



03040  
4

EFFECTOS DEL FACTOR DE CRECIMIENTO I TIPO  
INSULINA EN LA MUERTE CELULAR NORMAL DURANTE EL DESARROLLO  
RETINIANO EN ROEDORES

Andrea Gutiérrez de la Barrera

291482

Centro de Neurobiología  
Universidad Nacional Autónoma de México

Tesis que presenta la pasante Andrea Gutiérrez de la Barrera, como un  
requisito para obtener el grado de Maestra en Ciencias.

Asesor de Tesis: Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina

Director de Tesis: Dra. Magdalena Giordano Noyola

Campus Juriquilla, Querétaro. Octubre de 2001.



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

Universidad Nacional Autónoma de México

Centro de Neurobiología

Los miembros del Comité Tutorial certificamos que la tesis elaborada por Andrea Gutiérrez de la Barrera, cuyo título es *“Efectos Del Factor De Crecimiento I Tipo Insulina En La Muerte Celular Normal Durante El Desarrollo Retiniano En Roedores”* se presenta como uno de los requisitos para obtener el grado de Maestría en Ciencias y cumple con los criterios de originalidad y calidad requeridos por la División de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Firma

Presidente Dr. \_\_\_\_\_

Secretario Dr. \_\_\_\_\_

Vocal Dr. \_\_\_\_\_

Suplente Dr. \_\_\_\_\_

Suplente Dr. \_\_\_\_\_

Aprobado por el Comité Académico

\_\_\_\_\_  
Coordinador del Programa

**Resumen**

Las neuronas poseen un programa genético que las conduce a la muerte celular. El establecimiento de una pausa en la ejecución de este programa depende, en cierto grado, de la presencia de factores de crecimiento derivados de los sitios diana a los que las neuronas inervan. Existe, sin embargo, un periodo en el que las neuronas sobreviven y crecen siendo refractarias al efecto de los factores de crecimiento. Esta observación sugiere que las neuronas poseen un mecanismo autocrino que les permite generar sus propios factores de crecimiento, deteniendo así la progresión del programa de muerte celular transitoriamente. Con el objetivo de evaluar esta hipótesis, ratas neonatas fueron inyectadas intraocularmente con distintas dosis del factor de crecimiento I tipo insulina (IGF-I). Este factor es producido por las neuronas ganglionares retinianas, y el descenso de su producción durante el desarrollo del ojo coincide con la muerte de un porcentaje significativo de neuronas de éste tipo. Así, la aplicación de IGF-I en dosis de 100ng/ml incrementó el área de corte de sección del nervio óptico, en parte aumentando el número total estimado de fibras nerviosas. Dosis mayores, sin embargo, tuvieron efectos deletéreos sobre el desarrollo del nervio óptico. Sorprendentemente, la administración intraocular de anticuerpos contra IGF-I (200ng/ml) indujo efectos similares a los observados con el IGF-I, sobre el nervio óptico. Esto explica por que al ser co-administrados, los anticuerpos potencian los efectos del IGF-I, haciendo que 100ng/ml de éste factor tuvieran efectos tóxicos. En conclusión, nuestros resultados apoyan que IGF-I participa como un regulador local de la muerte/supervivencia de al menos una subpoblación de neuronas ganglionares, a través de mecanismos de autocrinia/paracrinia.

**Summary**

The developing neurons possess a genetic program that, when set in motion, leads to cell death. This program can be paused in the presence of neurotrophic factors derived from neuronal targets. Evidence supports, however, the existence of a brief, refractory period in which neurons survive and grow without any apparent dependence of target-derived neurotrophic factors. This observation suggests that neurons may have an autocrine/paracrine source of neurotrophic factors, thus transiently blocking the cell death program. To evaluate this possibility, we injected insulin-like growth factor I (IGF-I) into the eye's posterior chamber in neonatal rats. This factor is produced by retinal ganglion neurons, and a decrease of its production coincides with the death of a significant percentage of this neuron type in the neonatal retina. The administration of 100ng/ml of IGF-I increased the optic nerve area, in part as a result of a greater number of nerve fibers. Higher IGF-I dosages, however, had toxic effects. Surprisingly, the administration of antibodies against IGF-I produced similar effects to those observed with the IGF-I alone, and when co-administered, the antibodies potentiated IGF-I effects. Together these observations suggest the idea that IGF-I modulates retinal ganglion neuron survival and death through paracrine/autocrine mechanisms.

