

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

Facultat de Medicina i Odontologia

Departament de Cirurgia



**Estudio citoarquitectural de la retina del ratón en
relación a la disponibilidad del sustrato del
receptor de la insulina (IRS2). Nuevas
perspectivas para las enfermedades retinianas**

Tesis Doctoral

Dirigida por:

Prof. Dr. Manuel Díaz Llopis

Dra. María Dolores Pinazo Durán

Presentada por:

Mara Albert Fort

Valencia, 2014

Facultat de Medicina i Odontologia

Departament de Cirurgia

Curso de doctorado: 992 040G Cirugía en Otoneurooftalmología

Título de Tesis Doctoral:

**Estudio citoarquitectural de la retina del ratón en
relación a la disponibilidad del sustrato del receptor de
la insulina (IRS2). Nuevas perspectivas para las
enfermedades retinianas**

Presentada por:

Mara Albert Fort

Licenciada en Medicina

Especialista en Oftalmología

Directores:

Prof. Dr. Manuel Díaz Llopis

Dra. María Dolores Pinazo Durán

Valencia, 2014

MANUEL DÍAZ LLOPIS

Doctor en Medicina y Cirugía, Especialista en Oftalmología

Catedrático de Oftalmología del Departament de Cirurgia de la Facultat de Medicina i

Odontologia de la Universitat de València

MARIA DOLORES PINAZO DURÁN

Doctora en Medicina y Cirugía, Especialista en Oftalmología

Profesora Asociada de Oftalmología, Departament de Cirurgia de la Facultat de Medicina i

Odontologia de la Universitat de València. Director de la Unidad de Investigación Oftalmológica

“Santiago Grisolí” de Valencia

CERTIFICAN QUE:

Dña. **MARA ALBERT FORT**, ha realizado en el laboratorio de oftalmología experimental de la Unidad de Investigación Oftalmológica “Santiago Grisolí” de Valencia el trabajo de Tesis Doctoral que lleva por título:

“Estudio citoarquitectural de la retina del ratón en relación a la disponibilidad del sustrato del receptor de la insulina (IRS2). Nuevas perspectivas para las enfermedades retinianas”

Todos los experimentos han sido realizados bajo nuestra dirección, habiendo supervisado asimismo la redacción y presentación del trabajo, por lo que damos el consentimiento para que sea presentado y defendido ante tribunal para optar al grado de Doctor por la Universidad de Valencia.

En Valencia a 17 de Enero de 2014

Los Directores: **MANUEL DÍAZ LLOPIS**

MARIA DOLORES PINAZO DURÁN

*A los que buscan
aunque no encuentren.*

*A los que avanzan
aunque se pierdan.*

*A los que viven
aunque se mueran.*

Mario Benedetti

A mi Madre,
ejemplo de coraje y superación.

Agradecimientos

Este trabajo no hubiera salido a la luz sin los ratones, parte de este trabajo va dedicado a ellos.

A la Dra. María Dolores Pinazo, a quién tanto le debo por haberme dado la oportunidad de conocer el mundo de la investigación oftalmológica y haberme presentado a personas muy interesantes que me han aportado muchas reflexiones. Gracias por confiar en mí y no haberme hecho decaer en este gran proyecto.

Al prof. Dr. Manuel Díaz Llopis, por haberme brindado todo el apoyo necesario para la realización de la tesis.

Al Dr. Vicent Vila, a quién le tengo un cariño especial, ya que, aunque él no lo recuerde, fue quién hizo decantarme por la especialidad de la oftalmología. Te agradezco mucho la dedicación desinteresada en la tesis, todos tus consejos han sido muy acertados.

Debo agradecer de forma especial la inestimable colaboración del Dr. *Jose R. Hombrebueno*. Su dedicación expresa y su forma impecable de trabajar en el

laboratorio hacen de él un gran profesional. Gracias por haberme motivado en todo momento y por la paciencia a mis múltiples dudas planteadas.

Al Dr. E. De la Rosa, por sus acertados consejos en los momentos que más los necesité.

A la Dra. Deborah Burks y a la Dra. Silvia Sanz del Centro de Investigación Príncipe Felipe de Valencia, por habernos cedido desinteresadamente el modelo de ratón *IRS2*-/- y por su ayuda inestimable en el laboratorio. Gracias Silvia por haberme prestado tu colaboración en mis momentos más duros.

A mis compañeros de laboratorio de la Unidad de Investigación Oftalmológica “Santiago Grisolia”: Óscar, Vicente Z., Carmina, Carla, Laura, Raúl, por haberme facilitado el trabajo en el laboratorio.

A todo el equipo del Servicio de Oftalmología del Hospital Dr. Peset, a quién tanto debo por los 4 años intensos en mis inicios de la oftalmología. Con ellos he aprendido a disfrutar de ella.

A mis primeras compañeras de trabajo, *Sheila y Lucia*, con las que ahora me une una gran amistad. A ellas les debo, entre otras muchas cosas, mis conocimientos de laboratorio y mis primeros pasos en la oftalmología.

Y por último y parte esencial de mi vida, quiero agradecer personalmente el apoyo incondicional de mi familia:

A *mis padres*, a quienes va dedicada especialmente esta tesis, por haberme animado a estudiar, ya que el “conocimiento adquirido”, es sin duda, el mejor legado que podíais dejarme, ya que ahora me doy cuenta del valor de la frase que tanto nos repetíais: “eso nunca os lo quitará nadie”. Gracias por apoyarme siempre y haber sacado lo mejor de mí. Sin vosotros, nada de esto hubiera sido posible.

Al meu germà Jordi, que sempre ha estat pendent de mi en tot moment. Per a mi has sigut i seràs el meu punt de referència. Gràcies per estar ahí quant t’he necessitat.

A *mis abuelos*, en especial a mi abuelo Antonio, que aunque no he podido disfrutar de ellos tanto como hubiera querido, sé que se hubieran sentido orgullosos de nosotros.

Para finalizar, quiero agradecer de manera especial a la persona que ha dado sentido a mi vida, *mi marido Gabriel*, por haber sido mi punto de apoyo incondicional durante estos años, facilitándome el día a día con su positividad. Gracias por regalarme tu paciencia y por creer en mí.

RESUMEN

Título: *Estudio citoarquitectural de la retina del ratón en relación a la disponibilidad del sustrato del receptor de la insulina (IRS2). Nuevas perspectivas para las enfermedades retinianas.*

Propósito: Investigar los cambios retinianos en los ratones adultos homocigotos para la delección de IRS2 (*IRS2*^{-/-}).

Metodología: Fueron utilizados en este estudio ratones *IRS2*^{-/-} de 12 semanas de edad y ratones controles C57BL/6J. Las retinas fueron procesadas para técnicas de inmunohistoquímica, y examinadas al microscopio óptico usando anticuerpos específicos para la identificación de filamentos intermedios de las células gliales (proteína ácida fibrilar glial; GFAP), microglia (Iba-1), fotorreceptores (rodopsina, S-opsina, M-opsina, cono-Arrestina), células horizontales (calbindin), células bipolares (proteína quinasa C Alfa, $G\alpha$), células amacrinas (Colina Acetiltransferasa, neuronal óxido nítrico sintetasa, calretinin) y células ganglionares (neurofilamentos). El estudio morfométrico se realizó sobre criosecciones de retina teñidas con azul de toluidina. También se determinó la densidad de los terminales sinápticos de los fotorreceptores y de las células bipolares de los bastones. El análisis estadístico fue llevado a cabo mediante el programa informático SPSS 15.0.

Resultados: El espesor retiniano fue significativamente inferior en todas las capas retinianas de los ratones *IRS2*^{-/-}. Respecto a los fenotipos celulares, observamos la presencia de reactividad celular de las células de Müller y microglia. Se identificaron signos de degeneración de los fotorreceptores, así como disminución de las cintillas sinápticas de los mismos y retracción de los terminales sinápticos de los bastones. Tanto las células bipolares de los bastones como las células horizontales mostraron cambios en los procesos sinápticos con ramificaciones ectópicas en la retina de ratones *IRS2*^{-/-}. También se apreció una disminución del 40% de los terminales axónicos de las células bipolares de los bastones. Además se detectaron agregados anormales de neurofilamentos en los procesos y somas de las células ganglionares de la retina.

Conclusiones: Los ratones *IRS2*^{-/-} muestran signos claros de degeneración en toda la extensión de la retina. Sugerimos que la estimulación farmacológica a través de *IRS2* y sus vías de señalización, pueden aportar efectos beneficiosos para los pacientes con retinopatías, probablemente proporcionando neuroprotección adicional a la retina.

ABSTRACT

Title: *Study citoarquitectural of the retina of the mouse in relation to the insulin receptor substrate 2 (IRS2) availability. New perspectives for retinal diseases.*

Purpose: To study retinal changes in adult mice homozygous for the deletion of IRS2 (*IRS2*^{-/-}).

Methods: 12 weeks old *IRS2*^{-/-} mice and C57BL/6J age-matched controls were used in this study. Retinas were processed for immunohistochemistry, and examined the optical microscope using specific antisera against intermediate filaments of glial cells (glial fibrillary acidic protein; GFAP), microglia (Iba-1), photoreceptors (rhodopsin, S-opsin, M-opsin, cone-arrestin), horizontal cells (calbindin), bipolar cells (protein kinase C alpha, G α), amacrine cells (choline acetyltransferase, neuronal nitric oxide synthetase, calretinin) and ganglion cells (light neurofilament). Retinal morphometry was evaluated in transverse cryosections that were processed to toluidine blue staining and the density of photoreceptor synaptic ribbons and rod bipolar cell axon terminals were also determined. Statistics was performed by the SPSS 15.0 programm.

Results: Retinal thickness was significantly reduced in all retinal layers of *IRS2*^{-/-} mice, which was accompanied by Müller and microglial cell reactivity. Photoreceptors

displayed signs of degeneration and severe reduction of photoreceptor synaptic ribbons were observed. Both, rod bipolar and horizontal cells exhibited loss and sprouting of processes at the outer retina of *IRS2*^{-/-} mice. Although stratification of the inner plexiform membrane remained unchanged, there was a 40% decrease of rod bipolar cell axon terminals. Abnormal aggregates of light neurofilament were detected in retinal ganglion cell somata and processes.

Conclusions: *IRS2*^{-/-} mice displayed clear hallmarks of degeneration in the outer and inner retina. We suggest that pharmacological stimulation of IRS2 and the IRS2 signalling pathways may deserve beneficial effects for patients with retinopathies probably by providing additional neuroprotection to the retina.

ÍNDICE GENERAL

	Página
RESUMEN	XV
ÍNDICE GENERAL	XIX
LISTA DE ABREVIATURAS	XXV
ÍNDICE DE FIGURAS	XXXI
ÍNDICE DE GRÁFICOS	XXXVII
ÍNDICE DE TABLAS	XXXIX

Capítulo

I. INTRODUCCIÓN	1
1. Anatomía de la retina humana	3
1.1 Estructura de la retina	5
1.2 Componentes celulares de la retina	7
1.2.1 Fotorreceptores	7

1.2.2	Células bipolares	12
1.2.3	Células horizontales	15
1.2.4	Células amacrinas	16
1.2.5	Células interplexiformes	17
1.2.6	Células ganglionares	17
1.2.7	Células gliales	19
2.	Insulina y factor de crecimiento similar a la insulina	21
2.1	Insulina	21
2.1.1	Receptor de la insulina	22
2.2	Factor de crecimiento similar a la insulina (IGF)	26
2.2.1	Factor de crecimiento similar a la insulina tipo I (IGF-I)	28
2.2.2	Factor de crecimiento similar a la insulina tipo II (IGF-II)	29
2.2.3	Receptores del IGF (IGF-R)	29
2.2.4	Transducción de señales	31
3.	Vía de señalización de la insulina / IGF	32
3.1	Introducción	32
3.2	Dominios de interacción en la cascada de señalización de la insulina ..	32
3.3	Sustrato del receptor de la insulina (IRS)	35

3.3.1 Estructura del sustrato del receptor de la insulina	37
3.3.2 Sustrato del receptor de la insulina 1 (IRS1)	38
3.3.3 Sustrato del receptor de la insulina 2 (IRS2)	39
3.3.4 Papel de las proteínas IRS1 e IRS2	42
3.3.5 Proteínas adaptadoras con dominio de homología Src 2 (SH2) que interactúan con IRS	45
3.4 Cascada de señalización de la insulina	50
3.4.1 Unión del ligando al receptor y su regulación	52
3.4.2 Vías de señalización	53
3.4.2.1 Vía de la fosfoinositol 3 kinasa (PI3K)	54
3.4.2.2 Vía de las kinasas activadas por mitógenos (MAP kinasas)	58
4. Modelos experimentales para el estudio de enfermedades humanas	63
4.1 El animal de laboratorio	63
4.2 El ratón como modelo experimental	63
4.2.1 Taxonomía del ratón	64
4.2.2 Clasificación de los modelos murinos	64
4.2.3 Población celular de la retina del ratón	66

5. Modelos experimentales para el estudio de las enfermedades retinianas ..	69
5.1 Degeneración y remodelación retiniana	69
5.2 Modelos animales de degeneración y remodelación retiniana	75
6. Nuestro modelo experimental: <i>ratón deficiente de IRS2 (IRS2 -/-)</i>	85
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	95
1. Justificación	97
2. Hipótesis	100
3. Objetivos	101
III. MATERIAL Y MÉTODOS	103
1. Animales	106
1.1 Cuidado y sacrificio de los animales	107
1.2 Obtención y preparación de las muestras	107
2. Técnicas a estudio	109
2.1 Microscopia óptica para el estudio de morfología y análisis morfométrico	109
2.2 Inmunocitoquímica	114

2.3 Estudio de la densidad de terminales presinápticos de fotorreceptores en la MPE y de terminales de las células bipolares de bastones en la MPI	126
3. Análisis estadístico	127
IV. RESULTADOS	129
1. Estudio morfométrico de la retina	132
2. Estudio morfológico de la retina	138
2.1 Capa de los fotorreceptores (segmentos externos e internos)	138
2.1.1 Fotorreceptores bastones	138
2.1.2 Fotorreceptores conos	140
2.2 Membrana plexiforme externa (MPE)	143
2.2.1 Procesos presinápticos (fotorreceptores)	143
2.2.2 Procesos postsinápticos (células bipolares y horizontales) ...	147
2.2.2.1 Células bipolares	147
2.2.2.2 Células horizontales	150
2.3 Membrana plexiforme interna (MPI)	151
2.4 Capa de células ganglionares	154
2.5 Células gliales	155

V. DISCUSIÓN	159
1. Adelgazamiento del espesor de la retina del ratón <i>IRS2</i> ^{-/-}	161
2. Cambios en los fotorreceptores de la retina del ratón <i>IRS2</i> ^{-/-}	164
3. Hallazgos en la retina interna del ratón <i>IRS2</i> ^{-/-}	169
4. Cambios en la capa de células ganglionares de la retina del ratón <i>IRS2</i> ^{-/-}	173
5. Incremento en la expresión de proteína glial fibrilar ácida (GFAP) en la retina del ratón <i>IRS2</i> ^{-/-}	176
VI. CONCLUSIONES	179
VII. BIBLIOGRAFÍA	183

ABREVIATURAS

AC	Anticuerpo
ADN	Ácido d esoxirribonucleico
aPKC	Proteína k inasa a típica C
ARNm	Ácido r ibonucleico m ensajero
AS160	Sustrato de Akt de 160 kDa (del inglés <i>Akt substrate of 160 kDa</i>)
BAD	Promotor <i>de</i> muerte <i>celular</i> asociado <i>a</i> Bcl-2 (del inglés, <i>Bcl-2-associated death promoter</i>)
Ca²⁺	Ión de C alcio
CAR	Del inglés, <i>cone-arrestin</i>
CCF	Capa de c élulas f otorreceptores
CCG	Capa de c élulas g anglionares
CFN	Capas f ibras n erviosas
CME	Célula m adre e mbrionaria
CNE	Capa n uclear e xterna
CNI	Capa n uclear i nterna
DAPI	Del inglés, <i>Diamidino-2-phenylindole</i>
DMAE	D egeneración m acular a sociada a la edad
DR	D esprendimiento de r etina
EPR	E pitelio p igmentario r etiniano
ERK	Kinasa regulada por estímulo extracelular (del inglés,

Extracellular signal-regulated kinases)

ES	Células embrionarias pluripotenciales (del inglés, <i>Embryonic stem cells</i>)
Extremo COOH	Extremo carboxi-terminal
Extremo NH₂	Extremo amino-terminal
FOXO	Factores de transcripción Forkhead clase O
GABA	Ácido gamma-aminobutírico (del inglés, <i>γ-Aminobutyric acid</i>)
GDP	Guanosin difosfato (del inglés, <i>Guanosine diphosphate</i>)
GFAP	Proteína glial fibrilar ácida (del inglés, <i>Glial fibrillary acidic protein</i>)
GH	Hormona del crecimiento (del inglés, Growth factor)
GMPc	Monofosfato cíclico de guanosina (del inglés, <i>Cyclic guanosine monophosphate</i>)
GSK-3	Glicógeno sintasa kinasa-3 (del inglés, <i>Glycogen synthase kinase 3</i>)
GTP	Guanosin trifosfato (del inglés <i>Guanosine triphosphate</i>)
GTPasa	Guanosina trifosfatasa (del inglés, <i>guanosine triphosphatase</i>)
Ig	Inmunoglobulina
IGF	Factor de crecimiento similar a la insulina (del inglés, <i>Insulin-like growth factor</i>)
IGF-I, II	Factor de crecimiento similar a la insulina tipo I (del inglés, <i>Insulin-like growth factor tipo I, tipo II</i>)

IGF-IR, IIR	Receptor de factor de crecimiento similar a la insulina tipo I (del inglés, <i>Insulin growth factor receptor I, II</i>)
IGF- M6PR	Receptor del factor de crecimiento- manosa 6 fosfato (del inglés, <i>Mannose 6-phosphate - insulin-like growth factor receptor</i>)
IL4	Interleucina-4 (del inglés, <i>interleukin- 4</i>)
IRS 1,2,3,4	Sustrato del receptor de la insulina (del inglés, <i>Insulin receptor substrate 1,2,3,4</i>)
IRS2 -/-	Ausencia de IRS2
KO	Del inglés, K nock o ut
MAP-2	Microtúbulo asociado a proteína-2 (del inglés, <i>Microtubule-associated protein 2</i>)
MAPK	Proteínas kinasas activadas por mitógenos (del inglés, <i>Mitogen-activated protein kinase</i>)
MAPKK/MKK/MEK	MAPK kinasa (del inglés, <i>MAPK kinase</i>)
MAPKKK/MAP3K/MEKK	MAPK kinasa kinasa (del inglés, <i>MAPK kinase kinase</i>)
MLE	Membrana limitante externa
MLI	Membrana limitante interna
MPE	Membrana plexiforme externa
MPI	Membrana plexiforme interna
M6PR	Receptor manosa 6 fosfato (del inglés, <i>Mannose-6-</i>

	<i>phosphate receptor</i>)
Mr	Masa molecular relativa
mTOR	Del inglés <i>mammalian Target of Rapamycin</i>
Na⁺	Ión de sodio
NF	Neurofilamento
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (en inglés, <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PDE	Fosfodiesterasa (del inglés, <i>Phosphodiesterase</i>)
PDK	Kinasa dependiente de fosfoinositol (del inglés, <i>Phosphoinositide-dependent kinase</i>)
PH	Dominio de homología a la pleckstrina (del inglés, <i>Pleckstrin homology</i>)
PHLPP	Proteína fosfatasa de dominio PH rica en leucina (del inglés, <i>PH domain and Leucine rich repeat Protein Phosphatases</i>)
PI 3K	Fosfoinositol 3-kinasa (del inglés, <i>Phosphoinositol 3-kinase</i>)
PIP2	Fosfatidilinositol bifosfato (del inglés, <i>Phosphatidylinositol bisphosphate</i>)
PIP3	Fosfatidilinositol trifosfato (del inglés, <i>Phosphatidylinositol 3-phosphate</i>)
PIP4	Fosfatidilinositol 4-fosfato (del inglés, <i>Phosphatidylinositol 4-phosphate</i>)

PI 4,5P	Fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (del inglés, <i>Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate</i>)
PKB/ AKT	Proteína kinasa B
PKBα	Proteína kinasa B isoforma alpha
PKBβ	Proteína kinasa B isoforma beta
PKBγ	Proteína kinasa B isoforma gamma
PKC	Proteína kinasa C
PTB	Dominio de unión a fosfotirosina (del inglés, <i>Phosphotyrosine binding</i>)
PTP1B	Proteína tirosin-fosfatasa 1B (del inglés, <i>protein-tyrosine phosphatase 1B</i>)
PY	Sitios de fosfotirosinas (del inglés, Phosphotyrosine)
Raf	Factor activado por Ras (del inglés, <i>Ras activated factor</i>)
RCS	Del inglés, <i>Royal college of Surgeon</i>
RD	Retinopatía diabética
Rheb	Homólogo de Ras enriquecido en el cerebro (<i>Ras homolog enriched in brain</i>)
RI	Receptor de la insulina
RI-A	Receptor de la insulina isoforma A
RI-B	Receptor de la insulina isoforma B

ROD	Rodopsina
RP	Retinosis pigmentaria
SAPK/JNK	Proteína kinasa activada por el estrés/ c-Jun N-terminal kinasa (del inglés, <i>Stress-activated protein kinases/ Jun N-terminal kinase</i>)
SEB	Segmentos externos de los bastones
Shc	Proteína adaptadora que contiene SH2 (del inglés, <i>SH2-containing domain</i>)
SH2	Dominio de homología Src 2 (del inglés, <i>Src homology 2 domain</i>)
SH3	Dominio de homología Src 3 (del inglés, <i>Src homology 3 domain</i>)
SHP2	Proteína tirosina fosfatasa con homología a Src (del inglés Protein tyrosine phosphatase-2)
SNC	Sistema nervioso central
Sos	Proteína cuyo nombre deriva de “Hijo de sevenless” (del inglés <i>Son of sevenless</i>)

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Imagen de la sección transversal de la retina humana, en concreto del área de la mácula, adquirida mediante tomografía de coherencia óptica (OCT) donde se ilustra las capas de la retina	5
Figura 2.	A: Estructura de los fotorreceptores: bastón y cono, B: cascada de la Visión	11
Figura 3.	Sección transversal de la retina	20
Figura 4.	Secuencia de nucleótidos de la estructura primaria de la insulina humana	21
Figura 5.	Receptor de la insulina	22
Figura 6.	Diagrama resumen de la interacción de la I/IGF con los receptores tirosina-kinasa y alguna de las respuestas fisiológicas reguladas por IGF/I	24
Figura 7.	Función del complejo receptor- insulina	26
Figura 8.	Receptor IGF tipo I (A) y receptor IGF tipo II o receptor de manosa 6 fosfato (B)	30

Figura 9.	Esquema de interacción proteína-proteína en la cascada de señalización de la insulina	34
Figura 10.	Estructura de una proteína sustrato del receptor de insulina (IRS) ...	38
Figura 11.	Diagrama esquemático de la molécula de IRS1 en humano. Las flechas continuas indican los enlaces fuertes y las flechas discontinuas los enlaces débiles	39
Figura 12.	Diagrama esquemático de la molécula IRS2	41
Figura 13.	Diagrama esquemático de la regulación de los procesos energéticos a través de IRS2 e IRS1	43
Figura 14.	Estructura de la subunidad reguladora (p85) dePI-3 kinasa	47
Figura 15.	Estructura de la proteína Grb2	48
Figura 16.	Esquema del proceso de cascada de Ras	49
Figura 17.	Vías de señalización de la insulina e IGFs	54
Figura 18.	Activación de la vía de la PI3K/Akt por la insulina	56
Figura 19.	Cadena de activación de la familia MAP kinasa	60
Figura 20.	Activación de la vía de las MAPK por acción de la insulina	61

Figura 21.	Representación esquemática de los tres estadios de la degeneración retiniana	73
Figura 22.	Organización anatómica de los complejos sinápticos de los fotorreceptores en retina normal y retinas afectas de DMAE	80
Figura 23.	Inactivación del gen IRS 2 por recombinación homóloga. Mapa de restricción del vector (arriba), el gen de IRS 2 (medio) y el gen homólogo recombinante (parte inferior)	90
Figura 24.	Esquema simplificado de la creación de ratones Knock out	91
Figura 25.	Preparación de la muestra	111
Figura 26.	Obtención de los cortes al microtomo	111
Figura 27.	Proceso de desparafinación	112
Figura 28.	Tinción de las muestras	112
Figura 29.	Procesado de fotografiado de las muestras	113
Figura 30.	Estudio morfométrico de una muestra de retina de ratón control de la cepa C57BL/ 6 con el programa de ImageScope	114

Figura 31.	Detección de antígenos mediante anticuerpos marcados con Fluorocromo	116
Figura 32.	Criostato Leica CM 3050	118
Figura 33.	Colocación del AC primario en las muestras	119
Figura 34.	Colocación de anticuerpo secundario	122
Figura 35.	Microscopio confocal Leica TCS SP2	125
Figura 36.	Observación de las imágenes a microscopia confocal	126
Figura 37.	Microfotografías confocales de secciones transversales de 20 μm de grosor de retinas de ratón control (A) y ratón IRS2 -/- (B-C). La barra indica 20μm en la imagen B y 10 μm en la imagen C	139
Figura 38.	Microfotografías confocales de secciones transversales de 20 μm de grosor de retinas de ratón control (A) y ratón IRS2 -/- (B-C). Inmunomarcaje de conos con cone-arrestin. La barra indica 20μm en imagen B y 10 μm en imagen C	140
Figura 39.	Microfotografías confocales de secciones transversales de 20 μm de grosor procesadas con S-opsin (A,C) y M/L-opsin (B,D) en retinas de ratón control (A-B) y ratón IRS2 -/- (C-D). La barra indica 20μm	141

- Figura 40.** Microfotografías tomadas de retinas whole mount de ratón control (A) y ratón IRS2^{-/-} (B-C). Inmunomarcaje de conos con cone-arrestin. La barra indica 20µm en imagen B y 10 µm en imagen C 142
- Figura 41.** Microfotografías confocales de secciones transversales de 20 µm de grosor de retinas de ratón control (A, D) y ratón IRS2^{-/-} (B, C, E) procesadas con synaptofisina (A-C) y bassoon (D-E). La barra indica 10µm 144
- Figura 42.** Microfotografías confocales de secciones transversales de 20 µm de grosor de retinas de ratón control (A, D) y ratón IRS2^{-/-} (B, C, E, F, G-I). Fig A-C procesadas con PKCα para revelar células bipolares de bastones. (D-F) Fotomicrografías procesadas con arrestin (conos) y Goα (células bipolares ON conos y bipolares de bastones) en retina control (D) e IRS 2^{-/-} (E-F). (G-I) Doble marcaje con PKCα y Goα. La barra indica 20µm (A, B, D, E, G-I) y 10µm (C, F) 149
- Figura 43.** Microfotografías confocales de secciones transversales de 20 µm de grosor de retinas de ratón control (A) y ratón IRS2^{-/-} (B, C) procesadas con calbindina. La barra indica 20µm 151
- Figura 44.** Microfotografías confocales de secciones transversales de 20 µm de grosor de retinas de ratón control (A) y ratón IRS2^{-/-} (B-D). La barra indica 20µm 152

- Figura 45.** Microfotografía confocal de sección transversal de 20 μm de grosor de retina de ratón IRS2^{-/-} procesada con calretinina. La barra indica 20 μm 154
- Figura 46.** Microfotografías confocales de secciones transversales de 20 μm de grosor de retinas de ratón control (A) y ratón IRS2^{-/-} (B-D) procesadas con la subunidad de neurofilamento L (70 kDa, NFL). La barra indica 20 μm 155
- Figura 47.** Microfotografías confocales de secciones transversales de 20 μm de grosor (obtenidas mediante criostato) de retinas de ratón control (A) y ratón IRS2^{-/-} (B) procesadas con proteína glial fibrilar ácida (GFAP). La barra indica 20 μm 156
- Figura 48.** Microfotografías confocales de secciones transversales de 20 μm de grosor de retinas de ratón control (A) y ratón IRS2^{-/-} (B) procesadas con Iba-1. La barra indica 20 μm 157

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1.	Media del espesor de las capas de la retina en el grupo control y grupo KO (** $p < 0,001$)	137
Gráfico 2.	Recuento de puntos bassoon positivos cada 100 μ m de longitud retiniana. Los datos se muestran con el valor medio y la desviación estándar de la media. <i>Test de la T de Student</i> *** $p < 0.001$	146
Gráfico 3.	Recuento de puntos PKC α positivos cada 100 μ m de longitud retiniana. Los datos se muestran con el valor medio y la desviación estándar de la media. <i>Test de la T de Student</i> *** $p < 0.001$	153

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Clasificación de las proteínas que interactúan con las proteínas IRS ..	46
Tabla 2.	Mutaciones naturales de degeneración retiniana en ratones	78
Tabla 3.	Resumen de los anticuerpos utilizados	124
Tabla 4.	Datos estadísticos de las muestras de retina del ratón control ...	135
Tabla 5.	Datos estadísticos de las muestras de retina del ratón Knock out..	136
Tabla 6.	Datos estadísticos de la densidad de los terminales sinápticos de los fotorreceptores en los dos grupos de ratones	146
Tabla 7.	Datos estadísticos de la densidad de los terminales sinápticos de las células bipolares de bastones en los dos grupos de ratones	153

I. Introducción

1. Anatomía de la retina humana

El conocimiento de la anatomía de la retina nos ayudará a tener una mayor aproximación al entendimiento de los cambios sufridos en situaciones de enfermedad.

Como bien apunta Pulido (2003), la retina se compone de la *retina sensorial* y del *epitelio pigmentario*.

La retina neurosensorial se extiende desde la cabeza del nervio óptico, hasta la ora serrata, donde se continúa con el epitelio ciliar no pigmentado de la pars plana.

Su cara interna está en contacto con el vítreo, mientras que por su cara externa se encuentra adyacente al epitelio pigmentario retiniano (EPR), al cual está firmemente adherida en dos áreas: el disco óptico y la ora serrata, siendo la unión débil en el resto, sin uniones apicales, manteniéndose en contacto por presión negativa.

La retina central o **mácula**, como dice Olea (2010), es definida histológicamente como el área de la retina posterior que tiene al menos dos capas de núcleos de células ganglionares. Mide aproximadamente 5.5 mm de diámetro. La mácula está formada por: la foveola, la fóvea, la parafóvea y perifóvea.

La *fóvea* representa una excavación en el centro de la retina, de 1.5 mm de diámetro. La superficie retiniana interna es cóncava debido al adelgazamiento de las capas retinianas internas. En el fondo de la depresión foveal se encuentra la *foveola* de unos 0.350 mm de diámetro y 150 μ m de espesor, cuyo centro es el umbo. Las capas de fibras nerviosas, células ganglionares y plexiforme interna están ausentes en la foveola. La capa nuclear interna está reducida a una doble fila de células en el borde de la fóvea

y está ausente dentro de la misma. La capa de fotorreceptores en el centro de la fóvea está compuesta enteramente por conos.

La *parafóvea* es un cinturón alrededor de la fóvea, de unos 0.5 mm de ancho. Se caracteriza por la prominente celularidad de las capas retinianas internas, especialmente la capa nuclear interna y ganglionar. La relación de conos y bastones es de 1:1.

La perifóvea, de 1.5 mm de ancho alrededor de la retina parafoveal, es la zona periférica de la región macular. Se extiende a 2.75 mm del centro de la fóvea, a partir de la cual la capa de células ganglionares se reduce a una capa simple de núcleos, como en el resto de la retina periférica. La relación de conos-bastones es de 1:2.

Los estudios de Ramon y Cajal, utilizando el método de Golgi, sentaron las bases neuroanatómicas del sistema nervioso en general, y del sistema visual en particular. Cajal sugirió que existían dos tipos principales de vías de procesamiento de la información. Una cadena principal, en la que la información procedente de los fotorreceptores (conos y bastones) pasaría a las células bipolares y de aquí a las células ganglionares y una cadena de asociación lateral en la que intervendrían las células horizontales (a nivel de la plexiforme externa) y las células amacrinas (a nivel de la plexiforme interna). Cajal también introdujo la idea de que la mayor parte de las conexiones sinápticas se realizaban a nivel de las capas plexiformes, donde interaccionaban los axones y dendritas de las diferentes células permitiendo que las terminaciones presinápticas establecieran contacto con sus respectivas terminaciones postsinápticas (Ramon y Cajal S, 1892-1893).

Polyak fue uno de los pioneros en la aplicación del método de Golgi a retinas de monos y chimpancés, dando lugar a una serie clásica de trabajos que se resumen en su famoso libro *The retina* (Poliak, 1941).

1.1 Estructura de la retina

Histológicamente, la retina se divide en 10 capas, bien caracterizadas por Ramón y Cajal. A continuación incorporamos la clasificación de la retina que hizo Poliakov modificando parcialmente la de Cajal (Poliakov, 1941), que desde la superficie interna (próxima al vítreo) a la externa (adyacente a la coroides) se estratifica de la siguiente forma y que queda bien ilustrada en la figura 1, que se trata de una imagen de la zona macular de la retina captada mediante tomografía de coherencia óptica:

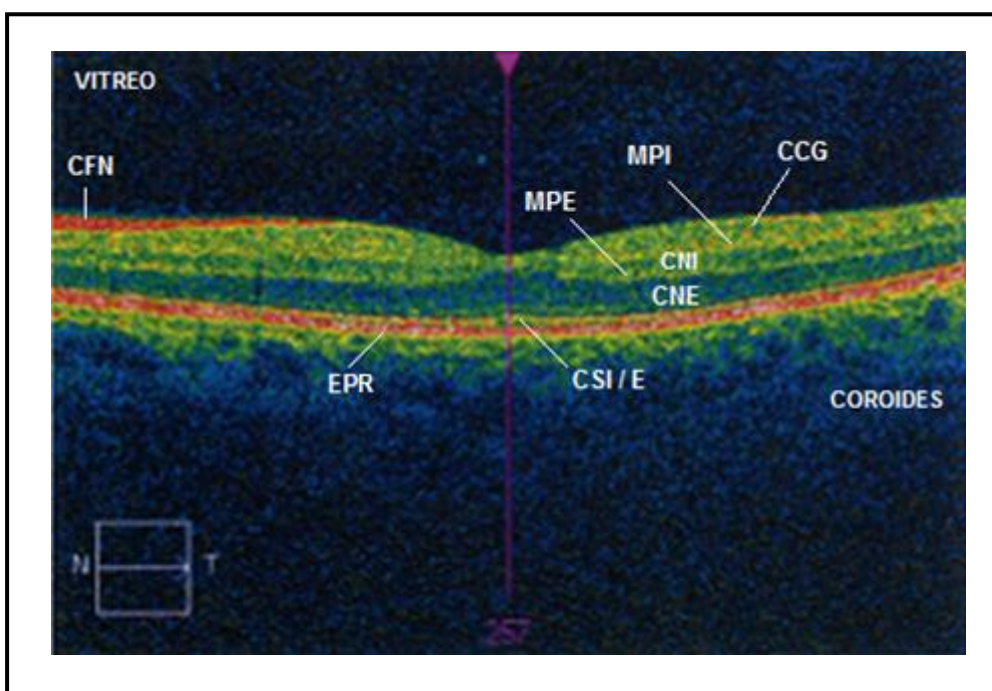


Figura 1: Imagen de la sección transversal de la retina humana, en concreto del área de la mácula, adquirida mediante tomografía de coherencia óptica (OCT) donde se ilustra las capas de la retina.

- **Membrana limitante interna (MLI):** considerada como superficie modificada del cuerpo vítreo y la extensión de los pies de las células de Müller en contacto con la hialoides posterior.
- **Capa de fibras nerviosas o de fibras del nervio óptico (CFN):** axones de las células ganglionares.
- **Capa de células ganglionares (CCG):** está formada por los cuerpos celulares de las células ganglionares. Pero esta capa también contiene abundantes células amacrinas desplazadas, astrocitos, células endoteliales y pericitos.
- **Membrana plexiforme interna (MPI):** está formada por los axones de las células bipolares y amacrinas y las dendritas de las células ganglionares y sus sinapsis, esta capa a su vez, está subdividida en al menos 10 subláminas (Robles et al., 2012). Esta estratificación dentro de la misma capa se trata de una característica prominente del sistema nervioso, organizándose las sinapsis en capas discretas o láminas. Estas láminas son esenciales para la segregación espacial de las conexiones sinápticas que transportan diferentes tipos de información.
- **Capa nuclear interna (CNI):** principalmente formado por los cuerpos de las células bipolares, junto con las células horizontales y amacrinas, así como el núcleo de las células de Müller.
- **Membrana plexiforme externa (MPE):** contiene la sinapsis de los fotorreceptores con las células bipolares y horizontales.
- **Capa nuclear externa (CNE):** cuerpos celulares de fotorreceptores, conos y bastones, transductores sensoriales primarios del sistema visual.

- **Membrana limitante externa (MLE):** formada por los complejos de unión entre las membranas celulares de las células de Müller y la de los segmentos internos (SI) de fotorreceptores.
- **Capa de fotorreceptores (conos y bastones):** formada por los segmentos externos de los fotorreceptores (CSE).
- **Epitelio pigmentario retiniano (EPR):** está formado por una monocapa de células hexagonales que se extiende en dirección anterior desde la papila óptica hasta la ora serrata, donde se fusiona con el epitelio pigmentario del cuerpo ciliar.

1.2 Componentes celulares de la retina

La retina consta de 6 tipos neuronales (Kaufman, 2004): fotorreceptores, células horizontales, células bipolares, células amacrinas, células interplexiformes y células ganglionares.

1.2.1 Fotorreceptores

Los *fotorreceptores* son células muy especializadas que convierten la luz en señales nerviosas mediante un proceso que se conoce como fototransducción. Sus partes distales están preparadas para captar la luz y sus zonas proximales se han adaptado a la transmisión de impulsos. Existen dos tipos fundamentales de fotorreceptores: los **bastones** y los **conos**. Los fotorreceptores tienen su soma localizado en la capa nuclear externa. Su estructura (Fig. 2A) se compone de dos *segmentos* (*externo* que está formado por varios cientos de láminas o placas delgadas de membrana y el *segmento interno* donde se encuentra el cilindroeje y finaliza con el terminal

sináptico), conectados entre sí por un fino tracto excéntrico de citoplasma denominado *cilio* donde se halla el núcleo. Los segmentos externos de los fotorreceptores se hallan entre el EPR y la MLE y los segmentos internos de los fotorreceptores se encuentran por debajo de la MLE.

Los elementos presinápticos de los fotorreceptores hacen sinapsis con otras células mediante el **terminal sináptico**, en el caso de los **bastones** tiene morfología redondeada y se le denomina *esférula* y en los **conos** forma triangular y se le denomina *pedículo*. Los fotorreceptores, como apunta Cuenca (2009), además de realizar la fototransducción, se comportan como neuronas, liberando neurotransmisores (*glutamato*) en su terminal axónico. Para ello utilizan un tipo especial de sinapsis química denominado **sinapsis en cinta**. En el terminal presináptico de dichas sinapsis se encuentra una estructura proteica denominada **cintilla sináptica o “synaptic ribbons”** como se conoce en inglés, alrededor de las cuales se localizan vesículas sinápticas cargadas de neurotransmisores. Morgans (2000) comenta que esta estructura está situada perpendicularmente e inmediatamente por encima de la membrana plasmática, justo por encima de una evaginación de la membrana presináptica, en el sitio de la fusión de la vesícula sináptica y está rodeada por un halo de vesículas sinápticas que están atados a la cinta por filamentos cortos. Para poder detectar esta estructura se utilizan anticuerpos contra proteínas presentes en estos terminales, entre ellas está la **sinaptofisina**, que participa en la formación y el reciclado vesicular (Takamori et al., 2006). Así mismo, entre la membrana presináptica y la cintilla se halla una densa banda curva que recibe el nombre de *densidad arciforme*, la cual se piensa que sirve para anclar la

cinta a la membrana (Dick et al., 2003). Si quisiéramos valorar la densidad arciforme de la cintilla sináptica, varios autores, como Grossman et al., (2009) o Dick et al., (2003) entre otros, utilizan anticuerpos contra la proteína **bassoon**, que junto con la proteína **piccolo**, han sido implicadas en la organización de la sinapsis del fotorreceptor, el funcionamiento de la cinta y el tráfico de vesículas en la sinapsis (Dick et al., 2001).

La cintilla sináptica se encuentra en las invaginaciones presentes a lo largo de los pedículos y las esférulas de los fotorreceptores, en las cuales penetran procesos de células horizontales y bipolares (Stell, 1975).

Los bastones contienen *rodopsina*, pigmento visual que se aloja en los receptores de doble membrana (en forma de disco) que se apilan en el segmento externo de los fotorreceptores, aislados de la membrana plasmática. En cambio en los conos su homólogo es la *yodopsina*. La rodopsina tiene dos componentes, una proteína llamada *opsina* y un pigmento llamado *retinal* (11-cis-retinal).

En presencia de la luz, la rodopsina comienza a descomponerse a través de varias formas intermedias hacia el 11-trans-retinal, más estable, lo que provoca pérdida de color de la molécula, pero no genera potencial de acción, sino que al descomponerse disminuye la conductancia de los iones de sodio (Na⁺) hacia el interior del bastón, de esta forma hay salida de iones positivos, produciendo un aumento de la negatividad intracelular, alcanzándose valores de -90mV, *potencial del receptor*.

Para entender el *proceso molecular de la fototransducción*, lo explicaremos brevemente a continuación (Fig. 2B). Hay que tener en cuenta que en condiciones

escotópicas, el monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) se une a la superficie interna de los canales de Na^+ y los abre, de esta forma se origina la corriente oscura que da como resultado la despolarización del fotorreceptor, que a su vez hace más positivo el potencial de membrana del fotorreceptor (-40mV) y se abren los canales de calcio (Ca^{2+}) con la consiguiente entrada de iones en el interior celular. La despolarización del fotorreceptor, permite la liberación continua del neurotransmisor de glutamato. Sin embargo se producen cambios moleculares cuando un fotón es absorbido por la rodopsina, el cual causa la isomerización del retinal, produciéndose un cambio conformacional de la rodopsina a su estado activo. La rodopsina, excitada por la luz, cataliza el intercambio de los nucleótidos guanosildifosfato (GDP) por guanostil trifosfato (GTP) de una proteína G denominada transducina que a su vez activa a la enzima fosfodiesterasa (PDE), que como consecuencia de su activación estimula la degradación GMPc, provocando el cierre de 250 canales de Na^+ por un cuanto de luz absorbida. De esta forma se acumulan iones de Na^+ en el exterior de la membrana plasmática y el potencial del receptor adopta un estado de hiperpolarización. Este cambio de potencial de membrana conduce al cierre de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje que a su vez conlleva a una disminución de la entrada de Ca^{2+} en la sinapsis.

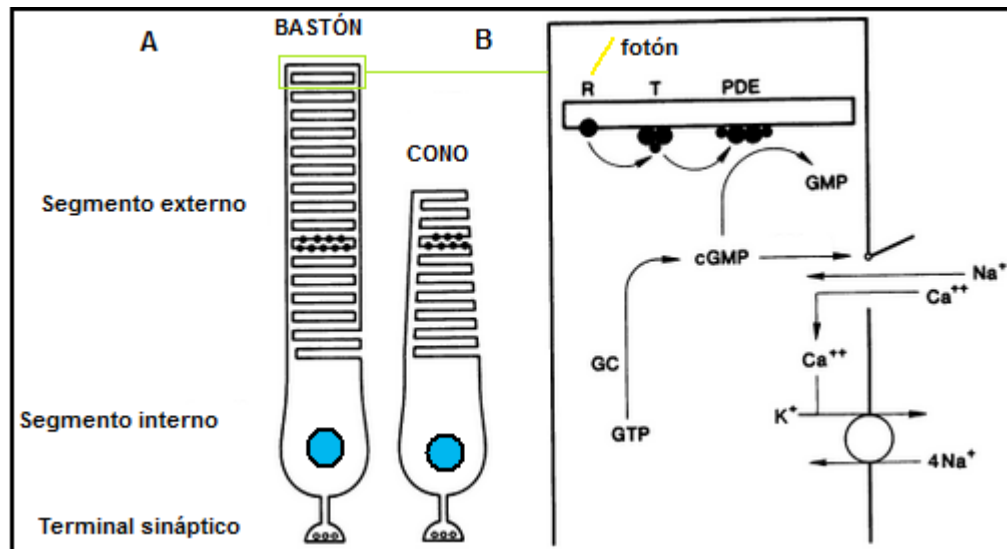


Figura 2. A: Estructura de los fotorreceptores: bastón y cono, B: cascada de la visión. (Extraído de Baylor D, 1996).

El resultado final es una disminución de la secreción del neurotransmisor glutamato por parte de los fotorreceptores. Como se sabe que la sinapsis con las células de segundo orden, las células bipolares es inhibitoria, de esta forma se deja de inhibir a esta célula, formándose un impulso nervioso que es transmitido a las células ganglionares y de éstas al cerebro (Chabre et al., 1989; Baylor, 1996; Kono et al., 2008; Lledó et al., 2010) (Fig. 2B).

Hay que señalar que hay una familia de proteínas reguladoras que se unen a receptores fosforilados acoplados a proteína G para activar un proceso de desensibilización del receptor mediante la endocitosis del mismo, con la finalidad de reciclar los receptores de la membrana plasmática. Entre esas proteínas se encuentra la **arrestina** (Mayor, 2010). Han sido identificados dos miembros de arrestinas visuales en los fotorreceptores: 1) arrestina de los bastones (rod –arrestin o también

conocida como S-antígeno) y 2) arrestina de los conos (cone-arrestin). Craft et al., (1994) descubrieron que cone-arrestin se expresaba mayormente en la retina, en concreto en los conos y en la glándula pineal. De ahí que la detección de cone-arrestin en la retina nos proporcionará una herramienta molecular útil para dirigir la expresión en conos.

Los bastones son los fotorreceptores responsables de la visión en condiciones de baja luminosidad. Los conos contienen pigmentos visuales que se alojan en los receptores de la propia membrana plasmática, son los fotorreceptores responsables de la visión en color, en tanto que cada uno de los tres tipos de conos captan una longitud de onda determinada en función del tipo de cromóforo u opsina que contienen: **conos S** (del inglés short wavelength), **conos M** (del inglés medium wavelength) y **conos L** (del inglés long wavelength). Éstos son sensibles a tres regiones distintas del espectro luminoso. Sus máximos de absorción se encuentran a 420 (azul; S), 531 (verde; M) y 588 (rojo; L) nm. En los mamíferos no primates, como el ratón, la discriminación del color es llevada a cabo solamente por dos tipos de conos llamados S y M/L.

1.2.2 Células bipolares

Las *células bipolares* tienen su soma localizado en la CNI, donde emiten prolongaciones dendríticas a MPE y MPI, contactando con las terminaciones sinápticas de los fotorreceptores y las de células ganglionares y amacrinas. Ramón y Cajal (1892) ya describió dos tipos básicos de células bipolares, unas que recibían ingresos exclusivos de conos y otras que lo hacían exclusivamente de bastones.

Existen ocho tipos de células bipolares que comunican con los conos, mientras que sólo hay un tipo que contacta con los bastones.

Kolb (2001) nos comenta que las terminaciones axonales de las células bipolares traen información de la MPE al entramado neuropilo (que incluye las prolongaciones de las neuronas, las prolongaciones de las células gliales y los vasos sanguíneos) de la MPI. Aquí las células bipolares entablan conexiones con distintas variedades de células amacrinas funcionalmente especializadas y con las dendritas de las células ganglionares.

Para la detección de células bipolares de los bastones se utiliza anticuerpo dirigido contra la proteína kinasa C (PKC), ya que como observaron Greferath et al., (1990) en la retina de varios mamíferos, había inmunorreactividad de PKC en las células bipolares, pero sólo en las que tenían la morfología de las células bipolares de los bastones. La PKC se trata de una enzima que juega un papel importante en la regulación de la neurotransmisión tanto en pre- como en postsinapsis como han visto varios autores, entre ellos: Malenka et al., (1984), Nishizuka (1992), Bramham et al., (1994). La PKC, denominada así por ser dependiente de Ca^{2+} , es miembro de una gran familia de proteínas kinasas, que consiste en al menos 11 subespecies de PKC descritas: alpha, beta I, beta II, gamma, delta, epsilon, eta, theta, mu, zeta y lambda. Saito (1995) ha observado que la localización inmunocitoquímica sugiere que las PKCs (alpha, beta I, beta II, and gamma) tienen función postsináptica, mientras que PKC-epsilon modula la eficacia de la sinapsis en la presinapsis. Kosaka et al., (1998) estudiaron la localización y expresión de tres isoenzimas de PKC (alfa, beta y gamma) en retina de rata. La señal de inmunorreactividad de PKC- alfa ($PKC\alpha$) fue

importante en las células bipolares de bastones, aunque también son inmunorreactivas algunas células amacrinas.

Otro de los anticuerpos que se utilizan para la detección de células bipolares es el anticuerpo contra Go alfa ($G\alpha$), se trata de un marcador de *células bipolares ON de conos* como observaron Vardi (1998), Dhingra et al., (2000) y Zhang et al., (2003), pero también de *células bipolares de bastones* como identificaron Vardi et al., (1993).

