de que algún animal no llegara a localizar la plataforma en un plazo superior a 60 segundos, este era el tiempo que anotábamos y el animal era guiado con un bastón hacia la plataforma.

Cada uno de los intentos era filmado por una cámara de vídeo digital (JVC- GR-DVP9US), que se encontraba montada sobre un trípode y cuyo objetivo quedaba en posición perpendicular al centro del tanque.

Una vez realizadas todas las filmaciones, y con ayuda de los programas de edición de vídeo y fotografía digital (Pínc hale Studio DC10 plus y Adobe Photodeluxe), proyectamos una cuadrícula de forma que la superficie total del tanque quedaba dividida en un total de 108 celdas (Fig. 37.-). Con el objeto de documentar la distancia recorrida por cada uno de los animales, proyectamos la secuencia trazada por el animal desde su salida y hasta la llegada a la plataforma y contabilizamos el número de celdas recorridas. Este procedimiento se realizó en el décimo de los intentos de cada ratón utilizado para el experimento.

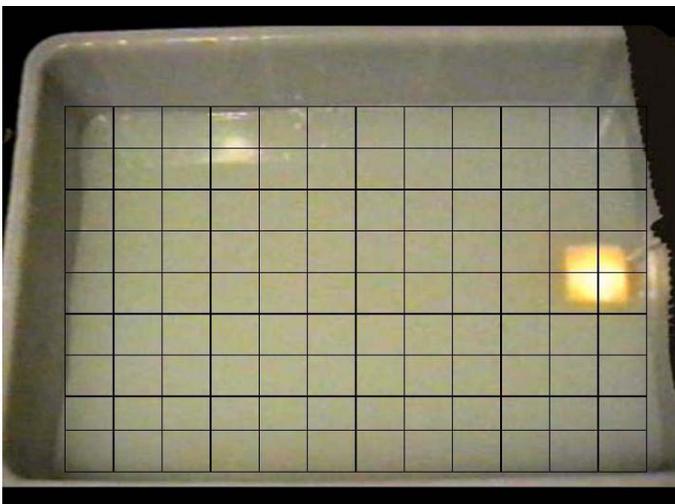


Fig.37- Representa la división en celdas de la superficie del tanque, con objeto de contabilizar el número de celdas recorridas por cada ratón en su trayectoria.

Análisis Estadístico.

Las medidas de todas las muestras obtenidas se recogieron en hojas de cálculo de la aplicación informática Excel, para antes de proceder al análisis estadístico realizar una depuración de los datos, con el fin de corregir los posibles errores de transcripción.

El análisis estadístico de los datos se realizó utilizando el paquete estadístico SPSS versión 11.5 para *windows*. En primer lugar, se procedió a la obtención de los estadísticos descriptivos: medidas de frecuencia, medidas de tendencia central, de dispersión, de forma e intervalos de confianza para todas las variables continuas. Posteriormente se comprobó la normalidad de las variables continuas mediante representaciones gráficas y tests de contraste de hipótesis.

Una vez asegurada la premisa de distribución normal de las variables, se aplicaron pruebas paramétricas y no paramétricas de comparación de medias para el contraste de hipótesis, según los casos. Para las comparaciones múltiples de grupos independientes se utilizó el análisis de la varianza (ANOVA) con corrección de Bonferroni, para determinar en primer lugar si existían diferencias globales entre los grupos y si existían determinar entre que grupos son significativas.

Cuando el número de medidas en los grupos es inferior a 30, se aplicaban las pruebas no paramétricas de comparación de medias de Kruskal-Wallis para K muestras independientes, para determinar si existían diferencias globales entre los grupos, y la prueba de Mann-Whitney para dos muestras independientes para determinar entre qué grupos eran significativas. Para evitar cometer el error Tipo I al utilizar las pruebas no paramétricas de comparación de medias de Kruskal-Wallis y de Mann-Whitney, adoptaremos un nivel $\alpha = 1\%$, por lo que serán los valores significativos $p < 0,01$ en lugar de $p < 0,05$.

Para la comparación de porcentajes se utilizó el test de X^2 de Pearson.

Todos los valores expresados tanto en el estudio morfométrico como en el resto vienen expresados en media +/- desviación típica (m+/-DT).

Para hallar las diferencias estadísticamente significativas siempre hemos comparado el grupo control con el resto. También hemos comprobado si existían diferencias significativas en cada caso entre los grupos ApoE y ApoE+D.

Los resultados han sido representados en gráficas. En ellos se muestra la $m \pm DT$. Las estrellas "★" representan que existe diferencia estadísticamente significativa de cada grupo con respecto al grupo Control. Cuando este signo aparece en las gráficas entre los grupos ApoE y ApoE+D significa que existe significación estadística entre ellos.

Resultados.

Peso y niveles lipídicos séricos de los animales

En este apartado mostraremos los resultados en cuanto al peso de los individuos de cada grupo y sus niveles de colesterol y triglicéridos en sangre.

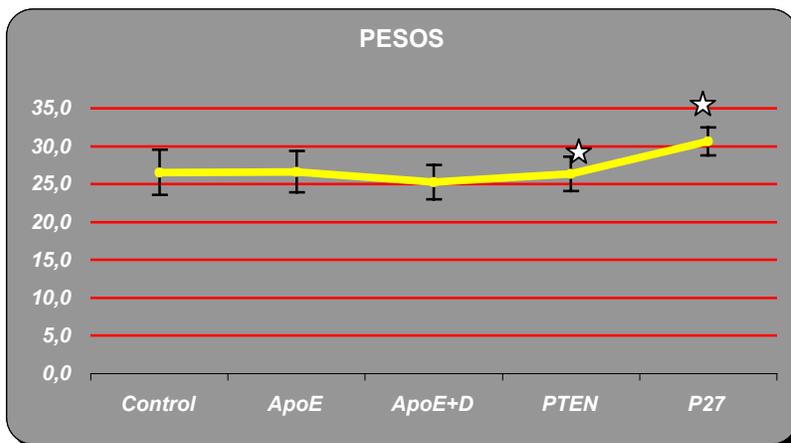
El peso medio de los animales fue en el grupo control de 25.73 +/-2.97 gr., en el grupo ApoE de 26.75 gr.+/- 2.73, 25.27 gr. +/- 2.24 en el grupo ApoE+D, 28.34 gr. +/- 4.3 en el PTEN y 30.56 gr. +/- 1.83 en el P27.

Con respecto al grupo control únicamente existió diferencia estadísticamente significativa en el grupo PTEN (P=0.02) y P27 (P<0.001).

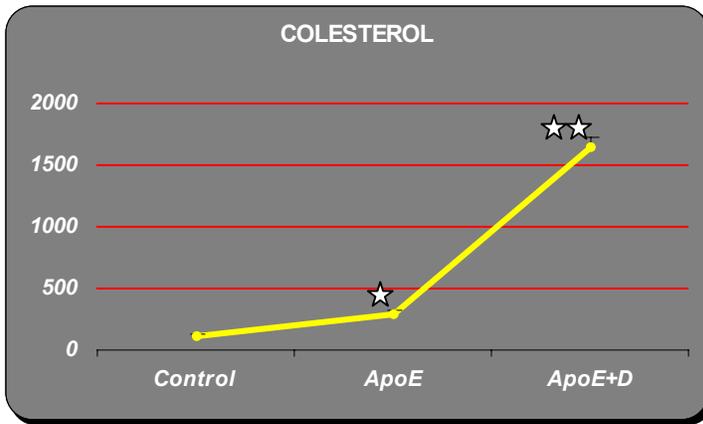
En cuanto a los niveles de colesterol, el grupo control presentaba unos valores de 117.65 mg/dl +/- 8, mientras que en los grupos ApoE y ApoE +D, los resultados fueron 294.68 mg/dl +/- 32.11 y 1653 mg/dl +/- 75.22, existiendo una diferencia estadísticamente significativa tanto de los dos grupos ApoE con respecto al control, como de ellos entre sí (P<0.001).

Los niveles de triglicéridos sanguíneos mostraron resultados proporcionales a los obtenidos para el colesterol, así en el grupo control el resultado fue de 47.53 mg/dl +/- 4.93, mientras que en los grupos ApoE y ApoE+D de 69.93 mg/dl +/- 5.52 y de 550 +/- 5.79 mg/dl respectivamente. También en este caso existió una diferencia estadísticamente significativa entre el grupo control y los grupos ApoE y ApoE+D, así como entre estos dos últimos (P<0.001).

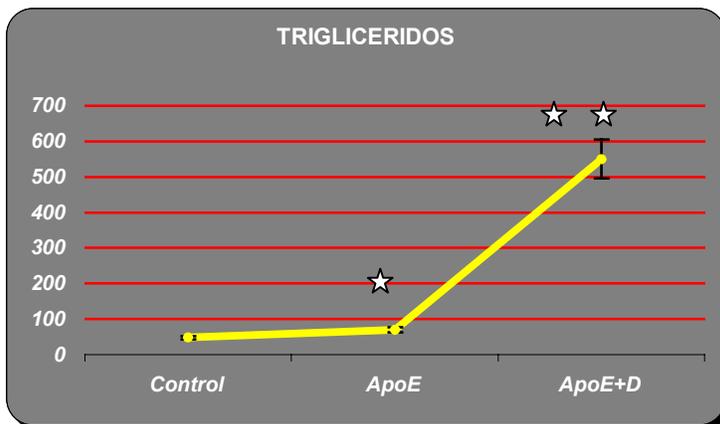
Todos estos valores quedan reflejados en las gráficas sucesivas.



Gráfica 2.-
Representa la media de los pesos en gr. de cada grupo



Gráfica 3.- Representa la media de los niveles séricos de colesterol en mg/dl. Las estrellas marcan significación estadística con respecto al grupo Control. La doble estrella en el grupo ApoE+D, significa que existe también significación estadística entre este y el grupo ApoE.



Gráfica 4.- Representa la media de los niveles séricos de triglicéridos en mg/dl. Las estrellas marcan significación estadística con respecto al grupo Control. La doble estrella en el grupo ApoE+D, significa que existe también significación estadística entre este y el grupo ApoE.

Estudio Morfométrico.

RESULTADO DEL CÁLCULO DEL ÁREA AXONAL.

A continuación mostramos en las tablas de la 11 a la 44 los resultados de las áreas expresadas en μm^2 que hemos medido para cada axón, en cada uno de los animales y en todos los grupos del estudio. En la primera fila de cada tabla consta el número identificativo del ejemplar sobre el que hemos realizado las medidas, indicándose además si las mediciones se han realizado en la zona central o periférica del NO. En la siguiente casilla de la misma fila consta la superficie del NO sobre la que hemos trabajado, que corresponde en todos los animales a $100 \mu\text{m}^2$. En la tercera casilla se indica el número total de axones contabilizados en esa área y en la casilla siguiente el área media axonal de ese ratón.

Control			
Ejemplar	Superficie.	Número de axones.	Área Media por axón.
Control 0001 Zona central	$100 \mu\text{m}^2$	52 axones	$0.98\mu\text{m}^2$
Área de los axones (μm^2)			
0.28	0.5	0.39	0.18
0.37	0.56	1.56	2.48
0.19	0.5	0.3	0.44
0.89	1.77	0.28	1.67
0.29	0.61	1.07	0.05
0.88	4.84	1.06	0.04
6.16	0.3	0.37	2.35
2.29	0.67	0.18	0.4
0.65	0.78	1.1	1.58
2.21	0.07	0.19	0.4
0.81	0.13	1.55	2.07
0.38	2.33	0.22	0.88
1.93	0.04	0.09	0.1

Tabla 11

Control			
Ejemplar	Superficie.	Número de axones.	Área Media por axón.
Control 0002 Zona periférica	$100 \mu\text{m}^2$	59 axones	$0.97\mu\text{m}^2$
Área de los axones (μm^2)			
0.28	1.79	0.17	1.89
0.18	0.6	0.04	0.25
0.37	0.95	0.44	0.25
0.17	4.9	0.88	0.13
0.95	2	0.72	0.84
0.3	0.69	0.54	1.07
1.75	0.8	0.02	0.71
1.06	0.08	1.95	0.44
6.31	0.14	1.83	0.64
0.04	0.04	0.41	1.49
0.2	2.35	0.14	1.35
0.97	0.4	5.51	0.15
0.39	1.58	0.33	0.3
0.57	0.04	1.22	0.62
0.52	0.18	2.48	

Tabla 12

Control			
Ejemplar	Superficie.	Número de axones.	Área Media por axón.
Control 0003 Zona central	100 μm^2	70 axones	0.67 μm^2
Área de los axones (μm^2)			
0.25	0.77	0.95	0.44
0.3	0.15	0.13	0.64
0.19	2.31	0.42	0.19
1.07	0.34	0.52	1.86
0.41	0.15	0.47	0.16
0.16	0.5	0.36	0.32
0.94	0.44	2.56	0.71
0.64	0.66	0.3	0.32
0.92	0.69	0.81	1.48
0.99	0.34	1.49	0.36
0.85	0.2	1.59	1.11
0.58	2.14	0.69	1.83
0.45	0.17	2.78	0.14
1.46	0.33	0.18	0.16
0.26	0.17	0.14	0.48
1.45	0.17	0.23	0.36
1.35	0.26	0.15	0.37
0.19	0.26		

Tabla 13

Control			
Ejemplar	Superficie.	Número de axones.	Área Media por axón.
Control 004 Zona periférica	100 μm^2	84 axones	0.6 μm^2
Área de los axones (μm^2)			
1.78	0.11	0.72	0.06
0.2	0.12	0.54	1.19
1.32	0.86	0.02	0.13
4.46	0.1	1.95	0.17
0.68	0.02	1.83	0.07
0.03	0.06	0.02	0.12
1.22	0.53	0.19	0.09
1.21	0.1	0.76	0.05
0.84	0.1	0.04	0.31
1.32	1.6	0.1	0.71
0.04	0.3	0.11	0.59
2.14	0.21	0.26	0.04
0.29	0.01	0.93	0.03
0.17	0.57	0.2	0.4
0.04	0.44	0.41	4.05
0.93	0.07	0.02	0.38
1.73	0.18	1.77	1.1
0.07	0.17	1.06	0.21
0.28	0.04	0.02	0.09
0.46	0.44	0.06	0.01
0.37	0.88	3.65	0.02

Tabla 14

Control			
Ejemplar	Superficie.	Número de axones.	Área Media por axón.
Control 0005 Zona central	100 μm^2	66 axones	0.84 μm^2
Área de los axones (μm^2)			
0.39	0.47	2.48	0.17
1.82	0.94	0.3	3.93
0.57	1.11	0.62	0.34
0.62	0.25	1.89	0.2
0.82	0.3	0.25	0.3
0.52	0.19	0.4	1.63
0.42	0.95	2.56	0.76
0.3	0.58	2.14	0.22
0.36	0.13	0.45	0.77
1.86	1.83	1.46	0.59
0.16	0.81	0.23	0.36
0.32	0.26	0.17	0.16
1.48	0.26	0.19	0.17
0.51	0.41	1.45	0.17
2.78	0.14	1.62	0.33
0.17	5.51	0.21	1.22
0.35	0.42		

Tabla 15

Control			
Ejemplar	Superficie.	Número de axones.	Área Media por axón.
Control 0006 Zona periférica	100 μm^2	59 axones	0.88 μm^2
Área de los axones (μm^2)			
1.54	0.14	0.17	0.3
1.7	0.49	3.93	1.89
1.82	2.01	0.3	0.4
0.26	0.25	5.51	0.62
0.81	0.39	0.42	2.48
3.45	0.57	0.77	0.25
0.82	0.62	0.31	0.17
0.22	0.16	0.36	0.35
1.63	0.13	0.19	0.17
0.76	2.57	0.16	1.38
0.22	1.18	0.33	0.22
0.4	0.54	0.59	0.55
0.64	0.29	0.21	1.62
1.31	0.13	0.41	0.51
0.47	0.84	1.22	

Tabla 16

Control			
Ejemplar	Superficie.	Número de axones.	Área Media por axón.
Control 0007 Zona central	100 μm^2	63 axones	0.69 μm^2
Área de los axones (μm^2)			
1.18	0.81	3.45	0.32
2.01	0.64	0.19	0.13
2.57	1.31	0.22	0.66
0.25	0.47	0.4	0.16
0.13	1.54	0.14	1.38
0.84	1.7	0.26	0.22
1.07	0.54	0.49	0.55
0.71	0.29	0.44	2.31
0.44	0.15	0.15	0.77
0.64	0.69	0.34	0.92
1.49	0.36	0.31	0.41
1.35	0.64	0.5	0.16
0.15	0.18	0.99	1.59
0.16	0.85	0.17	0.69
0.48	0.33	0.26	0.37
0.36	0.14	0.19	

Tabla 17

ApoE			
Ejemplar	Superficie.	Número de axones.	Área Media por axón.
ApoE 0003 Zona central	100 μm^2	60 axones	0.91 μm^2
Área de los axones (μm^2)			
1.29	0.62	1.47	0.65
1.96	2.69	0.43	0.14
0.25	1.21	0.64	0.13
0.4	0.93	0.75	0.23
0.61	0.18	0.71	0.33
0.21	1.04	0.91	0.3
1.71	1.03	0.36	0.13
0.54	0.51	0.14	3.99
1.31	0.78	0.39	0.19
0.73	0.4	1.2	2.52
1.4	2.85	2.05	0.36
0.45	1.51	1.57	0.4
0.65	1.91	0.13	0.25
2.59	0.16	1.57	0.78
0.18	0.49	0.3	1.51

Tabla 18

ApoE			
Ejemplar	Superficie.	Número de axones.	Área Media por axón.
ApoE 0002 Zona periférica	100 μm^2	63 axones	1.19 μm^2
Área de los axones (μm^2)			
0.73	0.36	0.14	0.7
1.71	0.94	0.66	0.67
0.38	0.14	0.45	0.16
0.69	3.57	0.29	0.87
1.81	2.3	2.17	0.49
0.57	0.17	1.17	2.21
1.43	0.18	0.72	0.72
0.34	1.46	0.36	0.25
0.99	1.04	8.31	0.89
0.27	3.48	0.44	1.78
0.36	3.02	1.52	0.83
1.65	1.03	0.75	2.14
0.16	0.6	1.36	0.83
1	0.48	0.4	0.85
1.91	3.72	2.58	1.51
0.62	0.74	1.26	

Tabla 19

ApoE			
Ejemplar	Superficie.	Número de axones.	Área Media por axón.
ApoE 0003 Zona central	100 μm^2	60 axones	0.91 μm^2
Área de los axones (μm^2)			
1.29	0.62	1.47	0.65
1.96	2.69	0.43	0.14
0.25	1.21	0.64	0.13
0.4	0.93	0.75	0.23
0.61	0.18	0.71	0.33
0.21	1.04	0.91	0.3
1.71	1.03	0.36	0.13
0.54	0.51	0.14	3.99
1.31	0.78	0.39	0.19
0.73	0.4	1.2	2.52
1.4	2.85	2.05	0.36
0.45	1.51	1.57	0.4
0.65	1.91	0.13	0.25
2.59	0.16	1.57	0.78
0.18	0.49	0.3	1.51

Tabla 20

ApoE			
Ejemplar	Superficie.	Número de axones.	Área Media por axón.
ApoE 0004 Zona periférica	100 μm^2	37 axones	1.31 μm^2
Área de los axones (μm^2)			
3.66	2.48	0.99	1.44
0.62	0.87	0.94	0.37
1.18	0.75	0.13	0.21
0.42	0.56	1.91	1.65
0.44	4.76	1.06	1.25
1.62	0.17	2.39	0.19
3.68	0.57	4.21	0.94
1.05	0.18	0.29	2.38
1.4	1.6	0.35	0.74
1.26			

Tabla 21

ApoE			
Ejemplar	Superficie.	Número de axones.	Área Media por axón.
ApoE 0005 Zona central	100 μm^2	42 axones	1.16 μm^2
Área de los axones (μm^2)			
1.47	4.02	0.17	0.47
0.43	1.37	0.69	1.39
0.17	1.01	2.07	0.9
0.18	0.78	0.14	0.99
1.46	1.17	3.57	0.27
1.7	0.28	2.3	0.36
1.99	2.34	1.16	0.36
2.64	0.18	4.84	0.94
0.2	0.9	1.43	1.96
0.29	0.75	0.8	0.13
0.16	0.36		

Tabla 22

ApoE			
Ejemplar	Superficie.	Número de axones.	Área Media por axón.
ApoE 0006 Zona periférica	100 μm^2	37 axones	1.1 μm^2
Área de los axones (μm^2)			
1.46	0.17	0.24	1.65
2.79	0.13	0.55	0.16
0.61	2	3.09	1
0.18	0.78	1.59	0.64
0.91	1.06	1.91	0.75
0.36	0.4	0.16	0.71
0.14	0.25	0.49	2.55
1.11	2.85	0.78	0.18
3.85	1.51	1.51	1.51
0.74			

Tabla 23

ApoE			
Ejemplar	Superficie.	Número de axones.	Área Media por axón.
ApoE 0007 Zona central	100 μm^2	42 axones	1.17 μm^2
Área de los axones (μm^2)			
0.56	0.78	1.59	0.95
0.86	2	1.46	1.85
2.5	1.06	2.79	0.89
1.08	2.55	0.61	0.89
1.91	0.18	0.74	1.26
1.6	1.51	0.13	0.74
1.53	1.11	0.18	0.38
0.42	3.85	0.93	0.29
1.34	0.74	0.62	0.18
0.77	0.37	2.33	1.08
0.35	2.29		

Tabla 24

ApoE+D			
Ejemplar	Superficie.	Número de axones.	Área Media por axón.
ApoE+D 0001 Zona central	100 μm^2	28 axones	1.34 μm^2
Área de los axones (μm^2)			
2.88	2.12	1.54	1.01
0.14	0.14	0.87	2.7
1.54	1.36	0.44	0.43
0.6	0.18	0.75	1.26
0.47	0.48	0.84	0.86
3.92	0.5	0.17	3.07
2.05	0.86	0.43	5.96

Tabla 25

ApoE+D			
Ejemplar	Superficie.	Número de axones.	Área Media por axón.
ApoE+D 0002 Zona periférica	100 μm^2	63 axones	1.21 μm^2
Área de los axones (μm^2)			
3.27	1.09	2.07	0.35
3.23	5.86	0.68	0.17
1.32	0.39	1.72	1.49
0.94	0.66	0.23	0.19
2.08	0.2	5.78	1.09
3.09	2.02	0.84	0.2
2.76	1.4	1.66	1.62
0.94	0.35	9.37	0.22
1.71	0.76	0.77	0.28
0.45	0.37	0.81	0.29
0.57	1.31	0.41	0.13
0.67	2.39	0.88	0.19
0.13	0.65	1.12	0.52
0.41	0.44	1.09	0.29
0.34	0.28	0.71	0.36
0.43	0.15	0.49	

Tabla 26

ApoE+D			
Ejemplar	Superficie.	Número de axones.	Área Media por axón.
ApoE+D 0003 Zona central	100 μm^2	47 axones	1.31 μm^2
Área de los axones (μm^2)			
2.01	6.66	0.43	0.45
2.73	0.21	0.54	0.36
3.48	0.44	1.09	2.38
0.73	0.48	0.82	0.78
0.15	0.14	1.59	1.78
0.14	1.31	1.01	1.7
0.75	0.66	0.81	0.46
4.5	0.29	0.93	6.48
0.15	0.14	7.91	0.17
0.46	1.29	0.22	1.34
1.06	0.4	0.31	0.55
0.5	0.62	0.24	

Tabla 27

ApoE+D			
Ejemplar	Superficie.	Número de axones.	Área Media por axón.
ApoE+D 0004 Zona periférica	100 μm^2	61 axones	1.01 μm^2
Área de los axones (μm^2)			
0.18	1.06	0.16	0.14
0.91	0.4	1	1.46
0.36	0.25	3.27	2.79
0.39	1.49	3.23	0.61
0.66	0.19	1.32	0.17
0.68	0.2	2.07	0.13
1.72	1.11	2	0.84
0.77	1.4	0.78	0.55
0.81	2.02	3.09	0.29
0.65	0.94	2.08	0.78
0.75	0.87	3.85	1.51
0.39	0.43	0.74	0.61
0.15	0.59	0.88	0.34
0.88	0.71	1.19	0.57
0.18	0.13	1.51	0.71
1.51			

Tabla 28

ApoE+D			
Ejemplar	Superficie.	Número de axones.	Área Media por axón.
ApoE+D 0005 Zona central	100 μm^2	51 axones	1.27 μm^2
Área de los axones (μm^2)			
0.94	3.42	0.72	1.7
0.51	0.45	2.26	0.52
0.96	3.23	0.35	0.96
0.3	1.36	0.75	1.46
4.74	0.17	2.52	0.48
1.24	0.19	1.94	1.75
0.13	0.14	3.15	3.04
0.73	5.56	1.03	0.36
0.64	0.15	0.31	7.02
0.52	0.16	0.75	1.13
0.88	0.6	1.15	1.09
0.14	0.24	1.08	0.95
0.16	0.26	0.65	

Tabla 29

ApoE+D			
Ejemplar	Superficie.	Número de axones.	Área Media por axón.
ApoE+D 0006 Zona periférica	100 μm^2	59 axones	0.98 μm^2
Área de los axones (μm^2)			
0.43	1.59	0.92	1.21
0.15	1.5	5.97	0.43
0.54	1.3	0.35	0.27
6.13	0.88	0.34	0.54
0.31	2.46	0.23	0.26
0.4	0.48	0.93	0.35
0.2	1.39	0.49	0.38
1.32	1.55	0.47	0.47
0.16	0.4	0.24	1
3.61	1.86	1.15	0.15
1.28	0.17	2.03	0.15
0.26	2.11	1.01	0.66
0.8	1.17	1.85	0.52
0.14	0.42	0.46	1.15
0.76	0.14	0.23	

Tabla 30

ApoE+D			
Ejemplar	Superficie.	Número de axones.	Área Media por axón.
ApoE 0007 Zona central	100 μm^2	49 axones	1.04 μm^2
Área de los axones (μm^2)			
1.09	0.23	1.09	1.65
0.2	2.78	2.86	0.24
1.62	1.09	1.66	0.75
0.35	1.59	3.37	2.55
0.17	1.91	0.22	0.28
0.35	2.76	0.37	0.16
0.76	0.94	1.31	0.49
1.85	1.71	0.13	0.64
0.41	1.42	0.19	0.64
0.45	1.39	0.52	0.56
1.43	1.27	1.08	0.25
0.81	0.84	1.94	0.14
0.45			

Tabla 31

PTEN			
Ejemplar	Superficie.	Número de axones.	Área Media por axón.
PTEN 0001 Zona central	100 μm^2	50 axones	1.29 μm^2
Área de los axones (μm^2)			
5.01	0.22	0.24	0.38
1.24	0.26	0.56	0.6
0.87	0.42	1.96	0.89
6.95	0.53	1.37	1.37
2.77	0.22	2.39	0.86
2.57	6.51	0.68	0.78
0.28	2.99	0.45	0.81
4.64	0.39	3.89	0.21
0.51	0.63	0.33	0.55
0.63	0.86	0.27	1.46
0.28	1.49	0.49	0.93
0.15	0.54	0.3	0.26
0.13	1.39		

Tabla 32.-

PTEN			
Ejemplar	Superficie.	Número de axones.	Área Media por axón.
PTEN 0002 Zona periférica	100 μm^2	40 axones	1.53 μm^2
Área de los axones (μm^2)			
1.51	0.17	2.04	1.86
1.95	1.56	0.55	0.23
1.8	2.04	3.27	1.27
2.47	0.19	0.34	0.24
2.55	1.53	3.49	0.6
1.04	2.88	0.65	0.52
8.12	0.38	4.47	0.15
4.22	3.63	0.93	0.29
0.77	1.4	0.58	0.19
0.34	0.19	0.52	0.32

Tabla 33.--

PTEN			
Ejemplar	Superficie.	Número de axones.	Área Media por axón.
PTEN 0003 Zona central	100 μm^2	46 axones	0.99 μm^2
Área de los axones (μm^2)			
0.57	0.52	0.54	0.34
1.09	0.52	0.22	3.16
2.47	0.28	1.7	0.76
0.57	0.55	0.69	0.73
2.51	0.52	3.77	0.27
2.87	0.19	4.68	0.63
0.53	2.07	1.82	0.32
0.73	1.3	0.69	0.25
0.25	0.46	0.16	0.88
0.21	0.13	0.18	2.14
0.88	0.83	0.64	0.48
0.16	0.32		

Tabla 34.-

PTEN			
Ejemplar	Superficie.	Número de axones.	Área Media por axón.
PTEN 0004 Zona periférica	100 μm^2	46 axones	1.17 μm^2
Área de los axones (μm^2)			
2	1.85	0.78	1.59
1.06	0.89	2.55	0.89
1.46	0.95	0.18	1.51
2.79	0.56	0.38	1.11
0.61	0.86	0.29	0.18
0.74	1.26	0.18	1.53
0.13	0.74	1.08	0.42
2.5	1.91	1.18	0.35
1.08	1.6	0.93	3.85
0.74	0.62	2.33	0.37
1.16	0.77	2.29	1.34
1.19	1.15		

Tabla 35.-

PTEN			
Ejemplar	Superficie.	Número de axones.	Área Media por axón.
PTEN 0005 Zona central	100 μm^2	41 axones	1.15 μm^2
Área de los axones (μm^2)			
2.39	0.71	0.25	0.66
1.72	1.41	0.69	0.31
0.17	2.19	2.03	0.55
0.92	2.64	0.34	0.8
1.17	0.27	2.31	4.94
0.52	0.43	0.27	1.26
0.23	0.28	3.39	2.08
0.45	1.17	1.38	0.88
0.64	0.32	0.61	0.47
1.37	0.55	0.67	0.34
3.67			

Tabla 36.-

PTEN			
Ejemplar	Superficie.	Número de axones.	Área Media por axón.
PTEN 0006 Zona periférica	100 μm^2	54 axones	0.96 μm^2
Área de los axones (μm^2)			
2.3	2.9	2.96	4.05
0.47	0.26	2.54	0.31
0.46	0.38	0.2	0.21
0.26	2.32	0.17	0.66
0.74	0.44	0.17	0.16
0.14	0.3	0.13	2.35
0.56	0.43	0.29	0.32
0.74	0.4	0.33	0.35
0.18	2.69	0.16	0.22
0.87	0.45	0.99	0.34
2.07	7.1	0.88	1.8
0.41	0.18	0.32	0.19
1.4	1.46	0.57	0.14
0.92	0.62		

Tabla 37.-

PTEN			
Ejemplar	Superficie.	Número de axones.	Área Media por axón.
PTEN 0007 Zona central	100 μm^2	39 axones	1.38 μm^2
Área de los axones (μm^2)			
0.22	0.46	0.81	0.19
3.73	0.51	0.81	0.15
5.81	2.1	0.17	0.99
0.94	1.14	0.93	0.38
0.23	1.53	0.82	1.17
0.85	0.74	1.8	0.22
3.35	0.33	3.45	0.15
0.45	0.82	0.16	2.95
1.58	1.81	5.39	0.53
1.05	0.91	4.29	

Tabla 38.-

P27			
Ejemplar	Superficie.	Número de axones.	Área Media por axón.
P27 0001 Zona central	100 μm^2	49 axones	1.85 μm^2
Área de los axones (μm^2)			
5.29	0.16	3.08	3.66
4.51	0.18	0.5	0.34
0.42	0.31	3.6	2.8
5.17	0.21	3.38	0.53
1.69	0.81	2.43	2.78
0.13	3.69	4.94	3.92
1.36	1.93	0.3	1.26
2.06	0.33	4.33	0.2
0.14	0.75	0.28	0.98
2.76	0.79	0.25	1.85
2.66	0.63	3.33	1.92
1.39	0.91	1.43	3.18
1.36			

Tabla 39.-

P27			
Ejemplar	Superficie.	Número de axones.	Área Media por axón.
P27 0002 Zona periférica	100 μm^2	52 axones	1.26 μm^2
Área de los axones (μm^2)			
3.04	5.45	0.76	0.82
0.22	0.35	0.46	0.49
3.96	0.23	2.74	7.18
0.15	0.16	3.26	0.2
1.56	0.16	2.74	0.14
1.04	2.02	1.57	0.73
0.3	0.18	0.75	0.88
0.17	0.18	1.01	0.49
0.48	0.16	0.24	0.91
4.76	0.78	3.65	0.47
3.14	0.31	0.17	0.48
0.16	0.2	0.39	4.92
0.74	0.18	0.25	0.18

Tabla 40.-

P27			
Ejemplar	Superficie.	Número de axones.	Área Media por axón.
P27 0004 Zona periférica	100 μm^2	51 axones	1.38 μm^2
Área de los axones (μm^2)			
2.39	0.52	0.76	0.56
1.27	2.08	2.85	0.25
0.84	1.94	0.41	0.14
1.09	9.37	1.09	3.09
5.86	0.22	0.2	1.59
1.66	0.37	1.62	1.91
1.65	2.76	0.35	0.23
0.24	0.94	0.17	5.78
0.75	1.71	0.35	0.28
2.55	0.49	1.39	0.45
0.16	0.64	0.13	1.43
0.19	0.64	1.42	0.45
0.81	1.31	1.37	

Tabla 42.-

P27			
Ejemplar	Superficie.	Número de axones.	Área Media por axón.
P27 0003 Zona central	100 μm^2	56 axones	1.36 μm^2
Área de los axones (μm^2)			
2.41	1.55	0.37	0.49
3.83	0.85	4.78	0.21
0.33	0.54	0.2	0.34
0.46	0.3	0.89	0.24
1.46	0.73	0.78	2.06
0.21	2.68	6.72	0.45
0.14	0.26	0.38	0.74
0.41	0.27	1.79	0.35
0.16	0.3	0.24	0.84
0.2	5.38	5.85	0.32
1.51	7.42	1.27	0.63
0.96	2.96	1.55	0.95
0.24	0.23	0.61	3.75
1.42	0.33	0.32	1.7

Tabla 41.-

P27			
Ejemplar	Superficie.	Número de axones.	Área Media por axón.
P27 0005 Zona central	100 μm^2	44 axones	1.71 μm^2
Área de los axones (μm^2)			
2.45	1.18	0.19	1.53
1.37	2.97	0.52	8.59
2.88	0.67	0.23	2.38
0.43	0.54	9.51	0.53
0.14	6.92	0.29	0.19
1.59	1.57	0.5	0.83
0.19	0.21	3.54	0.16
0.44	0.43	2.02	2.12
0.72	0.19	3.47	3.12
2.45	0.42	0.19	3.33
1.53	0.77	1.43	0.94

Tabla 43.-

P27			
Ejemplar	Superficie.	Número de axones.	Área Media por axón.
P27 0007 Zona central	100 μm^2	59 axones	1.36 μm^2
Área de los axones (μm^2)			
0.22	9.17	0.4	0.69
0.37	3.03	0.71	1.56
2.76	0.73	0.46	1.62
1.32	6.08	0.46	0.17
6.93	0.28	1.71	1.65
0.3	0.45	0.49	0.36
5.78	0.26	0.63	1.43
0.88	0.19	0.29	0.45
4.1	1.52	0.36	0.42
0.16	0.66	0.18	1.94
1.91	0.2	1.73	0.35
0.23	0.16	0.32	0.2
0.24	0.35	0.69	0.96
3.1	2.52	0.96	0.52
1.51	1.1	1.93	

P27			
Ejemplar	Superficie.	Número de axones.	Área Media por axón.
P27 0006 Zona periférica	100 μm^2	53 axones	1.34 μm^2
Área de los axones (μm^2)			
0.2	0.42	0.36	0.26
0.88	1.73	0.18	0.19
4.1	3.03	0.28	1.52
1.32	0.73	0.69	2.14
6.93	6.08	1.56	0.16
0.3	0.7	3.96	0.4
0.28	0.3	0.46	0.71
2.32	0.3	0.46	0.74
0.66	0.92	0.34	0.36
1.52	0.42	1.72	1.65
1.74	0.63	0.3	0.33
0.32	0.29	0.67	0.27
1.83	7.03	5.34	0.36
0.68			

Tabla 44. -

Tabla 45. -

El resultado en cuanto a la cantidad de axones contabilizados en cada uno de los grupos se muestra en la Tabla 46. El número total de axones analizados en las 3500 μm^2 fue de 1830.

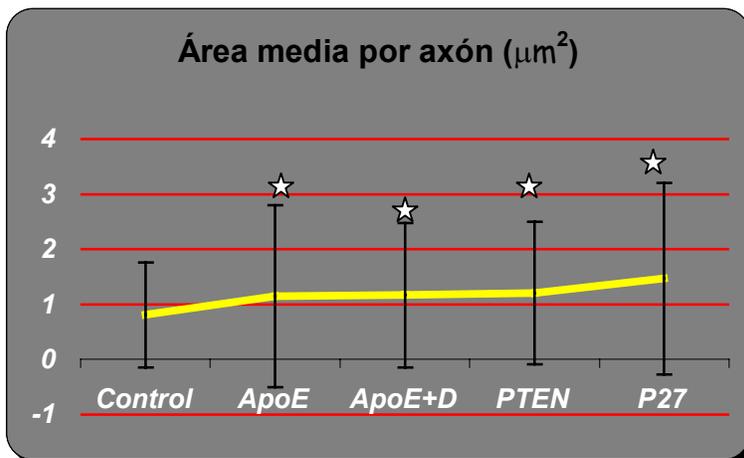
Grupo	Número de animales	Axones Contabilizados	Área Media por axón (μm^2)
Control	7	453	0.8+/-0.95
ApoE	7	339	1.13+/-1.05
ApoE+D	7	358	1.16+/-1.31
PTEN	7	316	1.21+/-1.29
P27	7	364	1.46+/-1.74

Tabla 46. - Se sintetizan los resultados obtenidos en las anteriores tablas por grupos.

En cuanto al resultado del cálculo del área media axonal, destaca la existencia en los ratones pertenecientes al grupo P27 de superficies transversales mucho mayores que en el grupo control.

El grupo PTEN presenta, aunque en menor cuantía que el grupo P27, axones ópticos también mayores con respecto al grupo Control. El tamaño de los axones de los grupos ApoE y ApoE+D es semejante al presente en los PTEN.

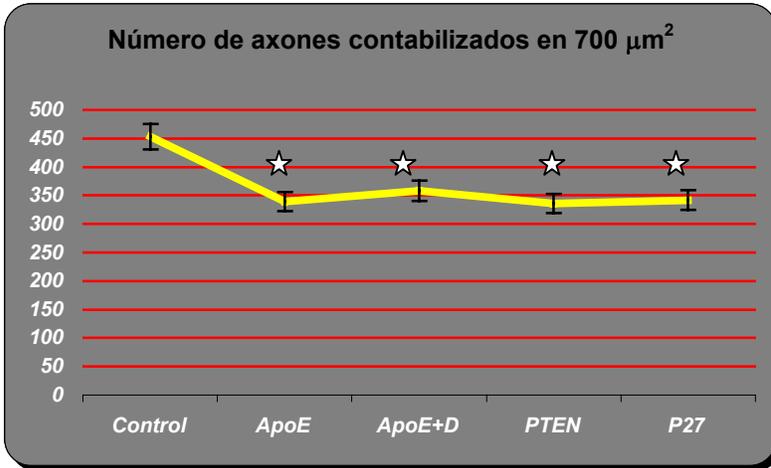
Existieron diferencias estadísticamente significativas al comparar cada uno de los grupos con el grupo Control, pero no hubo significación entre el grupo ApoE y ApoE+D (Gráfica 5.-)



Gráfica 5.- Los datos son las medias +/- DT. Como reflejan las estrellas (★) existieron diferencias estadísticamente significativas al comparar el grupo Control con el ApoE (P=0.002), con el ApoE+D

(P=0.001), PTEN (P<0.001) y P27(P<0.001), sin embargo no existen diferencias entre los dos grupos ApoE (P=1)

En cuanto a la densidad axonal, expresada como el número de axones contabilizados en 700 μm² para cada uno de los distintos grupos, observamos una tendencia inversa a la expuesta en las medidas de las áreas axonales, es decir, al ser de mayor tamaño los axones de los grupos del estudio al compararlos con el Control, el número de estos por unidad de superficie es menor y por tanto su densidad (Gráfica 6.-).



Gráfica 6.- Existe significación estadística al comparar la densidad axonal de cada uno de los grupos con el grupo control ($P < 0.0001$). No existieron diferencias al comparar los grupos ApoE y ApoE+D

RESULTADOS DEL CÁLCULO DE LAS SUPERFICIES DE LOS NERVIOS ÓPTICOS.

En las tablas 47 a 51 se detallan los resultados de los cálculos de las superficies transversas de los NO obtenidas por medio de microscopía óptica. Cada una de las tablas va encabezada por el código de color de su grupo y en ellas figuran, a la izquierda el número identificativo de cada ejemplar y a la derecha la superficie en μm^2 . En la última celda consta la media +/- DT de cada grupo.

Control	
Ejemplar	Área μm^2
control 0001	114678
control 0002	129997
control 0003	103770
control 0004	132278
control 0005	139120
control 0006	179031
control 0007	114033
control 0008	120987
control 0009	117890
control 0010	122435
control 0011	124745
control 0012	114528
control 0013	129065
control 0014	116794
control 0015	118790
MEDIA+/-DT	125209+/-17277

Tabla 47

ApoE	
Ejemplar	Área μm^2
ApoE 0001	179031
ApoE 0002	158505
ApoE 0003	166488
ApoE 0004	189294
ApoE 0005	140260
ApoE 0006	117453
ApoE 0007	165765
ApoE 0008	171234
ApoE 0009	160976
ApoE 0010	166752
ApoE 0011	173450
ApoE 0012	163432
ApoE 0013	171548
ApoE 0014	164532
ApoE 0015	150982
MEDIA+/-DT	162646+/-16889

tabla48

ApoE+D	
Ejemplar	Área μm^2
ApoE+D 0001	160873
ApoE+D 0002	166754
ApoE+D 0003	156987
ApoE+D 0004	168945
ApoE+D 0005	143245
ApoE+D 0006	161459
ApoE+D 0007	171287
ApoE+D 0008	164387
ApoE+D 0009	161289
ApoE+D 0010	181549
ApoE+D 0011	165176
ApoE+D 0012	155693
ApoE+D 0013	158720
ApoE+D 0014	163690
ApoE+D 0015	157634
MEDIA+/-DT	162512+/-8462

tabla 49

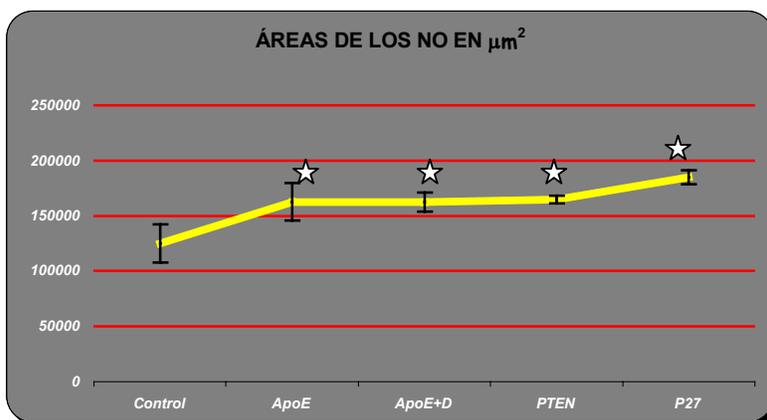
PTEN	
Ejemplar	Área $m\mu^2$
PTEN 0001	165358
PTEN 0002	164587
PTEN 0003	167097
PTEN 0004	162345
PTEN 0005	163879
PTEN 0006	168976
PTEN 0007	165487
PTEN 0008	167893
PTEN 0009	156764
PTEN 0010	162387
PTEN 0011	171890
PTEN 0012	164982
PTEN 0013	163409
PTEN 0014	160296
PTEN 0015	166583
MEDIA+/-DT	164795+/-3645

Tabla 50

P27	
Ejemplar	Área $m\mu^2$
P27 0001	168769
P27 0002	192715
P27 0003	187965
P27 0004	179054
P27 0005	189065
P27 0006	192387
P27 0007	184367
P27 0008	178954
P27 0009	185643
P27 0010	185463
P27 0011	179865
P27 0012	183421
P27 0013	191298
P27 0014	189056
P27 0015	188639
MEDIA+/-DT	185110+/-6402

tabla 51

Como ocurrió en las mediciones de las áreas axonales, al obtener los valores de las superficies trasversales de los NO, hemos detectado un aumento muy importante de estas en el grupo P27, seguido por el grupo PTEN, ApoE+D y ApoE, en este orden. Tampoco en este caso se halló significación estadística entre los grupos ApoE y ApoE+D.



Gráfica 6.- Existe significación estadística al comparar las superficies trasversales de cada uno de los grupos con respecto al grupo control ($P < 0.001$). No existieron diferencias al comparar los grupos ApoE y ApoE+D.

RESULTADO DEL CÁLCULO DEL ÍNDICE DE MIELINIZACIÓN.

En las tablas de la 52 a la 60 se muestran los resultados de las mediciones realizadas de cada uno de los axones. Como anteriormente el color y el encabezamiento de cada tabla identifica el grupo de estudio al que pertenecen los axones. Dentro de cada grupo se han dividido los axones en pequeños, medianos y grandes, como así consta también en el encabezamiento de cada tabla.

Como se indicó en el apartado de material y métodos, dentro de cada celda constan tres números, el superior corresponde al diámetro medio del axón, el del medio al espesor de la mielina y bajo, en negrita, figura el índice de mielinización obtenido a partir de los dos primeros.

En la Tabla 67 figuran los resultados medios obtenidos para cada tamaño axonal y para cada grupo del estudio.

GRUPO Control, axones pequeños.									
0.725	0.915	0.68	0.47	0.765	0.86	0.36	0.77	0.495	0.73
0.05	0.1	0.13	0.09	0.13	0.09	0.09	0.11	0.13	0.14
0.06896552	0.10928962	0.19117647	0.19148936	0.16993464	0.10465116	0.25	0.14285714	0.26262626	0.19178082
0.96	0.78	0.43	0.595	0.53	0.815	0.43	0.845	0.64	0.76
0.14	0.13	0.1	0.09	0.08	0.15	0.1	0.1	0.38	0.13
0.14583333	0.16666667	0.23255814	0.1512605	0.1509434	0.18404908	0.23255814	0.1183432	0.59375	0.17105263
0.605	0.755	0.565	0.805	0.825	0.85	0.75	0.85	0.785	0.525
0.07	0.03	0.11	0.11	0.08	0.06	0.13	0.1	0.12	0.16
0.11570248	0.0397351	0.19469027	0.13664596	0.0969697	0.07058824	0.17333333	0.11764706	0.15286624	0.3047619
0.845	0.365	0.78	0.885	0.95	0.43	0.8	0.66	0.72	0.625
0.12	0.07	0.16	0.13	0.09	0.12	0.12	0.07	0.08	0.11
0.14201183	0.19178082	0.20512821	0.14689266	0.09473684	0.27906977	0.15	0.10606061	0.11111111	0.176
0.31	0.685	0.585	0.525	0.68	0.79	0.35	0.805	0.81	0.805
0.13	0.11	0.12	0.12	0.12	0.1	0.05	0.09	0.1	0.2
0.41935484	0.16058394	0.20512821	0.22857143	0.17647059	0.12658228	0.14285714	0.11180124	0.12345679	0.2484472
0.575	0.765	0.45	0.81	0.645	0.8	0.8	0.8	0.96	0.74
0.13	0.1	0.09	0.13	0.1	0.09	0.12	0.08	0.15	0.19
0.22608696	0.13071895	0.2	0.16049383	0.15503876	0.1125	0.15	0.1	0.15625	0.25675676
0.615	0.95	0.575	0.44	0.64	0.735	0.405	0.5	0.97	0.81
0.07	0.13	0.13	0.11	0.14	0.11	0.12	0.09	0.18	0.11
0.11382114	0.13684211	0.22608696	0.25	0.21875	0.14965986	0.2962963	0.18	0.18556701	0.13580247
0.72	0.505	0.94	0.485	0.41	0.965	0.535	0.695	0.925	0.715
0.16	0.1	0.13	0.09	0.11	0.16	0.08	0.1	0.15	0.11
0.22222222	0.1980198	0.13829787	0.18556701	0.26829268	0.16580311	0.14953271	0.14388489	0.16216216	0.15384615
0.8	0.695	0.5	0.535	0.85	0.72	0.63	0.5	0.345	0.71
0.17	0.17	0.12	0.12	0.18	0.19	0.08	0.1	0.1	0.14
0.2125	0.24460432	0.24	0.22429907	0.21176471	0.26388889	0.12698413	0.2	0.28985507	0.1971831
0.805	0.66	0.345	0.4	0.99	0.885	0.975	0.69	0.75	0.38
0.15	0.09	0.11	0.1	0.11	0.11	0.14	0.1	0.14	0.1
0.1863354	0.13636364	0.31884058	0.25	0.11111111	0.12429379	0.14358974	0.14492754	0.18666667	0.26315789
0.525	0.795	0.915	0.915	0.955	0.805	0.47	0.88	0.53	0.635
0.1	0.12	0.15	0.14	0.15	0.12	0.09	0.12	0.14	0.07
0.19047619	0.1509434	0.16393443	0.15300546	0.15706806	0.14906832	0.19148936	0.13636364	0.26415094	0.11023622
0.705	0.73	0.485	0.765	0.85	0.65	0.735	0.745	0.4	0.565
0.12	0.1	0.14	0.11	0.09	0.1	0.14	0.08	0.13	0.08
0.17021277	0.1369863	0.28865979	0.14379085	0.10588235	0.15384615	0.19047619	0.10738255	0.325	0.14159292
0.69	0.595	0.455	0.77	0.73	0.5	0.78	0.445	0.495	0.735
0.12	0.1	0.08	0.1	0.1	0.09	0.1	0.07	0.12	0.08
0.17391304	0.16806723	0.17582418	0.12987013	0.1369863	0.18	0.12820513	0.15730337	0.24242424	0.10884354
0.67	0.67	0.475	0.795	0.41	0.68	0.79	0.605	0.62	0.485
0.09	0.12	0.09	0.15	0.08	0.12	0.15	0.12	0.12	0.14
0.13432836	0.17910448	0.18947368	0.18867925	0.19512195	0.17647059	0.18987342	0.19834711	0.19354839	0.28865979
0.595	0.535								
0.14	0.14								
0.23529412	0.26168224								

Tabla 52.- En negrita, en la parte inferior de cada celda consta el índice de mielinización.

GRUPO Control, axones medianos.									
1,525	1,03	1,45	1,285	1,495	1,22	1,08	1,025	1,26	1,35
0,14	0,12	0,25	0,1	0,19	0,05	0,12	0,12	0,12	0,12
0,09180328	0,11650485	0,17241379	0,07782101	0,1270903	0,04098361	0,111111111	0,11707317	0,0952381	0,08888889
1,35	1,075	1,695	1,015	1,165	1,22	1,18	1,45	1,08	1,085
0,11	0,08	0,15	0,13	0,11	0,17	0,16	0,2	0,08	0,1
0,08148148	0,0744186	0,08849558	0,12807882	0,0944206	0,13934426	0,13559322	0,13793103	0,07407407	0,0921659
1,465	1,615	1,215	1,025	1,08	1,335	1,33	1,32	1,44	1,445
0,14	0,13	0,07	0,09	0,08	0,13	0,14	0,13	0,11	0,14
0,09556314	0,08049536	0,05761317	0,08780488	0,07407407	0,09737828	0,105263158	0,09848485	0,07638889	0,09688581
1,275	1,32	1,33	1,39	1,275	1,425	1,02	1,05	1,155	1,65
0,16	0,23	0,12	0,14	0,16	0,17	0,12	0,16	0,14	0,13
0,1254902	0,17424242	0,09022556	0,10071942	0,1254902	0,11929825	0,117647059	0,15238095	0,12121212	0,07878788
1,02	1,54	1,14	1,175	1,115	1,35	1,23	1,23	1,01	1,105
0,1	0,12	0,14	0,13	0,11	0,13	0,15	0,16	0,11	0,15
0,09803922	0,07792208	0,12280702	0,1106383	0,09865471	0,0962963	0,12195122	0,1300813	0,10891089	0,13574661
1,65	1,22	1,195	1,445	1,21	1,22	1,15	1,195	1,695	1,07
0,15	0,12	0,13	0,15	0,11	0,13	0,17	0,11	0,19	0,11
0,09090909	0,09836066	0,10878661	0,10380623	0,09090909	0,10655738	0,147826087	0,09205021	0,1120944	0,10280374
1,565	1,055	1,695	1,11	1,675					
0,21	0,16	0,14	0,14	0,2					
0,1341853	0,15165877	0,08259587	0,12612613	0,11940299					

Tabla 53.- En negrita, en la parte inferior de cada celda consta el índice de mielinización.

GRUPO Control, axones grandes.									
2,175	1,77	2,145	1,8	2,18	1,765	2,175	2,39	1,755	1,77
0,22	0,17	0,28	0,25	0,22	0,27	0,23	0,2	0,19	0,22
0,10114943	0,0960452	0,13053613	0,13888889	0,10091743	0,1529745	0,10574713	0,08368201	0,10826211	0,12429379
2,08	2,005	2,245	1,75	1,895	2,225	1,785			
0,22	0,1	0,21	0,12	0,21	0,14	0,24			
0,10576923	0,04987531	0,0935412	0,06857143	0,11081794	0,06292135	0,13445378			

Tabla 54.- En negrita, en la parte inferior de cada celda consta el índice de mielinización.