## Agradecimientos

Agradezco profundamente a la Dra. Magdalena Giordano Noyola y al Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina por el gran apoyo brindado para la realización de esta tesis y por haberme brindado la oportunidad de colaborar con ellos; su apoyo, enseñanzas y confianza han sido importantes para mi formación.

Agradezco a la IBQ Lourdes Palma , al Fis. Leopoldo González , al Ing. Rafael Favila y a María Soledad Mendoza Trejo por la ayuda técnica brindada en distintas fases del trabajo.

Agradezco al Dr. Jorge Larriva Saad por su participación y ayuda en el procesamiento y observación de las muestras destinadas para el estudio de microscopía electrónica.

A mis compañeros de laboratorio con quien siempre fue un placer trabajar y de manera muy especial a Fernando Alonso Onofre y Verónica Mireya Rodríguez por estar siempre dispuestos a ayudarme.

A todos los que de una u otra forma contribuyeron para la realización de este trabajo.

## INDICE

Introducción.....	1
Antecedentes.....	2
1. La teoría trófica neuronal.....	8
2. Generalidades sobre apoptosis.....	9
3. Generalidades sobre el factor de crecimiento tipo insulina-1.....	12
4. El IGF-1 y el desarrollo neuronal.....	17
5. El ojo: generalidades sobre su anatomía y fisiología.....	20
6. Citoarquitectura de la retina.....	22
7. Aspectos generales sobre el desarrollo de la retina en mamíferos. Neuronas ganglionares y muerte celular.....	28
Justificación.....	31
Hipótesis.....	32
Objetivo General.....	32
Objetivos específicos.....	32
Material y Métodos.....	33
1. Animales.....	33
2. Procedimientos quirúrgicos.....	34
3. Obtención y procesamiento de las muestras.....	35
4. Obtención y análisis de los datos.....	36
Resultados.....	37
1. Patrón de desarrollo axónico del nervio óptico en los animales normales.....	37
2. Efecto de la administración neonatal intraocular de IGF-1 sobre el área del nervio óptico ocupada por fibras y sobre el número y densidad de axones en el nervio óptico de animales de cinco días de edad.....	40
3. Efecto de la administración neonatal intraocular de anticuerpos monoclonales dirigidos contra IGF-1 sobre el área del nervio óptico ocupada por fibras y sobre el número y densidad de axones en el nervio óptico de animales de cinco días de edad.....	41
4. Efecto de la administración conjunta de IGF-1 y anticuerpo (clona 8E6) al nacimiento sobre el área ocupada por fibras nerviosas en el nervio óptico de animales de cinco días de edad.....	45
Discusión.....	47

Referencias.....55



## INTRODUCCIÓN

Existe evidencia experimental que sustenta la idea de que durante el desarrollo del Sistema Nervioso, los órganos blanco liberan factores de crecimiento capaces de regular el número de neuronas que lo inervarán. (Barres, 1992; Connor, Dragunow, 1998). También se ha propuesto que las neuronas poseen un “programa” de desarrollo que incluye la opción de morir en caso de no recibir el aporte trófico derivado del órgano blanco. Existe una competencia por el factor de crecimiento entre las neuronas en desarrollo que proyectan a un órgano blanco común.

Por otro lado se ha sugerido que las neuronas en desarrollo secretan sus propios factores de crecimiento durante las etapas tempranas del desarrollo neuronal. Estos factores de acción autócrina/parácrina pudieran proveer el aporte trófico necesario para permitir el crecimiento neuronal y mantener pausado el programa de muerte celular hasta que los axones neuronales alcancen sus órganos blanco.