Según han demostrado Nawy et al., (1990), la despolarización se mantiene en las células bipolares ON gracias a que fluyen cationes a través de los canales abiertos en ausencia del transmisor, pues hay una alta concentración de GMPc. El glutamato (principal neurotransmisor excitatorio retiniano) parece ser justamente la causa del cierre de estos canales, pues activará un segundo mensajero que haría disminuir los niveles de GMPc. Las células bipolares tendrían un receptor de glutamato específico, que al igual que la rodopsina activaría una proteína G, que a su vez activaría a la fosfodiesterasa de GMPc que produciría su degradación. La proteína G sigue sin ser identificada, pero la subunidad alfa de Go ($G\alpha$) ha sido sugerida como candidata porque está presente tanto en las células bipolares de los bastones como en células bipolares ON de conos.

Como ya hemos comentado anteriormente, el fotorreceptor se hiperpolariza en respuesta a la luz, con lo que cesa la liberación de glutamato. Las células bipolares no generan potenciales de acción del tipo “todo o nada”, sino que responden a los estímulos presinápticos de los fotorreceptores de dos formas: hiperpolarizando o

despolarizando su membrana. Se clasifican las células bipolares en función de su respuesta en (Werbling, 1991):

- **Célula bipolar OFF** si se *hiperpolariza* al cesar la liberación de glutamato por parte de los fotorreceptores.
- **Célula bipolar ON** si se *despolariza* en las mismas condiciones.

Kolb (2003) dice que las células bipolares OFF dan lugar a lo que se conoce como vía OFF en el procesamiento visual, a partir de la cual se detectan imágenes oscuras sobre fondos claros. Por su parte las células bipolares ON dan lugar a la vía ON, mediante la cual se detectan imágenes claras sobre fondos oscuros.

Hay que añadir, que las células bipolares que hacen sinapsis con conos las hay tanto de tipo ON como de tipo OFF. En cambio, el único tipo de célula bipolar que hace sinapsis con bastones son células siempre de tipo ON (Boycott et al., 1991; Ghosh et al., 2004).

1.2.3 Células horizontales

Las **células horizontales** son neuronas de interconexión lateral a nivel de la MPE, localizándose sus somas en la parte más externa de la CNI. Se han descrito tres tipos de células horizontales: las de tipo I que no poseen axón y contactan preferentemente con conos rojos y verdes, aunque ocasionalmente también lo hacen con azules; las de tipo II que sí cuentan con axón y que contactan preferentemente con conos azules; y las de tipo III son similares a las de tipo I pero de mayor tamaño y no contactan con conos azules. Todas ellas modulan la acción de los fotorreceptores.

Un marcador que revela la presencia de células horizontales es la **calbindina**. Es curioso pero esta proteína fue descrita por primera vez por Wassermann y Taylor (1966), quienes la encontraron en la mucosa intestinal del pollo y la denominaron *proteína ligante de calcio de 28K inducida por vitamina D*. Más tarde en 1985, el mismo Wassermann le dió el nombre actual de calbindina D-28K. Observaron que el papel de esta proteína se relaciona con el transporte y tamponado de iones de calcio, regulando de este modo la concentración y distribución del mismo en el interior celular. Pasteels et al., (1990) han observado que los conos de las retinas de mono, cerdo, oveja, rata, gato, paloma y salamandra son positivas a calbindina. Pochet et al., (1991) observaron que el patrón de inmunorreactividad a calbindina en el ratón es diferente al que se encuentra en la retina de primates. En la retina del ratón, los fotorreceptores y las células bipolares no presentan inmunorreactividad a calbindina, pero las células horizontales presentan una fuerte inmunorreactividad a este marcador. También son positivas algunas células amacrinas y ganglionares, así como la capa de las fibras.

1.2.4 Células amacrinas

Las **células amacrinas** son interneuronas que interactúan en el segundo nivel sináptico de la vía vertical, es decir, no reciben conexiones directas de los fotorreceptores, sólo de las células bipolares, células ganglionares y de otras células amacrinas, formando la vía de asociación lateral a nivel de la plexiforme interna (Kolb, 2005). Tienen su soma a nivel de la CNI, a partir de la cual establecen sinapsis con los terminales de todos los tipos de células bipolares y con

las dendritas de las células ganglionares. Algunas amacrinas se ubican en la capa de las células ganglionares y se conocen como amacrinas *desplazadas*. Se distinguen las amacrinas difusas y las estratificadas. Las difusas extienden sus procesos a lo largo de todo el espesor de la MPI, mientras que las estratificadas lo hacen en uno o pocos estratos de esta capa. La mayoría de las células amacrinas son neuronas inhibitorias en la retina de los vertebrados, conteniendo neurotransmisores ácido gamma-aminobutírico (GABA) o glicina (Kolb, 2000). Las células amacrinas colinérgicas, comentan Masland et al., (1986) están situadas en la CCG o en la CNI, y dan lugar a procesos dendríticos que estratifican en estrechas bandas dentro de las partes internas o externas de la MPI respectivamente.

1.2.5 Células interplexiformes

Las *células interplexiformes* fueron descritas en la retina del gato en 1971 (Gallego, 1971). Tienen sus cuerpos celulares en la capa nuclear interna y envían sus procesos tanto a la capa plexiforme externa como a la interna.

1.2.6 Células ganglionares

Las *células ganglionares* suman las respuestas de las células bipolares y amacrinas y generan potenciales de acción que son conducidos hasta el núcleo geniculado dorsolateral del encéfalo (Kolb, 1995). La distinción ON-OFF de las células bipolares también se distingue en estas células. Así pues, las células bipolares OFF excitarán a las células ganglionares OFF, y las células bipolares ON excitarán a células ganglionares ON, a excepción de las células bipolares de bastón ON que

hacen conexión con las células ganglionares a través de las amacrinas. Pero la respuesta al estímulo de la luz va a ser diferente, es decir, la célula ganglionar ON se despolariza y envía potenciales de acción durante el tiempo que dura el estímulo, mientras que la célula ganglionar OFF se hiperpolariza y deja de emitir potenciales de acción (Kolb, 1995).

Su cilindroeje está formado por neurofilamentos (NFs). Lee et al., (1996) comentan que los NFs son filamentos intermedios y los componentes estructurales más abundantes en los axones mielinizados de gran diámetro, siendo una pieza clave para la velocidad de conducción. Los neurofilamentos se agrupan entre sí, formando lo que se conoce como el triplete de proteínas de neurofilamentos, compuesto de NFs de bajo peso molecular (≈ 70 KDa, NF-L), medio peso molecular ($\approx 140-160$ KDa, NF-M) y alto peso molecular (≈ 200 KDa, NF-H). Estos tres componentes forman filamentos de 8- 10 nm de diámetro que corren paralelas a lo largo de la longitud del axón, sirviendo principalmente como función estructural. Sin embargo, no todas las neuronas tienen la misma combinación de subunidades de NFs e incluso entre especies hay diferencias claras. En la retina, Ruiz-Ederra et al., (2004) dicen que la inmunoreactividad de los NF se ha descrito principalmente en los procesos de las células ganglionares de la retina y los axones, pero dependiendo de las especies estudiadas fue encontrada también en otros tipos de neurona. Pero en la única célula donde no se ha detectado inmunoreactividad contra NFs es en los fotorreceptores. Las tres subunidades de NFs se asocian normalmente pero hay excepciones. Dräger et al., (1984) han observado en la retina interna del ratón la presencia de NF-L a lo

largo de grandes células ganglionares, mientras que NF-H se encuentra solamente en las porciones más distales de los axones ópticos.

1.2.7 Células gliales

También hay que nombrar la presencia en la retina neurosensorial de las *células gliales*, de las cuales se han descrito 4 tipos (Kolb, 1995):

- *células de Müller* son las más numerosas y se extienden a través de todo el espesor de la retina. Las células de Müller tienen numerosas y muy importantes funciones; entre ellas, contribuir a la barrera hematorretiniana, aportar soporte trófico a los vasos sanguíneos en la retina interna por la liberación del VEGF, proteger a las neuronas absorbiendo el glutamato liberado por éstas, y el óxido nítrico, proporcionar la guía para el desarrollo retiniano gracias a su arquitectura radial, ser sumidero de iones potasio que se forman siguiendo la activación de las bipolares y actualmente aumenta la evidencia de que pueden ser progenitores de neuronas.
- *astrocitos* aparecen sobre todo en las partes más internas de la retina y cabeza del nervio óptico. Juegan un papel fundamental en la regulación del balance iónico, neurotransmisión, plasticidad sináptica y neurodegeneración. Hay dos tipos de astrocitos: astrocito tipo I que expresa proteína glial fibrilar ácida (GFAP) y conexina-43 y astrocito tipo II que sólo expresa GFAP. Ambos tipos de astrocitos quiescentes llegan a ser reactivos, proliferando ante varios estímulos de daño celular.
- *células microgliales* de naturaleza fagocítica.

- *células macrogliales* (astrocitos y oligodendrocitos) los últimos envuelven a los axones de las células ganglionares formando la vaina de mielina.

La distribución retiniana de los componentes celulares más importantes de la retina queda muy bien ilustrada en la figura 3 por Hubel (1999).

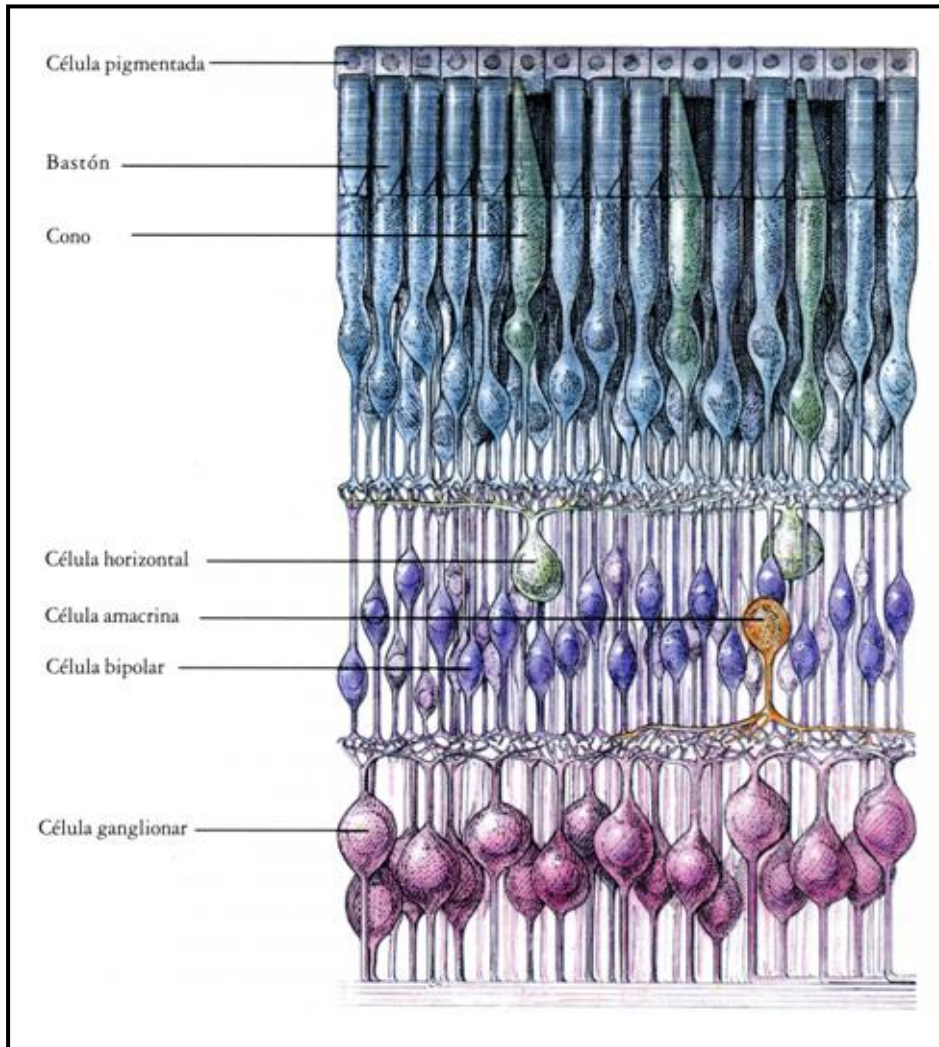


Figura 3. Sección transversal de la retina. (Extraído de Hubel, 1999).

2. Insulina y factor de crecimiento similar a la insulina

2.1 Insulina

La **insulina** fue descubierta por Banting y Best en 1922 en Toronto, Canadá, suponiendo un hito en la medicina y sobretodo en el campo de la endocrinología molecular y clínica, siendo una revolución en el curso de la diabetes, cambiando radicalmente su pronóstico y aumentando así la esperanza de vida de los pacientes portadores de esta enfermedad (Banting y Best, 1922).

Frederick Sanger fue quién consiguió determinar la estructura química de la insulina en 1955 (Sanger et al., 1955). Este investigador precisó que la molécula de insulina, cuyo peso molecular es de 6000 daltons, está constituida por dos cadenas polipeptídicas, una formada por 21 y otra por 30 aminoácidos. Ambas cadenas están ligadas por dos uniones bisulfuradas, correspondientes a grupos cisticos de las cadenas A y B según Vajo et al., 2000 (Fig. 4).

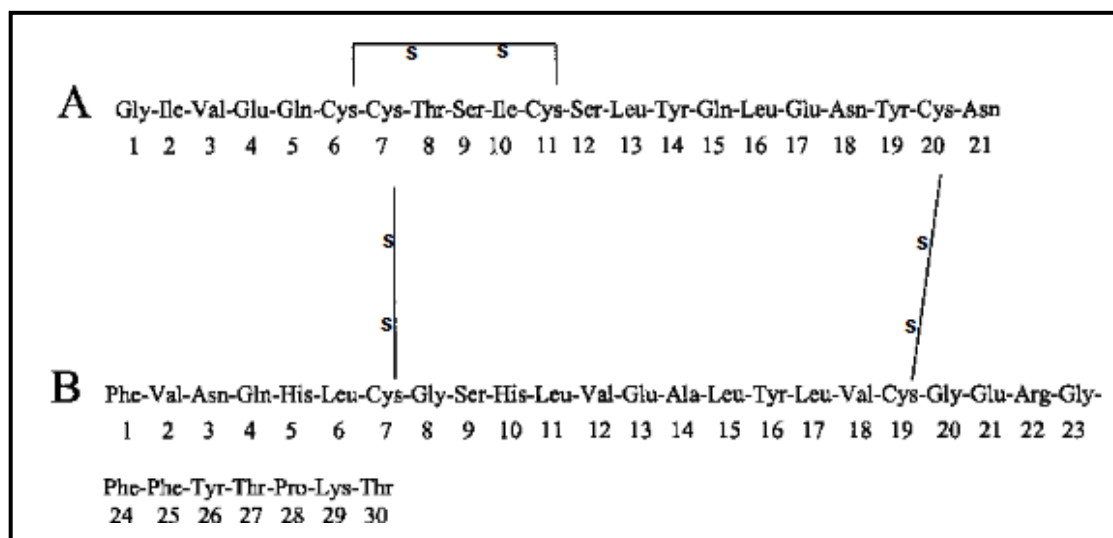


Figura 4. Secuencia de nucleótidos de la estructura primaria de la insulina humana. (Extraído de Vajo et al., 2000).

La estructura del **gen de la insulina** está muy conservada entre las especies, es decir, las secuencias de nucleótidos se encuentran altamente conservadas a lo largo de la evolución, a excepción del cobayo, que ha acumulado mutaciones en las cadenas A y B, produciendo una insulina con una menor potencia que la de otras especies y consiste en tres exones y dos intrones y está localizado en el **brazo corto del cromosoma 11**.

2.1.2 Receptor de la insulina

El **receptor de la insulina (RI)** consiste en una glicoproteína de membrana (aproximadamente *Mr* 300 000 daltons) compuesto de **dos subunidades α** (aproximadamente *Mr* 130 000 daltons) y **dos subunidades β** (aproximadamente *Mr* 95 000 daltons) unidos por puentes disulfuro como se refleja en la figura 5 (Gammeltoft y Van Obberghen, 1986).

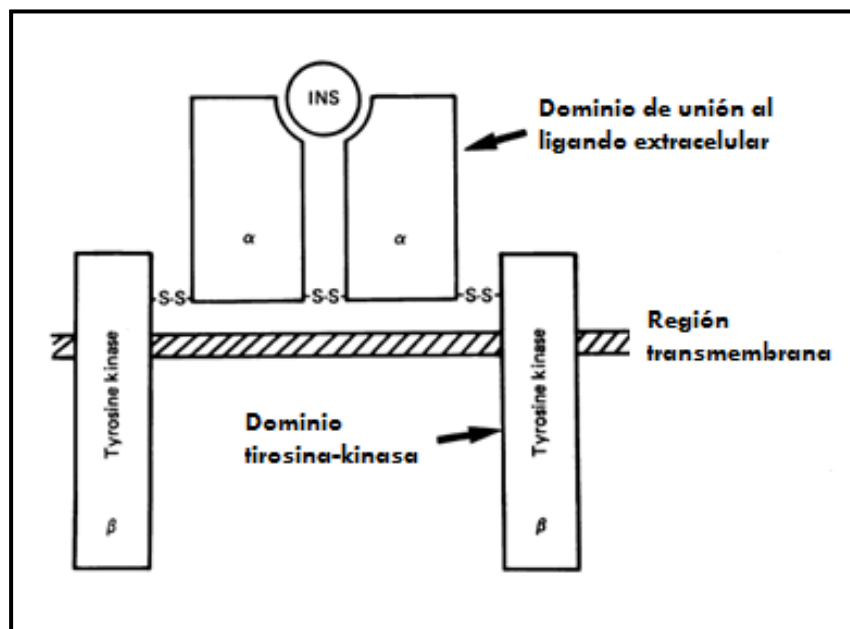


Figura 5. Receptor de la insulina (Extraído de Gammeltoft y Van Obberghen, 1986)

El modelo del receptor ha sido estudiado por diversos investigadores y métodos distintos para dilucidar la estructura completa del receptor (Yip et al., 1978; Jacobs et al., 1979; Pilch et al. 1979; Van Obberghen et al., 1981, Siegel et al., 1981) como expone Gammeltoft S et al., (1986). Este complejo, mediante la activación de la insulina, controla la actividad de una tirosina-kinasa intracelular. La activación de estas tirosinas-kinasas generan diferentes respuestas fisiológicas a través de cambios conformacionales del receptor (White et al., 2003).

El **RI** se forma bajo la dirección de la activación del gen que codifica la síntesis de este tipo de receptor. Este **gen** se encuentra ubicado en el **cromosoma 19q**, cerca del gen de las lipoproteínas de baja densidad. Tiene 22 exones y 22 intrones para producir una proteína que es un dímero de dos unidades idénticas. Cada unidad consta de una *subunidad alfa* y una *subunidad beta* unidas entre sí por un enlace disulfuro y que después conforman una estructura tetramérica (Seino, 1989).

En el *exón 11*, donde se encuentra la porción del gen que codifica para la subunidad α , existe la particularidad de poder expresar dos isoformas, una denominada **isoforma A (RI-A) exón 11 (-)** y otra **isoforma B (RI-B) exón 11 (+)**. Esto es resultado del fenómeno de “**splicing alternativo**” o **empalme alternativo** que permite obtener a partir de un transcrito primario de ácido ribonucleico mensajero (ARNm) o pre-ARNm, distintas moléculas de ARNm maduras. Estas dos formas distintas de ARNm codifican sendas subunidades α , que difieren entre sí en la secuencia terminal de aminoácidos 717-729 presentes en la subunidad α tipo B y ausentes en la tipo A. **La presencia de esta secuencia tiene escasa repercusión en la unión de la insulina al receptor, pero da lugar a una mayor afinidad de los**

factores de crecimiento similar a la insulina (IGF) a la isoforma A del receptor.

Durante el desarrollo fetal la isoforma A del RI predomina y es estimulado tanto por la insulina como el IGF-II. Mientras que la isoforma B predomina después del nacimiento y es estimulado principalmente por la insulina y se encuentra mayoritariamente en el músculo, hígado y grasa. **Así que tanto IGF-I como IGF-II pueden también unirse al RI y producir la acción a través de él. De hecho algunos estudios han indicado que RI-B participa en funciones metabólicas y en cambio RI-A en funciones mitogénicas** (Frasca et al., 1999; White, 2002) (Fig. 6).

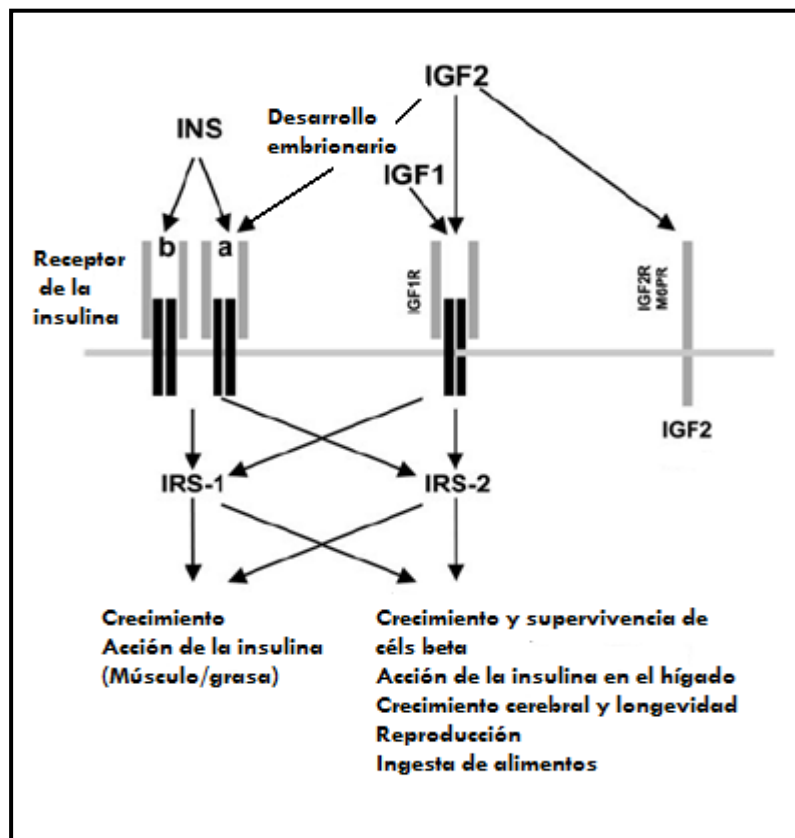


Figura 6. Diagrama resumen de la interacción de la I/IGF con los receptores tirosina-kinasa y alguna de las respuestas fisiológicas reguladas por IGF/I. (Extraído de White, 2002).

Cada subunidad α se coloca completamente en el exterior de la célula, mientras que cada subunidad β está colocada en el interior, atravesando la membrana con un único segmento transmembrana.

Cierta controversia ha surgido en relación al sitio de enlace de la insulina. Jacobs (1979) sugiere que el **sitio de enlace de la insulina** se encuentra en la **subunidad α** del receptor. Otros estudios, Massague et al., (1981), han demostrado que la subunidad β es una kinasa de proteínas sensibles a la insulina que fosforila residuos de tirosina en la subunidad β ('autofosforilación'), así como de otros sustratos. En células intactas, la insulina estimula la fosforilación de su receptor, la subunidad β . Kasuga et al (1982) lo demostró en células de hepatoma de rata y en linfoblastos humanos IM9 y posteriormente Van Obberghen y Kowalski (1982).en hepatocitos de rata.

Por tanto, el dominio de unión a la insulina está localizado en el extremo N-terminal de la subunidad α . Y el dominio intracelular de la subunidad β contiene la actividad protein-kinasa específica de tirosina. La unión de la insulina al dominio extracelular origina una modificación conformacional en el dominio intracelular, de tal manera que el receptor sufre autofosforilación. En concreto se produce la fosforilación de varios residuos de tirosina localizados en el dominio yuxtamembranal del receptor (Tyr 965 y Tyr 972), en el dominio catalítico (Tyr 1158, Tyr 1162 y Tyr 1163) y en el dominio carboxiterminal (Tyr 1328 y Tyr 1334).

En ausencia de insulina, el receptor adopta una configuración de inactividad en la que están implicadas las subunidades α , pero tras el reconocimiento y anclaje de la

insulina, se produce una reagrupación de las subunidades β y la activación del receptor.

Además, la unión del receptor con la insulina es irreversible, ya que se produce la degradación del complejo receptor-insulina tras la endocitosis del mismo (Gammeltoft et al., 1986) como se muestra en la figura 7.

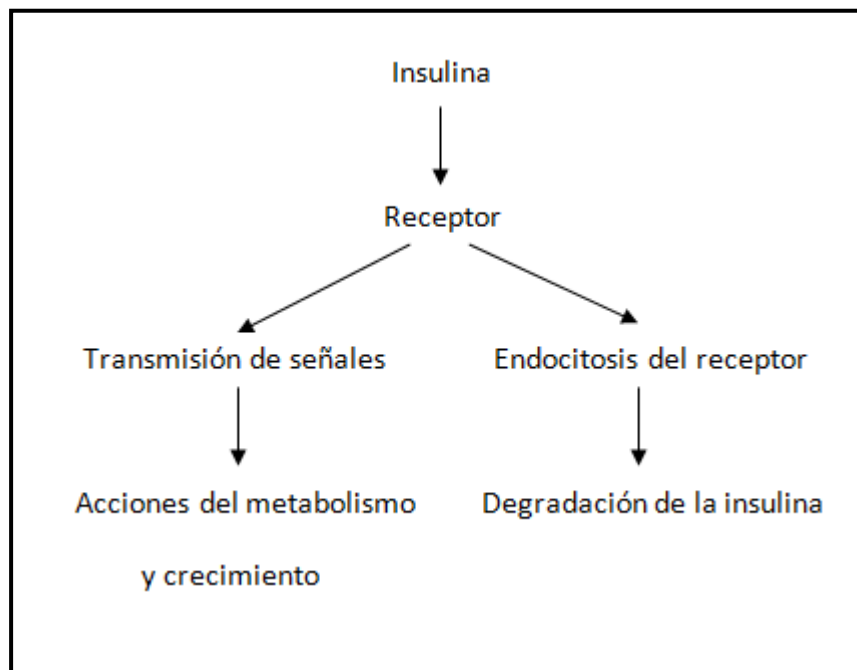


Figura 7. Función del complejo receptor- insulina. (Modificado de Gammeltoft et al., 1986).

2.2 Factor de crecimiento similar a la insulina (IGF, *insulin-like growth factor*)

Salmon y Daughaday (1957) identificaron por primera vez la existencia de estos péptidos, observando que tras la administración “in vivo” de la hormona del crecimiento (GH, *growth factor*) inducía una sustancia en sangre que era capaz de estimular el consumo de sulfato en el cartílago. Tras estas observaciones concluyeron

que la acción promotora del crecimiento por parte de GH era realmente de estas sustancias mediadoras, las cuales, tras su estimulación por GH, realizaban el efecto directo de la misma.

Daughaday et al., (1972) propusieron la “*hipótesis de la somatomedina*” con la intención de proporcionar un nombre específico para los agentes mediadores de la acción de la GH. La cual afirmaba que "un factor del plasma dependiente de la GH estimula en el cartílago no sólo la incorporación de sulfato a condroitín sulfato, sino también la incorporación de timidina en el DNA, prolina en hidroxiprolina de colágeno y uridina en ARN." El aislamiento de sustancias con una variedad de nombres (somatomedina C, somatomedina A) dependientes de la estimulación de GH, reafirmaba la hipótesis. Pero cuando la secuencia de aminoácidos de estos péptidos fue purificada, reveló la homología con la proinsulina, de ahí el nombre que se le aplicó: “*factor de crecimiento similar a la insulina*” (Daughaday et al., 1987).

Los **factores de crecimiento similares a la insulina** (IGFs) son péptidos que tienen una masa molecular de alrededor de 7,5 KDa y tienen una estructura homóloga a la proinsulina (Granada, 2006). Existen 2 tipos de IGF, el *IGF-I o somatomedina C* y el *IGF-II*.

Daughaday et al., (1989) describieron la estructura de los IGFs, cuya molécula es una cadena de 70 aminoácidos que posee cuatro dominios o regiones: A, B, C y D. Gran parte de la secuencia entre los dominios A y B es homóloga para el IGF-I y la proinsulina, llegando esa homología al 43%, por el contrario, no existe homología entre el dominio C y la región del péptido C de la proinsulina. Además, el dominio

Do región carboxiterminal con ocho restos de aminoácidos es típica del IGF-I, pero no existen en la proinsulina.

El gen que codifica cada tipo de IGF se encuentra en cromosomas distintos. El **gen** que codifica el **IGF-I** ha sido localizado en el **brazo largo del cromosoma 12** (12q) en la banda 23, e **IGF-II** en el **brazo corto del cromosoma 11**. (D'Ercole, 1996).

Jones et al., (1995), afirman que los IGFs son esenciales para el desarrollo fetal y postnatal del mamífero. Estimulan la proliferación y supervivencia de muchas células, y en algunas de ellas promueve la diferenciación y la especialización funcional.

El *IGF-I* es el que mejor se correlaciona con el estado secretor de GH en la vida posnatal, mientras que el *IGF-II* parece tener una mayor relevancia durante la vida fetal. Los IGF se sintetizan en el hígado y en múltiples tejidos por la acción de la GH y son los principales mediadores de las acciones de la GH. Tienen acción estimuladora del crecimiento, potencian la acción de la insulina y regulan la proliferación celular.

En la retina normal, se ha descrito la expresión de IGF-I y su receptor en capas de la neurorretina, en el EPR, en la coriocapilar y en células endoteliales de capilares de la retina (Lambooi et al., 2003). Se ha observado que IGF parece jugar un importante papel en la neurogénesis temprana de la retina (De la Rosa et al., 1994; Hernández-Sánchez C et al., 1995).

2.2.1 Factor de crecimiento similar a la insulina tipo I (IGF-I)

El IGF-I no es producido en exclusiva por ningún órgano. Las células productoras de IGF-I se encuentran diseminadas por todo el organismo, como el cartílago de

crecimiento, riñón, gónadas, etc., siendo el hígado el órgano de máxima producción. Si bien el IGF-I hepático depende de los niveles circulantes de GH en sangre, el IGF-I extrahepático no parece ser dependiente de GH (Daughaday, 1989).

Los factores que regulan la síntesis de IGF-I son principalmente hormonales y nutricionales.

Una vez transportado el IGF-I a los órganos diana, debe entrar en contacto con las células a través de receptores específicos, sobre todo los de tipo 1, cuya estructura es similar al receptor de la insulina.

El efecto fundamental del IGF-I es el de promover la división celular, así como la formación de la matriz en el cartílago.

2.2.2 Factor de crecimiento similar a la insulina tipo II (IGF-II)

El IGF-II se une con gran afinidad al receptor de IGF, el IGF-IR y al receptor IGF-II-manosa 6 fosfato, del que no se conoce su acción pero que al parecer tiene parte esencial en la regulación del propio IGF-II. Asimismo, el IGF-II muestra gran afinidad por la isoforma A del RI-A.

Entre las principales acciones del IGF-II, cabe destacar que estimula la proliferación celular y el crecimiento en el feto de los siguientes órganos y tejidos: Hígado, riñón, páncreas, intestino, glándulas suprarrenales, paratiroides, tejido muscular y cardíaco, piel y tejido conjuntivo (Granada, 2006).

2.2.3 Receptores del IGF (IGF- R)

La acción de los IGFs están mediados por la interacción con los receptores celulares (D'Ercole, 1996).

Los efectos biológicos de la insulina y el IGF-I son mediados por dos receptores diferentes, pero estructuralmente muy similares (Fig. 8). Ambos se expresan en la superficie de la membrana celular, y pertenecen a la familia de los receptores tirosina-kinasa. A su vez, como ya se ha comentado anteriormente, los IGF pueden unirse al receptor de la insulina a parte de sus receptores específicos.

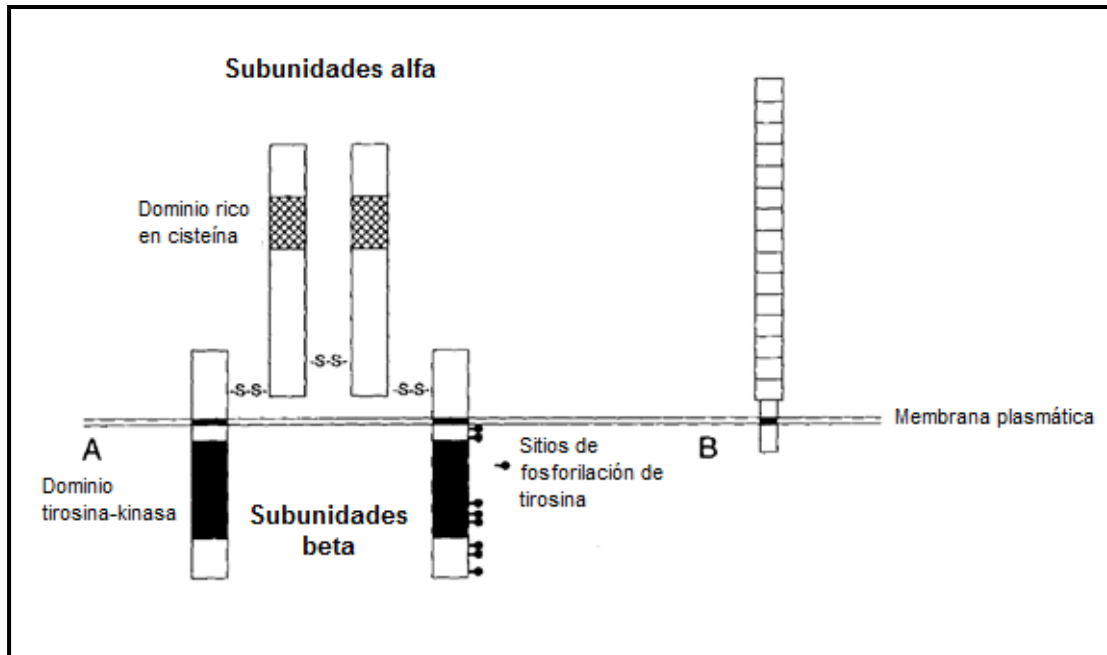


Figura 8. Receptor IGF tipo I (A) y receptor IGF tipo II o receptor de manosa 6 fosfato (B). (Extraído de D'Ercole, 1996).

A continuación se explica por separado los dos receptores descritos en la literatura para los dos tipos de IGF (según D'Ercole, 1996):

- *Receptor de IGF-I (IGF-IR):* el receptor de IGF-I es un tetrámero, formado por dos subunidades α y dos subunidades β unidas por puentes disulfuro (LeRoith et al., 1995). Las subunidades α están localizadas extracelularmente y median la unión al ligando, mientras que las subunidades β , se encuentran

intracelularmente y son las que poseen la actividad tirosina-kinasa. Toda la estructura del IGF-IR es el producto de un solo gen y comparte homología con el receptor de la insulina. La unión del IGF-I con la porción extracelular del receptor, desencadena la fosforilación de las subunidades β y otras proteínas celulares, estimulando la actividad tirosina-kinasa, la cual es esencial para la transducción de la señal.

- *Receptor de IGF-II (IGF-IIR)*: El receptor de IGF-II es idéntico al receptor manosa-6-fosfato (IGF-M6PR). Es una proteína de cadena sencilla con un dominio citoplasmático corto.

2.2.4 Transducción de señales

La unión del IGF a la subunidad alfa del IGF-IR induce cambios conformacionales en el receptor que se traduce en la autofosforilación de la subunidad β . A continuación se activa una cascada de eventos que activan las moléculas de señalización citosólicas, tanto las quinasas (enzimas que catalizan la fosforilación) como las fosfatasas (enzimas que catalizan la desfosforilación). Los cambios en la fosforilación de una variedad de proteínas intracelulares conducen finalmente a la transcripción de los genes de respuesta temprana. Estos genes codifican los factores de transcripción que actúan para estimular la transcripción de los genes de respuesta tardía. Los productos de estos genes de respuesta tardía son los efectores finales de la estimulación del factor de crecimiento, tales como la progresión a través del ciclo celular y la diferenciación. (D'Ercole, 1996).

3. Vía de señalización de la insulina / IGF

3.1 Introducción

La cascada de señalización de la insulina/ IGF se inicia con la fosforilación de la tirosina del receptor tras la unión con el ligando y a partir de aquí se generan múltiples señalizaciones intracelulares complejas que están estructuradas alrededor de las proteínas tirosin-fosforiladas, incluyendo las proteínas de la familia del *sustrato del receptor de la insulina* (IRS), pero también alrededor de SHC y CBL, APS y SH2B y GAB1/2, DOCK1 y CBL (Pawson et al., 1997; Kotani et al., 1998; Lock et al., 1999, Noguchi et al., 1999, Baumann et al., 2000, Chiang et al., 2001). Aunque el papel que juega cada una de estas proteínas en la cascada es importante, recientes estudios en ratones transgénicos, sugieren que **muchas de las respuestas de la insulina, especialmente las que se asocian con el crecimiento somático y el metabolismo de los carbohidratos, son mediados principalmente a través de dos proteínas de la familia del IRS, llamadas *IRS1* e *IRS2*** (White, 2002).

3.2 Dominios de interacción en la cascada de señalización de la insulina

La cascada de señalización de la insulina se compone de múltiples proteínas que interaccionan entre ellas mediante diferentes dominios de interacción para poder ir activando las distintas vías intracelulares (Virkamäki et al., 1999) (Fig. 9). Algunos de los dominios de interacción mejor caracterizados son el ***PH* (pleckstrin homology)**, ***PTB* (phosphotyrosine binding)**, ***SH2* (Src homology 2 domain)** y ***SH3* (Src homology 3 domain)** que a continuación pasamos a describir.

- **Dominio PH:** se encuentra en la mayoría de las proteínas que interactúan con el receptor de insulina, se enlazan a grupos cargados de fosfatidilinositoles específicos y están dirigidas preferentemente a estructuras de membrana. En el caso de las proteínas IRS, los dominios PH tienen como diana las proteínas de membrana adyacentes al receptor de insulina.
- **Dominio PTB:** reconoce la fosfotirosina en la secuencia de aminoácidos asparagina-prolina-algún aminoácido-fosfotirosina (NPXpY), que está presente de forma habitual en los receptores tirosin-kinasa, incluyendo el receptor de insulina. Este dominio suele encontrarse en las proteínas IRS.
- **Dominio SH2:** muchas *proteínas de transducción de señal intracelular* que interaccionan con las proteínas IRS, contienen este dominio por el cual se fijan a un receptor activado u otro componente de la vía que contiene un residuo de fosfotirosina. El dominio SH2 deriva de su nombre completo en inglés *Src homology 2 domain*, por su homología con una región tirosin-quinasa citosólica prototípica codificada por el gen *src*. Sadowski et al., (1986) identificaron este dominio N-terminal, formado por 100 aminoácidos aproximadamente, que estaba altamente conservado entre las proteínas tirosin-quinasa citoplasmáticas de la familia Src. Las estructuras tridimensionales de los dominios SH2 en proteínas diferentes son muy similares, cada una se fija a secuencias de aminoácidos diferentes que rodean un residuo de fosfotirosina. Cada dominio SH2 específico, posee una unión preferente a fosfotirosinas en el contexto de una secuencia determinada. Por tanto, la especificidad de unión de los

dominios SH2 está determinada en gran parte por los residuos C-terminal a la fosfotirosina en el péptido diana, como han observado Songyang et al., (1993).

- **Dominio SH3:** están habitualmente presentes en las proteínas adaptadoras SH2. La función del dominio SH3 se dilucidó cuando Ren et al., (1993) descubrieron que el dominio SH3 se unía a zonas ricas en prolina.

Muchas proteínas de señalización contienen varios de estos dominios de interacción, e incluso otros elementos de reconocimiento. Hay numerosas proteínas que interaccionan entre sí y desconocemos los mecanismos de relación.

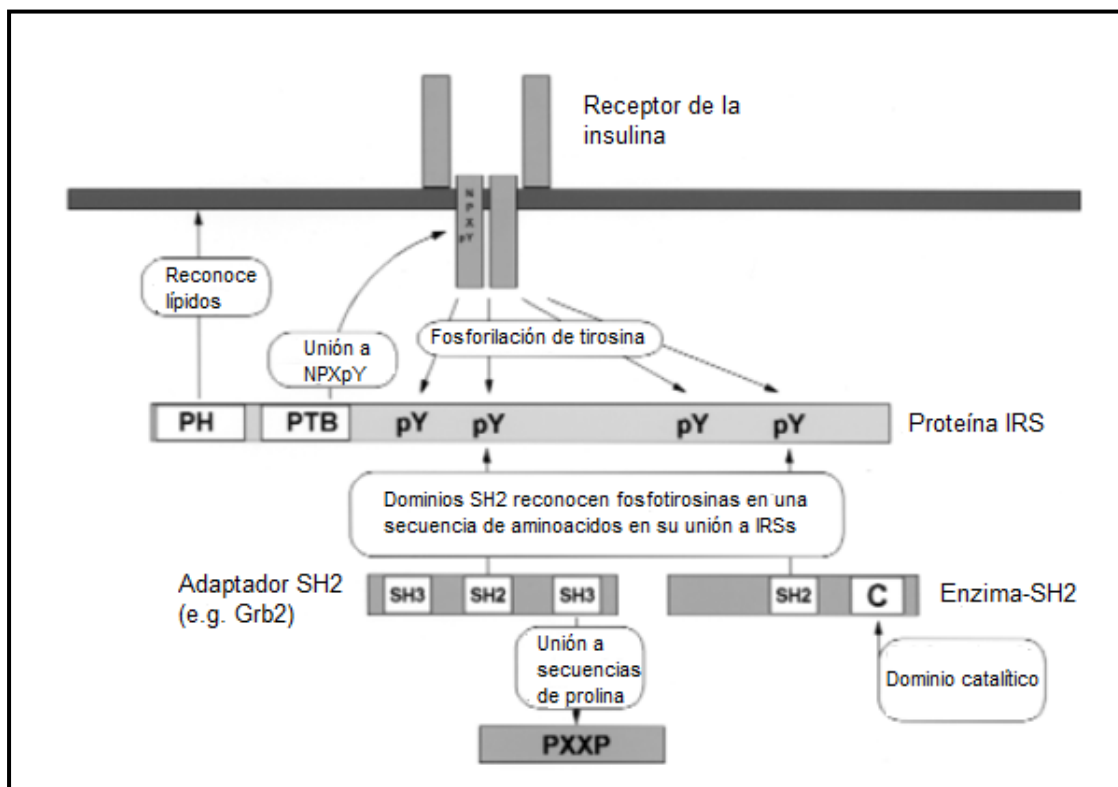


Figura 9. Esquema de interacción proteína-proteína en la cascada de señalización de la insulina. (Extraído de Virkamäki et al., 1999).

3.3 Sustrato del receptor de la insulina (IRS)

Cuando en 1982 se descubrió que la insulina se unía a un receptor tirosin-kinasa, muchos laboratorios intentaron encontrar el sustrato endógeno del receptor de la insulina, el cual al unirse al receptor podría a través del mismo activar las señales a sus efectores.

Fue a principios de de los años noventa cuando Sun XJ et al., (1991), aislaron la primera molécula de la familia, el *sustrato del receptor de la insulina-1 (IRS-1)* con una masa molecular relativa entre 165 y 185 kDa. A partir de entonces varios investigadores se interesaron por el tema y se fueron descubriendo más moléculas de la misma familia de forma encadenada.

El *sustrato del receptor de la insulina-2 (IRS-2)* fue inicialmente identificado por Araki et al., (1994) y Tamemoto et al., (1994) como un sustrato alternativo para el receptor de insulina en animales con interrupciones específicas del gen del IRS-1. Un año más tarde, Sun et al., (1995), sorprendidos con los resultados obtenidos en ratones IRS-1-/- con sólo leve resistencia a la insulina, investigaron en la búsqueda de la existencia de otro sustrato de la misma familia que IRS1. Este dilema se resuelve con el descubrimiento de un candidato probable llamado **4PS**, una proteína de aproximadamente 180 kDa inicialmente observada como el sustrato primario del receptor asociado a tirosin-kinasa de la interleucina-4 (IL4). A principios de la década de los noventa se descubre que en células mieloides progenitoras de 4PS es rápidamente fosforilada en respuesta al estímulo de la insulina o la IL4, se une a p85 y activa a fosfoinositol 3-kinasa (PI 3-kinasa). Pues bien, se ha comprobado que en células mieloides en ausencia de 4PS, la sobreexpresión de IRS-1 puede restaurar sensibilidad a

la insulina y la IL-4 (Wang et al., 1992, 1993). De ahí que al presentar funcionalidad similar entre IRS1 y 4PS, Sun et al., (1995) clonan la molécula 4PS, revelando una molécula similar a IRS-1 con múltiples sitios de fosforilación de tirosina, así como varios dominios homólogos cerca del terminal NH₂. A este sustrato lo designaron como **IRS-2**, confirmando un año más tarde que se trataba del sustrato alternativo del receptor de la insulina en ratones deficitarios de IRS1, juega un papel fundamental en la cascada de señalización fisiológica de la insulina tanto en la vía de activación de la PI-3-kinasa como del complejo Grb2/Sos (Patti et al., 1995).

Todos estos estudios condujeron al aislamiento de una molécula con características similares a las proteínas anteriores en adipocitos de ratas con un peso molecular de 60 kDa, a la que se le denominó **sustrato del receptor de la insulina-3 (IRS-3)** (Lavan et al., 1997a, Kaburagi et al., 1997).

Estos hallazgos se complementaron a los pocos meses con el aislamiento de una nueva molécula de 160 kDa en células de riñón de embrión humano (HEK 293) que sufre una rápida fosforilación de tirosina en respuesta a la insulina, la denominan **sustrato del receptor de la insulina -4 (IRS-4)** (Lavan et al., 1997b).

Las dos últimas moléculas de la familia IRS descubiertas hasta el momento, fueron aisladas por Cai et al., (2003) en el genoma humano, se trata del **sustrato del receptor de la insulina-5 (IRS-5)** y **sustrato del receptor de la insulina-6 (IRS-6)**.

Desde las proteínas IRS, la señal se transporta a través de una serie de moléculas ancladas a la membrana y de ahí dan continuidad a la cascada intracelular en la vía de

comunicación. Los **IRS** son por tanto, **proteínas adaptadoras**, que actúan como diques para recolectar y activar otras enzimas.

Algunos miembros como IRS1 e IRS2 están ampliamente distribuidos en el cuerpo humano (pasaremos a hablar un poco más de ellas más adelante), mientras que otros han restringido la distribución (IRS3 en adipocitos y cerebro, IRS4 en tejidos embrionarios o líneas celulares, IRS5 en el riñón y el hígado e IRS6 en músculo esquelético (Chakraborty et al., 2011).

3.3.1 Estructura del sustrato del receptor de la insulina (IRS)

Una proteína IRS típica está formada por varios dominios de unión (Fig. 10):

- **dominio de homología pleckstrin NH2-terminal (pleckstrin homology, PH)**, el cual se une a los fosfolípidos de membrana.
- **Dominio de unión a fosfotirosina (phosphotyrosine binding, PTB)** localizado justo COOH terminal al dominio PH, está implicado en el reconocimiento de la secuencia de aspargina prolina-glutámico ácido-fosfotirosina (NPXpY) ubicada en la región yuxtamembrana de la subunidad β del receptor de la insulina.
- Y una porción COOH-terminal menos conservada de variable longitud que cuenta con numerosos **sitios de fosfotirosinas (PY)** potenciales de fosforilación, que al ser fosforilados por el receptor de la insulina, se convierten en sitios de unión y activación de proteínas que contienen el dominio SH2 específicas, descrito por Virkamäki et al., (1999).

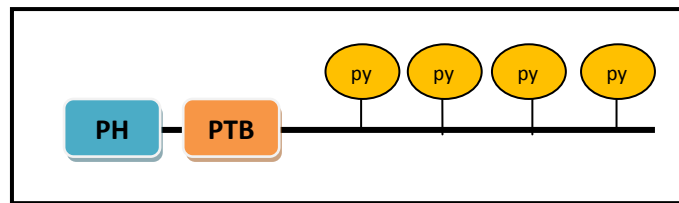


Figura 10. Estructura de una proteína sustrato del receptor de insulina (IRS). (Extraído de Virkamäki et al., 1999).

Las proteínas IRS se unen al receptor de insulina fosforilado de forma transitoria a través del dominio PTB y luego se disocian. Posteriormente, tras la fosforilación de varios residuos de tirosina en las proteínas IRS (PY) por el receptor, pueden ser reconocidos por varias proteínas con dominio SH2 facilitando su unión, como específica White (1998).

Los IRSs son regulados por mecanismos de retroalimentación y la interferencia de otras vías. Sun et al., (2009) han observado que la fosforilación de serina de las proteínas IRS altera las capacidades de estas proteínas para ser fosforiladas en tyrosyl y por lo tanto, incapaz de mediar la señalización de la insulina.

3.3.2 Sustrato del receptor de la insulina 1 (IRS1)

Como hemos comentado anteriormente, IRS1 fue la primera molécula descubierta de la familia IRS, y es el prototipo de este grupo de proteínas.

El gen humano de IRS1 se localiza en el **cromosoma 2q36–37**, y se ha descrito recientemente que a diferencia de los otros miembros de la familia IRS, tanto IRS1 como IRS2, se distribuyen ampliamente por todo el organismo (Chakraborty et al., 2011).