GRUPO ApoE, axones pequeños.									
0,625	0,575	0,705	0,87	0,88	0,835	0,665	0,965	0,945	0,91
0,1	0,18	0,19	0,12	0,2	0,11	0,19	0,16	0,17	0,2
0,16	0,31304348	0,26950355	0,13793103	0,22727273	0,13173653	0,28571429	0,16580311	0,17989418	0,21978022
0,675	0,6	0,58	0,735	0,825	0,76	0,745	0,75	0,905	0,89
0,18	0,11	0,09	0,13	0,1	0,11	0,16	0,14	0,09	0,18
0,26666667	0,18333333	0,15517241	0,17687075	0,12121212	0,14473684	0,2147651	0,18666667	0,09944751	0,20224719
0,91	0,725	0,79	0,715	0,725	1,28	1,365	1,525	1,62	1,63
0,12	0,17	0,11	0,17	0,13	0,16	0,12	0,19	0,29	0,06
0,13186813	0,23448276	0,13924051	0,23776224	0,17931034	0,125	0,08791209	0,12459016	0,17901235	0,03680982
1,035	0,905	0,79	0,69	0,895	0,355	0,73	0,705	0,685	0,715
0,15	0,09	0,16	0,19	0,19	0,03	0,18	0,04	0,15	0,12
0,14492754	0,09944751	0,20253165	0,27536232	0,2122905	0,08450704	0,24657534	0,05673759	0,2189781	0,16783217
0,715	0,68	0,72	0,59	0,685	0,77	0,67	0,875	0,48	0,87
0,12	0,09	0,17	0,12	0,1	0,03	0,09	0,11	0,07	0,04
0,16783217	0,13235294	0,23611111	0,20338983	0,1459854	0,03896104	0,13432836	0,12571429	0,14583333	0,04597701
0,55	0,715	0,595	0,53	0,57	0,79	1	0,44	0,57	0,585
0,07	0,12	0,07	0,06	0,04	0,14	0,19	0,11	0,08	0,05
0,12727273	0,16783217	0,11764706	0,11320755	0,07017544	0,17721519	0,19	0,25	0,14035088	0,08547009
0,595	0,955	0,85	0,955	0,705	0,575	0,865	0,855	0,66	0,815
0,05	0,11	0,06	0,11	0,07	0,08	0,1	0,04	0,03	0,08
0,08403361	0,11518325	0,07058824	0,11518325	0,09929078	0,13913043	0,11560694	0,04678363	0,04545455	0,09815951
0,595	0,34	0,495	0,48	0,675	0,475	0,625	0,7	0,33	0,395
0,05	0,18	0,2	0,14	0,17	0,08	0,17	0,19	0,18	0,09
0,08403361	0,52941176	0,4040404	0,29166667	0,25185185	0,16842105	0,272	0,27142857	0,54545455	0,2278481
0,555	0,715	0,76	0,47	0,585	0,75	0,39	0,8	0,775	0,46
0,18	0,14	0,14	0,08	0,15	0,14	0,11	0,11	0,19	0,12
0,32432432	0,1958042	0,18421053	0,17021277	0,25641026	0,18666667	0,28205128	0,1375	0,24516129	0,26086957
0,97	0,56	0,55	0,685	0,555	0,545	0,865	0,6	1	0,52
0,1	0,05	0,12	0,12	0,08	0,06	0,14	0,09	0,13	0,07
0,10309278	0,08928571	0,21818182	0,17518248	0,14414414	0,11009174	0,16184971	0,15	0,13	0,13461538
0,515	0,71	0,485	0,565	0,59	0,775	0,61	0,83	0,865	0,415
0,07	0,12	0,1	0,12	0,12	0,12	0,14	0,19	0,19	0,13
0,13592233	0,16901408	0,20618557	0,21238938	0,20338983	0,15483871	0,2295082	0,22891566	0,21965318	0,31325301
0,65	0,625	0,915	0,715	0,815	0,51	0,87	0,83	0,67	0,985
0,08	0,11	0,14	0,12	0,14	0,12	0,17	0,12	0,13	0,13
0,12307692	0,176	0,15300546	0,16783217	0,17177914	0,23529412	0,1954023	0,14457831	0,19402985	0,1319797
0,785	0,51	0,51	0,575	0,58	0,835	0,7	0,8	0,95	0,49
0,16	0,15	0,14	0,15	0,14	0,11	0,19	0,16	0,18	0,12
0,20382166	0,29411765	0,2745098	0,26086957	0,24137931	0,13173653	0,27142857	0,2	0,18947368	0,24489796
0,865	0,6								
0,16	0,19								
0,1849711	0,31666667								

Tabla 55. - En negrita, en la parte inferior de cada celda consta el índice de mielinización.

GRUPO ApoE, axones medianos.									
1,595	1,23	1,035	1,11	1,585	1,03	1,085	1,37	1,455	1,395
0,28	0,14	0,11	0,2	0,24	0,06	0,05	0,05	0,16	0,14
0,17554859	0,11382114	0,10628019	0,18018018	0,15141956	0,05825243	0,046082949	0,03649635	0,10996564	0,10035842
1,575	1,165	1,3	1,04	1,085	1,18	1,305	1,275	1,59	1,015
0,12	0,06	0,05	0,07	0,08	0,07	0,16	0,14	0,07	0,06
0,07619048	0,05150215	0,03846154	0,06730769	0,07373272	0,05932203	0,122605364	0,10980392	0,04402516	0,0591133
1,49	1,42	1,055	1,06	1,07	1,255	1,245	1,31	1,35	1,17
0,15	0,12	0,1	0,11	0,1	0,09	0,12	0,07	0,11	0,09
0,10067114	0,08450704	0,09478673	0,10377358	0,09345794	0,07171315	0,096385542	0,05343511	0,08148148	0,07692308
1,115	1,18	1,19	1,085	1,67	1,125	1,115	1,445	1,015	1,7
0,07	0,07	0,16	0,08	0,14	0,22	0,13	0,21	0,17	0,16
0,06278027	0,05932203	0,13445378	0,07373272	0,08383234	0,19555556	0,116591928	0,14532872	0,16748768	0,09411765
1,15	1,025	1,14	1,015	1,69	1,025	1,28	1,275	1,13	1,075
0,15	0,14	0,17	0,26	0,17	0,1	0,16	0,09	0,25	0,25
0,13043478	0,13658537	0,14912281	0,25615764	0,10059172	0,09756098	0,125	0,07058824	0,22123894	0,23255814
1,155	1,14	1,035	1,045	1,39	1,07	1,645	1,35	1,08	1,345
0,08	0,13	0,1	0,26	0,2	0,06	0,13	0,19	0,17	0,08
0,06926407	0,11403509	0,09661836	0,24880383	0,14388489	0,05607477	0,079027356	0,14074074	0,15740741	0,05947955
1,135	1,625	1,22	1,315	1,7	1,025	1,64	1,265	1,315	1,695
0,07	0,17	0,1	0,23	0,12	0,07	0,14	0,14	0,11	0,18
0,06167401	0,10461538	0,08196721	0,17490494	0,07058824	0,06829268	0,085365854	0,11067194	0,08365019	0,10619469
1,01	1,07	1,01	1,445						
0,19	0,24	0,07	0,21						
0,18811881	0,22429907	0,06930693	0,14532872						

Tabla 56.- En negrita, en la parte inferior de cada celda consta el índice de mielinización.

GRUPO ApoE, axones grandes.									
1,97	2,435	2	2,59	2,5	2,23	2,73	1,81	1,705	2,45
0,21	0,26	0,09	0,18	0,24	0,26	0,1	0,21	0,21	0,21
0,10659898	0,10677618	0,045	0,06949807	0,096	0,11659193	0,03663004	0,1160221	0,12316716	0,08571429
1,77	2,825	1,72	2,275	1,715	1,735	1,87	1,81		
0,19	0,21	0,14	0,15	0,13	0,17	0,15	0,2		
0,10734463	0,07433628	0,08139535	0,06593407	0,07580175	0,09798271	0,0802139	0,11049724		

Tabla 57.- En negrita, en la parte inferior de cada celda consta el índice de mielinización.

GRUPO ApoE+D, axones pequeños.									
0,48	0,72	0,91	0,735	0,98	0,745	0,545	0,75	0,505	0,665
0,13	0,1	0,21	0,1	0,11	0,07	0,15	0,13	0,12	0,11
0,27083333	0,13888889	0,23076923	0,13605442	0,1122449	0,09395973	0,27522936	0,17333333	0,23762376	0,16541353
0,705	0,795	0,735	0,76	0,685	0,75	0,775	0,67	0,955	0,905
0,12	0,13	0,14	0,13	0,12	0,12	0,17	0,09	0,16	0,15
0,17021277	0,16352201	0,19047619	0,17105263	0,17518248	0,16	0,21935484	0,13432836	0,16753927	0,16574586
0,82	0,705	0,925	0,775	0,385	0,8	0,74	0,86	0,545	0,935
0,14	0,19	0,1	0,16	0,16	0,11	0,13	0,13	0,1	0,12
0,17073171	0,26950355	0,10810811	0,20645161	0,41558442	0,1375	0,17567568	0,15116279	0,18348624	0,12834225
0,66	0,92	0,91	0,735	0,63	0,48	0,78	0,725	0,525	0,93
0,09	0,17	0,19	0,1	0,13	0,11	0,11	0,1	0,1	0,14
0,13636364	0,18478261	0,20879121	0,13605442	0,20634921	0,22916667	0,14102564	0,13793103	0,19047619	0,15053763
0,705	0,68	0,785	0,505	0,56	0,455	0,935	0,75	0,835	0,57
0,13	0,1	0,17	0,12	0,1	0,13	0,11	0,11	0,1	0,13
0,18439716	0,14705882	0,21656051	0,23762376	0,17857143	0,28571429	0,11764706	0,14666667	0,11976048	0,22807018
0,615	0,555	0,55	0,64	0,72	0,46	0,495	0,605	0,705	0,715
0,09	0,15	0,12	0,13	0,15	0,13	0,08	0,07	0,11	0,12
0,14634146	0,27027027	0,21818182	0,203125	0,20833333	0,2826087	0,16161616	0,11570248	0,15602837	0,16783217
0,675	0,67	0,715	0,445	0,7	0,575	0,755	0,915	0,775	0,715
0,1	0,09	0,12	0,1	0,13	0,13	0,1	0,15	0,16	0,1
0,14814815	0,13432836	0,16783217	0,2247191	0,18571429	0,22608696	0,13245033	0,16393443	0,20645161	0,13986014
0,91	0,68	0,81	0,42	0,64	0,965	0,495	0,865	0,7	0,395
0,19	0,16	0,12	0,06	0,13	0,14	0,21	0,09	0,2	0,08
0,20879121	0,23529412	0,14814815	0,14285714	0,203125	0,14507772	0,42424242	0,10404624	0,28571429	0,20253165
0,705	0,76	0,685	0,77	0,67	0,875	0,48	0,58	0,735	0,825
0,08	0,13	0,11	0,02	0,1	0,1	0,08	0,08	0,14	0,09
0,11347518	0,17105263	0,16058394	0,02597403	0,14925373	0,11428571	0,16666667	0,13793103	0,19047619	0,10909091
0,76	0,745	0,75	0,51	0,87	0,83	0,67	0,985	0,835	0,665
0,12	0,15	0,15	0,11	0,18	0,11	0,14	0,18	0,12	0,18
0,15789474	0,20134228	0,2	0,21568627	0,20689655	0,13253012	0,20895522	0,18274112	0,14371257	0,27067669
0,965	0,945	0,91	0,675	0,6	0,55	0,64	0,72	0,46	0,495
0,17	0,16	0,21	0,17	0,12	0,11	0,14	0,14	0,14	0,07
0,1761658	0,16931217	0,23076923	0,25185185	0,2	0,2	0,21875	0,19444444	0,30434783	0,14141414
0,605	0,505	0,665	0,705	0,795	0,735	0,58	0,835	0,7	0,8
0,09	0,13	0,1	0,13	0,12	0,13	0,15	0,1	0,2	0,15
0,14876033	0,25742574	0,15037594	0,18439716	0,1509434	0,17687075	0,25862069	0,11976048	0,28571429	0,1875
0,95	0,49	0,865	0,825	0,76	0,745	0,75	0,905	0,87	0,83
0,19	0,11	0,17	0,09	0,12	0,17	0,15	0,1	0,16	0,13
0,2	0,2244898	0,19653179	0,10909091	0,15789474	0,22818792	0,2	0,11049724	0,18390805	0,15662651
0,67									
0,14									
0,20895522									

Tabla 58. - En negrita, en la parte inferior de cada celda consta el índice de mielinización.

GRUPO ApoE+D, axones medianos									
1,06	1,515	1,55	1,115	1,435	1,105	1,45	1,415	1,595	1,38
0,12	0,17	0,18	0,13	0,15	0,09	0,16	0,13	0,12	0,14
0,11320755	0,11221122	0,11612903	0,11659193	0,10452962	0,08144796	0,110344828	0,09187279	0,07523511	0,10144928
1,14	1,05	1,395	1,14	1,335	1,415	1,595	1,12	1,545	1,05
0,12	0,13	0,14	0,16	0,21	0,13	0,12	0,13	0,15	0,17
0,10526316	0,12380952	0,10035842	0,14035088	0,15730337	0,09187279	0,07523511	0,11607143	0,09708738	0,16190476
1,645	1,23	1,035	1,11	1,585	1,275	1,59	1,015	1,49	1,42
0,13	0,15	0,11	0,19	0,19	0,14	0,07	0,06	0,15	0,13
0,07902736	0,12195122	0,10628019	0,171171171	0,119873817	0,10980392	0,044025157	0,0591133	0,10067114	0,0915493
1,055	1,06	1,31	1,35	1,17	1,115	1,18	1,19	1,085	1,415
0,1	0,11	0,06	0,11	0,1	0,07	0,08	0,17	0,07	0,14
0,09478673	0,10377358	0,04580153	0,08148148	0,08547009	0,06278027	0,06779661	0,14285714	0,06451613	0,09893993
1,595	1,38	1,14	1,05	1,455	1,395	1,575	1,165	1,3	1,04
0,11	0,18	0,11	0,18	0,15	0,15	0,13	0,07	0,04	0,08
0,06896552	0,13043478	0,09649123	0,17142857	0,10309278	0,10752688	0,082539683	0,06008584	0,03076923	0,07692308
1,085	1,085	1,415	1,595						
0,09	0,06	0,15	0,12						
0,08294931	0,05529954	0,10600707	0,07523511						

Tabla 59. - En negrita, en la parte inferior de cada celda consta el índice de mielinización.

GRUPO ApoE+D, axones grandes									
2,585	1,865	2,21	2,145	2,165	1,77	1,93	2,32	2,09	2,21
0,27	0,18	0,15	0,15	0,15	0,22	0,2	0,17	0,15	0,15
0,10444874	0,09651475	0,0678733	0,06993007	0,06928406	0,12429379	0,10362694	0,07327586	0,07177033	0,0678733
2,165	2,04	1,77	1,93	2,32	2,435	2	2,59	2,5	2,23
0,15	0,2	0,22	0,2	0,17	0,28	0,12	0,5	0,27	0,24
0,06928406	0,09803922	0,12429379	0,10362694	0,07327586	0,11498973	0,06	0,19305019	0,108	0,10762332
2,73	1,81	2,21	2,145	2,165	1,77	1,93	2,32	2,09	2,21
0,08	0,23	0,14	0,16	0,14	0,23	0,19	0,18	0,14	0,16
0,02930403	0,12707182	0,06334842	0,07459207	0,06466513	0,1299435	0,0984456	0,07758621	0,06698565	0,07239819
2,165	2,04	1,705	2,45	1,77	2,825	1,72	2,165	1,77	
0,14	0,21	0,2	0,22	0,2	0,22	0,15	0,16	0,21	
0,06466513	0,10294118	0,11730205	0,08979592	0,11299435	0,07787611	0,0872093	0,073903	0,11864407	

Tabla 60. - En negrita, en la parte inferior de cada celda consta el índice de mielinización.

GRUPO PTEN, axones pequeños									
0,43	0,92	0,55	0,72	0,57	0,34	0,465	0,53	0,58	0,67
0,05	0,15	0,07	0,08	0,09	0,05	0,03	0,09	0,08	0,1
0,11627907	0,16304348	0,12727273	0,11111111	0,15789474	0,14705882	0,06451613	0,16981132	0,13793103	0,14925373
0,595	0,475	0,795	0,49	0,62	0,38	0,4	0,635	0,315	0,58
0,05	0,09	0,08	0,09	0,03	0,06	0,11	0,1	0,06	0,1
0,08403361	0,18947368	0,10062893	0,18367347	0,0483871	0,15789474	0,275	0,15748031	0,19047619	0,17241379
0,72	0,705	0,715	0,77	0,835	0,5695	0,5	0,76	0,61	0,665
0,14	0,11	0,12	0,1	0,15	0,08	0,08	0,13	0,06	0,09
0,19444444	0,15602837	0,16783217	0,12987013	0,17964072	0,1404741	0,16	0,17105263	0,09836066	0,13533835
0,44	0,475	0,51	0,535	0,39	0,29	0,265	0,36	0,63	0,34
0,14	0,1	0,12	0,14	0,1	0,08	0,07	0,07	0,16	0,16
0,31818182	0,21052632	0,23529412	0,26168224	0,25641026	0,27586207	0,26415094	0,19444444	0,25396825	0,47058824
0,725	0,79	0,45	0,4	0,595	0,91	0,64	0,665	0,63	0,475
0,1	0,05	0,06	0,07	0,09	0,16	0,13	0,08	0,12	0,06
0,13793103	0,06329114	0,13333333	0,175	0,1512605	0,17582418	0,203125	0,12030075	0,19047619	0,12631579
0,77	0,475	0,59	0,65	0,78	0,53	0,625	0,48	0,72	0,455
0,12	0,07	0,09	0,09	0,07	0,07	0,11	0,08	0,07	0,09
0,15584416	0,14736842	0,15254237	0,13846154	0,08974359	0,13207547	0,176	0,16666667	0,09722222	0,1978022
0,77	0,635	0,715	0,63	0,79	0,705	0,83	0,31	0,76	0,81
0,14	0,9	0,12	0,12	0,05	0,1	0,15	0,05	0,13	0,14
0,18181818	1,41732283	0,16783217	0,19047619	0,06329114	0,14184397	0,18072289	0,16129032	0,17105263	0,17283951
0,5	0,89	0,42	0,45	0,635	0,57	0,645	0,325	0,665	0,3
0,12	0,12	0,06	0,08	0,12	0,11	0,12	0,05	0,08	0,06
0,24	0,13483146	0,14285714	0,17777778	0,18897638	0,19298246	0,18604651	0,15384615	0,12030075	0,2
0,77	0,435	0,605	0,3	0,735	0,565	0,45	0,94	0,755	0,835
0,14	0,1	0,1	0,09	0,13	0,12	0,12	0,12	0,12	0,11
0,18181818	0,22988506	0,16528926	0,3	0,17687075	0,21238938	0,26666667	0,12765957	0,1589404	0,13173653
0,565	0,61	0,56	0,545	0,64	0,515	0,865	0,835	0,675	0,98
0,12	0,1	0,16	0,11	0,14	0,11	0,17	0,12	0,15	0,17
0,21238938	0,16393443	0,28571429	0,20183486	0,21875	0,21359223	0,19653179	0,14371257	0,22222222	0,17346939
0,84	0,66	0,97	0,945	0,915	0,36	0,775	0,5	0,725	0,965
0,13	0,17	0,18	0,16	0,22	0,08	0,12	0,14	0,13	0,15
0,1547619	0,25757576	0,18556701	0,16931217	0,24043716	0,22222222	0,15483871	0,28	0,17931034	0,15544041
0,775	0,435	0,59	0,525						
0,12	0,11	0,1	0,07						
0,15483871	0,25287356	0,16949153	0,13333333						

Tabla 61.- En negrita, en la parte inferior de cada celda consta el índice de mielinización.

GRUPO PTEN, axones medianos									
1,675	1,625	1,42	1,62	1,08	1,255	1,16	1,425	1,23	1,19
0,08	0,12	0,12	0,1	0,16	0,09	0,12	0,13	0,07	0,11
0,04776119	0,07384615	0,08450704	0,0617284	0,14814815	0,07171315	0,103448276	0,09122807	0,05691057	0,09243697
1,165	1,455	1,6	1,23	1,485	1,67	1,045	1,035	1,495	1,095
0,22	0,17	0,17	0,13	0,13	0,09	0,17	0,1	0,12	0,13
0,1888412	0,11683849	0,10625	0,10569106	0,08754209	0,05389222	0,162679426	0,09661836	0,08026756	0,11872146
1,43	1,605	1,625	1,19	1,275	1,04	1,155	1,09	1,175	1,62
0,14	0,11	0,14	0,11	0,08	0,17	0,18	0,13	0,19	0,13
0,0979021	0,06853583	0,08615385	0,09243697	0,0627451	0,16346154	0,155844156	0,11926606	0,16170213	0,08024691
1,175	1,63	1,095	1,305	0,965	1,455	1,59	1,18	1,435	1,665
0,19	0,09	0,13	0,19	0,19	0,16	0,2	0,14	0,14	0,1
0,16170213	0,05521472	0,11872146	0,14559387	0,19689119	0,10996564	0,125786164	0,11864407	0,09756098	0,06006006
1,025	1,03	1,5	1,09	1,28	0,99	1,16	1,085	1,18	1,615
0,14	0,11	0,13	0,12	0,09	0,16	0,19	0,12	0,2	0,12
0,13658537	0,10679612	0,08666667	0,11009174	0,0703125	0,16161616	0,163793103	0,11059908	0,16949153	0,07430341
1,175	1,625	1,1	1,3	1,68	1,62	1,425	1,615	1,085	1,25
0,17	0,08	0,14	0,12	0,09	0,11	0,13	0,09	0,17	0,08
0,14468085	0,04923077	0,12727273	0,09230769	0,05357143	0,06790123	0,09122807	0,05572755	0,15668203	0,064
1,165	1,42	1,28	1,275						
0,13	0,12	0,16	0,19						
0,11158798	0,08450704	0,125	0,14901961						

Tabla 62. - En negrita, en la parte inferior de cada celda consta el índice de mielinización

GRUPO PTEN, axones grandes									
2.225	2.785	2.64	1.92	1.825	2.05	2.82	1.795	1.89	2.065
0.13	0.38	0.25	0.16	0.11	0.2	0.2	0.25	0.16	0.17
0.05842697	0.13644524	0.09469697	0.08333333	0.06027397	0.09756098	0.07092199	0.13927577	0.08465608	0.08232446
2.625	2.87	1.91	2.335	2.24	1.875	3.005	1.985	2.045	1.78
0.21	0.22	0.18	0.25	0.23	0.21	0.16	0.13	0.1	0.12
0.08	0.07665505	0.09424084	0.10706638	0.10267857	0.112	0.05324459	0.06549118	0.04889976	0.06741573
1.865	1.55	2.635	2.23	2.78	2.645	1.92	1.815	2.045	2.77
0.13	0.14	0.08	0.14	0.37	0.26	0.16	0.12	0.19	0.19
0.06970509	0.09032258	0.03036053	0.06278027	0.13309353	0.09829868	0.08333333	0.0661157	0.09290954	0.06859206
1.8	1.94	2.06	1.85	3.145	2	2.1	1.765	1.915	1.745
0.26	0.15	0.16	0.24	0.13	0.14	0.11	0.11	0.14	0.13
0.14444444	0.07731959	0.0776699	0.12972973	0.04133545	0.07	0.05238095	0.06232295	0.07310705	0.07449857
2.64	2.21	2.35	2.63	2.82	2.015				
0.09	0.2	0.27	0.22	0.21	0.2				
0.03409091	0.09049774	0.11489362	0.08365019	0.07446809	0.09925558				

Tabla 63. - En negrita, en la parte inferior de cada celda consta el índice de mielinización

GRUPO P27, axones pequeños									
0.43	0.92	0.55	0.72	0.57	0.34	0.465	0.53	0.58	0.67
0.05	0.15	0.07	0.08	0.09	0.05	0.03	0.09	0.08	0.1
0.11627907	0.16304348	0.12727273	0.11111111	0.15789474	0.14705882	0.06451613	0.16981132	0.13793103	0.14925373
0.595	0.475	0.795	0.49	0.62	0.38	0.4	0.635	0.315	0.58
0.05	0.09	0.08	0.09	0.03	0.06	0.11	0.1	0.06	0.1
0.08403361	0.18947368	0.10062893	0.18367347	0.0483871	0.15789474	0.275	0.15748031	0.19047619	0.17241379
0.72	0.705	0.715	0.77	0.835	0.5695	0.5	0.76	0.61	0.665
0.14	0.11	0.12	0.1	0.15	0.08	0.08	0.13	0.06	0.09
0.19444444	0.15602837	0.16783217	0.12987013	0.17964072	0.1404741	0.16	0.17105263	0.09836066	0.13533835
0.44	0.475	0.51	0.535	0.39	0.29	0.265	0.36	0.63	0.34
0.14	0.1	0.12	0.14	0.1	0.08	0.07	0.07	0.16	0.16
0.31818182	0.21052632	0.23529412	0.26168224	0.25641026	0.27586207	0.26415094	0.19444444	0.25396825	0.47058824
0.725	0.79	0.45	0.4	0.595	0.91	0.64	0.665	0.63	0.475
0.1	0.05	0.06	0.07	0.09	0.16	0.13	0.08	0.12	0.06
0.13793103	0.06329114	0.13333333	0.175	0.1512605	0.17582418	0.203125	0.12030075	0.19047619	0.12631579
0.77	0.475	0.59	0.65	0.78	0.53	0.625	0.48	0.72	0.455
0.12	0.07	0.09	0.09	0.07	0.07	0.11	0.08	0.07	0.09
0.15584416	0.14736842	0.15254237	0.13846154	0.08974359	0.13207547	0.176	0.16666667	0.09722222	0.1978022
0.77	0.635	0.715	0.63	0.79	0.705	0.83	0.31	0.76	0.81
0.14	0.9	0.12	0.12	0.05	0.1	0.15	0.05	0.13	0.14
0.18181818	1.41732283	0.16783217	0.19047619	0.06329114	0.14184397	0.18072289	0.16129032	0.17105263	0.17283951
0.5	0.89	0.42	0.45	0.635	0.57	0.645	0.325	0.665	0.3
0.12	0.12	0.06	0.08	0.12	0.11	0.12	0.05	0.08	0.06
0.24	0.13483146	0.14285714	0.17777778	0.18897638	0.19298246	0.18604651	0.15384615	0.12030075	0.2
0.77	0.435	0.605	0.3	0.735	0.565	0.45	0.94	0.755	0.835
0.14	0.1	0.1	0.09	0.13	0.12	0.12	0.12	0.12	0.11
0.18181818	0.22988506	0.16528926	0.3	0.17687075	0.21238938	0.26666667	0.12765957	0.1589404	0.13173653
0.565	0.61	0.56	0.545	0.64	0.515	0.865	0.835	0.675	0.98
0.12	0.1	0.16	0.11	0.14	0.11	0.17	0.12	0.15	0.17
0.21238938	0.16393443	0.28571429	0.20183486	0.21875	0.21359223	0.19653179	0.14371257	0.22222222	0.17346939
0.84	0.66	0.97	0.945	0.915	0.36	0.775	0.5	0.725	0.965
0.13	0.17	0.18	0.16	0.22	0.08	0.12	0.14	0.13	0.15
0.1547619	0.25757576	0.18556701	0.16931217	0.24043716	0.22222222	0.15483871	0.28	0.17931034	0.15544041
0.775	0.435	0.59	0.525						
0.12	0.11	0.1	0.07						
0.15483871	0.25287356	0.16949153	0.13333333						

Tabla 64. - En negrita, en la parte inferior de cada celda consta el índice de mielinización.

GRUPO P27, axones medianos									
1.675	1.625	1.42	1.62	1.08	1.255	1.16	1.425	1.23	1.19
0.08	0.12	0.12	0.1	0.16	0.09	0.12	0.13	0.07	0.11
0.04776119	0.07384615	0.08450704	0.0617284	0.14814815	0.07171315	0.103448276	0.09122807	0.05691057	0.09243697
1.165	1.455	1.6	1.23	1.485	1.67	1.045	1.035	1.495	1.095
0.22	0.17	0.17	0.13	0.13	0.09	0.17	0.1	0.12	0.13
0.1888412	0.11683849	0.10625	0.10569106	0.08754209	0.05389222	0.162679426	0.09661836	0.08026756	0.11872146
1.43	1.605	1.625	1.19	1.275	1.04	1.155	1.09	1.175	1.62
0.14	0.11	0.14	0.11	0.08	0.17	0.18	0.13	0.19	0.13
0.0979021	0.06853583	0.08615385	0.09243697	0.0627451	0.16346154	0.155844156	0.11926606	0.16170213	0.08024691
1.175	1.63	1.095	1.305	0.965	1.455	1.59	1.18	1.435	1.665
0.19	0.09	0.13	0.19	0.19	0.16	0.2	0.14	0.14	0.1
0.16170213	0.05521472	0.11872146	0.14559387	0.19689119	0.10996564	0.125786164	0.11864407	0.09756098	0.06006006
1.025	1.03	1.5	1.09	1.28	0.99	1.16	1.085	1.18	1.615
0.14	0.11	0.13	0.12	0.09	0.16	0.19	0.12	0.2	0.12
0.13658537	0.10679612	0.08666667	0.11009174	0.0703125	0.16161616	0.163793103	0.11059908	0.16949153	0.07430341
1.175	1.625	1.1	1.3	1.68	1.62	1.425	1.615	1.085	1.25
0.17	0.08	0.14	0.12	0.09	0.11	0.13	0.09	0.17	0.08
0.14468085	0.04923077	0.12727273	0.09230769	0.05357143	0.06790123	0.09122807	0.05572755	0.15668203	0.064
1.165	1.42								
0.13	0.12								
0.11158798	0.08450704								

Tabla 65. - En negrita, en la parte inferior de cada celda consta el índice de mielinización.

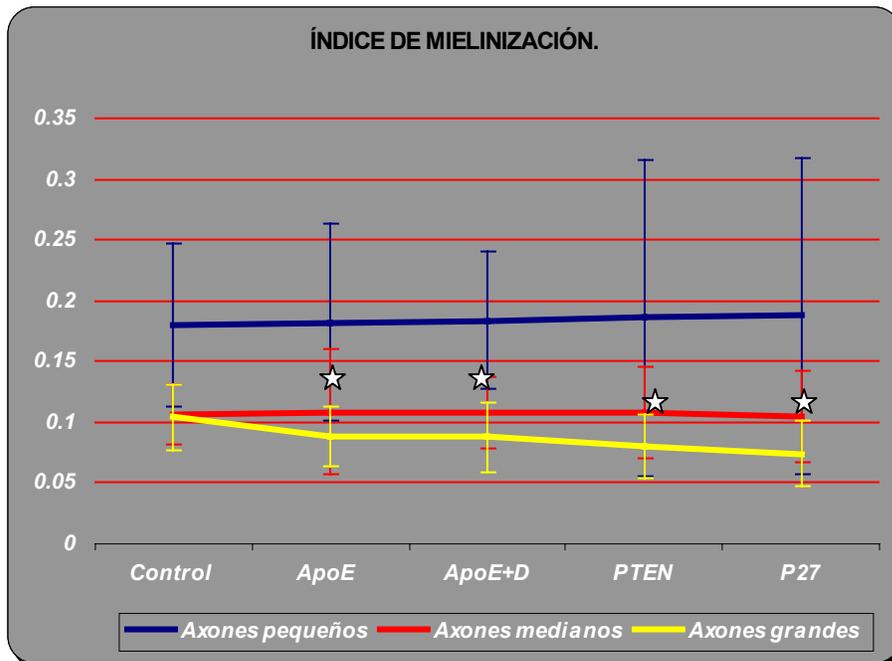
GRUPO P27, axones grandes									
1.975	1.84	2.925	1.905	1.885	2.085	2.325	2.23	1.89	3.005
0.1	0.25	0.2	0.1	0.09	0.14	0.26	0.22	0.22	0.15
0.05063291	0.13586957	0.06837607	0.05249344	0.04774536	0.06714628	0.11182796	0.09865471	0.11640212	0.04991681
1.99	2.05	1.775	1.86	1.745	2.64	2.21	2.35	2.97	2.13
0.12	0.11	0.11	0.12	0.13	0.09	0.2	0.27	0.18	0.14
0.06030151	0.05365854	0.06197183	0.06451613	0.07449857	0.03409091	0.09049774	0.11489362	0.06060606	0.0657277
2.21	1.945	1.77	2.975	1.945	1.835	1.935	2.33	2.225	1.795
0.2	0.11	0.24	0.2	0.09	0.1	0.13	0.27	0.21	0.23
0.09049774	0.05655527	0.13559322	0.06722689	0.04627249	0.05449591	0.06718346	0.11587983	0.09438202	0.1281337
3.15	1.995	2.05	1.77	1.91	1.74	2.645	2.205	2.355	2.965
0.14	0.13	0.1	0.12	0.13	0.12	0.1	0.19	0.28	0.17
0.04444444	0.06516291	0.04878049	0.06779661	0.06806283	0.06896552	0.03780718	0.0861678	0.11889597	0.05733558
2.135	2.16	1274.195	2.22	2.04	2.16	2.215	1.99		
0.15	0.19	0.21	0.16	0.17	0.16	0.16	0.19		
0.07025761	0.08796296	0.00016481	0.07207207	0.08333333	0.07407407	0.07223476	0.09547739		

Tabla 66.- En negrita, en la parte inferior de cada celda consta el índice de mielinización.

INDICES DE MIELINIZACION)					
	Control	ApoE	ApoE+D	PTEN	P27
Axones pequeños	0.1806+/-0.067	0.1822+/-0.0815	0.1838+/-0.056	0.1861+/-0.131	0.1876+/-0.131
Axones medianos	0.1066+/-0.251	0.10852+/-0.051	0.0979+/-0.031	0.1061+/-0.038	0.1051+/-0.384
Axones grandes	0.1041+/-0.027	0.08864+/-0.025	0.0911+/-0.029	0.0806+/-0.026	0.0741+/-0.027

Tabla 67.- Figuran de forma más esquemática los resultados medios obtenidos, en cuanto al índice de mielinización, para cada tamaño axonal y para cada grupo experimental.

De los resultados obtenidos destacamos una similitud sin diferenciación estadística entre los axones de tamaño pequeño y medio, entre todos los grupos. Sí existió una diferencia estadísticamente significativa al comparar los axones grandes del grupo control con el resto de los grupos. No se hallaron diferencias entre los grupos ApoE y ApoE+D para ninguno de los tamaños axonales estudiados.



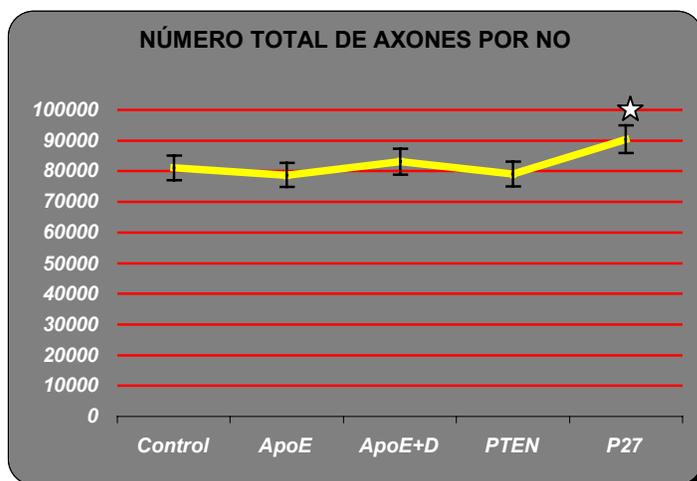
Gráfica 8.- Los datos son la media +/- DT. Como indican las estrellas, existe significación estadística únicamente entre el grupo control y el resto de los grupos, solo para los axones de tamaño grande. P=0,44 para el Grupo ApoE, P=0,41 para el Grupo ApoE+D, P=0,03 para el Grupo PTEN y P=0,02 para el Grupo P27.

RESULTADO DEL CÁLCULO DEL NÚMERO DE FIBRAS TOTALES POR NERVIÓ ÓPTICO.

A partir de los datos obtenidos al calcular las superficies transversales de los NO, y al haber calculado la densidad axonal (número medio de axones +/- DT en $700 \mu\text{m}^2$) en el apartado donde medimos las superficies axonales, nos es fácil deducir de estos datos el promedio de fibras ópticas que compondrán los NO de cada uno de los animales del estudio.

Grupo	Área contabilizada	Axones Contabilizados	Área Media del nervio óptico (μm^2)	Número total de fibras por NO
Control	$700 \mu\text{m}^2$	453	125209	81028
ApoE	$700 \mu\text{m}^2$	339	162646	78767
ApoE+D	$700 \mu\text{m}^2$	358	162512	83113
PTEN	$700 \mu\text{m}^2$	336	164795	79101
P27	$700 \mu\text{m}^2$	342	185110	90439

Tabla 68.- Número total de axones que componen cada uno de los NO y que se muestran en la columna de la derecha. Los datos a partir de los cuales hemos hallado este resultado se muestran en las columnas de la izquierda.



Gráfica 9.- Gráfica que representa el resultado final en cuanto a contenido axonal. Los datos son la media +/- DT. Únicamente detectamos significación estadística entre el grupo Control y el P27.

RESULTADO DEL CÁLCULO DE LOS GROSORES RETINANOS POR CAPAS Y GLOBALES.

Los resultados se muestran, siempre expresados en micras (μm).

Las Tablas 69 a 73.- muestran cada uno de los valores recogidos durante la medición. El color del encabezamiento de cada tabla, muestra según el código de colores, el grupo de animales al que corresponden los datos, y en la columna de la izquierda figura el número de identificación de cada animal, con las medidas de cada capa expuestas en las columnas de la derecha. La última fila muestra la media +/- DT.

Hemos realizado gráficas comparativas (11 a 17) donde están representados los resultados de cada grupo, en cada una de las 7 capas retinianas estudiadas. También ha quedado representado en una gráfica (18) el valor del espesor total de la retina, comparándose así los 5 grupos. Hemos mostrado gráficamente la proporción sobre el grosor retiniano global, que ocupa cada una de las capas, y para cada uno de los cinco grupos estudiados (Gráfica 10.-).

En la capa de los segmentos de los fotorreceptores el grupo control mostró un espesor de $39.78 \mu\text{m}$, solo superado por el grupo PTEN, donde esta misma capa tuvo un grosor $45.72 \mu\text{m}$, la capa más delgada fue la del grupo P27 con $27.62 \mu\text{m}$. (Graf. 11.-).

El grosor de la capa nuclear externa fue mayor en el grupo control ($43.29 \mu\text{m}$) y menor en el P27 ($23.56 \mu\text{m}$) (Gráfica 12). Los grupos ApoE y ApoE+D presentaron espesores menores al del grupo control y a su vez con diferencias estadísticamente significativas entre ellos.

La capa plexiforme externa mostró un mayor espesor en el grupo PTEN ($21.09 \mu\text{m}$) y menor en el ApoE+D ($15.19 \mu\text{m}$) (Gráfica 13).

Al igual que en la capa de segmentos y nuclear externa, en la capa nuclear interna, el grupo que mostró mayor adelgazamiento fue el P27 ($17.46 \mu\text{m}$), seguidos de los grupos ApoE+D y ApoE (21.3 y $25.546 \mu\text{m}$), existiendo también significación entre ambas.

En el análisis de las capas plexiforme interna y ganglionar, el grupo P27 continuó mostrando los menores grosores con 26.77 μm , y 28.57 μm , (Gráficas 15 y 16.-).

Sin embargo, y al contrario de los resultados obtenidos en la mayoría de las capas retinianas, el grosor de la capa de fibras nerviosas fue máximo para el grupo P27 (11.34 μm), y progresivamente menor en los grupos PTEN, ApoE y ApoE+D (Gráfica 17).

Como cabe esperar dados los resultados anteriormente expuestos, el grosor retiniano total fue mínimo en el grupo P27, con un espesor retiniano de 153.70 μm . Los grupos control, ApoE y ApoE+D mostraron grosores de 227.45, 209.52 y 203.17 μm respectivamente, también más reducidos al compararlos con el grupo Control. El único grupo que presentó un engrosamiento de la retina fue el grupo PTEN (244.46 μm) (Gráfica 18).

Con el fin de aportar una herramienta más intuitiva y visual de las alteraciones que se producen sobre la retina en los animales estudiados, la Fig. 38 muestra 5 cortes de retinas completas correspondientes a un animal de cada grupo.

En resumen las tendencias apuntan en los grupos ApoE y ApoE+D a una disminución del espesor retiniano a costa fundamentalmente de las capas nuclear externa e interna, existiendo además significación estadística no solo de estos grupos con respecto al control, sino también entre ellos mismos. Únicamente la capa de fibras presenta un grosor superior al mostrado por el grupo Control.

El grupo P27 es el que presenta, de entre todos los grupos, grosores retinianos más reducidos a excepción de la capa de fibras, donde este es mayor.

El grupo PTEN muestra un moderado incremento en cuanto al espesor de cada una de las capas de la retina al compararlo con el grupo control, especialmente marcado en las capas plexiformes, de fibras y segmentos.

GRUPO Control							
Animales	Segmentos	Nucl Ext	Plex Ext	Nucl Int	Plex Int	Cels Gangl	Fibras
CONTROL 001	44,68	42,384	17,88	30,92	54,63	34,34	10,01
CONTROL 001	41,88	43,2	15,66	30	55,6	35,18	11,22
CONTROL 001	35,24	42,544	15,9	31,36	53,16	30,18	10,21
CONTROL 001	34,12	45,456	17,56	32,56	55,2	29,14	10,74
CONTROL 001	41,8	41,856	17,74	31,16	53,6	31,74	9,74
CONTROL 001	39,52	44,72	16,68	30,24	53,2	33,5	10,31
CONTROL 002	41,8	44,88	16,44	29,36	55,23	35,4	10,31
CONTROL 002	44,6	46,16	16,82	33,8	53,92	29,92	9,21
CONTROL 002	45,04	45,664	15,8	31,92	55,19	36,88	9,72
CONTROL 002	42,4	44,208	14,42	29,8	52,46	32,93	9,25
CONTROL 002	44,44	44,704	12,06	31,92	53,68	33,42	9,99
CONTROL 002	37	41,104	16,76	32,6	51,44	35,2	9,93
CONTROL 003	42,52	44,384	14,84	31,44	54,98	33,43	9,22
CONTROL 003	41,04	38,816	14,46	32,8	52,22	31,12	10,17
CONTROL 003	36,68	47,296	14,08	30,92	55,6	33,4	10,27
CONTROL 003	32,04	46,576	17,86	31,48	55,34	33,68	10,63
CONTROL 003	31,12	49,6	16,9	30,16	55,46	32	10,21
CONTROL 003	35,84	42,464	16,22	31,32	54,26	32,02	10,82
CONTROL 004	46,32	43,04	13,78	30,24	55,32	33,9	9,62
CONTROL 004	45,24	42,096	15,24	29,38	52,26	33,82	9,83
CONTROL 004	35,28	42,672	12,62	30,78	51,24	34,4	10,36
CONTROL 004	40,44	40,432	17,72	27,55	58,96	33,7	11,37
CONTROL 004	35,8	42,688	21,3	28,14	53,32	35,4	9,72
CONTROL 004	35,44	44,336	16,24	35,8	53,34	29,92	10,72
CONTROL 005	38,04	46,288	16,42	32,23	51,92	29,52	9,83
CONTROL 005	41,72	48,192	17,36	31,42	50,12	32,04	10,83
CONTROL 005	39,68	46,608	17,86	32,48	57,76	33,56	10,52
CONTROL 005	39	42,592	17,94	31,24	53,6	32,94	10,61
CONTROL 005	42,68	42,368	16,62	30,12	54,2	32,75	10,59
CONTROL 005	42,12	42,64	19,2	31,2	55,08	34,96	10,75
CONTROL 006	37,68	40,16	16,14	30,34	53,16	31,78	9,38
CONTROL 006	42,56	40,064	15	31,1	52,48	31,2	9,82
CONTROL 006	41,92	37,6	16,4	31,12	54,3	34,94	10,09
CONTROL 006	45,24	41,64	16,14	30,44	51,12	35,36	10,01
CONTROL 006	35,68	43,28	14,62	29,36	57,1	31,92	9,91
CONTROL 006	38,92	40,74	18,22	31,28	55,16	34,41	10,19
CONTROL 007	44,04	41,94	14,88	27,4	55,56	32,52	9,23
CONTROL 007	43,12	42,384	17,2	28,2	54,96	32,44	10,78
CONTROL 007	36,88	38,86	17,64	28,92	52,16	33,26	9,34
CONTROL 007	37,28	41,26	16,04	32,24	55,93	32,6	9,86
CONTROL 007	37,2	46,6	17,44	28,96	54,82	33,4	10,8
CONTROL 007	36,88	43,6	16,24	31,16	50,12	34,2	10,34
Media+/-DT	39,784+/-3,88	43,288+/-2,61	16,341+/-1,71	30,83+/-1,63	54,028+/-1,91	33,058+/-1,77	10,154+/-0,33

Tabla 69.- Valores retinianos correspondientes al grupo control.

GRUPO ApoE							
Animales	Segmentos	Nucl Ext	Plex Ext	Nucl Int	Plex Int	Cels Gangl	Fibras
APO E 001	43,92	37,24	14,96	26,48	54,19	30,76	9,04
APO E 001	39,64	35,32	14	25,6	51,46	28,54	10,11
APO E 001	39,24	36,84	17,28	27,4	52,28	31,56	9,71
APO E 001	39,28	39,72	13,2	23,68	50,91	28,43	11,91
APO E 001	36,44	38,76	16,88	22,4	53,65	27,45	11,89
APO E 001	38,88	35,68	15,68	24,6	51,22	32,93	9,05
APO E 002	35,84	34,96	15,6	25,4	54,26	35,39	10,68
APO E 002	38,16	33,36	15	23,28	53,95	33,67	11,12
APO E 002	36,44	34,24	13	22,24	55,06	34,85	11,39
APO E 002	38,96	35,92	13,8	22,44	54,46	27,45	11,31
APO E 002	37,44	39,4	14,2	23,76	54,79	27,87	11,21
APO E 002	39,8	34,28	17,88	24,08	51,26	34,04	11,49
APO E 003	36,08	34,64	14,04	25,08	50,54	34,54	10,53
APO E 003	38,76	35,24	16,04	25,52	57,43	34,32	12,08
APO E 003	38,2	41,04	16,76	26,36	52,12	28,13	10,64
APO E 003	38,6	37,96	15,76	24,8	53,51	34,45	11,16
APO E 003	33,8	35,6	15,52	24,08	50,62	29,34	12,1
APO E 003	37,8	37,2	17,68	28,14	49,54	32,4	10,91
APO E 004	39,64	38,56	13,44	27,68	56,06	36,32	10,22
APO E 004	39,76	40	14,36	30,17	47,41	32,24	10,53
APO E 004	31,48	35,96	14,44	28,27	48,12	28,42	12,88
APO E 004	35,44	34,24	13,96	24,38	55,9	30,84	11,34
APO E 004	39,68	36,56	15,4	27,47	51,4	31,34	11,62
APO E 004	35,72	34,96	12,2	28,07	52,9	31,23	9,32
APO E 005	31,4	34,68	17,26	25,17	53,5	30,21	10,42
APO E 005	33,52	36,56	15,34	23,96	51,34	27,26	10,21
APO E 005	37,32	34,96	17,47	24,71	50,71	30,31	9,54
APO E 005	38,32	39,36	17,2	26,23	52,57	31,43	11,35
APO E 005	32,6	34,72	16,44	28,14	49,68	30,52	11,13
APO E 005	39,2	41,88	15,32	25,12	55,7	30,96	10,91
APO E 006	37,21	34,36	17,4	25,11	53,16	32,06	11,14
APO E 006	36,54	34,72	15,14	25,14	53,5	29,38	11,24
APO E 006	35,86	38,64	14,62	26,13	52,06	29,22	9,91
APO E 006	37,14	34,24	17,22	27,78	50,37	32,14	10,78
APO E 006	39,98	35,54	15,88	26,63	53,34	33,42	12,06
APO E 006	37,79	35,74	17,12	27,42	52,12	29,72	10,07
APO E 007	36,26	36,14	15,44	28,43	48,17	32,32	9,93
APO E 007	38,24	36,71	16,96	24,42	50,04	30,47	11,21
APO E 007	41,67	35,47	15,4	23,51	57,52	31,71	10,02
APO E 007	40,06	37,41	15,2	23,21	52,2	31,32	11,24
APO E 007	39,2	35,69	17,86	23,74	53,1	30,32	11,35
APO E 007	36,6	35,91	14,62	23,23	50,12	31,41	11,62
Media+/-DT	37,569+/-2,54	36,438+/-2,04	15,547+/-1,46	25,463+/-1,93	52,434+/-2,37	31,207+/-2,31	10,866+/-0,87

Tabla 70.- Valores retinianos correspondientes al grupo ApoE.

GRUPO ApoE+D							
Animales	Segmentos	Nucl Ext	Plex Ext	Nucl Int	Plex Intt	Cels Gangl	Fibras
APO E+D001	31,22	34,52	15,32	18,87	54,41	34,27	10,51
APO E+D001	31,94	35,91	16,72	17,96	52,45	38,4	10,21
APO E+D001	35,54	34,12	15,52	19,52	55,67	33,29	10,27
APO E+D001	33,62	34,51	15,01	19,85	53,59	36,4	10,14
APO E+D001	33,38	33,59	14,63	24,04	56,98	30,42	12,17
APO E+D001	33,38	35,04	16,59	20,62	52,82	32,45	10,27
APO E+D002	35,02	33,51	14,76	23,06	54,69	31,46	11,66
APO E+D002	39,26	33,16	14,83	21,58	54,4	32,21	10,4
APO E+D002	30,54	33,35	14,88	21,94	54,34	33,25	10,32
APO E+D002	39,7	30,61	14,11	21,85	50,19	36,29	10,36
APO E+D002	37,26	31,34	14,41	25,62	54,52	31,98	10,14
APO E+D002	35,3	38,71	19,12	22,34	55,48	30,21	10,11
APO E+D003	37,74	35,23	16,23	24,87	55,69	34,46	9,21
APO E+D003	39,1	34,44	15,65	15,64	47,86	35,47	9,22
APO E+D003	33,18	36,05	17,99	19,41	51,46	32,25	10,63
APO E+D003	39,5	34,63	15,01	22,91	55,82	27,67	11,19
APO E+D003	32,38	33,42	14,12	22,92	51,29	32,82	9,27
APO E+D003	36,18	34,63	15,03	24,18	47,69	32,27	11,63
APO E+D004	37,18	33,65	14,15	23,42	49,27	29,31	12,91
APO E+D004	39,46	36,85	18,15	22,98	53,25	32,58	10,42
APO E+D004	38,06	35,43	13,15	22,6	54,65	29,21	10,65
APO E+D004	36,07	34,22	16,22	24,32	48,7	32,58	11,18
APO E+D004	35,4	35,43	16,02	22,98	55,59	32,86	11,65
APO E+D004	34,72	32,14	16,34	23,98	53,14	33,48	11,74
APO E+D005	36	39,11	12,23	24,18	52,69	33,86	9,69
APO E+D005	38,84	35,63	14,65	20,45	52,96	33,28	10,47
APO E+D005	36,65	34,92	15,64	20,67	55,82	30,67	12,69
APO E+D005	35,12	36,31	15,03	19,48	51,32	30,28	10,36
APO E+D005	38,64	34,52	14,61	20,21	54,55	33,81	11,41
APO E+D005	39,04	34,91	11,36	20,27	53,71	30,58	12,74
APO E+D006	36,52	33,99	14,21	17,94	53,69	30,65	10,73
APO E+D006	31,76	35,44	15,33	21,48	53,35	35,12	10,19
APO E+D006	36,28	33,91	17,2	20,78	51,41	33,65	10,91
APO E+D006	36,72	33,56	15,23	18,42	51,8	32,45	12,88
APO E+D006	33,2	33,75	12,92	19,99	52,92	31,27	11,46
APO E+D006	36,04	31,01	15,2	22,98	55,14	33,22	11,58
APO E+D007	33,12	34,84	15,48	19,84	52,71	30,51	9,64
APO E+D007	36,04	34,05	13,8	17,89	54,42	33,12	10,47
APO E+D007	36,68	31,21	13,82	19,74	54,91	32,35	10,11
APO E+D007	37,84	31,41	15,7	19,68	53,31	30,74	9,98
APO E+D007	37,68	31,32	15,62	20,55	53,25	30,61	9,46
APO E+D007	37,2	32,63	16,2	22,92	55,86	33,14	10,68
Media+/-DT	35,917+/-2,47	34,215+/-1,84	15,195+/-1,48	21,308+/-2,23	53,28+/-2,02	32,498+/-2,09	10,755+/-0,98

Tabla 71.- Valores retinianos correspondientes al grupo Apo E+.D.