Durante el desarrollo del ojo, las células ganglionares de la retina extienden sus axones formando el nervio óptico hasta llegar a sus órganos blanco, el colículo superior en el mesencéfalo y el cuerpo geniculado lateral en el tálamo. Hay evidencia de que entre el día de nacimiento y los 5 días post natal, el número de fibras en el nervio óptico disminuye sensiblemente. Esta disminución coincide temporalmente con un decremento en los niveles del factor trófico conocido como factor insulínico tipo 1 (IGF-I). Así pues un aumento en la disponibilidad de IGF-I exógeno podría redundar en un aumento en el número de fibras presentes en el nervio óptico. Con la

finalidad de probar esta hipótesis se aplicó intraocularmente IGF-I y se evaluó el área de sección y el número de fibras presentes en el nervio óptico de animales de 5 días de edad.

Los resultados del presente estudio muestran que la aplicación de IGF-I incrementa el área de corte de sección del nervio óptico en parte aumentando el número total estimado de fibras nerviosas, confirmando esto nuestra hipótesis.

Estos resultados indican que posiblemente las neuronas ganglionares presentes en el nervio óptico de la rata, aportan factores tróficos que permiten su sobrevivencia en su trayecto hacia el órgano blanco.

## **Antecedentes**

La formación del sistema nervioso central resulta de la coordinación de distintos eventos entre los que destacan la proliferación celular, la migración celular, la especificación de linajes y posición celulares, y la generación de contactos sinápticos específicos. Uno de los eventos que es particularmente importante para alcanzar un adecuado ensamblaje de los circuitos neuronales es el ajuste y determinación del número de neuronas que inervarán determinado órgano blanco. En invertebrados, esta coordinación numérica entre las células blanco y sus neuronas "inervadoras" está genéticamente determinada. En los mamíferos, sin embargo, existe un balance entre el número de células blanco potenciales localizadas en los territorios blanco y el número de neuronas que las inervan que es sensible a factores "epigenéticos" (Coleman, 1990).

finalidad de probar esta hipótesis se aplicó intraocularmente IGF-I y se evaluó el área de sección y el número de fibras presentes en el nervio óptico de animales de 5 días de edad.

Los resultados del presente estudio muestran que la aplicación de IGF-I incrementa el área de corte de sección del nervio óptico en parte aumentando el número total estimado de fibras nerviosas, confirmando esto nuestra hipótesis.

Estos resultados indican que posiblemente las neuronas ganglionares presentes en el nervio óptico de la rata, aportan factores tróficos que permiten su sobrevivencia en su trayecto hacia el órgano blanco.

## **Antecedentes**

La formación del sistema nervioso central resulta de la coordinación de distintos eventos entre los que destacan la proliferación celular, la migración celular, la especificación de linajes y posición celulares, y la generación de contactos sinápticos específicos. Uno de los eventos que es particularmente importante para alcanzar un adecuado ensamblaje de los circuitos neuronales es el ajuste y determinación del número de neuronas que inervarán determinado órgano blanco. En invertebrados, esta coordinación numérica entre las células blanco y sus neuronas "inervadoras" está genéticamente determinada. En los mamíferos, sin embargo, existe un balance entre el número de células blanco potenciales localizadas en los territorios blanco y el número de neuronas que las inervan que es sensible a factores "epigenéticos"(Coleman, 1990).