El IRS-1 humano contiene 21 sitios potenciales de fosforilación, varios de los cuales se encuentran en regiones específicas de su estructura para poder interactuar con proteínas del dominio SH2, incluyendo la subunidad reguladora de 85 KDa PI 3-quinasa (o también conocida como p85), Grb-2 (proteína ligadora del receptor del factor de crecimiento 2), Nck, Crk, Fyn, Csk, fosfolipasa C γ y SHP-2 (proteína tirosina fosfatasa con homología a Src) como expone White (1997). Esto indica que la interacción de estas moléculas con IRS1 fosforilado median múltiples acciones de la insulina en las vías descendentes. Sesti et al., (2001) expusieron un diagrama esquemático de la molécula de Irs1 en el humano que muestra los dominios de unión PTB y PH, así como los sitios potenciales de unión con la subunidades reguladoras p85, Grb2 y SHP (Fig. 11).

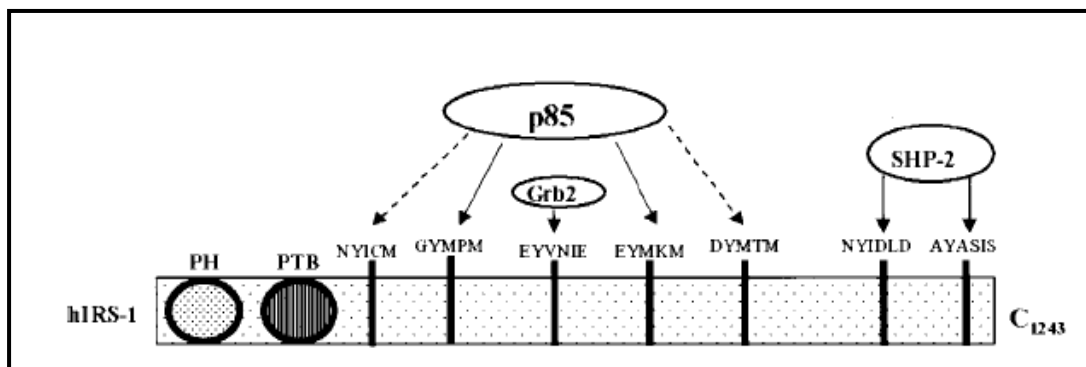


Figura 11. Diagrama esquemático de la molécula de IRS1 en humano. Las flechas continuas indican los enlaces fuertes y las flechas discontinuas los enlaces débiles. (Extraído de Sesti et al., 2001).

3.3.3 Sustrato del receptor de la insulina 2 (IRS2)

Sun et al., (1995) clonaron el DNA de la molécula de IRS2. Se observó que la proteína era 100 residuos más largos que IRS1, pero que compartían muchas

características estructurales entre sí. El gen de esta proteína en el humano está localizado en el **cromosoma 13q34**, (Kalidas et al., 1998).

IRS-2 humano contiene *22 sitios potenciales de fosforilación*. La similitud de la secuencia de aminoácidos entre IRS-1 y IRS-2 es del 43%, con algunos dominios como los dominios PH y PTB que exhiben mayores grados de analogía (65-75%, respectivamente). En cuanto a los dominios de carboxi-terminal de IRS-1 y el IRS-2 se conservan mal, mostrando sólo el 35% de la identidad, que surge en gran parte de los sitios de fosforilación de tirosina rodeados por tramos variables de secuencia de aminoácidos.

El centro de la molécula de IRS-2, a diferencia de IRS1, posee una región única integrada por 591–786 aminoácidos. Sawka-Verhelle et al., (1996) han observado que esta zona interactúa específicamente con el dominio de enlace de la subunidad β del receptor de insulina. Estos hallazgos parecen sugerir que IRS2 se une al receptor de la insulina por dos sitios de anclaje. Y se ha observado que la interacción del receptor con IRS-2 a través de su dominio PTB parece ser menos intensa en comparación con la interacción a través del otro dominio. Los autores postulan que este nuevo dominio descrito sea el primer anclaje al receptor de la insulina, mientras que el dominio PTB se comportaría como un estabilizador de la unión establecida con el receptor de insulina. Como esta región está ausente en IRS1, se podría pensar que este dominio podría contribuir a la especificidad de la señal de IRS2. Sesti et al., (2001), al igual que hicieron con la estructura de IRS1, también realizó un diagrama esquemático con la molécula IRS2 donde se muestran los dominios de unión a PTB y

PH, así como los sitios potenciales de unión de las subunidades reguladoras p85, Grb2, SHP-2, para su entendimiento (Fig.12).

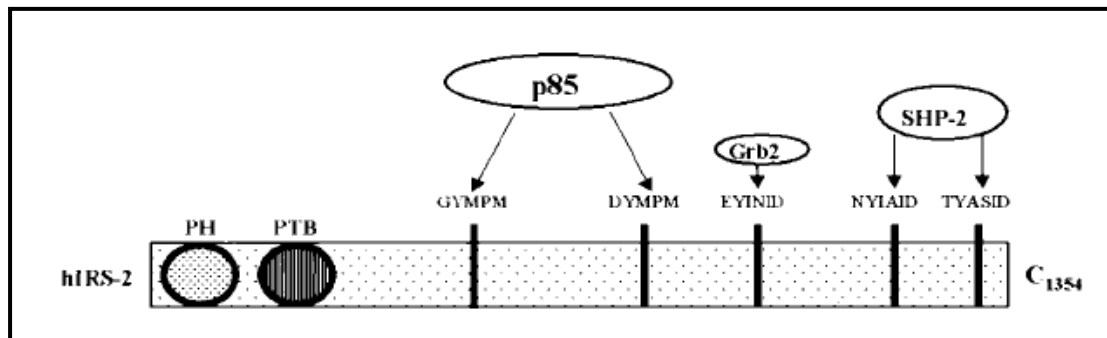


Figura 12. Diagrama esquemático de la molécula IRS2. (Extraído de Sesti et al., 2001)

Además se ha descrito que IRS1 e IRS2 pueden regular vías de señalización única, ya no sólo por su diferenciación estructural, sino por su diferente distribución en los tejidos, localización subcelular, cinética de activación o desactivación e incluso en la especificidad de interacción con las moléculas efectoras (Giovannone et al., 2000). Y también se ha encontrado que IRS1 e IRS2 difieren en su localización subcelular, ya que IRS-1 está mayormente concentrado en el compartimento de membrana intracelular que en el citosol, mientras que el IRS2 es al revés (Inoue et al., 1998). Otros estudios han demostrado que el IRS2 es defosforilado más rápidamente y activa PI 3-kinasa más transitoriamente que IRS1, indicando de esta manera diferencias en la cinética de activación, la cual puede contribuir a la diversidad de la señalización de insulina tanto para IRS1 como para IRS2 (Ogihara et al., 1997, Inoue et al., 1998).

3.3.4 Papel de las proteínas IRS1 e IRS2 en el crecimiento, supervivencia y metabolismo de la glucemia

Las proteínas IRS juegan un papel importante dentro de la cadena de señalización de la I e IGF-I, involucrados tanto en la *regulación de la homeostasis de la glucosa* como en el *crecimiento y supervivencia celular* (White, 2002).

Parece ser que IRS1 está más involucrado en la regulación del crecimiento celular que IRS2 (Withers et al., 1998), ya que la supresión del gen IRS1 en ratones reduce el crecimiento embrionario y neonatal un 40%, mientras que la eliminación del gen IRS2 apenas reduce el crecimiento prenatal y posnatal temprano en un 10 %.

IRS1 es la isoforma que está involucrada en el *transporte de la glucosa intracelular* al promover la translocación del transportador de glucosa GLUT-4 (proteína transportadora de glucosa regulada por la insulina, que se localiza en los adipocitos, el músculo esquelético y el miocardio (McCarthy et al., 2007; Kaburagi et al., 1997)) de compartimentos intracelulares a la membrana plasmática, por una vía que depende de la activación de PI3K y de la cinasa Akt.

También se ha descrito la participación de IRS1 en la *regulación de la síntesis de proteínas* a través de la activación de la vía de señalización de las proteínas kinasas activadas por mitógenos (MAP kinasas), como apuntan Chuang LM et al., (1994), a través de Grb-2 asociado a SOS (del inglés *son of sevenless*, factor recambiador de nucleótidos de guanina, capaz de activar a Ras, Simon et al., 1991). La activación de Ras (proteína GTP-Ras) inicia el encendido de la cascada de las MAP kinasas.

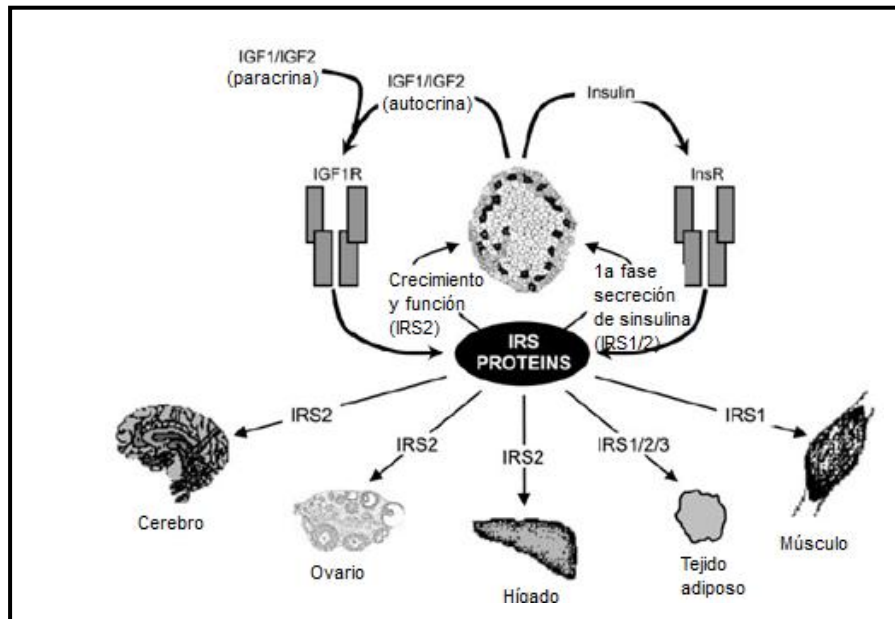


Figura 13. Diagrama esquemático de la regulación de los procesos energéticos a través de IRS2 e IRS1 (Extraído de White, 2002).

Sin embargo **IRS2** tiene un **papel** más predominante que IRS1 **en el metabolismo de los carbohidratos** (Withers et al., 1998). IRS1 ejerce su mayor efecto sobre el metabolismo regulando las señales de la insulina en músculo y tejido adiposo, mientras que desempeña un papel menor en la mediación de los efectos de la insulina en el metabolismo hepático (White et al., 2002). (Fig. 13).

Es bien conocido que la resistencia a la insulina es un componente esencial en la aparición de la diabetes tipo 2, pero como dice Kahn (1996), no parece ser el único componente, habiendo aún controversias en su patogenia. Muchos datos indican que la resistencia a la insulina es una anomalía temprana en la historia clínica de la diabetes, pero no parece ser la única causante. Al parecer tras una situación de hiperglucemia, se produce fisiológicamente una respuesta por parte de las células β -pancreáticas para producir más insulina y la hiperinsulinemia compensa la resistencia

a la insulina periférica (De Fronzo et al., 1992). Pero la hiperglucemia subsiguiente tras el fallo de las células beta para segregar insulina compensatoria, conlleva al desarrollo de la diabetes. Polonsky et al., (1996) han observado anomalías en las células β -pancreáticas, pero más difícil de demostrar en estadios iniciales de la diabetes tipo 2. Es generalizado que la resistencia a la insulina se inicia en el músculo y en los adipocitos, aunque otros autores han demostrado también que este hecho no es suficiente para desembocar en el cuadro clínico de la diabetes tipo 2 si las células β -pancreáticas están intactas (Lauro et al., 1998). Además se ha descrito que inactivando el gen del receptor de la insulina en las células beta, los ratones resultantes muestran una pérdida selectiva de la secreción de insulina en respuesta a la glucosa y un progresivo deterioro de tolerancia a la glucosa (Kulkarni et al, 1999).

Whithers et al., (1998) han demostrado que la ablación de IRS2 conlleva a una afectación en la diferenciación de las células β -pancreáticas (con una reducción de la masa de esta población celular desde el nacimiento), así como una resistencia a la insulina en el músculo esquelético y el hígado. Sin embargo la deficiencia de IRS1 en ratones muestra un retraso en su crecimiento pero no desarrolla diabetes (Araki et al., 1994; Tamemoto et al., 1994).

Por tanto estos estudios demuestran que la vía de señalización de la insulina junto con la resistencia periférica a la misma, son dos factores importantes en la **patogenia** de la **diabetes tipo 2**, sugiriendo que el papel de **IRS2** está **estrechamente relacionado**.

Pero como ya hemos comentado, **IRS2** no sólo tiene un papel en la homeostasis de la glucemia, sino que parece estar implicado en otras funciones fisiológicas, como la

fertilidad de la hembra así como en la **supervivencia celular** (White, 2002). De hecho, varios estudios apoyan la importancia de IRS2 en la homeostasis celular neuronal y su supervivencia (Taguchi et al., 2007, Freude et al., (2008). Otros estudios han ido más allá y han llegado a sugerir que la señalización de **IRS2** es **neuroprotectora** (Schubert et al., 2003; Martín et al., 2012; Murillo-Cuesta et al., 2012; Zemva et al., 2013).

Con todos estos datos cabe esperar que **a nivel oftalmológico**, como una parte más del sistema nervioso, **IRS2** pueda también ejercer una parte esencial en el mantenimiento celular retiniano, ya que Yi et al., (2005) han observado que IRS2 se **distribuye** en la **capa plexiforme externa** así como en los **segmentos externos de los fotorreceptores de la retina**, demostrando estos autores en ratones, que IRS2 promueve la supervivencia de los fotorreceptores después del nacimiento.

3.3.5 Proteínas adaptadoras con dominio de homología Src 2 (SH2) que interactúan con IRS

Son proteínas que reconocen y se unen a proteínas tirosinfosforiladas por su dominio SH2. No tienen actividad enzimática, actúan como **ligandos** para posteriores interacciones con proteínas efectoras.

Las subunidades reguladoras **PI3-kinasa** y **Grb2**, son las más estudiadas ya que participan en dos vías importantes de transducción activadas por acción de la insulina. Ambas vías regulan la mayoría de las acciones de la insulina asociadas a la regulación del **metabolismo energético y efectos mitogénicos** (vía **PI3-kinasa**), y de la **expresión genética** (vía **MAP-quinasas; Grb2**). Se describirán a continuación.

A parte de las proteínas anteriores, se han descrito más proteínas adaptadoras que podemos ver en la tabla 1.

PROTEÍNAS QUE INTERACCIONAN CON IRS	
Proteínas CON dominio SH2	Proteínas SIN dominio SH2
<i>Proteínas adaptadoras:</i> P85, AS53, p50 (subunidad catalítica p10) Grb-2 (Sos) Crk (p130cas, C3G) Nck (PAK-1, WASP)	<i>Adaptadoras/Chaperonas:</i> Proteínas 14-3-3
	<i>Proteínas transformadoras:</i> T-antígeno SV40 grande
	<i>Proteínas estructurales:</i> Integrinas
<i>Enzimas:</i> Fyn (caveolina) Csk (FAK) SHIP (PIP3/EPIP2) SHIP-2 (Ras/MAPK)	<i>Enzimas:</i> Ca ⁺⁺ ATPasa (SERCA1, SERCA2)

Tabla 1: Clasificación de las proteínas que interactúan con las proteínas IRS. (Modificado de Virkamäki, 1999).

- Fosfoinositol 3 quinasa (PI3-kinasa)

Esta proteína adaptadora juega un papel importante en las acciones metabólicas y mitogénicas de la insulina y del IGF-1 (Shepherd et al., 1998).

Se trata de una proteína dimérica formada por dos subunidades (Dhand et al., 1994):

- *Subunidad reguladora (p85)* contiene dos dominios SH2 que le permiten la unión a sustratos del receptor de la insulina tirosin fosforilados y un dominio SH3. Contiene además otro dominio localizado entre los dos dominios SH2 que se une a la subunidad catalítica. De ahí que Klippel et al., (1993) afirmen que p85 sirve como puente entre el receptor activado y la subunidad catalítica de PI3 kinasa. Hay al menos 8 isoformas identificadas de subunidades reguladoras, éstas derivan de tres genes ($p85\alpha$, $p85\beta$, P55pik). Seis son derivadas del splicing alternativo del gen $p85\alpha$ (Inukai et al., 1997), las cuales son: $p85\alpha$, $AS53$ (también llamada $p55\alpha$) y $p50\alpha$, identificadas ambas por Antonetti et al., (1996). El esquema de la estructura de la subunidad p85 la muestra muy bien Margolis et al., 2000 (Fig.14). Las otras dos isoformas son derivadas de genes distintos como han comprobado Otsu et al., (1991) y Pons et al., (1995).

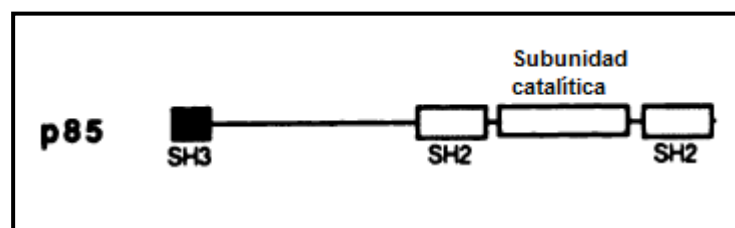


Figura 14. Estructura de la subunidad reguladora (p85) dePI-3 kinasa. (Modificado de Margolis et al., 2000).

- *Subunidad catalítica (p110)* responsable de la fosforilación de fosfatidilinositoles en membranas celulares, principalmente el fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (*PI 4,5P*) para generar fosfatidilinositol trifosfato (*PIP3*). El *PIP3* es el encargado de fijar a la membrana y activar a una quinasa *dependiente de fosfoinositol 1* (*PDK1*) y a una *proteína kinasa B* (*PKB* o también conocida como *AKT*), dos enzimas kinasas que median la mayoría de los efectos metabólicos de la insulina.

Cuando se realizan experimentos con bloqueo genético o farmacológico de la actividad de *PI3K*, se reduce dramáticamente la expresión de *GLUT-4* (proteína transportadora de glucosa) en la membrana plasmática. Se pierde el "freno antilipólisis" brindado por la insulina y se inactiva la glucógeno sintetasa. Todo ello conlleva la reducción importante de la síntesis de nuevas proteínas y ácido desoxiribonucleico (*ADN*). (Hara et al., (1994), Okada et al., (1994)).

- Proteína ligadora del receptor del factor de crecimiento 2 (*Grb2*)

Es una molécula de 27-kDa con una estructura con dos dominios *SH3* y un dominio *SH2*, con éste último se une al sustrato del receptor de la insulina y a través del dominio *SH3* se activa la vía inferior. Su estructura es resumida por Margolis et al., 2000 en la siguiente figura (Fig. 15).

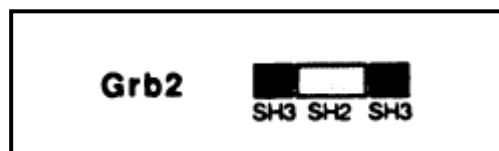


Figura 15. Estructura de la proteína *Grb2*.
(Extraído de Margolis et al., 2000).

Se ha visto que la zona carboxi terminal de Sos es rico en prolina y son sitios, por tanto, potenciales de unión al dominio SH3 de Grb2. El complejo Grb-2/Sos, actúa sobre una proteína guanosina trifosfatasa (GTPasa) asociada a la membrana llamada *Ras*, haciendo que intercambie GDP por GTP y se active toda la *vía de las MAP kinasas*, esencial en la regulación del crecimiento y proliferación celulares, así como de la expresión génica (Fig. 16) (Sapag-Hagar, 2003).

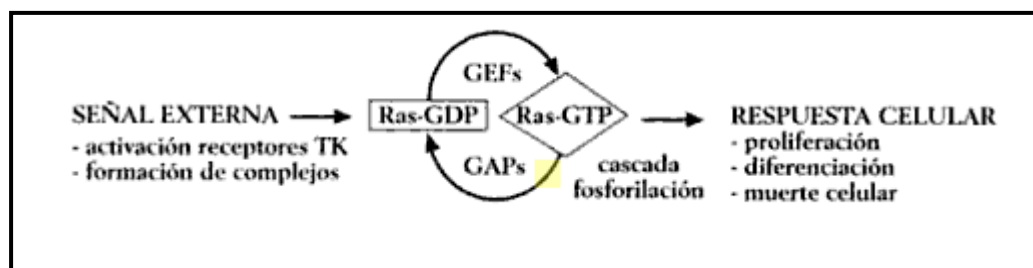


Figura 16. Esquema del proceso de cascada de Ras. (Extraído de Sapag-Hagar, 2003).

- Enzimas SH2

Las enzimas SH2 se unen a proteínas tirosin fosforiladas a través de sus dominios SH2, pero también poseen un dominio catalítico (usualmente un dominio kinasa o fosfatasa). Virkamäki et al., (1999) explican que un amplio grupo de estas proteínas pertenece a una familia de protooncogenes o proteínas kinasas que regulan la mitogénesis, entre ellas incluye *Fyn*, *c-Cbl*, y *Csk*. Otras moléculas, asociadas a IRS, pueden modular la actividad PI 3-kinasa (SHIP) o el nivel de fosforilación de tirosina (SHP-2). En general, la actividad catalítica de cada una estas enzimas SH2 se incrementa al unirse a las proteínas IRS fosforiladas.

- Proteínas que interaccionan con IRS pero se desconocen los mecanismos

Hay un grupo de proteínas que interaccionan con las proteínas IRS pero que aún no se conocen sus mecanismos. Entre estas proteínas incluyen: adaptadores (*proteínas 14-3-3*, las cuales se han visto asociadas con varios productos de oncogenes y proteínas del ciclo celular como han observado Yaffe et al., (1997). Además Ogihara et al., (1997) sugieren que la interacción entre *proteínas 14-3-3* y proteínas IRS modula el reconocimiento de las proteínas IRS por el receptor de insulina o la actividad de PI3-quinasa asociada a proteínas IRS), proteínas transformadoras (*T-antígeno SV40 grande* parece participar en la cascada de la insulina/ IGF-1) y enzimas (Ca^{++} ATPasa, entre ellas *SERCA1* y *SERCA2* las cuales se asocian tanto a IRS1 como a IRS2, y dado que un inhibidor contra SERCA induce la apoptosis en algunas líneas celulares, el complejo del IRS/SERCA podría participar en un efecto antiapoptótico dependiente de insulina e IGF-1 como han observado Zhou et al., (1998)).

3.4 Cascada de señalización de la insulina

Conocemos a la **insulina** generalmente por su efecto en la reducción de la glucosa desde un punto de vista clínico, pero es una **hormona pleiotrópica** que también ejerce una **influencia significativa** en todos los aspectos del **metabolismo de los lípidos, proteínas y carbohidratos**. De hecho, estimula la síntesis y absorción de aminoácidos y proteínas y lípidos y a su vez inhibe la cetogénesis, proteólisis y lipólisis.

A su vez, la insulina, así como los IGFs controlan muchos aspectos, no sólo del metabolismo, sino también del crecimiento y supervivencia como apuntan Nakae et al.,

(2001). Sin embargo la alteración en la regulación de la cadena de señalización, puede estar también implicada en la formación de neoplasia, según Pollak (2008).

De ahí que la pregunta que ha desconcertado a los investigadores desde el descubrimiento de la insulina es cómo una hormona puede producir gran cantidad de efectos no sólo en diferentes tejidos, sino también con frecuencia dentro de la misma célula. Todos los aspectos de la acción de la insulina se inician en el mismo momento en que la insulina interactúa con su receptor.

Por lo tanto, **la clave para entender el mecanismo de acción pleiotrópico de la insulina debe estar en la red de señalización de la misma.**

Para entender la especificidad de la acción de la insulina, uno debe descifrar las vías de señalización que conectan el receptor de insulina con las enzimas y las proteínas que realizan "comandos" de la insulina.

A pesar de los recientes avances en la identificación de numerosos intermediarios de señalización, aún hay numerosas preguntas sin responder. Y como ya he comentado, uno de los temas más importantes es la *especificidad de los efectos de la insulina*. Muchos factores de crecimiento (entre ellos IGF) y hormonas, activan los mismos intermediarios de señalización que la insulina pero no imitan la acción de la insulina. Una explicación a esta paradoja, es la existencia de isoformas de varios intermediarios que pueden responder diferentemente a distintos factores de crecimiento. Por citar algún ejemplo: se han descrito al menos 3 factores activados por Ras, conocidas como Raf kinasas (Raf A, B y C), 4 MAPK (ERK I and II, p38, y JNK), y 3 subunidades p85 y dos subunidades p110 de PI-3K como citan Goalstone et al., (1997). Pero a su vez, la

expresión de ciertas isoformas de la señalización son específicas de cada tejido, siendo ésta otra variable en la respuesta celular a la insulina y otros factores del crecimiento.

En los últimos años, numerosos intermediarios de señalización han sido identificados, caracterizados y clonados. Sin embargo, a pesar de importantes avances en la comprensión de los mecanismos de señalización de la insulina, la relación exacta de estas moléculas de señalización con las manifestaciones biológicas finales de acción de la insulina sigue siendo enigmática.

Así que es bien conocido que **tanto la insulina como IGF juegan papeles fisiológicos distintos**, pero **utilizan las mismas vías de señalización**, tanto la **vía de la fosfatidilinositol 3-kinasa (PI3K)** y la **vía de las kinasas activadas por mitógenos (MAPK)**, las cuales median las respuestas a muchos otros estímulos celulares. Por tanto **varios factores dentro de la cascada contribuirán a la especificidad de respuesta** a nivel celular y en distintos tejidos que es lo que se intenta estudiar para entender la fisiología celular.

3.4.1 Unión del ligando al receptor y su regulación

La cascada de señalización se activa con la unión del ligando, tanto de la insulina como del IGF al receptor. Se ha comentado anteriormente que el receptor de la insulina está formado por dos isoformas diferentes en función de la presencia (IR-B) o ausencia (IR-A) de 12 aminoácidos en el extremo carboxi terminal de la subunidad α . La insulina se une con la misma afinidad a las dos subunidades, pero IGF y en particular IGF2, tiene mayor afinidad por IR-A que IR-B, tanto que IR-A es un mediador significativo en las acciones de IGF2.

Una vez se ha iniciado la señalización intracelular, la autofosforilación inducida por el ligando provoca la internalización de los complejos ligando/receptor, llevando a la disociación y degradación del ligando en el endosoma intracelular y la inactivación y reciclaje del receptor (Foti et al., 2004).

Los receptores internalizados una vez ya se han unido al ligando, son inactivados por fosfatasas fosfotirosin específicas, particularmente la proteína tirosin-fosfatasa 1B (PTP1B), las cuales se localizan en la cara citosólica del retículo endoplásmico (Dubé et a., 2005).

3.4.2 Vías de señalización

Las principales vías de señalización con las cuales RI e IGFR regulan el metabolismo y la expresión génica, es decir, las *vías de la fosfatidilinositol 3-kinasa (PI3K)* y la *vía de las kinasas activadas por mitógenos (MAP kinasas)*, están bien establecidas en la literatura.

La activación de estas quinasas es dependiente de los IRSs (principalmente IRS1 e IRS2) y Shc, llevando a la activación de PI3K y la pequeña Ras de proteína G. Siddle (2011) expone un esquema gráfico de la activación de estas dos vías (Fig. 17). A continuación describiremos cada vía por separado.

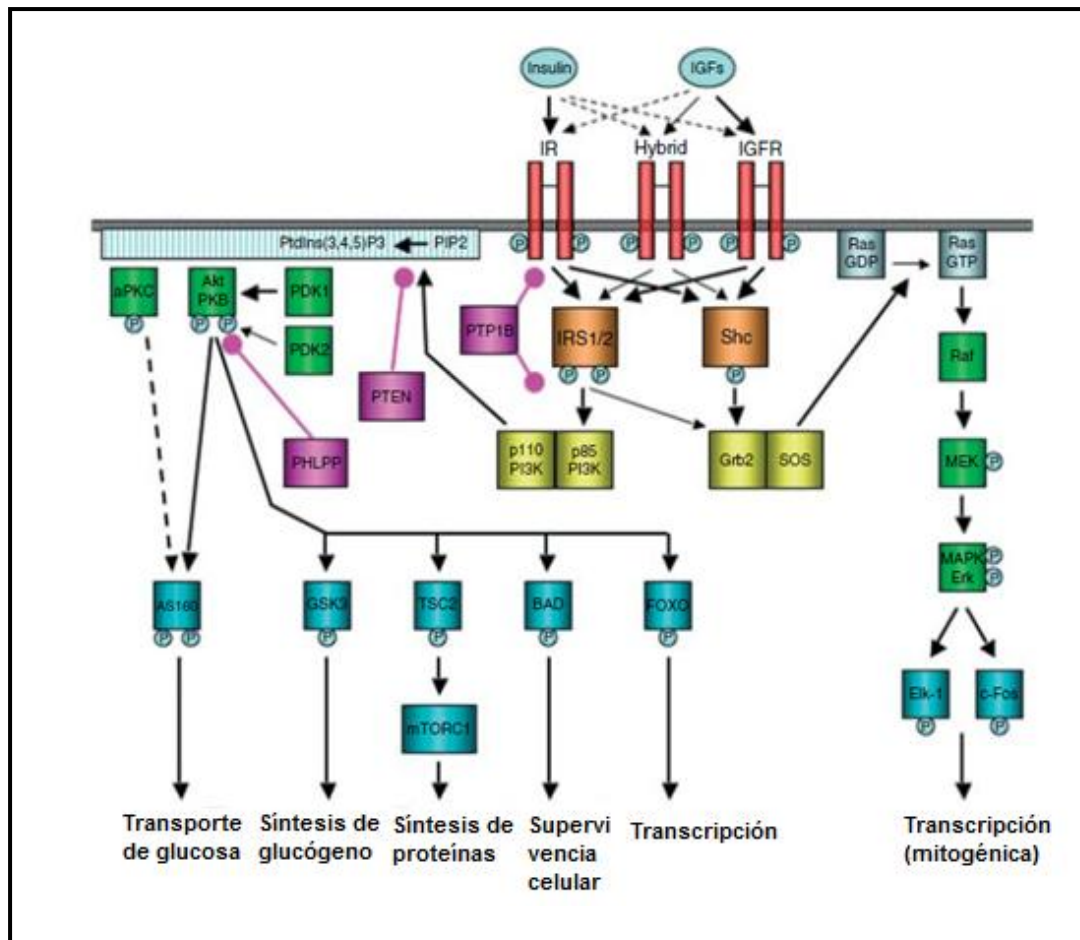


Figura 17. Vías de señalización de la insulina e IGFs. (Modificado de Siddle, 2011)

3.4.2.1 Vía de señalización de la fosfoinositol 3 kinasa (PI3K)

La vía de la PI3K es el principal mecanismo por el que la insulina ejerce sus funciones en el **metabolismo de la glucosa y de los lípidos**.

Pues bien, cuando el receptor tirosin-kinasa es activado y autofosforilado, interacciona con IRS y lo fosforila. La fosforilación de IRS crea sitios de unión para dominios SH2 de diversas proteínas, en particular las subunidades reguladoras de clase Ia PI3Ks y el adaptador de Grb2 y también la fosfatasa SHP2 y la kinasa de la familia Src. Interesante es la sugerencia de Liu et al., (2010)

acerca de la secuencia de fosfotirosinas que determina la especificidad del enlace de SH2.

Como bien se ha comentado anteriormente, las **PI3Ks**, son heterodímeros que constan de una *subunidad reguladora* (*p85*) y de una *subunidad catalítica* (*p110*). Las subunidades reguladoras son proteínas adaptadoras que contienen dos dominios SH2, los cuales permiten su unión a las proteínas IRS. La interacción entre ambas proteínas, comentan Olivares et al., (2008) (Fig. 18), provoca cambios alostéricos en la conformación de la subunidad reguladora dando por resultado la activación de la subunidad catalítica de PI3K. A consecuencia de ello, p110 se localiza cerca de la membrana plasmática en donde tiene acceso a sus sustratos PI4-P (fosfatidilinositol 4-fosfato) y PI4,5-P2 (fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato), los cuales son fosforilados en la posición 3 del inositol, generando los productos **PIP2** (fosfatidilinositol-bisfosfato) y **PIP3** (fosfatidilinositol-trisfosfato), respectivamente. El PIP3, como apuntan Mora et al., (2004), sirve como sitio de unión para quinasas de Ser como PDK1 (kinasa dependiente de fosfoinositidos-1), Akt o también conocida como proteína kinasa B (PKB) y la proteína kinasa atípica Cs (aPKCs).

En el caso de la proteína kinasa **Akt**, después de su reclutamiento a la membrana plasmática es *fosforilada* en dos residuos, la serina 473 (*Ser473*) y la treonina 308 (*Thr308*). La fosforilación en la Ser473, ocurre primero por acción del complejo proteico mTORC2, también conocido como kinasa dependiente de fosfoinositol 2 (PDK2). Esta fosforilación parece promover la interacción entre el motivo hidrofóbico del carboxilo terminal de Akt y la kinasa dependiente de fosfoinositol

1 (PDK1) que la fosforila en la Thr308, estas dos fosforilaciones son importantes para que Akt se active completamente (Bozulic et al., 2009).

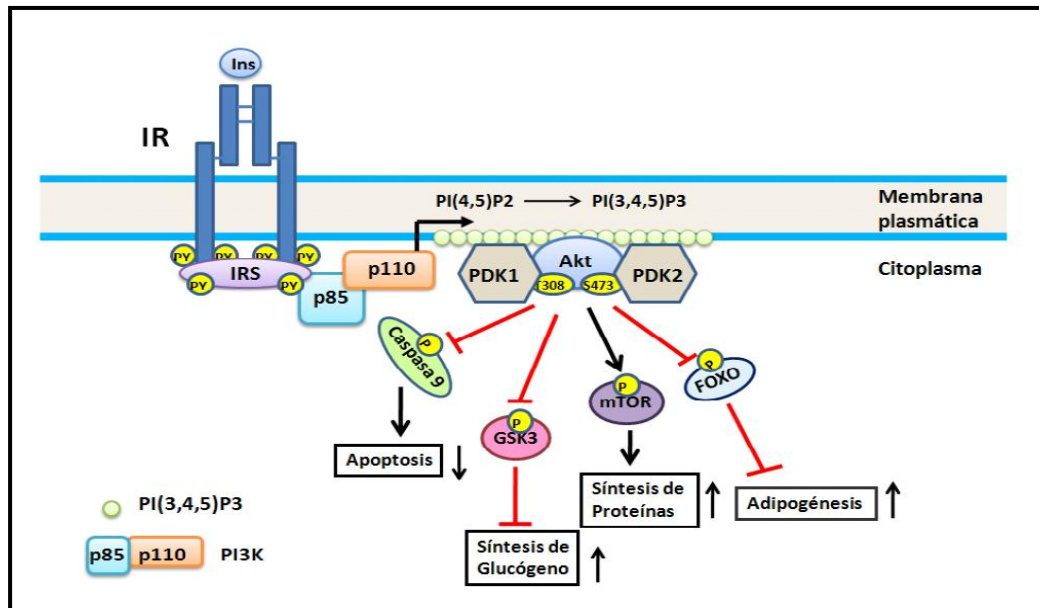


Figura 18. Activación de la vía de la PI3K/Akt por la insulina (Extraído de Olivares et al., 2008).

Hay descritas tres isoformas de Akt/PKB codificadas por diferentes genes: *PKBalpha* (*Akt1*), *PKBbeta* (*Akt2*) y *PKBgamma* (*Akt3*), y se ha demostrado su especificidad funcional en la señalización para el metabolismo y crecimiento (Dummler et al., 2007; Gonzalez et al., 2009 y Schultze et al., 2011).

La enzima Akt, regula varios de los efectos metabólicos de la insulina a través de la fosforilación de una lista creciente de sustratos que propagan la respuesta de la insulina (Manning et al., 2007; Vasudevan et al., 2010). Entre esos sustratos destacan:

- **Glicógeno sintasa quinasa-3 (GSK-3)**, que regula la *síntesis del glucógeno*.

- Rab guanosina trifosfatasa (RabGTPasa) activa la **proteína sustrato de Akt de 160 kDa (AS160)** para la **regulación del transporte de la glucosa**.
- Homólogo de Ras enriquecido en el cerebro (Rheb GTPasa) activa el complejo **TSC1/2**, interviniendo en la regulación *de la síntesis de mTOR* (del inglés, mammalian Target of Rapamycin, se trata de una familia de proteínas TOR que están implicados en el control del inicio de la transcripción del ARNm, la organización del citoesqueleto celular de actina, el tráfico de membrana, la formación de ribosomas y la regulación del crecimiento, proliferación y **muerte celular**, nos explican Hay et al., (2004)) **y proteínas**.
- los factores de transcripción de **FOXO** (factores de transcripción Forkhead clase O), regulan la **expresión de neogluogénicos y otros genes**.
- **BAD** (Promotor *de muerte celular* asociado a Bcl-2), que se encarga de regular la **apoptosis**.

Hay que hacer mención que la fosforilación e inactivación de la enzima GSK3, una kinasa que en condiciones de no estímulo inhibe a la glucógeno sintasa; su inhibición por Akt favorece la activación de la glucógeno sintasa y el aumento en la síntesis de glucógeno (Engelman et al., 2006).

3.4.2.2 Vía de las kinasas activadas por mitógenos (MAPK)

Los efectos de la insulina en la **regulación de la síntesis de proteínas** son mediados principalmente a través de la activación de la vía de señalización de las MAPK.

Basándose en pruebas que la insulina y los mitógenos actuaban a través de la misma vía, posiblemente convergían mecanismos para promover la fosforilación de proteínas intracelulares mediante la activación de proteínas (Ser/Thr) kinasas. Sturgill et al., (1986) detectaron una proteína (Ser / Thr) con actividad kinasa que se activaba por la insulina en extractos de adipocitos 3T3-L1, este polipéptido de alto peso molecular fue identificado como un microtúbulo asociado a proteína-2 (MAP-2). La posibilidad de que esta kinasa MAP-2 podría ser un estímulo mitogénico, fue reforzada por el hallazgo que el polipéptido de kinasa MAP-2 era idéntico a los polipeptidos de 41–43kDa caracterizados previamente, cuya fosforilación de tirosina era estimulada por factores de crecimiento celular en cultivo, de ahí su nombre de *proteinkinasas activadas por mitógenos* (MAPK) (Rossomando et al., (1989).

Las MAPK son proteínas reguladoras de la señalización celular conservadas a lo largo de la evolución, que desempeñan papeles esenciales como el *control de diferenciación celular, proliferación celular y muerte celular* (Kyriakis et al., 2001).

Las principales familias de MAPK en mamíferos son tres (Hommes et al., 2003):

- las kinasas activadas por estímulo extracelulares (**ERK**): contienen la secuencia TEY (Thr-Glu-Tyr), y sus miembros pueden clasificarse en dos grupos: las MAPK clásicas (ERK1/p44 y ERK2/p42) y las MAP quinasas

grandes (ERK3, ERK5, ERK7 y ERK8). Las más estudiadas son la ERK1/2 y forman parte del módulo que incluye a la MAPK kinasa kinasa (MAPKKK o también conocida como MAP3K o MEKK). Las rutas ERK 1/2 se activan en respuesta a muchos estímulos diferentes, incluyendo los factores de crecimiento, citoquinas, infección de virus, ligandos de receptores acoplados a proteínas G, agentes transformantes y carcinógenos. Éstas proteínas participan en la regulación de la meiosis, mitosis y en células diferenciadas.

- las **MAP kinasas p38**: presentan la secuencia de activación TGY (Thr-Gly-Tyr) e incluye las proteínas p38 α , β , γ (ERK6, SAPK3) y δ (SAPK4). La señalización por p38 se ha relacionado con respuestas diversas: inflamación, progresión del ciclo celular, aparición de tumores, desarrollo, diferenciación y muerte celular.
- las **SAPK/JNK** (quinasas activadas por estrés o quinasas del extremo NH₂-terminal de c-jun). Esta familia contiene la secuencia TPY (Thr-Pro-Tyr) e incluye diez isoformas de 46 y 55 kDa generadas por corte y empalme alternativo a partir de los mensajes codificados por los genes Jnk1, Jnk2 y Jnk3. Jnk1 y 2 tienen expresión universal, mientras que Jnk3 se expresa únicamente en cerebro, corazón y testículos. Esta ruta participa en muchos procesos fisiológicos, entre los que se encuentran la proliferación celular y la apoptosis.

Todas las MAPK contienen una secuencia de activación Thr-Y-Tyr (TXY) y la fosforilación de la treonina y la tirosina es necesaria y suficiente para su

activación. Su activación se realiza mediante una cascada de kinasas. Se ha descrito que se inicia con la fosforilación de un residuo de treonina (Thr) o de tirosina (Tyr) mediante una kinasa específica, la MAPKKK sobre la MAPK kinasas (MAPKK, MKK, o MEK), y éstas a su vez catalizan la fosforilación en Thr o Tyr de las MAPK (Hommes et al 2003) (Fig. 19).

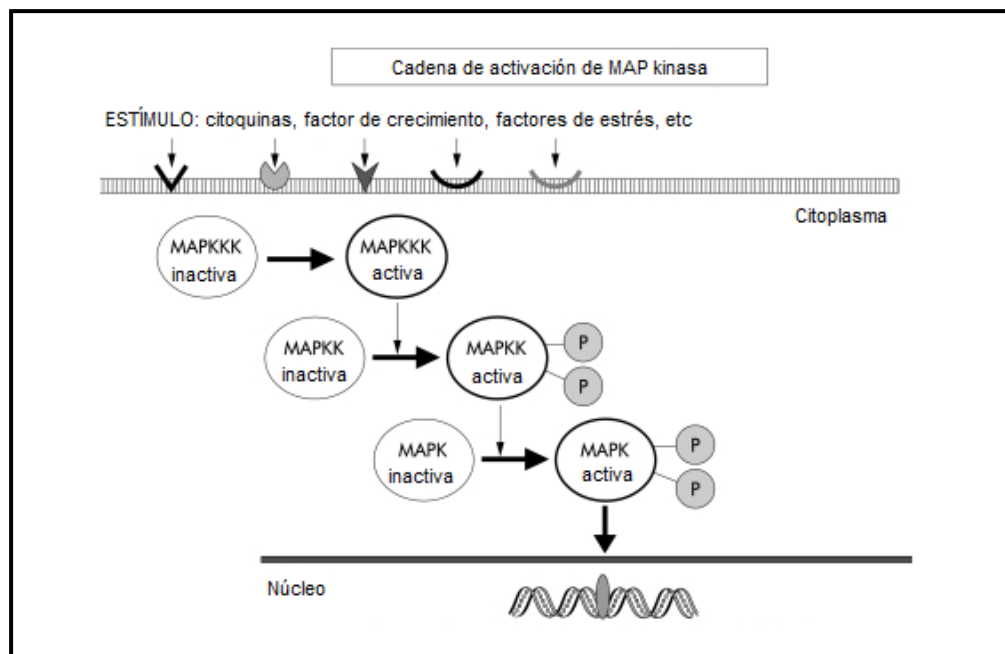


Figura. 19. Cadena de activación de la familia MAP kinasa (Extraído de Hommes et al., 2003).

Esta vía se inicia por el reclutamiento del complejo Grb2/ SOS; SOS es un factor recambiador de nucleótidos de guanina, capaz de activar a Ras. Puede ser activado por Shc fosforilado o IRS fosforilado. No está claro si Shc (proteína adaptadora que contiene SH2) o IRS enlazado al complejo Grb2/Sos son igualmente de eficaces para activar a Ras, dadas las diferencias en su abundancia, localización subcelular y posible reclutamiento de componentes adicionales. En algunas células, Shc es el sustrato más importante para la activación de Ras/MAPK,

mientras que en otras, la vía dependiente de IRS parece predominar (Pruett et al., 1995; Takahashi et al., 1997). Como bien se ilustra en la figura 20, Olivares et al., (2008) nos explica que la activación de Ras (GTP-Ras) inicia el encendido de la cascada de las MAP kinasas. GTP-Ras se une y activa a Raf-1 que subsecuentemente lleva a la fosforilación y activación de la vía, que involucra el reclutamiento y activación de MEK y de las ERK1 y ERK2.

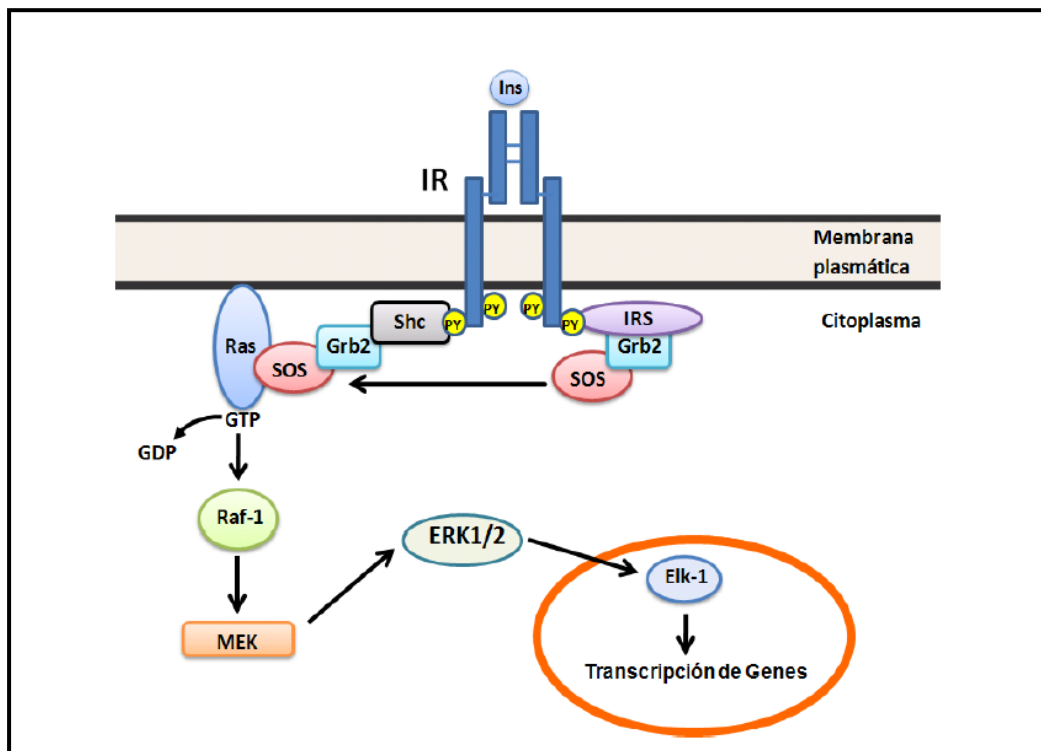


Figura 20. Activación de la vía de las MAPK por acción de la insulina. (Extraído de de Olivares et al., 2008).

En resumen, con esta revisión bibliográfica hemos querido exponer de forma más o menos detallada, que la cascada de señalización de la I/IGF puede producir gran cantidad de efectos fisiológicos, tanto metabólicos como relacionados con el crecimiento y supervivencia celular, no solo en diferentes tejidos, como ya hemos visto, sino también dentro de la misma célula, utilizando

las mismas vías de señalización, tanto la vía de la PI3K y la vía de las MAPK.

La clave está en la red de señalización, que es lo que daría la especificidad a la insulina/IGF. Dentro de esta vía, participan múltiples moléculas efectoras, como hemos estado explicando, que harían posible esta especificidad, entre ellas está el IRS, que parece pieza clave a nivel de la cascada de señalización de la insulina/IGF. IRS pertenece a una familia de proteínas que hasta al momento se han descrito 6, y entre ellas, IRS2 destaca porque se ha observado que participa en la supervivencia celular. Se distribuye ampliamente en el cuerpo, y por tanto la podemos encontrar también en el sistema visual, pudiendo entonces ejercer un papel importante en el mantenimiento celular retiniano, como han observado Yi et al., (2005). De ahí que tengamos interés en su estudio.

4. Modelos experimentales para el estudio de enfermedades humanas

4.1. El animal de laboratorio

Los animales que utilizamos para el estudio experimental se tratan de un animal:

- Engendrado y producido en condiciones controladas
- Mantenido en un entorno controlado
- Se conocen antecedentes genéticos y microbiológicos
- Debe existir una comprobación sistemática de estos antecedentes

4.2 El ratón como modelo experimental

Estos modelos animales en la medicina experimental nos ayudan a entender la patogénesis de muchas enfermedades, así como pueden ayudar en el desarrollo de terapias que sustituyan la función defectiva de un gen determinado, eso sí, salvando las distancias filogenéticas.

La elección del modelo animal del “*ratón*” dentro de la medicina experimental tiene sus razones, ya que presenta muchas ventajas con respecto a otros modelos genéticos, como por ejemplo la mosca *Drosophila*, el nematodo *Caenorhabditis elegans* e incluso la rata.

Las ventajas que cuenta el modelo del ratón son las siguientes (Benavides et al., 2003):

- Se trata de un **mamífero**, por tanto, gran parte de sus procesos bioquímicos son similares al hombre.