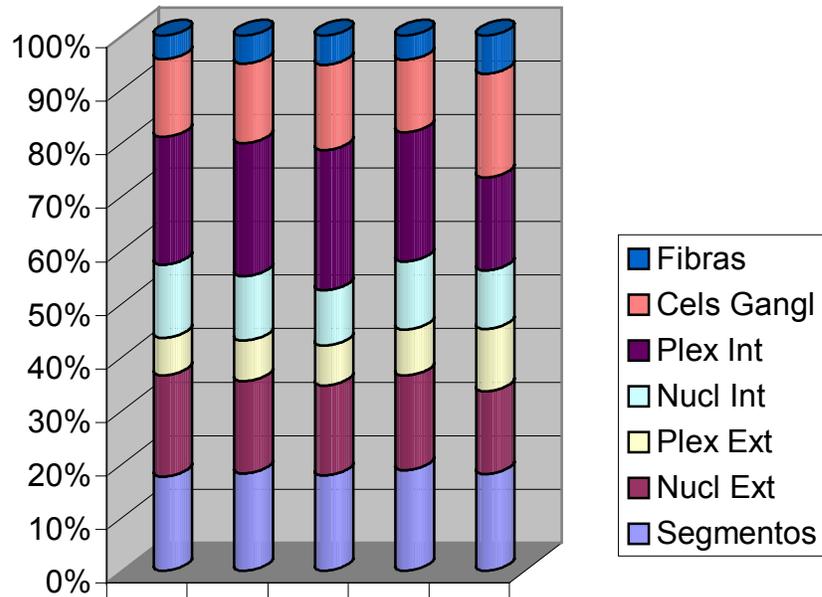
GRUPO PTEN							
Animales	Segmentos	Nucl ext	Plex Ext	Nucl Int	Plex Int	Cels Gangl	Fibras
PTEN 001	44,08	42,4	18,6	31,84	66,56	33,32	11,02
PTEN 001	44,64	42,52	22,04	33,08	67,2	39,4	10,45
PTEN 001	44,64	41,08	22,32	39,2	54,76	31,92	11,23
PTEN 001	46,04	43,4	23,72	3,12	51,08	35,24	12,33
PTEN 001	45,64	42,48	23,76	28,12	66,4	30,36	11,36
PTEN 001	42,16	42,68	19,6	27,92	71,48	31,64	11,32
PTEN 002	48,88	41,44	19,72	30,28	71,32	31,4	10,11
PTEN 002	48,12	43,08	19,28	30,48	66,68	32,2	10,23
PTEN 002	45,04	43,6	18,96	28,8	57,96	28,52	11,21
PTEN 002	45,68	45,32	20,2	35,96	60,4	27,32	12,01
PTEN 002	46,84	45,48	20,84	31,6	54,56	30,04	11,89
PTEN 002	46,68	45,08	24,48	37,68	55,36	26,56	11,95
PTEN 003	46,2	44,12	21,24	33,44	55,36	32,24	10,34
PTEN 003	47,76	43,64	23,68	29,4	55,36	30,84	10,12
PTEN 003	47,72	43,76	22,68	28,76	58,16	33,56	10,72
PTEN 003	51,2	42,84	22,88	29,28	60,24	30,68	10,21
PTEN 003	46,92	43,12	22,56	28,68	58,96	29,2	12,61
PTEN 003	49,04	43,72	26,24	33,32	63,2	34,04	10,89
PTEN 004	43,24	40,04	23,84	27,32	50,44	37,56	11,55
PTEN 004	45,8	44,84	25,76	33,12	58,92	35,24	10,94
PTEN 004	44,64	43,88	16,76	34,72	60,12	36,48	10,23
PTEN 004	45,12	41,24	20,04	35,76	57,76	29,68	10,33
PTEN 004	46	42,92	23,84	38	63,68	29,84	11,23
PTEN 004	49,92	45,88	23,64	26,36	60,24	36,64	11,45
PTEN 005	44,92	42,48	24,16	24,84	55,08	36,8	11,71
PTEN 005	43,12	40,8	24,64	27,52	59,92	36,04	11,11
PTEN 005	47,64	42,4	21,36	37,56	56,6	30,72	11,23
PTEN 005	48,04	42,28	19,72	29,12	56,44	36,48	11,98
PTEN 005	45,52	43	19,28	27,92	62,4	31,04	10,02
PTEN 005	40,76	42,72	18,24	34,28	59,56	34,12	10,21
PTEN 006	45,28	41,28	15,96	34,48	52,48	38,2	11,9
PTEN 006	45,72	41,12	16,4	33	57,6	34,44	12,34
PTEN 006	42,2	44,64	19,12	33,12	53,24	30,32	11,13
PTEN 006	45,04	42	19,76	33,4	59,4	32,4	11,31
PTEN 006	42,12	41,04	20,28	35,92	56,56	33,08	12,2
PTEN 006	45,04	44,84	17,96	36,24	56,36	33	12,01
PTEN 007	45,68	43,88	19,36	36,48	57,36	32,12	11,04
PTEN 007	46,84	43,24	17,48	29,68	55,36	32,4	10,54
PTEN 007	46,68	44,92	23,12	29,84	59,16	34,92	11,21
PTEN 007	46,2	44,12	19,64	28,76	59,24	36,4	11,22
PTEN 007	43,76	45,64	20,28	29,28	61,12	34,4	10,61
PTEN 007	43,72	46,76	22,68	28,68	58,76	35,24	10,04
Media+/-DT	45,721+/-2,15	43,231+/-1,55	21,098+/-2,6	31,103+/-5,7	59,115+/-4,83	33,001+/-2,99	11,132+/-0,72

Tabla 72.- Valores retinianos correspondientes al grupo PTEN.

GRUPO P27							
Animales	Segmentos	Nucl Ext	Plex Ext	Nucl Intt	Plex int	Cels Gangl	Fibras
P27 001	32,28	21,68	22,48	20,04	34,92	33,81	11,64
P27 001	29,24	22,48	26,56	18,84	32,92	25,43	12,43
P27 001	36,44	25,84	23,8	21,12	35	26,24	10,01
P27 001	39,76	24,24	18,28	18,2	33,16	28,09	13,29
P27 001	34,4	24,56	11,52	17,24	23,56	29,8	11,91
P27 001	35,28	20,64	18,76	19	20,52	33	12,52
P27 002	32,08	18,76	21,72	16,64	21,24	29,12	10,65
P27 002	34,88	17,36	15	16,2	24,84	28,4	10,21
P27 002	48,48	23,2	19,2	15,28	22,92	29,92	12,44
P27 002	38,56	23,28	19,92	14,84	22,68	30,64	13,71
P27 002	25,52	24,24	12,64	16,56	22,68	30,48	10,11
P27 002	23	23,92	17,6	14,92	34,32	29,48	10,83
P27 003	18,12	25,84	24,92	15,52	28,56	29,22	10,48
P27 003	28,4	21,84	21,8	16,52	19,84	28,76	10,62
P27 003	25,52	17,48	18,12	15,52	34,92	29,28	11,47
P27 003	26,52	28,32	19,92	18,56	32,92	26,24	12,47
P27 003	20,04	27,92	15,2	20,28	35	27,02	10,03
P27 003	28,44	30,36	13,8	20,56	33,16	29,2	11,48
P27 004	26,56	20,56	19	16,6	23,56	27,34	11,74
P27 004	28,4	19,2	15,2	19,68	20,52	28,06	12,41
P27 004	28,16	20,44	18,76	17,28	21,24	26,02	10,9
P27 004	22,76	21,96	18,52	17,4	24,84	27,14	13,14
P27 004	22,6	24,56	14,64	16,71	22,92	29,36	11,3
P27 004	17,76	25,24	17,76	15,2	22,68	26,28	11,41
P27 005	20,72	22,28	17,4	16,12	22,68	27,4	11,2
P27 005	21,12	21,12	21,04	15,76	34,32	28	13,41
P27 005	23,92	19,12	24,44	16,98	28,56	30,02	11,44
P27 005	22,04	24,6	17,56	17,3	19,84	30,4	11,04
P27 005	22,64	21,32	23,12	19,95	29	27,89	10,21
P27 005	20,08	24,32	23,18	20,07	26,56	26,04	10,44
P27 006	25,8	17,16	11,62	15,69	24,6	26,71	11,17
P27 006	28,04	27,16	16,12	18,75	27,04	27,18	10,44
P27 006	26,12	23,28	19,07	16,33	28,4	30,34	10,67
P27 006	24,6	18,8	16,86	20,42	22,48	27,1	12,25
P27 006	25,28	26,2	16	19,12	28,8	30,02	9,34
P27 006	28,52	33,32	16,85	16,4	26,72	30,04	10,45
P27 007	27,24	38,28	16,53	20,01	20,4	29,16	10,48
P27 007	39,72	21,4	14,34	18,44	22,92	29,48	10,74
P27 007	29,88	22,96	18,92	17,2	30	26,04	13,1
P27 007	27,8	25,52	14,76	16,8	33,6	26,51	10,49
P27 007	20,44	25,96	17,96	13,85	23,89	29,68	10,65
P27 007	22,96	23,6	19,4	15,6	25,74	29,84	11,47
Media+/-DT	27,622+/-6,57	23,579+/-4,14	18,34+/-3,56	17,464+/-1,88	26,773+/-5,09	28,576+/-1,87	11,338+/-1,06

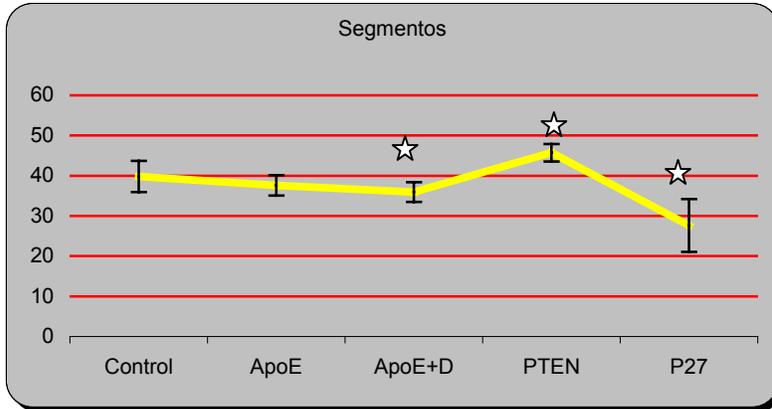
Tabla 73. - Valores retinianos correspondientes al grupo P27.

Porcentaje de cada capa sobre el grosor total.



	Contr ol	ApoE	ApoE +D	PTEN	P27
■ Fibras	4%	5%	5%	5%	7%
■ Cels Gangl	15%	15%	16%	14%	20%
■ Plex Int	24%	25%	26%	24%	18%
■ Nucl Int	14%	12%	10%	13%	11%
■ Plex Ext	7%	8%	7%	9%	12%
■ Nucl Ext	19%	17%	17%	18%	16%
■ Segmentos	18%	18%	18%	19%	18%

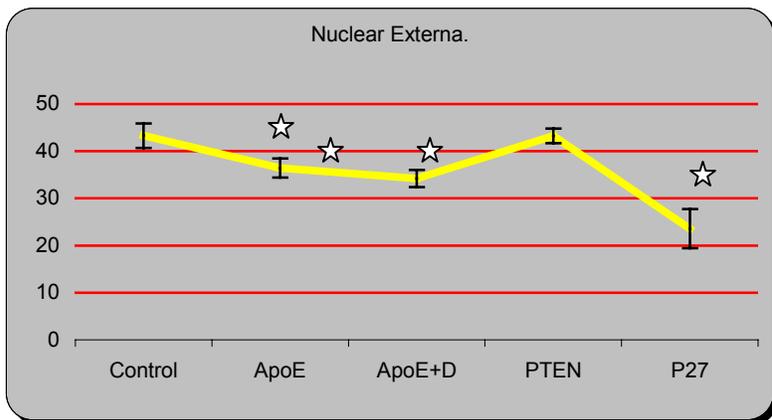
Gráfica 10. - Muestra la proporción sobre el grosor retiniano global, que ocupa cada una de las capas, y para cada uno de los cinco grupos estudiados.



Gráfica. -11.

Representación de los grosores medios de la capa de segmentos de los fotorreceptores (μm). Existe una diferencia estadísticamente significativa entre el grupo Control con respecto al grupo ApoE+D,

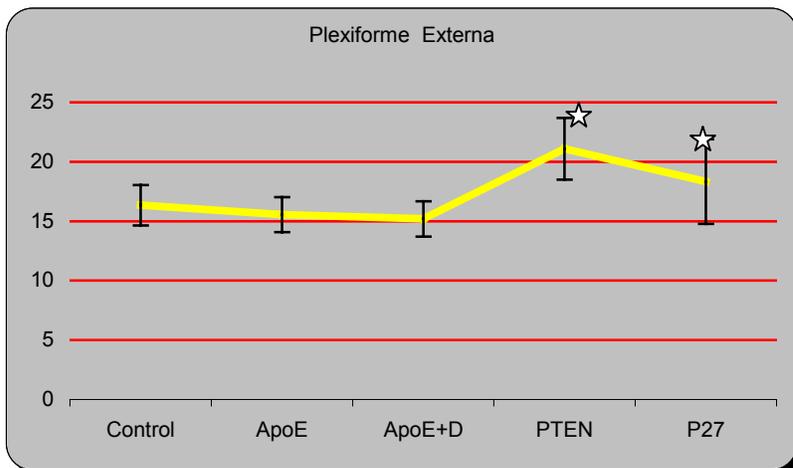
PTEN y P27 ($P < 0.001$). No Existió significación estadística al comparar los grupos ApoE y ApoE+D ($P = 0.526$).



Gráfica. -12.

Representación de los grosores medios de la capa nuclear externa (μm). Existen diferencias significativas de todos los grupos respecto al Control ($P < 0.001$) a excepción del grupo PTEN. También existió significación

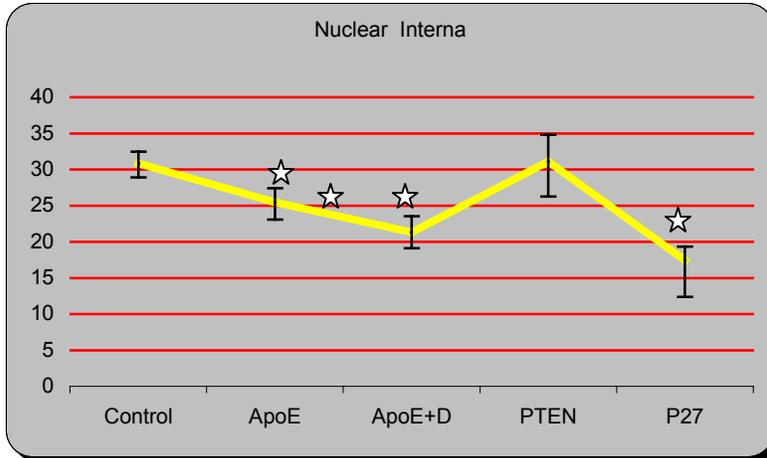
estadística al comparar los grupos ApoE y ApoE+D ($P = 0.001$).



Gráfica. -13.

Representación de los grosores medios de la capa plexiforme externa (μm). Existen diferencias significativas del grupo Control con respecto al PTEN ($P < 0.001$) y al P27

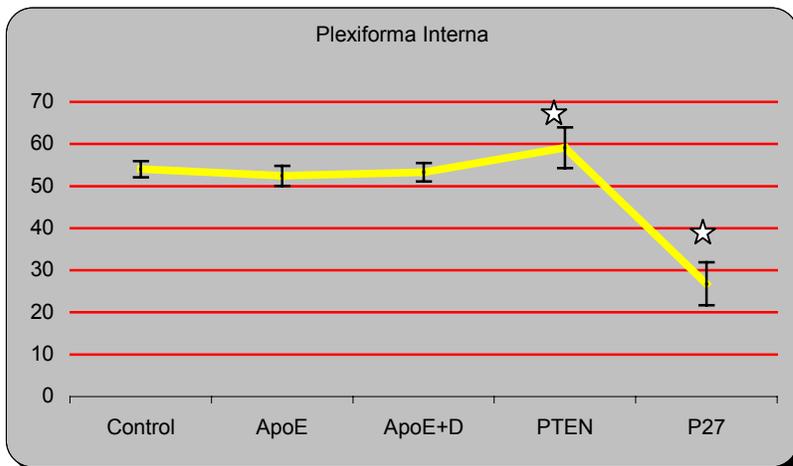
($P = 0.001$). No hay diferencias entre los grupos ApoE y ApoE+D ($P = 1$).



Gráfica. -14.

Representación de los grosores medios de la capa nuclear interna (mμ). Existen diferencias significativas del grupo Control con respecto a los grupos ApoE , ApoE+D y P27 ($P < 0.001$). También existen diferencias entre los grupos ApoE y ApoE +D.

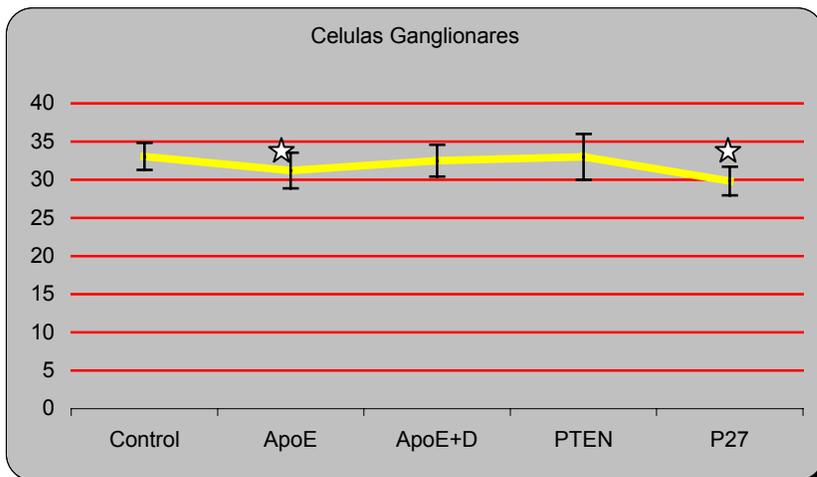
No hay significación estadística entre el grupo control y PTEN ($P=1$).



Gráfica. -15.

Representación de los grosores medios de la capa plexiforme interna (mμ). Existen diferencias significativas del grupo Control con respecto a los grupos PTEN ($P < 0.001$). y P27 ($P < 0.001$). No aparecen diferencias en la comparación con los grupos

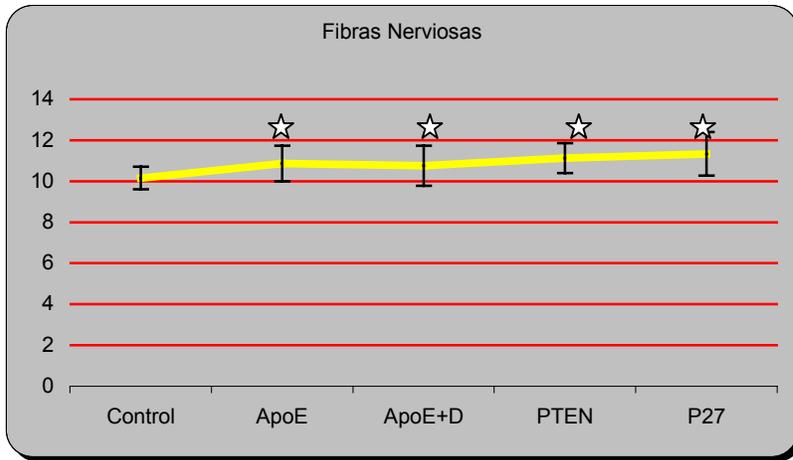
ApoE ($P=0.42$) y ApoE+D ($P=1$). Tampoco hay diferencias al comparar estos dos últimos entre sí ($P=1$).



Gráfica. -16

Representación de los grosores medios de la capa de células ganglionares (mμ). Únicamente existen diferencias al comparar los grupos Control con P27 ($P < 0.001$) y ApoE ($P=0.002$). No existe significación al comparar

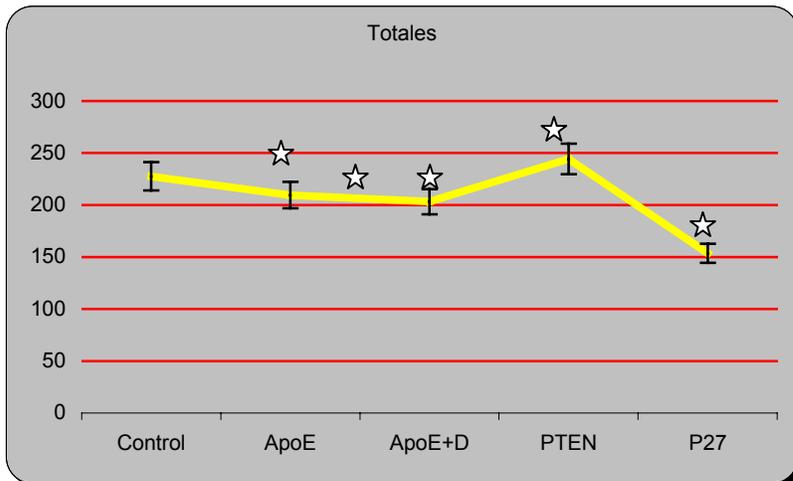
los grupos ApoE y ApoE+D entre sí ($P=0.092$).



grupos ApoE y ApoE +D (P=1).

Gráfica. -16

Representación de los grosores medios de la capa de Fibras. Existen diferencias entre los grupos Control y ApoE (P=0.02), ApoE+D (P=0.016), PTEN (P<0.001), y P27 (P<0.001). No existen diferencias entre los



existen diferencias al compara los grupos ApoEy ApoE+D (P=0.01).

Gráfica. -17

En cuanto al grosor retiniano total, comentar que existen diferencias entre todos los grupos que hemos estudiado. Entre Control y ApoE (P<0.001), ApoE+D (P<0.001), PTEN (P<0.001), y P27 (P<0.001). También

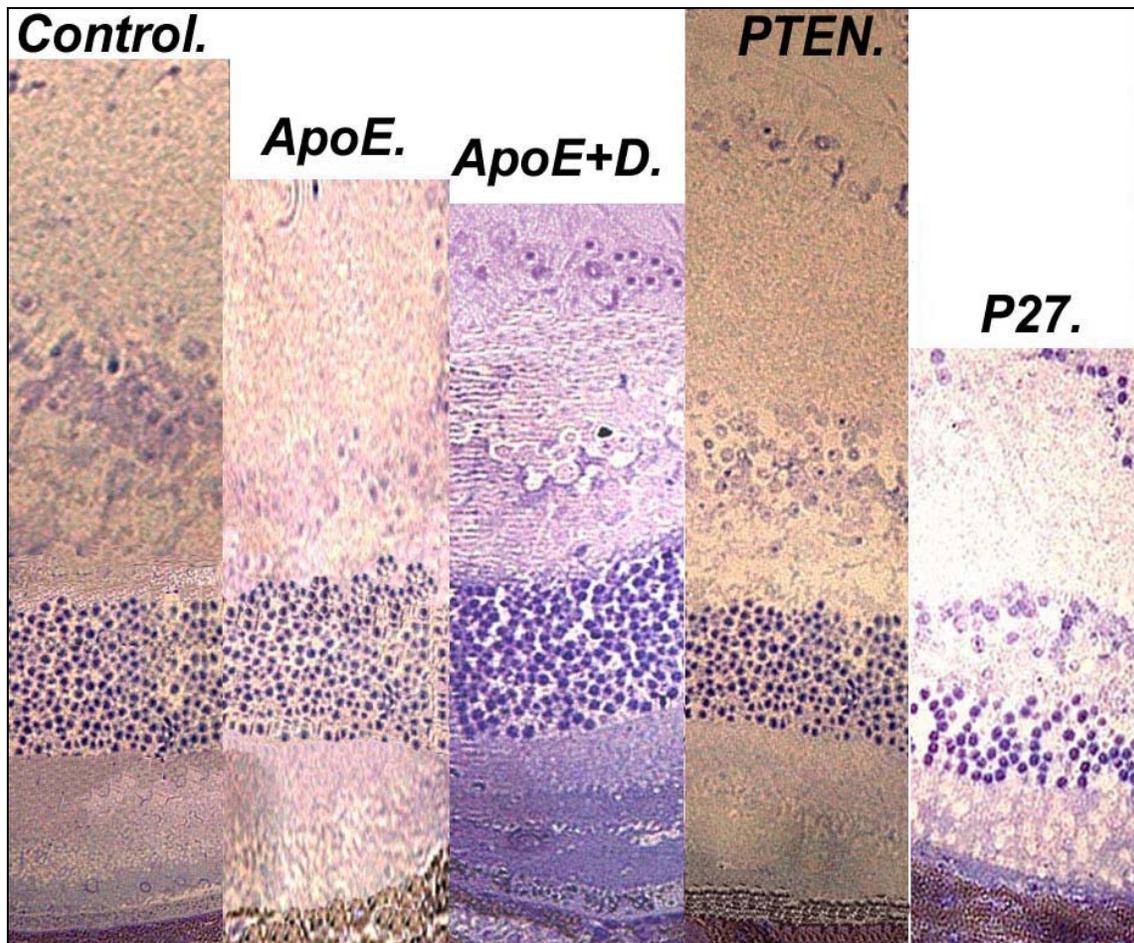


Fig.38.- Cortes Histológicas que muestran el grosor retiniano completo de un ratón correspondiente a cada uno de los grupos. Obsérvese el grosor retiniano completo máximo en el grupo PTEN y mínimo en el P27. (Sección semifina, 1 μ m, azul de toluidina 20X).

RESULTADO DEL RECUESTO DE LOS NÚCLEOS CELULARES RETINIANOS.

Las Tablas 74.- y 75.- muestran respectivamente en cada casilla el resultado del recuento de los núcleos celulares por cada unidad de superficie de $1.000 \mu\text{m}^2$, de cada una de las dos capas de la retina estudiadas. En cada columna y precedido por el correspondiente código de colores, se sitúan en el orden habitual los distintos grupos. En la última fila y en negrita se representa la Media de cada uno de los grupos.

Las gráficas 19.- y 20.- representan gráficamente los resultados contenidos en las tablas precedentes.

El análisis morfométrico de la densidad celular retiniana reveló que, en las dos capas estudiadas, al comparar los cuatro grupos de ratones estudiados respecto al grupo control, estos primeros mostraban un descenso en la celularidad con respecto al segundo.

En la capa Nuclear Externa, expresando este descenso en porcentaje y siempre con respecto al grupo control observamos que, la diferencia es mínima al compararlo con el grupo PTEN, mostrando este una celularidad del 88,6% +/- 2,1 %, seguido por el grupo ApoE y ApoE+D 85% +/- 1,4 % y 81,4% +/- 1,7 % respectivamente, por último, el grupo con menor celularidad y con una diferencia remarcada con respecto a cualquiera de los grupos anteriores fue el grupo P27 con un 49,9% +/- 1,8 %.

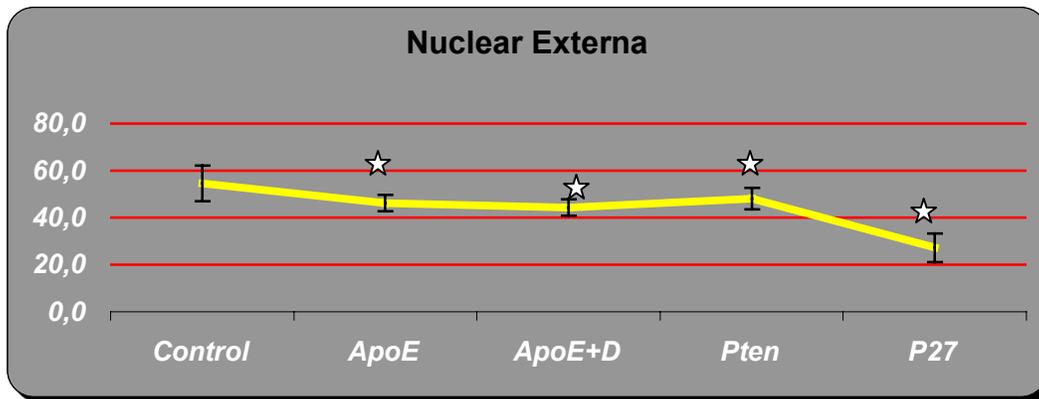
En la capa Nuclear Interna se repite de nuevo un patrón idéntico en cuanto al orden de los grupos por su densidad celular y con porcentajes también muy parecidos: PTEN 88,9% +/- 2 %, ApoE 84,4 % +/- 1,77 %, ApoE+D 75,1% +/- 1,65 % y por último P27 57,4% +/-2,1 %.

Nuclear Externa				
CONTROL	ApoE	ApoE+D	PTEN	P27
54	45	44	50	29
68	44	47	48	21
36	44	41	39	25
55	41	48	47	32
51	47	42	44	41
59	39	43	52	28
49	46	41	51	22
51	48	39	49	27
58	51	42	39	31
54	47	48	52	18
61	49	51	51	19
63	51	41	52	31
51	47	46	53	29
53	49	48	48	28
54,5+/-7,55	46,3+/-3,47	44,4+/-3,6	48,2+/-4,59	27,2+/-6,02

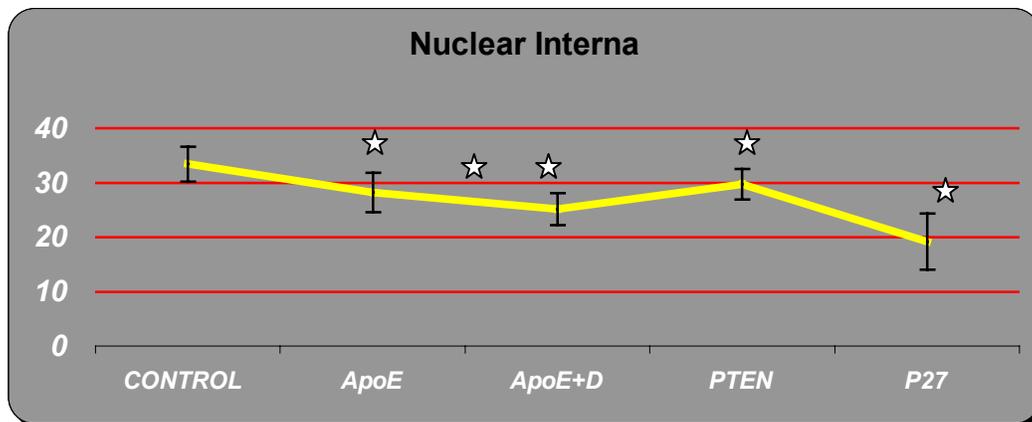
Tabla 74. - Recuento de los núcleos celulares en la capa retiniana Nuclear Externa.

Nuclear Interna				
CONTROL	ApoE	ApoE+D	PTEN	P27
32	27	25	29	16
31	24	25	31	12
35	21	24	32	14
39	25	29	34	27
38	28	31	24	21
27	31	24	31	14
34	32	22	24	18
32	28	28	32	22
36	32	21	31	17
31	29	23	30	18
31	28	22	30	22
35	31	26	29	29
35	34	24	28	24
32	25	28	31	15
33,4+/-3,18	28,2+/-3,62	25,1+/-2,93	29,7+/-2,84	19,2+/-5,12

Tabla 75. - Recuento de los núcleos celulares en la capa retiniana Nuclear Interna.



Gráfica 19.-. Representación de las densidades celulares por grupos en la capa Nuclear Externa. En cuanto a números absolutos de celularidad media contabilizada en $1000 \mu\text{m}^2$, existen diferencias estadísticamente significativas al comparar el grupo Control con ApoE ($P=0.001$), ApoE+D ($P<0.001$), PTEN ($P=0.01$) y P27 ($P<0.001$). A pesar de que la diferencia en cuanto a porcentaje entre los grupos ApoE y ApoE+D fue prácticamente del 4%, no existió significación estadística ($P=0.06$).



Gráfica 20.-. Representación de las densidades celulares por grupos en la capa Nuclear Interna. En cuanto a números absolutos de celularidad media contabilizadas en $1000 \mu\text{m}^2$, existen diferencias estadísticamente significativas al comparar el grupo Control con ApoE ($P<0.001$), ApoE+D ($P<0.001$), PTEN ($P=0.003$) y P27 ($P<0.001$). También existieron diferencias al comparar los grupos, ApoE y ApoE+D ($P=0.02$).

RESULTADOS DEL ESTUDIO MORFOMÉTRICO, MEDIANTE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA, DE LA RETINA.

A continuación mostramos 5 tablas correspondiendo la primera de ellas (tabla 76.-), a cada uno de los valores obtenidos en las mediciones de los grosores de las membranas de Bruch, la segunda (tabla 77.-), representa los valores obtenidos del cálculo de las áreas de los núcleos celulares del EPR. La tabla 78.- muestra los espesores de los EPR, y por último las tablas 79.- y 80.-, las áreas de los núcleos de las células de las capas nuclear externa e interna respectivamente. En todas las tablas, las columnas representan a cada uno de los grupos del estudio, encabezándose cada una de ellas con el correspondiente color. En la última fila y en sombreado se muestran las medias.

Seguidamente se muestran 5 gráficas donde se representan los resultados obtenidos en las tablas, es decir, la media +/- DT de cada grupo de animales.

En la gráfica 21.-, la Membrana de Bruch se muestra más adelgazada en el grupo P27 (0,38 μ m) que en el resto. Por el contrario, los valores correspondientes a los grosores de los grupos ApoE (0,48 μ m), ApoE+D (0,51 μ m) y PTEN (0,48 μ m) son claramente superiores a los del Grupo Control (0,44 μ m).

La Fig 39.- es un montaje de diversas micrografías correspondientes a cada uno de los grupo del estudio, donde se comparan fácilmente los grosores de la membrana de Bruch.

En cuanto al grosor del EPR (gráfica 22.-), destaca el espesor máximo mostrado por el grupo Control (15,52 μ m), frente al mínimo, que una vez más corresponde al grupo P27(4,84 μ m). Entre estos valores se sitúan ApoE(11,11 μ m), ApoE+D (11,12 μ m), y PTEN (11,93 μ m).

Las gráficas 23.-,24.- y 25.- muestran los resultados obtenidos al estudiar las áreas de los núcleos del EPR, capa nuclear externa e interna. En todos los casos encontramos un patrón similar, el grupo PTEN presenta las áreas nucleares mayores seguido por el grupo control, los ratones P27, por el contrario, son los que poseen núcleos de menor

tamaño y los grupos ApoE y ApoE+D tienen núcleos de tamaños intermedios. Estas diferencias son máximas al comparar las áreas de los núcleos del EPR y mínimas en los núcleos de la capa nuclear externa.

Membrana de Bruch				
Control	ApoE	ApoE+D	PTEN	P27
0,62	0,65	0,46	0,45	0,36
0,7	0,45	0,47	0,46	0,34
0,51	0,43	0,48	0,46	0,38
0,59	0,5	0,47	0,49	0,28
0,62	0,58	0,43	0,50	0,28
0,7	0,54	0,46	0,49	0,31
0,51	0,65	0,48	0,47	0,35
0,59	0,44	0,47	0,46	0,31
0,52	0,43	0,46	0,46	0,3
0,49	0,5	0,47	0,62	0,34
0,38	0,58	0,46	0,49	0,35
0,46	0,54	0,49	0,51	0,32
0,55	0,53	0,47	0,52	0,37
0,46	0,54	0,52	0,54	0,29
0,42	0,51	0,48	0,52	0,32
0,42	0,55	0,58	0,49	0,36
0,51	0,64	0,47	0,50	0,29
0,3	0,63	0,53	0,54	0,49
0,38	0,58	0,57	0,52	0,46
0,4	0,53	0,58	0,51	0,42
0,54	0,42	0,56	0,51	0,43
0,4	0,45	0,51	0,48	0,39
0,62	0,49	0,51	0,50	0,4
0,41	0,5	0,53	0,52	0,39
0,52	0,52	0,48	0,52	0,39
0,43	0,43	0,47	0,52	0,4
0,35	0,54	0,48	0,52	0,42
0,35	0,36	0,48	0,45	0,52
0,34	0,34	0,48	0,43	0,45
0,32	0,46	0,45	0,44	0,46
0,27	0,43	0,51	0,46	0,42
0,33	0,37	0,58	0,45	0,44
0,26	0,37	0,58	0,45	0,4
0,36	0,41	0,57	0,45	0,43
0,37	0,45	0,59	0,45	0,44
0,45	0,41	0,55	0,42	0,38
0,52	0,45	0,59	0,43	0,44
0,5	0,48	0,61	0,46	0,45
0,38	0,35	0,59	0,45	0,43
0,45	0,36	0,52	0,45	0,38
0,31	0,3	0,57	0,45	0,34
0,42	0,48	0,46	0,43	0,4
0,37	0,51	0,49	0,47	0,35
0,26	0,5	0,53	0,45	0,34
0,32	0,43	0,54	0,50	0,35
0,51	0,52	0,56	0,46	0,34
0,37	0,38	0,47	0,60	0,34
0,45	0,36	0,58	0,45	0,31
0,40	0,44	0,40	0,51	0,38
0,44+/-0,11	0,48+/-0,08	0,51+/-0,05	0,48+/-0,04	0,38+/-0,06

Tabla 76.- Grososres de la Membrana de Bruch (μm).

Epitelio Pigmentario de la Retina				
Control	ApoE	ApoE+D	PTEN	P27
14,79	11,83	10,33	11,9	3,64
15,24	12,29	10,46	11,57	5,9
15,04	11,27	11,21	11,04	6,93
15,13	11,49	11,22	10,98	6,62
14,65	11,98	11,91	11,49	3,42
14,5	11,98	11,11	11,94	5,36
14,29	10,64	11,94	12,15	4,74
14,67	9,84	11,38	12,74	4,28
14,8	10,07	11,45	12,82	4,64
15,02	11,31	11,91	12,48	6,31
14,41	10,22	10,78	12,55	3,45
15,32	10,89	12,92	12,25	6,25
14,15	11,06	10,71	11,3	5,53
14,11	11,14	10,97	11,58	4,48
15,1	10,57	10,72	11,5	3,23
14,31	11,72	11,41	12,23	4,45
14,76	11,19	11,58	12,63	5,62
14,31	12,28	10,72	11,84	4,81
13,16	10,17	10,81	12,32	4,46
14,02	10,21	9,48	11,01	3,24
14,55	11,24	10,51	12,24	4,21
14,59 \pm 0,5	11,11 \pm 0,75	11,12 \pm 0,72	11,93 \pm 0,58	4,84 \pm 1,14

Tabla 77.- Valores correspondientes a las medidas de los grososres del EPR (μm).

Área de los núcleos del EPR				
Control	ApoE	ApoE+D	PTEN	P27
42,43	33,9	16,69	36,96	14,19
42,43	21,16	33,7	44,77	33,9
32,37	12,82	31,37	38,27	21,16
28,46	11,34	20,91	56,08	12,82
30,58	18,1	19,48	40,94	7,26
40,04	26,42	29,32	43,12	29,71
29,8	24,63	20,75	36,85	17,57
35,16 \pm 6,21	21,19 \pm 7,93	24,6 \pm 6,68	42,43 \pm 6,74	19,51 \pm 9,49

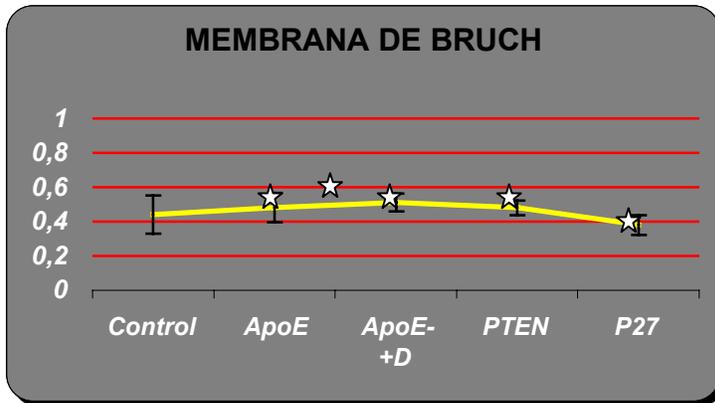
Tabla 78.- Superficies de los Núcleos del Epitelio Pigmentario de la Retina (μm^2).

Nuclear Externa.				
Control	ApoE	ApoE+D	PTEN	P27
18,8	17,1	18,56	21	19,48
17	15,81	19,76	18,31	7,31
21,2	18,68	15,11	18,83	13,98
15,57	19,35	18,61	18,21	16,88
19,51	19,84	20,95	20,79	12,03
19,48	20,44	15,27	22,21	4,36
20,58	18,52	18,21	17,23	10,73
22,89	17,73	14,32	23,73	17,6
18,24	14,56	15,54	22,32	13,43
16,14	21,77	18,63	18,21	20,69
20,36	14,76	16,98	21,15	7,42
21,44	17,41	16,4	18,32	16,73
18,76	19,53	17,32	19,72	14,61
19,41	21,76	18,42	17,13	15,54
18,15	19,22	21,34	18,32	8,87
15,71	17,31	17,32	21,26	5,73
20,43	19,15	18,72	19,21	17,32
19,76	18,72	17,78	22,34	17,41
20,69	20,54	21,24	21,43	9,63
17,33	21,16	17,05	18,31	15,31
20,97	15,32	18,02	16,32	13,42
21,87	14,32	16,32	18,21	11,42
22,83	18,92	18,71	19,66	12,41
18,43	17,33	21,55	18,98	17,95
19,13	18,33	21,34	17,41	15,43
16,97	17,23	16,15	20,62	13,73
22,41	18,78	19,32	19,58	15,94
17,02	16,45	18,31	17,03	14,19
19,32+/-2,1	18,22+/-2,06	18,12+/-2	19,49+/-1,91	13,56+/-4,15

Tabla 79.- Valores correspondientes a las áreas de los núcleos de la capa nuclear externa (μm^2)

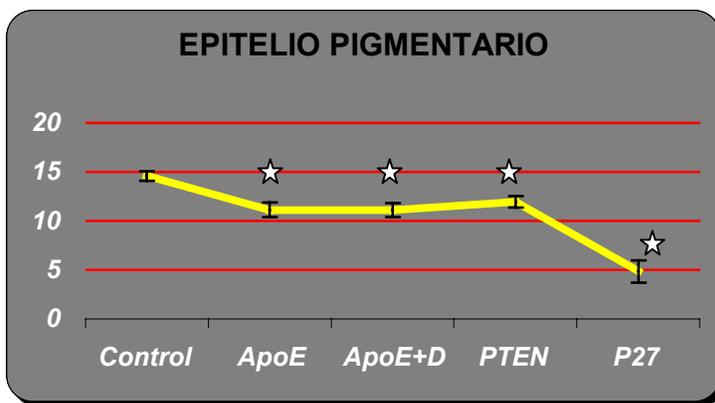
Nuclear Interna.				
Control	ApoE	ApoE+D	PTEN	P27
36,41	28,99	31,14	36,24	27,68
28,22	35,3	28,15	36	34,32
21,3	24,13	32,16	35,9	36,65
40,98	44,62	25,41	35,8	30,29
30,41	41,47	28,16	36,2	23,89
32,33	41,75	29,98	45,98	19,87
45,87	28,44	39,72	39,94	30,31
39,76	25,91	30,67	39,62	32,41
38,63	41,65	21,63	37,63	30,94
41,45	20,99	30,45	33,88	24,63
28,33	12,2	20,32	29,88	30,54
41,13	46,03	32,74	35,52	29,61
35,44	34,54	41,94	34,32	20,73
38,23	49,14	37,73	41,32	32,95
39,86	31,31	42,62	35,18	29,19
32,76	40,56	33,84	36,24	23,87
40,21	30,32	32,95	39,94	28,73
37,43	25,84	31,38	36,53	27,41
32,73	28,49	27,52	35,11	32,32
29,34	32,39	2,93	38,71	31,73
36,73	21,34	43,66	36,48	26,42
39,77	45,7	37,61	34,12	28,42
32,32	31,45	33,88	37,48	20,33
31,94	32,14	31,15	32,48	36,24
41,16	33,45	20,9	34,12	28,78
37,4	38,91	41,15	36,18	24,15
40,45	27,15	31,31	29,56	36,71
41,98	26,21	31,01	39,43	21,77
36,16+/-5,48	32,87+/-8,8	31,15+/-8,3	36,42+/-3,32	28,6+/-4,85

Tabla 80.- Valores correspondientes a las áreas de los núcleos de la capa nuclear interna (μm^2).

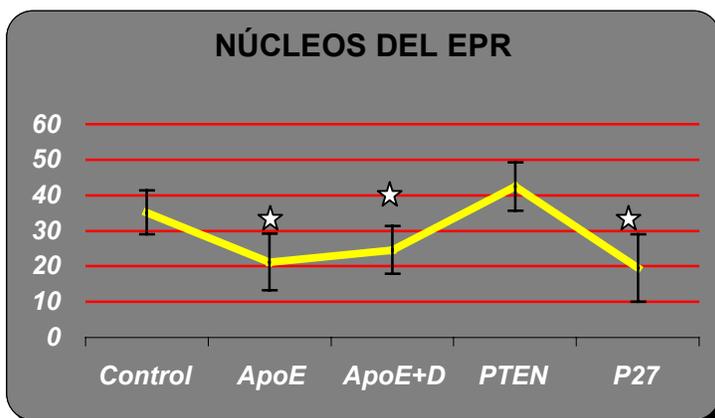


Gráfica 21.- Representación de los grosores medios de la membrana de Bruch (μm). Existen diferencias significativas del grupo Control con respecto a todos los grupos. ApoE ($P=0.044$), ApoE+D ($P=0.002$), PTEN ($P=0.017$) y P27($P=0.004$).

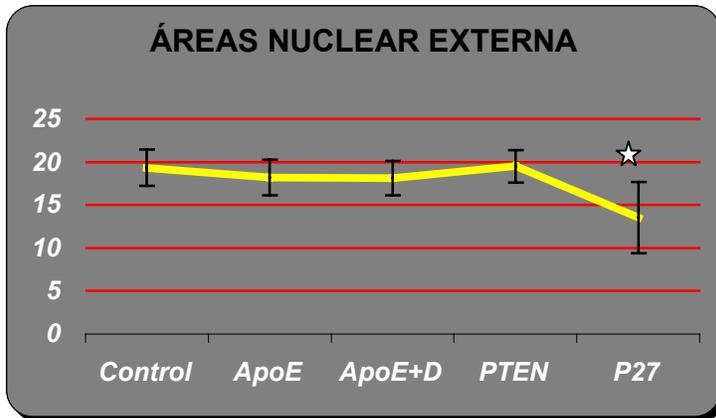
También existen diferencias entre los grupos ApoE y ApoE+D ($P=0.014$).



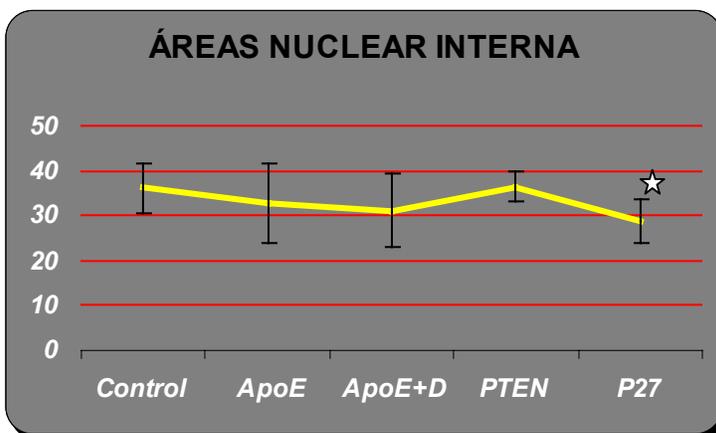
Gráfica 22.- Representación de los grosores medios del EPR (μm). Existen diferencias significativas del grupo Control con respecto a todos los grupos. ApoE, ApoE+D, PTEN y P27 ($P<0.001$). No hay diferencias entre ApoE y ApoE+D ($P=0.97$).



Gráfica 23.- Representación de las superficies medias de los núcleos celulares del EPR (μm^2). Solo existen diferencias significativas del grupo Control con respecto a los grupos. ApoE ($P=0.003$), ApoE+D ($P<0.01$), y P27 ($P=0.003$).



Gráfica 24.- Representación de las superficies medias de los núcleos celulares de la capa nuclear externa (μm^2). Solo existen diferencias significativas del grupo Control con respecto a al grupo P27 ($P < 0.001$).



Gráfica 25.- Representación de las superficies medias de los núcleos celulares de la capa nuclear interna (μm^2). Solo existen diferencias significativas del grupo Control con respecto a al grupo P27 ($P < 0.001$).

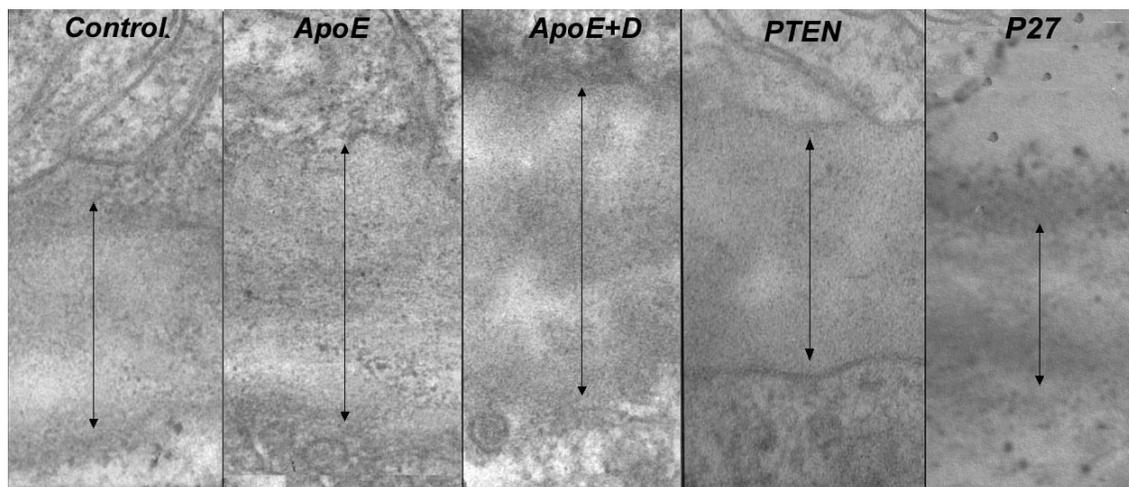


Fig. 39.- Microscopía Electrónica 100.000X. Montaje de diversas micrografías correspondientes a cada uno de los grupo del estudio, donde se comparan fácilmente los grosores de las membranas de Bruch, marcado por las flechas.

ESTUDIO MORFOLÓGICO.

RESULTADO DEL ESTUDIO MORFOLÓGICO DE LOS NERVIOS ÓPTICOS.

ESTRUCTURA DEL NERVIÓ ÓPTICO DE LOS RATONES DEL GRUPO CONTROL

Los nervios ópticos están compuestos por un número considerable de haces de fibras ópticas, con preponderancia de los cilindro-ejes de las células ganglionares de la retina y firmemente sujetos por tejidos de sostén.

Cerca del globo ocular, el NO está formado por unos haces de tamaño variable, los cuales están compuestos por un número diferente de fibras del nervio óptico, mielinizadas de variado espesor y diámetro y separadas unas de otras por un septum de tejido conectivo (representado por células conectivas y fibras colágenas elásticas).



Fig 40. - Sección transversal de un nervio óptico. Los núcleos de las células gliales aparecen como puntos pigmentados (flecha).

Tec.: Azul de Toluidina.

Aumento: 10X

Grupo: Control.

En un corte transversal del NO, el septum conectivo aparece como una red o malla. En contraste con esta delicada red tisular se encuentra un tejido neuroglial principalmente representado por los astrocitos y sus expansiones fibrosas. Como contenido posee los haces del nervio óptico.

El más inmediato revestimiento del NO y de hecho una parte de su propia sustancia, es una capa delgada de tejido conectivo: La Piamadre, que contiene numerosos vasos sanguíneos de pequeño calibre, cuyas ramas penetran en el septum conectivo al espesor del nervio óptico y le dan su aporte nutricional.

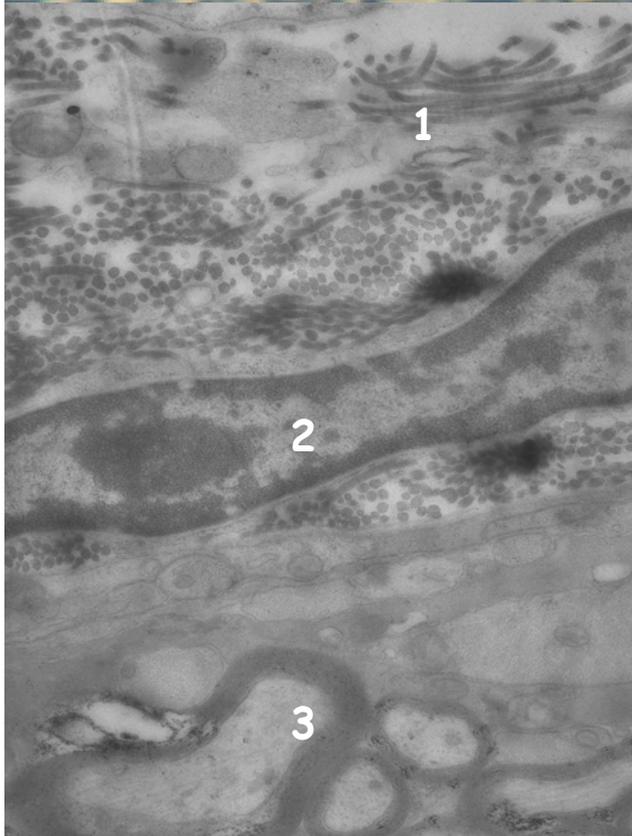
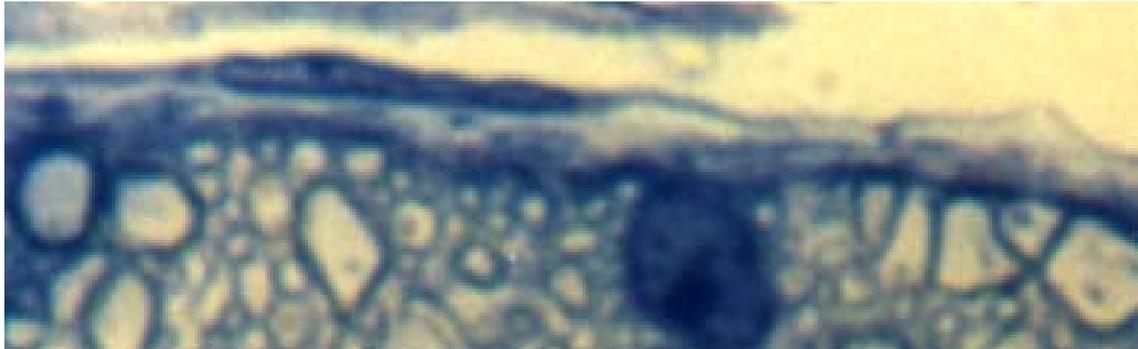


Fig. 41. -

Arriba: Membrana meníngea del NO Semifino (1 μm)

Tec.: Azul de Toluidina.