El primer ejemplo, y uno de los más claros sobre coordinación numérica entre poblaciones de células blanco y neuronas "inervadoras" en vertebrados fue descrito hace ya unos cincuenta años por Victor Hamburger en el embrión de pollo (Coleman, 1990). En experimentos clásicos de amputación, re-implantación, y sobre-implantación de extremidades, Hamburger y colaboradores demostraron que el número de neuronas motoras espinales cervicales varía dependiendo del número de extremidades presentes. La ausencia de extremidades conduce a una reducción del número de neuronas, mientras que la implantación de extremidades incrementó el número de neuronas cervicales de manera proporcional al número de extremidades supernumerarias implantadas, comparaciones ambas, hechas con respecto a los embriones normales. Otro ejemplo que ilustra el principio de coordinación numérica entre poblaciones de células blanco y neuronas "inervadoras" en un ámbito de desarrollo normal es la variación de las neuronas motoras espinales lumbares entre ambos sexos en mamíferos. En machos, el número de estas neuronas es mayor que en hembras. La diferencia en el número de neuronas responde, en parte, a la existencia de la musculatura responsable de la erección, mejor desarrollada en la región pélvica de los machos (Fawcett, 1992).

Si bien los ejemplos arriba descritos claramente ilustran la capacidad de los órganos blanco para regular el número de neuronas que los inervan, esta evidencia no permite concluir el mecanismo por medio del cual dicho proceso ocurre. Desde la publicación de los resultados del grupo de Hamburger, un número considerable de trabajos se han dedicado, por una parte, a la descripción de otros grupos neuronales y órganos blanco entre

los que el principio de coordinación numérica parece estar ocurriendo, y por la otra, a la identificación de los posibles mecanismos involucrados. En términos generales, todos estos estudios indican que, durante el desarrollo, los órganos blanco liberan factores (de crecimiento), cuya naturaleza es proteica y son capaces de regular el número de neuronas que las inervan. En este escenario, un aumento en la disponibilidad de factores de crecimiento derivados del órgano diana promovería un incremento (hasta cierto punto proporcional) del número de neuronas que lo inervan (i.e., la teoría trófica neuronal). El caso contrario se observaría si existiese una disminución en la disponibilidad de los factores de crecimiento durante el desarrollo del organismo (Barres, 1992; Connor, Dragunow, 1998).

En años recientes, se ha dedicado un gran esfuerzo para esclarecer cuáles son los mecanismos celulares y moleculares por los que los factores de crecimiento derivados de los órganos blanco regulan el número de neuronas que los inervan. Así, se ha propuesto que las neuronas poseen un "programa" de desarrollo que incluye la opción de morir en caso de no recibir el aporte trófico derivado del órgano blanco. Cuando el axón de una neurona alcanza a sus células blanco, éstas le proveen de factores que "pausan" la progresión y ejecución del "programa" de muerte celular fomentando su supervivencia (Jacobson, 1991). No todas las neuronas en desarrollo, sin embargo, reciben el aporte correspondiente de factores de crecimiento, lo que las conduce a sufrir muerte celular. Tres parecen ser los factores importantes que determinan el que una neurona pueda o no acceder al aporte trófico necesario para su subsistencia. El primero de ellos, es la presencia de neuronas vecinas que "buscan" también obtener su soporte

tráfico, lo que conduce a una competencia por el factor de crecimiento entre las neuronas en desarrollo que proyectan a un órgano diana común. El segundo de estos factores, es el grado de restricción en la disponibilidad de los factores de crecimiento liberados por el órgano blanco. Una baja disponibilidad se traduciría en un aumento de la competencia, y así del número de neuronas que mueren. El caso contrario favorecería la supervivencia neuronal. Y, el tercer factor, es la probabilidad de tener acceso al órgano diana correcto. Es conocido que algunas neuronas de una población específica pueden establecer contactos "aberrantes" con sitios blanco que no son sus órganos diana definitivos. Estas neuronas no reciben el aporte trófico que requieren, ni en cantidad ni en especificidad, por lo que mueren a lo largo del desarrollo neural (Jeffery, Perry, 1982; Sefton, Lam, 1984; Milam, 1993).