- Presentan un **tiempo generacional muy corto**, además son muy prolíferos y se adaptan fácilmente a la vida en los animalarios.
- Junto con el hombre son de las pocas **especies de mamíferos mejor estudiadas** desde el punto de vista genético.
- Existe una **gran cantidad de líneas genéticamente definidas**, como las consanguíneas y congénicas, además de cientos de mutaciones y un gran número de rearrreglos cromosómicos disponibles.
- Es el único animal que posee **sistemas eficientes de cultivo de células embrionarias pluripotenciales** (células ES), lo que permite la realización de mutaciones dirigidas (ratones KO constitutivos y condicionales).
- Es relativamente **barato** en comparación con otros animales de experimentación.
- De **fácil cuidado** y mantenimiento.

4.2.1 Taxonomía del ratón

Clase: *Mammalia*

Familia: *Muridae*

Género: *Mus*

Especie: *Mus musculus*

4.2.2 Clasificación de los modelos murinos

Benavides et al., (2003) clasifica estos modelos según su origen en:

- a) Modelos procedentes de mutaciones espontáneas o inducidas

- b) Modelos generados por transgénesis
- c) Modelos generados *in vitro* por manipulación de células madre embrionarias (células ES)

- a) Modelos provenientes de mutaciones espontáneas o inducidas

Las mutaciones del ratón se encuentran listadas y descritas, y son actualizadas de forma periódica. Las podemos consultar en la página de internet del *Mouse Genome Informatics* (http://www.informatics.jax.org/searches/marker_form.shtml). Muchas de estas mutaciones se catalogan como *modelos homólogos* de enfermedades humanas, siendo por tanto interesante su conocimiento para su traslación a humanos.

- b) Modelos generados por transgénesis

- *Modelos producidos a través de la eliminación de un determinado tipo celular.* Se pueden generar animales que les falte un tipo celular específico e incluso hasta un linaje celular completo. Por ejemplo se diseñarían ratones según este patrón para el estudio de ratones con inmunodeficiencia de linfocitos B.
- *Modelos producidos a través de una regulación anormal del gen.* El mejor ejemplo es el ratón gigante producido en 1982 para la sobreexpresión de la hormona del crecimiento de la rata.

- *Modelos producidos por la incorporación de genes humanos.* Como ejemplo se destaca el ratón transgénico sensible al virus de la polio, el cual reproduce algunos de los síntomas clínicos observados en humanos, y por tanto siendo un modelo excelente para estudios moleculares de su patogenia.
 - *Modelos transgénicos producidos por la incorporación de grandes fragmentos de ADN.* Son de gran utilidad cuando el defecto genético resulta de una alteración cuya causa molecular es poco conocida o desconocida. Es el ejemplo del estudio del modelo de ratón con Síndrome de Down.
- c) Modelos generados *in vitro* por manipulación de células ES (células pluripotenciales)

Ha sido un gran avance contar con cultivos celulares pluripotenciales, ya que ha permitido la manipulación del genoma murino, sobre todo en el caso de las mutaciones dirigidas, como es el caso de nuestro modelo experimental sin el gen IRS2.

4.2.3 Población celular de la retina del ratón

Como ya hemos comentado, la retina del ratón está siendo un importante objeto de estudio para la aproximación del conocimiento de la organización retiniana en mamíferos, ya que su organización celular es muy parecida, salvando las distancias filogenéticas.

De ahí que el modelo de animal de experimentación que se va a llevar a cabo en la presente tesis doctoral sea el *ratón*.

Ya que todo nuestro modelo experimental se basa en el ojo de este animal, y en concreto nos centramos en la retina del mismo, se va a explicar a continuación, de forma breve, cuál es la organización celular de la retina en los ratones, ya que su conocimiento va a ser vital para entender bien los cambios degenerativos que se puedan producir.

La retina de los ratones tiene conos y bastones al igual que en el mamífero. La proporción de conos que han encontrado Carter-Dawson et al., (1979) ha sido del 1%, sugiriendo este dato que la retina del ratón está dominada por la presencia de bastones.

A diferencia de la retina de los mamíferos, Peichl y Gonzales (1994) han descrito que la retina del roedor sólo cuenta con un tipo de célula horizontal. Comprende el 3% de las células que se hallan en la capa nuclear interna (Jeon et al., 1998).

En cuanto a las células bipolares, no hay ningún estudio detallado de este tipo celular en ratones. Sin embargo ha sido estudiado en retina de gato (Cohen y Sterling 1990a y 1990b), en rata (Euler y Wässle, 1995) y en primate (Boycott y Wässle, 1991), donde se ha descrito diez tipos de células bipolares para conos y un tipo celular para bastón. Jeon et al (1998), han encontrado en sus estudios que las células bipolares corresponden al 40% de los cuerpos celulares de la capa nuclear interna.

Se han descrito entre 20 y 30 tipos diferentes de células amacrinas en la retina de mamíferos (Strettoi y Masland, 1996; MacNeil y Masland, 1998). Representan una población similar a las células bipolares, ya que Jeon et al., (1998) reportaron que las amacrinas constituyen el 41% de todas las células de la capa nuclear interna.

Las descripciones de Dräger et al (1981), confirman un incremento gradual de 2000 células ganglionares por mm^2 en retina periférica a 8000 por mm^2 en retina central.

5. Modelos experimentales para el estudio de las enfermedades retinianas

5.1 Degeneración y remodelación retiniana

La retina es un complejo celular muy especializado encargado de la captación de luz y del procesamiento de la información por la neurona de primer orden. Un fallo en la cadena de activación celular y molecular de la retina, conlleva a consecuencias devastadoras para la misma siendo la pérdida de visión su máxima expresión.

Tras cualquier proceso de pérdida celular, el intento por parte del organismo de reparación de ese tejido dañado es lo que conocemos como *regeneración/ remodelación celular*.

Es bien conocido que el sistema nervioso central (SNC) sufre remodelación por muchos procesos fisiológicos, entre ellos:

- *desarrollo*
- *aprendizaje*
- y por la *edad*

Y ante cualquier daño neuronal, el SNC responde de forma rápida con una reestructuración del sistema somatosensorial dañado con un intento de recuperar la funcionalidad anterior al estímulo dañino. (Wall et al., 2002, Navarro et al., 2007, Navarro, 2009).

La retina forma parte del SNC y por tanto sufre también este proceso de remodelación ante una pérdida celular retiniana. Marc RE et al., (2003) afirma que la regeneración retiniana empieza típicamente en la *retina sensorial* (fotorreceptores) y sus tejidos

adyacentes (el epitelio pigmentario retiniano), que se encarga estrechamente del mantenimiento metabólico de los fotorreceptores y por tanto vital para el buen funcionamiento de los mismos), y con ello la deafferenciación (es decir, la interrupción nerviosa) de la *retina neuronal* (neuronas que transmiten la información de los fotorreceptores).

Una revisión de la literatura científica confirma que la enfermedad degenerativa retiniana mejor caracterizada es la ***retinosis pigmentaria (RP)***. Esta enfermedad afecta a uno de cada 2000 humanos aproximadamente (Sohocki et al., 2001; Jones BW et al., 2005). Ya se conocen más de 100 genes alterados implicados en esta enfermedad, como podemos consultarlo en la página web (<http://www.sph.uth.tmc.edu/RetNet/>). Pero no sólo esta enfermedad es la única que produce degeneración retiniana en humanos, otras enfermedades retinianas como las *distrofias de conos y bastones* (Eisenfeld AJ et al., 1984; Chua et al., 2013) la *degeneración macular asociada a la edad (DMAE)* (Adler et al., 1999; Sullivan et al., 2007) así como la afectación de genes o la implicación de factores ambientales (epigenética), pueden producir un daño en la retina neurosensorial importante.

Todas estas enfermedades difieren en los mecanismos de actuación y pueden desencadenar diversas modalidades de muerte celular, pero todas comparten un resultado común: *pérdida de fotorreceptores y remodelación neuronal.*

A continuación vamos a describir de forma breve las fases por las que pasa la retina en el proceso de remodelación (Fig. 21). En la figura la identificación celular viene determinada por el color: los fotorreceptores conos y bastones en naranja, células bipolares de bastones y conos en azul claro y azul oscuro respectivamente, células

ganglionares en morado claro y oscuro, célula horizontal en verde oscuro, célula amacrina GABAérgica en rojo, célula amacrina glicinérgica en verde y célula de Müller en amarillo. (A) muestra la laminación y conectividad celular retiniana normal. (B) Degeneración de los fotorreceptores. (C) Muerte de los fotorreceptores y formación de de complejo glial de Müller. (D) Fase inicial del estadio 3 y (E) fase final de la degeneración retiniana (Jones et al., 2005).

Fase 1: **Degeneración de los fotorreceptores:** se desencadena un proceso de modulación fenotípica del fotorreceptor, con frecuencia iniciándose con el acortamiento de los bastones (Jones et al., 2005). Previamente se pensó si la degeneración retiniana estuviera mediada por el EPR, se iniciarían alteraciones moleculares y desacoplamiento celular del mismo (Jones et al., 2003). Independientemente del insulto inicial, parece que los fotorreceptores dañados comienzan a desestructurar sus terminales sinápticos, y sus proyecciones axonales empiezan a eludir sus objetivos normales (células bipolares y horizontales) y se extienden hasta la capa de células ganglionares. Cuando los segmentos de los bastones comienzan a reducirse se va mermando la tasa de rodopsina en los segmentos internos incrementando la muerte de los mismos (Fisher et al., 2003) (Fig. 21b).

Fase 2: **Muerte de los fotorreceptores:** aunque es una fase breve, es compleja. El evento clave de esta segunda fase es la formación de un complejo glial fibrótico distal constituido de procesos distales de la célula de Müller. Cubre casi totalmente las paredes de la retina neural del espacio subretiniano remanente, el EPR y coriocapilar. Se producen brechas ocasionales en este complejo fibrótico y

éstos son sitios de invasión de EPR más adelante y quizás más preocupante, zonas de escape neuronal de la retina. También se produce la aceleración de la muerte de los fotorreceptores (Jones et al., 2005; Marc et al., 2007) (Fig. 21c), junto con la deaferenciación o desconexión de las células bipolares, no sólo fisiológicamente a través de la eliminación de receptores de glutamato en la capa plexiforme externa, sino también anatómicamente a través de la retracción de las dendritas de todas las células bipolares (Jones et al., 2012) y el desarrollo de “sprouting” (ramificación) anómala de las células bipolares, amacrinas, y horizontales.

Fase 3: **Remodelación neuronal:** Conforme las neuronas mueren, la retina comienza a reducirse, permitiendo a las células de Müller rellenar parcialmente el espacio desocupado, se hipertrofian y migran distorsionando las capas internas y externas de la plexiforme. El nuevo complejo glial sirve de anclaje para la migración neuronal y extensión del proceso. Además se añade el hecho que las células del EPR migran hacia la retina acompañados de vasos coroideos a través de los gaps del complejo glial desplazando las células de la capa nuclear interna. Así mismo, las células amacrinas empiezan a migrar a lo largo de la columna glial hacia la capa de células ganglionares. Y se empiezan a formar “*microneuromas*”. Jones et al., (2003) describe estas neoformaciones como terminaciones sinápticas de células GABAérgicas y glicinérgicas amacrinas, células bipolares glutamatérgicas y procesos de células ganglionares. En estas formaciones se crean sinapsis nuevas dentro de la capa nuclear interna remanente y alrededor de los somas de las neuronas supervivientes. Los microneuromas contienen diferentes

sinapsis (amacrina/amacrina, amacrina/bipolar, amacrina/célula ganglionar, bipolar/ amacrina, bipolar/célula ganglionar). Precisamente Jones et al., (2005) denominan a este fenómeno de reorganización masiva “cableado” (“rewiring”) que conlleva a circuitos anómalos.

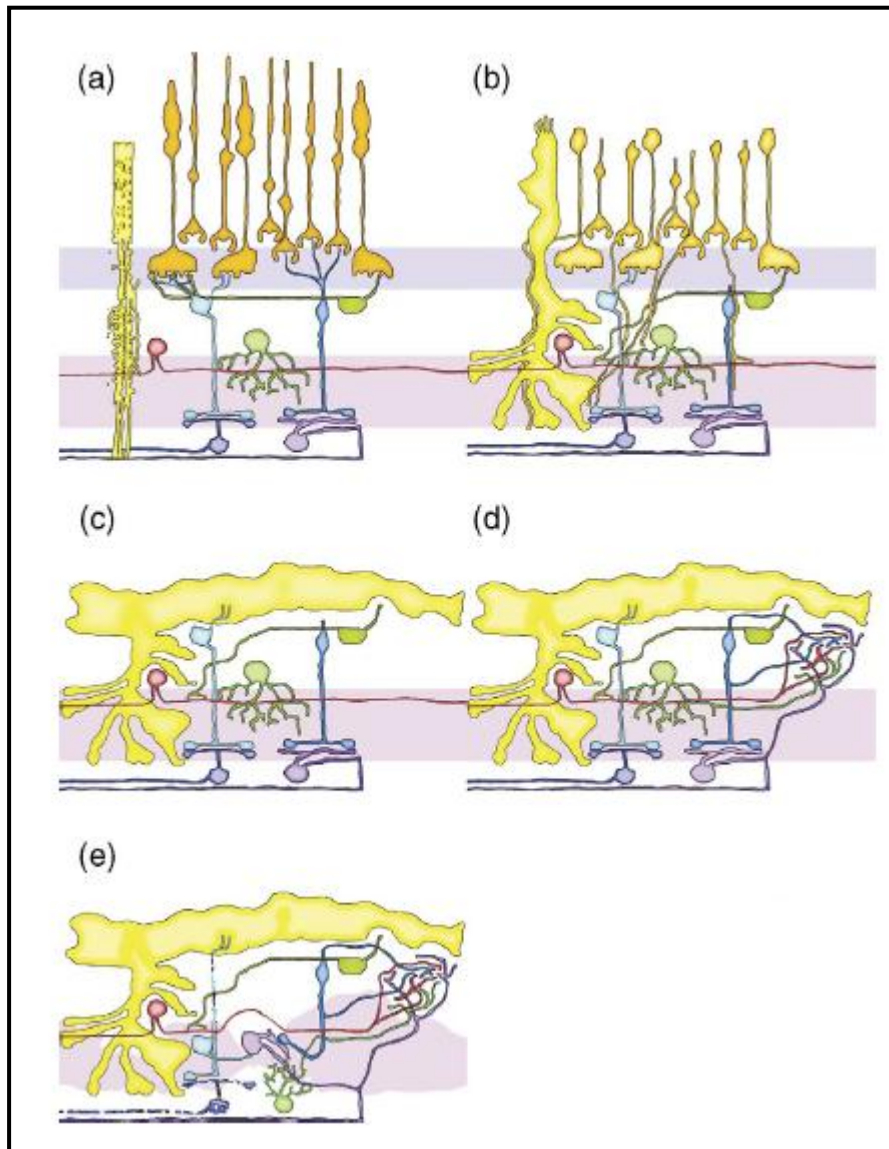


Figura 21. Representación esquemática de los tres estadios de la degeneración retiniana.

Es conocido desde hace tiempo que el incremento de una de las proteínas de la familia de los filamentos intermedios, la **proteína glial fibrilar ácida (GFAP)**, ha sido descrito como un indicador de “estrés” en los astrocitos del sistema nervioso central (Pekny et al., 2005). De manera similar responde la retina al "estrés", dice Lewis et al., (2003), pero el incremento de filamentos intermedios se produce principalmente en las células de Müller, la glía radial de la retina.

Bringmann et al., (2012) dicen que cada célula de Müller constituye el núcleo de una columna de neuronas retinianas, que representa la unidad funcional más pequeña para llevar a cabo el procesamiento de la información visual. Interactúan con las neuronas de sus columnas en una especie de relación simbiótica y son responsables del apoyo funcional y metabólico de sus neuronas asociadas. En general las células de Müller son neuroprotectoras, pero pueden también detener el apoyo a las neuronas y contribuir a su degeneración neuronal. Pekny et al., (2005) apuntan que diferentes estudios en varias enfermedades neurológicas indican que la gliosis reactiva puede tener tanto efectos positivos como negativos en el mantenimiento y funcionalidad neuronal.

Bignami et al., (1979) y Lewis et al., (2003), piensan que la gliosis reactiva representa un intento celular de proteger el tejido retiniano de los daños, con la intención de promover la reparación del tejido retiniano y limitar la remodelación tisular. Incluye cambios morfológicos, bioquímicos, y fisiológicos. Estas respuestas varían según el tipo y la gravedad del daño. La regulación al alza de los filamentos intermedios gliales, vimentina y la GFAP, son un indicador sensible de “estrés retiniano”.

Muchos procesos degenerativos retinianos presentan un aumento de GFAP, ya sea por desprendimiento de retina (Erickson et al., 1987, Okada et al., 1990, Lewis et al., 2003; Sethi et al., 2005), en situaciones de isquemia (Barnett et al., 1995, Osborne et al., 1999), en degeneraciones del fotorreceptor (Eisenfeld et al., 1984, Strettoi et al., 2002, Chua et al., 2013), así como en el ratón super p53 (Salazar et al., 2013).

5.2 Modelos animales de degeneración y remodelación retiniana

Se han reportado más de 20 modelos de degeneración retiniana en roedores analizados, que incluyen mutaciones naturales, mutaciones diseñadas en el laboratorio, así como provocadas por el efecto dañino de la luz (Marc et al., 2003; Jones et al., 2005).

Durante muchos años, **se han estudiado diferentes modelos de degeneración retiniana en animales, con la intención de investigar las causas de la degeneración retiniana en humanos**, especialmente de la RP, distrofia de conos, y degeneración macular. Aunque se han hecho progresos importantes, como la aclaración de defectos genéticos de la enfermedad subyacente, aún **estamos lejos en la comprensión de mecanismos que conducen a la enfermedad** y en el diseño de moléculas para la investigación traslacional y la terapia génica para interferir en la progresión de la enfermedad. **Clave de este progreso** ha sido, y continuará siéndolo **el estudio de procesos de degeneración retiniana ocurridos de forma natural o mutantes tanto en animales murinos como en caninos.**

A continuación describiremos las principales características de los modelos experimentales para el estudio de las enfermedades retinianas más prevalentes:

- **Modelos de retinosis pigmentaria (RP):**

Se conoce como retinosis pigmentaria a un grupo de enfermedades retinianas hereditarias caracterizadas por la degeneración progresiva de los fotorreceptores, afectando típicamente primero a los bastones, produciendo en líneas generales, una ceguera nocturna y una reducción de la visión periférica. Conforme progresa, también va afectando a los conos y con ello la visión central (Hartong et al., 2006).

Se han identificado varios genes de RP, más de 100, pudiendo ser heredado de forma autosómica dominante, autosómica recesiva, o ligado al cromosoma X, así como formas raras mitocondriales (Daiger et al., 2007), varios de estos genes participan en la cascada de transducción de señales visuales (Phelan et al., 2000). Se han estudiado muchos modelos en animales para entender esta patología. Cabe destacar por ejemplo:

- La **rata *The Royal College of Surgeon (RCS)***: se trata de un modelo de RP recesivo, esta cepa de rata fue desarrollada por Richard Sidman y John Dowling proporcionados por Sorsby Arnold de la Royal College of Surgeons, Londres, de ahí el nombre (Bourne et al., 1938). A pesar que el *defecto genético no es conocido* (Strauss et al., 1998), causa una alteración en el EPR que es incapaz de fagocitar segmentos externos de los bastones, un proceso controlado que es de vital importancia para la renovación del segmento externo del fotorreceptor (Edwards et al., 1977; Tamai et al, 1979).

- El **ratón rd 10** (*Pde6b^{rd10}*): presenta una degeneración de fotorreceptores moderada, y sirve como modelo de RP autosómica recesiva en humanos (Phillips et al., 2012). Presenta un defecto en el gen *Pde6b^{rd10}* localizado en el cromosoma 4p16 (Chang et al., 2002). Es común encontrar en estos ratones acortamiento y desorganización de los segmentos de los conos y los axones (Barhoum et al., 2008). Así como pérdida de procesos dendríticos de las células bipolares de los bastones en estadios tempranos (Puthussery et al., 2009; Barhoum et al., 2008 y Phillips et al., 2010).
- El **ratón rd 1** (*Pde6b^{rd1}*): se considera la primera degeneración retiniana y una de las más importantes (Keeler et al., 1966). Presenta un defecto en el gen *Pde6b^{rd1}* localizado en el cromosoma 4p16 (Chang et al., 2002).
- **La rata S334ter-3**: modelo transgénico de degeneración retiniana desarrollado para expresar una mutación a la rodopsina similar a la que se halla en la RP en humanos (Hombrebueno et al., 2010). Se ha descrito que se producen cambios morfológicos en las células retinianas de estas ratas, con una degeneración de los fotorreceptores que se inicia en la retina central y avanza hacia la periferia, así como cambios en las células bipolares de los bastones y horizontales que exhiben procesos anormales en la CPE como retracción de las dendritas formando clusters a lo largo de la MPE, mientras que la CNE es significativamente más delgada, junto con una reacción glial concomitante (Ray et al., 2010; Martinez-Navarrete et al., 2011).

- **Modelos de degeneración retiniana en ratones ocurridos de forma natural**

Durante muchos años se han estudiado diferentes modelos de ratón con degeneración retiniana con la esperanza de comprender las causas de la muerte de las células fotorreceptoras.

RATONES CON DEGENERACIÓN RETINIANA	GEN	CROMOSOMA
Degeneración retiniana rd1	Pde6b ^{rd1}	4p16
Degeneración de células de Purkinje	pcd	5q
Degeneración nerviosa	nr	8p
Degeneración retiniana lenta	PrphRd2	6p
Degeneración retiniana 3	rd3	1q32
Degeneración de la motoneurona	mnd	8p
Degeneración retiniana 4	rd4	1p36
Degeneración retiniana 5	rd5 (tub)	11p15
Vitíligo	Mitt ^{mi-vit}	3p14
Degeneración retiniana 6	rd6	11q23
Degeneración retiniana 7	Nr2e3rd7	15q23
Lipofuscinosis ceroides neuronal	nclf	15q21
Degeneración retiniana 8	rd8	1q25
Degeneración retiniana 9	rd9	Xp21.1
Degeneración retiniana 10	Pde6b ^{rd10}	4p16
Pérdida de la función del cono de los fotorreceptores	cpfl1	10q25

Tabla 2. Mutaciones naturales de degeneración retiniana en ratones (Extraído de Chang et al., 2002).

Se han descrito varias mutaciones naturales ocurridas en ratón que manifiestan degeneración de fotorreceptores de la retina con la preservación de los otros tipos de células retinianas. En la tabla 2 se citan algunos de ellos.

- **Modelos de degeneración macular asociada a la edad (DMAE)**

La degeneración macular es una enfermedad de la mácula y del EPR que causa una disminución de la agudeza visual central. La desestructuración del EPR interfiere con la fagocitosis y el ciclo de la retina, causando adelgazamiento de la misma y estimulando el crecimiento de nuevos vasos (Bressler et al 1988). Se trata de una enfermedad compleja y heterogénea que involucra la interacción de factores genéticos y ambientales con la anatomía de la mácula humana (Stone, 2007). La DMAE se convierte cada vez más frecuente en una patología prevalente en las personas más allá de los 50 años, afectando aproximadamente al 25% de personas mayores de 75 años (Brown et al., 2005). La prevalencia y la necesidad de desarrollar tratamientos eficaces para la DMAE, han llevado al desarrollo de múltiples modelos animales: ratones, ratas, conejos, cerdos y primates no humanos, recreando muchas de las características histológicas de la DMAE y proporcionando información de los mecanismos patológicos subyacentes de esta enfermedad. A pesar de la gran cantidad de modelos desarrollados, ningún modelo todavía recapitula todas las características de DMAE humana (Pennesi et al., 2012; Chen et al., 2013). Destacan los estudios de Sullivan et al., (2007) que fueron los primeros en demostrar en tejido retiniano humano afecto de DMAE la capacidad de remodelación mediante procesos de sprouting y formación de nuevos

complejos sinápticos como se observa en la figura 22. En ella vemos como en la retina normal las esferulas de los bastones (B) y los pedículos de los conos (C) en la MPE forman complejos sinápticos tanto con células bipolares de los conos (CB) y células bipolares de los bastones (BB), así como con células horizontales (h). Sin embargo en retinas con DMAE se aprecia retracción de la sinapsis de los bastones hacia la CNE, mientras que los pedículos de los conos permanecen en la MPE. Los procesos postsinápticos de las células bipolares de los bastones se extienden radialemente o tangencialmente hacia la CNE y reconectan con la sinapsis de los fotorreceptores de los bastones retraídos, mientras que los procesos horizontales se mantienen en la MPE. Estas observaciones ya fueron sugeridas en estudios previos (Sullivan et al., 2003; Johnson et al., 2003).

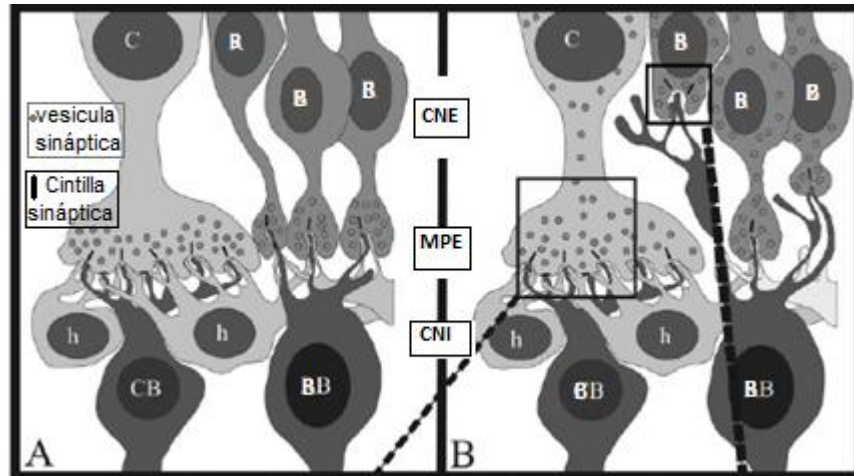


Figura 22. Organización anatómica de los complejos sinápticos de los fotorreceptores en retina normal y retinas afectas de DMAE (Extraído de Sullivan et al., 2007).

- **Modelos de desprendimiento de retina (DR)**

El DR es una causa clínicamente importante de la pérdida visual aguda, de ahí el interés en el estudio de esta patología para el entendimiento de su desarrollo y el manejo de la misma. Se ha estudiado en modelos animales y seres humanos durante décadas. En la actualidad, la inyección subretiniana de ácido hialurónico crea un modelo de DR prevalente, ayudando a explicar la cascada de eventos que puede conducir a la pérdida de la visión permanente en esta patología (Fisher et al., 2005). La separación de la retina neural del epitelio pigmentario, inicia una cascada de eventos que se traduce en cambios celulares a lo largo de la retina “*retinopatía de la separación*”. Utilizando estos modelos animales de desprendimiento y reacoplamiento de la retina dañada, se han identificado muchos cambios celulares que ocasionan una importante remodelación del tejido retiniano. Estos cambios van desde la retracción de los axones por parte de los bastones de los fotorreceptores (Fisher et al., 2005), y la degeneración de los segmentos externos, así como muchos de ellos llegan a sufrir un proceso de apoptosis, junto con el crecimiento de neuritas hacia el espacio subretiniano y vítreo por células horizontales y células ganglionares (Cook et al., 1995; Lewis et al., 1998). Así como cambios por parte de las células de Müller, que van desde la proliferación a una reorganización estructural, creciendo hacia el espacio subretiniano (después de la separación) o al vítreo después del reacoplamiento, así como incremento de neurofilamentos intermedios (Erickson et al., 1987; Fisher SK et al., 2003; Lewis et al., 2003; Sethi et al., 2005; Coblenz et al., 2002; Verardo et al., 2008).

- **Modelos para el estudio del ciclo celular (súper P53)**

La proteína p53 tiene un peso molecular de 53 KDa (de ahí su nombre) y su principal característica es que interviene directamente en el control del ciclo celular y en la replicación y reparación del ácido desoxirribonucleico (ADN), manteniendo la estabilidad genómica, activando la apoptosis y participando en la respuesta celular a agentes externos nocivos. El gen p53 codifica la proteína p53 y en el genoma humano parecen existir unas 200 copias de este gen, localizadas en el cromosoma 17 (Gallego-Pinazo et al., 2008).

Este modelo experimental, que presenta una copia extra de p53, se trata de un modelo para el entendimiento del papel del p53 en el desarrollo de la retina, de hecho Ikeda et al., (1999) han demostrado que p53 es un factor importante para el desarrollo y mantenimiento del ojo, de ahí el interés en su estudio para clarificar la embriogénesis retiniana. Por ejemplo, Vuong et al., (2013) han observado apoptosis durante el desarrollo, con una disminución del número total de bastones y de células de la CNI, pero no indujeron la pérdida de conos o la degeneración de células retinianas más allá de la etapa del desarrollo.

Además, se ha observado que p53 puede tener un papel importante en la retina durante el estrés o la enfermedad aunque estos roles potenciales siguen siendo confusos (Vuong et al., 2013). Así como en ciertos modelos animales de RP, p53 se ha relacionado con respuestas retinianas a la irradiación, al estrés oxidativo y al desarrollo de retinoblastoma (para una revisión Vuong et al., 2012).

- **Modelos de diabetes experimental para el estudio de Retinopatía diabética (RD)**

La retinopatía diabética (RD) es una de las complicaciones microvasculares crónicas de la diabetes y la más importante a nivel ocular. Como han observado Klein et al., (1984), en los países industrializados se ha convertido en la principal causa de deficiencia visual y ceguera en adultos entre los 25 y 74 años de edad.

La RD no afecta sólo a la vascularización retiniana, sino que también se ve afectada la neurorretina (Wolter, 1961; Lieth et al., 2000; Barber, 2003), considerándose la RD como un proceso de *neurodegeneración*.

Varios grupos han establecido que hay un aumento significativo de células que sufren apoptosis, sobre todo en la CCG en retinas de ratas diabéticas (Barber et al., 1998; Hammes et al., 1997; Asnaghi et al., 2003; Park et al., 2003). Junto con cambios en las capas internas de la retina, en las que se ha descrito una reducción de su espesor (Martin et al., 2004; Barber et al., 2005; Gastinger et al., 2008; Yang et al., 2012) y modificaciones en las conexiones sinápticas (Agardh et al., 2001; Park et al., 2003; Preet et al., 2006; Park et al., 2007). Así como cambios morfológicos en las células ganglionares y acumulación de NF-L (Gastinger et al., 2001, 2008; Qin et al., 2006; Meyer-Rüsenberg et al., 2007; Kern et al., 2008).

El efecto de la diabetes a nivel retiniano ha sido estudiado principalmente usando los siguientes modelos:

- *Ratones inducidos de forma experimental:* usando estreptozotocina para alterar las células beta pancreáticas. Ozawa et al., (2011), explican que la estreptozotocina químicamente es una metilnitrosurea que fue originalmente identificada como un antibiótico, pero también conocida por tener efecto antitumoral. Schnedl et al., (1994) han observado que es citotóxica para las células beta pancreáticas y se usa para generar modelos de diabetes tipo I. Se puede experimentalmente inducir diabetes en ratones y ratas mediante la inyección de estreptozotocina intraperitoneal. En el modelo de ratón los niveles de glucosa llegan a más de 500 mg/dL después de un mes de diabetes.
- *Ratones que desarrollan espontáneamente diabetes:*
- diabetes tipo I (ratón Ins2^{Akita}). Yoshioka et al., (1997) han demostrado que el locus Mody4 en el cromosoma 7 tiene una mutación puntual en el gen 2 de la insulina, ahora referido como el alelo Ins2^{Akita}. Wang et al., (1999) han observado que esta mutación provoca en el ratón la muerte de las células beta pancreáticas y con ello hipoinsulinemia e hiperglucemia.
 - diabetes tipo II (ratón de la cepa KKAY): se ha estudiado como un modelo de retinopatía diabética con lesiones microangiopáticas (Duhault et al., 1973).

6. Nuestro modelo experimental: *ratón deficiente de IRS 2 (IRS2 -/-)*

Se utilizaron ratones **adultos** de la cepa **C57BL/6**. Esta cepa de ratones es una de las líneas de consanguineidad más populares utilizadas en la actualidad como señalan Benavides (2003). Las principales características de las líneas consanguíneas son:

- *Isogenicidad o igualdad genética*: el hecho de que todos los individuos pertenecientes a una línea sean idénticos genéticamente, permitiendo el intercambio de células o tejidos.
- *Homocigosis* (más del 98%): Por lo tanto, los individuos que pertenecen a una línea consanguínea no son equivalentes a una colección de gemelos idénticos (monocigóticos), ni tampoco a un grupo de animales clonados, ya que éstos son heterocigotas en muchos de sus locis.
- *Individualidad*: rasgo importante a la hora de seleccionar una línea para un trabajo de investigación, ya que la asociación de los caracteres fijados en cada línea particular genera una individualidad con respecto a sus cualidades.
- *Uniformidad fenotípica*: dado que se trata de animales genéticamente idénticos, este rasgo es importante porque nos permite afirmar que la variabilidad en los parámetros experimentales se debe exclusivamente a factores no genéticos (ambientales o metodológicos).
- *Estabilidad genética a largo plazo*: hace posible la comparación de resultados experimentales entre animales de diferentes laboratorios y además, debido a su estabilidad genética, a lo largo del tiempo.

Aunque la generación y fenotipo del modelo de ratón *IRS2*^{-/-} fue descrito previamente por Withers et al., (1998), es muy importante conocer el proceso de creación del ratón que utilizamos en nuestro estudio, para ello exponemos a continuación las características más relevantes.

▪ **Preparación de la recombinación homóloga y creación de ratones con ausencia de *IRS2***

Para poder entender el proceso de creación de un animal transgénico, expondremos previamente en qué consiste el proceso.

La técnica consiste en reprimir o inactivar la función específica de un gen reemplazándolo por formas mutadas de éste en estadios celulares muy primitivos. En el caso de la retinopatía diabética, se aprovecha el mecanismo de la recombinación homóloga para inactivar uno de los genes importantes del sistema de señalización de la insulina, *IRS2*, generando un modelo murino knock out (KO) para esta enfermedad. (Hablamos de ratón KO a aquel ratón producto de un ratón transgénico en el cual el gen insertado no se expresa o es un gen nulo, Herrera, (2005)).

Para poder crear un ratón KO y para destacar a un gen de interés particular (“blanco”), según Herrera (2005) se pueden realizar dos procesos diferentes:

- I. En uno de los procesos de creación de ratones knock-out o transgénicos, es necesaria la construcción de un vector (transportador) que lleve en sí un marcador con secuencias flanqueadoras homólogas al ADN genómico del gen blanco (Bockamp et al., 2002). Posteriormente, este vector se introduce a una

línea celular embrionaria mediante el *método de transfección* (inserción de material exógeno en el genoma de ese organismo). La secuencia homóloga que lleva el vector facilita su inserción dirigida al genoma del huésped y es así como el gen introducido reemplaza al gen con la secuencia original, en un proceso denominado *recombinación homóloga*. Las células embrionarias que hayan sido exitosamente mutadas en el gen blanco serán luego inyectadas a embriones en etapa blastocística (tres y medio días de madurez) o serán co-cultivadas con embriones en etapa de mórula (dos y medio días de madurez) para luego ser implantados en el animal. Así, estas células contribuirán a la formación de tejidos del animal en desarrollo, así como también entrarán a formar parte de las células de la línea germinal. Este proceso dará como resultado ratones quiméricos que, a través de cruces selectivos con ratones sanos, darán como resultado ratones heterocigóticos para el gen deseado y el cruce de éstos a su vez, producirán finalmente ratones knock-out homocigóticos, como señalan Galli-Taliadoros et al., (1995) y Brian et al., (2003). Éste es el procedimiento que se ha seguido para obtener los ratones utilizados en este trabajo.

- II. En otro proceso para la creación de ratones transgénicos, se realiza la inyección del gen elegido en el pro-núcleo masculino de un óvulo fertilizado pero que no ha iniciado su proceso de división. Este embrión (óvulo fecundado después de su primera división mitótica) que ya lleva el transgen en su interior, es implantado en el útero de una ratona previamente preparada para poder anidar el huevo fecundado. De esta manera se obtienen crías de las cuales el 5- 40% serán portadoras del gen inyectado y que serán identificadas

a través del análisis de su ácido desoxirribonucleico (ADN) (Rajewsky et al., 1996; Abuin et al., 2002).

Para la creación de los ratones que se utilizan en los estudios de la Dra. D Burks (Sun et al., 1997; Withers et al., 1998; Withers et al., 1999; Burks et al., 2000; Kido et al., 2000; Hennige et al., 2003; Valverde et al., 2003; Yi et al., 2005; Garcia-Barrado et al., 2011; Schultze et al., 2011; Chirivella et al., 2012; Arroba et al., 2013) del Centro Superior de Investigación Príncipe Felipe de Valencia, se clonó el gen IRS2 de una biblioteca genómica de la cepa de ratones 129, siguiendo el modelo de Sun et al., (1997).

A continuación es necesaria la **creación del vector o transportador**, que es el agente que lleva el fragmento de ADN al interior de una célula huésped que queremos modificar, como ya hemos comentado anteriormente. Estos vectores son piezas de ADN genómico de tamaño mediano, de aproximadamente 6.000 a 8.000 pares de bases de largo, que son replicas cercanas de genes endógenos y que contienen tanto exones (secuencias de codificación) como intrones (secuencias de intervención) (Rajewsky et al., 1996). Es imprescindible la presencia de regiones de homología para permitir la recombinación entre nuestro vector de inactivación y el genoma del ratón, de ahí que sea importante conocer la secuencia del gen a mutar, hecho tremendamente facilitado con la secuencia del genoma de ratón, que fue completada por Mouse Genome Sequencing Consortium (Waterston et al., 2002). Este vector debe ser construido con un clon genómico que contenga *secuencias flanqueadoras* (se trata de la región de un gen que precede o sigue a la región de transcripción, es decir, es el ADN a cada lado de un gen blanco que es lo mismo que el gen que se quiere anular)

homólogas a las secuencias flanqueadoras del gen blanco. Además, Smith (2000) comenta que el vector de reemplazamiento debe contener un **marcador de selección positiva**, habitualmente se emplea el **gen neo** (“*cassette*” *genético*), que confiere resistencia al antibiótico neomicina (antibiótico aminoglucósido). El marcador de selección positiva permite identificar y seleccionar aquellas células embrionarias de ratón (ES, células pluripotenciales) que han incorporado el vector en su genoma. Cuando el vector entra a las células madre por el método de transfección, ocurre una recombinación homóloga del gen transportado por el vector con el gen blanco, esto es, recombinación de las secuencias flanqueadoras homólogas de ambos genes y el intercambio del gen blanco por el cassette que contiene el neo. Es así como el gen de interés es reemplazado o anulado (KO). El gen neo, actúa por tanto como un marcador positivo para seleccionar a todas las células que contienen un gen mutado ó transgen (homólogo y no-homólogo) por su resistencia a la neomicina. Pierce (2010) nos explica que este paso se comprueba después de transferir el gen desactivado a las células embrionarias, éstas se seleccionan mediante el agregado al medio de cultivo del *antibiótico G418* (es un antibiótico aminoglucósido similar en estructura a la gentamicina B1, producido por *Micromonospora rhodorangea*, la resistencia a este antibiótico viene conferida por el gen de resistencia a neomicina) Sin embargo, en algunas ocasiones se puede presentar el fenómeno de recombinación no-homóloga, en la que el gen huésped se combina con otro gen y como resultado el gen blanco no sufre mutación alguna. De ahí que sea recomendable incorporar un segundo marcador, éste de **selección negativa**, adyacente a la secuencia del gen, pero fuera de la región de homología. El marcador más usado es el **gen** quinasa del herpes virus (**HSV-tk**), que permite distinguir las integraciones por recombinación homóloga (donde el

marcador negativo no se incorpora al genoma) de las integraciones aleatorias (donde toda la construcción, incluido el marcador, se integran). Aquellas células tk⁺ son sensibles al antiviral ganciclovir. Por tanto, para corroborar el éxito de la recombinación homóloga, se realiza una segunda selección, añadiendo al medio de cultivo ganciclovir que impide la replicación del ADN en las células que han incorporado a su genoma el gen HSV-tk.

En nuestro caso, utilizaron el **plásmido pPNT** para formar el vector (se trata de un vector no viral), ya contiene los marcadores de Neo y HSV-tk, como nos muestra Withers et al., (1997) en la figura 23.

Para su construcción, dos fragmentos del ADN genómico que flanquean la región codificante que queremos intercambiar, fueron subclonados en sitios de restricción conveniente en el vector.

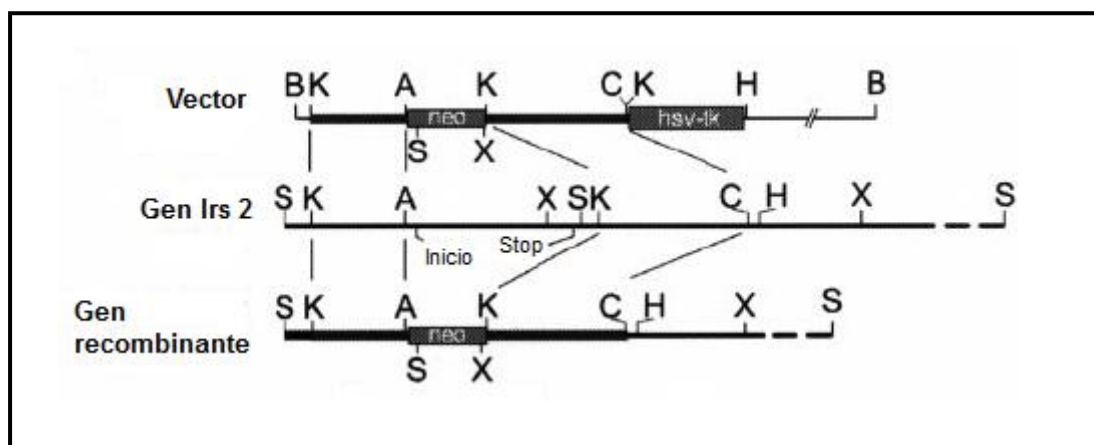


Figura 23. Inactivación del gen IRS 2 por recombinación homóloga. Mapa de restricción del vector (arriba), el gen de IRS 2 (medio) y el gen homólogo recombinante (parte inferior). (Extraído de Withers et al., 1997).

Una vez construido el vector, fue introducido en las células madre embrionarias (CME) derivadas de blastocitos del ratón de la cepa 129 mediante transfección. Tras

este paso, las células se someten a los procesos de selección positiva/ negativa, que permite la supervivencia sólo de aquellas células donde el marcador positivo se ha integrado y no el negativo. Posteriormente, y con la técnica de Southern blot se detecta un único fragmento de restricción específico en una mezcla muy compleja de fragmentos producidos por la escisión de todo el genoma humano) y así se verifica que la integración se ha producido (Arango et al., 2005; Passarge, 2010).

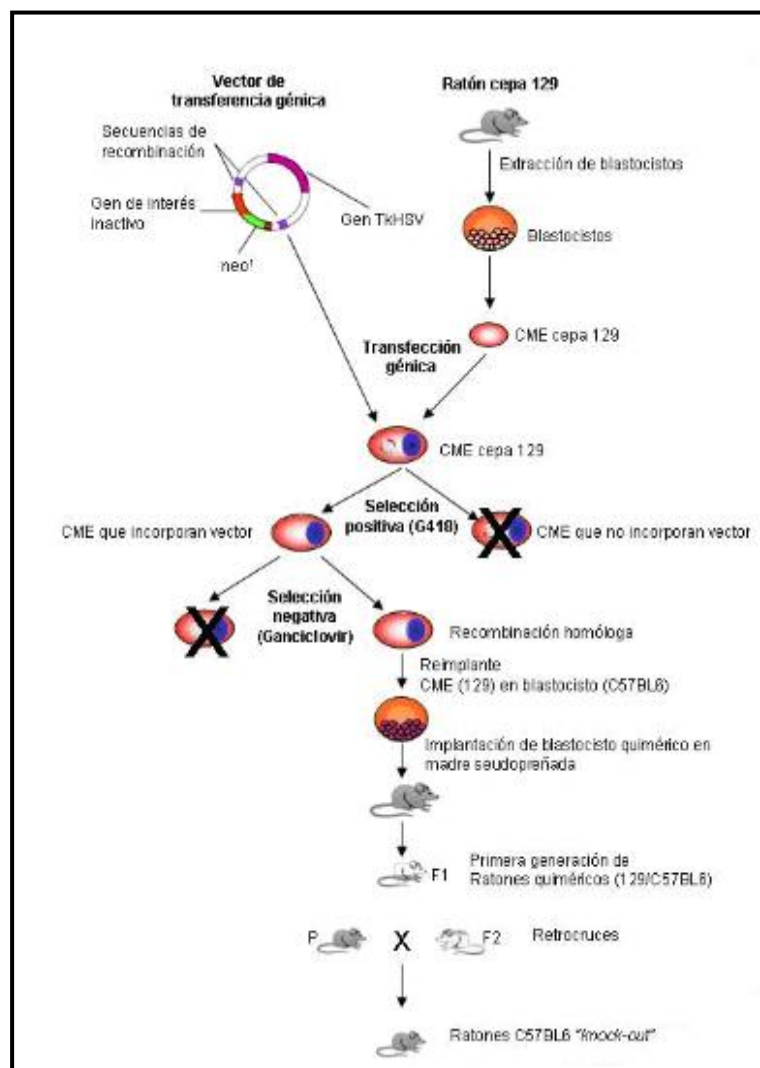


Figura 24. Esquema simplificado de la creación de ratones Knock out (Modificado de Arango et al., 2005).

Una vez identificados los clones donde la mutagénesis ha sido exitosa, los embriones fueron aislados al tercer día de desarrollo, en el estado de blastocito y se microinyectaron 10-16 CME recombinantes (Papaioannou et al., 1993) y éstos se implantaron en hembras pseudopreñadas para originar ratones quimera. Así las quimeras que nacieron presentaban dos tipos diferentes de células: las que derivaban del blastocisto original microinyectado y las células derivadas de las CME manipuladas, que llevan el gen modificado integrado en su genoma. Aquellos animales quimera cuyas células germinales provenían de las CME manipuladas permitirían la transmisión de la mutación a la descendencia. Al cruzar estas quimeras con animales normales, obtuvieron ratones heterocigotos, que por medio de cruces obtuvieron ratones que generarán las dos copias del gen mutado, es decir, animales homocigotos KO (Fig. 24).

Los ratones se detectaron a la 3^o- 4^o semana de vida realizando el genotipado del animal mediante la técnica de **PCR** (*reacción en cadena de la polimerasa*, McPherson et al., 2000 explican que se trata de la reproducción in Vitro de la duplicación del ADN de las células, amplificando de forma exponencial una secuencia específica de ADN bicatenario, técnica descrita por Kary Mullis en 1983). Para ello se tomaron muestras de la cola de los ratones, con previa extracción del ADN. Los cebadores o “primers” (segmentos de ADN) utilizados para la detección del ratón KO fueron:

- IRS2 UPPER: 5' CTT GGC TAC CAT GTT GTT ATT GTC 3'
- IRS2 NEO 5' GCT ACC CGT GAT ATT GCT GAA GAG 3'
- IRS2 LOWER 5' AGC TCT GGA GGT TTA CTT TCC TAG 3'

Una vez expuesto el origen de los ratones *IRS2*^{-/-}, en este trabajo nos planteamos obtener la retina mediante secciones transversales y describir sus características morfológicas, para aplicarlas al entendimiento de los procesos que acontecen en la retina degenerada.

II. Justificación, hipótesis y objetivos

1. Justificación

El receptor de la insulina (RI) y las proteínas de señalización del receptor de la insulina, están ampliamente distribuidas en todo el sistema nervioso central, jugando por tanto algún papel fundamental en este sistema neuronal tan complejo (Havrankova et al., 1978).

Un amplio espectro de factores es responsable tanto del crecimiento como de la supervivencia cerebral, entre ellos se incluye las cascadas de señalización del factor de crecimiento similar a la insulina (IGF) y la insulina. Ampliamente se acepta que uno de los papeles más importantes de la insulina es estimular la absorción de la glucosa de la sangre por los tejidos periféricos. Recientemente se ha intentado aclarar si la insulina por sí misma reduce los niveles de glucosa en sangre o tal vez la insulina pueda desempeñar otras funciones relevantes en el cuerpo. De hecho, varios informes han demostrado las propiedades neurotróficas de la insulina dentro del sistema nervioso central (SNC) (Voll et al., 1991; Schubert et al., 2003; Zemva et al., 2013), independientemente de los niveles de glucemia, incluso disminuye la apoptosis neuroretiniana (Barber et al., 1998), donde también se ha demostrado en cultivos de células ganglionares de la retina (Ito, 2003). Además, varios estudios indican fuertemente que la señalización del receptor de la insulina puede ser importante para la fisiología de la retina (Reiter et al., 2006; Rajala et al., 2009). Por otra parte, algunos autores han demostrado que el receptor de insulina desempeña un papel importante en el desarrollo de los fotorreceptores (Rajala et al., 2008, 2013; Rajala et al., 2009, 2010).