Aumento: 100X. Grupo: Control.

Abajo: Micrografía que muestra un detalle de la membrana exterior del NO, donde destaca la presencia de fibras de colágeno (1) con su orientación especial. Se puede apreciar también la presencia de un meningocito (2). En el interior aparecen los axones mielinizados (3). Ultrafino (0,5 μm) Aumento: 25.000X Grupo: Control.

Por fuera de esta capa se encuentra la segunda envoltura del NO, la Aracnoides, desprovista de vasos sanguíneos.

El tercer revestimiento es una vaina fibrosa y gruesa denominada Paquimeninge por su espesor: la Duramadre. Está compuesta por una capa más interna, densa y otra más externa de tejido conectivo compuesto por células y fibras. Contiene pequeños y escasos vasos sanguíneos y también delgados nervios.

La microvascularización del NO de los ratones.

Es importante destacar en este punto la particular anatomía que presentan los roedores en cuanto a la distribución del sistema vascular dentro del NO. Una de las primeras variaciones con respecto al modelo humano, es la ausencia de la arteria y vena central de la retina en la parte central del NO, situándose estas por fuera de la envoltura de este (Fig 42.-).

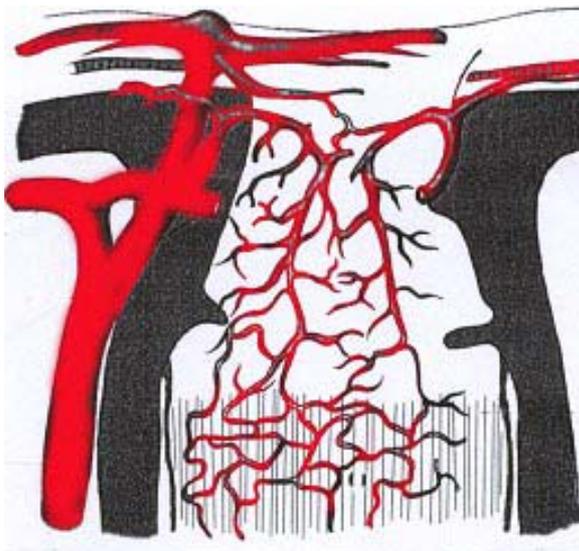


Fig 42.- La anatomía particular del nervio óptico en ratones hace que la arteria central de la retina circule en todo momento por fuera de la vaina del nervio óptico, motivo por el que no hallaremos grandes vasos en el interior de las secciones transversales de los nervios.

La arteria oftálmica, en su bifurcación dará lugar a la arteria ciliar posterior y arteria central de la retina. Esta última penetrará en el globo ocular colocándose en una posición inferior con respecto al NO pero sin penetrar en este. La vena central de la retina se origina a partir de la confluencia de las venas retinianas mayores de la cabeza del nervio óptico. Esta vena viajará por debajo de la cabeza del nervio óptico y junto con la arteria central de la retina (Fig. 43.- y 44.-).

Esta variante anatómica, de la que todo investigador que se inicie en el estudio del sistema visual en roedores debe ser conocedor, será uno de los primeros

hallazgos con los que nos encontraremos a la hora de estudiar las secciones de los NO. Morrison y cols. y Sugiyama y cols. publicaron una perfecta descripción de esta característica (190,191).

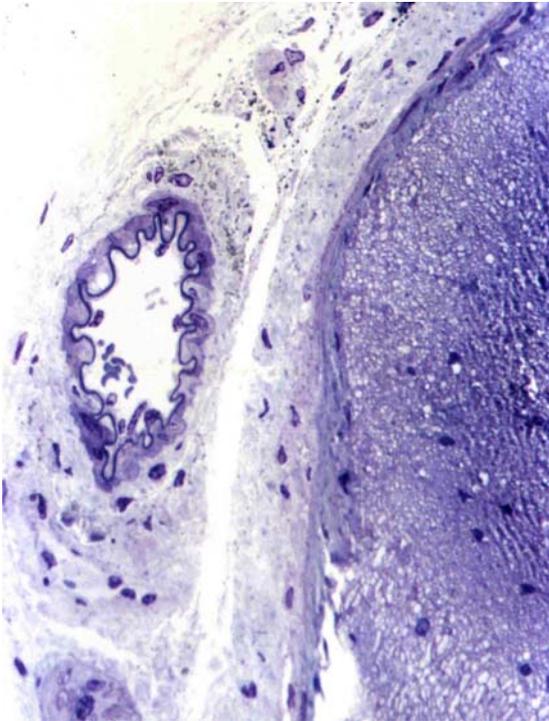


Fig. 43.- Vaso venoso de gran calibre situado por fuera de la envoltura meníngea del NO. Vena central de la retina
Grupo: Control.
Tec.: Azul de Toluidina.
Aumento: 20X



Fig. 44.- Pequeño vaso que penetra en la envoltura meníngea del N.O. aportando nutrientes y oxígeno al nervio.
Grupo: Control.
Tec.: Azul de Toluidina.
Aumento: 100X

ELEMENTOS GLIALES DEL NO.

Las células gliales son identificadas fácilmente en el NO tanto bajo microscopía óptica como electrónica. Sus funciones comprenden: Soporte mecánico neuronal, "filtro" entre la sangre y las neuronas, contribución a ciertas actividades neuronales, control de la composición del líquido extracelular, producción de la vaina de mielina, provisión de una guía a las neuronas migratorias y sus procesos axonales, durante el desarrollo embrionario del SNC, formación de la cicatriz tras daño tisular y eliminación del tejido local dañado.

Las células que componen los elementos gliales son:

Astrocitos: Son de forma estrellada y se hallan alineados en el NO de forma que siguen el eje mayor del nervio. Se localizan en los tabiques y son más numerosos en la periferia, desde donde envían sus expansiones citoplasmáticas al interior de los tabiques. Los astrocitos son de dos tipos:

- Astrocito protoplasmático: tiene un núcleo mayor que los oligodendrocitos y que la microglia, un citoplasma granular abundante y numerosas prolongaciones gruesas.
- Astrocito fibroso: Expansiones largas, delgadas, lisas y con ramificaciones. Dentro del citoplasma distinguiremos estructuras fibrilares que corresponden a agrupaciones de filamentos delgados. Serán los que hallaremos habitualmente en el NO.

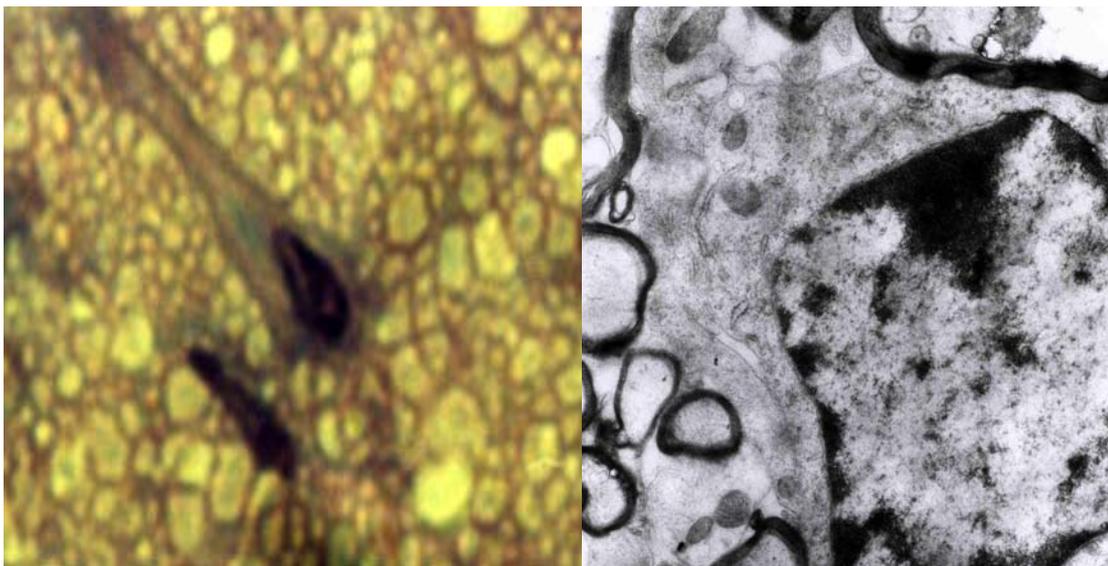


Fig. 45.- *Izquierda:* Detalle donde se aprecian los núcleos de los astrocitos rodeados por los axones mielinizados. Semifino (1 μ m) Tec.: Azul de Toluidina. Aumento: 100X. Grupo: Control. *Derecha:* Núcleo y proceso de célula glial (astrocito), con sus componentes citoplasmáticos característicos. (REP, mitocondrias,...). Ultrafino (0,5 μ m) Aumento: 25.000X Grupo: Control.

Incluido dentro del citoplasma de los astrocitos hay estructuras fibrilares. Las micrografías electrónicas muestran que estas estructuras corresponden a

agrupaciones de filamentos delgados que están presentes abundantemente en el citoplasma.

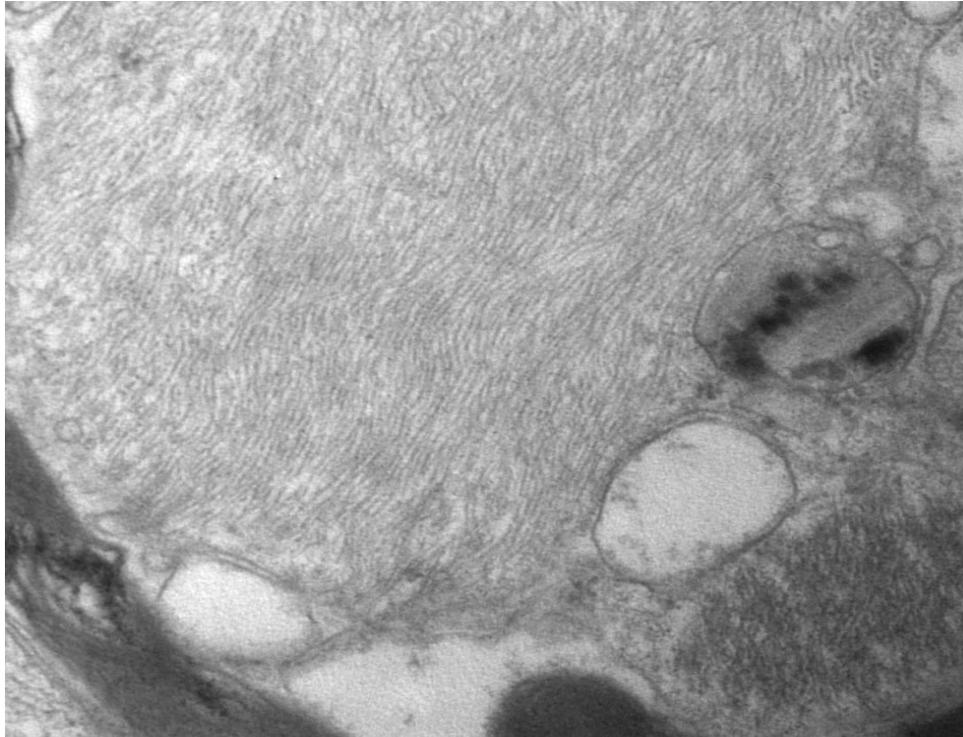


Fig. 46. - Detalle del citoplasma del astrocito. Abundantes filamentos intermedios organizados en su interior. Ultrafino (0,5 μ m). Aumento: 50.000X Grupo: Control

Oligodendrocitos: Los oligodendrocitos del NO son similares a los de la sustancia blanca cerebral. Se disponen en columnas longitudinales. Son más numerosos en el centro que en la periferia. Participan en la formación de la mielina alrededor de los axones y no poseen conexiones vasculares, aunque si tienen expansiones citoplasmáticas muy numerosas. Los procesos citoplasmáticos envuelven a los axones concéntricamente formando la vaina de mielina, que es interrumpida a intervalos regulares por lagunas llamadas nódulos de Ranvier.

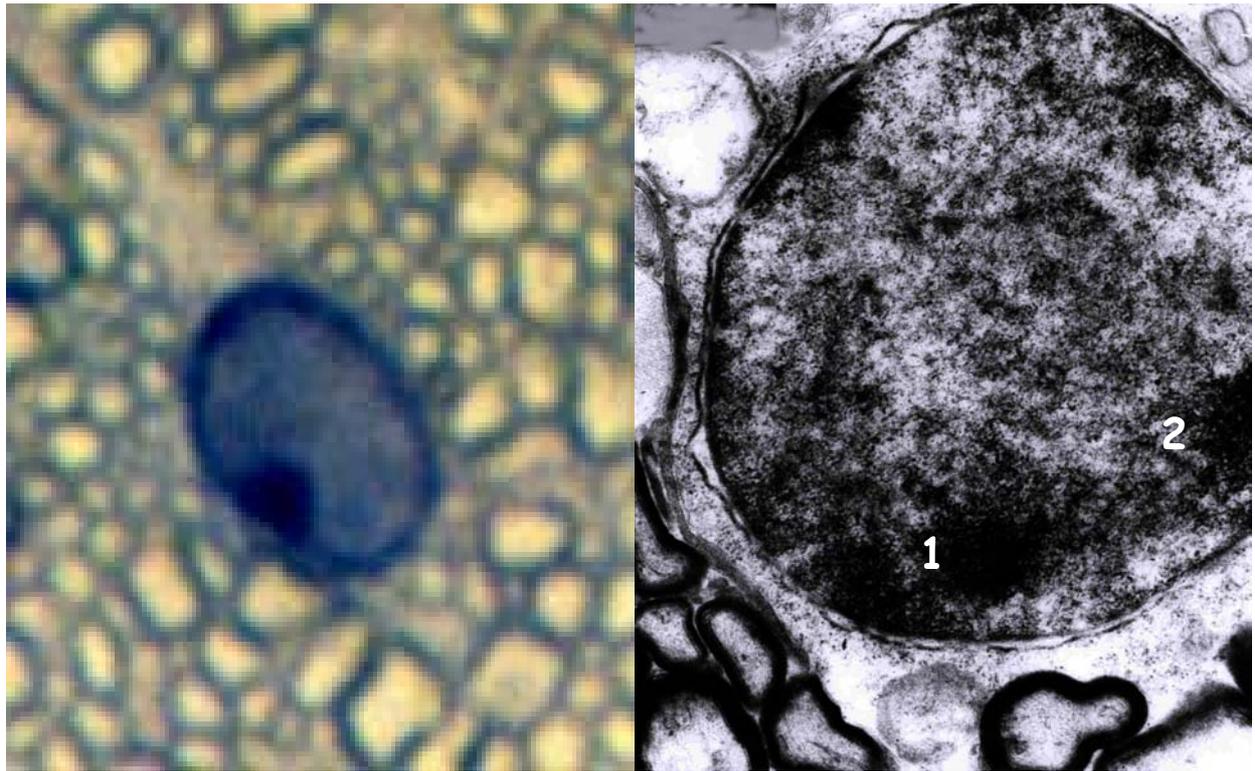


Fig. 47.- *Izquierda:* Detalle donde se aprecia un oligodendrocito rodeado por los axones mielinizados. Semifino ($1\ \mu\text{m}$) Tec.: Azul de Toluidina. Aumento: 100X. Grupo: Control. *Derecha:* Núcleo de un oligodendrocito con abundante cromatina nuclear dispersa y dos nucleolos (1 y 2). Ultrafino ($0.5\ \mu\text{m}$) Aumento: 25.000X Grupo: Control.

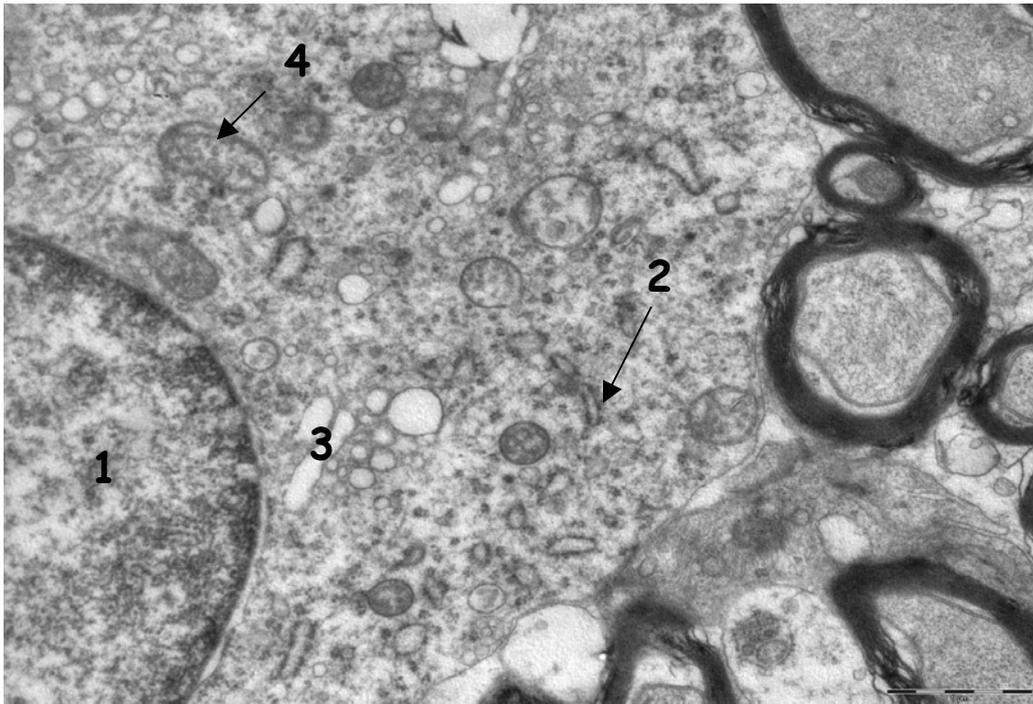


Fig. 48.- Detalle del citoplasma del oligodendrocito y sus organelas. Núcleo celular (1), el citoplasma de estas células es denso, rico en ribosomas (2), y en cisternas del retículo rugoso, un gran aparato de Golgi (3) y numerosas mitocondrias (4). Ultrafino (0,5 μm). Aumento: 100.000X Grupo: Control

AXONES Y VAINAS DE MIELINA.

La oligodendroglía es considerada el elemento responsable de la mielinización del NO. La membrana lipídica es una estructura estable compuesta por una capa lipídica bimolecular y por dos monocapas de proteínas.

La mielina es pues el resultado de la envoltura en espiral de una prolongación de una célula glial, el oligodendrocito en el SNC, que envía una prolongación citoplasmática que rodea al axón y se enrosca alrededor de él, con la ayuda de un brazo que está formado por el mesoaxón. Al plegarse las membranas dan lugar a la aparición de líneas más espesas visibles a microscopía electrónica.

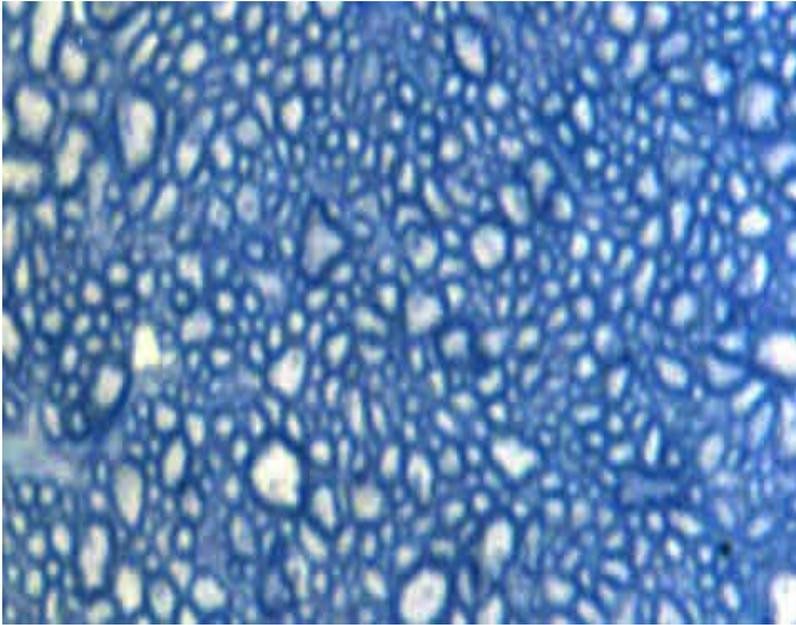


Fig. 49.-
Envoltura mielínica
alrededor de los axones
Semifino ($1\ \mu\text{m}$)
Tec.: Azul de Toluidina.
Aumento: 100X.
Grupo: Control.

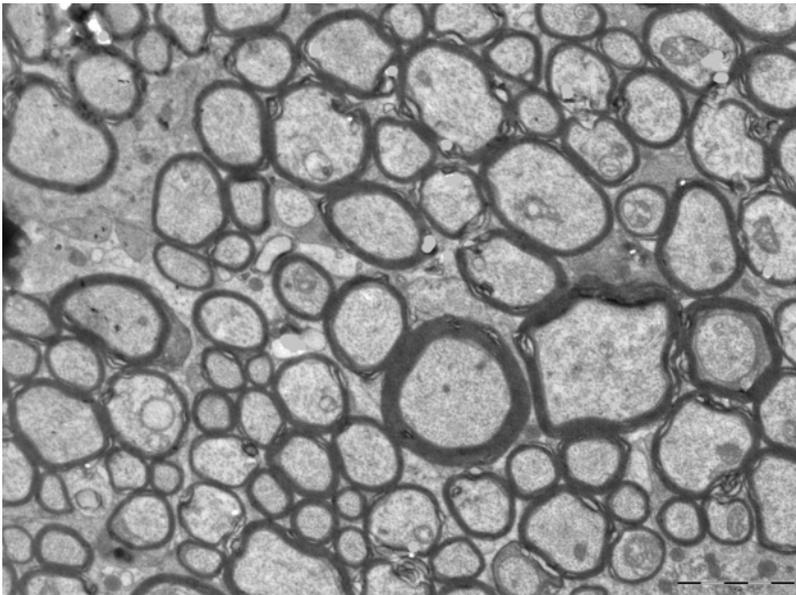


Fig. 50.-
Detalle bajo microscopía
electrónica de los axones
mielinizados.
Ultrafino ($0,5\ \mu\text{m}$) Aumento:
25.000X
Grupo: Control



Fig. 51. - Micrografía de un axón en su etapa inicial de mielinización (1). La vaina de mielina está constituida por un enrollamiento espiral multiestratificado (2) de la membrana de los oligodendrocitos. Las dos porciones de la membrana del Oligodendrocito, aplicadas una a otra, forman el mesaxón interno (3), que se extiende desde el espacio periaxónico a la capa más interna de la envoltura de mielina. Ultrafino (0,5 μ m) Aumento: 25.000X Grupo: Control.

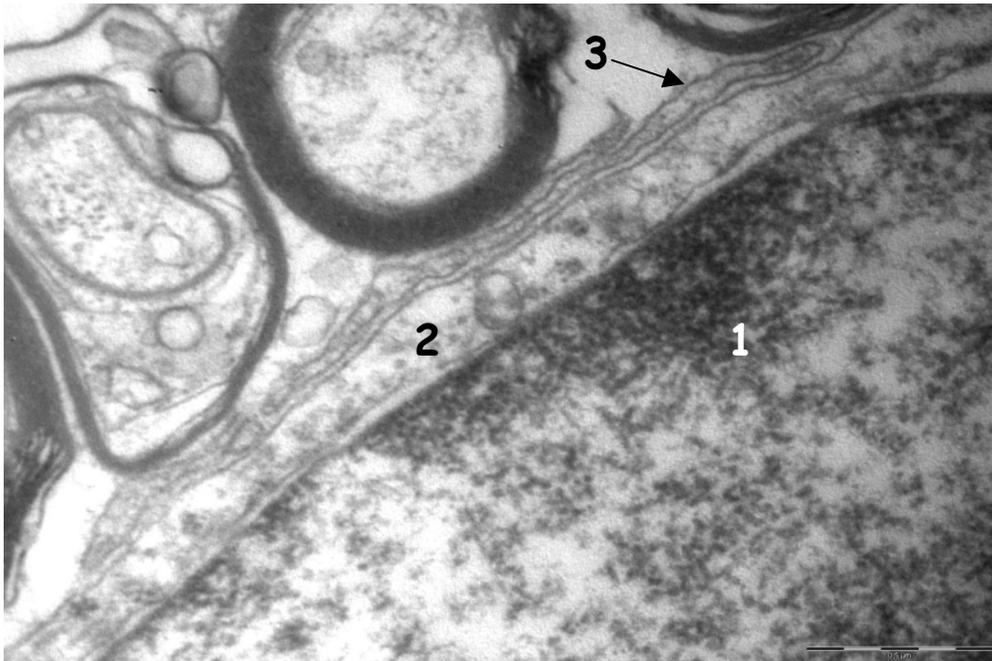


Fig. 52.- Oligodendrocito realizando sus proyecciones citoplasmáticas para mielinizar los axones próximos. Cromatina nuclear del oligodendrocito (1), citoplasma del oligodendrocito (2), prolongaciones citoplasmáticas (3). Ultrafino (0,5 μ m) Aumento: 25.000X Grupo: Control

Alteraciones morfológicas halladas en la vaina de mielina de los axones de los nervios ópticos.

Tal y como ha quedado explicado en el apartado de material y métodos hemos considerado como alteraciones de la vaina de mielina: la ruptura de esta, las vacualizaciones en su espesor o la mielinización alterada.

Existe un aumento significativo en cuanto a las alteraciones de la vaina de los axones en todos los grupos del estudio excepto en el grupo PTEN, siempre en comparación a los hallazgos detectados en el grupo control.

El número total de vainas de mielina alteradas en el grupo control fue de 29, lo que representa el 6.9% sobre el total de fibras contabilizadas. En el grupo ApoE, la cantidad de axones con alteraciones en su cubierta mielínica fue de 67, el 15.95%. En el grupo ApoE+D, 76, es decir, el 18.09%. En el grupo PTEN 47, el 11.18%. y por último en el grupo P27 fue de 126, el 30%. Todos los porcentajes quedan reflejados en la Gráfica 26.

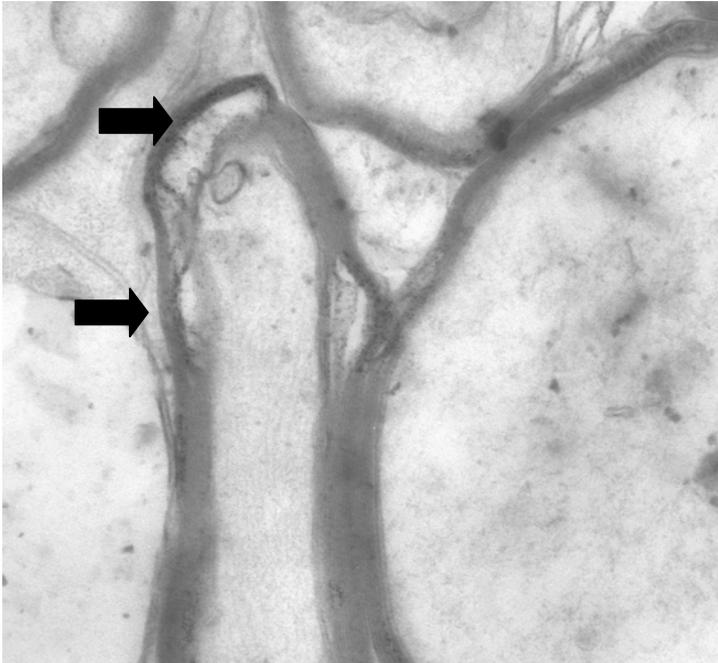


Fig.53.- Axón con degeneración de la capa de mielina y heterogeneidad en el grosor de la vaina (flechas).

Ultrafino (0,5 μ m)

Aumento: 30.000X.

Grupo ApoE+D.

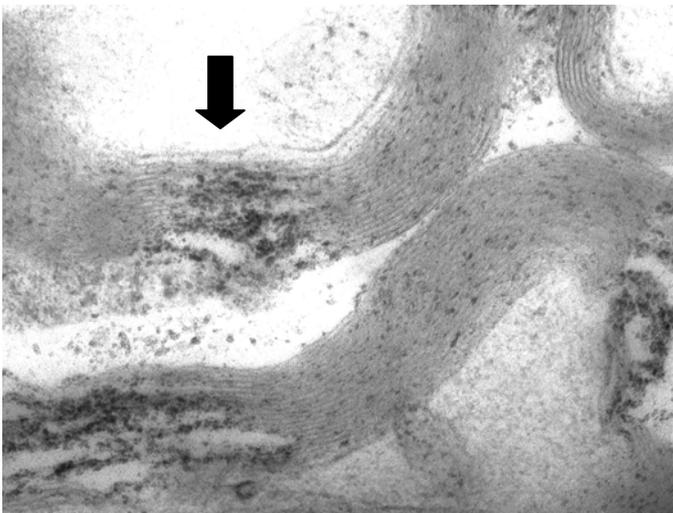


Fig.54.- Detalle en el que se muestra la presencia de roturas en la cubierta de mielina del axón (flecha).

Ultrafino (0,5 μ m)

Aumento: 40.000X.

Grupo ApoE.

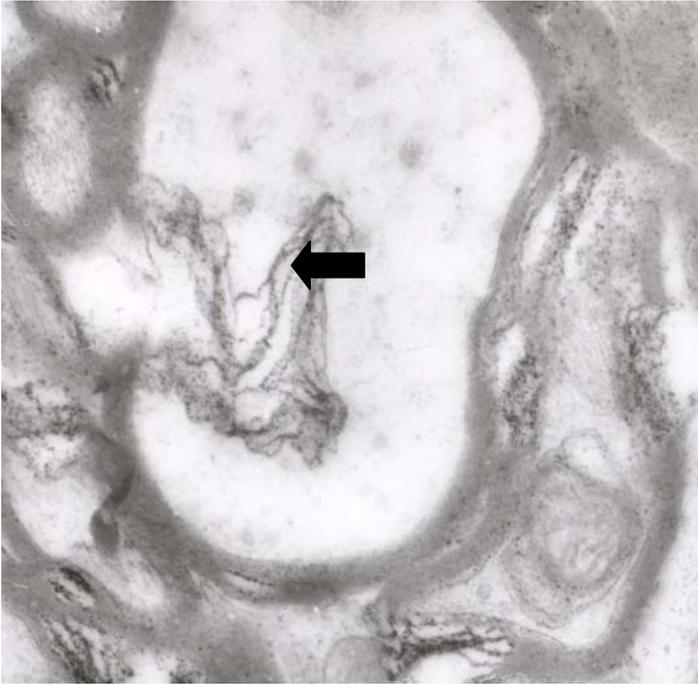


Fig.55.- Axón con degeneración del contenido intraxoplásmico e importante desorganización con laceración de las laminillas de mielina (flecha). (0,5 μ m)
Aumento: 15.500X.
Grupo P27.

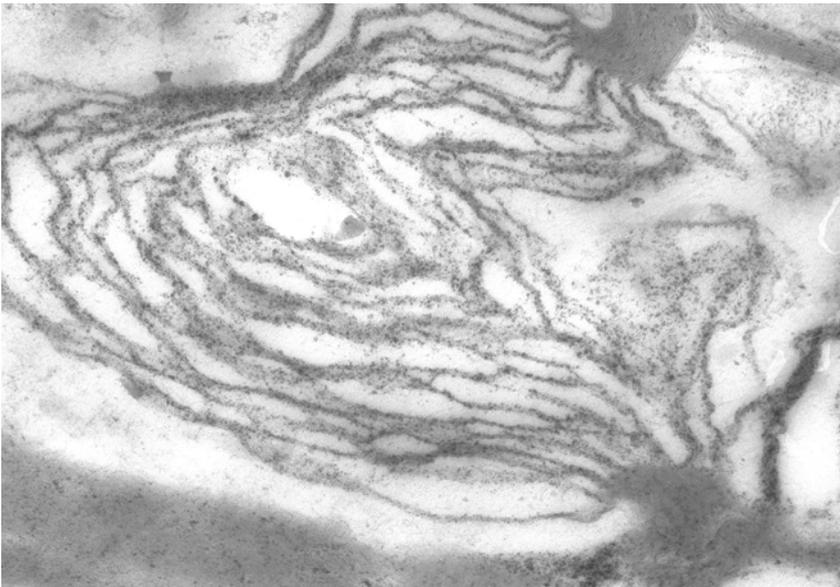


Fig.56.- Axón con degeneración del contenido intraxoplásmico e importante desorganización con laceración de las laminillas de mielina (0,5 μ m)
Aumento: 40.000X.
Grupo P27.



Fig.57.- Axón con una vaina degenerada (1). que ha sido recubierta por otra normal (2). (0,5 μ m)
Aumento: 28.500X.
Grupo P27.

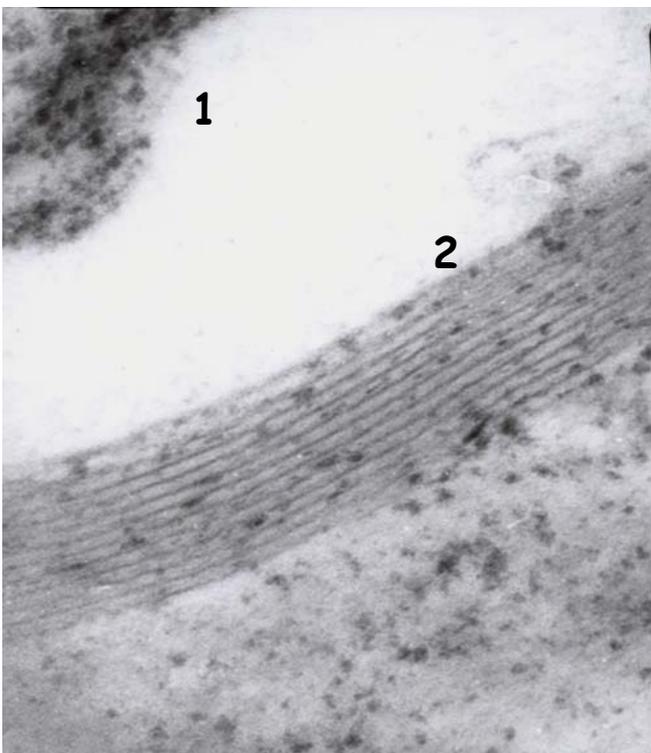


Fig.58.- Detalle de la vaina degenerada de la micrografía anterior (1) y su recubrimiento con la vaina no alterada, donde pueden apreciarse las laminillas de mielina perfectamente alienadas (2). (0,5 μ m)
Aumento: 105.000X.
Grupo P27.

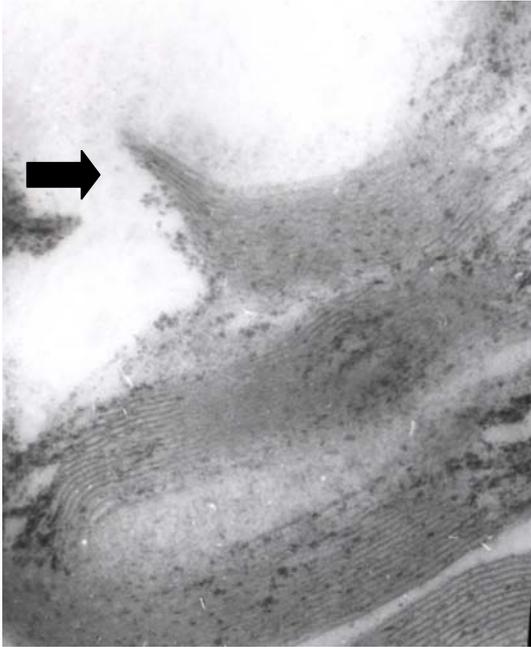


Fig.59.- Detalle de una cubierta mielínica bien organizada que al llegar a un punto (flecha), sufre una ruptura total.

(0,5 μ m)

Aumento: 52.000X.

Grupo ApoE+D.

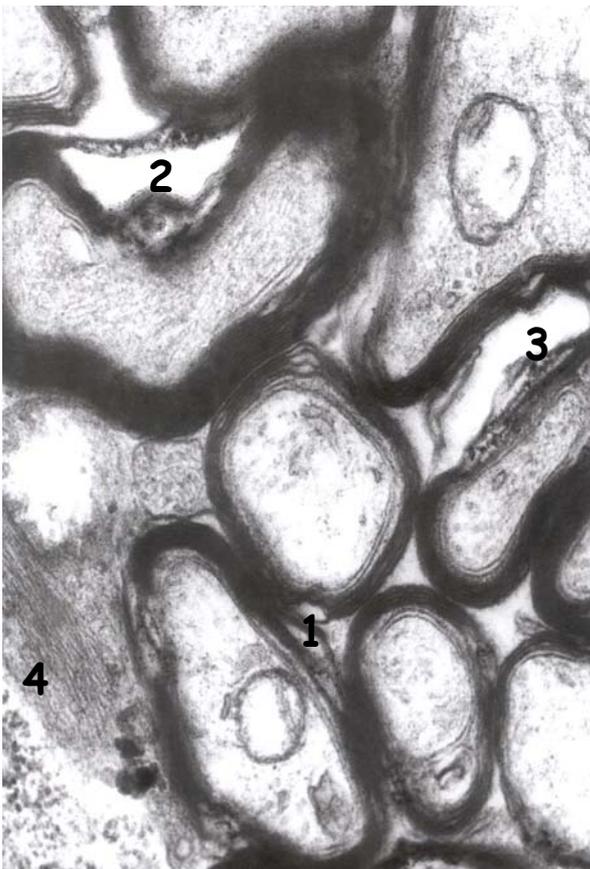


Fig.60- En este grupo de axones pueden apreciarse diversas alteraciones morfológicas en las vainas de mielina tales como vesiculaciones (1), desorganizaciones (2) y roturas (3). Se muestra también una zona de filamentos intermedios pertenecientes al citoesqueleto de un astrocito (4).

(0,5 μ m)

Aumento: 30.000X.

Grupo ApoE.

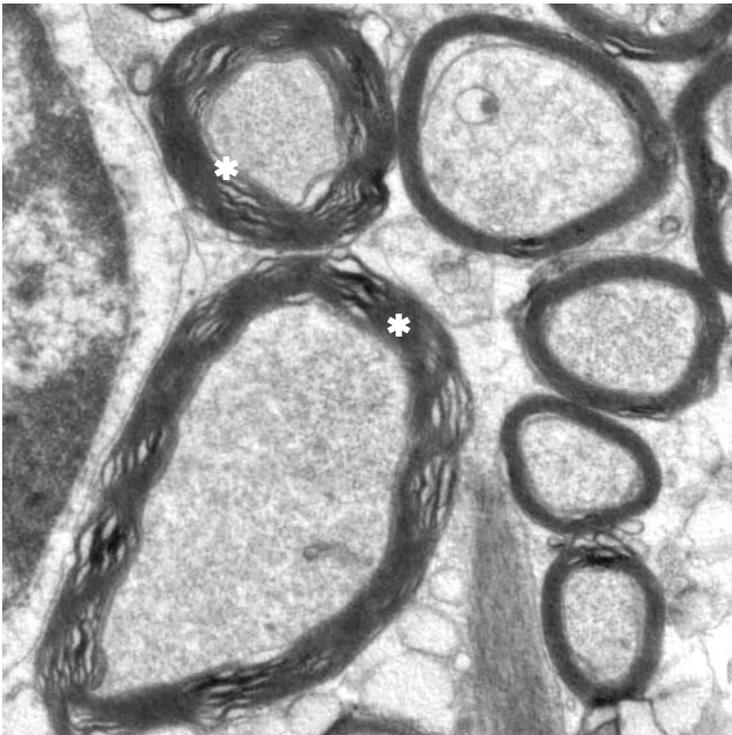
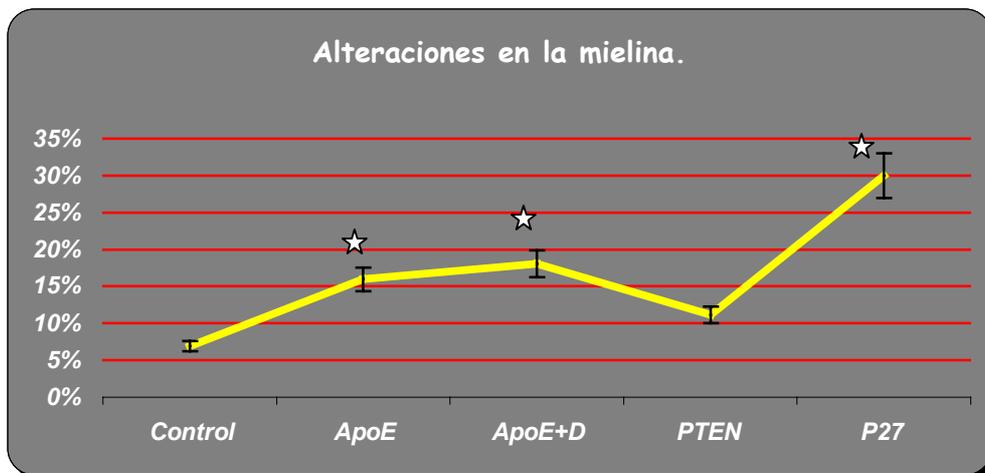


Fig. 61.- En el grupo PTEN, las alteraciones de la vaina de mielina más frecuentes fueron perfiles micrográficos compatibles con "desflecamientos (*)" de la mielina.
Ultrafino (0,5 μ m)
Aumento: 21.000X
Grupo PTEN.



Gráfica 26.- Representa el porcentaje de axones que muestran en su vaina de mielina alguna de las alteraciones que hemos comentado a lo largo de este apartado. Se expresa como porcentaje sobre el total de axones analizados para cada grupo.

Alteraciones morfológicas halladas en el interior de los axoplasmas.

Hemos considerado como alteraciones en el interior del axoplasma los perfiles micrográficos que mostraban imágenes sugerentes de la existencia de vacuolas en el interior del axón y que se muestran en el microscopio electrónico como espacios de baja densidad electrónica.

Existe un aumento significativo en cuanto a las alteraciones axoplásmicas en todos los grupos del estudio excepto en el grupo PTEN, siempre en comparación a los hallazgos detectados en el grupo control.

El número total de axoplasmas alterados en el grupo control fue de 34, lo que representa el 8.09% sobre el total de fibras contabilizadas. En el grupo ApoE, la cantidad de axones con alteraciones fue de 72, el 17.14%. En el grupo ApoE+D, 80, es decir, 19.04%. En el grupo PTEN 36, el 8.57%. y por último en el grupo P27 fue de 169, el 40.23%. Todos los porcentajes quedan reflejados en la Gráfica 27.



Fig. 62. - Axón que presenta un perfil compatible con un posible proceso de degeneración y vacuolización interna de su citoplasma (*).

Ultrafino (0,5 μm)

Aumento: 105.000X

Grupo ApoE+D.

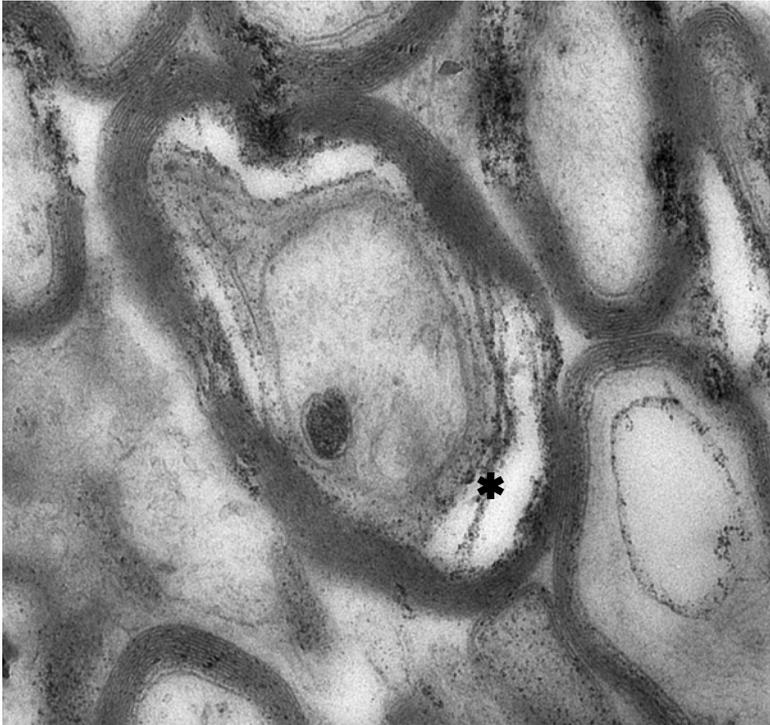


Fig. 63.- El axoplasma de este axón muestra señales de probable degeneración , que se manifiesta con la presencia de una zona vacía que prácticamente lo rodea completamente (*).
Ultrafino (0,5 μ m)
Aumento: 21.000X
Grupo ApoE+D.



Fig. 64.- (A) Micrografía de un axón que muestra un perfil morfológico sugerente de la existencia de un proceso de degeneración interna donde se aprecian vesículas membranosas en el interior del axoplasma (1), con presencia de vacuolas extraxoplásmicas (2) que retraen el axolema(3).
Ultrafinos (0,5 μ m)
Aumento: 40.000X
Grupo ApoE+D.

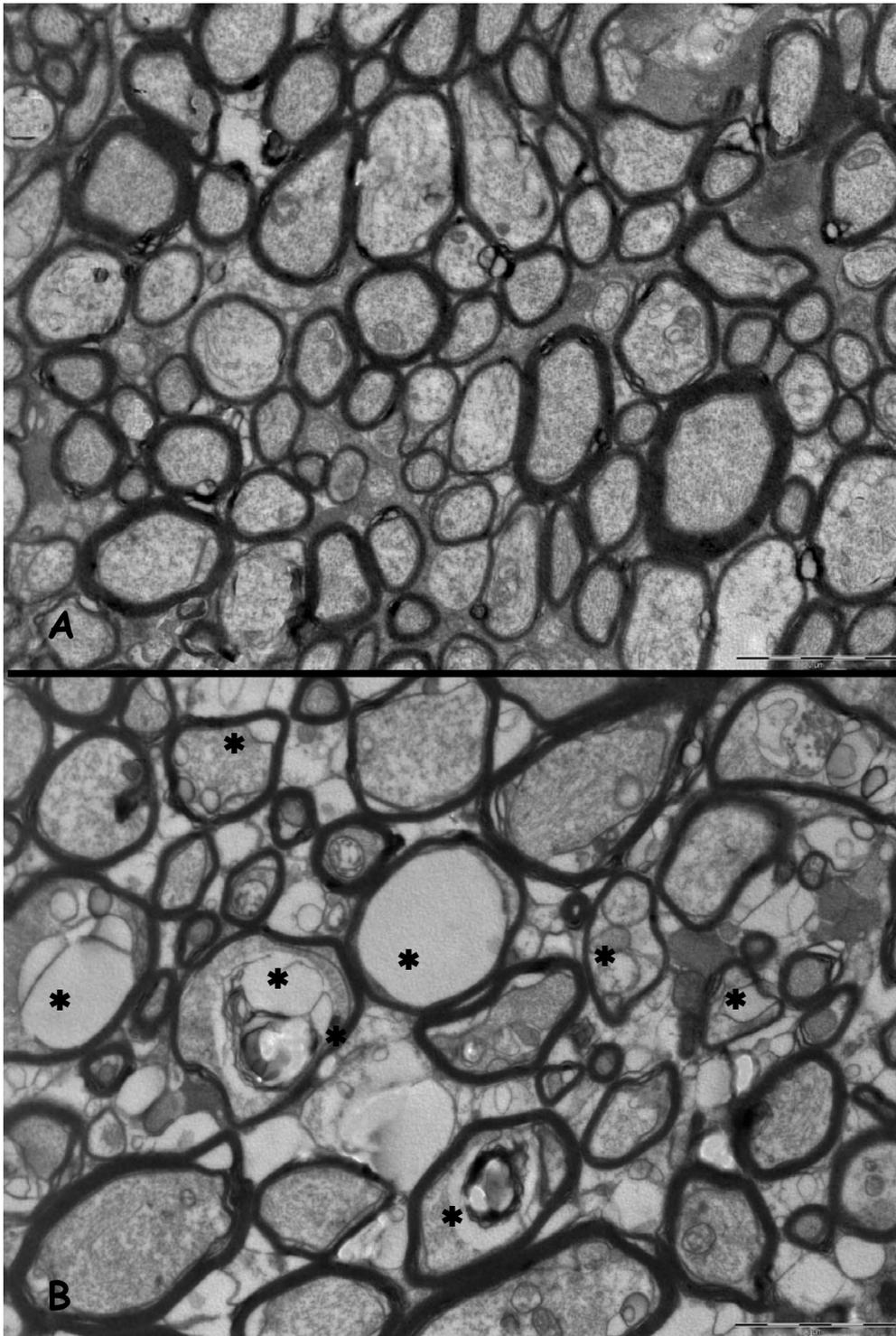
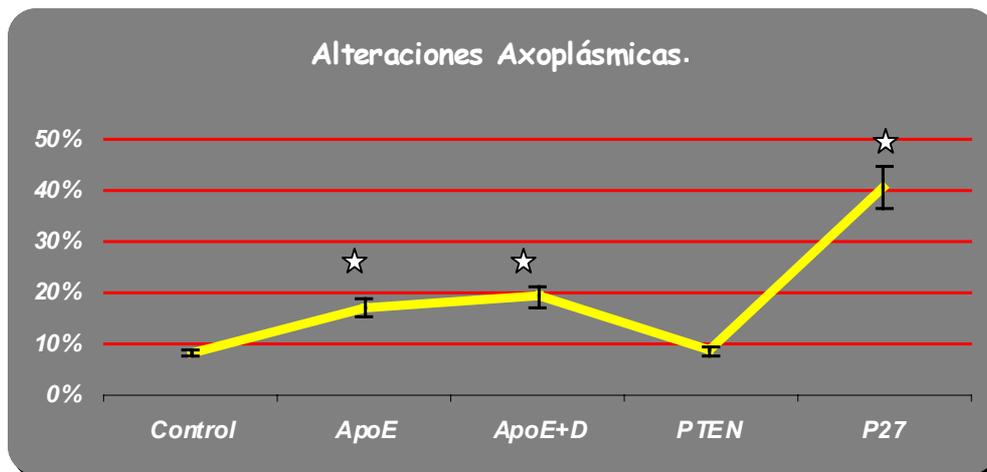


Fig. 65.- (A) Micrografía correspondiente al grupo Control donde pueden apreciarse los axones con una morfología homogénea y donde la existencia de vacuolas o vesículas intraxonales es prácticamente inexistente. Abajo (B), micrografía correspondiente al NO de un animal del grupo P27. Obsérvese la gran cantidad de axones con vesículas y espacios electrónicamente vacíos en su axoplasma (*). Ultrafinos (0,5 μ m)
Aumento: 12.000X



Gráfica 27.- Representa el porcentaje de axones que muestran en axoplasma alguna de las alteraciones que hemos comentado. Se expresa como porcentaje sobre el total de axones analizados para cada grupo.

Alteraciones morfológicas halladas en las células macrogliales.

Del estudio morfológico de las células macrogliales, bajo microscopía electrónica destacamos como hallazgo fundamental la existencia de una clara alteración de los núcleos celulares correspondientes mayoritariamente a los astrocitos del grupo de estudio P27. En ellos se aprecia un núcleo claro, con densidad electrónica baja, posible marcador de daño celular. Por otro lado también apreciamos condensación de la cromatina, dando lugar estas a "nucleosomas" que se posicionan alrededor de la membrana nuclear. Del mismo modo hemos hallado en el citoplasma de algunos astrocitos cuyo núcleo presentaba los signos anteriormente descritos, la presencia de zonas electrónicamente vacías, que se mostraban como espacios vacuolares.

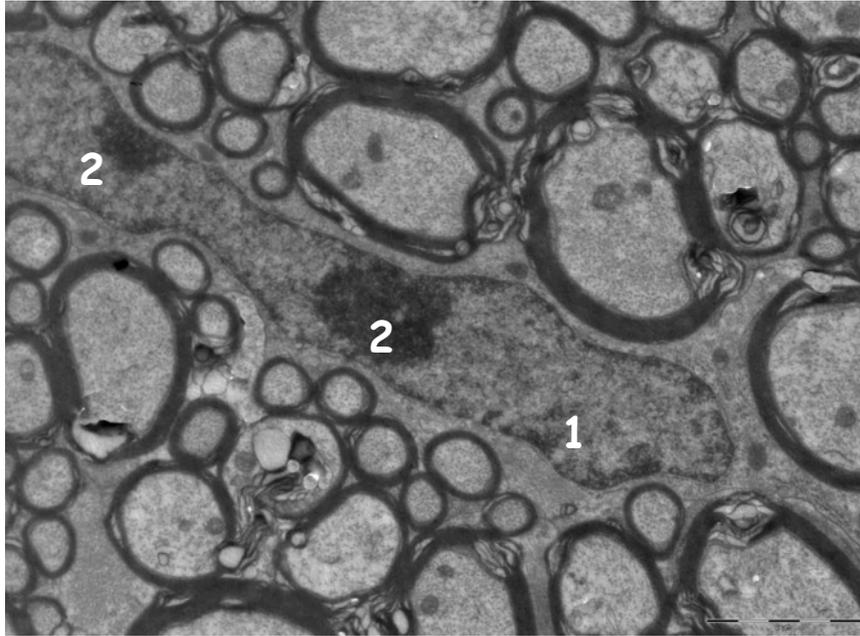


Fig. 66.- Micrografía que muestra la estructura de un núcleo de un astrocito de un animal del grupo control. Se muestra un núcleo alargado con escasa cromatina condensada (1) y dos nucleolos (2).

Ultrafino (0,5 μm). Aumento: 16.000X. Grupo: Control.