En resumen, la evidencia experimental hasta ahora disponible sugiere que la relación numérica entre las poblaciones de células blanco de un órgano blanco y las neuronas que las inervan se establece a través de la regulación diferencial de la muerte neuronal. Esta muerte selectiva es el resultado de interacciones competitivas de las neuronas en desarrollo por factores de crecimiento liberados en cantidades minúsculas por las células del órgano blanco<sup>1</sup>. Si bien el postulado central de la llamada teoría trófica neuronal ha sido consolidado a lo largo de los años, evidencia relativamente

---

<sup>1</sup> La disponibilidad de los factores de crecimiento depende, por un lado, del tamaño del órgano diana y del número de células blanco que contenga, y por el otro, de los procesos de regulación de su producción y liberación dentro de marcos espacio-temporales estrictos durante el desarrollo.

reciente apoya la posibilidad de que el control de la progresión del programa de muerte neuronal no sólo sea pausada por factores de crecimiento secretados por los órganos blanco que inervan. Por ejemplo, se conocen diversas hormonas que afectan la supervivencia de las poblaciones neuronales durante el desarrollo del sistema nervioso. Estas hormonas son liberadas al torrente sanguíneo por glándulas que se encuentran distantes a dichas poblaciones neuronales, y por tanto, no constituyen el órgano diana de éstas, al menos no en el sentido en el que la teoría neurotrófica neuronal sugiere. Esto es, no existe inervación directa entre la glándula y la población neuronal afectada por el producto secretorio de aquella (Purves, Lichtman, 1985).

Por otro lado, se ha sugerido que durante un periodo del desarrollo neural, las neuronas en crecimiento son refractarias a los efectos tróficos de los factores de crecimiento. Dicha propiedad se pierde una vez que los axones de las neuronas se encuentran en la vecindad de sus potenciales órganos blanco, una vez alcanzadas ciertas dimensiones celulares, o bien, una vez transcurrido cierto tiempo de desarrollo. Cualquiera que sean los factores que determinan la duración del periodo refractario, es claro que éste fenómeno celular impone un reto a la teoría neurotrófica, al menos durante las etapas tempranas del desarrollo del sistema nervioso central. Si bien el mecanismo que subyace a éste periodo refractario se desconoce, se ha propuesto que existe un programa genético que lo controla en su totalidad. Una alternativa a esta postura puramente "geneticista", es que las neuronas en desarrollo secreten sus propios factores de crecimiento durante las etapas tempranas del desarrollo neuronal. Estos factores de acción

autócrina/parácrina pudieran proveer del aporte trófico necesario y suficiente para permitir el crecimiento neuronal y, al mismo tiempo, mantener pausado el programa de muerte celular hasta que los axones neuronales alcancen sus órganos diana. En apoyo a esta posibilidad, se ha demostrado que la liberación de algunos factores de crecimiento de origen neural (i.e., la neurotrofinas) promueven la formación sináptica actuando de manera autocrina (Pardee, Baserga, Rubin, 1989; Purves, Lichtman, 1985, Purves, 1988).

Con esto en mente, en el presente trabajo evaluamos si los factores de crecimiento modulan la progresión de la muerte neuronal a través de mecanismos autócrino/parácrinos, utilizando como modelo la retina de la rata en desarrollo. Estudios previos han mostrado que el número de neuronas ganglionares en la retina de la rata disminuye dramáticamente durante los primeros cinco días que siguen al nacimiento (Perry, Henderson, Linden, 1983). Se ha sugerido que dicha disminución en el número de neuronas ganglionares resulta de un proceso de muerte celular inducido, al menos en parte, por la disminución del aporte trófico brindado por el mesencéfalo, órgano diana de un porcentaje significativo de neuronas ganglionares. De hecho se ha mostrado que la producción del factor de IGF-I por parte de las neuronas ganglionares también decrece durante el periodo de muerte neuronal (Santucci, Cagiano, Calamandrei, 1994). La coincidencia temporal de estos dos últimos eventos nos plantea la posibilidad de que el IGF-I regule la progresión de la muerte de las neuronas ganglionares, a través de mecanismos autócrino/parácrinos. Es decir, que la muerte celular de las neuronas ganglionares esté regulada tanto por la