El papel del IGF en el desarrollo y maduración de las células retinianas es en parte desconocido. Los IGFs son esenciales para el desarrollo fetal y postnatal porque su papel en estimular la proliferación y supervivencia de muchas células. Además, IGFs promueve la diferenciación y especialización funcional en la célula (Jones et al., 1995). Es bien conocido, que IGF regula el crecimiento celular y el desarrollo, protege las neuronas contra la muerte celular inducida por derivados amiloidogénicos, privación de suero o glucosa, mediante la activación de las vías intracelulares que implican a la fosfatidilinositol trifosfato /Akt kinasa (PI3K/AKT) (Zheng et al 2000).

La insulina e IGF se unen primero al dominio extracelular de los receptores, activando el receptor intracelular tirosina kinasa. La fosforilación mediada por las proteínas del sustrato del receptor de la insulina (IRS) es necesaria para la propagación de las señales para la mitogénesis, transporte de glucosa y numerosos eventos bioquímicos y biológicos durante la señalización de la insulina (Myers et al., 1996).

Los ratones Knock out (KO) convencionales han comenzado a revelar diferentes roles fisiológicos de las proteínas IRS (Withers, 2001). IRS2 integra la acción de la insulina en relación al control del peso corporal, el crecimiento de células β pancreáticas y supervivencia celular y la fertilidad en hembras (Neganova et al., 2007). Así mismo, la deficiencia de IRS2 produce una intolerancia a la glucosa y causa diabetes en ratones (Withers et al., 1998; Kubota et al., 2000).

Ya hemos comentado que la señalización de IRS2 a nivel cerebral es muy importante tanto a nivel sistémico como a nivel de la homeostasis celular (Taguchi et al., 2007).

Freude et al., (2008) demostró que IRS2 es fundamental para la formación de mielina. De hecho, varios estudios han llegado a sugerir que la señalización de IRS2 es neuroprotectora (Schubert et al., 2003; Martín et al., 2012; Murillo-Cuesta et al., 2012; Zemva et al., 2013). En el ojo, Yi et al., (2005), han demostrado en ratones que IRS2 promueve la supervivencia de los fotorreceptores de la retina después del nacimiento. Más recientemente, Marçal et al., (2013) han publicado que la retinopatía podría provenir de cambios en la vía de IRS / PI3K/AKT o la expresión de isoformas NOS (Marçal et al., 2013).

Son diversas las enfermedades que producen alteraciones retinianas importantes, con evidencia creciente de que la muerte de los fotorreceptores conduce a remodelación secundaria de neuronas en la retina restante. Esta remodelación incluye una serie de cambios negativos en la plasticidad neuronal que incluyen la pérdida o surgimiento de procesos neuronales, pérdida de receptores de glutamato, formación de sinapsis ectópicas, migración celular y gliosis reactiva (Marc et al., 2003; 2007). La remodelación retiniana ha sido reportada en muchos modelos animales en una amplia gama de patologías y etiologías, como son la RP, incluyendo el ratón rd1, rd10 (Strettoi et al., 2002; Gargini et al., 2007; Barhoum et al., 2008), la rata de RCS (Cuenca et al., 2005), también en modelos humanos de RP (Marc et al., 2007), de DMAE (Sullivan et al., 2007), de RD (Barber et al., 1998; Park et al., 2003), así como en modelos animales de DR (Fisher et al., 2005), de ACL (Seeliger et al., 2001; Van Hooser et al., 2002). Sin embargo no hemos encontrado ningún trabajo que analizara los cambios morfológicos en la retina del ratón deficiente de IRS2 en edad adulta.

2. Hipótesis

Una vez expuestas las funciones conocidas de IRS2, nos planteamos evaluar la retina desde el punto de vista de la biología celular mediante un abordaje integral morfológico/funcional, en un modelo experimental de ratón que carece del IRS2, con la finalidad de verificar la siguiente hipótesis de trabajo:

“deben existir cambios morfológicos a nivel celular y en las conexiones sinápticas en la retina de los ratones ausentes de IRS2 en el ratón adulto”.

Así pues, la finalidad de nuestro estudio es analizar los cambios morfológicos a nivel celular, así como en las conexiones sinápticas con el fin de contribuir al conocimiento de los mecanismos celulares y moleculares implicados en la degeneración retiniana.

La verificación de esta hipótesis se ha acometido mediante el estudio de ratones deficientes del gen IRS2.

3. Objetivos

Con el fin de estudiar las implicaciones fisiológicas derivadas de la ausencia de este sustrato, el presente trabajo aborda los siguientes objetivos:

Objetivo prioritario:

1. Caracterización citoarquitectural de la retina en ratones modificados genéticamente a los que se les ha eliminado el gen del sustrato del receptor 2 de insulina, *IRS2* (*IRS2* $-/-$), y su aplicación a la comprensión de las enfermedades retinianas.

Objetivos secundarios:

1. Analizar comparativamente los hallazgos morfológicos y morfométricos de la retina deficiente del *IRS2* frente a los datos de los ratones controles.
2. Evaluar la expresión de proteínas marcadoras de los fotorreceptores y células bipolares de la retina en los ratones deficientes del *IRS2*, frente a los ratones controles.
3. Analizar la expresión de las proteínas marcadoras de las sinapsis mediante evaluación en las membranas limitante externa, plexiforme externa y plexiforme interna.
4. Análisis comparativo de la expresión de proteínas marcadoras de las células ganglionares en la retina deficiente del *IRS2* y los ratones controles.

5. Análisis de la expresión de proteínas marcadoras de las células gliales en la retina de los ratones deficientes del IRS2, frente a los ratones controles.
6. Integración de todas las variables para obtener un resultado global de los cambios retinianos en ausencia del IRS2 y sus consecuencias para la viabilidad de la retina.

III. Material y métodos

Este trabajo lo hemos realizado en la “Unidad de Investigación Santiago Grisolia”, adscrito en la Fundación de la Generalitat Valenciana para la Investigación del Hospital Dr. Peset de Valencia, utilizando como material animales de experimentación de laboratorio y técnicas de estudio morfométrico con microscopia óptica y técnicas de inmunocitoquímica, para poder caracterizar los distintos componentes celulares de la retina y métodos estadísticos.

Nuestro esquema de trabajo fue el siguiente:

1. Animales

- 1.1 Cuidado y sacrificio de los animales

- 1.2 Obtención y preparación de las muestras

2. Técnicas de estudio

- 2.1 Microscopia óptica para el estudio de morfología y análisis morfométrico

- 2.2 Inmunocitoquímica

- 2.3 Estudio de la densidad de terminales presinápticos de fotorreceptores en la MPE y de terminales de las células bipolares de bastones en la MPI.

3. Análisis estadístico

1. Animales

Como animal de experimentación se utilizaron ratones adultos de la cepa C57BL/6J, que se obtuvieron del Centro Superior de Investigación Príncipe Felipe (Valencia), con los permisos correspondientes. La experimentación animal se llevó a cabo siguiendo los estándares aceptados para el cuidado de animales de los servicios de animalario registrados del Centro de Investigación Príncipe Felipe. Los procedimientos de experimentación animal utilizados fueron acordes con los “Principios del Cuidado de Animales de Laboratorio” (NIH Publicación nº 85-23, revisado 1985) y con la legislación española y europea vigente relativa al uso y tratamiento de animales de experimentación (Real Decreto 1201/2005, B.O.E. 252, 10 de octubre de 2005 y Convenio Europeo 1-2-3 del 18 de marzo de 1986). La parte del procesamiento de tejidos se llevó a cabo en la Unidad de Investigación Oftalmológica “Santiago Grisolia” en el Hospital Universitario Dr. Peset de Valencia, El estudio ha sido aceptado por el Comité de Ética e Investigación Clínica de la Facultad de Medicina.

El número de ratones utilizados para el estudio fue de 16 animales de 12 semanas de edad. Se dividieron en dos grupos:

- **grupo de ratones control** (n= 8)
- **grupo de ratones deficientes de IRS2** (n= 8)

El Centro Superior de Investigación Príncipe Felipe nos cedió los ratones IRS2 -/- para nuestro estudio de investigación. La generación y fenotipo del modelo de ratón IRS2 -/-

ha sido descrito previamente por Withers et al., (1998), y ya fue explicado brevemente su proceso de creación en el apartado de introducción.

1.1 Cuidado y sacrificio de los animales

Los animales fueron mantenidos en el estabulario a 21 ± 1 °C, con una humedad relativa de $70 \pm 5\%$, y un fotoperíodo de 12:12 de luz-oscuridad. La alimentación y el agua fueron *ad libitum* de acuerdo con los protocolos del Centro de cuidados animales de Diabetes Joslin and Use Committee.

El sacrificio de las ratones se realizó según la normativa vigente. Se llevó a cabo mediante decapitación de los ratones con guillotina. El procedimiento está aprobado por el Centro de Investigación Príncipe Felipe de Valencia sin anestesia previa.

1.2 Obtención y preparación de las muestras

Tras el sacrificio de los animales, se extrajeron los globos oculares mediante enucleación *ab externo* bajo control con lupa de grandes aumentos. El párpado del animal ya sacrificado fue abierto y por medio de unas pinzas curvas que deslizamos hasta la región retrobulbar, el globo ocular era luxado, obteniéndose una muestra que contenía el propio globo y el nervio óptico correspondiente. Posteriormente, los globos fueron separados cuidadosamente de los nervios ópticos.

Una vez obtenida la muestra, con ayuda de un microscopio se realizó una paracentesis (incisión en el limbo esclero-corneal) con bisturí de 15° y posterior peritomía con tijeras de Wescott, con el fin de separar la córnea y extraer cuidadosamente el cristalino. A continuación, la copa óptica y el nervio óptico fueron fijaron en una solución al 2% de glutaraldehído (glutaraldehído ultrapure tem grade 25%) y 3% de formaldehído

(formaldehído ultrapure tem grade 16%) en tampón cacodilato 0.1M pH 7.4, sumergiéndolos durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se deposita cada pieza convenientemente identificada en tampón fosfato salino 0.01M pH 7.4 (PBS), se registraron las muestras convenientemente y se almacenaron en nevera a 4° C hasta su posterior procesamiento para la inclusión. De esta forma ya están dispuestas las muestras para realizar las distintas técnicas.

Los ojos de cada grupo fueron seleccionados al azar para cada experimento.

2. Técnicas a estudio

1.1 Microscopía óptica para estudio de morfología y análisis morfométrico con el programa de ImageScope

1.2 Inmunocitoquímica

2.1 Microscopía óptica para el estudio de morfología y análisis morfométrico

Con esta técnica hemos querido observar las posibles diferencias morfológicas que se pudieran dar entre las muestras de retina de ratón control y ratón IRS2 $-/-$ teñidas con azul de toluidina. A su vez se aprovechó para realizar a todas las muestras, mediciones de los espesores de todas las capas de la retina y su espesor completo.

A continuación se describe el procesamiento de las muestras para posteriormente observarlas a microscopía óptica. Los pasos a seguir fueron:

a) *Inclusión*

b) *Cortes*

c) *Tinción*

d) *Observación la microscopio*

a) Lo primero que hicimos fue la ***inclusión*** de las muestras, siendo el método más común de endurecer el tejido. Seguimos el siguiente procedimiento:

- Para conseguir la deshidratación del tejido se realizaron baños con etanol a concentraciones crecientes. Con Etanol al 70% realizamos 3 baños de 30 minutos a 37°C en un baño de agua, agitando ocasionalmente. Pasamos a concentración mayor de Etanol (100%) realizando 3 baños de 30 minutos, a 37°C en un baño de agua, y agitando ocasionalmente.
 - Posteriormente se transfirió el tejido a un líquido que fuera miscible tanto con el alcohol 100% como con la parafina, para ello utilizamos Xileno. Se realizaron 3 baños de 30 minutos a temperatura ambiente. Agitando ocasionalmente.
 - Se prepararon las muestras en cajitas de plástico o celdillas, depositándolas junto con las muestras con la parafina fundida a 65°C, en el Amershan Life Science Hybridization oven/shaker. Este paso se realiza 3 veces para que el xileno sea sustituido por la parafina.
 - Por último se dejó solidificar a temperatura ambiente y así ya teníamos las muestras incluidas en parafina.
- b) Para estudiar las características tisulares y celulares microscópicas a microscopía óptica debemos tener grosores muy pequeños de tejido por problemas de difusión y penetración de la luz. Para ello el siguiente paso es realizar los *cortes* de las muestras parafinadas a estudio. En nuestro caso utilizamos el *microtomo Microm HM350S* para obtener cortes semifinos (**8µm de grosor**), orientando el ecuador del globo ocular, para evitar así las diferencias en los análisis morfométricos retinianos entre retina periférica y

central (polo posterior). Una vez comienza el corte se obtienen tiras de secciones unidas por el borde inferior. Estas tiras son manipuladas cuidadosamente con unas pinzas y antes de su fijación definitiva en la superficie del portaobjetos, las estiramos para que nuestro tejido quede perfectamente extendido, habiendo por tanto varias secciones en el portaobjetos (Fig. 25 y 26). A continuación para el estiramiento de las muestras y aprovechando la hidrofobicidad de la parafina, los portaobjetos con las tiras de las secciones fueron depositadas sobre agua calentada a unos 35°C - 40°C. Una vez evaporada el agua, las secciones quedaban adheridas al portaobjetos.



Figura 25. Preparación de la muestra



Figura 26. Obtención de los cortes al microtomo

c) El paso último es la **tinción** de las muestras con **azul de toluidina**. Seguimos el siguiente procedimiento:

- Desparafinamos e hidratamos hasta llegar al agua destilada, es decir, invirtiendo el proceso de inclusión en parafina (Fig. 27).

- Teñimos durante 10-15 minutos en solución de azul de toluidina (Fig. 28).
- Lavamos en agua corriente apenas tibia durante 15 minutos.
- Lavado rápido en agua destilada.
- 80% etanol durante 1 o 2 minutos.
- Deshidratamos y aclaramos a través de Etanol 96%, Etanol absoluto y Xileno, mezcla de isómeros con dos cambios de 2 minutos cada uno.
- Por último realizamos el montaje del cubreobjetos con el medio para montajes EUKITT®.



Figura 27. Proceso de desparafinación

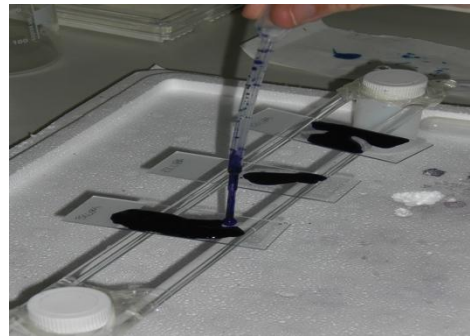


Figura 28. Tinción de las muestras

- d) Examen de las muestras al **microscopio óptico**. En nuestro estudio utilizamos el **modelo Leica DMLB**.

Las muestras fueron visualizadas al microscopio, y realizamos las microfotografías con aumento de 40x y 20x, para una buena visualización de las capas de la retina (Fig. 29).



Figura 29. Proceso de fotografiado de las muestras

Posteriormente, las microfotografías obtenidas tanto de retina control como de IRS2 $-/-$, se utilizaron para realizar los recuentos morfométricos que se llevaron a cabo con el *programa de ImageScope* (Fig. 30), que permitió el análisis morfométrico del espesor de distintas capas de la retina, principalmente:

- Espesor de la capa de fotorreceptores (segmento interno y externo)
- Espesor de la capa nuclear externa
- Espesor de la membrana plexiforme externa
- Espesor de la capa nuclear interna
- Espesor de la membrana plexiforme interna
- Espesor de la capa de células ganglionares
- Espesor global de la retina

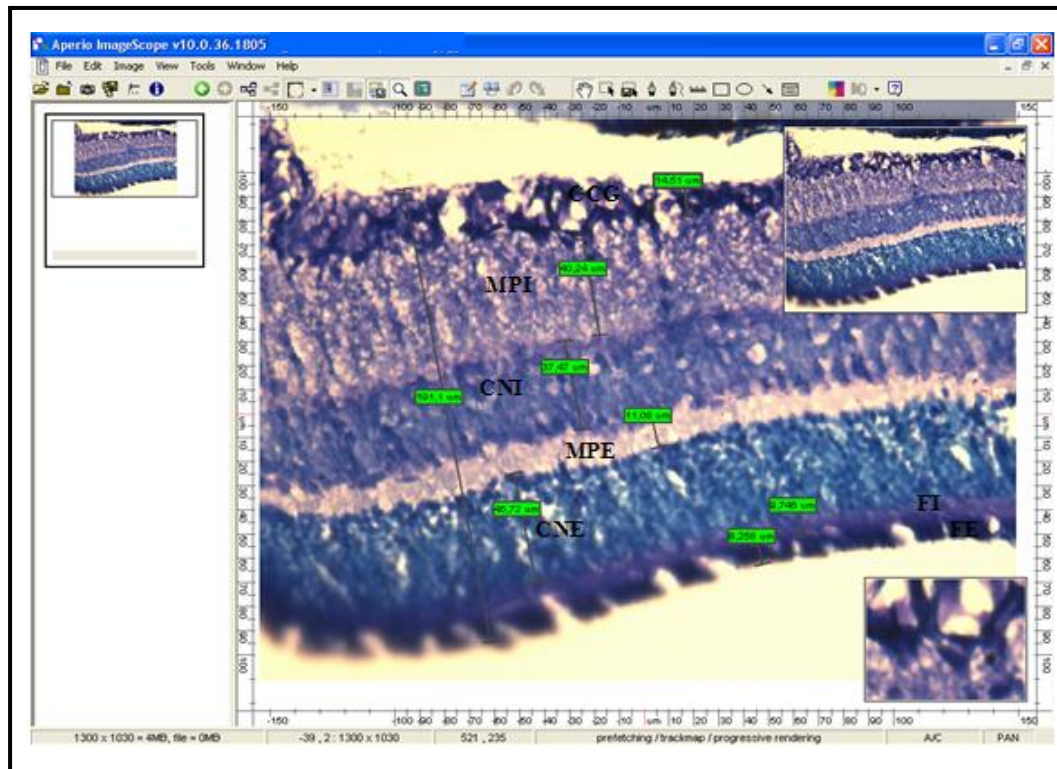


Figura 30. Estudio morfométrico de una muestra de retina de ratón control de la cepa C57BL/6 con el programa de ImageScope.

Los datos de las mediciones de las distintas capas de la retina de las diversas muestras a estudio, fueron archivados en una base de Excel. Posteriormente con la ayuda del programa estadístico SPSS se realizó el análisis estadístico descriptivo de las mediciones, calculando la media y desviación estándar.

2.2 Inmunocitoquímica

Con esta técnica nuestro objetivo es poder caracterizar los distintos componentes celulares de la retina, así como su localización y cambios morfológicos que pudiéramos encontrar con respecto a nuestra muestra control.

Para conseguir la identificación *in situ* de un constituyente del tejido, mediante la reacción antígeno - anticuerpo, Del Brio (1995) nos comenta que se han desarrollado tres metodologías:

1. Localización de antígenos mediante anticuerpos marcados con fluorocromos: ***inmunofluorescencia*** (directa o indirecta). Esta es la técnica que nosotros utilizamos en el estudio.
2. Localización de antígenos mediante *métodos enzimáticos con anticuerpos no marcados*. Los más utilizados son dos técnicas:
 - a) complejo enzima-anti enzima (peroxidasa-antiperoxidasa o fosfatasa alcalina-antifosfatasa alcalina).
 - b) complejo avidina-biotina-enzima.
3. Localización de antígenos usando *metales como marcadores*.

La **técnica de inmunofluorescencia** consiste en conjugar ciertas moléculas fluorescentes con el anticuerpo. Estos anticuerpos en contacto con el tejido se fijan a los antígenos específicos, formando un complejo inmunitario estable observable mediante microscopia de fluorescencia, pone en evidencia los antígenos en virtud del color brillante de los anticuerpos. Como cita Montero (1998), los comienzos en el campo de la inmunofluorescencia se iniciaron a mediados del siglo XX con la gran aportación de Coombs. La primera técnica que se describió fue en 1941 por estos investigadores, tratándose de una *técnica directa* con anticuerpos marcados, que proporciona la detección de estructuras antigénicas por medio de anticuerpos específicos conjugados con un fluoroforo. Más tarde, se describió una variante de

esta técnica con anticuerpos anti-inmunoglobulinas marcadas con fluorocromos, se trataba de una *técnica indirecta*. Muy bien ilustrado el concepto de las dos técnicas por Del Brio (1995) en la figura 31.

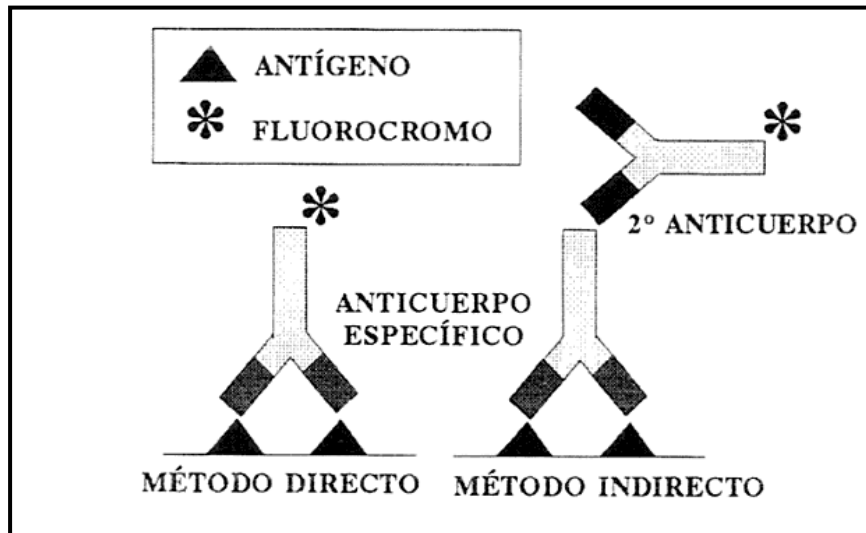


Figura 31. Detección de antígenos mediante anticuerpos marcados con fluorocromo. (Extraído de Del Brio, 1995).

Los compuestos fluorescentes utilizados en estas técnicas, se tratan de moléculas orgánicas relativamente estables, que presentan la propiedad de absorber radiación de corta longitud de onda y después de un corto período de tiempo, emitir una radiación luminosa de mayor longitud de onda que la luz absorbida.

A continuación describiremos la técnica de *inmunofluorescencia indirecta* utilizada en nuestro estudio. Se fueron siguiendo los siguientes pasos:

- a) Fijación
- b) Cortes por congelación
- c) Preparación de los tejidos

- d) Aplicación de anticuerpo primario
- e) Aplicación de anticuerpo secundario
- f) Microscopía

a) Fijación

Los ojos obtenidos de los animales sacrificados se fijaron por inmersión en paraformaldehído al 4% en PBS 0,1M, pH 7,4 durante dos horas. Para preparar 200 ml de paraformaldehído al 4%:

- Disolvemos 8 g de paraformaldehído en 50 ml de agua destilada, calentada previamente a 60°C, con agitación. Añadir si es necesario, 1 ó 2 gotas de NaOH al 2'5% para su total disolución.
- Filtramos y completamos hasta 100 ml con agua destilada y dejamos enfriar.
- Añadimos 100 ml de PBS: 0,2 M, Ph 7,4.

Tras la fijación, las retinas fueron cuidadosamente disecadas y las piezas fueron sumergidas en una solución crioprotectora tamponada (30% en glucosa tamponada fosfato). Congelamos las muestras en nitrógeno líquido y almacenadas a -70° C hasta su uso posterior.

b) Cortes por congelación

Seleccionamos este tipo de corte que nos permite analizar los preparados a microscopía óptica, utilizando el *criostato Leica CM 3050* (Fig. 32) y siguiendo los siguientes pasos:

1. Temperatura del criostato aproximadamente a -20°C .
2. Colocación del bloque de la pieza sobre el portabloques pegándolo a este mediante una gota de Tissue-Tek, que al congelarse mantiene una adherencia estable.
3. Grosor de corte en nuestro caso: **20 μm** y colocación de las muestras en portaobjetos.
4. Proceso de secado durante 1 hora a temperatura ambiente.



Figura 32. Criostato Leica CM 3050.

c) Preparación de los tejidos

A continuación se sumergen en tampón fosfato 0,01 M (PBS, pH 7,4), repetimos el procedimiento tres veces durante 5 minutos. Y posteriormente las muestras fueron incubadas en solución de bloqueo de suero de burro al 10%, en una cámara húmeda a 37° C durante una hora. A continuación se lavaron las muestras con PBS pH 7,2 (3 baños de 5 minutos cada uno).

d) Aplicación de anticuerpo primario

El anticuerpo (AC) primario fue diluido con PBS 0,1M y fuimos vertiendo sobre cada sección una gota de AC primario y Triton X-100 al 0,5% (extrae proteínas de membrana, facilitando así el acceso de los anticuerpos) (Fig. 33). La incubación se realizó durante toda la noche en una caja húmeda para evitar la desecación de los cortes, manteniéndose en nevera a 4° C.

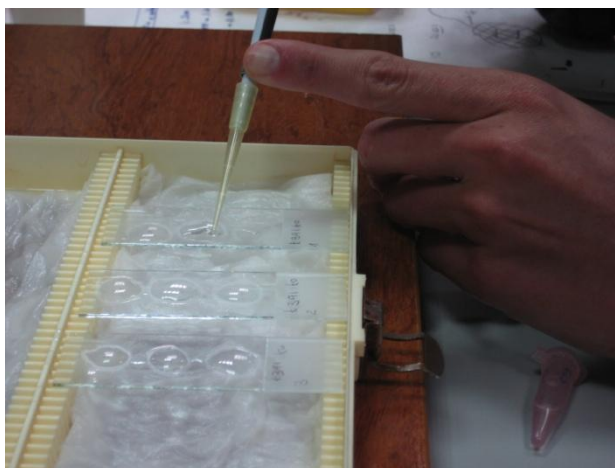


Figura. 33. Colocación del AC primario en las muestras.

Las secciones fueron incubadas con los siguientes ACs primarios (hablamos de *anticuerpo monoclonal* cuando se enlazan a un solo determinante antigénico, y de *anticuerpo policlonal* cuando van dirigidos a diferentes determinantes antigénicos de un mismo antígeno):

- Anticuerpo policlonal de conejo dirigido contra **cone-arrestin** (Chemicon; Temecula, CA dilución 1:10000), para detectar CONOS.
- Anticuerpo monoclonal de ratón dirigido contra **proteína glial fibrilar ácida (GFAP** - Sigma-Aldrich, St. Louis, MO; dilución 1:500), para detectar FILAMENTOS INTERMEDIOS GLIALES.
- Anticuerpo policlonal de conejo contra **Iba-1** (Wako, Neuss, Germany; dilución 1:500), para detectar MICROGLIA.
- Anticuerpo policlonal de conejo **protein kinase C alpha (PKC α** - Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA; dilución 1:500), para detectar células BIPOLARES de los BASTONES.
- Anticuerpo policlonal de conejo contra **synaptophysin** (Dako, Carpinteria, CA; dilución 1:200), para detectar PROCESOS PRESINÁPTICOS NEURONALES.
- Anticuerpo monoclonal de ratón contra **rhodopsin** (clone 4D2, Chemicon; dilución 1:500), para detectar los SEGMENTOS EXTERNOS de los BASTONES.

- Anticuerpo policlonal de cabra contra **short-wavelength opsin** (Santa Cruz; dilución 1:500), para detectar CONOS SENSIBLES DE ONDA CORTA.
- Anticuerpo policlonal de conejo contra **medium/long-wavelength opsin** (Chemicon; dilución 1:500), para detectar CONOS SENSIBLES DE ONDA MEDIA/LARGA.
- Anticuerpo monoclonal de ratón contra **bassoon** (Enzo; dilución 1:400 Farmingdale, NY), para detectar CINTILLAS SINÁPTICAS.
- Anticuerpo policlonal de cabra contra **calretinin** (Chemicon; dilución 1:1000), para detectar células AMACRINAS y GANGLIONARES.
- Anticuerpo policlonal de conejo contra **calbindin** (Chemicon; dilución 1:500), para detectar células HORIZONTALES.
- Anticuerpo policlonal de conejo contra **light neurofilament** (70 KDa, NF-L - Abcam; dilución 1:100), para detectar CÉLULAS GANGLIONARES.

e) Aplicación de anticuerpo secundario

Tras la incubación con el primer AC, lavamos las secciones con PBS (3 baños de 10 minutos cada uno). Posteriormente secamos alrededor de las secciones usando papel de filtro y procedemos a incubar el segundo

anticuerpo conjugado a un fluorocromo durante 2 horas a temperatura ambiente (Fig. 34). Como consideración, este anticuerpo será un anti Inmunoglobulina G (IgG) capaz de reconocer a la Ig G del animal donante del anticuerpo primario; además debe obtenerse de una especie de animal diferente a la utilizada para obtener el anticuerpo primario. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron:

- Anticuerpo secundario inmunofluorescente burro anti-conejo IgG asociado a carboxymethylindocyanine (Cy3) (Jackson Immuno Laboratories, West Grove, PA; dilución 1:500).
- Anticuerpo secundario inmunofluorescente DyLight 488 burro anti-ratón IgG (Jackson Immuno Laboratories; dilución 1:300).

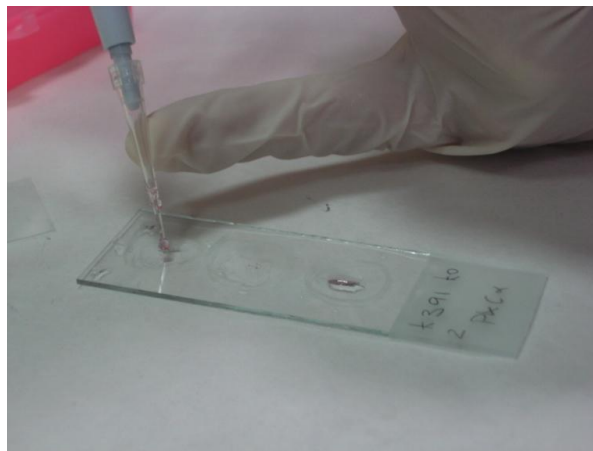


Figura 34. Colocación de anticuerpo secundario.

Las secciones posteriormente fueron aclaradas con PBS durante 15 minutos y cubiertas con medio de montaje Vectashield (Vector Labs, Burlingame, CA) para prolongar la vida media del fluorocromo y con 100

nM 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Sigma-Aldrich), se trata de un fluorocromógeno que se une fuertemente a las regiones ricas en bases nitrogenadas adenina y timina del ADN, por tanto marcando núcleos celulares.

Como aclaración, todo lo descrito anteriormente es para el procesamiento de secciones de la retina. Pero hay que señalar que en nuestro estudio también llevamos a cabo el procesamiento de pequeños trozos de tejido (conocido como *whole-mount*), que a diferencia de las secciones, estas muestras son mucho más grandes y más gruesas sobre el portaobjetos. Por lo tanto, las incubaciones de los anticuerpos tuvieron que ser más largas para permitir la permeabilización de la muestra. Para la incubación del anticuerpo primario, se llevó a cabo durante 4 días y la incubación del anticuerpo secundario durante 3 días.

En una serie de experimentos se procedió a un marcaje simultáneo de dos moléculas, lo que se conoce como **técnicas de doble-marcaje**. Las secciones fueron incubadas toda la noche a 4°C con el anticuerpo diluido en 0.5% Triton X-100 y en PBS mezclando:

- anticuerpo monoclonal de ratón contra **Goα** (Chemicon; dilution 1:500) para detectar células BIPOLARES ON y anticuerpo contra **cone-arrestin, synaptophysin o PKCα**.
- anticuerpo policlonal de conejo contra **neuronal NOS** (nNOS - Sigma, dilution 1:10000) con anticuerpo policlonal de cabra **choline**

acetyltransferase (ChAT - Sigma, dilution 1:300), para detectar
CÉLULAS AMACRINAS.

Podemos ver resumidos los anticuerpos utilizados en la tabla 3.

Anticuerpos empleados

Anticuerpo	Fuente	Dilución	Detección
Conejo anti-cone-arrestin	Chemicon, Temecula, CA	1:10000	Conos
Cabra anti- short wavelength opsin	Santa Cruz	1:500	Conos
Conejo anti- medium/longh wavelength opsin	Chemicon	1:500	Conos
Ratón anti- rhodopsin	Chemicon	1:500	Bastones
Conejo anti- PKC α	Santa Cruz Biotechnology	1:500	Bipolares de bastones
Ratón anti- Bassoon	Enzo, Farmingdale, NY	1:400	Cintilla sináptica
Conejo anti-synaptophysin	Dako, Carpinteria, CA	1:200	OPL y IPL
Ratón anti- GFAP	Sigma-Aldrich, St Louis	1:500	Astroцитos y Müller
Conejo anti- Iba-1	Wako, Neuss, Germany	1:500	Microglía
Cabra anti-calretinin	Chemicon	1:1000	Amacrinas A2 y ganglionares
Cabra anti- ChAT	Sigma	1:300	Amacrinas
Conejo anti- nNOS	Sigma	1: 10000	Amacrinas
Conejo anti-calbindin	Chemicon	1:500	céls horizontals
Conejo anti- neurofilament	NFL-Abcam	1:100	ganglionares

Tabla 3. Resumen de los anticuerpos utilizados.

Posteriormente las secciones fueron aclaradas con PBS (3 baños de 10 minutos cada uno) y posteriormente se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado:

- Anticuerpo secundario inmunofluorescente DyLight 488 burro anti-ratón IgG (Jackson Immuno Laboratories; dilución 1:300).
- Anticuerpo secundario inmunofluorescente burro anti-conejo IgG asociado a carboxymethylindocyanine (Cy3) (Jackson Immuno Laboratories, West Grove, PA; dilución 1:500).

f) Microscopía

Las imágenes fueron analizadas mediante un *microscopio confocal Leica TCS SP2* (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) (Fig. 35 y 36).

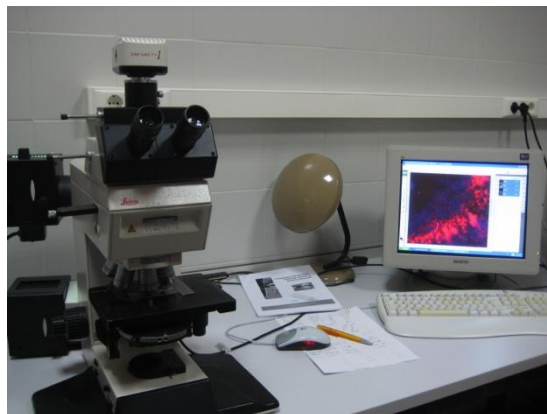


Figura 35. Microscopio confocal *Leica TCS SP2*.

Los fluorocromos DyLight 488 y Cy3 fueron excitados usando una línea de emisión de láser Argón de 488nm y una línea de emisión de Helio-Neón de 543nm respectivamente. Para la detección de DAPI se utilizó una línea de láser diodo de 405nm. El brillo y el contraste de las imágenes fueron ajustadas usando el software Adobe Photoshop CS4 (Adobe Systems, Mountain View, CA).



Figura 36. Observación de las imágenes a microscopia confocal.

2.3 Estudio de la densidad de terminales presinápticos de fotorreceptores en la MPE y de terminales de las células bipolares de los bastones en la MPI.

Para el estudio de la densidad sináptica en estas dos capas retinianas (MPE y MPI) se realizó el análisis morfológico y morfométrico sobre las microfotografías obtenidas, cuyas imágenes fueron realizadas a alta resolución en microscopio confocal. La técnica fue:

- Recuento de los puntos bassoon positivos en la MPE para analizar la densidad sináptica de los fotorreceptores sobre un área constante de cada microfotografía escogida al azar de entre las de una misma ampliación.
- Recuentos de los terminales PKC α positivos para analizar la densidad de los terminales de las células bipolares de los bastones sobre un área constante de las microfotografías escogidas al azar entre aquellas que tuvieran la misma ampliación.

El análisis de la densidad se realizó mediante el software imageJ, en un total de 5 secciones transversales no consecutivas realizadas a través de la cabeza del nervio óptico (n=4 independiente del tejido retiniano). Los datos de densidad obtenidos fueron finalmente normalizados a 100µm de longitud retiniana.

3. Análisis estadístico

Los datos de las distintas mediciones fueron archivados en una base de Excel. Posteriormente con la ayuda del programa estadístico SPSS se realizó el análisis estadístico descriptivo de las mediciones, calculando la media y desviación estándar y el análisis de la t-Student para analizar las diferencias de los dos grupos. Una diferencia entre la media de las diferentes condiciones experimentales se consideró significativa a $p < 0.05$.

IV. Resultados

Con el material y la metodología expuestos en el capítulo correspondiente, obtuvimos las partes de la retina que necesitábamos para nuestro estudio y así poder llegar a los siguientes resultados:

1. Estudio morfométrico de la retina

2. Estudio morfológico de la retina

- 2.1 Capa de los fotorreceptores (segmentos externos e internos)

- 2.1.1 Fotorreceptores bastones

- 2.1.2 Fotorreceptores conos

- 2.2 Membrana plexiforme externa (MPE)

- 2.2.1 Procesos presinápticos (fotorreceptores)

- 2.2.2 Procesos postsinápticos (células bipolares y horizontales)

- 2.2.2.1 Células bipolares

- 2.2.2.2 Células horizontales

- 2.3 Membrana plexiforme interna (MPI)

- 2.4 Capa de células ganglionares (CCG)

- 2.5 Células gliales

1. Estudio morfométrico de la retina

La primera parte del estudio se centró en la medición del espesor total de la sección transversal de la retina, así como de las distintas capas de la misma tanto de los ratones control como de los ratones KO, por medio del procesamiento manual y la ayuda del programa ImageScope. Los datos que se recogieron de las distintas muestras de los dos grupos de ratones se muestran en las tablas 4 y 5 respectivamente.

Durante el procesado de las muestras para su preparación previa a la observación al microscopio, algunas muestras fueron alteradas por la manipulación.

Se analizaron 53 microfotografías de la sección transversal de la retina de cada grupo a estudio, bajo la observación a microscopía de las distintas muestras, tanto a 20 aumentos (20x) como a 40 aumentos (40x).

Todos los datos anteriores fueron procesados por el programa informático SPSS 15.0 para el análisis estadístico descriptivo de las mediciones.

Los resultados obtenidos en los **ratones control** fueron los siguientes:

- La media \pm desviación típica del **espesor de la capa de fotorreceptores** fue de $26,34 \pm 3,08\mu\text{m}$, comprendiendo los valores entre un mínimo de 18,94 μm y un máximo de 32,84 μm .
- La media \pm desviación típica del **espesor de la capa nuclear externa** fue de $40,58 \pm 4,53 \mu\text{m}$, comprendiendo los valores entre un mínimo de 29,94 μm y un máximo de 49,63 μm .

- La media \pm desviación típica del espesor de la **membrana plexiforme externa** fue de $10,28 \pm 1,39 \mu\text{m}$, comprendiendo los valores entre un mínimo de $7,21 \mu\text{m}$ y un máximo de $12,72 \mu\text{m}$.
- La media \pm desviación típica del espesor de la **capa nuclear interna** fue de $32,81 \pm 4,37 \mu\text{m}$, comprendiendo los valores entre un mínimo de $23,88 \mu\text{m}$ y un máximo de $40,88 \mu\text{m}$.
- La media \pm desviación típica del espesor de la **membrana plexiforme interna** fue de $40,27 \pm 2,90 \mu\text{m}$, comprendiendo los valores entre un mínimo de $33,5\mu\text{m}$ y un máximo de $49,13\mu\text{m}$.
- La media \pm desviación típica del espesor la **capa de células ganglionares** fue de $15,35 \pm 3,26 \mu\text{m}$, comprendiendo los valores entre un mínimo de $7,65 \mu\text{m}$ y un máximo de $23,9 \mu\text{m}$.
- La media \pm desviación típica del **espesor de la retina** fue de $174,32 \pm 12,80 \mu\text{m}$, comprendiendo los valores entre un mínimo de $150,15 \mu\text{m}$ y un máximo de $201,43\mu\text{m}$.

Los resultados obtenidos en los **ratones KO** fueron los siguientes:

- La media \pm desviación típica del **espesor de la capa de fotorreceptores** fue de $10,84 \pm 2,23 \mu\text{m}$, comprendiendo los valores entre un mínimo de $6,17 \mu\text{m}$ y un máximo de $15,67 \mu\text{m}$.
- La media \pm desviación típica del **espesor de la capa nuclear externa** fue de $22,11 \pm 2,79 \mu\text{m}$, comprendiendo los valores entre un mínimo de $14,31 \mu\text{m}$ y un máximo de $26,74 \mu\text{m}$.

- La media \pm desviación típica del espesor de la **membrana plexiforme externa** fue de $5,90 \pm 0,96 \mu\text{m}$, comprendiendo los valores entre un mínimo de $4,13 \mu\text{m}$ y un máximo de $7,87 \mu\text{m}$.
- La media \pm desviación típica del espesor de la **capa nuclear interna** fue de $14,66 \pm 3,00 \mu\text{m}$, comprendiendo los valores entre un mínimo de $9,25 \mu\text{m}$ y un máximo de $21,33 \mu\text{m}$.
- La media \pm desviación típica del espesor de la **membrana plexiforme interna** fue de $15,99 \pm 5,35 \mu\text{m}$, comprendiendo los valores entre un mínimo de $7,54 \mu\text{m}$ y un máximo de $25,73 \mu\text{m}$.
- La media \pm desviación típica del espesor la **capa de células ganglionares** fue de $5,69 \pm 1,50 \mu\text{m}$, comprendiendo los valores entre un mínimo de $3,41 \mu\text{m}$ y un máximo de $9,69 \mu\text{m}$.
- La media \pm desviación típica del **espesor de la retina** fue de $76,83 \pm 12,72 \mu\text{m}$, comprendiendo los valores entre un mínimo de $57,88 \mu\text{m}$ y un máximo de $98,01 \mu\text{m}$.

RATÓN CONTROL

ESTADÍSTICO DESCRIPTIVO					
Espesor	N	Mínimo (µm)	Máximo (µm)	Media (µm)	Desviación típica (µm)
Fotorreceptores	49	18,94	32,84	26,34	3,08
Capa nuclear externa	53	29,94	49,63	40,58	4,53
Membrana plexiforme externa	53	7,21	12,72	10,28	1,39
Capa nuclear interna	53	23,88	40,88	32,81	4,37
Membrana plexiforme interna	53	33,5	49,13	40,27	2,90
Capa células ganglionares	52	7,65	23,9	15,35	3,26
Total de la retina	48	150,15	201,43	174,32	12,80

Tabla 4. Datos estadísticos de las muestras de retina del ratón control.

RATÓN KNOCK OUT

ESTADÍSTICO DESCRIPTIVO					
Espesor	N	Mínimo (µm)	Máximo (µm)	Media (µm)	Desviación típica (µm)
Fotorreceptores	53	6,17	15,67	10,84	2,23
Capa nuclear externa	53	14,31	26,74	22,11	2,79
Membrana plexiforme externa	53	4,13	7,87	5,90	0,96
Capa nuclear interna	53	9,25	21,33	14,66	3,00
Membrana plexiforme interna	53	7,54	25,73	15,99	5,35
Capa células ganglionares	52	3,41	9,69	5,69	1,50
Total de la retina	52	57,88	98,01	76,83	12,72

Tabla 5. Datos estadísticos de las muestras de retina del ratón Knock out.

Como observamos en el gráfico 1, se observaron diferencias estadísticas para los espesores de las distintas capas entre el grupo control y el grupo KO ($p < 0.001$ t-Student para muestras independientes), destacando una diferencia generalizada de la media de los espesores en todas las capas de la retina entre los dos grupos, afectando por tanto, al espesor total. Hay una disminución marcada de los espesores en las retinas de los ratones *IRS2*^{-/-} (CCF 20%; CNE 45%; MPE 20%; CNI 60%; MPI 65%; GCL 70%; $p < 0,001$). Esto se reflejó en un importante adelgazamiento retiniano total del 60% ($p < 0,001$).

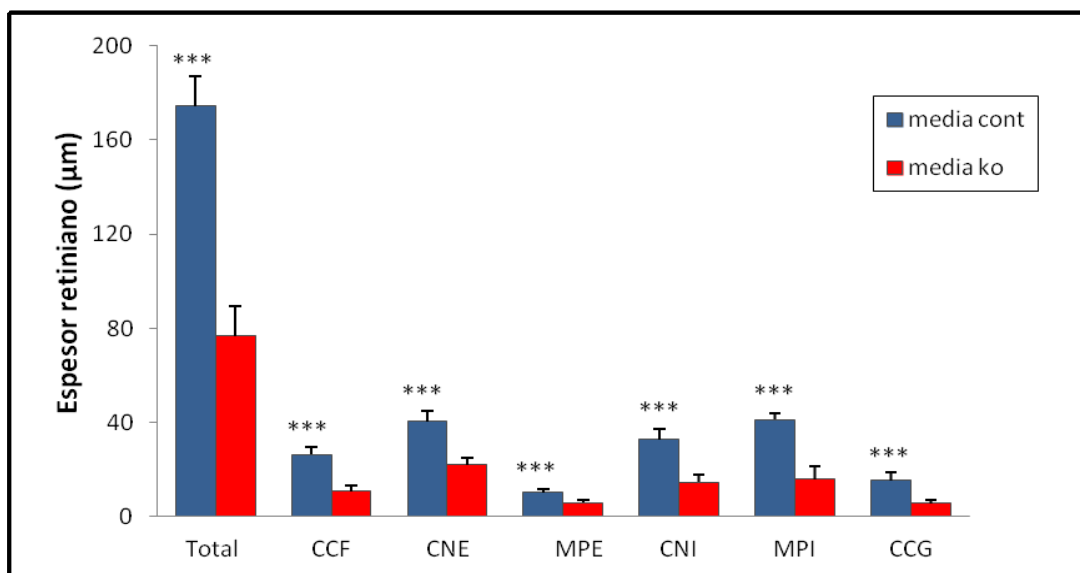


Gráfico 1. Media del espesor de las capas de la retina en el grupo control y grupo KO (***) $p < 0,001$).

2. Estudio morfológico de la retina

El estudio morfológico de las distintas capas de la retina se llevó a cabo con la tinción de antígenos celulares específicos. Se exponen los resultados por capas desde la región externa a la interna de la retina.

2.1 Capa de los fotorreceptores (segmentos externos e internos)

Utilizamos anticuerpos específicos contra los dos tipos de fotorreceptores: *bastones* y *conos*.

2.1.1 Fotorreceptores bastones: para la detección de bastones empleamos *anticuerpo contra rodopsina*, se trata de una proteína de transmembrana que como comentamos en la introducción, está implicada en la cascada de transducción de la visión.

Las imágenes de la figura 37 representan la localización de rodopsina detectado mediante inmunohistoquímica de fluorescencia.

Podemos observar que en las retinas control se muestra una inmunorreactividad normal de rodopsina en los segmentos externos de los bastones (SEB), sin hallarse expresión en el interior de otros componentes celulares (Fig. 37A).

En cambio en los ratones *IRS2-/-*, observamos una banda más estrecha en la parte más periférica de los segmentos externos de los bastones (Fig. 37B, puntas de flecha). Parece ser que cualquier disminución significativa en la tasa de rodopsina en el segmento externo conduce a

una redistribución de la rodopsina en el segmento interno. Además, llama la atención encontrar rodopsina en la membrana plasmática de los bastones en la capa nuclear externa (Fig. 37C, doble punta de flecha).

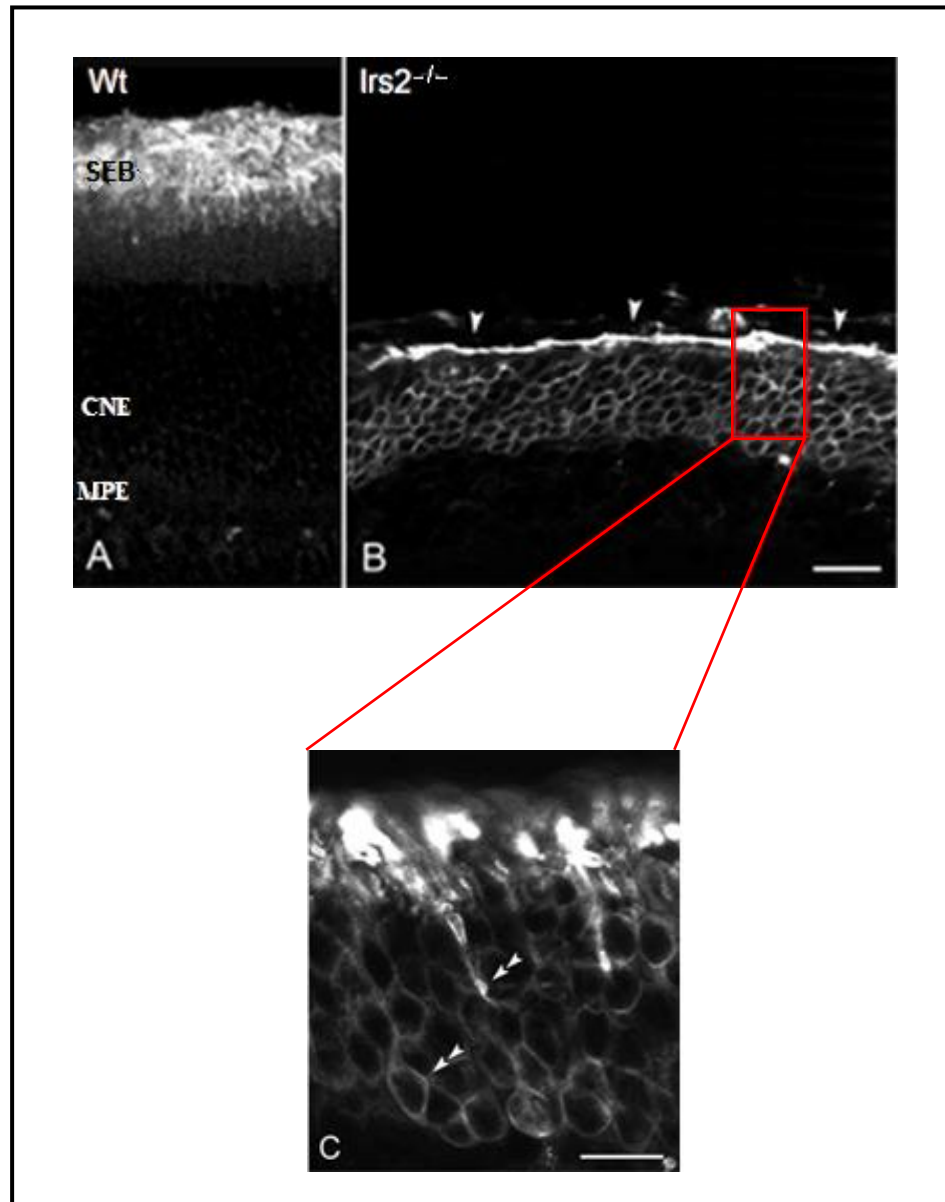


Figura 37. Microfotografías confocales de secciones transversales de 20 μm de grosor de retinas de ratón control (A) y ratón *IRS2*^{-/-} (B-C). La barra indica 20 μm en la imagen B y 10 μm en la imagen C.