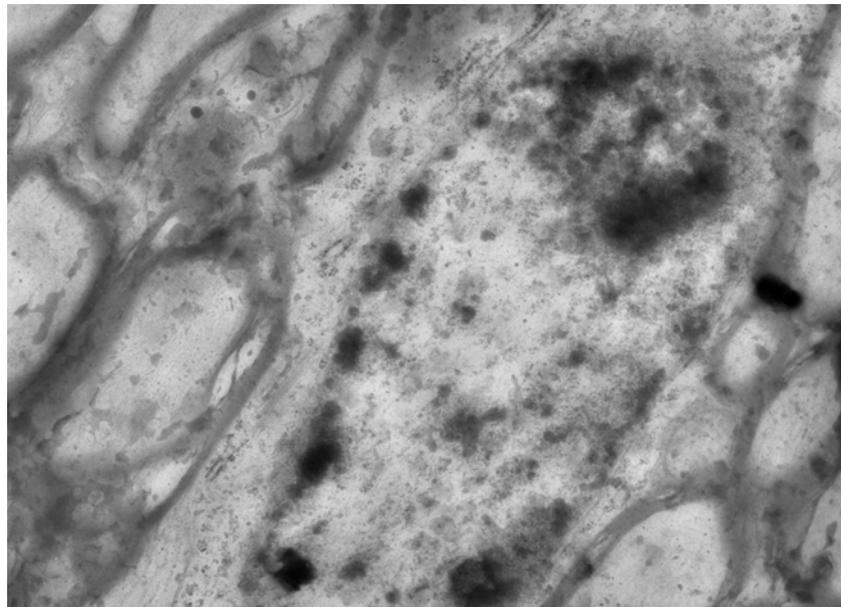


Fig. 67.- Micrografía de un astrocito del grupo P27: Núcleo claro, con densidad electrónica baja y condensación de la cromatina, dando lugar a "nucleosomas" (1) que se posicionan alrededor de la membrana nuclear. Ultrafino (0,5 μm). Aumento: 21.000X. Grupo: P27.

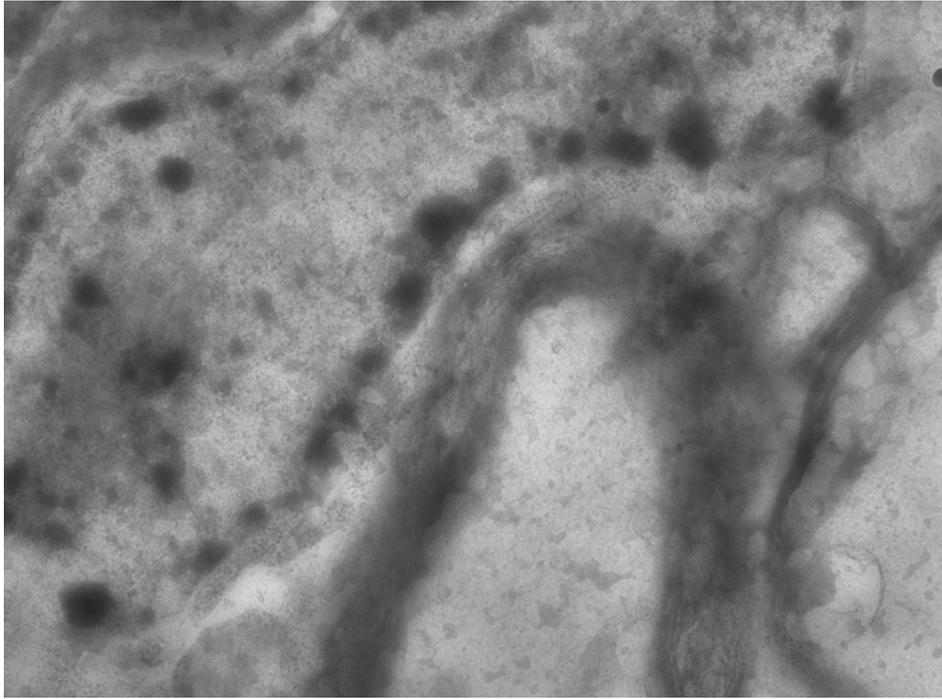


Fig. 68.- Micrografía de otro núcleo astrocitario con idénticas características a las mostradas en la Fig. 67.

Ultrafino (0,5 μm). Aumento: 21.000X. Grupo: P27.

Resultado del estudio morfológico de las retinas.

El examen con microscopía electrónica de las secciones seriadas trasversales del globo ocular nos ha permitido analizar las características de la esclerótica, coroides y retina de los ratones. En nuestro estudio nos hemos centrado en el estudio de la retina de los diferentes grupos.

En cada uno de los grupos hemos conseguido identificar todas las capas retinianas y los diferentes fenotipos celulares.

Mediante la utilización de la microscopía electrónica hemos valorado las características ultraestructurales de la capa de fotorreceptores, así como la de las células ganglionares y fibras del nervio óptico. También hemos analizado el epitelio pigmentario de la retina y la membrana de Bruch de los diferentes animales.

Las retinas de los ratones control.

LA MEMBRANA DE BRUCH.

La membrana de Bruch (MB) se sitúa entre la parte externa de la retina y el endotelio coriocapilar.

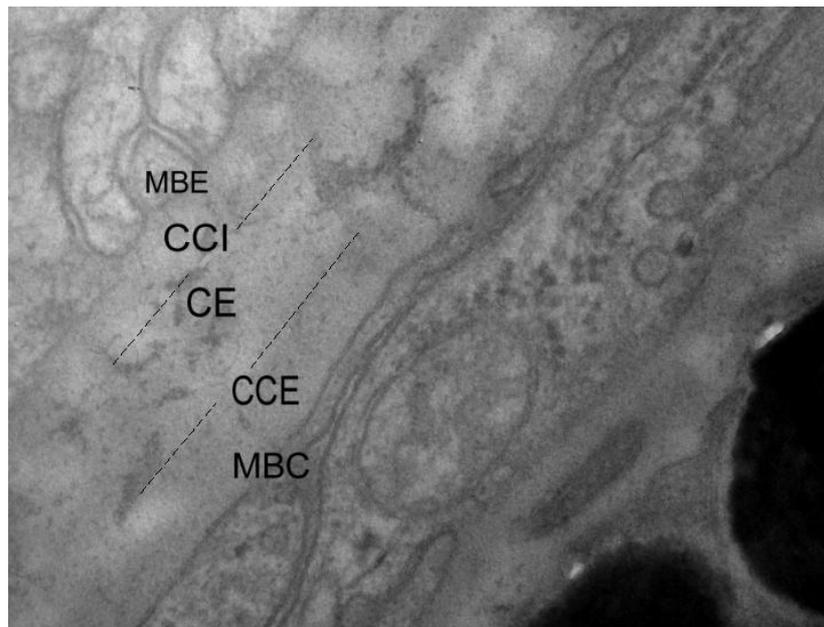


Fig.69- Micrografía electrónica de la Membrana de Bruch. Membrana Basal de la Coriocalpilar (MBC), Capa Colágena Externa (CCE). Capa Elástica (CE), Capa Colágena Interna (CCI) y Membrana Basal del Epitelio Pigmentario de la Retina (MBE). Ultrafino (0,5 μ m). Aumento: 100.000X Grupo: Control

Con la ayuda de la microscopía óptica es posible identificar 5 capas que conforman la membrana de Bruch.

La membrana basal de la coriocalpilar: Esta es la única capa discontinua de las cinco, estando ausente en las zonas en que la MB atraviesa zonas situadas entre los capilares de la coroides. Está compuesta fundamentalmente por fibras colágenas IV y VI.

La capa colágena externa: Se trata de una red de fibras colágenas embebidas en una matriz de mucopolisacáridos y que se orientan fundamentalmente en el mismo plano de la membrana.

La capa elástica: Sus fibras forman una capa continua aunque fenestrada. Esta compuesta por fibras de elastina que varían entre ellas en cuanto a tamaño y grosor.

La capa colágena interna: Es de todas, la capa más gruesa pero su composición es idéntica a la de la capa colágena externa.

La Membrana Basal del Epitelio Pigmentario de la Retina: Aunque de composición similar a la encontrada en la membrana basal de la coriocapilar, esta es continua. (192,193).

EL EPITELIO PIGMENTARIO DE LA RETINA.

El EPR es un epitelio monoestratificado con características secretoras (Fig.-70). Las células adquieren una morfología cuboidal en una perspectiva trasversal y hexagonal en una visión desde arriba. La estrecha unión de las porciones apicales de las células forman junto al endotelio coriocapilar, la barrera hemato-retiniana.

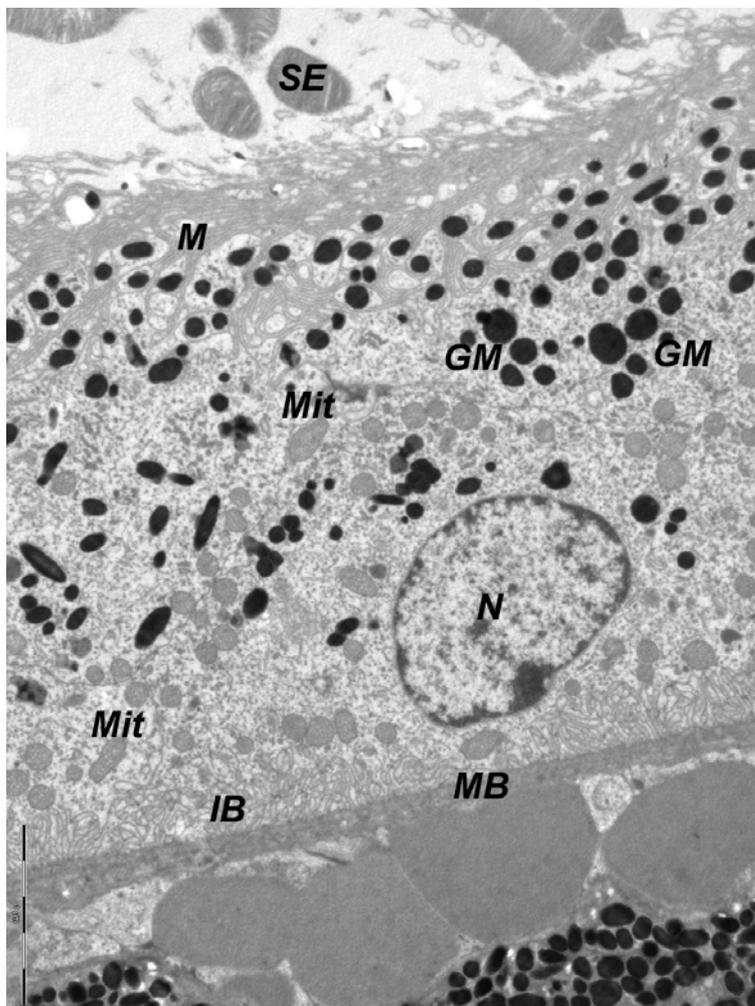


Fig. 70.- Micrografía electrónica del EPR de un ratón adulto perteneciente al grupo Control. Membrana de Bruch (MB), Invaginaciones Basales (IB), Mitocondrias (Mit), Núcleo (N), Gránulos de Melanina (GM), Microvellosidades (M), Segmentos Externos (SE). Ultrafino (0,5 μ m) Aumento: 6.000X Grupo: Control

La parte apical de las células del EPR posee múltiples microvellosidades que se prolongan verticalmente entre los segmentos externos de los fotorreceptores

hasta envolverlos parcialmente. También en la porción apical se concentran gran cantidad de gránulos de melanina.

La porción medial contiene los núcleos celulares así como algunas vesículas digestivas (lisosomas).

En la parte inferior se sitúan infinidad de invaginaciones membranas que aumentan la superficie de absorción y secreción (Fig. 71).

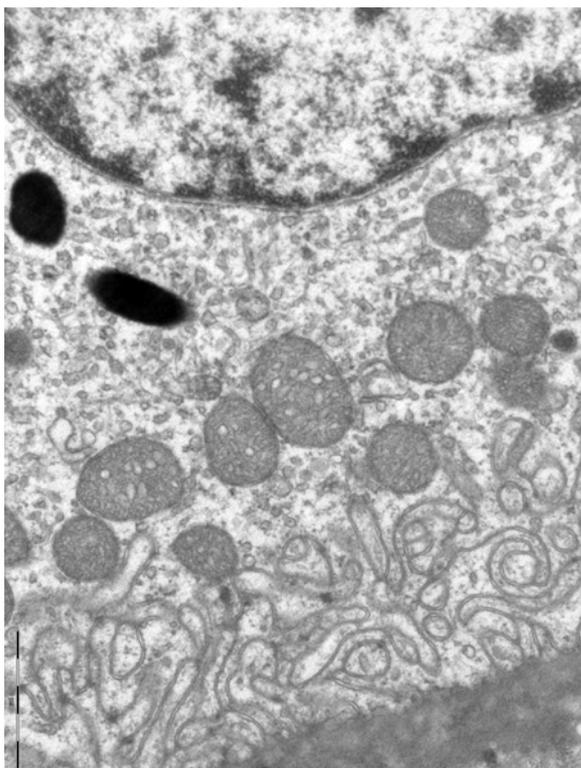


Fig. 71.- Detalle de la porción basal del EPR donde destacan la presencia de mitocondrias e invaginaciones membranas destinadas a aumentar la superficie de absorción-secreción Ultrafino (0,5 μ m) Aumento: 25.000X Grupo: Control

Una de las principales funciones realizadas por el epitelio pigmentario es la fagocitosis de los segmentos externos de los fotorreceptores. Esta labor se pone de manifiesto en el estudio morfológico de las retinas (Fig.72). Los fotorreceptores, continuamente expuestos a las radiaciones lumínicas, acaban siendo dañados y precisan ser regenerados. Así, cada uno de los fotorreceptores es fagocitado por el EPR al mismo tiempo que uno nuevo es sintetizado. Los restos fagocitados de los discos de los fotorreceptores son encapsulados en vesículas llamadas fagosomas.

Otros procesos en los que interviene de modo activo el EPR son: adaptación a la luz, transporte de iones y nutrientes, síntesis de enzimas y factores de crecimiento, ciclo de los "pigmentos visuales", actividad eléctrica de la retina y funciones de reparación.

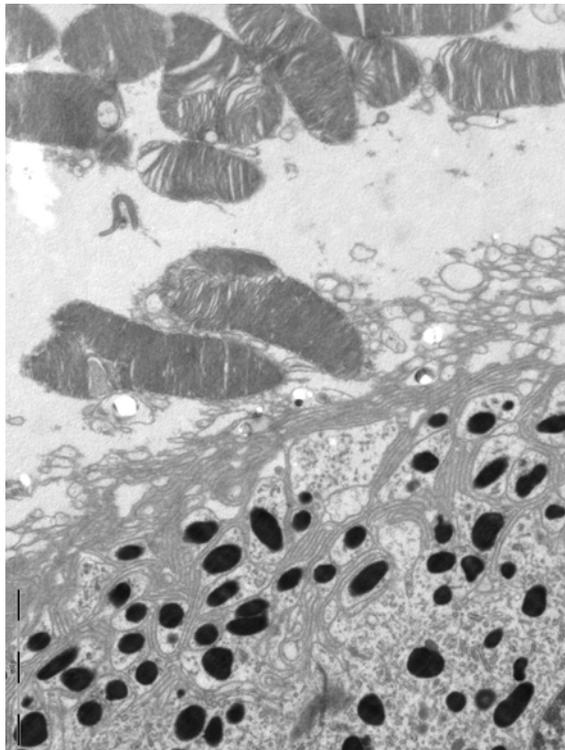


Fig. 72.- Detalle de la porción apical del EPR donde se produce la fagocitosis de los discos de los fotorreceptores. Se aprecian las microvellosidades envolviendo en este caso a dos discos. Ultrafino (0,5 μm) Aumento: 10.000X Grupo: Control

LOS FOTORRECEPTORES.

Los fotorreceptores son las células sensoriales que transforman la luz en energía eléctrica mediante procesos bioquímicos. La morfología de los segmentos externos de los fotorreceptores aparece como una empalizada, anclados al epitelio pigmentario por un lado y en la parte opuesta por la membrana limitante externa, que delimita la zona de los núcleos que ocupa la capa nuclear externa.

Los segmentos externos son la zona especialmente fotosensible de cada célula y contienen bien el pigmento rodopsina o iodopsina. Estos fotopigmentos se encuentran en unas estructuras denominadas laminillas o discos. Los discos están formados por un par de membranas paralelas que se unen y se continúan unas con otras en sus extremos y limitan una cavidad muy estrecha. Los discos se van

formando continuamente y añadiendo al extremo vítreo del segmento externo de la célula fotorreceptora. Los más antiguos se desplazan en dirección a la esclera hasta el epitelio pigmentario donde las células los fagocitan.

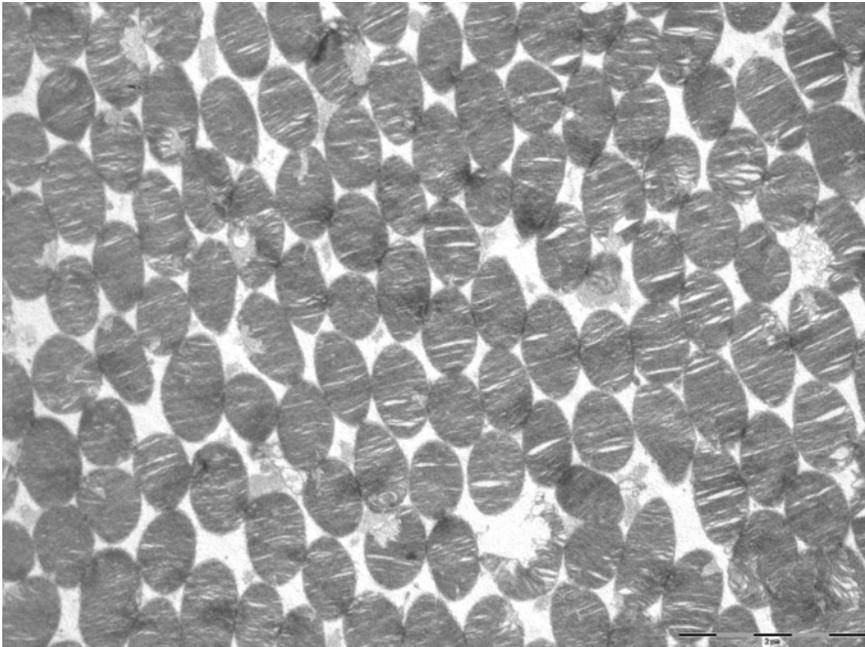


Fig. 73.-. Capa de los Segmentos externos de los fotorreceptores, conteniendo los discos. Ultrafino (0,5 μ m)
Aumento: 6.000X
Grupo: Control

Los segmentos internos de los fotorreceptores contienen las organelas para la producción de energía y la síntesis de proteínas. Presentan un gran número de mitocondrias de tamaño considerable.

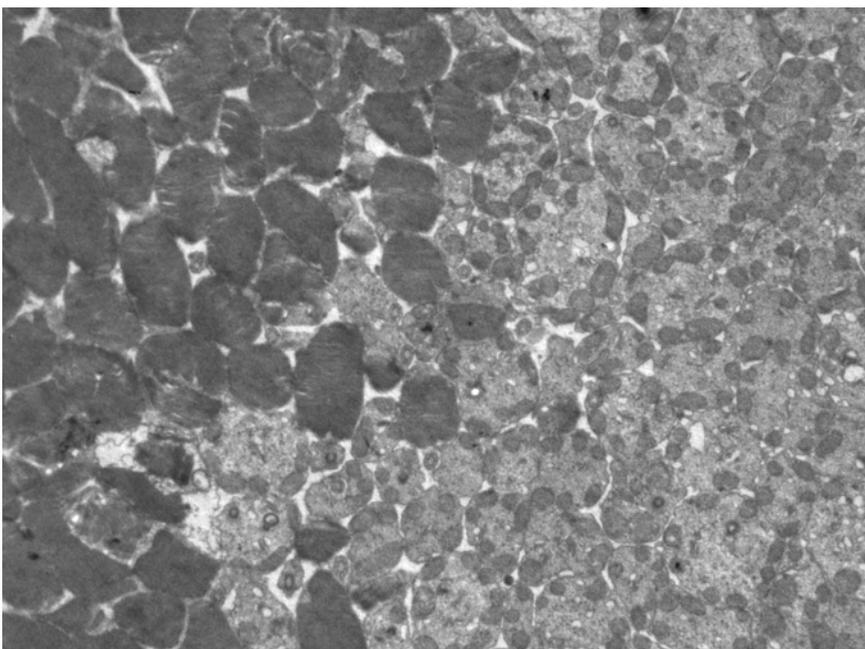


Fig. 74.-
Micrografía que muestra la zona de transición entre los segmentos externos e internos de los fotorreceptores.
Ultrafino (0,5 μ m)
Aumento: 6.000X
Grupo: Control

NUCLEAR EXTERNA.

La capa nuclear externa engloba a numerosos núcleos fotorreceptores, de tamaño medio y coloración oscura que se caracterizan por la presencia de acúmulos de cromatina condensada. La membrana limitante externa está formada por la condensación de citoplasmas de las células de Müller y forma una red alrededor de los fotorreceptores manteniéndolos en posición. (Fig.32)

NUCLEAR INTERNA

Esta capa contiene los cuerpos celulares de las células horizontales de conos y bastones y células amacrinas, ambos tipos configuran vías laterales que modifican y controlan el mensaje que aportan las vías directas (conos / bastones - células bipolares - células ganglionares). También contiene los cuerpos celulares de bipolares y células de Müller, estas últimas con funciones de soporte y sostén. (Fig. 33)

CELULAS GANGLIONARES Y FIBRAS OPTICAS.

En cuanto a la capa de células ganglionares y fibras del nervio óptico, hemos observado en el citoplasma de las células ganglionares, las organelas habituales (retículo endoplásmico rugoso, mitocondrias, neurofilamentos, aparato de Golgi yuxtannuclear y ribosomas). Sus axones contienen neurotúbulos y múltiples mitocondrias dispuestas en fila, son amielínicos, no tienen extensiones colaterales y abandonan la retina a través de la papila óptica para formar los axones del nervio óptico. Las células y también las fibras del nervio óptico están rodeadas por las prolongaciones de las células de Müller y por los astrocitos. El límite de la retina

con la superficie vítrea lo constituye la membrana limitante interna, una verdadera membrana basal en la que se engarzan las prolongaciones de la glía de Müller.

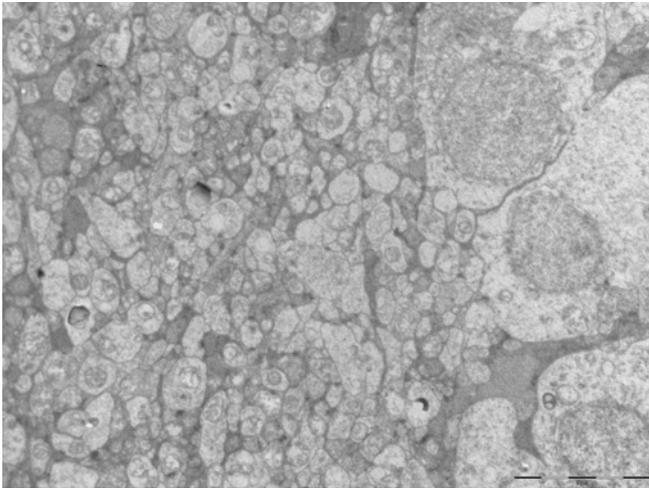


Fig. 75.-. Micrografía que muestra la zona de transición entre la capa plexiforme interna (izquierda) y ganglionar (derecha). Ultrafino (0,5 μ m) Aumento: 6.000X Grupo: Control

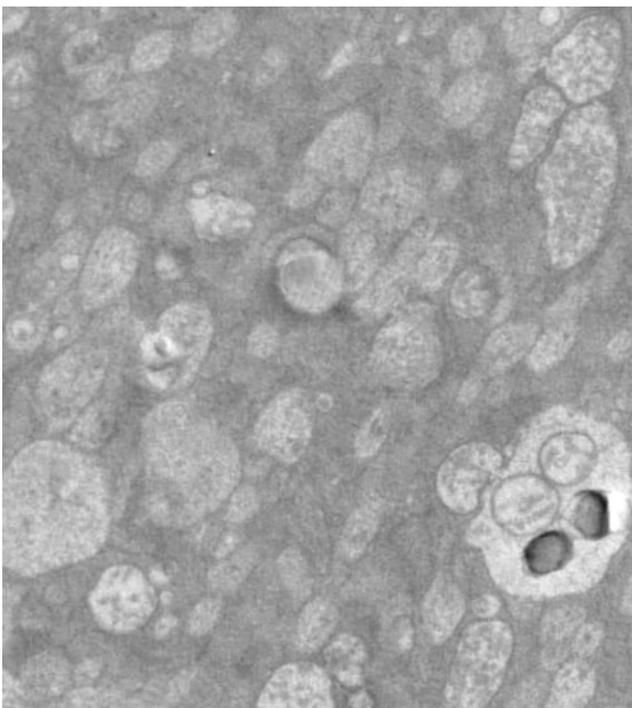


Fig. 76.-. Capa de fibras nerviosas, sus axones son amielínicos y abandonarán la retina a través de la papila para formar el nervio óptico. Ultrafino (0,5 μ m) Aumento: 10.000X Grupo: Control

En el examen bajo microscopía electrónica, hemos hallado diferencias morfológicas relevantes en las siguientes estructuras retinianas de los diferentes grupos de estudio.

Las retinas de los ratones de los grupos ApoE y ApoE +D.

MEMBRANA DE BRUCH.

Los hallazgos ultraestructurales presentes en la MB de los dos grupos ApoE *Knockout* se hallan representados en la micrografía Fig. 77.- El análisis ultraestructural reveló dos tipos de cambios vacuolares. Por un lado detectamos la presencia de partículas electrolúcidas situadas entre ambas capas colágenas de la MB. Además de estas, hallamos la existencia de vacuolas que presentaban envolturas compatibles con perfiles de estructuras membranosas, de mayor tamaño y también situadas entre ambas capas colágenas.

Las "vacuolas no rodeadas por membranas", fueron halladas en nuestro caso solamente en 2 de los siete animales control, y estuvieron presentes en 5 animales del grupo ApoE y en los 7 del grupo ApoE+D.

Las "vacuolas rodeadas por membranas", no fueron halladas en ninguno de los ratones control, pero sí se detectaron en los 7 animales de los grupos ApoE y ApoE+D.

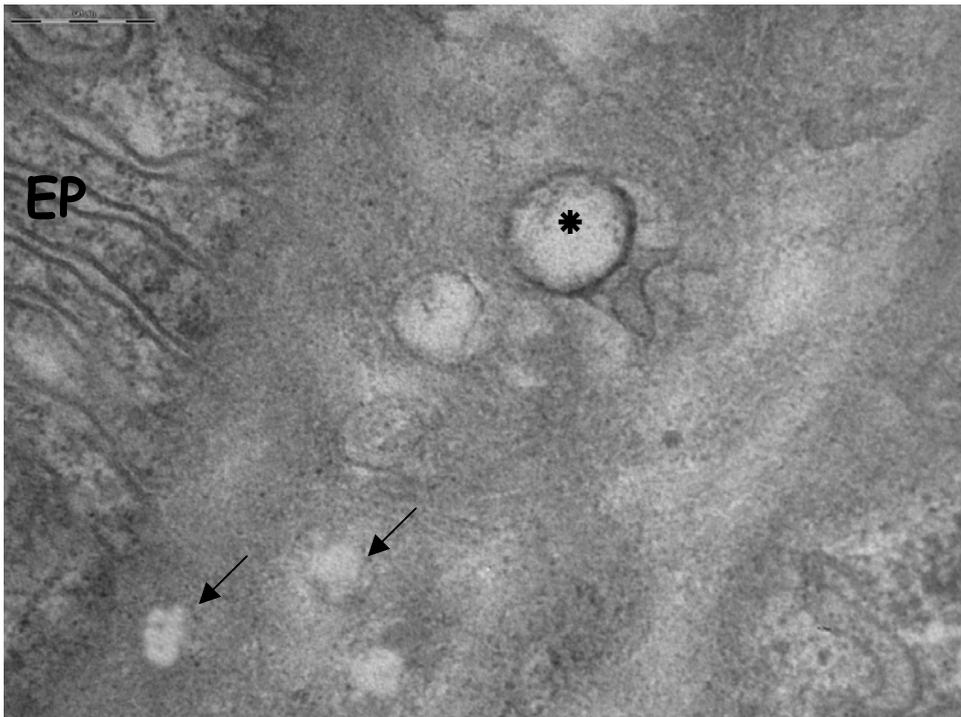


Fig. 77.- Vesícula rodeada por una membrana (*) y vesículas no rodeadas por membranas (flechas), EPR: epitelio pigmentario de la retina. Ultrafino (0,5 μ m) Aumento: 100.000X Grupo: ApoE+D

EPITELIO PIGMENTARIO DE LA RETINA.

Hemos documentado en el estudio morfológico de las micrografías del EPR de los grupos ApoE y ApoE+D la desaparición del patrón de polarización apical de los gránulos de pigmento de melanina presente en el grupo control. Hemos detectado en estos grupos la distribución de la mayoría de los gránulos de melanina a lo largo de todo el citoplasma y posicionándose incluso por debajo de los núcleos celulares y próximos a la MB. No hemos hallado una diferencia sustancial en cuanto a la distribución de estos gránulos entre los grupos ApoE y ApoE+D.

Por otro lado, hemos comprobado como en los animales de los grupos ApoE y ApoE+D, y en comparación al grupo control, los gránulos de melanina eran aparentemente menos numerosos pero de mayor volumen, hallazgo este que se presentó en los siete animales estudiados de cada uno de los dos grupos y en cada

una de las secciones ultrafinas estudiadas. Tampoco en este punto hemos hallado una diferencia sustancial entre los grupos ApoE y ApoE+D.

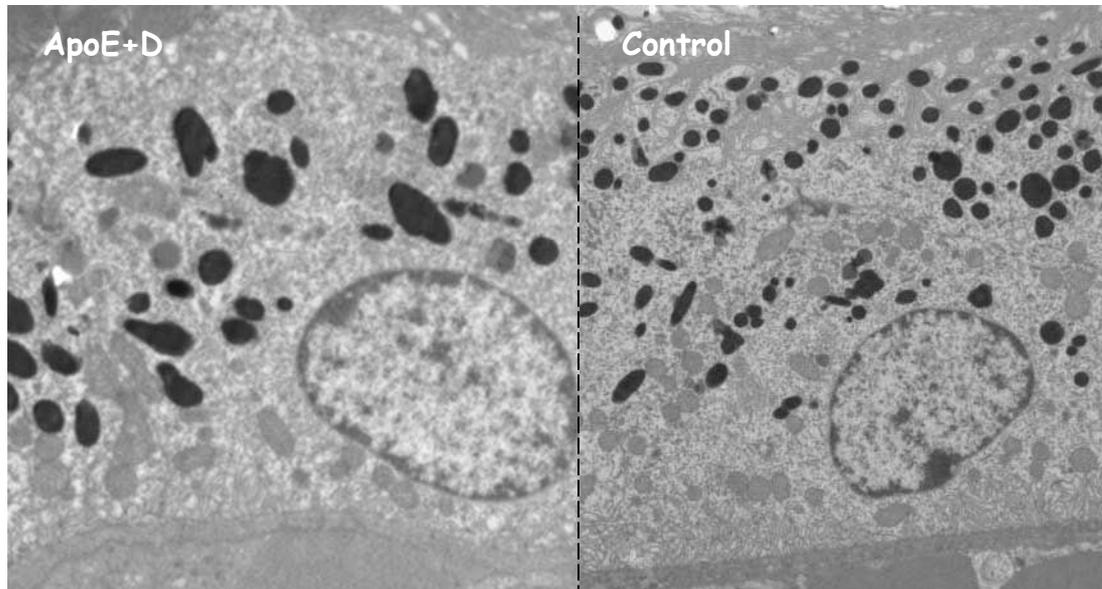


Fig. 78.-. A la izquierda, micrografía del EPR de un animal del grupo ApoE+D, a la derecha, el EPR corresponde a un animal del grupo Control. Obsérvese la distribución apical de los pigmentos de melanina en la micrografía de la derecha, mientras estos se distribuyen a lo largo del citoplasma y acercándose a la MB en la micrografía de la izquierda (ApoE+D) Ultrafino (0,5 μ m) Aumento: 6.000X Grupo: ApoE+D y Control.

CAPA DE CELULAS GANGLIONARES.

A nivel de la capa ganglionar, encontramos perfiles micrográficos compatibles con alteraciones citoplasmáticas de las células ganglionares, que se ponen de manifiesto por la presencia de vacuolizaciones internas con alteraciones y rupturas de las mitocondrias.

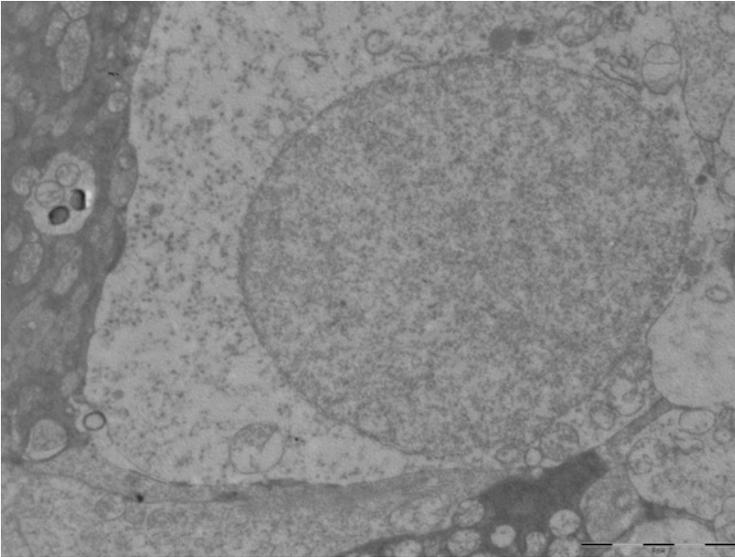


Fig. 79.-. Micrografía que muestra una célula ganglionar dañada en su citoplasma y con alteraciones mitocondriales.

Ultrafino (0,5 μm)

Aumento: 10.000X

Grupo: ApoE+D.

Las retinas de los ratones PTEN.

A pesar de las diferencias morfométricas señaladas en apartados anteriores, a nivel morfológico únicamente cabe destacar diferencias reseñables en la capa más externa de la retina, es decir, en el EPR y MB.

EPITELIO PIGMENTARIO DE LA RETINA.

Como en el caso de los ratones del grupo ApoE y ApoE+D, hemos detectado en este grupo, una pérdida de la polaridad apical de los gránulos de pigmento de melanina, mostrándose estos dispersos en el citoplasma.

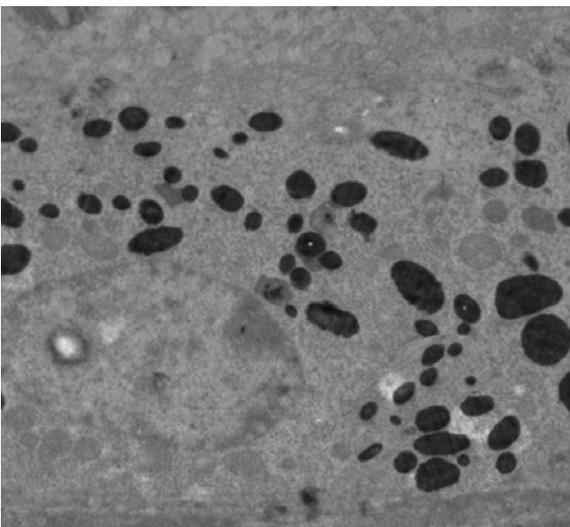


Fig 80.-. Micrografía que muestra la pérdida de la polaridad apical de los gránulos de pigmento del EPR.

Ultrafino (0,5 μm) Aumento:

6.000X Grupo: ApoE+D.

MEMBRANA DE BRUCH.

Los ratones del grupo PTEN presentaban a nivel de la MB irregularidades en su grosor aunque con un aumento generalizado de este, según describimos en el apartado de morfometría.

Destacamos también la abundante presencia de espacios electrónicamente poco densos, dispersos por la MB y que se corresponderían con las "vacuolas no membranosas", que describimos anteriormente en los grupos ApoE y ApoE+D.

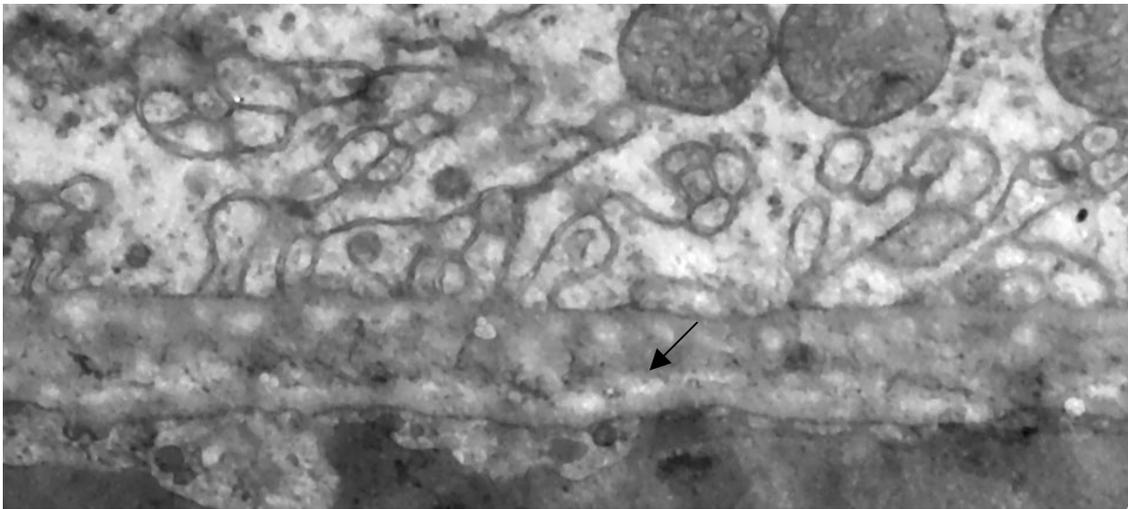


Fig. 81. - Espacios electrónicamente poco densos distribuidos a lo largo de la MB de este animal PTEN (flecha) y cuyos perfiles micrográficos son idénticos a los que definíamos como "Vesículas no rodeadas por membranas" de los grupos ApoE y ApoE+D. Ultrafino (0,5 μm) Aumento: 60.000X Grupo: ApoE+D.

Las retinas de los ratones del grupo P27.

Las retinas de los ratones P27 muestran bajo microscopía electrónica profundas alteraciones morfológicas a lo largo de todo su espesor.

MEMBRANA DE BRUCH.

Hemos detectado la presencia de numerosas vacuolas en el interior de la MB, así como la existencia de irregularidades en su grosor y rupturas puntuales que afectaban a la totalidad del espesor de dicha estructura.

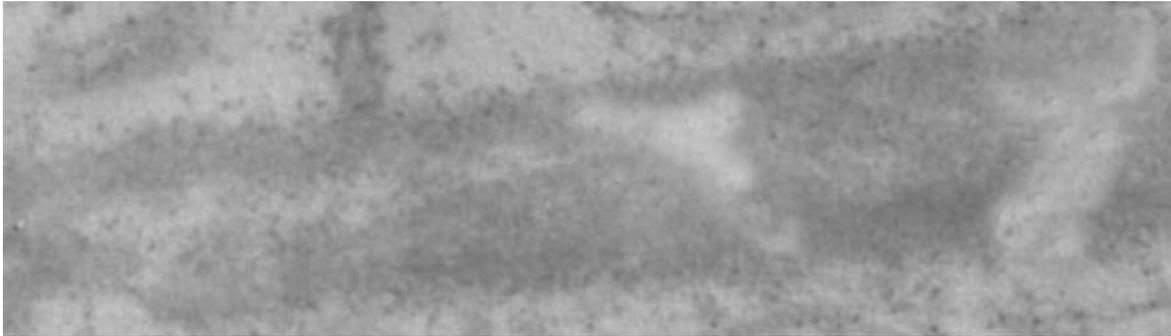


Fig. 82.-Detalle de la MB donde se muestran espacios electrónicamente vacíos, compatibles con rupturas totales de su espesor . Ultrafino (0,5 μm) Aumento: 100.000X Grupo: P27

EPITELIO PIGMENTARIO DE LA RETINA.

Esta estructura muestra importantes espacios vacíos en el citoplasma de las células epiteliales con graves cambios en sus mitocondrias. Por su parte, los núcleos celulares, aunque conservando al menos parcialmente la membrana nuclear, presentan alteraciones en su cromatina.

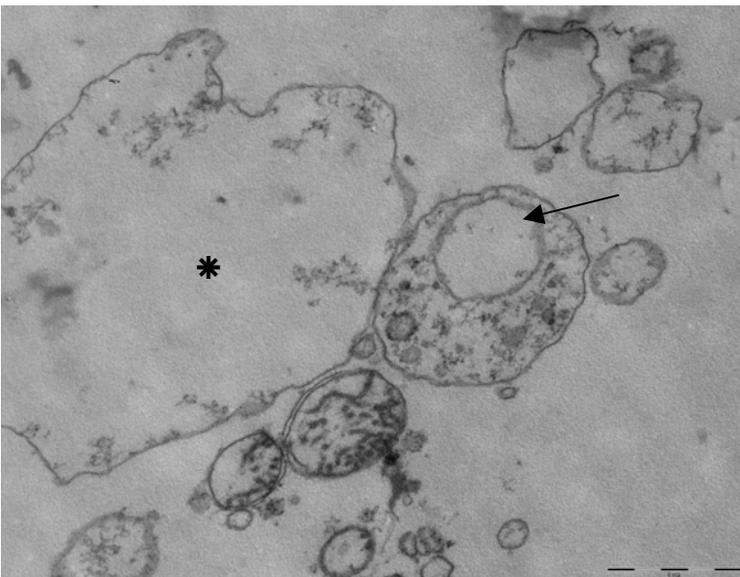


Fig. 83.-

EPR marcadamente dañado con alteración mitocondrial (flecha) y núcleo celular vacío de material genético (*). Ultrafino (0,5 μm) Aumento: 25.000X Grupo: P27

En otros casos detectamos cambios a nivel nuclear por condensación de la cromatina, dando lugar estas condensaciones a "nucleosomas" que se posicionan alrededor de la membrana nuclear. Alteraciones estas semejantes a las descritas en los procesos de apoptosis celular.

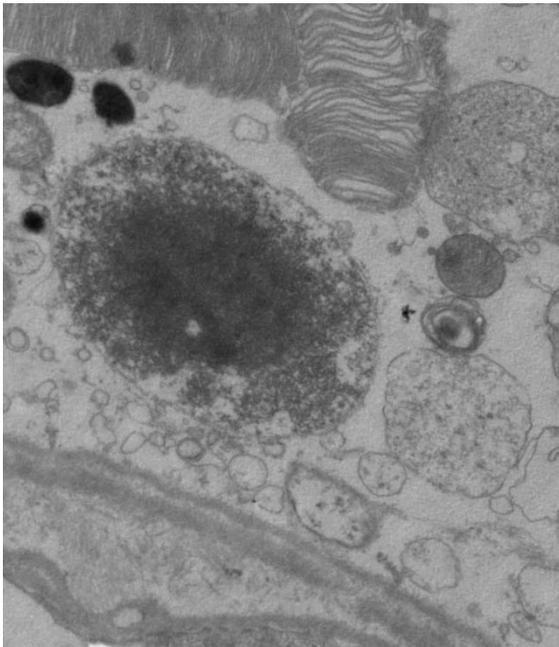


Fig. 84.- Micrografía de un núcleo celular del EPR de un animal P27, mostrándose la fase inicial del proceso de condensación de la cromatina nuclear formando "nucleosomas". Ultrafino (0,5 μ m). Aumento: 10.000X. Grupo: P27

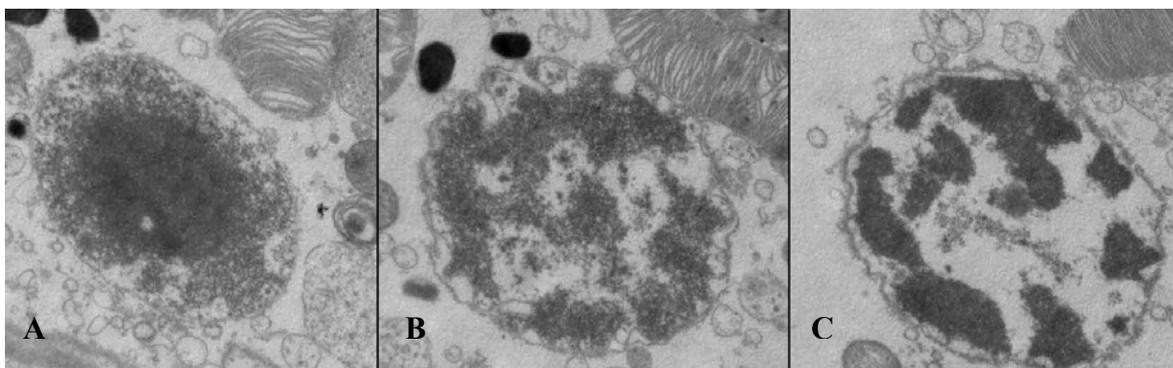


Fig. 85.-A: Estadio incipiente del proceso de apoptosis con inicio de la condensación de la cromatina del núcleo de una célula del EPR B: Estadio intermedio del proceso. C: condensación total de la cromatina en nucleosomas, al borde de la fragmentación celular. Ultrafino (0,5 μ m). Aumento: 10.000X. Grupo: P27.

CAPA DE LOS SEGMENTOS DE LOS FOTORRECEPTORES.

Morfológicamente destaca la presencia de una importante alteración de los discos de los fotorreceptores representada por la existencia de vacuolas en su interior.

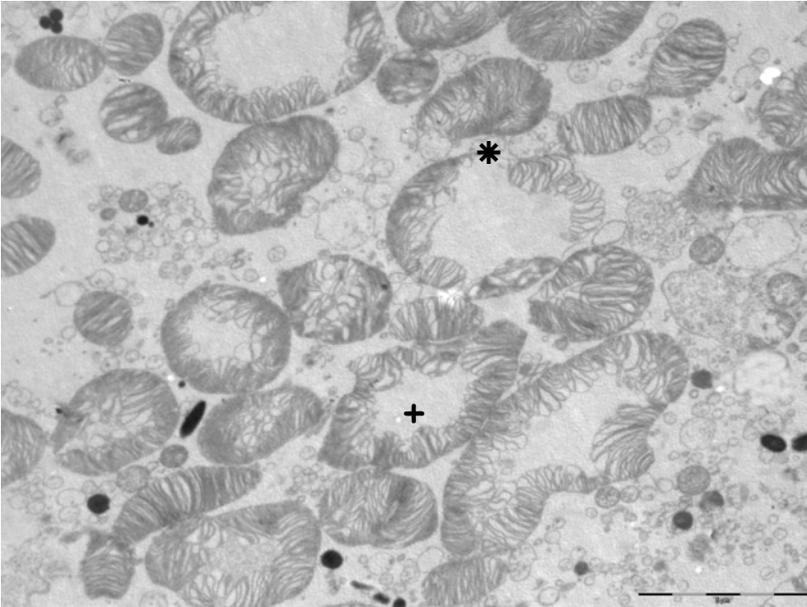


Fig. 86.-
Segmentos externos
de los fotorreceptores
con rupturas (*) y
vacuolización interna
(+). Ultrafino (0,5 μ m)
Aumento: 6.000X
Grupo: P27

CAPAS NUCLEARES EXTERNA E INTERNA.

Aunque al compararlas con el resto de las capas estudiadas en este modelo, parecen las menos alteradas, en un estudio más minucioso y detallado podemos detectar también en ellas espacios vacíos y una evidente disminución de la densidad celular en comparación al grupo control (Fig 87). En algunos casos hemos observado núcleos celulares con condensaciones de la cromatina a modo de nucleosomas (Fig 88).

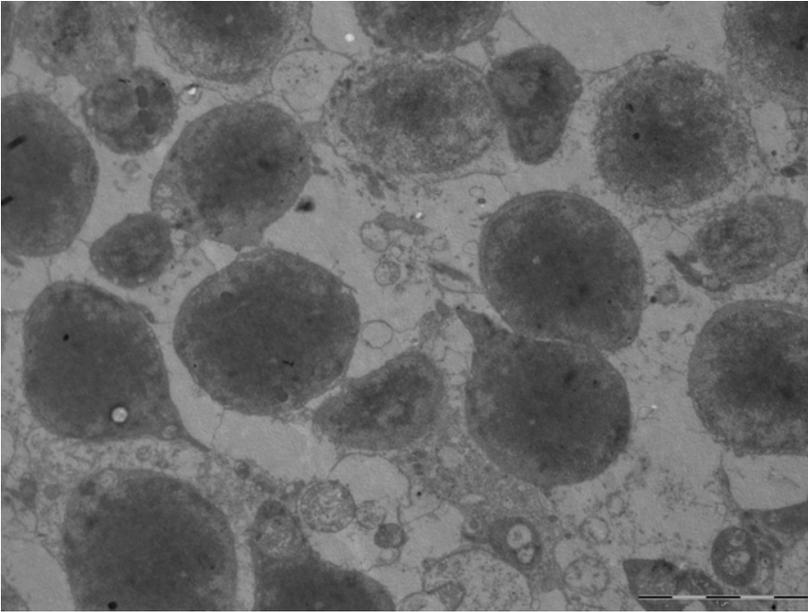


Fig 87.-
Nuclear externa con
disminución de la
densidad celular,
espacios vacuolares y
algún núcleo que
presenta tendencia
hacia la condensación
de la cromatina.
Ultrafino (0,5 μ m)
Aumento: 6.000X
Grupo: P27

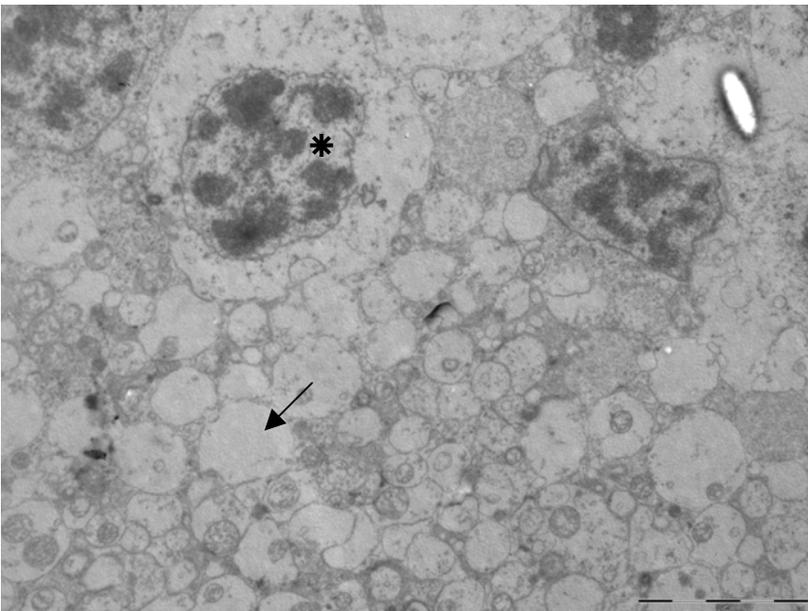


Fig 88.-
Nuclear interna
con signos de
condensación de
la cromatina (*) y
vacuolización de
la plexiforme
(flecha) (0,5 μ m)
Aumento: 6.000X
Grupo: P27

CAPA DE CELULAS GANGLIONARES Y FIBRAS ÓPTICAS.

Dada la consistencia histológica de las retinas de estos animales, hemos encontrado serias dificultades a la hora de obtener muestras en buen estado para su estudio, en

los casos en los que se consiguió con éxito hallamos también células ganglionares y fibras con perfiles micrográficos de daño celular (vacuolización, alteraciones nucleares y roturas celulares).

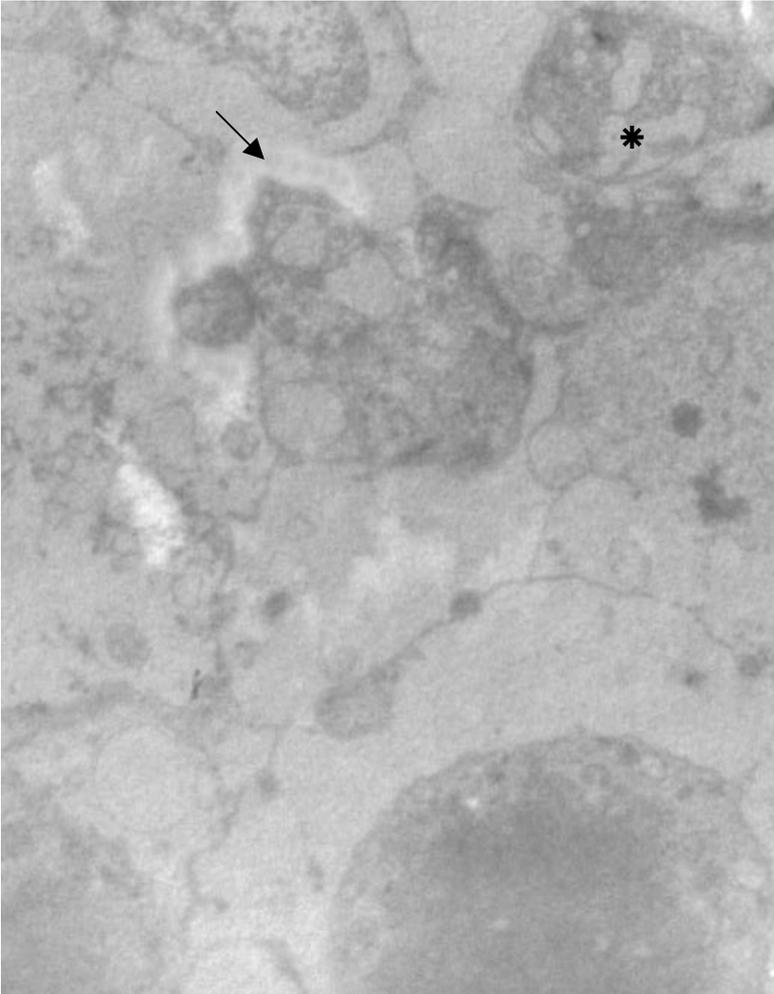


Fig. 89. -
Célula ganglionar
junto a fibras
nerviosas retinianas
que presentan signos
de daño celular, como
vacuolización (*) o
edema periaxonal
(flecha) (0,5 μ m)
Aumento: 6.000X
Grupo: P27

Resultados de la Inmunocitoquímica.