producción local de IGF-I, como por la producción de este factor por parte del mesencéfalo. Así, el presente estudio fue diseñado para evaluar esta posibilidad. Es importante destacar que el IGF-I ha sido involucrado en la regulación autócrina/parácrina del crecimiento de distintos tejidos a lo largo del desarrollo. Sería pues interesante evaluar si esta característica se hace extensiva al sistema nervioso central, en donde la expresión postnatal de IGF-I es muy significativa.

En los párrafos que siguen describiremos los tópicos y antecedentes que consideramos son necesarios para contextualizar nuestro trabajo. Dicha descripción dista de intentar ser una revisión exhaustiva, pues esto sale de los objetivos de la presente tesis.

### **1. La teoría trófica neuronal: Revisión de sus postulados básicos**

Un factor determinante para la sobrevivencia de una neurona es la captura de moléculas tróficas presentes en el órgano blanco a través de sus axones terminales, de decir, obteniendo el factor trófico de una manera retrógrada (Primi, Clark, 1996). Sin embargo, se ha demostrado que la sobrevivencia neuronal también es regulada por señales tróficas anterógradas ( Von Barthled, 1996). Se han identificado al menos tres clases de factores neurotróficos; factores de crecimiento, neurotrofinas y las citoquinas. Las neurotrofinas ejercen sus efectos a través de su unión con receptores tipo triocina cinasa que activan señales de transducción, las cuales bloquean la apoptosis y promueven el crecimiento neuronal por la activación de genes específicos (Parnovelae, 2000). Con respecto al IGF-I se ha observado que el IGF-I administrado de manera exógena es transportado por las células ganglionares de la retina hacia el tectum. ( Von Bartheld,

## **2. Generalidades sobre Apoptosis**

Uno de los eventos más importantes durante el desarrollo de los organismos, desde la concepción hasta la vejez, es la muerte rutinaria de las células que lo constituyen. Dicha muerte ayuda a mantener la homeostasis celular (i.e., balance entre génesis y muerte celulares) en tejidos que muestran un recambio celular constante, a modelar la citoarquitectura de los órganos, a remover células transitorias, dañadas o potencialmente dañinas para el organismo, a ajustar el número de células que constituye cada uno de los órganos, y a adecuar el número de células entre poblaciones funcionalmente relacionadas (ver introducción). Alteraciones del proceso de muerte celular pueden conducir a enfermedades neurodegenerativas, autoinmunes, linfoproliferativas y otras neoplasias de índole diversa. Así mismo, la prolongación del periodo en el que las células deben ser eliminadas parece ser la base del proceso de envejecimiento (Baker, Russo, Bernard, D'Ercole, Werther, 1999)

Hasta el momento se han identificado tres mecanismos a través de los cuales las células de cualquier órgano pueden morir. La primera de ellas es la denominada muerte necrótica que ocurre, generalmente, después de infringido un daño agudo al tejido, y se acompaña de una reacción inflamatoria. En la necrosis, las células sufren un choque osmótico y autólisis que las conduce a su ruptura, por lo que vierten su contenido al espacio extracelular generando así una reacción inflamatoria. La muerte celular programada no apoptótica, descrita recientemente en células

pulmonares en cultivo, ocurre en condiciones de hiperoxia y a lo largo de varios días. Aunque la cascada genética y de transducción que subyace a este tipo de muerte celular no ha sido dilucidada completamente, se ha documentado que parte de la respuesta es mediada por la enzima cinasa de Jun, y por los proto-oncogenes c-fos y c-jun. Finalmente, la muerte celular programada apoptótica ocurre en todos los órganos a lo largo del desarrollo, y en general, no se acompaña de respuesta inflamatoria. Morfológicamente, las células que mueren por apoptosis muestran una serie de cambios entre los que destacan la condensación y subsiguiente fragmentación de la cromatina, la ruptura de la membrana nuclear, el desarreglo del citoesqueleto, la dilatación de las cisternas del retículo endoplásmico, la contracción y fragmentación (i.e., cuerpos apoptóticos) del citoplasma y alteraciones de la adhesión celular (Johnson, Harrison, 1997)).