2.1.2 Fotorreceptores conos: para la detección de los conos fue utilizado anticuerpo contra *cone-arrestin*.

En la retina de los ratones *IRS2*^{-/-} (Fig. 38B,C) podemos observar alteraciones en la morfología de los conos, con una marcada reducción de la longitud total (flecha) así como un colapso de los segmentos externos e internos (flecha vacía). Asimismo, se aprecia una disminución del número de conos.

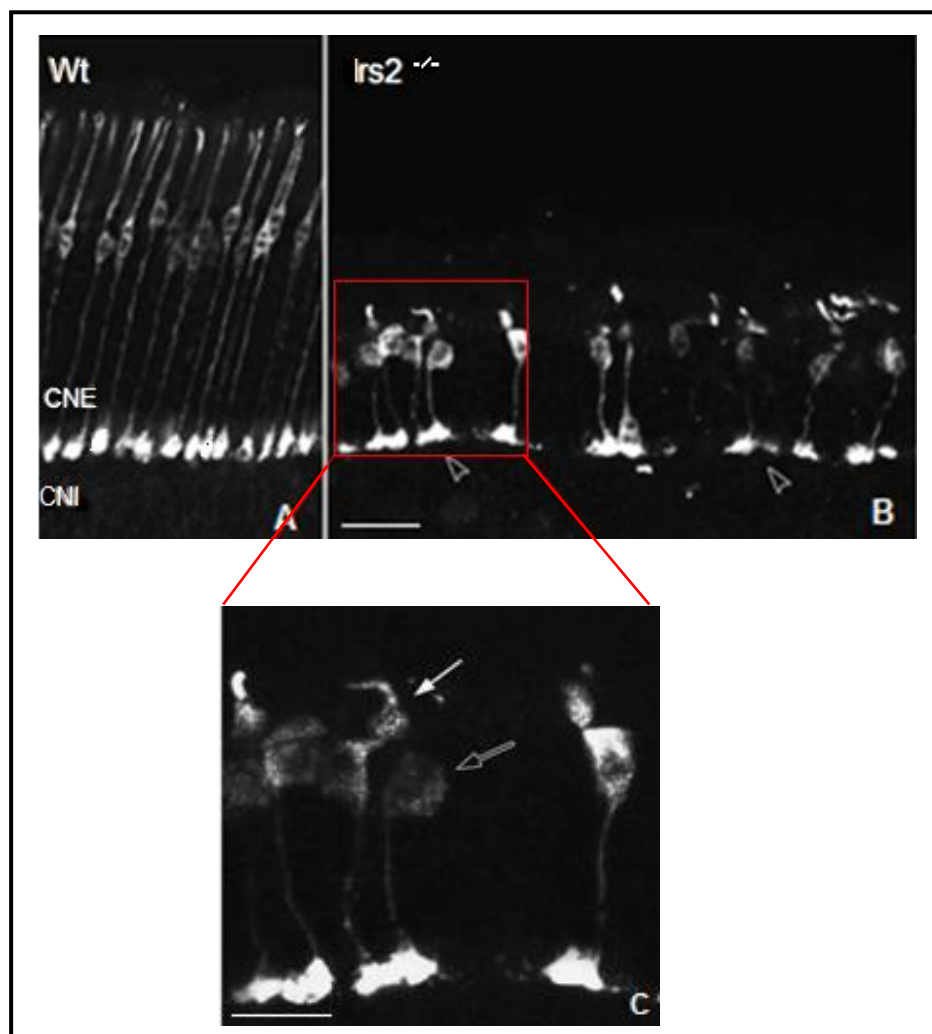


Figura 38. Microfotografías confocales de secciones transversales de 20 μm de grosor de retinas de ratón control (A) y ratón *IRS2*^{-/-} (B-C). Inmunomarcaje de conos con cone-arrestin. La barra indica 20 μm en imagen B y 10 μm en imagen C.

A pesar de la desestructuración que se observa en la imagen, los pedículos de los conos se mantienen alineados hacia la membrana plexiforme externa (Fig. 38B, cabeza de flecha vacía).

En cuanto a la distribución de la opsina en los segmentos de los fotorreceptores (SF), también comprobamos que estaba afectada en la retina de los ratones *IRS2*^{-/-} (Fig.39C, D).

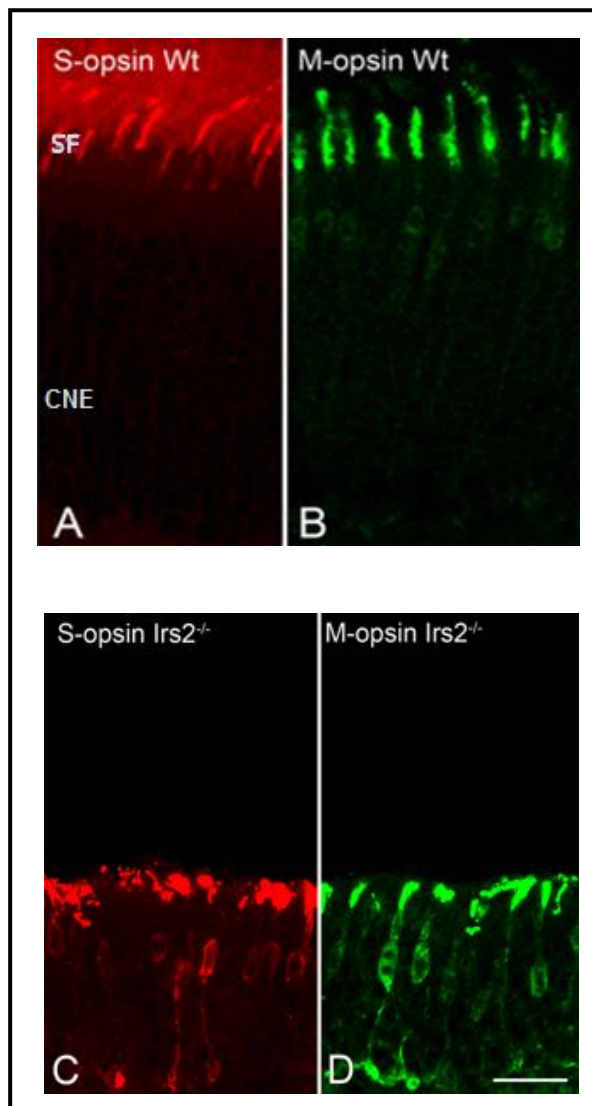


Figura 39. Microfotografías confocales de secciones transversales de 20 µm de grosor procesadas con S-opsin (A,C) y M/L-opsin (B,D) en retinas de ratón control (A-B) y ratón *IRS2*^{-/-} (C-D). La barra indica 20µm.

Observamos que su distribución a través de la membrana plasmática en los dos tipos de conos: **conos S** (del inglés short wavelength), **conos M/L** (del inglés medium/long wavelength), estaba alterada, presentando una redistribución anormal de la opsinina de los conos en el soma celular del fotorreceptor como se observa en la figura 39.

Analizamos también la disposición espacial de los conos mediante *preparaciones whole-mount*. Se tratan de microfotografías tomadas de la retina de media periferia (Fig. 40 A-C).

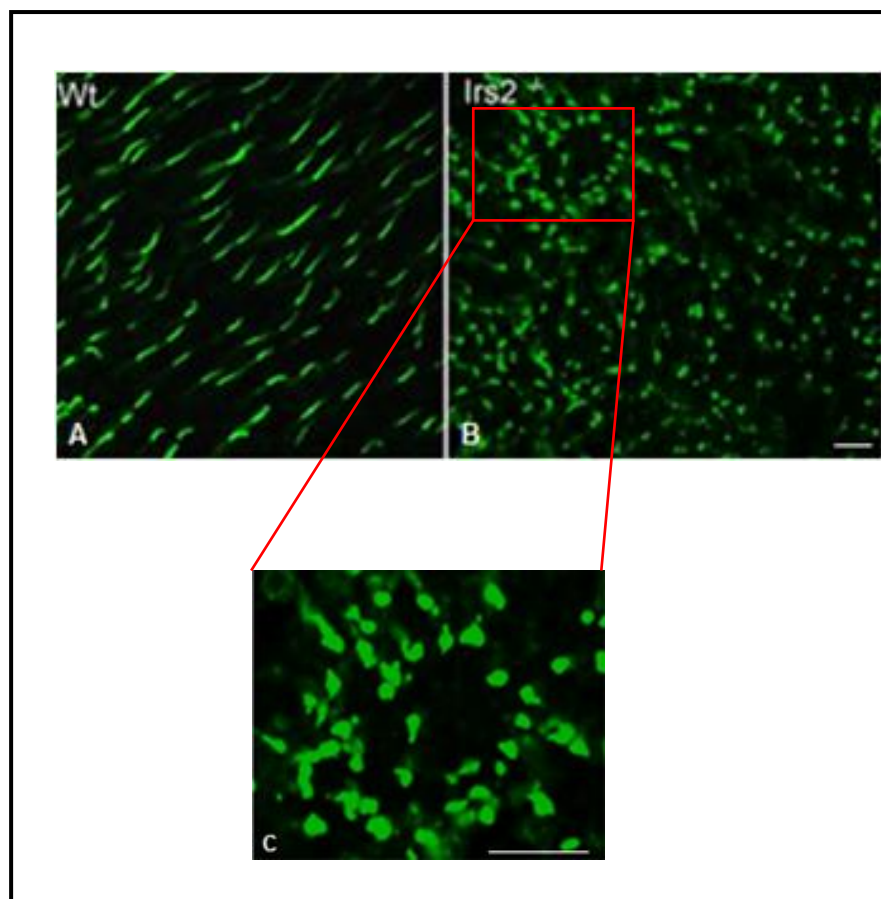


Figura 40. Microfotografías tomadas de retinas whole mount de ratón control (A) y ratón *IRS2*^{-/-} (B-C). Inmunomarcaje de conos con cone-arrestin. La barra indica 20µm en imagen B y 10 µm en imagen C.

Llama la atención la distribución regular que hay en la retina de los ratones control en contraste con los ratones *IRS2* $-/-$ que muestran áreas focales de distribución desorganizada. El análisis detallado de tales áreas se mostró con morfología anormal del cono con segmentos atróficos y desorganizados (Fig. 40 C).

2.2 Membrana plexiforme externa (MPE)

Con la pérdida parcial y la desestructuración de la capa de fotorreceptores que hemos observado, nos decidimos a estudiar la MPE por si hubiera afectación.

Si recordamos, la MPE la constituyen la sinapsis entre los fotorreceptores (presinapsis) y las células bipolares y horizontales (postsinapsis). De ahí que sea interesante investigar los elementos sinápticos que se hallen en esta capa.

2.2.1 Membrana plexiforme externa: procesos presinápticos (fotorreceptores). En primer lugar analizaremos los elementos presinápticos de esta capa, es decir, de los fotorreceptores.

Ya sabemos que los bastones y los conos hacen sinapsis con otras células mediante el terminal sináptico, en el caso de los bastones tiene morfología redondeada y se le denomina *esférula* y en los conos forma triangular y se le denomina *pedículo*. Los fotorreceptores como ya explicamos en la introducción, además de realizar la fototransducción, se comportan como neuronas, liberando neurotransmisores (*glutamato*) en su terminal axónico. Para ello utilizan un tipo especial de sinapsis

química denominado **sinapsis en cinta**. En el terminal presináptico de dichas sinapsis se encuentra una estructura proteica denominada **cintilla sináptica**, alrededor de las cuales se localizan las vesículas sinápticas cargadas de neurotransmisores.

Pues bien, para poder revelar estos elementos presinápticos de los fotorreceptores, debemos utilizar anticuerpos contra proteínas presentes en estos terminales. En este caso, utilizamos la **sinaptofisina** para caracterizar el terminal presináptico (Fig. 41A-C).

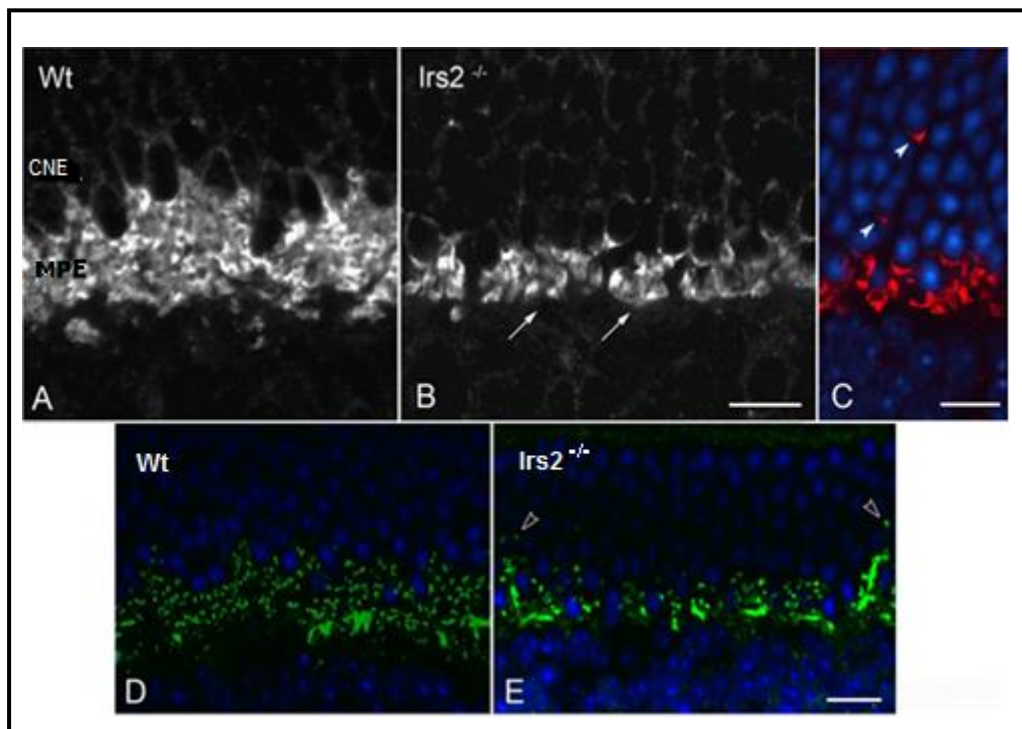


Figura 41. Microfotografías confocales de secciones transversales de 20 μm de grosor de retinas de ratón control (A, D) y ratón *IRS2*^{-/-} (B, C, E) procesadas con sinaptofisina (A-C) y bassoon (D-E). La barra indica 10 μm .

En la retina control (Fig. 41A) se muestra una disposición normal de las terminaciones sinápticas de bastones y conos en la MPE, formando una capa compacta. En cambio, en la retina *IRS2* ^{-/-} se muestra una marcada reducción de los procesos presinápticos en la MPE (Fig. 41B, flechas). Además podemos observar algunos de estos procesos presinápticos localizados ectópicamente en la CNE (Fig. 41C, puntas de flecha). Estos resultados fueron confirmados con inmunomarcaje con **bassoon** (Fig. 41 D-E).

Se determinó **la densidad arciforme de los terminales sinápticos** de los **fotorreceptores** de los ratones control y de los ratones *IRS2* ^{-/-} mediante el conteo de puntos positivos para el inmunomarcaje de la proteína bassoon (Fig. 41D-E), utilizado como marcador de densidad arciforme de la cintilla sináptica.

En la tabla 6 vemos reflejados los datos estadísticos.

Haciendo un análisis comparativo cuantitativo con los ratones control, observamos que el número de puntos positivos de bassoon en la retina externa de **ratones *IRS2* ^{-/-} estaba significativamente disminuido en un 35%** (Test de la T de Student *** $p < 0.001$) (gráfico 2).

Ratones	N	Mínimo (puntos+/100µm)	Máximo (puntos+/100µm)	Media (µm)	Desviación típica (µm)
Control	15	138,73	169,15	151,93	9,41
IRS2 -/-	21	80	121,45	99,89	13,09

Tabla 6. Datos estadísticos de la densidad de los terminales sinápticos de los fotorreceptores en los dos grupos de ratones.

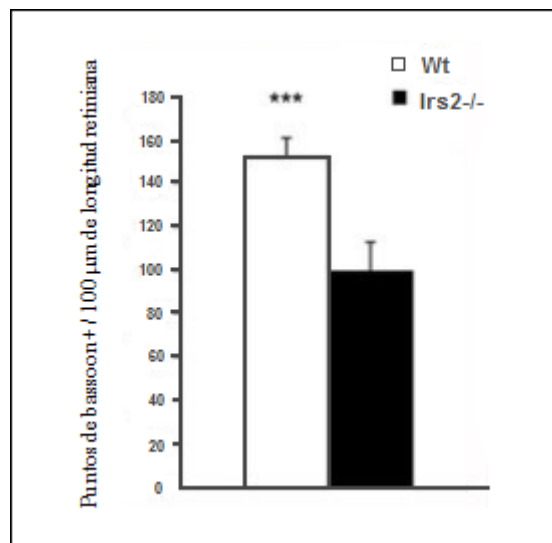


Gráfico 2. Recuento de puntos bassoon positivos cada 100µm de longitud retiniana. Los datos se muestran con el valor medio y la desviación estándar de la media. *Test de la T de Student* ***p<0.001.

2.2.3 Membrana plexiforme externa: procesos *postsinápticos* (células bipolares y horizontales)

2.2.3.1 Células bipolares

Como ya se comentó en la introducción, existen básicamente dos tipos de células bipolares:

- a) las que comunican con bastones
- b) las que comunican con conos.

Vamos a analizarlas por separado.

a) Bastones- células bipolares

Utilizamos **anticuerpos dirigidos contra PKC α** para estudiar a las células bipolares de los bastones. Observamos en la figura 42A que la retina del ratón control con inmunomarcaje PKC α presenta una disposición normal de las células bipolares de bastones, los cuales proyectan procesos dendríticos densos hacia la MPE y sus cuerpos celulares residen en la CNI. En cambio, en la retina del ratón *IRS2* $-/-$ las células bipolares de los bastones exhiben un menor complejo dendrítico ramificado debido a la retracción y falta de procesos dendríticos (Fig. 42B). Así como algunas células bipolares de bastones muestran “*sprouting*” (ramificación, brote) dendrítico hacia la CNE, apoyando con estos hallazgos la existencia de remodelación de las conexiones de los bastones (Fig. 42C).

b) Conos- células bipolares

Habría que determinar si el sprouting también afecta a las células bipolares de conos. Para ello hacemos una **inmunotinción con anticuerpo contra Go α** , que se trata de un marcador de *células bipolares ON*.

El glutamato, como se ha descrito en la introducción es el principal neurotransmisor excitatorio retiniano, parece ser el causante del cierre de estos canales, pues activará un segundo mensajero que haría disminuir los niveles de GMPC. Las células bipolares tendrían un receptor de glutamato específico, que al igual que la rodopsina activaría una proteína G, que a su vez activaría a la fosfodiesterasa de GMPC que produciría su degradación. La proteína G sigue sin ser identificada, pero la subunidad alfa de Go (Go α) ha sido sugerido como candidato porque está presente tanto en las células bipolares de los bastones como en células bipolares ON de conos.

Las figuras 42D-F muestran doble tinción de *Go α* , con *cone-arrestin* o *sinaptofisina*). Las imágenes A-C procesadas con PKC α para revelar células bipolares de bastones. Las imágenes D-F fueron procesadas con arrestin (conos) y Go α (células bipolares ON y bipolares de bastones) en retina control (D) e IRS2-/- (E-F). En las últimas imágenes (G-I) doble marcaje con PKC α y Go α en retina IRS2 -/-.

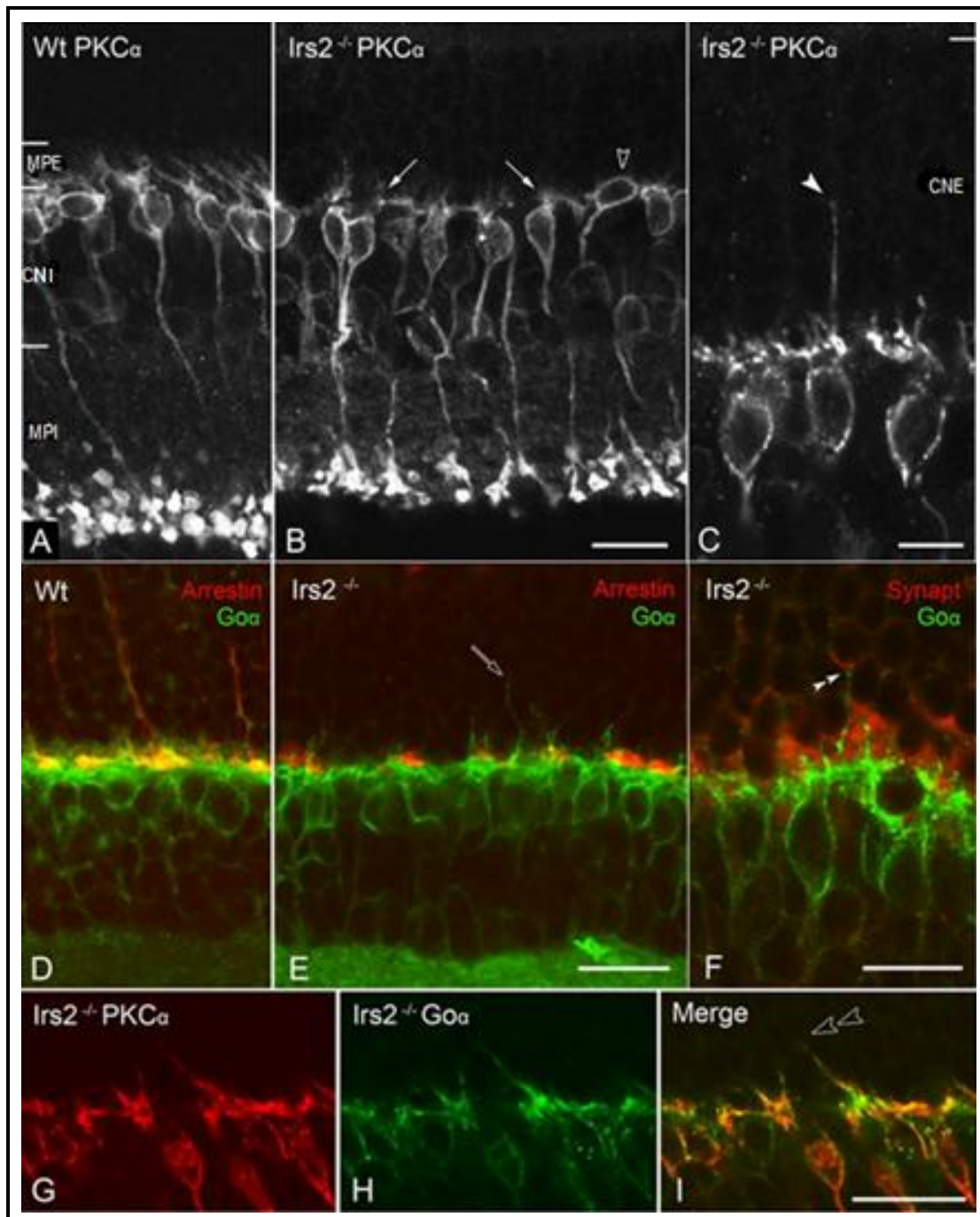


Figura 42. Microfotografías confocales de secciones transversales de 20 μm de grosor de retinas de ratón control (A, D) y ratón *IRS2*^{-/-} (B, C, E, F, G-I). Fig A-C procesadas con PKC α para revelar las células bipolares de bastones. (D-F) Fotomicrografías procesadas con arrestin (conos) y Go α (células bipolares ON conos y bipolares de bastones) en retina control (D) e *IRS2*^{-/-} (E-F). (G-I) Doble marcaje con PKC α y Go α . La barra indica 20 μm (A, B, D, E, G-I) y 10 μm (C, F).

Observamos en las figuras referentes al ratón *IRS2*^{-/-} una disminución de los procesos dendríticos (Fig. 42B, flechas) así como de los pedículos de los conos y algunas están completamente desprovistas de ramas terminales (imagen B, punta de flecha transparente). También llamaba la atención la proyección de dendritas de células bipolares hacia procesos presinápticos ectópicos en la CNE (Fig. 42C, puntas de flecha e imagen F, doble punta de flecha). Con la doble tinción de $Go\alpha$ y $PKC\alpha$ se confirmó que los brotes hacia la CNE surgen sólo de células bipolares de bastones, ya que todos los brotes de $Go\alpha$ contienen $PKC\alpha$ (Fig. 42I, doble punta de flechas transparentes).

2.2.3.2 Células horizontales

El otro componente celular de la capa MPE que hemos analizado son las células horizontales.

Estas células fueron inmunomarcadas con **anticuerpo contra calbindina**. En las células horizontales de la retina control se mostraban plexos de procesos proyectados en el margen proximal de la MPE (Fig. 43A). Sin embargo, en la retina del ratón *IRS2*^{-/-}, aunque los procesos de la célula horizontal se conservaron, la densidad del plexo se redujo de forma importante en ciertas localizaciones retinianas (Fig. 43B, puntas de flechas). Además, algunas células horizontales muestran brotes dendríticos en la CNE, reseñada con una flecha en la figura 43C.

Estos hallazgos sugieren también la remodelación de neuronas de segundo orden en retinas *IRS2*^{-/-}.

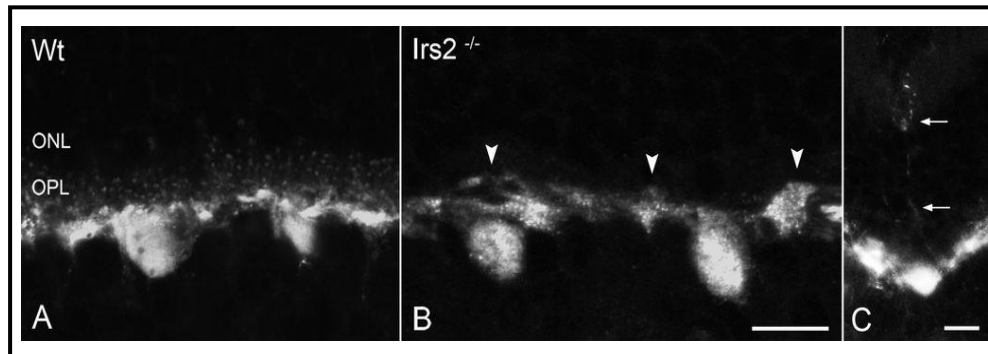


Figura 43. Microfotografías confocales de secciones transversales de 20 μm de grosor de retinas de ratón control (A) y ratón *IRS2*^{-/-} (B, C) procesadas con calbindina. La barra indica 20 μm .

2.3 Membrana plexiforme interna (MPI)

Se trata del lugar de sinapsis de las células bipolares con las células ganglionares. Para saber cómo se organiza la capa plexiforme interna, hicimos una doble inmunotinción con ChAT y nNOS.

Aquí las células bipolares entablan conexiones con distintas variedades de células amacrinas funcionalmente especializadas y con las dendritas de las células ganglionares.

Si bien recordamos, las células amacrinas colinérgicas, están situadas en la CCG o en la CNI, y dan lugar a procesos dendríticos que estratifican en estrechas bandas dentro de las partes internas o externas de la MPI respectivamente.

Para ello se hizo una doble inmunotinción contra ChAT (verde) y nNOS (rojo) y destacaron 5 de todos los estratos de la IPL (Fig. 44A; ChAT s2, s4; nNOS s1, s3, s5). En la retina de *IRS2*^{-/-} se observaba una marcada disminución de la MPI, sin embargo su organización básica se mantenía sin cambios. En las imágenes C-D se muestran los terminales sinápticos de las células bipolares de bastones inmunomarcados con PKC α (puntas de flecha) en el control (C) y en retinas de *IRS2*^{-/-} (D).

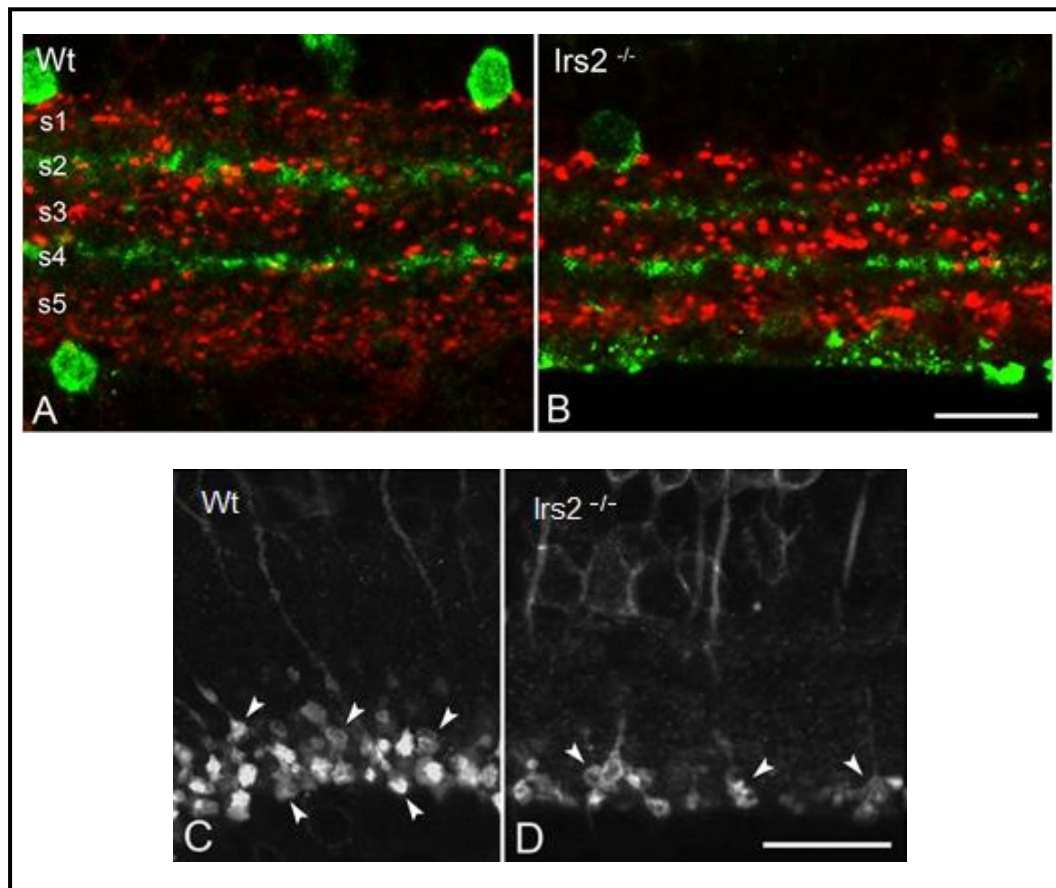


Figura 44. Microfotografías confocales de secciones transversales de 20 μ m de grosor de retinas de ratón control (A) y ratón *IRS2*^{-/-} (B-D). La barra indica 20 μ m.

Para determinar si la disminución en la densidad celular también afectaba el número de sinapsis dentro de la MPI, se determinó la **densidad de los terminales de las células bipolares de bastones** en la MPI de los ratones control e *IRS2* *-/-* usando anticuerpo contra PKC α (Fig. 44C-D).

Ratones	N	Mínimo (puntos+/100 μ m)	Máximo (puntos+/100 μ m)	Media (μ m)	Desviación típica (μ m)
Control	7	43,62	66,38	51,72	7,71
<i>IRS2</i> <i>-/-</i>	17	25,16	51,43	31,28	6,63

Tabla 7. Datos estadísticos de la densidad de los terminales sinápticos de las células bipolares de bastones en los dos grupos de ratones.

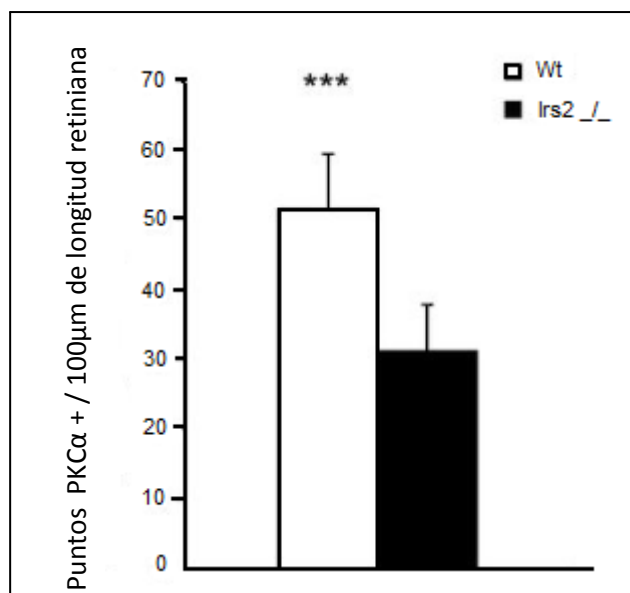


Gráfico 3. Recuento de puntos PKC α positivos cada 100 μ m de longitud retiniana. Los datos se muestran con el valor medio y la desviación estándar de la media. *Test de la T de Student* *** $p < 0.001$.

En la tabla 7 podemos ver los datos estadísticos. En comparación con ratones control, el número de terminales PKC α positivos en retinas *IRS2*^{-/-} estaba **significativamente disminuido en un 40 %** (Test de la T de Student *** $p < 0.001$) (gráfico 3).

No se observó ninguna alteración en la morfología o estratificación de las células amacrinias inmunorreactivas a la calretinina, en la retina de ratón *IRS 2*^{-/-} (Fig. 45).

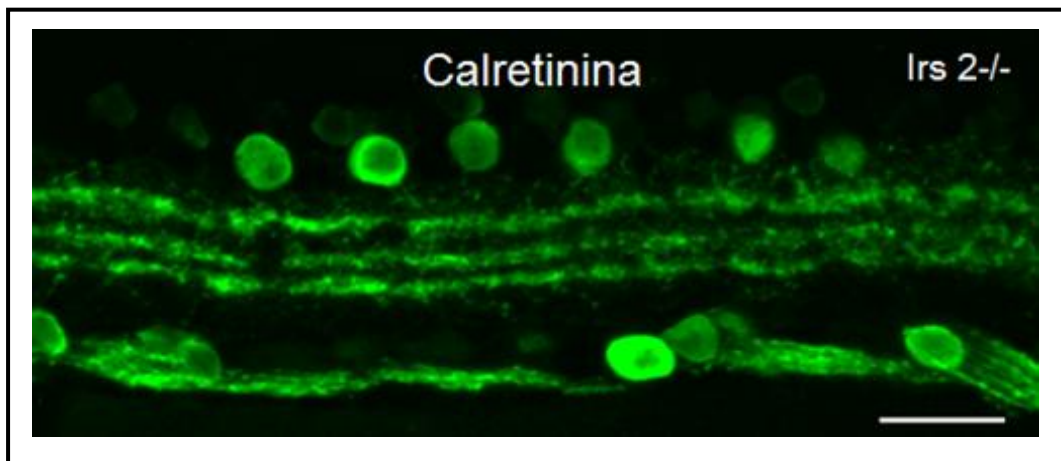


Figura 45. Microfotografía confocal de sección transversal de 20 μm de grosor de retina de ratón *IRS2*^{-/-} procesada con calretinina. La barra indica 20 μm .

2.4 Capa de células ganglionares

Para poder analizar esta capa se utilizó anticuerpos contra NFs de bajo peso molecular (NF-L), y así poder inmunomarcas a las células ganglionares, ya que su citoesqueleto está formado por NFs.

Observamos en la figura 46 que las retinas control muestran expresión NF-L en fascículos de axones de las células ganglionares y en una fina red de neuritas en la MPI. La expresión de este filamento en los cuerpos de las células ganglionares fue poco observada (Fig. 46A).

En contraste, las retinas del ratón *IRS2*^{-/-} mostraron una fuerte acumulación de NF-L en la mayoría de los cuerpos de las células ganglionares y en sus procesos dendríticos en la MPI. Sin embargo, no se encontraron diferencias en la expresión en la capa de fibras nerviosas (CFN). (Fig. 46B).

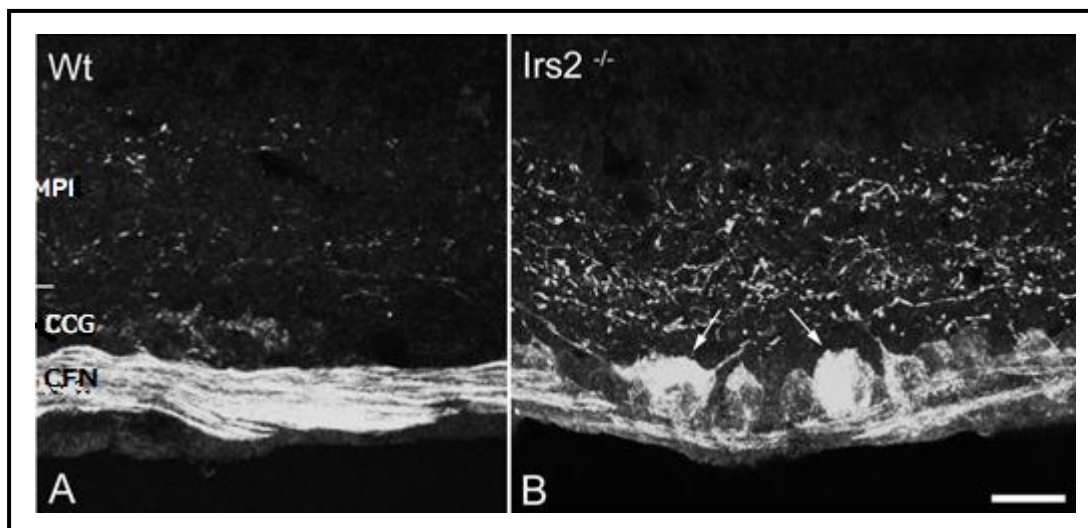


Figura 46. Microfotografías confocales de secciones transversales de 20 μm de grosor de retinas de ratón control (A) y ratón *IRS2*^{-/-} (B) procesadas con la subunidad de neurofilamento L (70 kDa, NFL). La barra indica 20 μm .

2.5 Células gliales

Hemos querido estudiar si las células gliales en las retinas de estos ratones *IRS2*^{-/-} se comportan del mismo modo que en otros modelos de degeneración retiniana

descritos. Es decir, comprobar si la pérdida retiniana descrita anteriormente en estos ratones, se asocia con incremento en la expresión de GFAP (Fig. 47).

Pudimos observar que en la retina control la expresión de GFAP estaba limitada a los procesos de la célula astrogliar en la capa de fibras nerviosas (CFN) y en la CCG, sin observarse expresión en otras capas de la retina (Fig. 47A). Sin embargo, el panorama en las retinas de ratón *IRS2*^{-/-} es distinto, observándose un masivo incremento de GFAP en la CCG así como en procesos radiales de la célula de Müller expandiendo a través de toda la retina neural hacia la membrana limitante externa (Fig. 47B, puntas de flecha).

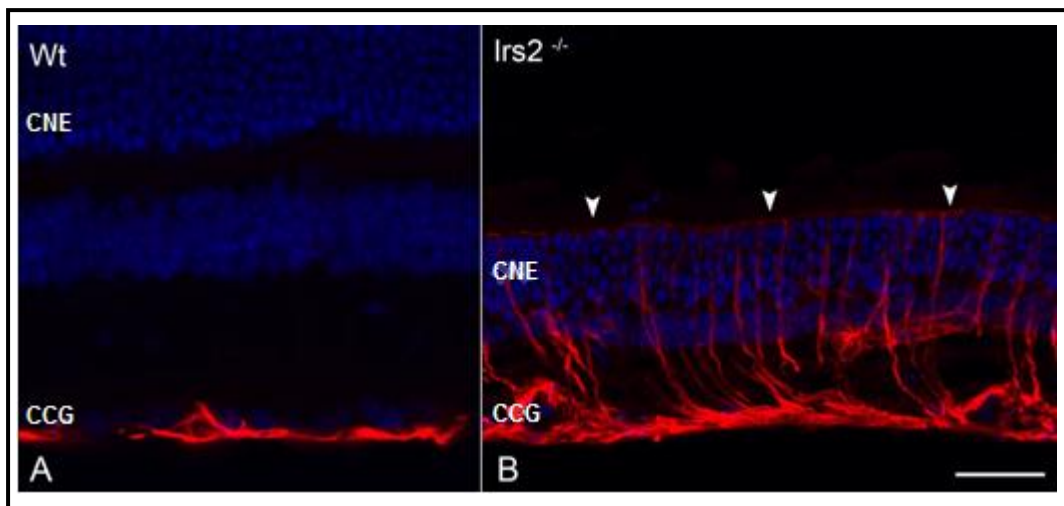


Figura 47. Microfotografías confocales de secciones transversales de 20 μm de grosor (obtenidas mediante criostato) de retinas de ratón control (A) y ratón *IRS2*^{-/-} (B) procesadas con proteína glial fibrilar ácida (GFAP). La barra indica 20 μm .

Además, el inmunomarcaje Iba-1 muestra una morfología típica microglial reactiva en regiones discretas en las retinas *IRS2*^{-/-}, con retracción y procesos de

inflamación (Fig 48B). Así como una reactividad glial en retinas *IRS2*^{-/-}, con procesos de retracción (flechas transparentes).

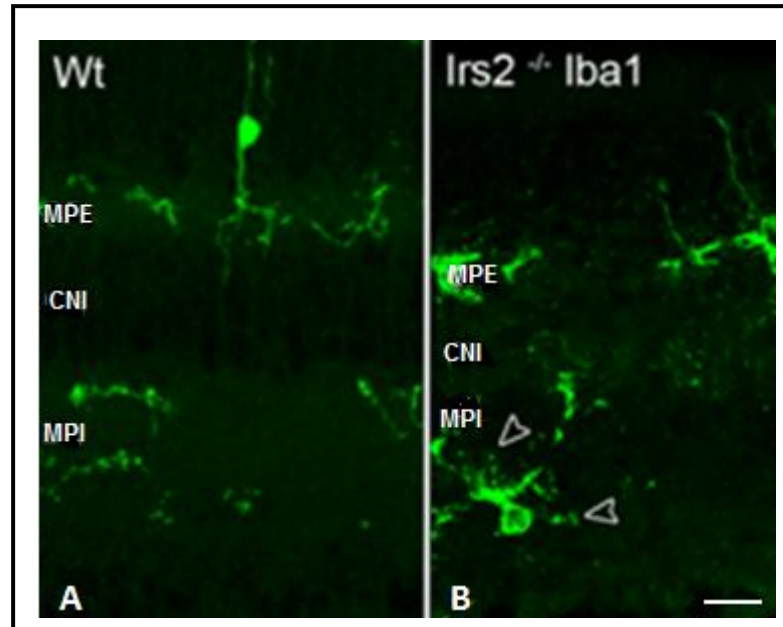


Figura 48. Microfotografías confocales de secciones transversales de 20 µm de grosor de retinas de ratón control (A) y ratón *IRS2*^{-/-} (B) procesadas con Iba-1. La barra indica 20 µm.

Estos datos confirman que la célula microglial y la de Müller se activan en respuesta a un daño retiniano.

V. Discusión

El modelo experimental de ratón que utilizamos en nuestro estudio, el ratón *IRS2*^{-/-}, se trata de un modelo de degeneración retiniana muy interesante que ha sido estudiado sólo en fases tempranas de su desarrollo por Yi et al., (2005), observando una fuerte implicación de *IRS2* en la supervivencia de los fotorreceptores, debido a la importante pérdida de los mismos a las dos semanas de nacer. Sin embargo, no se tiene mucha información descriptiva sobre la citoarquitectura de la retina adulta de este ratón, así como de los posibles cambios que se puedan producir en las capas retinianas más internas derivados de la degeneración de los fotorreceptores.

Nuestro interés sobre este modelo experimental es poder caracterizar los cambios retinianos ocurridos en el ratón adulto por la ausencia de *IRS2*, así como evaluar los circuitos sinápticos de la retina interna. Todo ello con la intención de poder aportar nuevos datos para el entendimiento del desarrollo normal y patológico de la retina.

1. Adelgazamiento del espesor de la retina del ratón *IRS2*^{-/-}

Nuestros resultados revelan una **importante reducción generalizada de todas las capas de la retina en ratones *IRS2*^{-/-} de aproximadamente 12 semanas de edad**, reflejándose en un importante adelgazamiento retiniano total del 60%. Estos datos concuerdan con los que observaron Yi et al., (2005), en las fases tempranas del desarrollo, en concreto hacia las 2 semanas de vida, en los ratones *IRS2*^{-/-}, estando afectadas las capas más externas, debido a la importante pérdida celular de fotorreceptores de la CNE, pero no observaron cambios significativos en capas internas,

a diferencia de nuestro estudio en el que sí se ha objetivado disminución en capas internas.

Hallazgos similares de afectación del espesor de la retina, tanto en la capa de los fotorreceptores (conos y bastones) como en las capas más internas, se encontraron en el ratón transgénico super p53 realizado por Vuong et al., (2013) en los que observaron una disminución de las capas internas de la retina, pero con una pérdida selectiva de bastones de los fotorreceptores dejando aparentemente intacta la población de los conos, demostrando que p53 tiene un papel importante en la apoptosis del desarrollo en la retina, pero sin comprometer la capacidad de la retina para generar las diferentes clases de células de la retina interna, ya que todas las clases estaban presentes, así como todos los subtipos específicos de células retinianas internas que fueron examinadas, demostraron sus características morfológicas de células normales. En nuestro caso se ven mermados los dos tipos de fotorreceptores, así como la reducción de celularidad en las capas internas, pero se diferencia del ratón super p53 por la presencia generalizada de cambios degenerativos morfológicos severos a nivel de los fotorreceptores y con ello cambios en el circuito sináptico neuroretiniano con un intento de preservar la funcionalidad de la vía visual.

No hay que olvidarse que estos ratones presentan un fenotipo diabético cuando son sacrificados debido a que desarrollan una hiperglucemia severa como consecuencia de la resistencia a la insulina a nivel periférico a partir de la 6-7^a semana de vida (Withers et al., 1998; Yi et al., 2005), de la misma forma que ocurrió con nuestros ratones (glucemia de ratones IRS2^{-/-} al sacrificio fue de $\pm 199,16$).

Junto con la disminución de la capa de fotorreceptores se ha observado afectación de las capas internas de la retina una vez establecida la hiperglucemia de nuestros ratones. Podemos pensar que el factor hiperglucémico pueda actuar como un factor sinérgico al déficit de *IRS2*^{-/-}, más que a una respuesta secundaria a la degeneración de los fotorreceptores. De hecho, en modelos de ratones con retinopatía diabética, como el caso de *Ins2 Akita*, Barber et al., (2005) y Gastinger et al., (2008) encontraron una reducción significativa de las capas internas, sobre todo de la MPI, y coinciden también con lo observado por Martin et al., (2004) y Yang et al., (2012) en modelos de ratones diabéticos inducidos con estreptozotocina.

Además no sólo hay cambios neurodegenerativos en capas internas de la retina en los ratones diabéticos experimentales, Park et al., (2003) describen apoptosis de los fotorreceptores en un estudio interesante realizado en ratas con diabetes inducida por estreptozotocina, pero para estos autores no ven claro que el principal factor causal para la apoptosis en la CNE esté asociado directamente con alteraciones del metabolismo de la glucosa y consecuentemente por alteraciones vasculares. Coinciden estos hallazgos con Barber et al., (1998) y Park et al., (2003), en el contexto de la hiperglucemia, en su caso en fases tempranas de la diabetes, en ratones diabéticos inducidos con estreptozotocina. Así como Alvarez et al., (2010), que han observado que la hiperglucemia en un modelo de retinopatía diabética no proliferativa en pez de cebra adulto, produce cambios morfológicos sobre todo en los conos.