En las tablas sucesivas se indica el número total de partículas contabilizadas, para MBP, por micrografías y en cada uno de los ejemplares de los diferentes grupos.

Control							
Micrografía	Ejemplar 016	Ejemplar 017	Ejemplar 018	Ejemplar 019	Ejemplar 020	Ejemplar 021	Ejemplar 022
1	207	236	238	274	214	321	215
2	240	245	274	268	199	304	241
3	270	255	306	314	225	247	236
4	241	325	207	204	244	287	202

Tabla81. - Partículas contabilizadas de MBP en el grupo control.

ApoE							
Micrografía	Ejemplar 016	Ejemplar 017	Ejemplar 018	Ejemplar 019	Ejemplar 020	Ejemplar 021	Ejemplar 022
1	195	219	240	187	178	241	204
2	231	221	147	223	196	218	235
3	154	198	217	254	201	211	188
4	236	201	168	221	187	247	198

Tabla 82. - Partículas contabilizadas de MBP en el grupo ApoE.

ApoE+D							
Micrografía	Ejemplar 016	Ejemplar 017	Ejemplar 018	Ejemplar 019	Ejemplar 020	Ejemplar 021	Ejemplar 022
1	210	209	241	199	175	214	217
2	187	304	147	263	208	184	198
3	149	241	165	241	169	198	178
4	236	258	178	198	184	184	169

Tabla 83. - Partículas contabilizadas de MBP en el grupo ApoE+D.

PTEN							
Micrografía	Ejemplar 016	Ejemplar 017	Ejemplar 018	Ejemplar 019	Ejemplar 020	Ejemplar 021	Ejemplar 022
1	241	255	249	250	271	241	218
2	217	274	289	174	235	262	271
3	301	247	268	296	300	207	236
4	265	279	314	256	217	272	256

Tabla 84. - Partículas contabilizadas de MBP en el grupo PTEN.

P27							
Micrografía	Ejemplar 016	Ejemplar 017	Ejemplar 018	Ejemplar 019	Ejemplar 020	Ejemplar 021	Ejemplar 022
1	230	216	218	236	237	198	237
2	245	241	199	241	245	234	241
3	196	239	249	216	234	248	234
4	239	241	236	238	241	235	246

Tabla 85. - Partículas contabilizadas de MBP en el grupo P27.

Como en el caso anterior, en las siguientes tablas figura el número total de partículas contabilizadas, para GFAP, por micrografías y en cada uno de los ejemplares de los diferentes grupos.

Control							
Micrografía	Ejemplar 016	Ejemplar 017	Ejemplar 018	Ejemplar 019	Ejemplar 020	Ejemplar 021	Ejemplar 022
1	30	36	29	27	25	33	31
2	27	35	26	32	16	35	27
3	32	32	21	34	39	37	28
4	21	24	30	26	38	33	36

Tabla 86. - Partículas contabilizadas de GFAP en el grupo Control.

ApoE							
Micrografía	Ejemplar 016	Ejemplar 017	Ejemplar 018	Ejemplar 019	Ejemplar 020	Ejemplar 021	Ejemplar 022
1	33	29	31	20	31	34	25
2	15	26	25	31	23	27	31
3	19	28	27	24	21	33	23
4	26	28	21	18	24	28	27

Tabla 87. - Partículas contabilizadas de GFAP en el grupo ApoE.

ApoE+D							
Micrografía	Ejemplar 016	Ejemplar 017	Ejemplar 018	Ejemplar 019	Ejemplar 020	Ejemplar 021	Ejemplar 022
1	21	20	21	21	17	28	28
2	22	34	26	24	20	21	28
3	27	24	28	23	22	23	29
4	23	27	21	22	24	24	25

Tabla 88. - Partículas contabilizadas de GFAP en el grupo ApoE+D.

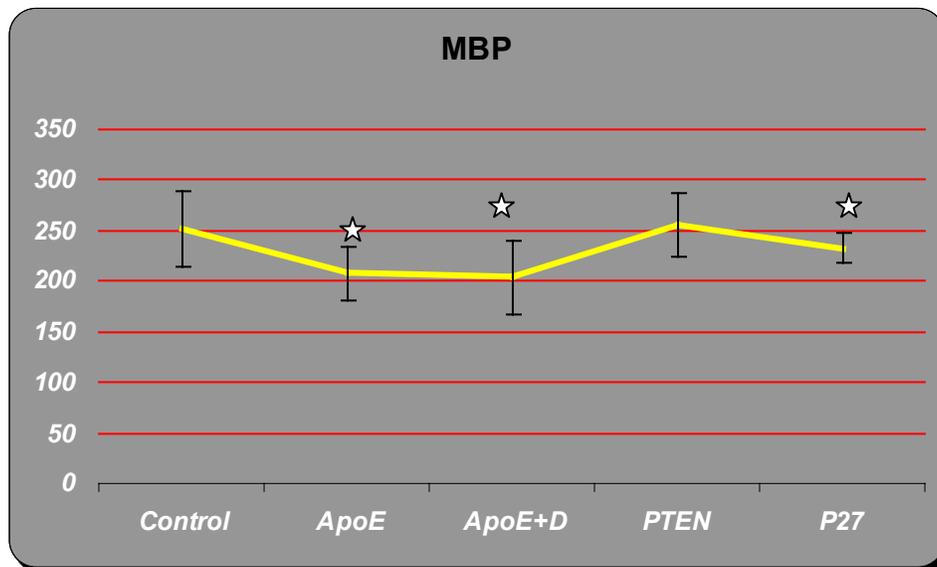
PTEN							
Micrografía	Ejemplar 016	Ejemplar 017	Ejemplar 018	Ejemplar 019	Ejemplar 020	Ejemplar 021	Ejemplar 022
1	24	26	32	32	32	32	33
2	31	28	31	29	36	28	26
3	35	25	24	27	34	28	25
4	36	32	26	28	26	18	26

Tabla 89. - Partículas contabilizadas de GFAP en el grupo PTEN.

P27							
Micrografía	Ejemplar 016	Ejemplar 017	Ejemplar 018	Ejemplar 019	Ejemplar 020	Ejemplar 021	Ejemplar 022
1	12	11	5	21	14	4	7
2	6	14	15	20	3	5	12
3	15	4	17	16	7	14	11
4	25	7	19	12	3	6	9

Tabla 90. - Partículas contabilizadas de GFAP en el grupo P27.

La gráfica 28.- muestra los resultados obtenidos en cuanto a la densidad media de partículas +/- DE para MBP por cada $65 \mu\text{m}^2$, que como vimos en el apartado de material y métodos correspondía a las micrografías tomadas a 15.000X. Hemos constatado una diferencia estadísticamente significativa del grupo Control con respecto al grupo ApoE ($P < 0.001$), al grupo ApoE+D ($P < 0.001$) y aunque con menor fuerza, también con respecto al grupo P27 ($P = 0.017$), no hallamos diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ApoE y ApoE+D ($P = 0.643$), ni del grupo Control con respecto al PTEN ($P = 0.642$),



Gráfica 28. - Representación de las medias +/- DT del recuento de partículas MBP por grupos. Las estrellas demuestran significación estadística.

En el caso de GFAP y como anteriormente, hemos hallado diferencias estadísticamente significativas entre el Control y los grupos ApoE y ApoE+D ($p = 0.006$ y $p < 0.001$ respectivamente), en cuanto al grupo P27, la diferencia fue estadísticamente más potente que en el caso de MBP ($P < 0.001$). Al igual que en el

estudio MBP, no se hallaron diferencias entre las densidades al comparar el grupo Control con el grupo PTEN (P=0.423), o los grupos ApoE entre sí (P=0.09).

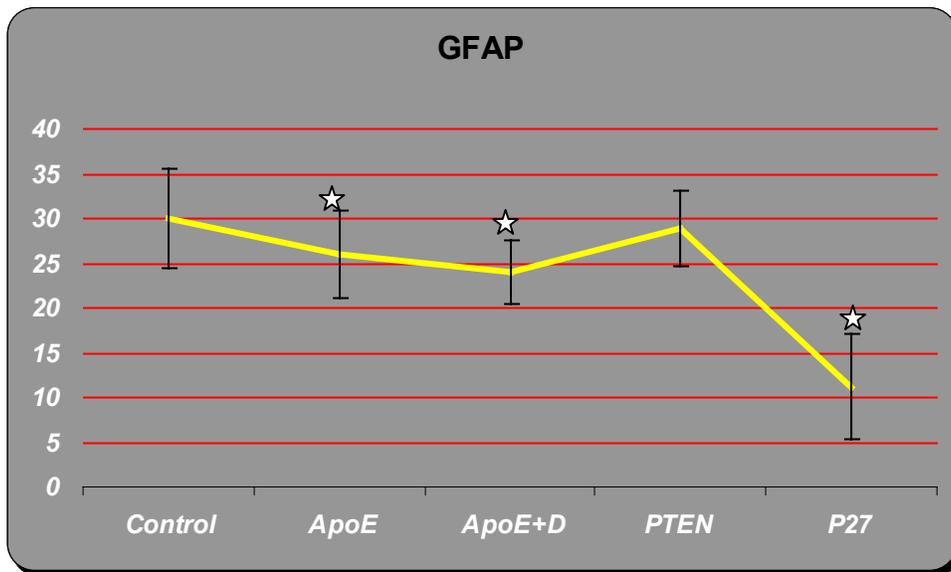


Tabla 29. - Representación de las medias +/- DT del recuento de partículas GFAP por grupos y en superficies de 8.3 μm², (aumento 40.000X).

La siguiente tabla ajusta los valores obtenidos en los dos experimentos en densidad de partículas por μm².

part/μm ²	Control	ApoE	ApoE+D	PTEN	P27
MBP	3.86	3.2	3.13	3.93	3.57
GFAP	3.61	3.13	3.01	3.49	1.35

Tabla 91.- Densidad de partículas por μm²

Las sucesivas micrografías que se muestran pretenden ser un ejemplo visual de los datos expuestos sobre las tablas y gráficos precedentes.

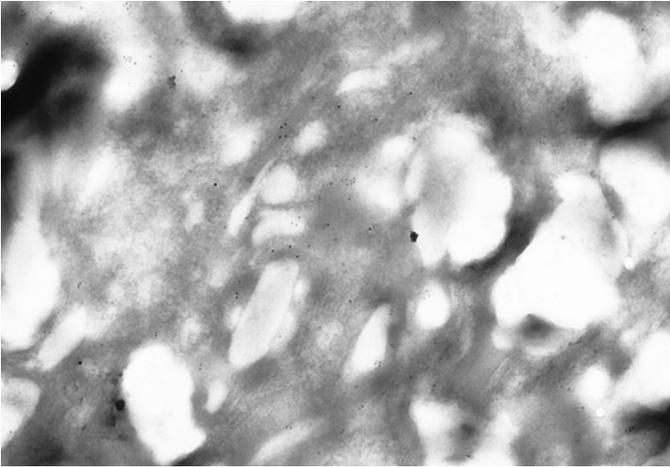


Fig. 90.-
Inmunocitoquímica con anticuerpos monoclonales anti MBP. En este caso las partículas de oro coloidal apenas se aprecian dado el mayor aumento empleado. El número contabilizado fue de 198. Ultrafino (0,5 m μ). Aumento: 15.000X Grupo: ApoE+D

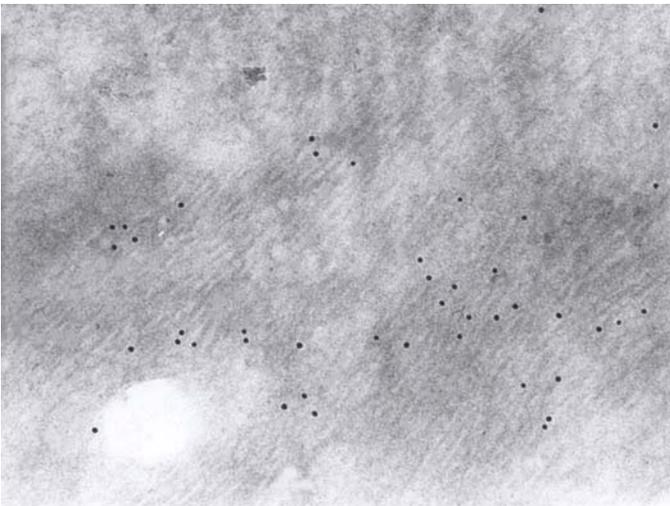


Fig. 91.-
Inmunocitoquímica con anticuerpos monoclonales anti MBP. La cantidad de partículas es de 43. Ultrafino (0,5 m μ). Aumento: 48.000X Grupo: PTEN

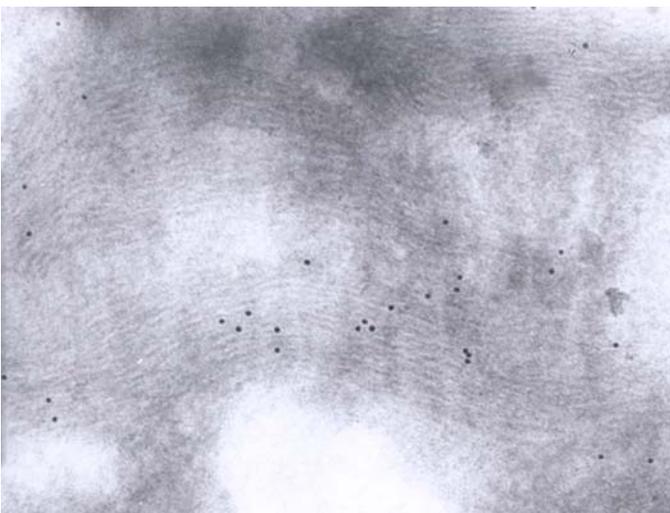


Fig. 92.-Inmunocitoquímica con anticuerpos monoclonales anti MBP. Menor cantidad de partículas que en la micrografía anterior, 31. Ultrafino (0,5 m μ). Aumento: 40.000X Grupo: ApoE

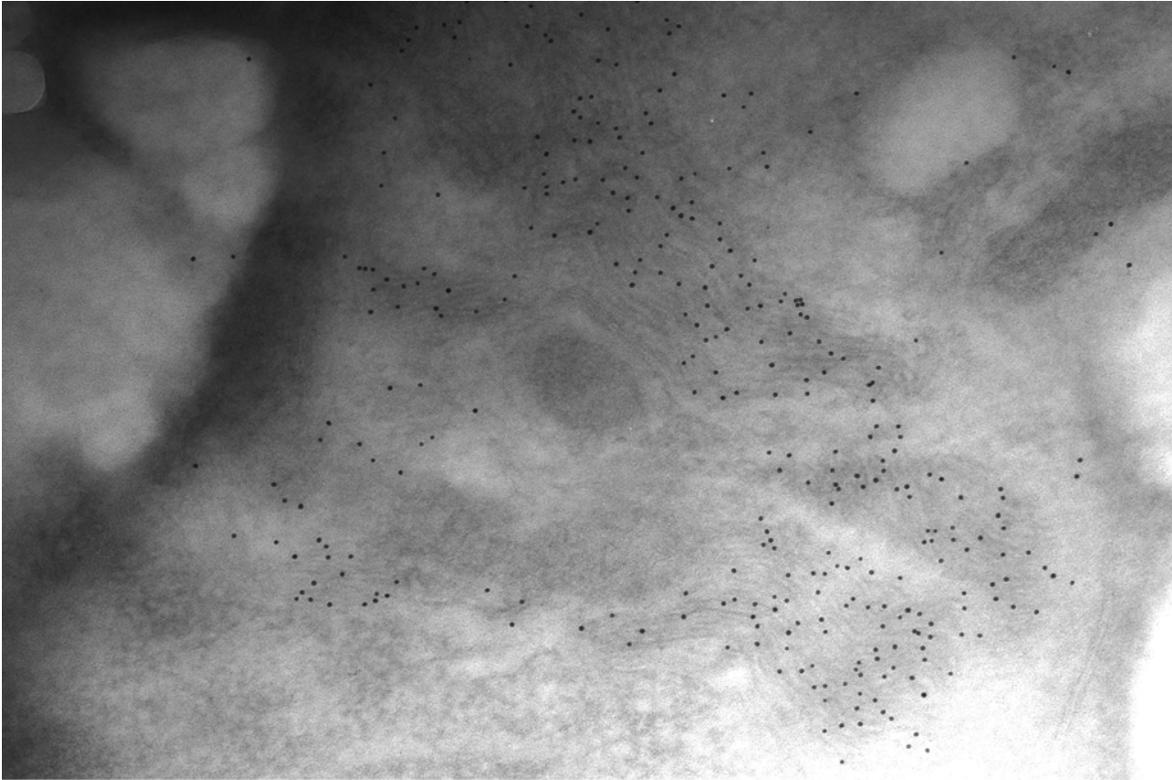


Fig. 93.-Inmunocitoquímica con anticuerpos monoclonales anti GFAP. Obsérvese como se dibujan los filamentos intermedios que configuran el citoesqueleto del astrocito. Ultrafino (0,5 μ m). Aumento: 15.000X Grupo: Control

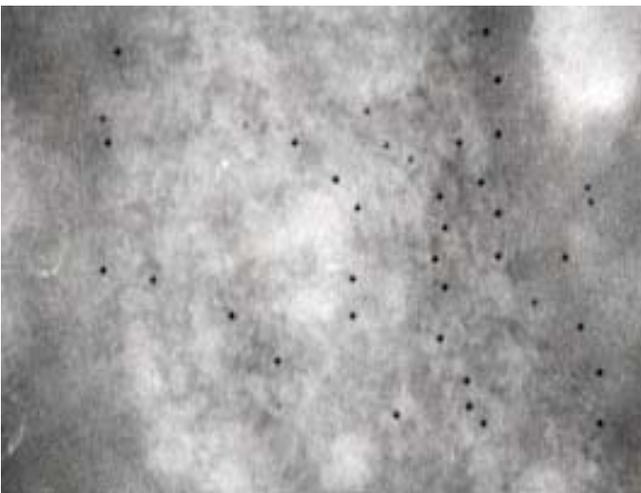


Fig. 94.-
Inmunocitoquímica con anticuerpos monoclonales anti GFAP Ultrafino (0,5 μ m). Aumento: 40.000X Grupo: Control.

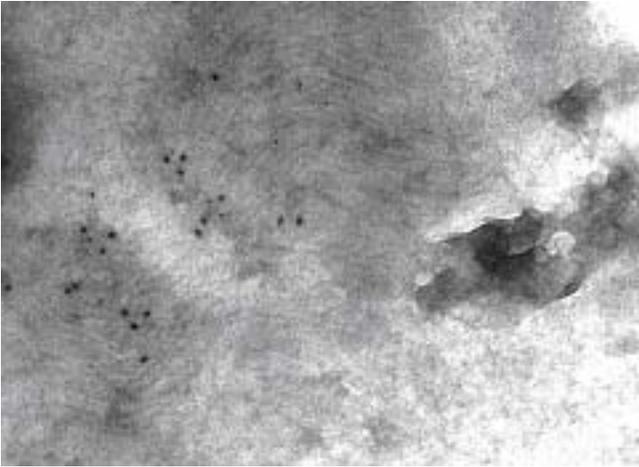


Fig. 95.-
Inmunocitoquímica con anticuerpos monoclonales anti GFAP. Obsérvese la menor densidad de partículas con respecto a la figura anterior 40.000X. Ultrafino (0,5 m μ). Aumento: 40.000X Grupo: ApoE

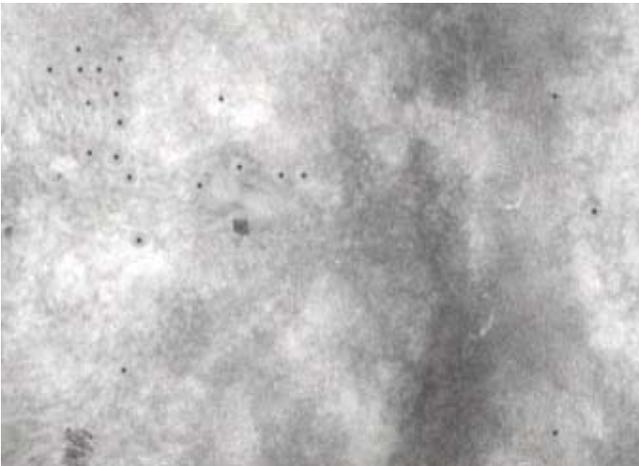


Fig. 96.-
Inmunocitoquímica con anticuerpos monoclonales anti GFAP. También aquí existe menor densidad de partículas. Ultrafino (0,5 m μ). Aumento: 40.000X Grupo: ApoE+D



Fig. 97.-
Inmunocitoquímica con anticuerpos monoclonales anti GFAP. En este grupo apreciamos una densidad de partículas semejante a la observada en el grupo control. Ultrafino (0,5 m μ). Aumento: 40.000X Grupo: PTEN.

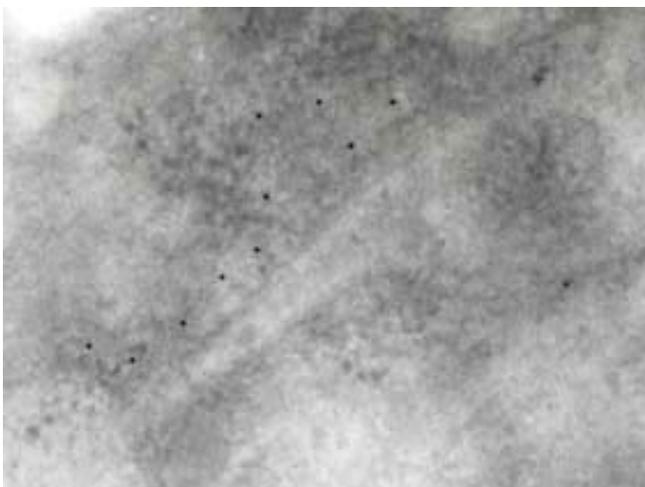


Fig. 98.-
Inmunocitoquímica con anticuerpos monoclonales anti GFAP. El grupo P27 muestra la menor densidad de todo el estudio. Ultrafino (0,5 m μ). Aumento: 40.000X
Grupo: P27

Resultados del Western-blot (SDS page).

Las proteínas estudiadas son marcadores específicos del desarrollo astrogliar (GFAP peso molecular 56.000 kD) y del proceso de mielinización (MBP 18.000 kD). Se ha analizado su expresión cualitativa y se ha procedido a la determinación densitométrica en los homogeneizados de nervio óptico y la comparación entre grupos demuestra las diferencias obvias entre las bandas correspondientes. El patrón de expresión de la MBP es similar entre el grupo Control y el PTEN, como se puede comprobar por la cuantificación densitométrica. Tanto los nervios ópticos del grupo P27 como los de los dos grupos ApoE y ApoE+D presentan una disminución ostensible de la expresión con respecto a la del Control. No obstante no existen diferencias de la expresión de dicha molécula entre los dos grupos ApoE. Sin embargo el grupo P27, aunque aparentemente alterado en su expresión, no presenta los niveles de afectación de los anteriores.

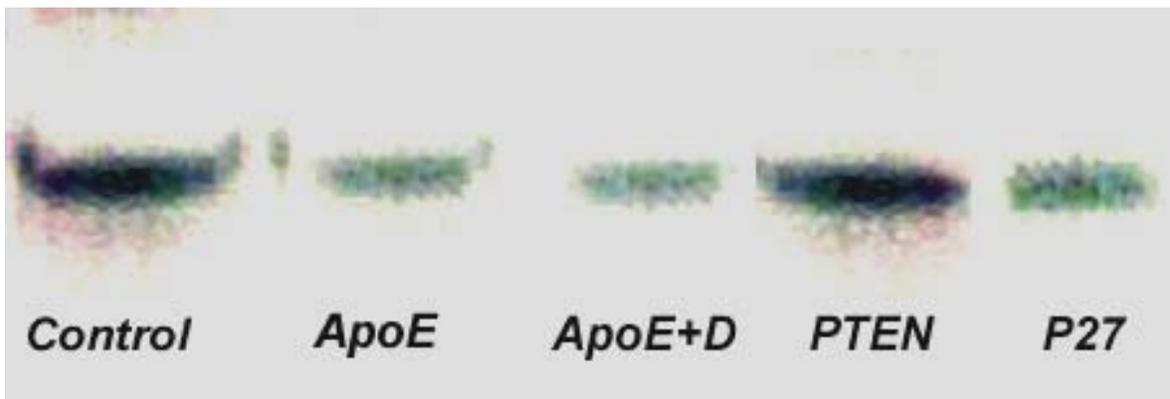


Fig. 88. - Bandas de expresión del Western-blot para el homogeneizado MBP de los nervios ópticos de los grupos de estudio.

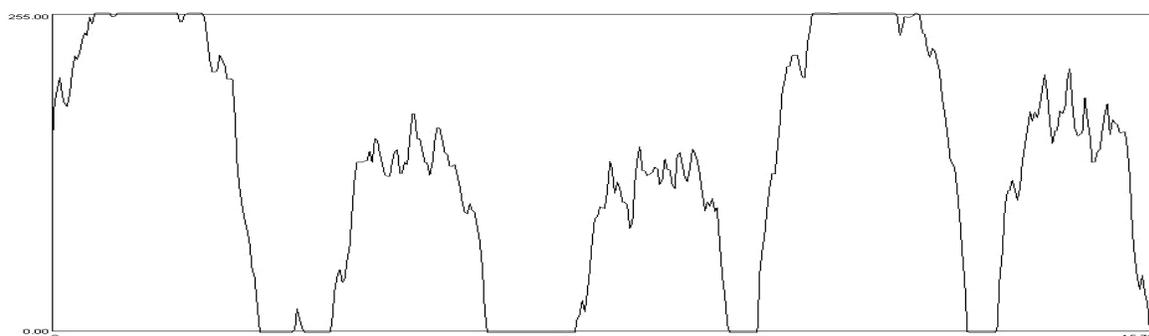


Fig. 100. -Densitometría de las bandas mostradas en la figura anterior donde se muestra una alteración del grupo P27 y en mayor medida de los dos grupos ApoE y ApoE+D.

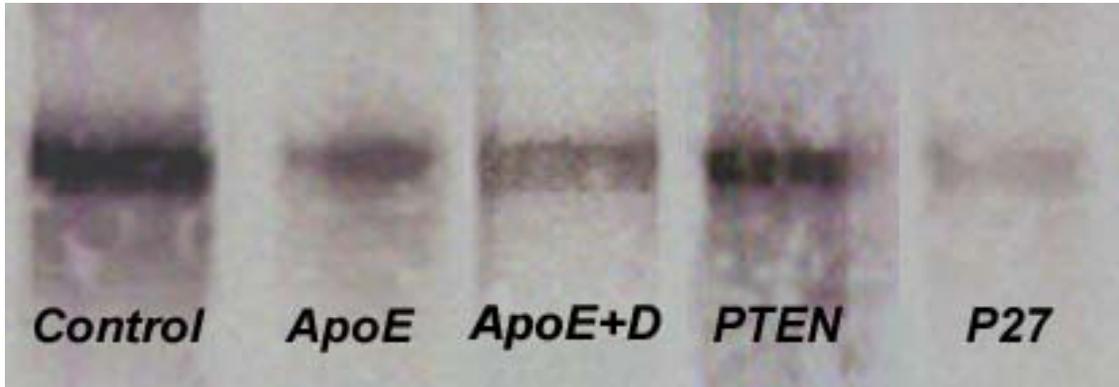


Fig. 101. - Bandas de expresión del Western-blot para el homogeneizado GFAP de los nervios ópticos de los grupos de estudio.

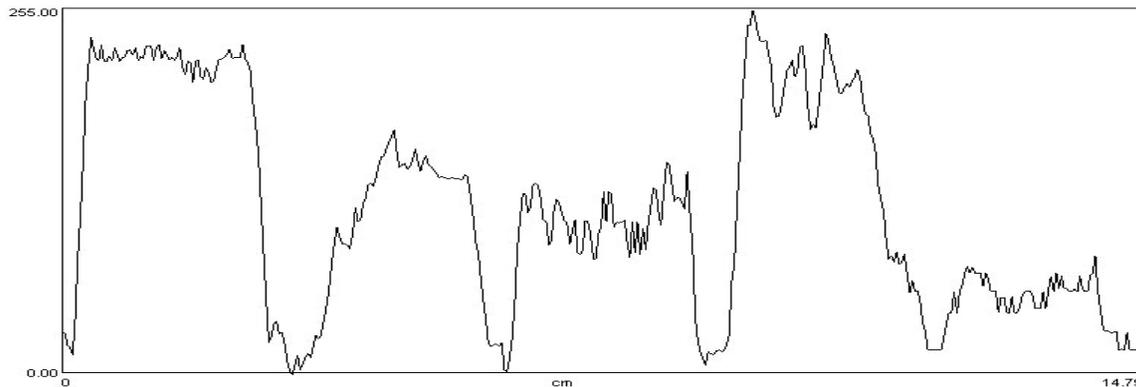


Fig. 102. -Densitometría de las bandas mostradas en la figura anterior donde se muestra una alteración marcada del grupo P27 y en menor medida de los dos grupos ApoE y ApoE+D.

Los patrones de expresión de la GFAP son similares entre el grupo Control y el grupo PTEN, de forma análoga a lo que ocurría en el nervio óptico con la proteína MBP. Estos datos pueden comprobarse en el ensayo densitométrico.

Los nervios ópticos del grupo P27 presentan una disminución muy marcada con respecto al grupo Control y los dos grupos ApoE. No existen diferencias de la

expresión de GFAP entre los dos grupos ApoE, aunque sí con respecto al grupo control, pero de forma mas moderada que en el grupo P27.

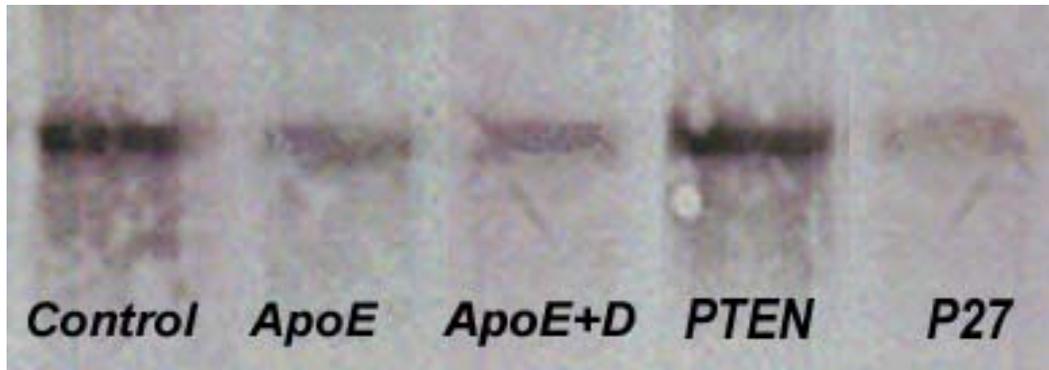


Fig. 103- Bandas de expresión del Western-blot para el homogeneizado GFAP de las retinas de los grupos de estudio.

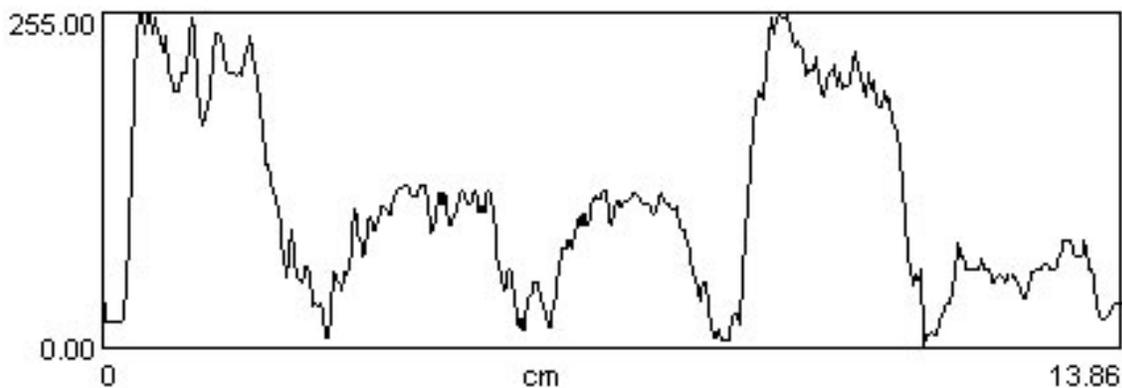


Fig. 104.-Densitometría de las bandas mostradas en la figura anterior donde se muestra una alteración marcada del grupo P27 y en menor medida de los dos grupos ApoE y ApoE+D.

En el tejido retiniano, la expresión de la GFAP presenta un perfil similar entre el grupo Control y el PTEN de forma idéntica al nervio óptico, como se aprecia en los datos del ensayo densitométrico.

En el grupo P27 la banda presenta una disminución muy notable respecto a la banda de expresión proteica en el grupo Control y también con las bandas de los dos grupos ApoE. No se aprecian diferencias de expresión de GFAP entre los dos grupos ApoE.

Resultados del test de escape.

Los resultados, en cuanto al tiempo consumido por los ratones desde su salida hasta la llegada a la plataforma sumergida, se muestran en las tablas sucesivas. Cada una de las tablas muestra los resultados según el grupo de estudio. En la columna de la izquierda figura el número de intento que es cronometrado. En la fila superior consta el número identificativo de cada animal. Las medias quedan recogidas en la columna de la derecha. Todos los tiempos se recogieron en segundos.

Control							
Intento	Ejemplar 023	Ejemplar 024	Ejemplar 025	Ejemplar 026	Ejemplar 027	Ejemplar 028	Media+/-DT
1	32	42	31	21	37	17	30+/-9,47
2	26	23	22	31	21	38	26,8+/-6,55
3	20	21	24	26	20	35	24,3+/-5,75
4	25	30	14	28	35	23	25,8+/-7,14
5	31	26	17	41	33	26	29+/-8,07
6	21	36	28	30	15	5	22,5+/-11,26
7	9	4	4	22	5	7	8,5+/-6,89
8	4	5	3	6	6	5	4,8+/-1,17
9	5	5	5	9	5	5	5,6+/-1,63
10	4	4	7	5	6	4	5+/-1,26

Tabla 92. - Tiempos cronometrados para el grupo control.

ApoE							
Intento	Ejemplar 023	Ejemplar 024	Ejemplar 025	Ejemplar 026	Ejemplar 027	Ejemplar 028	Media+/-DT
1	31	45	20	34	27	22	29,8+/-9,11
2	27	47	26	22	41	41	34+/-10,24
3	41	38	26	21	35	38	33,1+/-7,88
4	28	32	31	33	34	23	30,2+/-4,07
5	35	12	31	26	28	34	27,7+/-8,41
6	21	24	40	29	30	30	29+/-6,51
7	4	24	14	7	4	9	10,3+/-7,66
8	7	18	5	4	4	5	7,2+/-5,42
9	5	6	8	5	5	6	5,8+/-1,17
10	3	7	5	7	7	6	5,8+/-1,60

Tabla 93. - Tiempos cronometrados para el grupo ApoE.

ApoE+D							
Intento	Ejemplar 023	Ejemplar 024	Ejemplar 025	Ejemplar 026	Ejemplar 027	Ejemplar 028	Media+/-DT
1	18	41	30	47	38	42	36+/-10,45
2	33	38	27	33	29	23	30,5+/-5,28
3	22	29	25	42	41	38	32,8+/-8,61
4	25	31	26	22	32	31	27,8+/-4,07
5	19	27	31	26	22	28	25,5+/-4,32
6	31	24	30	25	34	26	28,3+/-3,93
7	10	9	3	5	6	12	7,5+/-3,39
8	7	7	5	7	7	11	7,3+/-1,97
9	9	11	8	3	5	5	6,8+/-2,99
10	4	3	4	4	3	5	3,8+/-0,75

Tabla 94.- Tiempos cronometrados para el grupo ApoE+D.

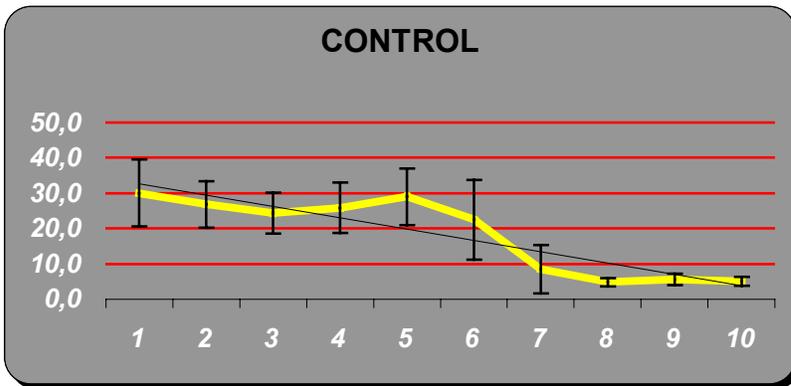
PTEN							
Intento	Ejemplar 023	Ejemplar 024	Ejemplar 025	Ejemplar 026	Ejemplar 027	Ejemplar 028	Media+/-DT
1	36	33	42	33	35	37	36+/-3,35
2	27	28	32	36	28	41	32+/-5,55
3	29	41	29	35	29	28	31,8+/-5,15
4	34	37	27	22	22	38	30+/-7,29
5	19	26	35	21	31	27	26,5+/-5,99
6	34	27	41	25	27	21	29,2+/-7,17
7	4	4	3	7	7	4	4,8+/-1,72
8	6	6	5	9	8	6	6,7+/-1,51
9	5	8	4	4	5	4	5+/-1,55
10	4	7	4	3	6	5	4,8+/-1,47

Tabla 95.- Tiempos cronometrados para el grupo PTEN.

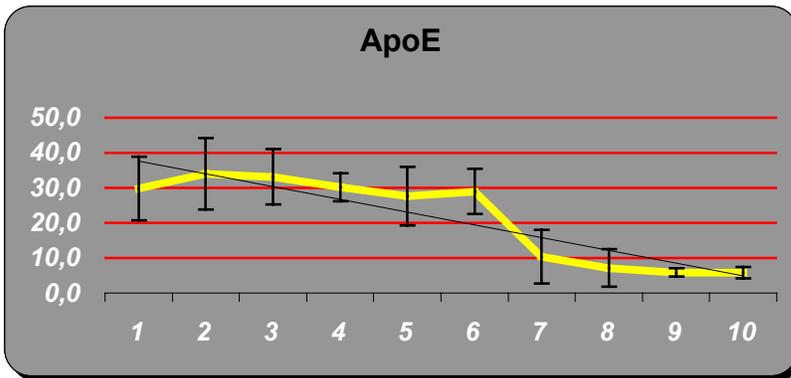
P27							
Intento	Ejemplar 023	Ejemplar 024	Ejemplar 025	Ejemplar 026	Ejemplar 027	Ejemplar 028	Media+/-DT
1	45	43	43	45	39	45	43,3+/-2,35
2	38	32	38	39	12	39	33+/-10,62
3	58	28	38	41	37	32	39+/-10,39
4	12	40	40	34	24	36	31+/-11,01
5	60	28	28	31	25	31	33,8+/-13,01
6	46	12	24	43	27	28	30+/-12,63
7	35	38	35	37	35	12	32+/-9,88
8	33	35	28	35	38	25	32,3+/-4,89
9	32	41	41	40	43	39	39,3+/-3,83
10	38	60	39	39	37	34	41,2+/-9,41

Tabla 96.- Tiempos cronometrados para el grupo P27

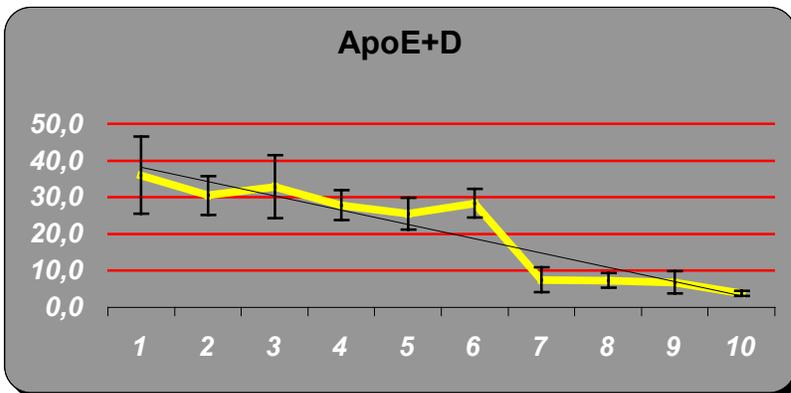
En las gráficas que figuran a continuación, recogemos los tiempos medios para cada intento y grupo de estudio. La línea negra continua representa la línea de tendencia medial de los valores.



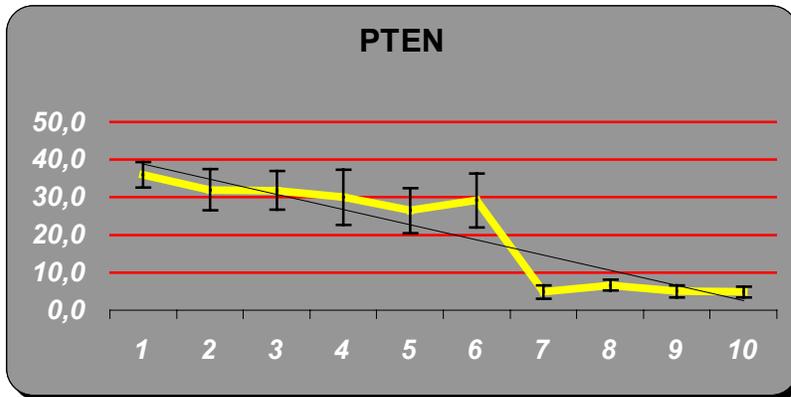
Gráfica 30.-
Tiempos medios para cada intento en el grupo Control. La línea negra representa la línea de tendencia medial.



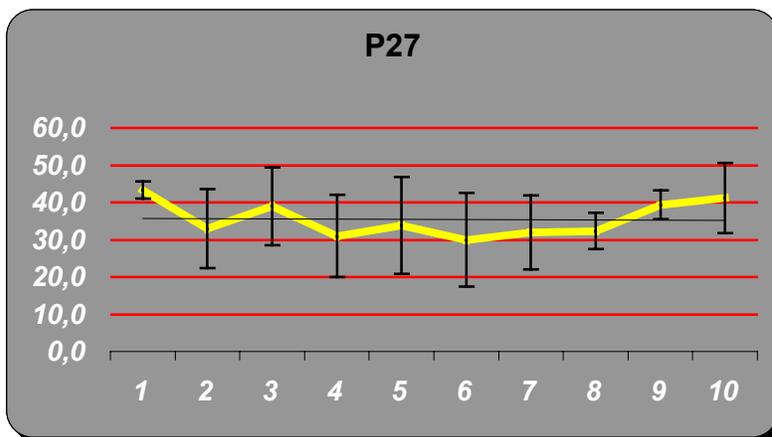
Gráfica 31.-
Tiempos medios para cada intento en el grupo ApoE. La línea negra representa la línea de tendencia medial.



Gráfica 32.-
Tiempos medios para cada intento en el grupo ApoE +D. La línea negra representa la línea de tendencia medial.

**Gráfica 33.-**

Tiempos medios para cada intento en el grupo PTEN. La línea negra representa la línea de tendencia medial.

**Gráfica 34.-**

Tiempos medios para cada intento en el grupo P27. La línea negra representa la línea de tendencia medial.

Los tiempos recogidos para los cinco grupos en el test fueron comparados por un análisis de medidas repetidas ANOVA, este análisis incluyó los 10 intentos para cada animal, utilizándose también las 7 primeras medidas que forman parte de la curva de aprendizaje del animal, y momento a partir del cual, en los animales con buena percepción de luz, los tiempos comienzan a decrecer. Los resultados comparando el grupo Control con el resto de grupos y los grupos ApoE y ApoE+D entre sí, mostró únicamente diferencias estadísticamente significativas al comparar el grupo Control con el P27 ($P=0.001$).

Si contabilizamos las medidas tomadas únicamente en los últimos tres intentos, es decir, sin tener en cuenta la curva de aprendizaje del animal, continuamos sin hallar

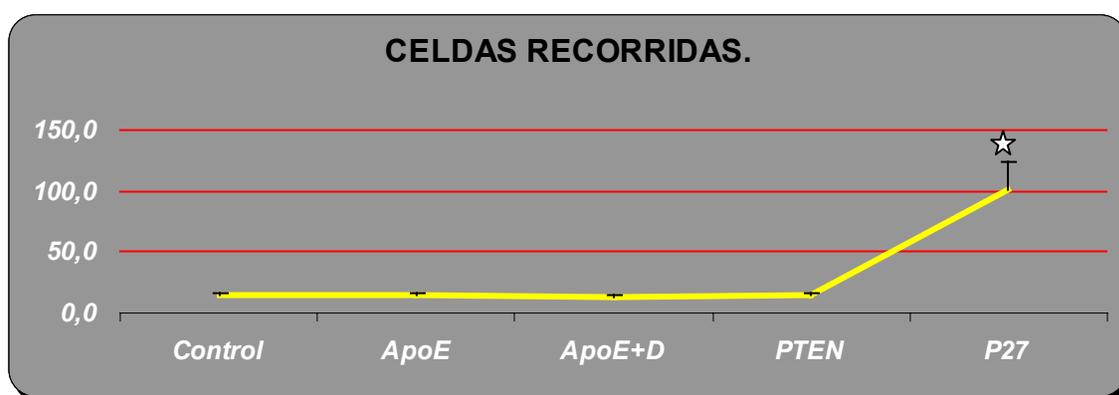
significación estadística entre el control y el resto de los grupos, a excepción claro está, del grupo P27, donde esta significación toma mayor fuerza ($P < 0.001$).

Todos los animales, mostraron una línea de tendencia medial claramente descendente a excepción del grupo P27 donde esta fue continua.

En la Tabla 97.- mostramos los resultados en cuanto al registro de la cantidad de celdas recorridas por cada uno de los animales en el 10° y último ensayo.

NUMERO DE CELDAS RECORRIDAS.							M+/-DT
CONTROL	15	13	15	13	12	16	14+/-1,55
ApoE	11	15	15	16	17	15	14,8+/-2,04
ApoE+D	13	11	14	11	15	16	13,3+/-2,07
PTEN	15	17	14	13	12	14	14,2+/-1,72
P27	83	147	91	96	97	94	101,3+/-22,93

Tabla 97.- Celdas recorridas por los ratones de cada grupo en el 10° ensayo.



Gráfica 35.- Representación gráfica de las medias mostradas en la tabla 97.-.

Realizado el análisis estadístico, comparamos el grupo control con el P27, hallándose una fuerte significación estadística ($P < 0.001$). No existen diferencias entre el resto de los grupos.

En las siguientes figuras se muestra la representación gráfica de la trayectoria trazada por los ratones del grupo control y P27, en su último intento.

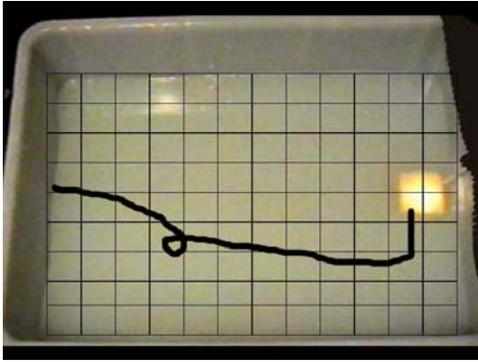


Fig. 105.- 10^a trayectoria.
Animal Control 023

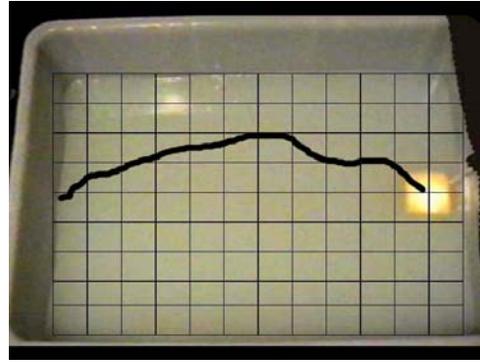


Fig. 106.- 10^a trayectoria.
Animal Control 024

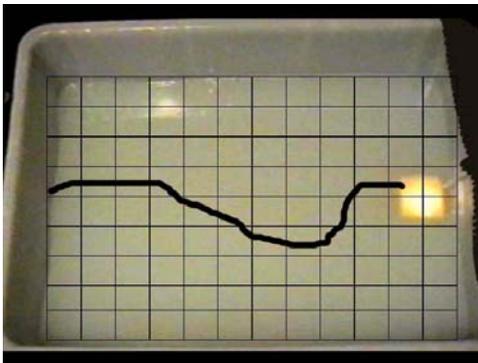


Fig. 107.- 10^a trayectoria.
Animal Control 025

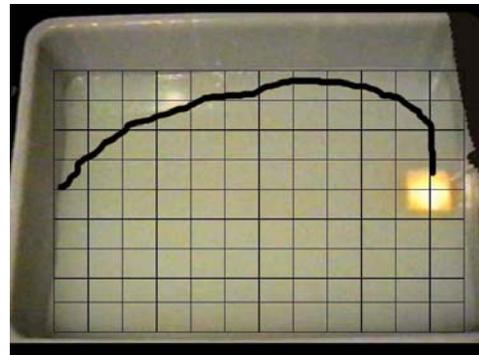


Fig. 108.- 10^a trayectoria.
Animal Control 026

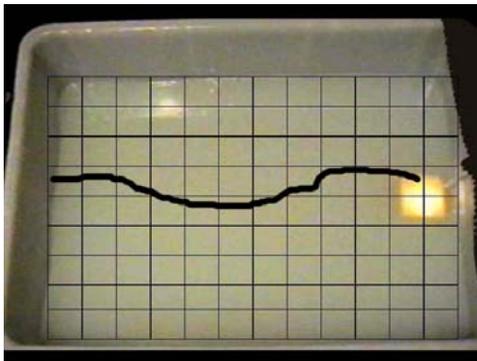


Fig. 109.- 10^a trayectoria.
Animal Control 027

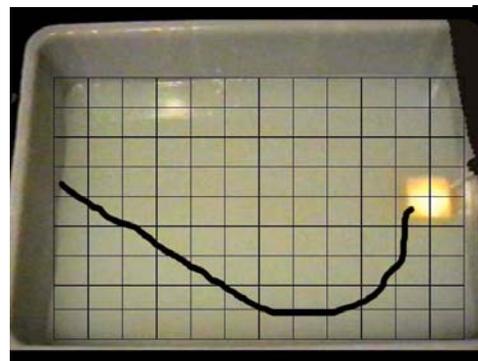


Fig. 110.- 10^a trayectoria.
Animal Control 028

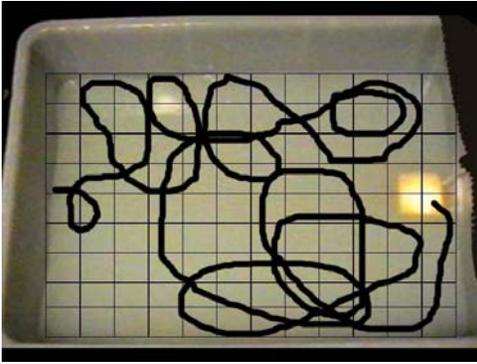


Fig. 111.- 10^a trayectoria.
Animal P27 023

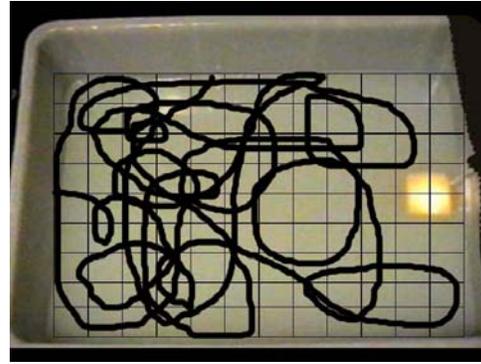


Fig. 112.- 10^a trayectoria.
Animal P27 024

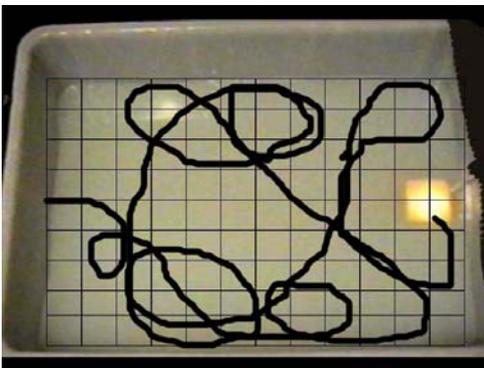


Fig. 113.- 10^a trayectoria.
Animal P27 025

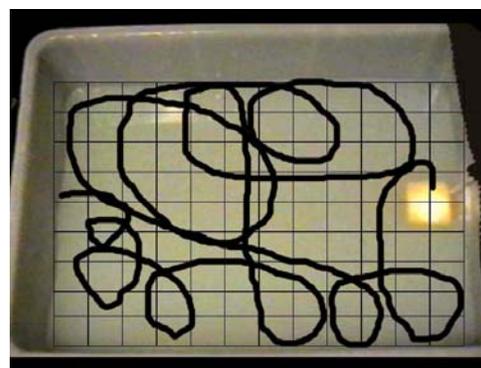


Fig. 114.- 10^a trayectoria.
Animal P27 026

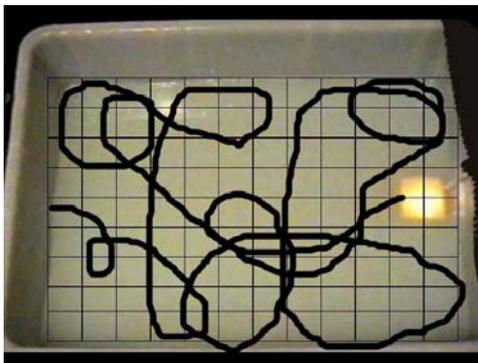


Fig. 115.- 10^a trayectoria.
Animal P27 027

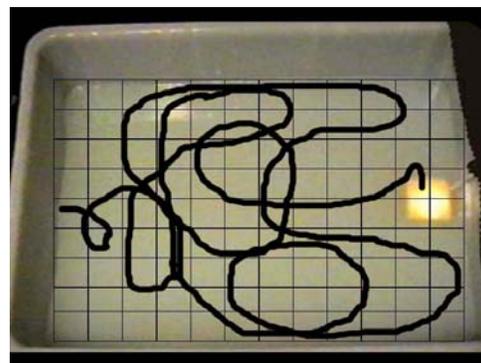


Fig. 116.- 10^a trayectoria.
Animal P27 028

Discusión.

En el presente trabajo de investigación, hemos estudiado las retinas y nervios ópticos de cuatro grupos diferentes de ratones, tres de los cuales han sido manipulados genéticamente para privarles artificialmente de un determinado gen (cepas *Knockout*) y el otro grupo (control) formado por ratones salvajes *wildtype* cepas (C7BL/6J). Hemos realizado un exhaustivo estudio morfométrico y morfológico de las citadas estructuras a un nivel tisular, celular y subcompartimental, con el fin de describir los fenotipos expresados por los ratones *Knockout*. Hemos analizado la expresión de dos proteínas, la MBP y GFAP, consideradas biomédicamente como marcadoras del sistema neural, y que en nuestro estudio hemos aplicado a la caracterización del sistema visual. Además, por medio de la realización del "test de escape", hemos investigado la repercusión funcional que podrían tener las alteraciones morfológicas descritas, sobre el comportamiento neurosensorial del animal y en particular sobre la función visual. La ejecución del trabajo, siguiendo el diseño inicial, ha aportado una gran cantidad de datos, que han sido procesados estadísticamente.

A la hora de trabajar con cepas de ratones *Knockout*, debemos tener en cuenta que las alteraciones descritas en un modelo experimental determinado pueden ser consecuencia directa de la falta de expresión de ese gen o bien, secundarias a un mecanismo indirecto debido a la ausencia del propio gen. Este concepto ha sido valorado en los tres modelos experimentales del presente estudio.

Con el fin de facilitar la discusión de los resultados obtenidos, presentamos los datos según el siguiente esquema: a) genotipo presentado por el animal, en concreto cepa de ratón ApoE *Knockout* (1), P27 *Knockout* (2) y PTEN *Knockout* (3) y b) estructura anatómica estudiada para cada modelo experimental, es decir, la retina o el nervio óptico.

1. EL GRUPO APOE *KNOCKOUT*.

Esta cepa de ratones se obtiene al anular el gen que expresa la apolipoproteína A (195).

Hemos descrito alteraciones en el tamaño y en la morfología de la retina y nervio óptico de los animales *ApoE Knockout* respecto a los controles.

Pormenorizando, y con el objetivo de atribuir a los citados efectos directos o indirectos de la ausencia de la apolipoproteína E la responsabilidad sobre las alteraciones mostradas en el apartado de resultados, hemos dividido el grupo de ratones *ApoE Knockout* en *ApoE* y *ApoE+D* (como se describe en el apartado material y métodos). El primer grupo alimentado con dieta normal y el segundo alimentado con una dieta hipocolesterolemizante. De esta forma conseguimos que el elemento diferencial fundamental entre los dos grupos sea el elevado perfil hiperlipidémico conseguido en el grupo *ApoE+D*. Así, las diferencias significativas entre estos dos grupos pueden ser atribuidos con más base a los fenómenos arterioscleróticos y microvasculares que a la propia ausencia de la apolipoproteína E.

Aunque en nuestro caso, la utilización de ratones *wildtype* sometidos a dietas hipocolesterolemizantes sería aparentemente el grupo ideal para compararlos con los ratones *ApoE* sometidos a dietas regulares (pues llegan a mostrar niveles similares de colesterol), para poder analizar a partir de sus diferencias, cuáles son secundarias a la arteriosclerosis generalizada y cuáles a la propia función de la *ApoE*. Debemos precisar que los ratones *wildtype* necesitan tiempo para mostrar placas de ateroma idénticas a las mostradas en los animales *ApoE* más jóvenes, por lo que tenemos que trabajar ya con animales muy envejecidos, y en parte deteriorados por otros factores que pudieran interferir con los resultados, como se ha descrito con anterioridad (80, 82, 195). Dada la capacidad metabólica de los ratones, es posible que los niveles de lípidos plasmáticos no sean constantes. Y en este sentido también es discutible que los niveles de colesterol intratisulares sean semejantes entre los grupos, puesto que en muchos tejidos es la propia *ApoE* la

que se encarga de "interiorizar" estas grasas (49,80), como hemos comentado en el capítulo de introducción.

1. 1 Los nervios ópticos de los ratones ApoE *Knockout*.

Las cuestiones relativas a la función de ApoE en el NO surgen tras identificarla como una de las principales proteínas expresadas en los nervios lesionados (29). El posterior descubrimiento de la asociación de ApoE con determinadas enfermedades neurodegenerativas renovó el interés por su estudio, y en el SNC parece desempeñar una función protectora, adoptando funciones específicas en el mantenimiento y regeneración nerviosa (44, 45). ApoE es la principal apolipoproteína del SNC y del líquido cerebroespinal, y también se localiza en el NO, donde es sintetizada por los oligodendrocitos (46). Los resultados de nuestro estudio sugieren que ese mismo papel es desarrollado por la apolipoproteína a nivel del NO, adoptando un papel propio neuro-reparador.

Sin embargo, y como argumentábamos en los párrafos anteriores ¿Cómo atribuir a ApoE ese papel propio neuroprotector sin considerar también que este pudiera ser consecuencia de sus efectos sistémicos? Es razonable pensar que la disminución del flujo sanguíneo debida a la arteriosclerosis podría inducir atrofia y daño a los axones ópticos. Los ratones utilizados en nuestro estudio son relativamente jóvenes (entre 16 y 20 semanas). A esta edad sólo los estadios precoces de la enfermedad aterosclerótica y el comienzo de la formación de alguna placa de ateroma es demostrable (196-198). El grosor de los vasos sanguíneos (199) y el flujo vascular cerebral (200) son normales. Además, los nervios que sufren una disminución del riego sanguíneo presentan un característico patrón degenerativo centrífugo (201). Sin embargo, no hemos detectado en ningún caso la presencia de este patrón histológico en nuestros resultados.

Según ha quedado reflejado en el apartado de resultados, hemos comprobado como las áreas transversales de los nervios ópticos de los ratones pertenecientes al grupo ApoE y ApoE +D no han mostrado diferencias significativas entre ellas,

pero sí eran significativamente mayores que el grupo Control. A un nivel ultraestructural, el área media de los axones de los grupos ApoE y ApoE+D tampoco mostraba diferencias entre ellos, pero sí eran mayores que en el control. Aunque estos axones se encontraban ultraestructuralmente dañados, no hemos conseguido demostrar una reducción significativa del número total de axones, y si bien existe una disminución de la densidad axonal en ambos grupos ApoE y ApoE+D, esta no parece deberse a pérdida axonal (con aumento del espacio "vacío" interaxonal) sino al aumento de las áreas axonales que van acompañadas del aumento de la superficie total del NO.

La ausencia de diferencias significativas entre ApoE y ApoE+D, pero sí de estos con respecto al grupo Control, hacen debilitarse la hipótesis sobre la influencia de la hipercolesterolemia, decantándose en favor de una función propia de ApoE.

Por otro lado, la existencia de axones de mayor tamaño en estos grupos ApoE *Knockout* respecto del control, podría deberse a una afectación selectiva de los axones menores, sin embargo, ya que el número total de axones no se ve alterado por la deficiencia de ApoE, esta hipótesis es menos convincente que pensar en la posibilidad de que la alteración inducida por la ausencia de la propia ApoE produzca la hipertrofia de todos los axones. Estos patrones anatomopatológicos son semejantes a los hallados en determinadas enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Batten (lipofuccinosis cerebral juvenil) (202) o la enfermedad de Tay-Sachs variante B (gangliosidosis GM2) (203), y que cursan con disfunción psicomotriz, pérdida de visión y muerte precoz. En ambos casos el patrón histológico es la hipertrofia axonal con acúmulos de material lisosómico.

Por otro lado, hemos comprobado mediante el estudio del índice de mielinización, como los axones de mayor tamaño de los grupos ApoE y ApoE+D (más numerosos que en el Control) presentaban una disminución significativa de la densidad mielínica, reflejada en la disminución del grosor de la vaina, hallazgo que también ha sido documentado en el NO de casos de enfermedad de Tay-Sachs avanzada (203). Siguiendo con esta hipótesis en la que la ApoE sería responsable de una metabolopatía, podríamos añadir que aunque no hemos hallado signos degenerativos

oligodendrogiales en un estudio ultraestructural minucioso, sí hemos hallado una disminución en la expresión de MBP, que hemos contrastado tanto en la inmunocitoquímica como en el estudio por *western-blot*. Sabemos que la mielinización depende directamente de los oligodendrocitos (204), células macrogliales donde se ha detectado la síntesis de ApoE. Pudiéramos postular además que esta carencia de ApoE influiría en el oligodendrocito, que de alguna manera sintetizaría una mielina alterada. Esta podría ser la causa de roturas y degeneraciones tanto en las vainas como intraxonales, como así hemos constatado en nuestro estudio. A favor de esto contaríamos también con el hallazgo de que a nivel macroglial existe una menor alteración de GFAP (proteína fundamental de los filamentos intermedios del citoesqueleto astroglial) que de MBP. Esta última aunque no es un componente estructural de los oligodendrocitos, si es fundamental y exclusivamente sintetizada por ellos.

Frente a esta hipótesis en la que consideraríamos a ApoE como un elemento fundamental en la morfogénesis de los axones ópticos, cabría ahora plantearnos una segunda hipótesis que consideraría los hallazgos de nuestro estudio como consecuencia de la pérdida del papel "protector", o neuro-regenerativo que se le ha atribuido a esta lipoproteína. Este papel se manifiesta por el demostrado aumento de la síntesis de ApoE tras producir un daño sobre el sistema nervioso. También en la capacidad protectora de esta lipoproteína al asociarse ciertas isoformas (ApoE*4) con la enfermedad de Alzheimer y con una recuperación neurológica deficiente tras un traumatismo cerebral (42, 43), o como ha sido probado, con la mayor mortalidad de estos animales en modelos experimentales de isquemia cerebral (205).

A lo largo de este trabajo de investigación hemos descrito la presencia en este modelo *Knockout* de rupturas de la vaina de mielina, vesiculaciones intralamelares, vainas aberrantes, y en definitiva la existencia de alteración en los patrones de mielinización. También hemos señalado perfiles micrográficos sugerentes de alteraciones intraxonales que se han manifestado como vacuolizaciones internas. Estos hallazgos han sido documentados en los últimos años en la literatura

científica mundial, en NO que habían sido sometidos a algún tipo de noxa como isquemia (206), hipertensión arterial (207), carencias nutricionales proteicas (208), mielopatías ópticas (209) o déficits de cobre (210) entre otros. Sin embargo, y partiendo de esta segunda hipótesis que hemos planteado, ¿Cómo podemos explicar la existencia de signos degenerativos axonales en estos modelos que no han sido expuestos a ningún daño sobre los nervios ópticos? Una posibilidad sería que en el NO normal existiera un cierto estado oxidativo al que el ratón *ApoE Knockout* fuera especialmente sensible, de forma que de alguna manera no pudiera "reparar" los daños que a consecuencia de estrés oxidativo ambiental se produjeran. Se ha definido el estrés oxidativo como una situación de desequilibrio que se produce entre los mecanismos pro-oxidantes y antioxidantes a favor de los primeros (211). Entre los mecanismos prooxidantes están los radicales libres, moléculas que contienen un electrón sin aparear en sus órbitas externas, que los hace intrínsecamente inestables y altamente reactivas, siendo los derivados del oxígeno y del nitrógeno los más abundantes (212). Así la detección de moléculas producto de la peroxidación lipídica, como el MDA (malondialdehído), indicaría que el proceso oxidativo se realiza de una manera natural sobre un NO normal. Sabemos que la concentración de MDA en un NO no expuesto a ninguna noxa externa es de 1.35 nmol/mg prot (213). Por otro lado parece existir una diferencia significativa en cuanto a la actividad antioxidante global al comparar el grupo de ratones *ApoE Knockout* y *wildtype* en determinados órganos como pulmón, riñón, plasma o corazón (49, 52). *In vitro* se han realizado experimentos que demuestran la función protectora de *ApoE* frente a la oxidación (214). Todo esto podría sugerir la existencia de un estado altamente oxidativo en los NO de los ratones *ApoE Knockout*, que sería muy dañino para los axones, a falta de futuros estudios que comparen los productos derivados de la peroxidación y los factores antioxidantes presentes en los NO en estos *Knockout*. Siguiendo con este razonamiento, la pérdida de la *ApoE* a nivel axonal sería equivalente a la pérdida de un potente agente protector, reparador y regenerador frente al daño oxidativo, haciendo a los axones y a su cubierta de mielina mucho más vulnerables.

Para concluir, y en un plano puramente especulativo, constatar que existen evidencias que apuntan hacia la posibilidad de estimular la síntesis de ApoE desde los oligodendrocitos con sustancias como el γ -interferon (215, 216) que podrían ser la base de futuras terapias frente a enfermedades degenerativas del NO como el glaucoma o la neuropatía óptica isquémica.

En resumen: El aumento de la superficie transversal de los NO, el patrón hipertrófico que muestran los axones y las alteraciones presentes tanto en la vaina de mielina como a nivel intraxonal que muestran los ratones ApoE *Knockout* podrían ser secundarios a una alteración en la morfogénesis, o una consecuencia directa del papel neuro-regenerador y protector de ApoE frente a noxas medioambientales.

1. 2 Las retinas de los ratones ApoE *Knockout*.

El estudio de la retina de los ratones ApoE *Knockout* es especialmente complejo e interesante. De nuevo y al igual que lo hacíamos en el NO, tendremos que considerar que ApoE podría ejercer su influencia desde dos puntos de vista: como "controlador" del metabolismo lipídico o desarrollando una función propia. Además si consideramos la diversidad de los elementos citoarquitectónicos retinianos hay que tener en cuenta que según las características de cada cual, podría tener mayor relevancia uno u otro mecanismo. Los ratones ApoE+D mostraron cambios retinianos significativos al compararlos con el grupo ApoE. En nuestro modelo, la hipercolesterolemia parece desempeñar un papel prioritario en los hallazgos retinianos mostrados, frente a la hipótesis de ApoE "per sé". No obstante, el mecanismo por el que la hipercolesterolemia produce esta dismorfogénesis retiniana permanece aún por dilucidar. Nuestro trabajo sugiere que el aumento del colesterol y triglicéridos en la dieta altera de una manera notable el mantenimiento y función de los elementos retinianos y es también congruente con otros estudios realizados en humanos, relativos a la hipercolesterolemia y al incremento de la ingesta de ácidos grasos saturados en pacientes con DMAE (217-219).

Los resultados obtenidos en las diferentes estructuras retinianas, requieren un análisis particularizado, aunque las conclusiones del estudio se realicen intentando conectar todos los datos obtenidos.

1. 2. 1 GROSOR RETINIANO Y DE LAS CAPAS NUCLEARES EXTERNA E INTERNA.

En el estudio morfológico y morfométrico que hemos realizado hemos documentado como el grosor global de las retinas ApoE+D era sensiblemente menor al descrito en el grupo ApoE, que a su vez estaba significativamente reducido con respecto al Control. También hemos detectado que esta disminución en el grosor es debida fundamentalmente a la reducción de las capas nucleares externa e interna, donde además la densidad celular se hallaba también disminuida.

Otros grupos como el de Ong (80) o Fliesler (220) han utilizado ratones ApoE *Knockout* para estudiar la retina. Fliesler concluye que los ratones ApoE *Knockout* alimentados con una dieta hipercolesterolémica no mostraban grandes alteraciones en cuanto a estructura o función al compararlos con los ratones *wildtype*. Sin embargo el grupo de Ong muestra unos resultados mucho más similares a los obtenidos en este estudio. Una posible explicación podría ser la utilización de dietas diferentes. En el experimento de Fliesler se utilizaron dietas hipercolesterolemiantes de bajo grado (4% grasa, 0.02% colesterol), mientras que Ong utilizaba una dieta de más alto poder hipercolesterolemiantes (11% grasa, 0.03% colesterol) y muy similar a la utilizada por nosotros (15.8% grasa, 1.25% colesterol) en el presente estudio.

1.2.2 CAPA DE CÉLULAS GANGLIONARES Y DE FIBRAS DEL NERVIO ÓPTICO.

Hemos descrito el aumento del grosor de la capa de fibras nerviosas (al contrario de lo que ocurre en todas las estructuras estudiadas, salvo la MB) con diferencia significativa entre ApoE y ApoE+D respecto al control, pero sin

diferencias entre ellos. Para justificar este hallazgo, hacemos válidos todos los argumentos aportados en la discusión sobre los NO donde también se demostró la presencia de axones hipertróficos. A lo largo de todo el estudio morfológico bajo microscopía electrónica de gran aumento, uno de los hallazgos más destacados ha sido la existencia de células ganglionares dañadas donde detectamos vacuolizaciones citoplasmáticas junto a la existencia de alteraciones mitocondriales. La determinación por medio de la técnica *western-blot* mostró una importante diferencia en cuanto a la expresión de GFAP a nivel retiniano de los grupos ApoE y ApoE+D con respecto al Control, lo que marca la existencia de daño celular en los astrocitos situados a nivel de la capa de fibras nerviosas, tal y como ocurría en el NO y en las células de Müller (221).

Viendo en conjunto todos los resultados expuestos, no existe diferencia significativa entre los grupos ApoE y ApoE+D, lo que apoyaría la hipótesis de que en las capas más internas de la retina tenga más importancia el papel funcional de ApoE que el estado hiperlipidémico que muestran los animales, y de modo similar a lo expuesto para los NO.

Estos hallazgos quedarían además justificados por la teoría propuesta por Amaratunga y cols. (59), donde las células de Müller serían sintetizadoras de apoproteínas necesarias para la utilización y homeostasis de los lípidos retinianos, independientemente de los niveles séricos. Pensamos que estas lipoproteínas jugarían un papel de reserva para la demanda de lípidos por las neuronas retinianas y ante la carencia de estas, quedarían más afectadas las neuronas con axones más largos, como las células ganglionares de la retina, altamente vulnerables a enfermedades neurodegenerativas como el glaucoma. En este sentido existen evidencias en otros trabajos de investigación (65, 80) donde se documenta en animales ApoE *Knockout* una disminución de la inmunorreactividad a Anhidrasa Carbónica II y Caretinina, indicando la primera un daño a nivel de las células de Müller y la segunda una alteración de las células ganglionares.

1. 2. 3 LA MEMBRANA DE BRUCH Y EL EPITELIO PIGMENTARIO DE LA RETINA.

Se ha comprobado que el acúmulo de materiales en el área del EPR y MB incluyendo la presencia de partículas de baja densidad electrónica, depósitos basales laminares (222,223), y depósitos basales lineales (224-226) ocurre durante el envejecimiento y, al menos los depósitos basales lineales son frecuentes en patologías como la DMAE y se asocian a la presencia de vesículas rodeadas de membranas. También se ha demostrado con el envejecimiento, la aparición de un acúmulo de lípidos en la MB (227). Los ratones ApoE y ApoE+D reciben por vía coroidea una gran cantidad de lípidos, en especial de colesterol.

Nuestro análisis morfométrico respecto al grosor de la MB ha revelado un aumento de ésta en los grupo ApoE y ApoE+D con respecto al grupo Control.

El estudio ultraestructural de las MB ha demostrado la presencia de dos tipos de perfiles vacuolares: vacuolas difusas, no rodeadas aparentemente por ninguna estructura membranosa (VNM) y por otro lado hemos detectado la presencia de vacuolas mayores, delimitadas y que sí parecían quedar limitadas por membranas (VM). Estos hallazgos son compatibles con los descritos en la MB de donantes de edad avanzada, donde se demuestra un engrosamiento de esta junto con la presencia de VNM (228). Parece que la composición bioquímica de las VNM es similar a la composición de las placas de ateroma (82). La composición de las VM, presente en algunos casos en las drusas, está aún por aclarar pero se ha asociado a la DMAE (224).

Dibmar (82), en su trabajo muestra resultados semejantes a los nuestros, donde concluye que las VNM son el resultado de la hipercolesterolemia, la arteriosclerosis y el envejecimiento generalizado, como lo demuestra la presencia de estas vesículas en animales ApoE *Knockout* jóvenes y viejos y solo en ratones *wildtype* viejos. En el origen de las VM podría hallarse una hipercolesterolemia extrema o algún factor propio dependiente de ApoE pues estas vesículas rodeadas por membranas están presentes casi únicamente en el grupo ApoE *Knockout*.

En este proyecto de tesis hemos utilizado, a diferencia del grupo de Dibmar, ratones ApoE+D, con niveles de colesterol aún más elevados, pero en animales más jóvenes. El resultado ha sido un aumento en el número de VNM de los ApoE+D respecto a ApoE, y la presencia de VM en todos los animales de los grupos ApoE y ApoE+D y en ningún control. Esto reforzaría la teoría de una influencia lineal de los niveles séricos de colesterol para las VNM mientras que podría existir alguna función propia de ApoE para controlar la aparición de VM, que como hemos visto, tienen una alta relación con la DMAE. Además esta hipótesis reforzaría las teorías sobre el papel protector de ciertos alelos de ApoE frente a la DMAE (71-75).

En el estudio del EPR hemos constatado una pérdida de la polarización apical de los gránulos de melanina así como una alteración evidente en su morfología que se aprecia en los ratones pertenecientes a ApoE y ApoE+D en comparación a los controles (229, 230), además el grosor medio y los núcleos celulares eran significativamente menores en los grupos del estudio con respecto al Control. Este fenómeno es semejante a los efectos que aparecen con el envejecimiento en retinas humanas. La distribución topográfica de los gránulos de melanina se mantiene al comienzo de la vida pero, a partir de los 40 años (231-233) se demuestra una pérdida en el número de melanosomas a la vez que se comienza a perderse la distribución apical de estos, situándose algunos de ellos a nivel basal del EPR. Los gránulos de pigmento melánico comienzan un proceso de digestión lisosomal. Este proceso de digestión es lento a lo largo de la vida y la consolidación y reorganización de los residuos de melanina, lisosomas secundarios y gránulos de lipofucsina da lugar a la reestructuración morfológica de los gránulos de melanina (231). Los hallazgos puestos de manifiesto en cuanto la distribución topográfica de estos gránulos, así como a su morfología y morfometría son sugerentes de la existencia de un proceso de envejecimiento acelerado de estos ratones.

En resumen: Podemos decir que de los hallazgos mostrados en las retinas de estos ratones *Knockout* son debidos a un mecanismo mixto del que formarían parte los elevados niveles de colesterol sanguíneo y la función local que ejerce la propia

ApoE. Nos inclinamos a sugerir que los hallazgos documentados en las capas medias de la retina (nuclear externa e interna), son consecuencia de los altos niveles de colesterol, mientras las alteraciones detectadas en la capa de células ganglionares, capa de fibras, EPR y MB son debidas también en parte a la ausencia del papel local que desarrollaría ApoE y que además coinciden con las capas retinianas donde existe síntesis local de ApoE (55-57).

2. EL GRUPO P27^{KIP1} *KNOCKOUT*.

De entre todos los grupos estudiados, el grupo de ratones *Knockout* P27 es el que presenta mayores diferencias con respecto al grupo Control, tanto en lo referente al estudio morfológico como morfométrico, estudio inmunocitoquímico y a los resultados del *western-blot* e *immunoblotting*. Además es el único grupo en el que se ha detectado mediante el "test de escape" una alteración funcional importante y extrapolable a nuestros resultados estructurales.

En el estudio morfológico son abundantes los hallazgos que ponen de manifiesto la existencia de una grave afectación de los tejidos tanto en la retina como en el nervio óptico. Sin embargo, llama la atención la diferencia existente en cuanto a los resultados del estudio morfométrico. Mientras en el NO *Knockout* se detectan valores superiores a los descritos para la morfometría de los NO Control, en la retina estos resultados se manifiestan a la inversa, es decir, las capas retinianas *Knockout* presentan menor grosor que las Controles. A lo largo de esta discusión trataremos de matizar y explicar estas diferencias.

2.1 Los nervios ópticos de los ratones P27^{kip1} *knockout*.

En nuestro trabajo hemos demostrado como los NO de los ratones del grupo P27 presentan un área de la sección transversal del nervio y sección transversal axonal significativamente superiores a la del grupo Control, aunque la densidad de axones (número axonal dividido por la unidad de superficie) ha sido inferior. Este último dato se explicaría por el mayor tamaño de estos elementos y no por la existencia de abundantes espacios vacíos inter-axonales, como podríamos pensar. Por otro lado, cabe destacar que el número total de fibras que componen el NO es también significativamente mayor que el del grupo Control.

Estos datos apuntan hacia un patrón hipertrófico-hiperplásico de los NO. Los resultados que acabamos de mostrar son perfectamente congruentes con el papel desarrollado por P27^{kip1} como elemento "enlentecedor" del ciclo celular. Al no existir estos complejos inhibidores en los animales *Knockout*, se produce una situación en la que realmente hay menos impedimento para el proceso de fosforilación de la proteína del retinoblastoma, facilitando la entrada de la célula en el ciclo celular y por tanto predominando los patrones hipertróficos e hiperplásicos. Esto ha sido también documentado en determinados tejidos de ratones P27^{kip1} *Knockout* (147-151), que hemos mencionado en la introducción. Hay que destacar la existencia de un índice de mielinización significativamente inferior en el grupo de los axones de mayor tamaño, que por otro lado son los más abundantes, lo que unido a la presencia de numerosas alteraciones en la vaina de mielina apunta hacia el hecho de que en estos modelos haya una deficiencia en el proceso de mielinización y/o presencia generalizada de un proceso de muerte celular programada: apoptosis, sobre el que profundizaremos más adelante. Además procesos pudieran ocurrir simultáneamente o en fases cronológicamente separadas.

Ahondando en la teoría de la dismorfogénesis, existen publicaciones que postulan que P27^{kip1} es un trófico para la mielinización axonal al facilitar la correcta maduración de los oligodendrocitos (234). Casaccia-Bonnefil (235) concluye que *in vitro* estos elementos en cerebros P27^{kip1} *Knockout* presentan un freno en su proceso de diferenciación, a expensas de su incremento en la mitosis y proliferación, llegándose a detectar oligodendrocitos que no expresan MBP. Concluyen que esta línea neuroglial está alterada y esto lleva implícita una dudosa capacidad de mielinización, ya que los oligodendrocitos maduros se desarrollan a partir de sus progenitores, atravesando diferentes estados hasta su diferenciación completa (236) para poder comenzar la formación de la mielina. Como el proceso de diferenciación a través de los diferentes estados evolutivos de la célula está intrínsecamente ligado al ciclo celular (237, 238), es razonable pensar que los reguladores de este ciclo jueguen un papel importante en

el proceso de diferenciación. En este sentido, un marcador específico del funcionamiento y maduración adecuada del oligodendrocito es la correcta codificación del gen que sintetiza la MBP, proteína que como hemos expuesto es fundamental para correcta estructuración de las vainas de mielina.

En los resultados de esta tesis hemos comprobado la disminución en la expresión de MBP (por medio de técnicas de inmunocitoquímica y de *western-blot*) y la alteración en el proceso de mielinización de los axones de los ratones P27^{kip1} *Knockout*.

De cualquier forma, queremos dejar constancia en este punto, de que hay autores que apuntan hacia la posibilidad de que P27^{kip1} tuviera una influencia directa sobre la producción de MBP diferente al que derivaría de su función en el ciclo celular, y por esto sobre la maduración oligodendroglial (235, 239). Casaccia-Bonnet (235) sugiere que en los animales P27^{kip1} *Knockout*, pudiera existir un aumento de la mielinización y de la expresión de MBP (en contra de lo esperado), lo que podría explicarse porque estos oligodendrocitos, aunque más inmaduros, poseerían gran capacidad mitótica llegando un porcentaje de ellos a ser hábiles para una correcta mielinización, incluso en mayor número que en ratones control. El hecho final es que en nuestro modelo la mielina que conforma la envoltura periaxonal y la expresión de la MBP se encuentran gravemente alteradas. Esto puede ser consecuencia bien de la influencia directa de la no-expresión de P27^{kip1} sobre el ciclo celular y la maduración de los oligodendrocitos, bien de la falta de un estímulo directo de este factor sobre la producción de MBP, o como parece más probable, que estas alteraciones sean consecuencia del inicio de un proceso de apoptosis. Y en este sentido, guiándonos únicamente por las imágenes obtenidas en las descripciones morfológicas, hemos hallado perfiles micrográficos altamente sugerentes, especialmente en los núcleos de las células macrogliales, de que en estos tejidos exista un proceso de apoptosis.

La apoptosis o muerte celular programada, es un mecanismo fisiológico activo en el cual el metabolismo celular está bajo el control de genes específicos. Es un fenómeno completamente distinto a la necrosis, donde se produce una muerte accidental o

pasiva. En la apoptosis la membrana plasmática está íntegra, sucediéndose los cambios a nivel nuclear por condensación de la cromatina y fragmentación del ADN, como consecuencia de la acción de endonucleasas específicas que activan el calcio y el magnesio endógenos. Estos fragmentos dan lugar a uno o varios nucleosomas que posteriormente, por condensación de las organelas citoplasmáticas, constituirían los cuerpos apoptóticos (240,241).

La relación entre P27^{kip1} y apoptosis ha sido comentada en la introducción. A modo de resumen y para continuar con el hilo de la discusión, mencionar que ya que P27^{kip1} favorece la detención en la fase G1 del ciclo celular y es en este punto donde se produce la apoptosis, sería razonable pensar que este es un factor pro-apoptótico: reduce la mitosis de los tejidos, favorece la diferenciación de estos y además controla el buen estado celular eliminando células alteradas por medio de la activación de la apoptosis (138,139,140,141). Sin embargo otros autores han atribuido en determinadas circunstancias a P27^{kip1} un papel antiapoptótico (142,143). En este modelo P27^{kip1} *Knockout*, podríamos pensar que existiera un estímulo para la entrada de la célula en el ciclo celular, con aumento de las mitosis, disminución en la diferenciación y protección frente a la apoptosis. Sin embargo, podemos suponer que debe existir algún mecanismo independiente de P27^{kip1} que controle este proceso y active el mecanismo de la apoptosis contrarrestando así el incremento en el número de las células poco diferenciadas. En la década de los 90 se sugirió que el fallo en la coordinación y diferenciación celular podría producir un fallo en la normal configuración de los tejidos, debido tanto a la proliferación celular como a la apoptosis (242,243). Casaccia-Bonnet (235) describe la existencia de núcleos apoptóticos en las células macrogliales de los NO de ratones P27^{kip1} *Knockout*. Este hallazgo contrasta con el buen estado axonal que describen (sin apenas alteración en la mielina ni degeneraciones intraxonales). Por el contrario, en nuestro modelo hemos descrito la existencia de perfiles compatibles con núcleos apoptóticos de células macrogliales, con condensaciones de cromatina formando nucleosomas, junto a axones con graves

degeneraciones y fragmentaciones de las vainas de mielina y vacuolización intra-axonal. Estos hallazgos han sido también reportados por diferentes autores, en relación a diferentes causas que afectan al NO mediante un proceso de apoptosis avanzada (244-246).

Para explicar la existencia de células macrogliales apoptóticas, Casaccia-Bonnet (235) apunta hacia la teoría de que, en su modelo $P27^{kip1}$ *Knockout* existe una superpoblación de elementos astrogliales y oligodendrogliales, produciéndose menor contacto entre axones y glía, afectándose la relación axonal-glial que conduce a la activación de apoptosis con autodestrucción de la macroglía. La teoría de que el número de células macrogliales viene determinado por el contacto axonal y que en ausencia de este factor, astrocitos y oligodendrocitos tienden a autodestruirse, ha sido ya descrita por otros autores (247,248). Sin embargo, en nuestro caso nos aventuramos a discrepar parcialmente de esta hipótesis y pensamos que el proceso de muerte celular programada es un proceso generalizado, que en el caso de los NO afecta tanto a células macrogliales como a axones, y cuya afectación ya proviene de la afectación de las células ganglionares de la retina. En el modelo de Casaccia-Bonnet (235) los animales tienen de 1 a 3 semanas, mientras que en nuestro caso los ratones tienen de 16 a 24 semanas. Es posible que los fenómenos apoptóticos detectados en las células macrogliales no sean consecuencia de la falta de un estímulo de contacto neuro-glial como postulan estos autores, sino las primeras fases de la activación de un proceso de apoptosis generalizada que se hace patente en edades más tardías de la vida y donde astrocitos y oligodendrocitos serían más sensibles a este proceso y por tanto se afectarían más precozmente (249).

Para reforzar nuestra hipótesis sobre la apoptosis generalizada, sería interesante la realización de ensayos más precisos donde se documentaran las alteraciones ocurridas cronológicamente desde la embriogénesis hasta las últimas etapas de la vida de estos modelos. Del mismo modo sería imprescindible la realización de técnicas histoquímicas como el método TUNEL (terminal transferase-dUTP nick end labeling)

(250) que confirmaran la existencia de apoptosis. Esta posibilidad queda abierta para futuras investigaciones en esta misma línea.

En resumen: Pensamos que en los NO de los modelos P27^{kip1} *Knockout* existe un patrón hipertrófico-hiperplásico del que puede ser responsable la acción trófica sobre el ciclo celular consecuencia de la ausencia de expresión de este factor. Secundariamente y como posible mecanismo compensador, se desencadena un proceso de muerte celular programada, que como responsable de la dismorfogénesis, explicaría nuestros hallazgos morfológicos y morfométricos en este modelo experimental.

Las retinas de los ratones P27^{kip1} *Knockout*.

En el estudio morfológico de las retinas de los ratones del grupo P27 destaca la presencia de perfiles micrográficos compatibles con un proceso de apoptosis generalizada. Además nuestros estudios morfométricos demuestran adelgazamiento de capas retinianas (a excepción de la capa retiniana de fibras del NO), con disminución de la densidad celular en las capas nucleares sugiriéndose un patrón de atrofia generalizada retiniana inducida por la apoptosis y destacando de entre todas, las graves alteraciones celulares que se documentan a nivel del EPR y segmentos externos de los fotorreceptores, donde son abundantes los núcleos en diferentes fases de condensación de la cromatina, roturas mitocondriales, presencia de cuerpos apoptóticos intracelulares y espacios vacíos. La expresión de GFAP por parte de células de Müller y astrocitos retinianos, está disminuida en comparación al grupo Control.

Los hallazgos descritos por nosotros a lo largo de este estudio son opuestos, en parte, a los presentados por las escasas publicaciones donde describen las retinas de los ratones P27^{kip1} *Knockout*.

Nakayama (147) describe una distrofia retiniana en este modelo, que no ha sido descrito en humanos, pero que coincide con otras descripciones similares en retinas

de ratones expuestos a agentes químicos como el ácido 2-aminoxi propiónico (251). La distrofia descrita por este autor consiste básicamente en la invasión de la capa de segmentos de los fotorreceptores por núcleos pertenecientes a la capa granular externa que atraviesan la membrana limitante externa. Junto a estos hallazgos parece existir un estado de mitosis acelerada que se plasma en un tejido retiniano con predominio de hiperplasia e hipertrofia celular, lo que llevaría a un engrosamiento generalizado de todas las capas, al contrario de lo que hemos descrito en el capítulo de resultados de este trabajo. Sin embargo existen algunos puntos en común entre este investigador y nuestra descripción. Como referíamos anteriormente, dentro de la desorganización citoarquitectónica retiniana mostrada por el modelo experimental utilizado por nosotros, destacaban sobre el resto las graves alteraciones detectadas en la capa de los segmentos externo e interno de los fotorreceptores y en el EPR. Pues bien, Nakayama (147) demuestra que los fotorreceptores son las células que expresan con mayor fuerza el factor P27^{kip1}. En estas células y del mismo modo en que ha sido comprobado en otros tejidos (148-150), existiría un control inapropiado del crecimiento celular derivado de la ausencia de expresión de P27^{kip1}. Otro punto clave para intentar "conectar" nuestras observaciones con las de Nakayama (147) es el estudio cronológico realizado por Dyer y Cepko (252), a lo largo de la morfogénesis pre- y postnatal de las retinas de ratones P27^{kip1} *Knockout*. Este estudio revela como la cantidad de células en mitosis decrece progresivamente con el desarrollo, hasta no hallarse células en mitosis a partir de la segunda semana postnatal. Esto explicaría como tras un periodo de hiperplasia y abundantes mitosis celulares, algún factor consigue frenar esta tendencia. Así mismo Dyer y Cepko (252), demuestran utilizando técnicas inmunohistoquímicas de Bromodeoxiduridina y técnica del TUNEL (250), como en los estadios más embrionarios del desarrollo retiniano apenas se detectan núcleos apoptóticos, mientras que con el progreso del desarrollo se apreciaba un incremento en la proporción de núcleos apoptóticos en comparación a los ratones *wildtype* y además este incremento era mayor en la capa nuclear externa. Además, se ha

comprobado que la activación del mecanismo de muerte celular programada por la no expresión del factor P27^{kip1} comienza en fases bien avanzadas del desarrollo, al contrario de lo que ocurre con los ratones P57^{kip1} *Knockout* (otro inhibidor del ciclo celular) donde esta apoptosis se activa inmediatamente tras la mitosis de la célula (253). Todo esto explicaría como tras un periodo de abundantes mitosis (resultado de la ausencia de la capacidad inhibidora de P27^{kip1} sobre el ciclo celular), se activa un mecanismo de control como es la apoptosis. Este mecanismo comienza a activarse en las fases tardías del desarrollo o incluso en animales ya maduros. Nakayama (147) o Dyer y Cepko (252) trabajan con animales en estadios prenatales o a lo sumo de 3 semanas de vida. En nuestro trabajo hemos utilizado ratones de mayor edad, donde creemos que la "balanza" entre apoptosis y mitosis se ha inclinado hacia la primera. Esto tiene como consecuencia la destrucción de cualquier resto de hiperplasia, de disgenesia celular o patrón retiniano distrófico y dando lugar a la aparición de una atrofia retiniana post-apoptosis que ya ha sido descrita en otras situaciones (254-256).

Curiosamente Dyer y Cepko (252) no hallan cambios en la proporción de neuronas retinianas ni afectación apoptótica. En nuestro estudio, a pesar de hallar algún signo de vacuolización y edema periaxonal, hemos documentado un aumento del grosor de la capa de fibras, que podría explicarse por una diferencia cronológica de las fases mitosis-apoptosis, de tal forma que en el tejido puramente neural la aparición de los fenómenos apoptóticos sería más tardía o incompleta. En parte, esto explicaría también la diferencia morfométrica entre retina y NO observada en los P27^{kip1} *Knockout*. Hipotéticamente en los NO existiría una afectación apoptótica incipiente, y como consecuencia no habría contrarrestado la fase hipertrófico-hiperplásica, que se mostraría en estado álgido (al contrario de lo sucedido en la retina).

Todas las alteraciones descritas en las retinas y NO del grupo P27^{kip1} *Knockout* apuntan hacia una afectación grave en la capacidad visual de estos animales, como así se ha puesto de manifiesto en los resultados del "test de escape", sin descartar que

junto a estas alteraciones, existieran también deficiencias en la capacidad de aprendizaje de estos ratones.

Por otra parte, intentamos establecer una relación entre el retinoblastoma y el modelo $P27^{kip1}$ *Knockout*. Como indicamos en la introducción, el desarrollo de las células retinianas depende de la regulación del ciclo celular y cualquier alteración en éste resulta en determinadas anomalías retinianas. La pérdida de la capacidad funcional de la proteína del retinoblastoma fue descrita por primera vez en el propio tumor. La proteína del retinoblastoma (pRb) regula la progresión de la célula desde la fase G1 del ciclo celular, y su capacidad antimitogénica es suprimida cuando esta proteína es fosforilada, facilitándose de esta forma la mitosis celular. Por otro lado $P27^{kip1}$ es un potente inhibidor del complejo ciclina-quinasa dependiente de ciclina que se encarga de fosforilar a la pRb, de tal manera que la no-expresión de $P27^{kip1}$ en los modelos $P27^{kip1}$ *Knockout* tiene como consecuencia final la inactivación del proceso inhibidor, y por tanto la fosforilación de la pRb. A pesar de la complejidad de la interacción entre las distintas ciclinas, quinasas dependientes de ciclinas e inhibidores, que en parte han quedado comentados en la introducción, podemos intuir un resultado final que incrementaría la mitosis al suprimir tanto la acción de la pRb como del inhibidor $P27^{kip1}$. En el primer caso el resultado sería hacia la anaplasia y en el segundo hacia la hiperplasia en principio e inmediatamente hacia la apoptosis con atrofia. Sin embargo, y en un plano puramente especulativo ¿podrían ser las invaginaciones de los núcleos de los fotorreceptores descritas por Nakayama (147) estructuras semejantes a la rosetas observadas en los retinoblastomas?. En este momento sólo podemos contestar que ambas tienen su origen aparentemente en los fotorreceptores (257) y que ambas son consecuencia de la modificación de diferentes factores que intervienen en el ciclo de las células retinianas. No hemos encontrado ninguna estructura semejante al retinoblastoma en las retinas $P27^{kip1}$ *Knockout*. Sí se han descrito tanto en estos modelos como en modelos $RB^{-/+}$ *Knockout* una elevada

incidencia de tumores hipofisarios, (147,149,150,151), lo que vendría a dar mayor fuerza a la relación entre P27^{kip1} y pRb .

En resumen: Pensamos que en las retinas de los animales P27^{kip1} *Knockout*, tras una fase de hiperplasia celular con abundantes mitosis, se activa una respuesta pro-apoptótica. Es posible que exista una diferencia cronológica en el paso de una a otra fase en tejidos como la retina y el NO.

3. EL GRUPO PTEN *KNOCKOUT*.

La característica diferencial más importante entre este y el resto de los grupos genéticamente manipulados de nuestro estudio, es que en este caso trabajamos con animales heterocigotos (aquellos en los que solamente ha sido suprimida la expresión del gen en uno de los alelos). Debemos reflejar aquí, que los animales homocigotos para esta mutación no son viables (157, 158). El estudio de animales heterocigotos puede tener por consecuencia que el gen alelo adquiera dominancia y que el fenotipo del animal no demuestre ninguna de las alteraciones que podrían ser atribuidas al gen en estudio. En otras ocasiones se aprecia como los animales heterocigotos presentan alteraciones fenotípicas idénticas, o incluso aún más significativas que las mostradas por sus homólogos homocigotos (252). En este caso sabemos que los ratones PTEN -/+, al menos muestran cambios importantes en determinados tejidos como mama, tracto gastrointestinal o próstata (168, 169) lo que demuestra que el alelo activo no asume todas las funciones ni se comporta de una forma dominante.

La mayoría de las publicaciones que hacen referencia a la función de PTEN han resultado del estudio en cultivos celulares sobre células homocigotas, o bien donde se ha inactivado la expresión del gen de PTEN en ambos alelos, pero sólo en un grupo de células de un ser vivo. Por todo esto, la extrapolación y comparación de los resultados obtenidos en este proyecto de tesis con muchas de las publicaciones existentes parten de un sesgo que debemos destacar.

Al compararlo con el grupo de ratones ApoE, ApoE+D y P27 vemos que es de entre todos ellos el que menos características diferenciales presenta con respecto al grupo Control. Hecho que puede ser atribuido a la función del propio gen o a la mencionada condición de animales heterocigotos.

Tampoco hemos encontrado diferencias notables en este grupo en cuanto a los patrones morfométricos entre retinas y NO. Por todo ello, en este grupo

analizaremos de una forma conjunta los resultados obtenidos de ambas estructuras.

3.1 Los nervios ópticos y las retinas de los ratones PTEN.

De los resultados de nuestro trabajo podemos deducir que los NO de los ratones pertenecientes al grupo PTEN *Knockout* presentan áreas axonales y de las secciones transversales de los NO significativamente aumentadas con respecto al grupo Control. La densidad axonal (número de axones por unidad de superficie) se encuentra disminuida como consecuencia del aumento de tamaño presentado por los axones. El cálculo aproximado del número total de axones en los NO no es superior al hallado en el grupo Control. Por lo tanto, los NO del grupo PTEN presentan un patrón morfológico hipertrófico con respecto al Control, sin que hallamos podido demostrar en ellos la existencia de hiperplasia.

El grosor retiniano total está aumentado. Destaca la capa de segmentos externos e internos de los fotorreceptores, que muestra proporcionalmente un mayor grosor respecto a las otras capas. Hemos encontrado una densidad celular similar entre grupos, en las capas nucleares externa e interna de la retina. Podemos deducir que al menos a este nivel tampoco hemos podido demostrar la existencia de hiperplasia celular.

En cuanto al estudio morfológico destacamos en el NO la presencia de alteraciones de las vainas de mielina en porcentaje algo superior al observado en el grupo control, destacando la existencia de "desflecamientos", aberraciones en las láminas o espacios vacíos entre las capas de la mielina. El examen microscópico de la retina demuestra, igual que en los grupos ApoE y ApoE+D, la pérdida de una distribución topográfica apical de los gránulos de pigmento y un engrosamiento de la MB.

Ni con en el estudio inmunocitoquímico, ni con la utilización de la técnica de *western-blot* hemos podido demostrar diferencias en cuanto a la expresión de MBP o GFAP de los animales PTEN *Knockout* con respecto al grupo Control.

De todo esto podemos deducir que, tanto en las retinas como en los NO de los ratones genéticamente manipulados para el gen PTEN, existe un patrón de hipertrofia celular sin hiperplasia y la organización citoarquitectónica está relativamente bien conservada.

Nuestros resultados concuerdan con los expuestos por He Huang (170), del que hemos dado cuenta detallada en la introducción, en un estudio comparativo entre ommatidias normales de moscas *Drosophila* y otras a las que se les había suprimido la expresión de PTEN. Al igual que en nuestros resultados, estas ommatidias presentaban un aumento en el tamaño celular pero una correcta estructuración en el tejido.

Durante el desarrollo de los organismos multicelulares, el crecimiento y la diferenciación celular se hallan estrictamente controladas. Aunque se han hecho descubrimientos para su conocimiento, seguimos sin conocer todos los mecanismos celulares y moleculares que influyen en este proceso. De hecho sabemos que el primer paso hacia la proliferación y crecimiento celular depende, la mayoría de las veces, de mediadores intercelulares que introducen a la célula en el ciclo celular. En el caso de PTEN hemos visto como este era un regulador de actuación precoz tras el estímulo sobre la membrana celular de determinados factores de crecimiento, que en el caso de PTEN eran la insulina, el factor de crecimiento epidérmico, o la matriz extracelular. PTEN se "encarga" de desfosforilar el PIP3, frenando de esta manera la intención de los factores extracelulares que pretendían iniciar el ciclo celular, por medio de la inhibición de determinados controladores intracelulares del ciclo, como era P27^{kip1}, o factores proapoptóticos. Para hacer más comprensible la argumentación, diríamos que PTEN es un inhibidor de la proliferación celular que se encuentra en la parte más alta de la cadena de los elementos reguladores intracelulares. De una

manera intuitiva, podremos pensar que si existe un fallo en la función de PTEN se "perderá" un importante inhibidor de los factores extracelulares de crecimiento, por lo que de alguna forma, estos tendrán más "fuerza" en su actuación, pero a la vez, los factores reguladores intracelulares que se encuentran por debajo de PTEN tendrán otras posibilidades de activación y correulación por otras vías, lo que modulará el resultado final, que se traducirá como hemos visto, en un aumento del tamaño celular sin la presencia de graves alteraciones tisulares como ocurría en el caso de los P27^{kip1} *Knockout*.

Dada nuestra falta de conocimiento sobre todos los mecanismos reguladores del ciclo celular y la característica del modelo estudiado como heterocigoto, la hipótesis anterior es en cierto modo más especulativa que rigurosa.

Sin embargo, Wittwer y cols. (258) muestran en su investigación (también sobre ommatidias de moscas *Drosophila*), resultados que pudieran reforzar nuestra hipótesis. Ellos demuestran como la pérdida de la función del gen *Lilli*, al contrario de lo que ocurre con la supresión de PTEN, conduce a una reducción en el tamaño celular y del organismo, siendo estas células por lo demás normales. *Lilli* actúa como un regulador positivo de la vía PI3K/PKB (259,260,261), cuyo segundo mensajero es PIP3, que a su vez era inhibido por PTEN. Así la inactivación de un regulador positivo, situado también en la cima de la cadena de control intracelular del ciclo celular, conduce a fenómenos de disminución en el tamaño celular. Y aún más, si en este momento frenamos la expresión de PTEN, neutralizaremos el efecto y las células tenderían a recuperar su tamaño original sin que se aprecien fenómenos evidentes de pérdida en la organización tisular, disgenesias o fenómenos apoptóticos.

Para finalizar, quisiéramos enfatizar tres tipos de alteraciones morfológicas que hemos mencionado al principio de este apartado: la alteración de la mielina de algunos axones con espacios vacíos entre las laminillas de mielina, el engrosamiento de la MB y la pérdida de la polarización apical de los gránulos de pigmento en el EPR. Estos

hallazgos, en nuestra opinión, podrían ser signos de un envejecimiento precoz del aparato visual en estos animales.

La pérdida de la topografía de los gránulos de melanina en el EPR como signo de envejecimiento ya fue comentada en esta discusión cuando comentamos el modelo P27 y no ahondaremos más en ella.

En cuanto al engrosamiento de la MB, está bien documentado que esta aumenta su espesor progresivamente con el tiempo, llegando a doblar su tamaño inicial en las etapas finales de la vida (262-266) y parece que este engrosamiento se produzca a expensas de las capas internas de la membrana. Esto podría deberse al remodelamiento de sus estructuras fibrosas y al depósito de material. Entre los cambios más precoces destaca la presencia de material granular y vesículas no membranosas como las que hemos descrito para este modelo.

Las alteraciones en cuanto a la morfología que se ha documentado en las cubiertas de mielina de los ratones del grupo PTEN han sido descritas, junto a otras, como consecuencia de los cambios en los axones producidos por el envejecimiento en ratones *wildtype* de más de 12 meses de edad (267,268).

En resumen: De todo lo anterior podríamos sugerir que el efecto de la supresión de uno de los alelos de PTEN en el ratón tiene como consecuencia un estímulo positivo para el crecimiento, en cuanto al tamaño celular en las retinas y NO, sin producirse fenómenos dismorfogénicos, y además podemos sugerir que podría producirse un envejecimiento precoz de estos animales, de forma congruente con la aceleración del ciclo vital que se ha producido en estos ratones genéticamente manipulados.

Para finalizar, quisiéramos particularizar sobre la aplicación biomédica y la utilidad práctica en oftalmología, de las descripciones de las retinas y NO de los diferentes modelos que se han hecho a lo largo del presente trabajo.

Con la herramienta que nos brinda el conocimiento de la manipulación genética, vamos a ser capaces en un futuro de aplicar estos conocimientos en la práctica clínica diaria. Cuando conozcamos profundamente el funcionamiento de cada uno de nuestros genes y sus relaciones con los demás, y la tecnología nos brinde la capacidad de poder aplicar de forma controlada la sobre-expresión o inhibición de determinados genes sobre los tejidos deseados y en el momento que necesitemos, en ese momento, será posiblemente cuando la terapia génica se imponga.

Así, y por continuar con esta especulación sobre el futuro de la neuro-oftalmología, podríamos pensar que ApoE, con su función como regenerador neural podría ser sobre-expresada en determinadas isoformas para tratar determinadas enfermedades neurodegenerativas del NO y retina tales como el glaucoma u otros tipos de neuropatías. Su función como controlador local del metabolismo lipídico pudiera utilizarse en el manejo de enfermedades como la degeneración macular asociada a la edad. El control y manejo de P27 podría ser interesante en su faceta como controlador del ciclo celular en enfermedades tumorales como el retinoblastoma. La inhibición de la expresión del gen PTEN podría utilizarse en caso de hipoplasia de papila o microftalmos, dada su función como inhibidor del crecimiento y la diferenciación. Cabe esperar que el control del ciclo celular y los procesos de inhibición-estimulación puedan aplicarse al tratamiento de las vítreo-retinopatías y otras enfermedades proliferativas de la retina, vítreo y nervio óptico, cuyos mecanismos básicos aún hoy permanecen sin esclarecer.



Podríamos decir, que de alguna manera somos en este campo, como lo fueron los anatomistas del siglo XVII, iniciándose en el conocimiento que les brindaba el estudio de la anatomía del cuerpo humano, ignorantes de las futuras técnicas y complejas tecnologías

quirúrgicas que en los siglos posteriores se han desarrollado, pero que necesitaron de los conocimientos básicos aportados por estos hombres.