De todos modos, no podemos descartar una contribución de la hiperglucemia a

estas anomalías, ya que es bien sabido que el estrés hiperglucémico es perjudicial para la supervivencia del fotorreceptor y pueden afectar las estructuras sinápticas en la MPE (Park et al., 2003, Ozawa et al., 2011).

Si la supervivencia del fotorreceptor está condicionada por el factor hiperglucémico en el ratón adulto *IRS2*^{-/-}, requerirá más experimentación.

Cabe comentar que varios estudios realizados sobre *IRS2*^{-/-} por Schubert et al., (2003), Zemba et al., (2012), Murillo-Cuesta et al., (2012), Martin et al., (2012) apoyan nuestros datos, sugiriendo que la cascada de señalización de *IRS2*^{-/-} parece jugar un papel importante en el engranaje de la neuroprotección. Es más, si vamos un poco más lejos, hemos comprobado que la capa que más se ha visto afectada es la de los fotorreceptores, haciéndose por tanto, más consistente la idea de que *IRS2*^{-/-} promueve la supervivencia de los fotorreceptores como ya comentaron Yi et al., (2005).

2. Cambios en los fotorreceptores de la retina del ratón *IRS2*^{-/-}

Hemos podido observar que en la retina de nuestros ratones *IRS2*^{-/-} se han producido cambios importantes a nivel de los fotorreceptores.

Marc et al., (2003) dice que se producen dos síntomas claves de mal funcionamiento del fotorreceptor que son: 1) *redirección anómala de la opsina* en los segmentos internos que frecuentemente se asocian con acortamiento progresivos

de los segmentos externos y 2) *reestructuración anómala de los axones del fotorreceptor mediante retracción o sprouting*. Nosotros hemos podido observar la presencia de los dos fenómenos degenerativos en los fotorreceptores de la retina IRS2^{-/-} como expresión de una fase avanzada de degeneración. Por un lado **hemos comprobado que hay redistribución de la rodopsina en los bastones y la opsina en los conos junto con acortamiento y colapso de los segmentos externos de los fotorreceptores, siendo muy llamativo en los dos tipos celulares**. Este mismo autor apunta que el período que precede a la muerte de los bastones está asociado con un progresivo acortamiento de los segmentos externos de los bastones junto con cambios lentos en la distribución de la rodopsina. Cambios que hemos podido observar en nuestro trabajo.

El aumento de la rodopsina en los segmentos internos ha sido descrito en otros procesos de degeneración retiniana como en la RP humana (Li et al., 1995; Fariss et al., 2000), la degeneración retiniana de ratón (Nir et al., 1986), así como en el DR (Lewis et al., 1991; Fariss et al., 1997). Estos hallazgos coinciden con los encontrados en nuestro trabajo.

En cuanto a la degeneración del segmento externo de los fotorreceptores, Marc et al., (2003) comentan que es un tema común en todas las condiciones degenerativas del fotorreceptor, tanto si es causa genética (como en nuestro caso), o inducida por enfermedad o por lesión.

Todos estos cambios degenerativos que hemos descrito en nuestros fotorreceptores, han sido observados por otros autores al eliminar otras moléculas efectoras de la vía de señalización del RI en la retina, como *Akt2* por Li et al., (2007), o el *bcl-xl* como han demostrado Zheng et al., (2006).

En cuanto al acortamiento de los segmentos externos, Fariss et al., (2000), Gouras et al., (2003), Lin et al., (2009) han descrito en la retina de ratón con retinitis pigmentaria deformación de los conos supervivientes, siendo más llamativa la pérdida del segmento externo de estos fotorreceptores, To et al., (1998) también observó estos cambios en retinas con degeneración de conos dominante en humanos. Estos hallazgos son similares a los observados en nuestros ratones *IRS2*^{-/-}.

También **hemos podido observar** el segundo defecto importante cercano a la muerte de los fotorreceptores descrito por Marc et al (2003), que implica la **retracción de la neurita y/o** la activación del crecimiento de la misma hacia capas más internas (sprouting). En nuestro caso hemos encontrado retracción de la neurita, observada como **presencia de procesos sinápticos en la CNE en las retinas de *IRS2*^{-/-}**, es decir, algunos terminales sinápticos de los fotorreceptores estaban retraídos desde la MPE, provocando la creación de nuevas sinapsis anómalas en la capa profunda de la CNE.

La retracción de la sinapsis de los bastones es una manifestación que es evidente en otros insultos del tejido retiniano, como es el DR, la DMAE e incluso en la RP.

Claes et al., (2004) indica que en ratones en los que la degeneración tanto de bastones como de conos causada por mutaciones KO, como es nuestro caso, la remodelación neuronal temprana es muy similar a lo que ocurre en el desprendimiento, pero con cambios estructurales más dramáticos y drásticos que ocurren en estadios más tardíos, cuando la pérdida masiva del fotorreceptor ya ha ocurrido, como es nuestro caso. Erickson et al., (1983) observó en la retina desprendida de gatos que los bastones retraían sus terminales sinápticos, mediante la observación de vesículas y cintillas sinápticas que venían a quedarse en el cuerpo de la célula, adyacente al núcleo en vez de al final del axón del bastón en la MPE, hemos encontrado hallazgos similares en la retina de los ratones *IRS2* ^{-/-} con las retinas desprendidas.

Pero no sólo encontramos estos cambios en retinas desprendidas, en las retinas afectadas de DMAE, Sullivan et al., (2007) y Chen et al., (2013) han descrito que algunos de los bastones presentaban sus procesos axonales replegados en la CNE, donde hacían sinapsis con dendritas de células bipolares. En lo que respecta a los conos, sus pedículos permanecían en la MPE, como hemos también observado en las retinas *IRS2* ^{-/-}, y los complejos sinápticos contuvieron múltiples cintas presinápticas y una mezcla de conexiones con células horizontales y bipolares.

En retinas de humanos *postmortem* afectas de RP (Li et al., (1995) y Fariss et al., (2000)), así como en modelos animales de RP (Hombrebueno, 2010) ya se describieron estas retracciones de las sinapsis de los fotorreceptores.

Respecto a la inmunorreactividad a bassoon, utilizado por Grossman et al., (2009) y Dick et al., (2003), coincidimos con estos autores en que esta proteína es un buen indicador de la sinapsis de los fotorreceptores, observando una disminución de la densidad arciforme de la cintilla sináptica respecto a las retinas controles. Esta reducción de inmunotinción es consecuente con la pérdida de fotorreceptores que sufren los animales *IRS2*^{-/-}.

Por otro lado, hay que señalar que Rajala et al., (2009) han observado que las vías de señalización del receptor de la insulina, regulan la organización del citoesqueleto de actina y tubulina en los fotorreceptores, ya que en estudios realizados en ratones que se les ha suprimido el RI y en cultivos celulares de retinas de roedores recién nacidos carentes de insulina, se exhibía una morfología anormal del fotorreceptor, entre ellas la presencia de un axón amplio en el cono y desorganización del citoesqueleto de actina y tubulina de los mismos. En nuestro caso no hemos estudiado el estado del citoesqueleto, pero sí hemos encontrado anomalías en la morfología del fotorreceptor. Estos resultados nos aportan un dato interesante sobre el papel de neuroprotección retiniana a través de la cascada de señalización de la insulina. Todos estos datos no hacen más que confirmar la importante implicación de la cascada de señalización de la insulina en la supervivencia celular retiniana, es decir, cualquier alteración en el engranaje de su maquinaria, puede conllevar a un colapso en la actividad de los fotorreceptores de forma importante.

3. Hallazgos en la retina interna del ratón *IRS2*^{-/-}

Marc et al., (2003) afirman que en los estadios tempranos de sufrimiento y daño de los fotorreceptores, la retina neural reacciona con la remodelación de las células de segundo orden, es decir, las células bipolares y las horizontales.

De forma generalizada hemos apreciado una reducción de la capa retiniana interna en los ratones *IRS2*^{-/-}, junto con cambios patológicos y signos de remodelación neuronal que eran previsibles ante la importante degeneración de los fotorreceptores. Ocurre una remodelación de las capas más internas de la retina en respuesta a una “deafrenciación”, que es lo mismo que la pérdida masiva de fotorreceptores en las retinas degeneradas. Llama la atención observar una marcada retracción y falta de procesos dendríticos de las células bipolares de los bastones y de los conos en nuestros ratones.

Varios autores, Marc et al., (2003), Strettoi et al., (2000 y 2002), están de acuerdo en que la primera evidencia fuerte de que las neuronas retinianas reaccionan a la muerte de las bastones, es con el fracaso de las células bipolares de los bastones para mantener los adecuados árboles dendríticos.

En los modelos de degeneración de fotorreceptores como son la rata albina P23H (Cuenca et al., 2004) y la rata RCS (Cuenca et al., 2005), se observó una atrofia de los axones terminales de las células bipolares, junto con otros cambios adicionales en la retina interna, con desorganización y adelgazamiento de la MPI. La pérdida de procesos

dendríticos finos de las células bipolares de los bastones también ha sido divulgada previamente en estadios tempranos en el modelo de ratón rd10 por varios autores: Puthussery et al., (2009), Barhoum et al., (2008) y Phillips et al., (2010). Igual como ocurre en nuestro modelo.

Por otro lado, las células bipolares de los conos pierden sus dendritas a un ritmo más lento. Por ejemplo, un modelo experimental de ratón de forma parecida al ratón rd10, con la mutación del gen Pde6b y con una degeneración retiniana más lenta, Chang et al., (2002) muestran el mismo patrón de retracción de neurita que las células bipolares de los bastones. Coincide con nuestro modelo de ratón que también presenta retracción tanto en las células bipolares de los bastones como de conos, enfatizando un proceso degenerativo severo celular.

En nuestro trabajo **nos sorprendió ver la presencia de sprouting hacia la CNE de las células bipolares, en conexión directa con los bastones.** Los procesos aberrantes han sido previamente descritos en varios modelos de degeneración retiniana animal. Es el caso del sprouting de las dendritas de las células bipolares que se ha encontrado en retinas experimentales de DR en estadios tempranos (Fischer et al., 2005), en modelos animales de RP (Li et al., 1995), en ratas del RCS (Cuenca et al., 2005 y Wang et al., 2005), así como en ratones mutantes de la proteína Bassoon (Dick et al., 2003). También ha sido descrito en modelos de retinas envejecidas de ratón por Liets et al., (2006) y Terzibasi et al., (2009), aunque en estos casos, a diferencia de los modelos de degeneración retiniana, no está aún aclarado porqué se producen estas ramificaciones hacia la CNE, ya que no se puede atribuir a una muerte celular de los fotorreceptores

puesto que, no se ha detectado una pérdida evidente de fotorreceptores en las retinas envejecidas (Gresh et al., 2003; Samuel et al., 2011) y que sí es un dato importante diferenciador en nuestro modelo así como en otros modelos de degeneración retiniana.

En todos estos casos, se piensa que la disponibilidad de la segunda neurona de rápidamente crear ramificaciones, pueda tener implicaciones para la supervivencia de esta célula tras un proceso de degeneración de fotorreceptores. Parece tratarse de una manera de asegurar la integridad de la vía visual durante un proceso degenerativo.

En el estudio de la densidad sináptica de la MPI coincidimos con Kosaka et al., (1998) en que la inmunotinción de PKC α es un buen indicador de la sinapsis de las células bipolares de los bastones. En comparación con los ratones control, el número de terminales sinápticos positivos a PKC α disminuyó un 40%, sugiriendo una severa reducción de las conexiones relacionadas con la vía de los bastones. Esta reducción de la inmunotinción es consecuente con las alteraciones sufridas en las células bipolares de los ratones *IRS2*^{-/-}.

En cuanto a las **células horizontales**, nosotros **hemos observado que también modulan su árbol dendrítico en los ratones *IRS2*^{-/-} acorde a los cambios sinápticos que se producen a su alrededor, proyectando sus dendritas hacia capas más externas**. Coincidimos con los hallazgos descritos en los modelos experimentales de retina desprendida de Lewis et al., (1998) y Fisher et al., (2003) que encuentran que las células horizontales están entre los participantes más obvios y, en estadios iniciales de la separación, enviando sus dendritas hacia la CNE. Phillips et al., (2010) y Gargini et al., (2007) también observan pérdida de procesos dendríticos y extensión de

proyecciones ectópicas en estas células en retinas con degeneración de fotorreceptores. En los estudios realizados en ratas diabéticas, Agardh et al., (2001), Park et al., (2003), Preet et al., (2006) y Park et al., (2007) también observaron reducción de los procesos postinápticos de las células horizontales así como la presencia de anormalidades estructurales en las células bipolares.

A nivel de la MPI, no observamos en nuestro trabajo cambios en la morfología ni en la estratificación de las células amacrinas que expresan ChAT y NOS, sin embargo estudios previos en diferentes modelos de diabetes, como han descrito Agradh et al., (2001) y Goto et al., (2005), describen una pérdida de esta población celular.

Todos estos cambios que hemos observados en la plasticidad neuronal retiniana de nuestros ratones provocados por una mutación KO, pueden ser una muestra del deterioro del complejo neurosensorial después de la pérdida de la unidad sensorial, conllevando a reorganizaciones estructurales, como hemos descrito, así como moleculares que se propagan a lo largo del entramado sináptico aferente. Al tratarse la retina de una parte más del SNC, se comporta de la misma manera ante el sufrimiento neuronal que el SNC, provocando alteraciones funcionales de excitación e inhibición, atrofia y degeneración tisular y surgimiento de nuevas conexiones, como muestran Wall et al., (2002) a nivel del SNC.

4. Cambios en la capa de células ganglionares de la retina del ratón IRS2-/-

Junto con los cambios morfológicos observados en las células de segundo orden, también cabe pensar que puedan verse afectadas las neuronas de tercer orden en la retina, es decir, las células ganglionares. Éstas son una parte importante del circuito funcional de la retina, ya que una de las partes claves de la vía visual depende de la integridad funcional de las mismas, al tratarse de la única neurona con proyección de la retina, cuyos axones llevan la información visual a los centros de procesamiento visual en el cerebro.

Es bien conocido, como dice Julien (1999), que los agregados anormales de NFs son características patológicas distintivas de muchas enfermedades neurodegenerativas, como por ejemplo en la esclerosis lateral amiotrófica, demencia con cuerpos de Lewy, o enfermedad de Parkinson. En cuanto a si esta acumulación es una consecuencia o es la causa principal de las disfunciones de las motoneuronas, sigue siendo un tema de debate.

Pues bien, no nos sorprende observar que **en la retina de los ratones IRS2 -/- se aprecie una pérdida de células ganglionares junto con la acumulación de NF-L en las células ganglionares retinianas, al tratarse de ratones con una importante degeneración retiniana.** Coincidimos con las referencias de otras enfermedades neurodegenerativas, como Ruiz-Ederra et al., (2001) que comentan que hay evidencias de la participación de los NFs en patologías oculares, en las cuales se produce una muerte selectiva de células ganglionares, como el caso del glaucoma, en la que estudios

con modelos experimentales de esta patología como el realizado por Vickers et al., (1995), se ha observado una pérdida selectiva de células ganglionares de la retina, así como un mayor contenido de NFs. Por otro lado, Fry et al., (1991) con la intención de estudiar en modelos experimentales la repercusión de la intoxicación de aluminio mediante la inyección del mismo en ojos de conejos, observaron acumulaciones de NFs en el soma de las neuronas formando los denominados “ovillos neurofibrilares”, éstos eran similares a los observados en pacientes de Alzheimer, consistiendo en acumulaciones anormales de NFs fosforilados agrupados en filamentos que desplazaban el núcleo hacia las zonas laterales del soma.

Estos resultados indican que las células ganglionares son subsidiarias de padecer cambios en eventos patológicos degenerativos, como la regulación al alza de NFs en estas células, sugestiva de remodelación estructural puesto que este componente del citoesqueleto está asociado con la estabilidad estructural.

Con todo ello, los agregados de NF-L en el soma de las CGs y en sus procesos dendríticos son considerados signos patognomónicos de algunas enfermedades neurodegenerativas de la retina. Es el caso del DR, en el que se ha observado en diversos modelos experimentales que se producen cambios moleculares como son la expresión de proteína de NF (Coblentz et al., 2002; Verardo et al., 2008) y que coinciden con nuestros hallazgos. Así como en la RP, hace ya años, un estudio en pacientes que padecían esta patología, se encontró un porcentaje sustancial de anticuerpos contra NF-H, aunque los autores concluyeron que no se encontró ninguna correlación entre la presencia de estos anticuerpos y otros parámetros inmunológicos y

clínicos con la RP, parece ser que estos resultados sugieren la liberación de NFs provenientes de neuronas dañadas en RP, activando a linfocitos B linfocitos autorreactivos a antígenos de NFs (Galbraith et al., 1986).

Sin embargo, en cuanto a la pérdida de células ganglionares que hemos encontrado en nuestro estudio, no está muy clara en otros modelos de degeneración retiniana como es el caso de la RP en la que el impacto de la pérdida del fotorreceptor en la viabilidad de las células ganglionares ha conducido a resultados un tanto contradictorios. Eisenfeld et al., (1984) no han observado cambios en las células ganglionares en ratas RCS, así como en ratones rd1 y rd10 (Mazzoni et al., 2008 y Damiani et al., 2012), no coincidiendo nuestros resultados con sus hallazgos. Sin embargo en estudios realizados en ratas RCS y P23H y en ratones rd (Villegas-Perez et al., 1998; Garcia-Ayuso et al., 2010; Wang et al., 2000) han observado pérdida de células ganglionares, así como en estudios *post mortem* realizados en pacientes humanos envejecidos con RP (Stone et al., 1992 y Humayun et al., 1999), como hemos examinado en las retinas de los ratones *IRS2*^{-/-}.

Recientemente un estudio realizado por Lin et al., (2013) en un modelo de RP, se une a esta polémica, encontrando que la células ganglionares de nueve tipos diferentes eran especialmente resistentes a la degeneración de fotorreceptores y seguían conservando su geometría dendrítica bien más allá de la muerte completa de los fotorreceptores. Nuestros estudios se alejan de estos resultados.

Por tanto, se desconoce por qué no todos los procesos degenerativos retinianos conllevan un patrón similar de degeneración de las células ganglionares. Se requieren más estudios para poder clarificar por qué unas degeneraciones se comportan de forma distinta a otras en cuanto a la afectación de estas células.

Sin embargo estos cambios no son excepcionales en la diabetes. De hecho, hay varios estudios que documentan que la diabetes induce pérdida de células ganglionares, así como cambios morfológicos significativos en las dendritas de estas células de la retina y acumulación de NF-L como hemos observado en nuestro estudio. Es el caso de Gastinger et al., (2001, 2008), Qin et al., (2006), Meyer-Rüsenberg et al., (2007) y Kern et al., (2008) que coinciden en la descripción de cambios en el moldeado de los axones con zonas hinchadas seguidas de constricciones cerca del cuerpo celular, así como una remodelación estructural de las dendritas, incluyendo un incremento en la longitud total, densidad y número de terminales.

5. Incremento en la expresión de proteína glial fibrilar ácida (GFAP) en la retina del ratón IRS2^{-/-}

Bringmann et al., (2012) dicen que cada célula de Müller son neuroprotectoras, pero pueden también detener el apoyo a las neuronas y contribuir a su degeneración neuronal. Pekny et al., (2005) apuntan que diferentes estudios en varias enfermedades neurológicas indican que la gliosis reactiva puede tener tanto efectos positivos como negativos en el mantenimiento y funcionalidad neuronal.

Bignami et al., (1979) y Lewis et al., (2003), piensan que la gliosis reactiva representa un intento celular de proteger el tejido retiniano de los daños, con la intención de promover la reparación del tejido retiniano y limitar la remodelación tisular. Incluye cambios morfológicos, bioquímicos, y fisiológicos. Estas respuestas varían según el tipo y la gravedad del daño. La regulación al alza de los filamentos intermedios gliales, vimentina y la GFAP, son un indicador sensible de “estrés retiniano”.

Las retinas de los ratones adultos *IRS2* -/- presentan un paisaje desolador. Junto con la pérdida retiniana generalizada se observa un incremento masivo de GFAP en la capa de fibras nerviosas (NFL), en las CGs, así como en procesos radiales de las células de Müller expandiéndose por toda la retina junto con activación de la microglia, todo ello nos habla de la presencia de un daño retiniano importante. Estos hallazgos coinciden con otros procesos degenerativos, ya que la acumulación de GFAP en las células de Müller ocurre en respuesta al daño retiniano, ya sea por desprendimiento de retina (Erickson et al., 1987, Okada et al., 1990, Lewis et al., 2003; Sethi et al., 2005), en situaciones de isquemia (Barnett et al., 1995, Osborne et al., 1999), en degeneraciones del fotorreceptor (Eisenfeld et al., 1984, Strettoi et al., 2002, Chua et al., 2013), así como en el ratón super p53 (Salazar et al., 2013).

Sin embargo en los resultados de retina de ratones *Ins2* Akita, de Barber et al., (2005) así como en ratones con diabetes inducida por estreptozotocina (Asnaghi et al., 2003) no coincidimos con sus resultados puesto que la expresión de GFAP no está muy alterada en sus retinas, como ocurre con el modelo utilizado en el presente trabajo (Albert-Fort et al., 2011). En cambio otros estudios, como Rungger-Brändle et al.,

(2000) en ratas diabéticas, o incluso en humanos, Mizutani et al., (1998), sí que han observado un incremento de GFAP en las células de Müller, con los que coincidimos plenamente.

En definitiva, la importante pérdida retiniana junto con todos los hallazgos degenerativos observados en la retina externa e interna de los ratones adultos *IRS2*^{-/-} como la atrofia de los fotorreceptores, la reducción y remodelación de procesos neuronales, la acumulación de NF-L en las células ganglionares, así como el incremento de la expresión de GFAP, se traduce en un interesante modelo de degeneración retiniana (Albert-Fort et al., 2014). De ahí que estos ratones pueden ser susceptibles de futuros análisis de plasticidad funcional adicional, así como servir de modelo de plasticidad sináptica para el entendimiento humano. Sería interesante además, realizar estudios adicionales para aclarar si estos cambios ocurren a parte del contexto hiperglucémico. Entre las claves para resolver este problema, sería restaurar la función de las células β pancreáticas en los ratones *IRS2*^{-/-}.

VI. Conclusiones

1. El modelo KO para el IRS2 ha resultado útil para alcanzar los objetivos de este estudio: caracterizar morfológicamente la retina del ratón en ausencia de esta molécula. La ausencia de IRS2 durante la vida del ratón induce cambios en la citoarquitectura de la retina compatibles con las descripciones morfológicas de la degeneración retiniana.
2. La biodisponibilidad de IRS2 es esencial para el establecimiento de las conexiones sinápticas y su mantenimiento en la retina del ratón adulto.
3. Los fotorreceptores son extremadamente vulnerables a la ausencia de IRS2, constituyendo el desencadenante para la reacción en cadena de la desorganización del resto de las capas retinianas. Por ello, las células de la capa nuclear interna (células bipolares, horizontales y amacrinas) sufren una desestructuración importante en respuesta a esa deafferenciación de fotorreceptores.
4. Las células ganglionares de la retina del ratón IRS2 $-/-$ muestran signos de degeneración caracterizados por la presencia de agregados de neurofilamentos tal y como son observados en otras enfermedades neurodegenerativas.
5. La evidencia del estrés retiniano se manifiesta en el ratón IRS2 $-/-$ por una marcada gliosis reactiva y por la activación de la microglía.
6. La privación de IRS2 en la retina del ratón provoca por lo tanto, una remodelación estructural generalizada en respuesta a la gravedad del proceso neurodegenerativo subyacente.
7. La proyección del uso de IRS2 a nivel farmacológico, podría beneficiar a los pacientes con retinopatía, proporcionando probablemente neuroprotección adicional a la retina.

VII. Bibliografía

Abuin A, Holt KH, Platt KA, Sands AT, Zambrowicz BP. Full-speed mammalian genetics: in vivo target validation in the drug discovery process. *Trends in Biotechnology*. 2002; 20: 36-42.

Adler R, Curcio C, Hicks D, Price D, Wong F. *Cell death in age-related macular degeneration*. *Mol Vis*. 1999; 5:31.

Agardh E, Bruun A, Agardh CD. *Retinal glial cell immunoreactivity and neuronal cell changes in rats with STZ-induced diabetes*. *Curr Eye Res*. 2001; 23(4):276-84.

Albert-Fort M, Pons-Vázquez S, Sanz-González S, Zanón-Moreno V, Pinazo-Durán MD, Burks D. *The Role of Insulin Receptor S2 (IRS-2) in Retinal Morphology and Diabetic Retinopathy*. *Ophthalmic Res* 2011; 47:109.

Albert-Fort M, Hombrebueno JR, Pons-Vazquez S, Sanz-Gonzalez S, Diaz-Llopis M, Pinazo-Durán MD. *Retinal neurodegenerative changes in the adult insulin receptor substrate-2 deficient mouse*. *Exp Eye Res* 2014 May 2; 124C:1-10.

Alvarez Y, Chen K, Reynolds AL, Waghorne N, O'Connor JJ, Kennedy BN. *Predominant cone photoreceptor dysfunction in a hyperglycaemic model of non-proliferative diabetic retinopathy*. *Dis Model Mech*. 2010; 3(3-4):236-45.

Antonetti DA, Algenstaedt P, Kahn CR. *Insulin receptor substrate 1 binds two novel splice variants of the regulatory subunit of phosphatidylinositol 3-kinase in muscle and brain.* Mol Cell Biol. 1996; 16(5):2195-203.

Araki E, Lipes MA, Patti ME, Brüning JC, Haag B 3rd, Johnson RS, Kahn CR. *Alternative pathways of insulin signalling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene. Alternative pathway of insulin signalling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene.* Nature. 1994; 372(6502):186-90.

Arango JC, Arias AA, Patiño PJ. *Importancia de los ratones knock-out en el estudio del sistema NADPH oxidasa.* Rev Cubana Hematol Inmunol Med Transfus. 2005; 21 (2): 1-10.

Arroba AI, Revuelta-Cervantes J, Menes L, González-Rodríguez Á, Pardo V, de la Villa P, Burks DJ, Valverde ÁM. *Loss of protein tyrosine phosphatase 1B increases IGF-I receptor tyrosine phosphorylation but does not rescue retinal defects in IRS2-deficient mice.* Invest Ophthalmol Vis Sci. 2013; 54(6):4215-25.

Asnaghi V, Gerhardinger C, Hoehn T, Adeboje A, Lorenzi M. *A role for the polyol pathway in the early neuroretinal apoptosis and glial changes induced by diabetes in the rat.* Diabetes. 2003;52: 506–511.

Banting FG, Best CH, *"The Internal Secretion of the Pancreas"*. Jour Lab and Clin Med. 1922; 465-480.

- Barber AJ.** *A new view of diabetic retinopathy: a neurodegenerative disease of the eye.* Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 2003; 27:283–290.
- Barber AJ,** Lieth E, Khin SA, Antonetti DA, Buchanan AG, Gardner TW. *Neural apoptosis in the retina during experimental and human diabetes. Early onset and effect of insulin.* J Clin Invest. 1998; 102(4):783-91.
- Barber AJ,** Antonetti DA, Kern TS, Reiter CE, Soans RS, Krady JK, Levison SW, Gardner TW, Bronson SK. *The Ins2Akita mouse as a model of early retinal complications in diabetes.* Invest Ophthalmol Vis Sci. 2005; 46(6):2210-8.
- Barhoum R,** Martínez-Navarrete G, Corrochano S, Germain F, Fernandez-Sanchez L, de la Rosa EJ, de la Villa P, Cuenca N. *Functional and structural modifications during retinal degeneration in the rd10 mouse.* Neuroscience. 2008; 155:698–713.
- Barhoum R,** Martínez-Navarrete G, Corrochano S, Germain F, Fernandez-Sanchez L, de la Rosa EJ, de la Villa P, Cuenca N. *Functional and structural modifications during retinal degeneration in the rd10 mouse.* Neuroscience. 2008; 155(3):698-713.
- Barnett NL,** Osborne NN. *Prolonged bilateral carotid artery occlusion induces electrophysiological and immunohistochemical changes to the rat retina without causing histological damage.* Exp Eye Res. 1995; 61(1):83-90.

Baumann CA, Ribon V, Kanzaki M, Thurmond DC, Mora S, Shigematsu S, Bickel PE, Pessin JE, and Saltiel AR. *CAP defines a second signalling pathway required for insulin-stimulated glucose transport*. Nature. 2000; 407: 202–207.

Baylor D. *How photons start vision*. Proc Natl Acad Sci USA. 1996; 93(2):560-5.

Benavides FJ, Guenet JL. *Manual de genética de roedores de laboratorio. Principios básicos y aplicaciones*. Ed. Universidad de Alcalá de Henares, 2003.

Biglami A, Dahl D. *The radial glia of Müller in the rat retina and their response to injury: an immunofluorescence study with antibodies to the glial fibrillary acidic (GFA) protein*. Exp Eye Res. 1979; 28: 63–69.

Bockamp E, Maringer M, Spangenberg C, Fees S, Fraser S, Eshkind L, Oesch F, Zabel B. *Of mice and models: improved animal models for biomedical research*. Physiological Genomics. 2002; 11: 115-132.

Bourne MC, Campbell DA, Tansley K. *Hereditary degeneration of the rat retina*. Br J Ophthalmol. 1938; 22(10):613-23.

Boycott BB, Wässle H. *Morphological Classification of Bipolar Cells of the Primate Retina*. Eur J Neurosci. 1991; 3(11):1069-1088.

-
- Bozulic L**, Hemmings BA. *PIKKing on PKB: regulation of PKB activity by phosphorylation*. *Curr Opin Cell Biol*. 2009 Apr; 21(2): 256-61.
- Bramham CR**, Alkon DL, Lester DS. *Arachidonic acid and diacylglycerol ACT synergistically through protein kinase C to persistently enhance synaptic transmission in the hippocampus*. *Neuroscience*. 1994; 60(3):737-43.
- Bressler NM**, Bressler SB, Fine SL. *Age-related macular degeneration*. *Surv Ophthalmol*. 1988; 32(6):375-413.
- Brian P**. Zambrowicz & Arthur T. Sands. *Knockouts model, the 100 best-selling drugs will they model the next 100?* *Nature Reviews Drug Discovery*. 2003; 2(1): 38-51.
- Bringmann A**, Wiedemann P. *Müller glial cells in retinal disease*. *Ophthalmologica*. 2012; 227(1):1-19.
- Brown MM**, Brown GC, Stein JD, Roth Z, Campanella J, Beauchamp GR. *Age-related macular degeneration: economic burden and value-based medicine analysis*. *Can J Ophthalmol*. 2005; 40(3):277-87.
- Burks DJ**, Font de Mora J, Schubert M, Withers DJ, Myers MG, Towery HH, Altamuro SL, Flint CL, White MF. *IRS-2 pathways integrate female reproduction and energy homeostasis*. *Nature*. 2000; 407(6802):377-82.

Cai D, Dhe-Paganon S, Melendez PA, Lee J, Shoelson SE. *Two new substrates in insulin signaling, IRS5/DOK4 and IRS6/DOK5.* J Biol Chem. 2003; 278(28):25323-30.

Carter-Dawson LD, LaVail MM. *Rods and cones in the mouse retina.* J Comp Neurol. 1979; 188: 245-262.

Claes E, Seeliger M, Michalakis S, Biel M, Humphries P, Haverkamp S. *Morphological characterization of the retina of the CNGA3(-/-)Rho(-/-) mutant mouse lacking functional cones and rods.* Invest Ophthalmol Vis Sci. 2004; 45(6):2039-48.

Coblentz FE, Radeke MJ, Lewis GP, Fisher SK. *Evidence that ganglion cells react to retinal detachment.* Exp Eye Res. 2003; 76(3):333-42.

Cohen E, Sterling P. *Demonstration of cell types among cone bipolar neurons of cat retina.* Phil Trans R Soc London 1990a; 330: 305-321.

Cohen E, Sterling P. *Convergence and divergence of cones onto bipolar cells in the central area of the cat retina.* Phil Trans R Soc London 1990b; 330: 323-328.

Cook B, Lewis GP, Fisher SK, Adler R. *Apoptotic photoreceptor degeneration in experimental retinal detachment*. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1995; 36(6):990-6.

Craft CM, Whitmore DH, Wiechmann AF. *Cone arrestin identified by targeting expression of a functional family*. J Biol Chem. 1994; 269(6):4613-9.

Cremers FP, van den Hurk JA, den Hollander AI. *Molecular genetics of Leber congenital amaurosis*. Hum Mol Genet. 2002; 11(10):1169-76.

Cuenca N, Pinilla I, Sauvé Y, Lu B, Wang S, Lund RD. *Regressive and reactive changes in the connectivity patterns of rod and cone pathways of P23H transgenic rat retina*. Neuroscience. 2004; 127(2):301-17.

Cuenca N, Pinilla I, Sauvé Y, Lund R. *Early changes in synaptic connectivity following progressive photoreceptor degeneration in RCS rats*. Eur J Neurosci. 2005; 22(5):1057-72.

Cuenca N. *Los fotorreceptores, esas fascinantes células*. SEBBM Divulgación. La divulgación al alcance de la mano. 2009.

Chabre M, Deterre P. *Molecular mechanism of visual transduction*. Eur J Biochem. 1989; 179:255-66.

Chang B, Hawes NL, Hurd RE, Davisson MT, Nusinowitz S, Heckenlively JR. *Retinal degeneration mutants in the mouse*. Vision Res. 2002; 42(4):517-25.

Chakraborty C, Agoramoorthy G, Hsu MJ. *Exploring the evolutionary relationship of insulin receptor substrate family using computational biology*. PLoS One. 2011; 6(2):e16580.

Chen M, Hombrebueno JR, Luo C, Penalva R, Zhao J, Colhoun L, Pandi SP, Forrester JV, Xu H. *Age- and light-dependent development of localised retinal atrophy in CCL2(-/-)CX3CR1(GFP/GFP) mice*. PLoS One. 2013; 8(4):e61381.

Chiang SH, Baumann CA, Kanzaki M, Thurmond DC, Watson RT, Neudauer CL, Macara IG, Pessin JE, and Saltiel AR. *Insulin-stimulated GLUT4 translocation requires the CAP-dependent activation of TC10*. Nature. 2001; 410: 944–948.

Chirivella L, Cano-Jaimez M, Pérez-Sánchez F, Herraes L, Carretero J, Fariñas I, Burks DJ, Kirstein M. *IRS2 signalling is required for the development of a subset of sensory spinal neurons*. Eur J Neurosci. 2012; 35(3):341-52.

Chua J, Nivison-Smith L, Fletcher EL, Trenholm S, Awatramani GB, Kalloniatis M. *Early remodeling of Müller cells in the rd/rd mouse model of retinal dystrophy*. J Comp Neurol. 2013 Aug 1;521(11):2439-53.

Chuang LM, Hausdorff SF, Myers MG Jr, White MF, Birnbaum MJ, Kahn CR.

Interactive roles of Ras, insulin receptor substrate-1, and proteins with Src homology-2 domains in insulin signaling in Xenopus oocytes. J Biol Chem. 1994; 269(44):27645-9.

Daiger SP, Bowne SJ, Sullivan LS. *Perspective on genes and mutations causing*

retinitis pigmentosa. Arch Ophthalmol. 2007; 125(2):151-8.

Damiani D, Novelli E, Mazzoni F, Strettoi E. *Undersized dendritic arborizations in*

retinal ganglion cells of the rd1 mutant mouse: a paradigm of early onset photoreceptor degeneration. J Comp Neurol. 2012; 520: 1406–1423.

Daughaday WH, Hall K, Raben MS, Salmon WD Jr, Van den Brande JL, van Wyk JJ.

Somatomedin: Proposed designation for sulphation factor. Nature. 1972; 235 (5333):107.

Daughaday WH, Hall K, Salmon WD Jr, Van den Brande JL, van Wyk JJ : *On the*

nomenclature of the somatomedins and insulin-like growth factors. Endocrinology. 1987; 121(5):1911-1912.

Daughaday WH, Rotwein P. *Insulin-like growth factors I and II: Peptide, messenger*

ribonucleic acid and gene structures, serum, and tissue concentrations. Endocr Rev. 1989; 10:68-91.

D'Ercole AJ. *Insulin-like growth factors and their receptors in growth.* Endocrinology and Metabolism Clinics of North America. 1996; 25 (3): 573- 590.

DeFronzo RA, Bonadonna RC, Ferrannini E. *Pathogenesis of NIDDM. A balanced overview.* Diabetes Care. 1992; 15(3):318-68.

De la Rosa EJ, Bondy CA, Hernández-Sánchez C, Wu X, Zhou J, López-Carranza A, Scavo LM, de Pablo F. *Insulin and insulin-like growth factor system components gene expression in the chicken retina from early neurogenesis until late development and their effect on neuroepithelial cells.* Eur J Neurosci. 1994; 6(12):1801-10.

De Vries SE, Baccus SA, Meister M. *The projective field of a retinal amacrine cell.* J Neurosci. 2011; 8; 31(23):8595-604.

Del Brio MA, Rovira P. *Manual de bases teórico-prácticas de inmunocitoquímica.* Departamento Morfología y Biología celular, Universidad de Oviedo. 1995.

Den Hollander AI, Roepman R, Koenekoop RK, Cremers FP. *Leber congenital amaurosis: genes, proteins and disease mechanisms.* Prog Retin Eye Res. 2008; 27(4):391-419.

- Dhand R**, Hara K, Hiles I, Bax B, Gout I, Panayotou G, Fry MJ, Yonezawa K, Kasuga M, Waterfield MD. *PI 3-kinase: structural and functional analysis of intersubunit interactions*. EMBO J. 1994; 13(3):511-21.
- Dick O**, Hack I, Altmann WD, Garner CC, Gundelfinger ED, Brandstätter JH. *Localization of the presynaptic cytomatrix protein Piccolo at ribbon and conventional synapses in the rat retina: comparison with Bassoon*. J Comp Neurol. 2001; 439(2):224–234.
- Dick O**, tom Dieck S, Altmann WD, Ammermüller J, Weiler R, Garner CC, Gundelfinger ED, Brandstätter JH. *The presynaptic active zone protein bassoon is essential for photoreceptor ribbon synapse formation in the retina*. Neuron. 2003; 37(5):775-86.
- Dhingra A**, Lyubarsky A, Jiang M, Pugh EN Jr, Birnbaumer L, Sterling P, Vardi N. *The light response of ON bipolar neurons requires G[alpha]o*. J Neurosci. 2000; 20(24):9053-8.
- Dräger UC**, Olsen JF. *Ganglion cell distribution in the retina of the mouse*. Invest Ophthalmol Vis Sci 1981; 20:285-293.
- Dräger UC**, Hofbauer A. *Antibodies to heavy neurofilament subunit detect a subpopulation of damaged ganglion cells in retina*. Nature. 1984; 309(5969):624-6.

Dubé N, Tremblay ML. *Involvement of the small protein tyrosine phosphatases TC-PTP and PTP1B in signal transduction and diseases: from diabetes, obesity to cell cycle, and cancer.* Biochim Biophys Acta. 2005; 1754(1-2):108-17.

Duhault J, Lebon F, Boulanger M. KK mice as a model of microangiopathic lesions in diabetes. Bibl Anat. 1973; 11:453-8.

Dummler B, Hemmings BA. *Physiological roles of PKB/Akt isoforms in development and disease.* Biochem Soc Trans. 2007; 35(Pt 2): 231-5.

Ebina Y, Ellis L, Jarnagin K, Edery M, Graf L, Clauser E, Ou JH, Masiar F, Kan YW, Goldfine ID, Roth RA, and Rutter WJ. *The human insulin receptor cDNA: the structural basis for hormone activated transmembrane signalling.* Cell. 1985; 40:747-758.

Edwards RB, Szamier RB. *Defective phagocytosis of isolated rod outer segments by RCS rat retinal pigment epithelium in culture.* Science. 1977; 197(4307):1001-3.

Eisenfeld AJ, LaVail MM, LaVail JH. *Assessment of possible transneuronal changes in the retina of rats with inherited retinal dystrophy: cell size, number, synapses, and axonal transport by retinal ganglion cells.* J Comp Neurol. 1984; 223: 22-34.

Engelman JA, Luo J, Cantley LC. *The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism.* Nat Rev Genet. 2006; 7(8): 606-19.

Erickson PA, Fisher SK, Anderson DH, Stern WH, Borgula GA. *Retinal detachment in the cat: the outer nuclear and outer plexiform layers*. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1983; 24(7):927-42.

Erickson PA, Fisher SK, Guérin CJ, Anderson DH, Kaska DD. *Glial fibrillary acidic protein increases in Müller cells after retinal detachment*. Exp Eye Res. 1987; 44(1):37-48.

Euler T, Wässle H. *Immunocytochemical identification of cone bipolar cells in the rat retina*. J Comp Neurol 1995; 361: 461- 478.

Fariss RN, Molday RS, Fisher SK, Matsumoto B. Evidence from normal and degenerating photoreceptors that two outer segment integral membrane proteins have separate transport pathways. J Comp Neurol. 1997; 387(1):148-56.

Fariss RN, Li ZY, Milam AH. Abnormalities in rod photoreceptors, amacrine cells, and horizontal cells in human retinas with retinitis pigmentosa. Am J Ophthalmol. 2000; 129(2):215-23.

Fasshauer M, Klein J, Kriauciunas KM, Ueki K, Benito M, Kahn CR. *Essential role of insulin receptor substrate 1 in differentiation of brown adipocytes*. Mol Cell Biol. 2001; 21(1):319-29.

Fernandez-Bueno I, Fernández-Sánchez L, Gayoso MJ, García-Gutierrez MT, Pastor JC, Cuenca N. *Time course modifications in organotypic culture of human neuroretina*. Exp Eye Res. 2012; 104:26-38.

Fisher SK, Lewis GP. *Müller cell and neuronal remodeling in retinal detachment and reattachment and their potential consequences for visual recovery: a review and reconsideration of recent data*. Vision Res 2003; 43(8):887-97.

Fisher SK, Lewis GP, Linberg KA, Verardo MR. *Cellular remodeling in mammalian retina: results from studies of experimental retinal detachment*. Prog Retin Eye Res. 2005; 24(3):395-431.

Frasca F, Pandini G, Scalia P, Sciacca L, Mineo R, Costantino A, Goldfine ID, Belfiore A. *Insulin receptor isoform A, a newly recognized, high-affinity insulin-like growth factor II receptor in fetal and cancer cells*. Mol Cell Biol. 1999; 19:3278–3288.

Freude S, Leeser U, Müller M, Hettich MM, Udelhoven M, Schilbach K, Tobe K, Kadowaki T, Köhler C, Schröder H, Krone W, Brüning JC, Schubert M. *IRS-2 branch of IGF-1 receptor signaling is essential for appropriate timing of myelination*. J Neurochem. 2008; 107(4):907-17.

Fry KR, Edwards DM, Shaw KA, Watt CB. *The rabbit retina: a long-term model system for aluminum-induced neurofibrillary degeneration*. *Neurosci Lett*. 1991; 124(2):216-20.

Foti M, Moukil MA, Dudognon P, Carpentier JL. *Insulin and IGF-1 receptor trafficking and signalling*. *Novartis Found Symp*. 2004; 262:125-41.

Galbraith GM, Emerson D, Fudenberg HH, Gibbs CJ, Gajdusek DC. *Antibodies to neurofilament protein in retinitis pigmentosa*. *J Clin Invest*. 1986; 78(4):865-9.

Gallego, A. *Células interplexiformes en la retina del gato*. *Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología*, 1971 MAY; XXXI (5): 299-304.

Gallego-Pinazo R, Zanón-Moreno V, Sanz S, Andrés V, Serrano M, García-Cao I, Pinazo-Durán MD. *Biochemical characterization of the optic nerve in mice overexpressing the P53 gen. Oxidative stress assays*. *Arch Soc Esp Ophthalmol*. 2008; 83(2):105-11.

Galli-Taliadoros LA, Sedgwick JD, Wood SA, Korner H. *Gene knock-out technology: a methodological overview for the interested novice*. *Journal of Immunological Methods*. 1995; 181: 1-15.

Gammeltoft S, Van Obberghen E. *Protein kinase activity of the insulin receptor*. Biochem J. 1986; 235(1):1-11.

Garcia-Barrado MJ, Iglesias-Osma MC, Moreno-Viedma V, Pastor Mansilla MF, Gonzalez SS, Carretero J, Moratinos J, Burks DJ. *Differential sensitivity to adrenergic stimulation underlies the sexual dimorphism in the development of diabetes caused by Irs-2 deficiency*. Biochem Pharmacol. 2011; 81(2):279-88.

Garcia-Ayuso D, Salinas-Navarro M, Agudo M, Cuenca N, Pinilla I, et al. *Retinal ganglion cell numbers and delayed retinal ganglion cell death in the P23H rat retina*. Exp Eye Res. 2010; 91: 800–810.

Gargini C, Terzibasi E, Mazzoni F, Strettoi E. *Retinal organization in the retinal degeneration 10 (rd10) mutant mouse: a morphological and ERG study*. J Comp Neurol. 2007; 500:222–238.

Gastinger MJ, Barber AJ, Khin SA, McRill CS, Gardner TW, Marshak DW. *Abnormal centrifugal axons in streptozotocin-diabetic rat retinas*. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2001; 42:2679-85.

Gastinger MJ, Kunselman AR, Conboy EE, Bronson SK, Barber AJ. *Dendrite remodeling and other abnormalities in the retinal ganglion cells of Ins2 Akita diabetic mice*. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2008; 49(6):2635-42.

Ghosh KK, Bujan S, Haverkamp S, Feigenspan A, Wässle H. *Types of bipolar cells in the mouse retina*. J Comp Neurol. 2004; 469(1):70-82.

Giovannone B, Scaldaferrri ML, Federici M, Porzio O, Lauro D, Fusco A, Sbraccia P, Borboni P, Lauro R, Sesti G. *Insulin receptor substrate (IRS) transduction system: distinct and overlapping signaling potential*. Diabetes Metab Res Rev. 2000; 16(6):434-41.

Goalstone ML, Draznin B. *Insulin signaling*. West J Med. 1997; 167(3):166-73.

Gonzalez E, McGraw TE. *The Akt kinases: isoform specificity in metabolism and cancer*. Cell Cycle. 2009; 8(16):2502-8.

Goto R, Doi M, Ma N, Semba R, Uji Y. *Contribution of nitric oxide-producing cells in normal and diabetic rat retina*. Jpn J Ophthalmol. 2005; 49(5):363-70.

Gouras P, Tanabe T. *Ultrastructure of adult rd mouse retina*. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 2003; 241(5):410-7.

Granada ML. *Factor de crecimiento similar a la insulina y sus proteínas de transporte*. Endocrinol Nutr. 2006; 53(7):467-75.

Greferath U, Grünert U, Wässle H. *Rod bipolar cells in the mammalian retina show protein kinase C-like immunoreactivity.* J Comp Neurol. 1990; 301(3):433-42.

Gresh J, Goletz PW, Crouch RK, Rohrer B. *Structure-function analysis of rods and cones in juvenile, adult, and aged C57bl/6 and Balb/c mice.* Vis Neurosci. 2003; 20(2):211-20.

Grossman GH, Pauer GJ, Narendra U, Peachey NS, Hagstrom SA. *Early synaptic defects in tulp1^{-/-} mice.* Invest Ophthalmol Vis Sci. 2009; 50:3074-83.

Gurevich VV, Gurevich EV. *The structural basis of arrestin-mediated regulation of G-protein-coupled receptors.* Pharmacol Ther. 2006; 110(3):465-502.

Hammes HP, Federoff HJ, Brownlee M. *Nerve growth factor prevents both neuroretinal programmed cell death and capillary pathology in experimental diabetes.* Mol Med. 1997; 1:527-534.

Hay N, Sonenberg N. *Upstream and downstream of mTOR.* Genes Dev. 2004; 18(16):1926-45.

Hara K, Yonezawa K, Sakaue H, Ando A, Kotani K, Kitamura T, Kitamura Y, Ueda H, Stephens L, Jackson TR, et al. *1-Phosphatidylinositol 3-kinase activity is required*

for insulin-stimulated glucose transport but not for RAS activation in CHO cells.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1994; 91(16):7415-9.

Hartong DT, Berson EL, Dryja TP. *Retinitis pigmentosa.* Lancet. 2006; 368(9549):1795-809.

Havrankova J, Roth J, Brownstein M. *Insulin receptors are widely distributed in the central nervous system of the rat.* Nature. 1978; 272 (5656):827-9.

Hennige AM, Burks DJ, Ozcan U, Kulkarni RN, Ye J, Park S, Schubert M, Fisher TL, Dow MA, Leshan R, Zakaria M, Mossa-Basha M, White MF. *Upregulation of insulin receptor substrate-2 in pancreatic beta cells prevents diabetes.* J Clin Invest. 2003; 112(10):1521-32.

Hernández-Sánchez C, López-Carranza A, Alarcón C, de La Rosa EJ, de Pablo F. *Autocrine/paracrine role of insulin-related growth factors in neurogenesis: local expression and effects on cell proliferation and differentiation in retina.* Proc Natl Acad Sci U S A. 1995; 92(21):9834-8.

Herrera AM. *Principios básicos y simples de la tecnología transgénica y knock-out.* Rev CES Med. 2005; 19(1): 43-51.

Hombrebueno JR, Tsai MM, Kim HL, De Juan J, Grzywacz NM, Lee EJ.