Aún en los albores del conocimiento de las funciones génicas, debemos conformarnos, por el momento, con el estudio de la repercusión que diferentes genes tienen, o podrían tener, sobre el aparato visual. Por nuestra parte, el estudio de modelos genéticamente manipulados para aplicarlos en neuro-oftalmología comenzó en el año 1999, y ya en el año 2001 realizamos las primeras descripciones sobre los modelos descritos (269-271), y esto ha constituido el propósito de este proyecto de tesis doctoral, con la esperanza de poder aplicarlo en un futuro, al objeto de intentar mejorar la visión y calidad de vida de nuestros pacientes.

Conclusiones.

PARA EL GRUPO DE RATONES APOE KNOCKOUT.

1. La eliminación del gen que codifica la apoproteína E produce en el nervio óptico de los ratones un patrón hipertrófico y alteraciones ultraestructurales, destacando las intra-axonales y de la vaina de mielina. Estas son consecuencia directa de la falta de expresión de este gen y se inducen independientemente de los niveles lipídicos sanguíneos.
2. La ausencia de expresión de la ApoE induce en las retinas de estos ratones la aparición de un patrón hipotrófico e hipoplásico, con especial afectación de las capas nuclear externa e interna, así como de la membrana de Bruch. Estas alteraciones son dependientes de los niveles de colesterol y triglicéridos plasmáticos, secundarios a la ausencia de ApoE.
3. Las alteraciones morfológicas del nervio óptico y retina, producidas por la ausencia de ApoE, no provocan alteraciones en la percepción de estímulos luminosos.

PARA EL GRUPO DE RATONES P27^{kip1} KNOCKOUT.

1. La ausencia del gen que codifica el inhibidor P27^{kip1} produce en el nervio óptico de los ratones adultos la aparición de un patrón hipertrófico e hiperplásico con especial afectación de los núcleos de las células macrogliales

que presentan cambios por condensación de la cromatina. Además, existen degeneraciones axonales.

2. La ausencia del gen que codifica el inhibidor P27^{kip1} provoca la aparición en la retina de estos ratones de un patrón marcadamente hipoplásico e hipotrófico, con especial afectación de la capa de segmentos de los fotorreceptores y del epitelio pigmentario de la retina.

PARA EL GRUPO DE RATONES PTEN KNOCKOUT.

1. La falta de expresión del gen que codifica la proteína citoplasmática PTEN, induce en el nervio óptico y en las retinas de los ratones un patrón hipertrófico, sin que se hayan observado alteraciones en su morfología.

Bibliografía.

1. **Humphries MM**, Rancourt D, Farrar GJ, et al. Retinopathy induced in mice by targeted disruption of the rhodopsin gene. *Nat Genet* 1997; 15(2): 216-219.
2. **Jaissel GB**, May CA, Reinhard J, et al. Evaluation of the rhodopsin knockout mouse as a model of pure cone function. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001; 42 (2): 506-513.
3. **Liang FQ** , Dejneka NS , Cohen DR , et al. AAV-mediated delivery of ciliary neurotrophic factor prolongs photoreceptor survival in the rhodopsin knockout mouse. *Mol Ther* 2001; 3(2): 241-248.
4. **Jena N**, Martín-Seisdedos C, McCue P, et al. BMP7 null mutation in mice: developmental defects in skeleton, kidney, and eye. *Exp Cell Res* 1997; Jan 10: 230(1): 28-37.
5. **Sanford LP**, Ormsby I, Gittenber-de Groot AC, et al. TGFbeta2 knockout mice have multiple developmental defects that are non-overlapping with other TGFbeta knockout phenotypes. *Development* 1977; 124(13): 2659-2670
6. **Matsuda H**. Gene expression and the eye. *Nippon Ganka Zasshi* 2000; 104(12): 858-874.
7. **Ripps H** , Peachey NS , Xu X et al. The rhodopsin cycle is preserved in IRBP "knockout" mice despite abnormalities in retinal structure and function. *Vis Neurosci* 2000; 17(1): 97-105.
8. **Brooks SE** , Gu X , Samuel S, et al. Reduced severity of oxygen-induced retinopathy in eNOS-deficient mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001 ; 42(1): 222-228.
9. **Choi MY** , Yu YS , Kim SK , et al. The effect of oxygen on retinal degeneration in wild-type and hsp70.1 knockout neonatal retinal degeneration mice. *Korean J Ophthalmol* 2001; 15(1): 1-7.
10. **Katz ML** , Redmond TM. Effect of Rpe65 knockout on accumulation of lipofuscin fluorophores in the retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001 ; 42(12): 3023-3030.
11. **Saari JC** , Nawrot M , Garwin GG , et al. Analysis of the visual cycle in cellular retinol-binding protein type I (CRBPI) knockout mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002; 43(6): 1730-1735.
12. **Zhou G** , Strom RC , Giguere V , et al. Modulation of retinal cell populations and eye size in retinoic acid receptor knockout mice. *Mol Vis* 2001; 7: 253-260.
13. **Li J** , Patil RV , Verkman AS. Mildly abnormal retinal function in transgenic mice without Müller cell aquaporin-4 water channels. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002 ; 43(2): 573-579.
14. **Weber BH** , Schrewe H , Molday LL , et al. Inactivation of the murine X-linked juvenile retinoschisis gene, *Rs1h*, suggests a role of retinoschisis in retinal cell layer organization and synaptic structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99(9): 6222-6227.
15. **Voet D**, Voet J. *Bioquímica*. Barcelona. Ediciones Omega S.A. 1992; 1451-1460.
16. **Mahley**, RW. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with an expanding role in cell biology. *Science* 1988; 240 : 622-630.
17. **Weisgraber**, K.H. Apolipoprotein E: structure-function relationship. *Adv Protein Chem* 1994; 45; 249-302.
18. **Kowal RC**. Opposing effects of apolipoprotein E and C on lipoprotein binding to low density lipoprotein receptor-related protein. *J. Biol. Chem* 1990; 265: 10771-10779.

19. **Takahashi S**, Kawarabayasi Y, Sakai J, et al. Rabbit very low density lipoprotein receptor-like protein with distinct ligand specificity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89:9252-9256.
20. **Yamamoto T**, Bujo H. Close encounters with apolipoprotein E receptors. *Curr Opin. Lipidol.* 1996; 7: 298-302.
21. **Saxena U**, Ferguson E, Bisgaire CL. Apolipoprotein E modulates low density lipoprotein retention by lipoprotein lipase anchored to subendothelial matrix. *J Biol Chem* 1993; 268: 14812-14819.
22. **Thuren T**, Weisgraber KH, Sisson P, et al. Role of apolipoprotein E in hepatic lipase catalysed hydrolysis of phospholipid in high-density lipoproteins. *Biochemistry* 1992;31: 2332-2338.
23. **Davignon J**, Gregg RE, Sing CF. Apolipoprotein E polymorphism and arteriosclerosis. *Arteriosclerosis* 1988; 8: 1-21.
24. **Boerwinkle E**, Uterman G. Simultaneous effects of the apolipoprotein E polymorphism on apolipoprotein E, apolipoprotein B, and cholesterol metabolism. *Am. J. Hum. Gene.* 1988; 42 :104-112.
25. **Wilson P**, Schaefer EJ, Larson MG, et al. Apolipoprotein E alleles and risk coronary disease. *Arterioscler. Thromb. Vas. Biol.* 1996; 16: 1250-1255.
26. **Brewer HB Jr**, Zech LA, Gregg RE, et al. NIH conference. Type III hyperlipidemia diagnosis, molecular defects, pathology, and treatment. *Ann. Intern. Med.* 1983; 98: 623-640.
27. **Kouff CH**, Hinsdale ME, Mezdour H, et al. ApoE structure determines VLDL clearance and arteriosclerosis risk in mice. *J Clin Invest.* 1999; 103: 1579-1586.
28. **Fukuyama R**, Takeda H, Fushiki S, et al. Muramyl dipeptide injected into crushed sciatic nerve, activates macrophages and promotes recovery of walking locomotion in rats. *Restor Neurol Neurosci.* 2004; 13: 213-219.
29. **Skene J**, Shooter E. Denervated sheathcells secrete a new protein after nerve injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1983; 80: 4169-4173.
30. **Bellosta S**, Nathan B, Orth M, et al. Stable expression and secretion of apolipoprotein E3 and E4 in mouse neuroblastoma cells produces differential effects on neurite outgrowth. *J. Biol. Chem.* 1995; 270(45): 27063-27017.
31. **Gutman CR**, Strittmatter W, Weisgraber K, et al. Apolipoprotein E binds to and potentiates the biological activity of ciliary neurotrophic factor. *J. Neurosci.* 1997; 17: 6114-6121.
32. **Holtzman D**, Pitas RE, Kilbridge J. et al. Low density lipoprotein receptor-related protein mediates apolipoprotein E-dependent neurite outgrowth in a central nervous system-derived neuronal cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1995; 92: 9480-9484.
33. **Huang DY**, Weisgraber HK, Strittmatter WJ, et al. Interaction of apolipoprotein E with laminin increases neuronal adhesion and alters neurite morphology. *Exp. Neurol.* 1995; 13: 251-257.
34. **Miyata M**, Smith JD. Apolipoprotein E allele- specific antioxidant activity and effects on cytotoxicity by oxidative insults and amyloid peptides. *Nature Genetics.* 1996; 14: 55-61.
35. **Alberts AJ**, Graffagnino C, McClenny C, et al. ApoE genotype and survival from intracerebral haemorrhage. *Lancet.* 1995; 346: 575.

36. **Jordan BD**, Relkin N, Ravdin LD, et al. Apolipoprotein E epsilon-4 associated with chronic traumatic brain injury in boxing. *JAMA*. 1997; 278: 136-140.
37. **Slooter AJ**, Tang MX, van Duijin MC, et al. Apolipoprotein E epsilon-4 and the risk of dementia with stroke. A population based investigation. *JAMA*. 1997; 277: 818-821.
38. **Tardiff BE**, Newman F, Saunders AM, et al. Preliminary report of a genetic basis for cognitive decline after cardiac operations. *Ann. Thorac. Surg.* 1997; 64: 715-720.
39. **Teasdale GM**, Nicoll JA, Murray G, et al. Association of apolipoprotein E polymorphisms with outcome after head injury. *Lancet*. 1997; 350: 1069-1071.
40. **Elshourbagy NA**, Liao WS, Mahley RW, et al. Apolipoprotein E mRNA is abundant in the brain and adrenals, as well as in the liver, and is present in other peripheral tissues of rats and marmosets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1985; 8: 203-207.
41. **Stoll G**, Müller HW. Macrophages in the peripheral nervous system and astroglia in the central nervous system of rat commonly express apolipoprotein E during development but differ in their response to injury. *Neurosci. Lett.* 1986; 72: 233-238.
42. **Strittmatter WJ**, Saunders AM, Schmechel D, et al. Apolipoprotein E: High-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of the type 4 allele in late-onset familial Alzheimer's Disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1993; 90: 1977-1981.
43. **Strittmatter WJ**, Roses AD. Apolipoprotein E and Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1995; 92: 4725-4 727.
44. **Boyles JK**, Zoellner CD, Anderson LJ, et al. A role for apolipoprotein E, apolipoprotein A-I, and low density lipoprotein receptors in cholesterol transport during regeneration and remyelination of the rat sciatic nerve. *J Clin Invest* 1989; 83: 1015-31.
45. **Poirier J**, Hess M, May PC, et al. Astrocytic apolipoprotein E mRNA and GFAP mRNA in hippocampus after endocrinal cortex lesioning. *Mol. Brain Res.* 1991; 11: 97-106.
46. **Struble RG**, Rosario ER, Kircher ML, et al. Regionally specific modulation of brain apolipoprotein E in the mouse during the estrous cycle and by exogenous 17beta estradiol. *Exp. Neurol.* 2003; 183: 638-644. .
47. **Zhang SH**, Reddick RL, Piedrahita JA, et al. Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science*. 1992; 258, 468-471.
48. **Moghadasian M.H**, McManus B M, Godin DV, et al. Pro-atherogenic and anti-atherogenic effects of probucol and phytosterols in apo E-deficient mice: possible mechanisms of action. *Circulation*. 1999; 99, 1733-1739.
49. **Hayck T**, Oiknic J, Brook JG, et al. Increased plasma and lipoprotein lipid peroxidation in apoE-deficient mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1994; 201: 1567-1574
50. **Moghadasian MH**, McManus BM, Frohlich, et al. Coronary artery disease: clinical evidence and genetic and metabolic background. *Arch. Intern. Med.* 1997; 157: 2299-2308.

51. **Khaleeli E**, Peters SR, Bobrowsky K, et al. Diabetes and the associated incidence of subclinical atherosclerosis and coronary artery disease: implications for management. *Am. Heart J.* 2001; 141: 637-644.
52. **Moghadasian MH**, Mc Manus B, Nguyen L, et al. Pathophysiology of apolipoprotein E deficiency in mice: relevance to ApoE-related disorders in humans. *FASEB.*2001; 15: 2623-2630.
53. **Moghadasian MH**, Nguyen LB, Shefer S, et al. Histologic, hematologic, and biochemical characteristics of ApoE-KO mice: effects of dietary cholesterol and phytosterols. *Lab. Invest.* 1999; 79: 355-364.
54. **Fullerton S**, Strittmatter WJ, Matthew W. Peripheral sensory nerve defects in Apoprotein E Knockout mice. *Exp Neurol.* 1998; 153: 156-163.
55. **Anderson DH**, Ozaki S, Neelson M, et al. Local cellular sources of apolipoprotein E in the human retina and retinal pigmented epithelium: implications for the process of drusen formation. *Am J Ophthalmol.* 2001; 131: 767-781.
56. **Brecht WJ**, Harris FM, Chang S, et al. Neuron-specific apolipoprotein 4 proteolysis is associated with increased tau phosphorylation in brains of transgenic mice. *J Neurosci* 2004; 24: 2527-2534.
57. **Diedrich S**, Wietgreffe A, Haase J, et al. Identifying and mapping changes in gene expression involved in the neuropathology of scrapie and Alzheimer's disease. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1999; 172: 259-274.
58. **Xu PT**, Gilbert JR, Qiu HL. Specific regional transcription of apolipoprotein E in human brain neurons. *Am J Pathol.* 1999; 154: 601-611.
59. **Amaratunga A**, Abraham CR, Edwards RB. Apolipoprotein E is synthesized in the retina by Muller glial cells, secreted into the vitreous, and rapidly transported into the optic nerve by retinal ganglion cells. *J Biol Chem.* 1996; 271: 5628-5632.
60. **Shanmugaratnam J**, Berg E, Kimerer L. Retinal Müller glia secrete apolipoproteins E and J which are efficiently assembled into lipoprotein particles. *Brain Res Mol Brain Res.* 1997 ; 50 : 113-120.
61. **Tada T**, Ito J ,Asai M , et al. Fibroblast growth factor 1 is produced prior to apolipoprotein E in the astrocytes after cryo-injury of mouse brain. *Neurochem Int.* 2004; 45: 23-30.
62. **Poirier J**. Apolipoprotein E in animal models of CNS injury and in Alzheimer's disease. *Trends Neurosci.* 1994 ; 17 : 525-530.
63. **Mouchel Y**, Lefrancois T, Fages C, et al. Apolipoprotein E gene expression in astrocytes: developmental pattern and regulation. *Neuroreport.*1995; 7: 205-208.
64. **Kuhr H**, Härtig W, Grimm D, et al. Changes in CD44 and ApoE immunoreactivities due to retinal pathology of man and rat. *J Hirnforsch.* 1997; 38: 223-229.
65. **Schneeberger SA**, Iwahashi CK, Hjelmeland LM, et al. Apolipoprotein E in the subretinal fluid of rhegmatogenous and exudative retinal detachments. *Retina.* 1977; 17: 38-43.
66. **Souied EH**, Benlian P, Rozet JM, et al. Exclusion of the apoE gene in autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Vision Res.* 1998; 38: 3829-3831,
67. **Copin B**, Brezin AP, Valtot F, et al. Apolipoprotein E-promoter single-nucleotide polymorphisms affect the phenotype of primary open-angle glaucoma and demonstrate interaction with the myocilin gene. *Am J Hum Genet.* 2002; 70: 1575-1581.

68. **Mullins RF**, Russell SR, Anderson DH, et al. Drusen associated with aging and age-related macular degeneration contain proteins common to extracellular deposits associated with atherosclerosis, elastosis, amyloidosis, and dense deposit disease. *FASEB J.* 2000; 14: 835-846.
69. **Johnson L**, Ozaki S, Staples M, et al. A potential role for immune complex pathogenesis in drusen formation. *Exp Eye Res.* 2000; 40: 441-449.
70. **Hageman GS**, Mullins RF, Russell SR, et al. Vitronectin is a constituent of ocular drusen and the vitronectin gene is expressed in human retinal pigmented epithelial cells. *FASEB J.* 1999; 13: 477-484.
71. **Yates JR**, Moore AT. Genetic susceptibility to age related macular degeneration. *J Med Genet* 2000; 37:83-7.
72. **Allikmets R**, Shroyer NF, Singh N, et al. Mutation of the Stargardt disease gene (ABCR) in age-related macular degeneration. *Science* 1997; 277:1805-7.
73. **Pauleikhoff D**, Barondes MJ, Minassian D, et al. Drusen as risk factors in age-related macular disease. *Am J Ophthalmol* 1990; 109:38-43.
74. **Klaver CC**, Kliffen M, van Duijn CM, et al. Genetic association of apolipoprotein E with age-related macular degeneration. *Am J Hum Genet* 1998; 63:200-6.
75. **Souied EH**, Benlian P, Amouyel P, et al. The epsilon 4 allele of the apolipoprotein E gene as a potential protective factor for exudative age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol* 1998; 125:353-359.
76. **Leung YF**, Fan DSP, Chan WM, et al. Apolipoprotein E alleles in age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999; 40: 920.
77. **Schmidt S**, Saunders AM, De La Paz MA, et al. Association of the Apolipoprotein E gene with age-related macular degeneration: Possible effect modification by family history, age, and gender *Mol Vis* 2000; 6: 287-293.
78. **Vance JM**. The Collection of Biological Samples for DNA Analysis. In: Haines JL, Pericak-Vance MA, New York: editors. Wiley-Liss. 1998; 201-211.
79. **Grubber JM**, Saunders AM, Crane-Gatherum AR, et al. Analysis of association between Alzheimer disease and the K variant of butyrylcholinesterase (BCHE-K). *Neurosci.* 1999; 269:115-9.
80. **Ong JM**, Zorapapel NC, Rich AK, et al. Effects of Cholesterol and Apolipoprotein E on retinal abnormalities in ApoE-Deficient Mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001, 42: 1891-1900.
81. **Ditbmar S**, Curcio Ch, Le Ngoc-Anb, et al. Ultrastructural changes in Bruch's membrane of Apolipoprotein E-deficient mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000 ; 41 : 2035-2042.
82. **Stoll G**, Müller HV, Trapp BD, et al. Oligodendrocytes but not astrocytes express apolipoprotein E after injury of rat optic nerve. *Glia.* 1989; 2: 170-176.
83. **Freeman JA**, Bock S, Deaton M, et al. Axonal and glial proteins associated with the development and response to injury in the rat and goldfish optic nerve. *Exp. Brain Res.* 1986; 13: 34-47.
84. **Ignatius MJ**, Gebicke-Haerter PJ, Skene JHP, et al. Expression of apolipoprotein E during nerve degeneration and regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 1986. 83: 1125-1129.
85. **Skene JHP**, Shooter E.M. Denervated sheath cells secrete a new protein after nerve injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1983; 80: 4169-4173.

86. **Snipes GJ**, McGuire CB, Norden JJ, et al. Nerve injury stimulates the secretion of apolipoprotein E by non neuronal cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1986; 83: 1130-1134.
87. **Boyles JK**, Pitas E, Wilson R, et al. Apolipoprotein E associated with astrocytic glia of the central nervous system and with nonmyelinating glia of the peripheral nervous system. *J. Clin. Invest.* 1985; 76: 1501-1513.
88. **Friend SH**, Horowitz JM, Gerber MR. Deletion of a DNA sequence in retinoblastoma and mesenchymal tumors: organization of the sequence and its encoded protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84:9059.
89. **Lee WH**, Shew JY, Hong FD. The retinoblastoma susceptibility gene encodes a nuclear phosphoprotein associated with DNA binding activity. *Nature*. 1987; 329: 642.
90. **Goodrich DW**, Wang NP, Qian YW. The retinoblastoma gene product regulates progression through the G1 phase of the cell cycle. *Cell*. 1991; 67: 293.
91. **Nevins JR**. E2F: a link between the Rb tumor suppressor protein and viral oncoproteins. *Science*. 1992; 258: 424.
92. **Chellappan SP**, Hiebert S, Mundryj M. The E2F transcription factor is a cellular target for the RB protein. *Cell*. 1991; 65: 1053.
93. **Whyte P**, Buchkovich KJ, Horowitz JM. Association between an oncogene and an anti-oncogene: The adenovirus E1A proteins bind to the retinoblastoma gene product. *Nature*. 1988; 334: 124.
94. **DeCaprio JA**, Ludlow JW, Figge. SV40 large tumour antigen forms a specific complex with the product of the retinoblastoma susceptibility gene. *Cell*. 1988; 54: 275.
95. **Dyson N**, Howley PM, Munger K. The human papillomavirus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science*. 1989; 243: 934-989.
96. **Szekely L**, Selivanova G, Magnusson KP. EBNA-5, an Epstein-Barr virus-encoded nuclear antigen, binds to the retinoblastoma and p53 proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993; 90: 5455.
97. **Jiang WQ**, Szekely L, Wendel-Hansen V. Colocalization of the retinoblastoma protein and the Epstein-Barr virus-encoded nuclear antigen EBNA-5. *Exp Cell Res* 197; 314: 3417-3418.
98. **Ewen ME**, Xing YG, Lawrence. Molecular cloning, chromosomal mapping, and expression of the cDNA for p107, a retinoblastoma gene product-related protein. *Cell*. 1991; 66: 1155.
99. **Hu QJ**, Bautista C, Edwards GM. Antibodies specific for the human retinoblastoma protein identify a family of related polypeptides. *Mol Cell Biol*. 1991; 11: 5792.
100. **Mayol X**, Grana W, Baldi A et al: Cloning of a new member of the retinoblastoma gene family (pRb2) which binds to the E1A transforming domain. *Oncogene* 1993; 8: 2561.
101. **Lee EY**, Change CY, Hu N. Mice deficient for Rb are nonviable and show defect in neurogenesis and hematopoiesis. *Nature*. 1992; 359: 288-291.
102. **Jacks T**, Fazeli A, Schmitt EM, et al. Effects of an Rb mutation in the mouse. *Nature* 1992; 359: 295-290.
103. **Leung SW**, Wloga EH, Castro A, et al. A dynamic switch in Rb+/- mediated neuroendocrine tumorigenesis. *Oncogene*. 2004; 23: 3296-307.

104. **Tsai KY**, MacPherson D, Rubinson DA, et al. ARF mutation accelerates pituitary tumor development in Rb+/- mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; 9: 16865-16870
105. **Strohmeier T**, Reissmann P, Cordon-Cardo, et al. Correlation between retinoblastoma gene expression and differentiation in human testicular tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 6662-6668.
106. **Wunder JS**, Czitron AA, Kandel R, et al. Analysis of alterations in the retinoblastoma gene and tumor grade in born and soft-tissue sarcomas. *J Natl Cancer Inst*. 1991; 83: 194-201.
107. **Cance WG**, Brennan MF, Dudas ME. Altered expression of the retinoblastoma gene product in human sarcomas. *N Engl J Med*. 1990; 323:1457-1462.
108. **Reissmann PT**, Simon MA, Lee WH. Studies of the retinoblastoma gene in human sarcomas. *Oncogene*. 1989; 4: 839-843.
109. **T'Ang A**, Varley JM, Charkraborty, et al: Structural rearrangement of the retinoblastoma gene in human breast carcinoma. *Science*. 1988; 242:263-269.
110. **Varley JM**, Armour J, Swallow JE, et al. The retinoblastoma gene is frequently altered leading to loss of expression in primary breast tumours. *Oncogene*. 1989; 4: 725.
111. **Goodrich DW**, Chen Y, Scully P, et al. Expression of the retinoblastoma gene product in bladder carcinoma cells associated with a low frequency of tumour formation. *Cancer Res*. 1992; 52: 1968.
112. **Takahashi R**, Hashimoto T, Xu HJ, et al. The retinoblastoma gene functions as a growth and tumor suppressor in human bladder carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991; 88: 5257.
113. **Xu HJ**, Cairns P, Hu SX et al. Loss of RB protein expression in primary bladder cancer correlates with loss of heterozygosity at the RB locus and tumor progression. *Int J Cancer*. 1993; 53: 781.
114. **Cordon-Cardo C**, Wartinger D, Petrylak D, et al. Altered expression of the retinoblastoma gene product: Prognostic indicator in bladder cancer. *J Natl Cancer Inst*. 1992; 84: 1251.
115. **Logothetis CJ**, Xu HJ, Ro JY, et al. Altered expression of retinoblastoma protein and known prognostic variables in locally advanced bladder cancer. *J Natl Cancer Inst*. 1992; 84: 1256.
116. **Steeg PS**. Suppressor genes in breast cancer: an overview. *Cancer Treat Res*. 1992 ; 61: 45.
117. **Fung YK**, T'Ang A. The role of the retinoblastoma gene in breast cancer development. *Cancer Treat Res*. 1992; 61: 59.
118. **Borg A**, Zhang QX, Alm P, et al. The retinoblastoma gene in breast cancer: Allele loss is not correlated with loss of gene protein expression. *Cancer Res*. 1992; 52: 2991.
119. **Birch JM**. Epidemiology of sarcomas. *Curr Opin Oncol*. 1990; 2: 462.
120. **Wang NP**, To H, Lee WH, et al. Tumour suppressor activity of RB and p53 genes in human breast carcinoma cells. *Oncogene*. 1993; 8: 279.
121. **Lundberg AS**, Weinberg RA. Functional inactivation of the retinoblastoma protein requires sequential modification by at least two distinct cyclin Cdk complex. *Moll Cell Biol*. 1998; 18: 753-761.

122. **Harbour JW**, Luo RX, Dei Santi A, et al. Cdk phosphorylation triggers sequential intramolecular interactions that progressively block Rb functions as cells move through G1. *Cell*. 1999; 98 :859-869.
123. **Sherr CJ**. Cancer cell cycles. *Science*. 1996; 274 :1672-1677.
124. **Coats S**, Flanagan WM, Nourse J, et al. Requirement of p27 Kip1 for restriction point control of the fibroblast cell cycle. *Science*. 1996;272: 877-80.
125. **Levenberg S**, Yarden A, Kam Z, et al. P27 is involved in N-cadherin-mediated contact inhibition of cell growth and S-phase entry. *Oncogene*. 1999; 18: 869-876.
126. **Fang F**, Orend G, Watanabe N, et al. Dependence of cyclin E-CDK2 kinase activity on cell anchorage. *Science*. 1996; 271: 499-502.
127. **Weng LP**, Brown JL, Eng C. PTEN coordinates G1 arrest by down-regulating cyclin D1 via its protein phosphatase activity and up-regulating p27 via its lipid phosphatase activity in a breast cancer model. *Hum Mol Genet*. 2001; 10: 599-604.
128. **Foster JS**, Henley DC, Bukovsky. Multifaceted regulation of cell cycle progression by estrogen: regulation of Cdk inhibitors and Cdc25A independent of cyclin D1-Cdk4 function. *Mol Cell Biol*. 2001; 21: 794-810.
129. **Cariou S**, Donovan JC, Flanagan WM, et al. Down-regulation of p21 WAF1/CIP1 or p27 Kip1 abrogates antiestrogen mediated cell cycle arrest in human breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000; 97: 9042-9046.
130. **Reichert TE**, Nagashima S, Kashii Y. Interleukin-2 expression in human carcinoma cell lines and its role in cell cycle progression. *Oncogene* 2000; 19: 514-525.
131. **Aktas H**, Cai H, Cooper GM. Ras links growth factor signalling to the cell cycle machinery via regulation of cyclin D1 and the Cdk inhibitor p27 KIP1. *Mol Cell Biol* 1997; 17(7):3850-3857.
132. **Kawada M**, Yamagoe S, Murakami Y. Induction of p27 Kip1 degradation and anchorage independence by Ras through the MAP kinase signalling pathway. *Oncogene* 1997; 15 :629-37.
133. **Zur Hausen H**. Cervical carcinoma and human papillomavirus: on the road to preventing a major human cancer. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93: 252-253.
134. **McMurray HR**, Nguyen D, Westbrook TF, et al. Biology of human papillomavirus. *Int J Exp Pathol* 2001; 82: 15-33.
135. **Zerfass-Thome K**, Zwerschke W, Mannhardt B, et al. Inactivation of the cdk inhibitor p27 KIP1 by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *Oncogene* 1996; 13: 2323-2330.
136. **Mann DJ**, Child ES, Swanton C, et al. Modulation of p27 Kip1 levels by the cyclin encoded by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *EMBO J* 1999; 18: 654-663.
137. **Kiyokawa H**, Kineman RD, Manova Todorova KO, et al. Enhanced growth of mice lacking the cyclin-dependent kinase inhibitor function of p27 (Kip1). *Cell* 1996; 85: 722-32.
138. **Evan GI**, Vousden KH. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* 2001; 411: 342-348.
139. **Katayose Y**, Kim M, Rakkar AN, et al. Promoting apoptosis: a novel activity associated with the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *Cancer Res* 1997; 57: 5441-5.

140. **Craig C**, Wersto R, Kim M, et al. A recombinant adenovirus expressing p27 Kip1 induces cell cycle arrest and loss of cyclin-Cdk activity in human breast cancer cells. *Oncogene* 1997; 14: 2283-2289.
141. **Fujieda S**, Inuzuka M, Tanaka N, et al. Expression of p27 is associated with Bax expression and spontaneous apoptosis in oral and oropharyngeal carcinoma. *Int J Cancer*. 1999; 84: 315-320.
142. **St Croix B**, Florenes VA, Rak JW, et al. Impact of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 on resistance of tumour cells to anticancer agents. *Nat Med*. 1996; 2: 1204-1210.
143. **Dimanche-Boitrel MT**, Micheau O, Hammann A, et al. Contribution of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27KIP1 to the confluence-dependent resistance of HT29 human colon carcinoma cells. *Int J Cancer* 1998; 77: 796-802.
144. **Eymin B**, Haugg M, Droin N, et al. P27Kip1 induces drug resistance by preventing apoptosis up-stream of cytochrome c release and procaspase-3 activation in leukemic cells. *Oncogene*. 1999 ; 18: 1411-1418.
145. **Masuda A**, Osada H, Yatabe Y, et al. Protective function of p27 (KIP1) against apoptosis in small cell lung cancer cells. *Am J Pathol* 2001; 158: 87-96.
146. **Dimanche-Boitrel MT**, Micheau O, France D, et al. P27 KIP1 overexpression inhibits the growth and doxorubicin sensitivity of HT29 human colon cancer cells in vivo. *Anticancer Res*. 2000; 20: 849-52.
147. **Nakayama K**, Ishida N, Shirane M, et al. Mice lacking p27(Kip1) display increased body size, multiple organ hyperplasia, retinal dysplasia, and pituitary tumors. *Cell*. 1996; 85: 707-720.
148. **Egerton M**, Scollay R, Shortman K. Kinetics of mature T -cell development in the thymus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1990; 87: 2579-2582.
149. **Jacks T**, Fazeli A, Schmitt EM, et al. Effects of an Rb mutation in the mouse. *Nature*. 1992 ; 359 : 295-300.
150. **De Bruin A**, Wu L, Saavedra HI, et al. Rb function in extraembryonic lineages suppresses apoptosis in the CNS of Rb-deficient. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 11: : 6546-51.
151. **Williams BO**, Schmitt EM, Remington L, et al. Extensive contribution of Rb-deficient cells to adult chimeric mice with limited histopathological consequences. *EMBO J*. 1994; 13: 4251-4259.
152. **Li J**, Yen C, Liaw D, et al. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science*. 1997; 275: 1943-1947.
153. **Seck PA**, Pershouse MA, Jasser SA, et al. Identification of a candidate tumour suppressor gene, *MMAC1*, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. *Nat Genet*. 1997; 15: 356-362.
154. **Li DM**, Sun H. PTEN/MMAC1/TEP1 suppresses the tumorigenicity and induces G1 cell cycle arrest in human glioblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 15406-15411.
155. **Furnari FB**, Lin H, Huang HS, et al. Growth suppression of glioma cells by PTEN requires a functional phosphatase catalytic domain. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997; 94: 12479-12484.

156. **Myers MP**, Pass I, Batty IH, et al. The lipid phosphatase activity of PTEN is critical for its tumor suppressor function. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998; 95: 13513-13518.
157. **Di Cristofano A**, Pesce B, Cordon-Cardo C, et al. Pten is essential for embryonic development and tumour suppression. *Nat. Genet*. 1998; 19: 348-355.
158. **Suzuki A**, de la Pompa JL, Stambolic V, et al. High cancer susceptibility and embryonic lethality associated with mutation of the PTEN tumor suppressor gene in mice. *Curr. Biol*. 1998; 8: 1169-1178.
159. **Podsypanina K**, Ellenson LH, Nemes A, et al. Mutation of Pten/Mmac1 in mice causes neoplasia in multiple organ systems *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1999; 96: 1563-1568.
160. **Lee JO**, Yang H, Georgescu MM, et al. Crystal structure of the PTEN tumor suppressor: implications for its phosphoinositide phosphatase activity and membrane association. *Cell*. 1999; 99: 323-334.
161. **Datta SR**, Brunet A, Greenberg ME. Cellular survival: a play in three Acts. *Genes Dev*. 1999; 13: 2905-2927.
162. **Stambolic V**, Suzuki A, de la Pompa JL, et al. Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. *Cell*. 1998; 95: 29-39.
163. **Tamura M**, Gu J, Tran H, et al PTEN gene and integrin signaling in cancer. *J. Natl. Cancer Inst*. 1999; 91: 1820-1828.
164. **Lu Y**, Lin YZ, LaPushin R, et al. The PTEN/MMAC1/TEP tumor suppressor gene decreases cell growth and induces apoptosis and anoikis in breast cancer cells. *Oncogene*. 1999; 50: 7034- 7045.
165. **Sun H**, Lesche R, Li DM, et al. PTEN modulates cell cycle progression and cell survival by regulating phosphatidylinositol 3,4,5,-trisphosphate and Akt/protein kinase B signaling pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1999; 96: 6199-6204.
166. **Paramio JM**, Navarro M, Segrelles C, et al. PTEN tumor suppressor is linked to the cell cycle control through the retinoblastoma protein. *Oncogene*. 2000; 18: 7462-7468.
167. **Di Cristofano**, De Acetis C, Cordon-Cardo, et al. Pten and P27Kip1 cooperate in prostate cancer tumor suppression in the mouse . *Nature Genetics*. 2001; 27: 222-224.
168. **Stambolic V**, Tsao MS, Macpherson D, et al . High incidence of breast and endometrial neoplasia resembling human Cowden syndrome in pten +/- mice. *Cancer Res*. 2000; 60: 3605-3611.
169. **Kwabi-Addo B**, Thompson TC, Ittmann M. Absence of PTEN/MMAC1 pseudogene in mice. *DNA Cell Biol*. 2000; 19: 301-305.
170. **Huang H**, Potter CJ, Tao W, et al. PTEN affects Cell Size, Cell Proliferation and Apoptosis During Drosophila Eye Development. *Development*. 1999; 126: 5365-5372.
171. **Brand A H**, Perrimon N. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development*. 1993; 118: 401-415.
172. **Liaw D**, Marsh D J, Li J, et al. Germline mutations of the PTEN gene in Cowden disease, an inherited breast and thyroid cancer syndrome. *Nat. Genet*. 1997; 16: 64-67.

173. **Margherita E.** Uveitis and Glaucoma in Cowden Syndrome Therapeutical challenge. Massachusetts eye and ear infirmiry immunology service. <http://www.uveitis.org/Enhanced/Review>
174. **Marsh DJ,** Dahla P L, Zheng Z, et al. Gem line mutations in PTEN are present in Bannayan-Zonana syndrome. *Nat. Genet.* 1997; 16: 333-334.
175. **Padberg GW,** Schot JDL, Vielvoye GJ, et al. Lhermitte-Duclos disease and Cowden disease: a single phakomatosis. *Ann. Neurol.* 1991; 29: 517-523.
176. **Boggs JM,** Moscarello MA. Structural organization of the human myelin membrane. *Biochem. Biophys. Acta.* 1978; 515: 1-21.
177. **Boggs JM,** Moscarello MA, Papahadjopoulos D. Structural organization of myelin - role of lipid protein interactions determined in model systems. In: P.C. Jost, O. H. Griffith. New York: eds. Jhon Wiley and Sons, 1992; 435-443.
178. **Omlin FX,** Webster HD, Palkovist CG, et al. Inmunocytochemical localization of basic protein in major dense line regions or central and peripheral myelin. *J. Cell Biol.* 1982; 95: 242-248.
179. **Reeves SA,** Helman LJ, Allison A, et al. Molecular cloning and primary structure of human glial fibrillary acidic protein. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 1989; 86: 5178-5182.
180. **Nielsen AL,** Holm IE, Johansen M, et al. A new splice variant of glial fibrillary acidic protein, GFAP-epsilon, interacts with the presenilin proteins. *J. Biol. Chem.* 2002; 277: 29983-29991.
181. **Scherer SS** . Molecular genetics of demyelination: new wrinkles on an old membrane. *Neuron.* 1997; 18: 13-6.
182. **Debus E.** Monoclonal antibodies specific for glial fibrillary acidic (GFA) protein and for each of the neurofilament triplet polypeptides. *Differentiation.* 1983; 25: 193-203.
183. **Pinazo-Duran MD,** Renau-Piqueras J, Guerri C Developmental changes in the optic nerve related to ethanol consumption in pregnant rats. Analysis of the alcohol-exposed optic nerve. *Teratology* 1993; 48:305-322.
184. **Morrjs RG.** Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci. Meth.* 1984; 11: 47-60.
185. **Brandeis R,** Brandys Y, Yehuda S. The use of the Morris water maze in the study of memory and learning. *Int J Neurosci.* 1989; 48: 29-69.
186. **Di Loreto Jr D,** del Cerro M, Reddy SV, et al. Water escape performance of adult RCS dystrophic and congenital rats: a functional and histomorphometric study. *Brain Res* 1996; 717: 165-172.
187. **Littfe CW,** Cox C, Wyatt J .Correlates of photoreceptor rescue by transplantation of human fetal RPE in the RCS rat. *Exper Neuro* 1998;149: 151-160.
188. **Castillo Jr BV,** del Cerro M, White RM, et al. Efficacy of non-fetal human RPE for photoreceptor rescue: A study in dystrophic RCS rats. *Exper. Neuro* 1997; 146: 1-9.
189. **Navea A.** Trasplante de retina: Epitelio Pigmentario In: Bases experimentales para el trasplante. TECNIMEDIA EDITORIAL SL. 1998; 45-49.
190. **Morrison JC,** Johnson EC, Cepurna WO, et al. Microvasculature of the rat optic nerve head. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1999; 40: 1702-1709.
191. **Sugiyama K,** Gu ZB, Kawase C, et al Optic nerve and peripapillary choroidal microvasculature of the rat eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1999 ; 40 : 3084-3090.

192. **Gass JDM.** Diagnosis and Treatment. In: Stereoscopic Atlas of Macular Diseases. St Louis. Ed. Mosby 1987: 345-348.
193. **Boulton M.** Melanin and the retinal pigment epithelium. In: Marmor FM, Wolfensberg TJ. The Retinal Pigment Epithelium. New York. Oxford University Press 1988: 68-85.
194. **Schleicher E,** Wieland OH. Evaluation of Bradford method for protein determination in body fluids. *J Clin Chem Clin Biochem.* 1979; 16: 533-544.
195. **Díez-Juan A,** Andrés V. The growth suppressor p27kip1 protects against diet-induced atherosclerosis. *FASEB.* 2001; 15: 1989-1995.
196. **Nathan BP,** Bellosta S, Sanan DA, et al. Differential effects of apolipoproteins E3 and E4 on neuronal growth in vitro. *Science.* 1984; 264: 850-852.
197. **Plump AS,** Smith JD, Hayek T, et al. Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES J\ cells. *Cell.* 1992; 71: 343-353.
198. **Plump AS,** Breslow JL. Apolipoprotein E and the apolipoprotein E-deficient mouse. *Ann. Rev. Neurosci.* 1995; 15: 495-518.
199. **Bonthu SD,** Heistad D, Chappell DA, et al. Atherosclerosis, vascular remodeling, and impairment of endothelium-dependent relaxation in genetically altered hyperlipidemic mice. *Arterioscler. Thromb. Biol.* 1987; 17: 2333-2340.
200. **Bart RD,** Sheng H, Laskowitz DT, et al. Regional cerebral blood flow in apolipoprotein E-deficient versus wild type mice undergoing middle cerebral artery occlusion. *Neuroreport*, in press.
201. **Ito U,** Hanyu S, Hakamata Y, et al. Ultrastructure of astrocytes associated with selective neuronal death of cerebral cortex after repeated ischemia. *Acta Neurochir* 1997; 70 : 46-49.
202. **Spalton DJ,** Taylor DSI, Sanders MD. Juvenile Batten's disease: an ophthalmological assessment of 26 patients. *Br J Ophthalmol.* 1980; 64: 726- 732.
203. **Volk BW,** Adachi M, Schneck L. The gangliosidoses. *Hum Pathol.* 1975; 6 :555-569.
204. **Noble M,** Oietrich J. Intersections between neurobiology and oncology: tumor origin, treatment and repair of treatment-associated damage. *Trends Neurosci.* 2002; 25: 103-107.
205. **Laskowitz DT,** Sheng H, Bart R, et al. Apolipoprotein E deficient mice have increased susceptibility to focal cerebral ischemia. *J. Cereb.Blood Flow. Metab.* 1997; 17: 753-758.
206. **Waxman SG ,** Black JA , Ransom BR , et al. Anoxic injury of rat optic nerve: ultrastructural evidence for coupling between Na⁺ influx and Ca⁽²⁺⁾-mediated injury in myelinated CNS axons. *Brain Res* 1994; 644: 197-204.
207. **Kishi S,** Tso MO , Hayreh SS. Fundus lesions in malignant hypertension. II. A pathologic study of experimental hypertensive optic neuropathy. *Arch Ophthalmol.* 1985; 103: 1198-206.
208. **Conradi NG ,** Gustafsson B. Functional development of the visual system normal and protein deprived rats. III: Recordings from adult optic nerve in vitro. *Acta Physiol Scand* 1985; 12: 353-358.
209. **Su k KD ,** Yoon KC , Shin JP. Aconite induced myelo-optic neuropathy in a rabbit model. *Korean J Ophthalmol.* 1994; 8: 77-82.

210. **Dake Y**, Amemila T. Electron microscopic study of the optic nerve in copper deficient rats. *Exp Eye Res.* 1991; 52: 277-281.
211. **Sies H**. Oxidative stress: introductory remarks. In: Sies H. *Oxidative stress.* London: Academic Press; 1985: 1-8.
212. **Southom PA**, Powis G. Free radicals in medicine. In: *Chemical nature and biologic reactions.* Mayo Clin. Proc 1988; 63: 381-389.
213. **Aviñó J**, Díaz Llopis M, España, et al. Chronic ethanol feeding induces oxidative stress in the optic nerve of rats. *Arch Soc Esp Oftalmol.* 2002; 77: 263-268.
214. **Miyata M**, Smith JD. Apolipoprotein E allele-specific antioxidant activity and effects on cytotoxicity by oxidative insults and f3-amyloid peptides. *Nature Genetics.* 1996; 14: 55-61.
215. **Oropeza R**, Wekerle H, Werb Zo. Expression of apolipoprotein E by mouse brain astrocytes and its modulation by interferon γ . *Brain Res.* 1997 ;410: 45-51.
216. **Müller HW**, Shooter EM. Molecular approach to the role of macrophages and astrocytes in nerve growth and regeneration. In: H.H. Althaus and W. Seifert: *Glial-Neuronal Communication in Development and Regeneration.* NATO ASI Series New York eds: Springer : 630-640.
217. **Mares-Perlman JA**, Brady WE, Klein R. Et al. Dietary fat and age-related maculopathy. *Arch Ophthalmol .* 1995; 113,743-748.
218. **The Eye Disease Case-Control Study Group**. Risk factors for neovascular age-related macular degeneration *Arch Ophthalmol.* 1992; 110: 1701-1708.
219. **Hyman L**, Schachat AP, He Q, et al. Hypertension, cardiovascular disease, and age-related macular degeneration: Age-Related Macular Degeneration Risk Factors Study Group *Arch Ophthalmol .* 2000: 118; 351-358.
220. **Fliesler SJ**, Richards MJ, Peachey R, et al. Hypercholesterolemia does not alter retinal sterol composition or compromise retinal structure or function in apolipoprotein E(ApoE)-knockout mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000; 41 : 1042.
221. **Sasso M**, Pognetto M, Panzanelli P. et al. Comparative study of glial fibrillary acidic protein (GFAP)-like immunoreactivity in the retina of some representative vertebrates. *EurJHistochem.* 1993; 36: 467-477.
222. **Van der Schaft TL**, de Bruijn WC, Mooy CM, et al. Is basal intralaminar deposit unique for age-related macular degeneration? *Arch ophthalmol* 1991; 110: 420-425.
223. **Sarks SH**. Ageing and degeneration in the macular region: a clinicopathological study. *Br J ophthalmol.* 1976 ;60 :324-342.
224. **Curcio CA**, Millican CL. Basal linear deposit and large drusen are specific for early age-related maculopathy. *Arch Ophthalmol.* 1999; 117: 329-339.
225. **Sarks JP**, Sarks SR, Killingsworth MC. Evolution of geographic atrophy of the retina! pigment epithelium. *Eye.* 1988; 2: 552-577.
226. **Bressler NM**, Silvia JC, Bressler SB, et al. Clinicopathological correlation of drusen and retina! pigment epithelium abnormalities in age related macular degeneration. *Retina.* 1994 ;14: 130-142
227. **Pauleikhoff O**, Harper A, Marshall J, et al. Aging changes in Bruch's membrane. A histochemical and morphologic study. *Ophthalmology.* 1990; 97: 171-178.
228. **Green WR**, Enger C. Age-related macular degeneration histopathologic studies. *Ophthalmology.* 1993; 100: 1519-1535.

229. **Hogan MJ**, Alvarado JA, Weddell JE. Histology of the Human Eye. Philadelphia: ed Saunders. 1971: 59-72.
230. **Feeney L**. Lipofuscin and melanin of human retinal pigment epithelium: fluorescence, enzyme cytochemical and ultrastructural studies. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1978 ; 17: 583-600.
231. **Feeney-Burns L**, Hilderbrand ES, Eldridge S. Aging human, RPE: morphometric analysis of macular, equatorial and peripheral cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1984; 25: 195-200.
232. **Weiter JJ**, Delori FC, Wing GL, et al. Retinal pigment epithelial lipofuscin and melanin and choroidal melanin in human eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1986 ; 27: 145-152.
233. **Schmidt SY**, Peisch RD. Melanin concentration in normal human retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1986 ;27 : 1063-1067.
234. **Miskimins R**, Srinivasan R, Main-Husstege M, et al. P27kip1 enhances myelin basic protein gene promoter activity. *J Neurosci Res*. 2002 ; 67: 100-105.
235. **Casaccia-Bonofil P**, Tikoo R, Kiyokawa H, et al. Oligodendrocyte precursor differentiation is perturbed in the absence of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27kip 1. *Genes Dev*. 1997;11 : 2335-2346.
236. **Pfeiffer SE**, Warrington AE, Llamal R. The oligodendrocyte in cellular processes. *Trends Cell Biol*. 1993; 13:191-197.
237. **Noble M**, Murray K, Stroobant P, et al. Platelet-derived growth factor promotes division and motility and inhibits premature differentiation of the oligodendrocyte/type-2 astrocyte progenitor cell. *Nature*. 1998; 333: 556-562.
238. **Richardmn WD**, Pringle N, Mosley MJ, et al. A role for platelet-derived growth factor in normal gliogenesis the central nervous system. *Cell*. 1998; 53:309-319.
239. **Miskimins R**, Knapp L, Dewey MJ, et al. Cell and tissue-specific expression of a heterologous gene under control of the myelin basic protein gene promoter in transgenic mice. *Brain Res Dev Brain Res*. 1992 ; 65: 217-221.
240. **De Saint Jean M**, Becquet F, Baudouin C. Apoptose et oeil. *J Fr Ophtalmol* 1997; 20: 704-721.
241. **Detry-Morel M**. Perspectives dans le traitement médical de la neuropathie glaucomateuse. *Bases de la neuroprotection*. *J Fr Ophtalmol* 1999; 22: 122-134.
242. **Boudreau. N**, Werb Z, Bissell MJ. Suppression of apoptosis by basement membrane requires three-dimensional tissue organization and withdrawal from the cell cycle. *Proc. Natl. Acad. Scd*. 1996; 93: 3509-3513.
243. **Kipreos. ET**, Lander LE, Wing JP, et al. Cul-1 is required for cell cycle exit in *C. elegans* and identifies a novel gene family. *Cell*. 1986; 186: 829-839.
244. **Blanc EM**, Anadora J, Keller B, et al. Astrocytic gap junctional communication decreases neuronal vulnerability to oxidative stress-induced disruption of Ca²⁺ homeostasis and cell death. *J Neurochem* 1998; 70: 958-696
245. **Ito U**, Hanyu S, Hakamata Y, et al. Ultrastructure of astrocytes associated with selective neuronal death of cerebral cortex after repeated ischemia. *Acta Neurochir* 1997; 70 : 46-49.
246. **Salazar JJ**, Ramírez AI, De Hoz R, et al. Apoptosis in ischemic optic neuropathy. *Arch Soc Esp Oftalmol*. 2001; 75: 819-824.

247. **Boulikas T.** Phosphorylation of transcription factors and control of the cell cycle. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 1995; 5: 71-77.
248. **Raff MC,** Barres BA, Burne JF, et al. Programmed cell death and the control of cell survival: Lessons from the nervous system. *Science.* 1993; 262: 695-700.
249. **Anderson CM,** Swanson RA. Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions. *Glia.* 2000; 32:1-14.
250. **Gavrieli Y,** Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol.* 1992; 119: 493-501.
251. **Lee KP,** Gibson JR, Sherman H. Retinopathic effects of 2-aminoxy propionic acid derivatives in the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1997; 51: 219-232.
252. **Dyer MA ,**Cepko CL. P27Kip1 and p57Kip2 regulate proliferation in distinct retinal progenitor cell populations. *J Neurosci;* 21 12: 4259-4271.
253. **Dyer MA ,** Cepko CL. P57 regulates progenitor cell proliferation and amacrine inter-neuron development in the mouse retina. *Development.* 2000; 127: 3593-3605.
254. **Whiteman AL,** Klauss G, Miller PE, et al. Morphologic features of degeneration and cell death in the neurosensory retina in dogs with primary angle-closure glaucoma. *Am J Vet Res.* 2000; 63: 257-261.
255. **Dunaief JL,** Dentchev T, Ying GS et al. The role of apoptosis in age-related macular degeneration. *Arch Ophthalmol.* 2002; 120: 1435-1442.
256. **Maeda H,** Ogata N, Yi X, et al. Apoptosis of photoreceptor cells in ornithine-induced retinopathy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 1998; 5: 207-212.
257. **Nork TM,** Schwartz TL, Doshi HM, et al. Retinoblastoma: cell of origin. *Arch Ophthalmol.* 1995; 113:791.
258. **Wittwer F,** van der Straten A, Keleman K, et al. Lilliputian: an AF4/FMR2-related protein that controls cell identity and cell growth. *Develop.* 2001; 128: 791-800.
259. **Boguski MS,** McCormick F. Proteins regulating Ras and its relatives. *Nature* 1993; 366; 643-654.
260. **Rommel C,** Hafen E. Ras \320 a versatile cellular switch. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 1998; 8: 412-418.
261. **Frame S,** Balmain A. Integration of positive and negative growth signals during ras pathway activation in vivo. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2000; 10: 106-113.
262. **Hagan MJ,** Alvarada J. Studies an the human macula. Ageing changes in Bruch's membrane. *Arch Ophthalmol* 1967; 77: 410-420.
263. **Sarks J,** Sarks S, Killingsworth MC. Evolution of soft drusen in age related macular degeneration. *Eye* 1994; 8: 269-283.
264. **Newsome DA,** Huh W, Green WR. Bruch's membrane age-related changes vary by region. *Curr Eye Res.* 1989; 6: 1211-1221.
265. **Van der Schaft TL,** de Bruijn WC, Mooy CM, et al. Is basal laminar deposit unique for AMD? *Arch Ophthalmol.* 1991; 109: 420-425.
266. **Ramrattan RS,** van der Schaft TL, Mooy CM, et al. Morphometric analysis of Bruch's membrane, the choriocapillaris and the choroid in ageing. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1994 ; 35: 2857-2864.
267. **Verdú E,** Ceballos D, Vilches J, et al. Influence of aging on peripheral function and regeneration. *J Peripher Nerv Syst.* 2000; 5: 191-200.

268. **Wong SL**, Ian PP, Yew Dt. Comparative ultrastructural study of the optic nerves and visual cortices of young (2.5 months) and old (17 months) mice. *Acta Anat* 1981; 105: 426-30.
269. **López-Sánchez E**, Pinazo-Durán MD. Apolipoprotein E in optic nerve morphogenesis. *Ophthalmic Research* 2001; 33, Supl 1: 107.
270. **López-Sánchez E**, Chaqués V, Francés E, et al. Role of apolipoprotein E in the pathogenesis of the optic nerve malformations. *Clin. and Exp. Ophthalmol, Supl.* 2002, p 468.
271. **López-Sánchez E**, Francés-Muñoz E, Diez-Juan A, et al. Optic nerve alterations in apolipoprotein E deficient mice. *Eur J Ophthalmol* 2003; 13: 560-5.