Morphological changes of short-wavelength cones in the developing S334ter-3 transgenic rat. Brain Res. 2010; 1321:60-6

Hommes DW, Peppelenbosch MP, van Deventer SJ. *Mitogen activated protein (MAP)*

kinase signal transduction pathways and novel anti-inflammatory targets. Gut. 2003; 52(1):144-51.

Hubel, David. *Ojo, cerebro y visión.* Servicio de publicaciones, Universidad, 1999.

Humayun MS, Prince M, de Juan E Jr, Barron Y, Moskowitz M, Klock IB, Milam AH.

Morphometric analysis of the extramacular retina from postmortem eyes with retinitis pigmentosa. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1999; 40: 143–148.

Ikeda S, Hawes NL, Chang B, Avery CS, Smith RS, Nishina PM. *Severe ocular*

abnormalities in C57BL/6 but not in 129/Sv p53-deficient mice. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1999; 40(8):1874-8.

Inoue G, Cheatham B, Emkey R, Kahn CR. Dynamics of insulin signaling in 3T3-L1

adipocytes. *Differential compartmentalization and trafficking of insulin receptor substrate (IRS)-1 and IRS-2.* J Biol Chem. 1998; 273(19):11548-55.

- Insinna C**, Besharse JC. *Intraflagellar transport and the sensory outer segment of vertebrate photoreceptors*. Dev Dyn. 2008; 237(8):1982-92.
- Inukai K**, Funaki M, Ogihara T, Katagiri H, Kanda A, Anai M, Fukushima Y, Hosaka T, Suzuki M, Shin BC, Takata K, Yazaki Y, Kikuchi M, Oka Y, Asano T. *p85alpha gene generates three isoforms of regulatory subunit for phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-Kinase), p50alpha, p55alpha, and p85alpha, with different PI 3-kinase activity elevating responses to insulin*. J Biol Chem. 1997; 272(12):7873-82.
- Ito M**. *Insulin or bFGF and C2 ceramide increase newborn rat retinal ganglion cell survival rate*. Biochem Biophys Res Commun. 2003; 301(2):564-71.
- Jacobs S**, Hazum E, Shechter Y, Cuatrecasas P. *Insulin receptor: covalent labeling and identification of subunits*. Proc Natl Acad Sci USA. 1979; 76(10):4918-21.
- Jeon C-J**, Strettoi E, Masland RH, 1998. *The major cell populations of the mouse retina*. J Neurosci. 1998; 18: 8936-8946.
- Johnson PT**, Lewis GP, Talaga KC, Brown MN, Kappel PJ, Fisher SK, Anderson DH, Johnson LV. *Drusen-associated degeneration in the retina*. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2003; 44(10):4481-8.
- Jones BW**, Watt CB, Frederick JM, Baehr W, Chen CK, Levine EM, Milam AH, Lavail MM, Marc RE. *Retinal remodeling triggered by photoreceptor degenerations*. J Comp Neurol 2003; 464(1):1-16.

Jones BW, Marc RE. *Retinal remodeling during retinal degeneration*. Exp Eye Res 2005 Aug; 81(2):123-37.

Jones BW, Kondo M, Terasaki H, Lin Y, McCall M, Marc RE. Retinal remodeling. Jpn J Ophthalmol. 2012; 56(4):289-306.

Jones JI, Clemmons DR. *Insulin-like growth factors and their binding proteins: Biological actions*. Endocr Rev. 1995; 16 (1):3-34.

Julien JP. *Neurofilament functions in health and disease*. Curr Opin Neurobiol. 1999; 9(5):554-60.

Kaburagi Y, Satoh S, Tamemoto H, Yamamoto-Honda R, Tobe K, Veki K, Yamauchi T, Kono-Sugita E, Sekihara H, Aizawa S, Cushman SW, Akanuma Y, Yazaki Y, Kadowaki T. *Role of insulin receptor substrate-1 and pp60 in the regulation of insulin-induced glucose transport and GLUT4 translocation in primary adipocytes*. J Biol Chem. 1997; 272(41):25839-44.

Kahn CR. *New concepts in the pathogenesis of diabetes mellitus*. Adv Intern Med. 1996; 41: 285-321.

Kalidas K, Wasson J, Glaser B, Meyer JM, Duprat LJ, White MF, Permutt MA. *Mapping of the human insulin receptor substrate-2 gene, identification of a linked*

polymorphic marker and linkage analysis in families with Type II diabetes: no evidence for a major susceptibility role. Diabetologia. 1998; 41(11):1389-91.

Kasuga M, Karlsson FA, Kahn CR. *Insulin stimulates the phosphorylation of the 95,000-dalton subunit of its own receptor.* Science. 1982; 215:185-187.

Kaufman P, Albert ALM. *Fisiología del ojo. Aplicación clínica.* 10° ed. Madrid: Mosby, 2004.

Keeler C. *Retinal degeneration in the mouse is rodless retina.* J Hered.1966; 57(2):47-50.

Kern TS, Barber AJ. *Retinal ganglion cells in diabetes.* J Physiol. 2008; 586(Pt 18):4401-8.

Kido Y, Burks DJ, Withers D, Bruning JC, Kahn CR, White MF, Accili D. *Tissue-specific insulin resistance in mice with mutations in the insulin receptor, IRS-1, and IRS-2.* J Clin Invest. 2000; 105(2):199-205.

Klein R, Klein Bek, Moss SE, Davis DM, De Mets DL. *The Wisconsin Epidemiology Study of Diabetic retinopathy III prevalence and risk of diabetic retinopathy when age at diagnosis is 30 or more years.* Arch Opht 1984; 102:527-532.

Klippel A, Escobedo JA, Hu Q, Williams LT. *A region of the 85-kilodalton (kDa) subunit of phosphatidylinositol 3-kinase binds the 110-kDa catalytic subunit in vivo.* Mol Cell Biol. 1993; 13(9):5560-6.

Kolb H. *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System; Morphology and Circuitry of Ganglion Cells.* Salt Lake City (UT): University of Utah Health Sciences Center: Kolb H, Fernandez E, Nelson R, editors, 1995.

Kolb H. *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System; Glial Cells of the Retina.* Salt Lake City (UT): University of Utah Health Sciences Center: Kolb H, Fernandez E, Nelson R, editors, 1995.

Kolb H. *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System. Gross Anatomy of the Eye.* Salt Lake City (UT): University of Utah Health Sciences Center; Kolb H, Fernandez E, Nelson R, editors, 1995.

Kolb H. *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System. Roles of Amacrine Cells.* Salt Lake City (UT): University of Utah Health Sciences Center; Kolb H, Fernandez E, Nelson R, editors, 1995.

Kolb H. *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System. Inner Plexiform Layer.* Salt Lake City (UT): University of Utah Health Sciences Center; Kolb H, Fernandez E, Nelson R, editors, 2001.

- Kolb H.** *How the retina work. American scientist.* 2003; 91:28-35.
- Kono M, Goletz PW, Crouch RK.** *11-cis- and all-trans-retinols can activate rod opsin: rational design of the visual cycle.* *Biochemistry.* 2008; 15;47(28):7567-71.
- Kosaka J, Suzuki A, Morii E, Nomura S.** *Differential localization and expression of alpha and beta isoenzymes of protein kinase C in the rat retina.* *J Neurosci Res.* 1998; 54(5):655-63.
- Kotani K, Wilden P, and Pillay TS.** *SH2-Balpa is an insulinreceptor adapter protein and substrate that interacts with theactivation loop of the insulin-receptor kinase.* *Biochem J.* 1998; 335:103–109.
- Kubota N, Tobe K, Terauchi Y, Eto K, Yamauchi T, Suzuki R, Tsubamoto Y, Komeda K, Nakano R, Miki H, Satoh S, Sekihara H, Sciacchitano S, Lesniak M, Aizawa S, Nagai R, Kimura S, Akanuma Y, Taylor SI, Kadowaki T.** *Disruption of insulin receptor substrate 2 causes type 2 diabetes because of liver insulin resistance and lack of compensatory beta-cell hyperplasia.* *Diabetes.* 2000; 49(11):1880-9.
- Kulkarni RN, Brüning JC, Winnay JN, Postic C, Magnuson MA, Kahn CR.** *Tissue-specific knockout of the insulin receptor in pancreatic beta cells creates an insulin secretory defect similar to that in type 2 diabetes.* *Cell.* 1999; 96(3):329-39.

Kyriakis JM, Avruch J. *Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation*. *Physiol Rev*. 2001; 81(2):807-69.

Lambooij AC, van Wely KH, Lindenbergh-Kortleve DJ, Kuijpers RW, Kliffen M, Mooy CM. *Insulin-like growth factor-I and its receptor in neovascular age-related macular degeneration*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003; 44(5):2192-8.

Lavan BE, Lane WS, Lienhard GE. *The 60-kDa phosphotyrosine protein in insulin-treated adipocytes is a new member of the insulin receptor substrate family*. *J Biol Chem*. 1997a; 272(17):11439-43.

Lavan BE, Fantin VR, Chang ET, Lane WS, Keller SR, Lienhard GE. *A novel 160-kDa phosphotyrosine protein in insulin-treated embryonic kidney cells is a new member of the insulin receptor substrate family*. *J Biol Chem*. 1997b; 272(34):21403-7.

Lauro D, Kido Y, Castle AL, Zarnowski MJ, Hayashi H, Ebina Y, Accili D. *Impaired glucose tolerance in mice with a targeted impairment of insulin action in muscle and adipose tissue*. *Nat Genet*. 1998; 20(3):294-8.

Lee MK, Cleveland DW. *Neuronal intermediate filaments*. *Annu Rev Neurosci*. 1996; 19:187-217.

- LeRoith D**, Werner H, Beitner-Johnson D, Roberts CT Jr. *Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor*. *Endocr Rev*. 1995; 16(2):143-63.
- Lewis GP**, Erickson PA, Anderson DH, Fisher SK. *Opsin distribution and protein incorporation in photoreceptors after experimental retinal detachment*. *Exp Eye Res*. 1991; 53(5):629-40.
- Lewis GP**, Linberg KA, Fisher SK. *Neurite outgrowth from bipolar and horizontal cells after experimental retinal detachment*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1998; 39:424–434.
- Lewis GP**, Fisher SK. *Up-regulation of glial fibrillary acidic protein in response to retinal injury: its potential role in glial remodeling and a comparison to vimentin expression*. *Int Rev Cytol*. 2003; 230: 263–290.
- Li G**, Anderson RE, Tomita H, Adler R, Liu X, Zack DJ, Rajala RV. *Nonredundant role of Akt2 for neuroprotection of rod photoreceptor cells from light-induced cell death*. *J Neurosci*. 2007; 27(1):203-11.
- Li ZY**, Kljavin IJ, Milam AH. *Rod photoreceptor neurite sprouting in retinitis pigmentosa*. *J. Neurosci*. 1995; 15 (8), 5429–5438.

Lieth E, Gardner TW, Barber AJ, Antonetti DA. *Retinal neurodegeneration: early pathology in diabetes*. Clin Exp Ophthalmol. 2000; 28:3–8.

Liets LC, Eliasieh K, van der List DA, Chalupa LM. *Dendrites of rod bipolar cells sprout in normal aging retina*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006; 103(32):12156-60.

Lin B, Masland RH, Strettoi E. *Remodeling of cone photoreceptor cells after rod degeneration in rd mice*. Exp Eye Res. 2009; 88(3):589-99.

Lin B, Peng EB. *Retinal Ganglion Cells are Resistant to Photoreceptor Loss in Retinal Degeneration*. PLoS One. 2013; 8(6):e68084.

Liu BA, Jablonowski K, Shah EE, Engelmann BW, Jones RB, Nash PD. *SH2 domains recognize contextual peptide sequence information to determine selectivity*. Mol Cell Proteomics. 2010; 9(11): 2391-404.

Lock P, Casagrande F, and Dunn AR. *Independent SH2- binding sites mediate interaction of Dok-related protein with RasGTPase-activating protein and Nck*. J Biol Chem. 1999; 274: 22775–22784.

Lledó M, Campos E, Cuenca, N. *La transducción visual*. Annals d'oftalmologia. 2010; 18(3):130-136.

Machado-Neto JA, Favaro P, Lazarini M, Costa FF, Olalla Saad ST, Traina F. *Knockdown of insulin receptor substrate 1 reduces proliferation and downregulates Akt/mTOR and MAPK pathways in K562 cells*. *Biochim Biophys Acta*. 2011; 1813(8):1404-11.

Marc RE, Jones BW. *Retinal remodeling in inherited photoreceptor degenerations*. *Mol Neurobiol*. 2003; 28(2): 139-47.

Marc RE, Jones BW, Anderson JR, Kinard K, Marshak DW, Wilson JH, Wensel T, Lucas RJ. *Neural reprogramming in retinal degeneration*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2007; 48(7):3364-71.

Manning BD, Cantley LC. *AKT/PKB signaling: navigating downstream*. *Cell*. 2007; 129(7):1261-74.

Marc RE, Jones BW. *Retinal remodeling in inherited photoreceptor degenerations*. *Mol Neurobiol* 2003; 28(2): 139-47.

Marçal AC, Leonelli M, Fiamoncini J, Deschamps FC, Rodrigues MA, Curi R, Carpinelli AR, Britto LR, Carvalho CR. *Diet-induced obesity impairs AKT signalling in the retina and causes retinal degeneration*. *Cell Biochem Funct*. 2013; 31(1):65-74.

Margolis B, Skolnik EY. *Activation of Ras by receptor tyrosine kinases*. J Am Soc Nephrol. 1994; 5(6):1288-99.

Martín ED, Sánchez-Perez A, Trejo JL, Martín-Aldana JA, Cano Jaimez M, Pons S, Acosta Umanzor C, Menes L, White MF, Burks DJ. *IRS-2 Deficiency impairs NMDA receptor-dependent long-term potentiation*. Cereb Cortex. 2012; 22(8):1717-27.

Martin PM, Roon P, Van Ells TK, Ganapathy V, Smith SB. *Death of retinal neurons in streptozotocin-induced diabetic mice*. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2004; 45(9):3330-6.

Martinez-Navarrete G, Seiler MJ, Aramant RB, Fernandez-Sanchez L, Pinilla I, Cuenca N. *Retinal degeneration in two lines of transgenic S334ter rats*. Exp Eye Res. 2011; 92(3):227-37.

Massague J, Pilch PF, Czech MP. *A unique proteolytic cleavage site on the beta subunit of the insulin receptor*. J Biol Chem. 1981; 256(7):3182-90.

Mayor Menéndez F. *Monografía XXIX: Acción de las hormonas a nivel cerebral. GRKs y arrestinas en la regulación de receptores cerebrales*. Real Academia Nacional de Farmacia. 2010.

McCarthy AM, Elmendorf JS. *GLUT4's itinerary in health & disease*. Indian J Med Res. 2007; 125(3):373-88.

McPherson MJ, Moller SG. *PCR*. Ed Garland Science, 2000.

McGilvery R. *Conceptos bioquímicos*. Barcelona: Reverté, 1977.

MacNeil MA, Masland RH. *Extreme diversity among amacrine cells: implication for function*. Neuron. 1998; 20:971-982.

Malenka RC, Madison DV, Nicoll RA. *Potentiation of synaptic transmission in the hippocampus by phorbol esters*. Nature. 1986 May; 321(6066):175-7.

Marc RE, Jones BW, Watt CB, Strettoi E. *Neural remodeling in retinal degeneration*. Prog Retin Eye Res. 2003; 22(5):607-55.

Marc RE, Jones BW, Anderson JR, Kinard K, Marshak DW, Wilson JH, Wensel T, Lucas RJ. *Neural reprogramming in retinal degeneration*. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2007; 48(7):3364-71.

Martín ED, Sánchez-Perez A, Trejo JL, Martín-Aldana JA, Cano Jaimez M, Pons S, Acosta Umanzor C, Menes L, White MF, Burks DJ. *IRS-2 Deficiency impairs*

NMDA receptor-dependent long-term potentiation. Cereb Cortex. 2012; 22(8):1717-27.

Martin PM, Roon P, Van Ells TK, Ganapathy V, Smith SB. *Death of retinal neurons in streptozotocin-induced diabetic mice.* Invest Ophthalmol Vis Sci. 2004; 45(9):3330-6.

Masland RH, Tauchi M. *The cholinergic amacrine cell.* TINS. 1986; 9:218–223.

Mazzoni F, Novelli E, Strettoi E (2008) *Retinal ganglion cells survive and maintain normal dendritic morphology in a mouse model of inherited photoreceptor degeneration.* J Neurosci 2008; 28 (52): 14282-92.

Meyer-Rüsenberg B, Pavlidis M, Stupp T, Thanos S. *Pathological changes in human retinal ganglion cells associated with diabetic and hypertensive retinopathy.* Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 2007; 245:1009-18.

Mizutani M, Gerhardinger C, Lorenzi M. *Muller cell changes in human diabetic retinopathy.* Diabetes. 1998 ;47:445–449.

Montero C. *Manual teorico-practico de técnicas inmuonohistoquímicas.* Editorial Universitaria Potosina. 1998.

Mora A, Komander D, van Aalten DM, Alessi DR. *PDK1, the master regulator of AGC kinase signal transduction*. Semin Cell Dev Biol. 2004; 15(2):161-70.

Morgans CW. *Neurotransmitter release at ribbon synapses in the retina*. Immunol Cell Biol 2000; 78(4):442-6.

Mouse Genome Sequencing Consortium, Waterston RH, Lindblad-Toh K, Birney E, Rogers J, Abril JF, Agarwal P, et al.,. *Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome*. Nature. 2002; 420(6915):520-62.

Murillo-Cuesta S, Camarero G, González-Rodríguez A, De La Rosa LR, Burks DJ, Avendaño C, Valverde AM, Varela-Nieto I. *Insulin receptor substrate 2 (IRS2)-deficient mice show sensorineural hearing loss that is delayed by concomitant protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) loss of function*. Mol Med. 2012; 18:260-9.

Myers MG Jr, White MF. *Insulin signal transduction and the IRS proteins*. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 1996; 36:615-58.

Nakae J, Kido Y, Accili D. *Distinct and overlapping functions of insulin and IGF-I receptors*. Endocr Rev. 2001; 22(6): 818-35.

Navarro X, Vivó M, Valero-Cabré A. *Neural plasticity after peripheral nerve injury and regeneration*. Prog Neurobiol. 2007; 82(4):163-201.

Navarro X. Chapter 27: *Neural plasticity after nerve injury and regeneration*. Int Rev Neurobiol. 2009; 87:483-505.

Nawy S, Jahr CE. *Time-dependent reduction of glutamate current in retinal bipolar cells*. Neurosci Lett. 1990; 108(3):279-83.

Neganova I, Al-Qassab H, Heffron H, Selman C, Choudhury AI, Lingard SJ, Diakonov I, Patterson M, Ghatei M, Bloom SR, Franks S, Huhtaniemi I, et al.,. *Role of central nervous system and ovarian insulin receptor substrate 2 signaling in female reproductive function in the mouse*. Biol Reprod. 2007; 76(6):1045-53.

Nir I, Papermaster DS. *Immunocytochemical localization of opsin in the inner segment and ciliary plasma membrane of photoreceptors in retinas of rds mutant mice*. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1986; 27(5):836-40.

Nishizuka Y. *Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C*. Science. 1992; 258(5082):607-14.

Noguchi T, Matozaki T, Inagaki K, Tsuda M, Fukunaga K, Kitamura Y, Kitamura T, Shii K, Yamanashi Y, and Kasuga M. *Tyrosine phosphorylation of p62(Dok) induced by cell adhesion and insulin: possible role in cell migration*. EMBO J. 1999; 18: 1748–1760.

Offield MF, Jetton TL, Labosky PA, Ray M, Stein RW, Magnuson MA, Hogan BL, Wright CV. *PDX-1 is required for pancreatic outgrowth and differentiation of the rostral duodenum*. Development. 1996; 122(3):983-95.

Ogihara T, Shin BC, Anai M, Katagiri H, Inukai K, Funaki M, Fukushima Y, Ishihara H, Takata K, Kikuchi M, Yazaki Y, Oka Y, Asano T. *Insulin receptor substrate (IRS)-2 is dephosphorylated more rapidly than IRS-1 via its association with phosphatidylinositol 3-kinase in skeletal muscle cells*. J Biol Chem. 1997; 272(19):12868-73.

Ogihara T, Isobe T, Ichimura T, Taoka M, Funaki M, Sakoda H, Onishi Y, Inukai K, Anai M, Fukushima Y, Kikuchi M, Yazaki Y, Oka Y, Asano T. *14-3-3 protein binds to insulin receptor substrate-1, one of the binding sites of which is in the phosphotyrosine binding domain*. J Biol Chem. 1997; 272(40):25267-74.

Okada T, Kawano Y, Sakakibara T, Hazeki O, Ui M. *Essential role of phosphatidylinositol 3-kinase in insulin-induced glucose transport and antilipolysis in rat adipocytes. Studies with a selective inhibitor wortmannin*. J Biol Chem. 1994; 269(5):3568-73.

Okada M, Matsumura M, Ogino N, Honda Y. *Müller cells in detached human retina express glial fibrillary acidic protein and vimentin*. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 1990; 228(5):467-74.

Olea, JL, Armada F, Fonseca A, Encinas JL, García J, Gómez-Ulla FJ, Ruiz JM, Vilaplana D. *Patología y cirugía de la mácula (sección 1.2. anatomía de la mácula, JL Olea)*. Editado por la Sociedad Española de Oftalmología, 2010.

Olivares JA, Arellano A. *Bases moleculares de las acciones de la insulina*. REB. 27(1): 9-18, 2008.

Osborne NN, Larsen AK. *Antigens associated with specific retinal cells are affected by ischaemia caused by raised intraocular pressure: effect of glutamate antagonists*. Neurochem Int. 1996; 29(3):263-70.

Otsu M, Hiles I, Gout I, Fry MJ, Ruiz-Larrea F, Panayotou G, Thompson A, Dhand R, Hsuan J, Totty N, et al. *Characterization of two 85 kd proteins that associate with receptor tyrosine kinases, middle-T/pp60c-src complexes, and PI3-kinase*. Cell. 1991; 65 (1):91-104.

Ozawa Y, Kurihara T, Sasaki M, Ban N, Yuki K, Kubota S, Tsubota K. *Neural degeneration in the retina of the streptozotocin-induced type 1 diabetes model*. Exp Diabetes Res. 2011; 2011:108328.

Papioannou, V., Johnson, R. *Gene Targeting: A Practical Approach* (ed. Joyner, A.) Ch. 4, pp. 107– 146 (Oxford Univ. Press, Oxford, 1993).

- Park SH**, Park JW, Park SJ, Kim KY, Chung JW, Chun MH, Oh SJ. *Apoptotic death of photoreceptors in the streptozotocin-induced diabetic rat retina*. Diabetologia. 2003; 46(9):1260-8.
- Park CW**, Kim HW, Ko SH, Lim JH, Ryu GR, Chung HW, Han SW, Shin SJ, Bang BK, Breyer MD, Chang YS. *Long-term treatment of glucagon-like peptide-1 analog exendin-4 ameliorates diabetic nephropathy through improving metabolic anomalies in db/db mice*. J Am Soc Nephrol. 2007; 18(4):1227-38.
- Pasteels B**, Rogers J, Blachier F, Pochet R. *Calbindin and calretinin localization in retina from different species*. Vis Neurosci. 1990; 5(1):1-16.
- Passarge E**. *Genética, texto y atlas*. Ed. Panamericana, 3° edición, 2010.
- Patti ME**, Sun XJ, Bruening JC, Araki E, Lipes MA, White MF, Kahn CR. *4PS/insulin receptor substrate (IRS)-2 is the alternative substrate of the insulin receptor in IRS-1-deficient mice*. J Biol Chem. 1995; 270(42):24670-3.
- Pawson T**, Scott JD. *Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins*. Science. 1997; 278: 2075–2080.
- Peichl L**, Gonzales-Soriano J. *Morphological types of horizontal cell in rodent retinae: a comparison of rat, mouse, gerbil, and guinea pig*. Vis Neurosci. 1994; 11:501-517.

Pekny M, Pekna M. Astrocyte intermediate filaments in CNS pathologies and regeneration. *J Pathol.* 2004; 204(4):428-37.

Pennesi ME, Neuringer M, Courtney RJ. *Animal models of age related macular degeneration.* *Mol Aspects Med.* 2012; 33(4):487-509.

Perrault I, Rozet JM, Gerber S, Ghazi I, Leowski C, Ducroq D, Souied E, Dufier JL, Munnich A, Kaplan J. *Leber congenital amaurosis.* *Mol Genet Metab.* 1999; 68(2):200-8.

Phelan JK, Bok D. *A brief review of retinitis pigmentosa and the identified retinitis pigmentosa genes.* *Mol Vis.* 2000; 6:116-24.

Phillips MJ, Otteson D, Sherry D. *Progression of Neuronal and Synaptic Remodeling in the rd10 Mouse Model of Retinitis Pigmentosa.* *J Comp Neurol.* 2010; 518(11): 2071–2089.

Pierce BA. *Genética.* Ed. Médica Panamericana, 2010.

Pilch PF, Czech MP. *Interaction of cross-linking agents with the insulin effector system isolated fat cells. Covalent linkage of 125I-insulin to a plasma membrane receptor protein of 140,000 daltons.* *J Biol Chem.* 1979; 254(9):3375-3381.

Pochet R, Pasteels B, Seto-Ohshima A, Bastianelli E, Kitajima S, Van Eldik LJ. *Calmodulin and calbindin localization in retina from six vertebrate species*. J Comp Neurol. 1991; 314(4):750-62.

Poliak S. *The Retina*. Chicago: The University of Chicago Press, 1941.

Pollak M. *Insulin and insulin-like growth factor signalling in neoplasia*. Nat Rev Cancer 2008; 8 (12):915-28.

Polonsky KS, Sturis J, Bell GI. *Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Non-insulin-dependent diabetes mellitus - a genetically programmed failure of the beta cell to compensate for insulin resistance*. N Engl J Med. 1996; 334(12):777-83.

Pons S, Asano T, Glasheen E, Miralpeix M, Zhang Y, Fisher TL, Myers MG Jr, Sun XJ, White MF. *The structure and function of p55PIK reveal a new regulatory subunit for phosphatidylinositol 3-kinase*. Mol Cell Biol. 1995; 15(8):4453-65.

Preet A, Siddiqui MR, Taha A, Badhai J, Hussain ME, Yadava PK, Baquer NZ. *Long-term effect of Trigonella foenum graecum and its combination with sodium orthovanadate in preventing histopathological and biochemical abnormalities in diabetic rat ocular tissues*. Mol Cell Biochem. 2006; 289(1-2):137-47.

Pruett W, Yuan Y, Rose E, Batzer AG, Harada N, Skolnik EY. *Association between GRB2/Sos and insulin receptor substrate 1 is not sufficient for activation of extracellular signal-regulated kinases by interleukin-4: implications for Ras activation by insulin.* Mol Cell Biol. 1995; 15(3): 1778-85.

Pulido J, *Los requisitos: Retina, coroides y vítreo.* Madrid: Elsevier, 2003.

Puthussery T, Gayet-Primo J, Pandey S, Duvoisin RM, Taylor WR. *Differential loss and preservation of glutamate receptor function in bipolar cells in the rd10 mouse model of retinitis pigmentosa.* Eur J Neurosci. 2009; 29:1533–1542.

Qin Y, Xu G, Wang W. *Dendritic abnormalities in retinal ganglion cells of three-month diabetic rats.* Curr Eye Res. 2006; 31(11):967-74.

Rajala A, Tanito M, Le YZ, Kahn CR, Rajala RV. *Loss of neuroprotective survival signal in mice lacking insulin receptor gene in rod photoreceptor cells.* J Biol Chem. 2008; 283(28):19781-92.

Rajala RV, Rajala A, Brush RS, Rotstein NP, Politi LE. *Insulin receptor signaling regulates actin cytoskeletal organization in developing photoreceptors.* J Neurochem. 2009; (5):1648-60.

Rajala RV, Anderson RE. *Rhodopsin-regulated insulin receptor signaling pathway in rod photoreceptor neurons.* Mol Neurobiol. 2010; 42(1):39-47.

Rajala A, Dighe R, Agbaga MP, Anderson RE, Rajala RV. *Insulin Receptor Signaling in Cones*. J Biol Chem. 2013; 288(27):19503-15.

Rajewsky K, Gu H, Kuhn R, Betz UA, Muller W, Roes J, Schwenk F. *Conditional gene targeting*. Journal of Clinical Investigation. 1996; 98: 600-3.

Ramachandran J. *Human insulin receptor and its relationship to the tyrosine kinase family of oncogenes*. Nature 1985; 313:756–761.

Ramon y Cajal S. *La retine des vertebres*. La Cellule. 1892-1893; 9:119-259.

Ray A, Sun GJ, Chan L, Grzywacz NM, Weiland J, Lee EJ. *Morphological alterations in retinal neurons in the S334ter-line3 transgenic rat*. Cell Tissue Res. 2010; 339(3):481-91.

Reiter CE, Wu X, Sandirasegarane L, Nakamura M, Gilbert KA, Singh RS, Fort PE, Antonetti DA, Gardner TW. *Diabetes reduces basal retinal insulin receptor signaling: reversal with systemic and local insulin*. Diabetes 2006; 55(4):1148-56.

Ren R, Mayer BJ, Cicchetti P, Baltimore D. *Identification of a ten-amino acid proline-rich SH3 binding site*. Science. 1993; 259(5098):1157-61.

Rossomando AJ, Payne DM, Weber MJ, Sturgill TW. *Evidence that pp42, a major tyrosine kinase target protein, is a mitogen-activated serine/threonine protein kinase.* Proc Natl Acad Sci. 1989; 86(18):6940-3.

Ruiz-Ederra J, García M, Hicks D, Vecino E. *Comparative study of the three neurofilament subunits within pig and human retinal ganglion cells.* Mol Vis. 2004; 10:83-92.

Rungger-Brändle E, Dosso AA, Leuenberger PM. *Glial reactivity, an early feature of diabetic retinopathy.* Invest Ophthalmol Vis Sci. 2000; 41(7):1971-80.

Sadowski Y, Stone JC, Pawson T. *A non catalytic domain conserved among cytoplasmic protein- tyrosine kinases modifies the kinase function and transforming activity of Fujinami sarcoma virus P130 gag-fps.* Mol Cell Biol. 1986; 6: 4396-4408.

Saito N. *Differential involvement of PKC subspecies in neuronal function.* Nihon Yakurigaku Zasshi. 1995; 105(3):127-36.

Salazar JJ, Gallego-Pinazo R, de Hoz R, Pinazo-Durán MD, Rojas B, Ramírez AI, Serrano M, Ramírez JM. *"Super p53" mice display retinal astroglial changes.* PLoS One. 2013; 8(6):e65446.

- Salmon WD Jr**, Daughaday WH. *A hormonally controlled serum factor which stimulates sulfate incorporation by cartilage in vitro*. 1956. *J Lab Clin Med*. 1990; 116(3):408-19.
- Samuel MA**, Zhang Y, Meister M, Sanes JR. *Age-related alterations in neurons of the mouse retina*. *J Neurosci*. 2011; 31(44):16033-44.
- Sanger F**, Thompson EO, Kitai R. *The amide groups of insulin*. *Biochem J*. 1955; 59(3):509-18.
- Sapag-Hagar M**, *La unidad bioquímica del hombre. De lo molecular a lo cultural*. Chile: Editorial Universitaria, 2003.
- Sawka-Verhelle D**, Tartare-Deckert S, White MF, Van Obberghen E. *Insulin receptor substrate-2 binds to the insulin receptor through its phosphotyrosine-binding domain and through a newly identified domain comprising amino acids 591-786*. *J Biol Chem*. 1996; 271(11):5980-3.
- Seino S**, Seino M, Nishi S, Bell GI. *Structure of the human insulin receptor gene and characterization of its promoter*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1989; 86(1):114-8.
- Schnedl WJ**, Ferber S, Johnson JH, Newgard CB. *STZ transport and cytotoxicity: specific enhancement in GLUT2-expressing cells*. *Diabetes*. 1994; 43(11):1326-1333.

Schubert M, Brazil DP, Burks DJ, Kushner JA, Ye J, Flint CL, Farhang-Fallah J, Dikkes P, Warot XM, Rio C, Corfas G, White MF. *Insulin receptor substrate-2 deficiency impairs brain growth and promotes tau phosphorylation*. J Neurosci. 2003; 23(18):7084-92.

Schultze SM, Jensen J, Hemmings BA, Tschopp O, Niessen M. *Promiscuous affairs of PKB/AKT isoforms in metabolism*. Arch Physiol Biochem. 2011; 117(2):70-7.

Seeliger MW, Grimm C, Ståhlberg F, Friedburg C, Jaissle G, Zrenner E, Guo H, Remé CE, Humphries P, Hofmann F, Biel M, Fariss RN, Redmond TM, Wenzel A. *New views on RPE65 deficiency: the rod system is the source of vision in a mouse model of Leber congenital amaurosis*. Nat Genet. 2001; 29(1):70-4.

Sesti G, Federici M, Hribal ML, Lauro D, Sbraccia P, Lauro R. *Defects of the insulin receptor substrate (IRS) system in human metabolic disorders*. FASEB J. 2001; 15(12):2099-111.

Sethi CS, Lewis GP, Fisher SK, Leitner WP, Mann DL, Luthert PJ, Charteris DG. *Glial remodeling and neural plasticity in human retinal detachment with proliferative vitreoretinopathy*. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2005; 46: 329–342.

Shampo MA, Kyle RA. *Frederick Sanger--winner of 2 Nobel prizes*. Mayo Clin Proc. 2002; 77(3):212.

Shepherd PR, Withers DJ, Siddle K. *Phosphoinositide 3-kinase: the key switch mechanism in insulin signalling*. Biochem J. 1998; 333 (Pt 3):471-90.

Siddle K. *Signalling by insulin and IGF receptors: supporting acts and new players*. J Mol Endocrinol. 2011; 47(1):R1-10.

Sidman RL, Green MC. *Retinal degeneration in the mouse: Location of the rd locus in linkage group XVII*. J.Heredity 1965; 56:23–29.

Siegel TW, Ganguly S, Jacobs S, Rosen OM, Rubin CS. *Purification and properties of the human placental insulin receptor*. J Biol Chem. 1981; 256(17):9266-9273.

Simon MA, Bowtell DD, Dodson GS, Lavery TR, Rubin GM. *Ras1 and a putative guanine nucleotide exchange factor perform crucial steps in signaling by the sevenless protein tyrosine kinase*. Cell. 1991; 67:701-16.

Smith CM. *Gene-targeting strategies provide an avenue for studying gene function*. Scientist 2000; 14(15): 32.

Sohocki MM, Daiger SP, Bowne SJ, Rodriguez JA, Northrup H, Heckenlively JR, Birch DG, Mintz-Hittner H, Ruiz RS, Lewis RA, Saperstein DA, Sullivan LS. *Prevalence of mutations causing retinitis pigmentosa and other inherited retinopathies*. Hum Mutat. 2001; 17(1):42-51.

Songyang Z, Shoelson SE, Chaudhuri M, Gish G, Pawson T, Haser WG, King F, Roberts T, Ratnofsky S, Lechleider RJ, et al. *SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences*. Cell. 1993; 12; 72(5):767-78.

Stell WK, Lightfoot DO, Wheeler TG, Leeper HF. *Goldfish retina: functional polarization of cone horizontal cell dendrites and synapses*. Science. 1975; 190(4218):989-90.

Stone EM. *Macular degeneration*. Annu Rev Med. 2007; 58:477-90.

Stone JL, Barlow WE, Humayun MS, de Juan E Jr, Milam AH. *Morphometric analysis of macular photoreceptors and ganglion cells in retinas with retinitis pigmentosa*. Arch Ophthalmol. 1992; 110: 1634–1639.

Strauss O, Stumpff F, Mergler S, Wienrich M, Wiederholt M. *The Royal College of Surgeons rat: an animal model for inherited retinal degeneration with a still unknown genetic defect*. Acta Anat (Basel). 1998; 162(2-3):101-11.

Strettoi E, Masland RH. *The number of unidentified amacrine cells in the mammalian retina*. Proc Natl Acad Sci USA. 1996; 93:14906-14911.

Strettoi E, Pignatelli V. *Modifications of retinal neurons in a mouse model of retinitis pigmentosa*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000; 97(20):11020-5.

Strettoi E, Porciatti V, Falsini B, Pignatelli V, Rossi C. *Morphological and functional abnormalities in the inner retina of the rd/rd mouse*. J Neurosci. 2002; 22(13):5492-504.

Sturgill TW, Ray LB. *Muscle proteins related to microtubule associated protein-2 are substrates for an insulin-stimulatable kinase*. Biochem Biophys Res Commun. 1986; 134(2):565-71.

Sullivan R, Penfold P, Pow DV. *Neuronal migration and glial remodeling in degenerating retinas of aged rats and in nonneovascular AMD*. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2003; 44(2):856-65.

Sullivan RK, Woldemussie E, Pow DV. *Dendritic and synaptic plasticity of neurons in the human age-related macular degeneration retina*. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2007; 48(6):2782-91.

Sun XJ, Rothenberg P, Khan CR, Backer JM, Araki E, Wilden PA, Cahill DA, Goldstein BJ, White MF. *Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein*. Nature. 1991; 352:73-77.

Sun XJ, Wang LM, Zhang Y, Yenush L, Myers MG Jr, Glasheen E, Lane WS, Pierce JH, White MF. *Role of IRS-2 in insulin and cytokine signaling*. Nature 1995; 377: 173-177.

Sun XJ, Pons S, Wang LM, Zhang Y, Yenush L, Burks D, Myers MG Jr, Glasheen E, Copeland NG, Jenkins NA, Pierce JH, White MF. *The IRS-2 gene on murine chromosome 8 encodes a unique signaling adapter for insulin and cytokine action.* Mol Endocrinol. 1997; 11(2):251-62.

Sun XJ, Liu F. *Phosphorylation of IRS proteins Yin-Yang regulation of insulin signaling.* Vitam Horm. 2009; 80:351-87.

Taguchi A, Wartschow LM, White MF. *Brain IRS2 signaling coordinates life span and nutrient homeostasis.* Science. 2007; 317 (5836):369-72.

Takahashi Y, Tobe K, Kadowaki H, Katsumata D, Fukushima Y, Yazaki Y, Akanuma Y, Kadowaki T. *Roles of insulin receptor substrate-1 and Shc on insulin-like growth factor I receptor signaling in early passages of cultured human fibroblasts.* Endocrinology. 1997; 138(2): 741-50.

Takamori S, Holt M, Stenius K, Lemke EA, Grønborg M, Riedel D, Urlaub H, Schenck S, Brügger B, Ringler P, Müller SA, Rammner B, Gräter F, Hub JS, De Groot BL, Mieskes G, Moriyama Y, Klingauf J, Grubmüller H, Heuser J, Wieland F, Jahn R. *Molecular anatomy of a trafficking organelle.* Cell. 2006; 127(4):831-46.

- Tamai M**, O'Brien PJ. *Retinal dystrophy in the RCS rat: in vivo and in vitro studies of phagocytic action of the pigment epithelium on the shed rod outer segments*. Exp Eye Res. 1979; 28(4):399-411.
- Tamemoto H**, Kadowaki T, Tobe K, Yagi T, Sakura H, Hayakawa T, Terauchi Y, Ueki K, Kaburagi Y, and Satoh S. (1994) *Insulin resistance and growth retardation in mice lacking insulin receptor substrate-1*. Nature. 1994; 372(6502):182-6.
- Tendler Y**, Weisinger G, Coleman R, Diamond E, Lischinsky S, Kerner H, Rotter V, Zinder O. *issue-specific p53 expression in the nervous system*. Brain Res Mol Brain Res. 1999; 72(1):40-6.
- Terzibasi E**, Calamusa M, Novelli E, Domenici L, Strettoi E, Cellerino A. *Age-dependent remodelling of retinal circuitry*. Neurobiol Aging. 2009; 30(5):819-28.
- To K**, Adamian M, Jakobiec FA, Berson EL. *Histopathologic and immunohistochemical study of dominant cone degeneration*. Am J Ophthalmol. 1998; 126(1):140-2.
- Ullrich A**, Bell JR, Chen EY, Herrera R, Petruzzelli LM, Dull TJ, Gray A, Coussens L, Liao YC, Tsubokawa M, et al. *Human insulin receptor and its relationship to the tyrosine kinase family of oncogenes*. Nature. 1985; 313(6005):756-61.

Vajo Z, Duckworth WC. *Genetically engineered insulin analogs: diabetes in the new millenium*. Pharmacol Rev. 2000; 52(1):1-9.

Valverde AM, Burks DJ, Fabregat I, Fisher TL, Carretero J, White MF, Benito M. *Molecular mechanisms of insulin resistance in IRS-2-deficient hepatocytes*. Diabetes. 2003; 52(9):2239-48.

Van Hooser JP, Liang Y, Maeda T, Kuksa V, Jang GF, He YG, Rieke F, Fong HK, Detwiler PB, Palczewski K. *Recovery of visual functions in a mouse model of Leber congenital amaurosis*. J Biol Chem. 2002; 277(21):19173-82.

Van Obberghen E, Kowalski A. *Phosphorylation of the hepatic insulin receptor: stimulating effect of insulin on intact cells and in a cell-free system*. FEBS Lett.1982; 143, 179-182.

Van Obberghen E, Ballotti R, Gazzano H, Fehlmann M, Rossi B, Gammeltoft S, Debant A, Le Marchand-Brustel Y, Kowalski A. *The insulin receptor kinase*. Biochimie. 1985; 67(10-11):1119-1124.

Vardi N, Matesic DF, Manning DR, Liebman PA, Sterling P. *Identification of a G-protein in depolarizing rod bipolar cells*. Vis Neurosci. 1993; 10(3):473-8.

Vardi N. *Alpha subunit of Go localizes in the dendritic tips of ON bipolar cells*. J Comp Neurol. 1998; 395(1):43-52.

Vasudevan KM, Garraway LA. *AKT signaling in physiology and disease*. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2010; 347:105-33.

Verardo MR, Lewis GP, Takeda M, Linberg KA, Byun J, Luna G, Wilhelmsson U, Pekny M, Chen DF, Fisher SK. *Abnormal reactivity of muller cells after retinal detachment in mice deficient in GFAP and vimentin*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008; 49(8):3659-65.

Vickers JC, Schumer RA, Podos SM, Wang RF, Riederer BM, Morrison JH. *Differential vulnerability of neurochemically identified subpopulations of retinal neurons in a monkey model of glaucoma*. *Brain Res*. 1995; 680(1-2):23-35.

Vidal, A. *Ratones modificados genéticamente: métodos y aplicaciones en endocrinología (I)*:
<http://webs.uvigo.es/endocrinologia/PDFs%202004_05/PDFS/Ratones_mod_AVidal_1.pdf>.

Villegas-Perez MP, Lawrence JM, Vidal-Sanz M, Lavail MM, Lund RD. *Ganglion cell loss in RCS rat retina: a result of compression of axons by contracting intraretinal vessels linked to the pigment epithelium*. *J Comp Neurol*. 1998; 392: 58–77.

Virkamäki A, Ueki K, Kahn CR. *Protein-protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanisms of insulin resistance*. *Protein-protein interaction in*

insulin signaling and the molecular mechanisms of insulin resistance. J Clin Invest. 1999; 103(7):931-43.

Voll CL, Auer RN. *Insulin attenuates ischemic brain damage independent of its hypoglycemic effect.* J Cereb Blood Flow Metab. 1991; 11:1006-14.

Vuong L, Conley SM, Al-Ubaidi MR. *Expression and role of p53 in the retina.* Invest Ophthalmol Vis Sci. 2012; 53(3):1362-71.

Vuong L, Brobst DE, Ivanovic I, Sherry DM, Al-Ubaidi MR. *p53 Selectively Regulates Developmental Apoptosis of Rod Photoreceptors.* PLoS One. 2013; 8(6):e67381.

Wall JT, Xu J, Wang X. *Human brain plasticity: an emerging view of the multiple substrates and mechanisms that cause cortical changes and related sensory dysfunctions after injuries of sensory inputs from the body.* Brain Res Brain Res Rev. 2002; 39(2-3):181-215.

Wang LM, Keegan AD, Paul WE, Heidarman MA, Gutkind JS, Pierce JH. *IL-4 activates a distinct signal transduction cascade from IL-3 in factor-dependent myeloid cells.* EMBO J. 1992; 11(13):4899-908.

- Wang LM**, Myers MG Jr, Sun XJ, Aaronson SA, White M, Pierce JH. *IRS-1: essential for insulin- and IL-4-stimulated mitogenesis in hematopoietic cells*. *Science*. 1993; 261(5128):1591-4.
- Wang J**, Takeuchi T, Tanaka S, et al. *A mutation in the insulin 2 gene induces diabetes with severe pancreatic beta-cell dysfunction in the Mody mouse*. *J Clin Invest*. 1999; 103:27–37.
- Wang S**, Villegas-Perez MP, Vidal-Sanz M, Lund RD. *Progressive optic axon dystrophy and vascular changes in rd mice*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2000; 41: 537–545.
- Wang S**, Lu B, Lund RD. *Morphological changes in the Royal College of Surgeons rat retina during photoreceptor degeneration and after cell-based therapy*. *J Comp Neurol*. 2005; 491(4):400-17.
- Wasserman RH**, Taylor AN. *Vitamin D₃-induced calcium-binding protein in chick intestinal mucosa*. *Science*. 1966; 152(3723):791-3.
- Werbling FS**. *Synaptic connections, receptive fields and patterns of activity in the tiger salamander retina*. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*. 1991; 32: 459-483.

Withers DJ, Gutierrez JS, Towery H, Burks DJ, Ren JM, Previs S, Zhang Y, Bernal D, Pons S, Shulman GI, Bonner-Weir S, White MF. *Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice*. Nature. 1998; 391(6670):900-4.

Withers DJ. *Insulin receptor substrate proteins and neuroendocrine function*. Biochem Soc Trans. 2001; 29(Pt 4):525-9.

White MF. *The insulin signalling system and the IRS proteins*. Diabetologia. 1997;40 Suppl 2:S2-17.

White MF. *The IRS-signalling system: a network of docking proteins that mediate insulin action*. Mol. Cell. Biochem. 1998; 182:3–11.

White MF. *IRS proteins and the common path to diabetes*. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2002; 283(3):413-22.

White MF. *Insulin signalling in health and disease*. Science. 2003; 302:1710-1711.

Withers DJ, Gutierrez JS, Towery H, Burks DJ, Ren JM, Previs S, Zhang Y, Bernal D, Pons S, Shulman GI, Bonner-Weir S, White MF. *Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice*. Nature. 1998; 391:900 –904.

Withers DJ, Burks DJ, Towery HH, Altamuro SL, Flint CL, White MF. *Irs-2 coordinates Igf-1 receptor-mediated beta-cell development and peripheral insulin signalling*. Nat Genet. 1999; 23(1):32-40.

Wolter, JR. *Retinopathy diabetic*. Am J Ophthalmol 1961; 51:1123-1139.

Yaffe MB, Rittinger K, Volinia S, Caron PR, Aitken A, Leffers H, Gamblin SJ, Smerdon SJ, Cantley LC. *The structural basis for 14-3-3:phosphopeptide binding specificity*. Cell. 1997; 91(7):961-71.

Yang Y, Mao D, Chen X, et al. *Decrease in retinal neuronal cells in streptozotocin-induced diabetic mice*. Mol Vis. 2012; 18:1411-20.

Yi X, Schubert M, Peachey NS, Suzuma K, Burks DJ, Kushner JA, et al. *Insulin receptor substrate 2 is essential for maturation and survival of photoreceptor cells*. J Neurosci. 2005; 25:1240-8.

Yip CC, Yeung CW, Moule ML. *Photoaffinity labeling of insulin receptor of rat adipocyte plasma membrane*. J Biol Chem. 1978; 253(6):1743-1745.

Yoshioka M, Kayo T, Ikeda T, Koizumi A. *A novel locus, Mody4, distal to D7Mit189 on chromosome 7 determines early-onset NIDDM in nonobese C57BL/6 (Akita) mutant mice*. Diabetes. 1997; 46:887-894.

Zemva J, Udelhoven M, Moll L, Freude S, Stöhr O, Brönneke HS, Drake RB, Krone W, Schubert M. *Neuronal overexpression of insulin receptor substrate 2 leads to increased fat mass, insulin resistance, and glucose intolerance during aging.* Age (Dordr). 2013; 35(5):1881-97.

Zhang J, Wu SM. *Goalpha labels ON bipolar cells in the tiger salamander retina.* J Comp Neurol. 2003; 461(2):276-89.

Zheng WH, Kar S, Doré S, Quirion R. *Insulin-like growth factor-1 (IGF-1): a neuroprotective trophic factor acting via the Akt kinase pathway.* J Neural Transm Suppl. 2000; (60):261-72.

Zheng L, Anderson RE, Agbaga MP, Rucker EB 3rd, Le YZ. *Loss of BCL-XL in rod photoreceptors: Increased susceptibility to bright light stress.* Invest Ophthalmol Vis Sci. 2006; 47(12):5583-9.

Zhou YP, Teng D, Dralyuk F, Ostrega D, Roe MW, Philipson L, Polonsky KS. *Apoptosis in insulin-secreting cells. Evidence for the role of intracellular Ca²⁺ stores and arachidonic acid metabolism.* J Clin Invest. 1998; 101(8):1623-32.