La muerte celular apoptótica requiere de la activación de una cascada genética y de transducción que conllevan a la destrucción de la célula. El programa de muerte celular apoptótica puede activarse por estímulos o señales extracelulares. Por ejemplo, la restricción o el incremento en la concentración de factores de crecimiento en el medio, la presencia o ausencia de algunas citoquinas y hormonas, la presencia de compuestos xenobióticos, la radiación, y el stress oxidativo son todos estímulos que pueden inducir apoptosis. Por otro lado, la habilidad de una célula para sufrir apoptosis en respuesta a ciertas señales depende de la fase del ciclo celular en la que se encuentre, del linaje celular al que pertenezca, de su estado metabólico, y de la presencia y abundancia de factores que previenen o bloquean la progresión del programa de muerte apoptótica (Johnson,

Harrison, 1997)).

En años recientes, y dada la importancia biológica de la apoptosis, se ha dedicado un gran esfuerzo a la dilucidación de la cascada genética y de transducción que subyace al programa de muerte celular apoptótica en los mamíferos. Si bien aún no se conocen todos los factores involucrados, ni se han esclarecido con precisión las formas en que estos factores interaccionan entre sí, los diversos estudios sugieren que la presencia de estímulos pro-apoptóticos inducen la activación de genes pro-apoptóticos cuyos productos interaccionan con componentes de la cadena respiratoria en la membrana interna mitocondrial, y/o inducen cambios en la permeabilidad de la mitocondria. Esto conduce, por un lado, a una alteración energética, y por otro, a la liberación de citocromo C y a la activación de dos medidores químicos denominados APAF-1 y APAF-2, que en turno activan a una cascada proteolítica mediada por una familia de enzimas conocidas como cisteína-aspartato proteasas (caspasas). Las caspasas, a su vez, activan también a través de proteólisis, a las nucleasas responsables de fragmentar al ácido desoxiribonucleico, siendo este último evento uno de los más característicos de la apoptosis. El esquema general arriba descrito dista de ser definitivo pues día con día se descubren nuevas "variaciones sobre el mismo tema" que, con seguridad, irán modificando nuestra visión sobre el mecanismo que conduce a la muerte celular apoptótica.

La apoptosis es un evento regulado. A lo largo de la cascada descrita en el párrafo anterior, distintos son los sitios de regulación hasta ahora identificados. Existen genes y proteínas anti-apoptóticas que previenen la interacción de los factores pro-apoptóticos con los elementos membranales

mitocondriales. Por otro lado, la mayor parte de las enzimas que participan a lo largo de la cascada de apoptosis, se encuentran unidas a proteínas reguladoras que bloquean su actividad. Finalmente, es importante mencionar, por un lado, que la mayor parte de los factores pro-apoptóticos y anti-apoptóticos descritos hasta el momento, son miembros de una misma familia de genes y proteínas. Por el otro lado, cabe destacar que la cascada genética y de transducción que conduce a la apoptosis está altamente conservada a lo largo de la filogenia (Banasiaka, Xiab, Haddadbc, 2000).

TABLA 2. Ejemplos de sustancias y genes que se han involucrado en la apoptosis. (Tomado de Desnoyers, Hengartner, 1997)

Substancias proapoptóticas	Genes proapoptóticos	Genes antiapoptóticos
Factor de necrosis tumoral (TNF) y los receptores Fas/APO-1/CD95 y TNFR-1	bax, bik, bak	bcl-2
Ceramida	bcl-x	bcl-x
Ligando inductor de apoptosis relacioando con TNF (TRAIL)	bad	Rb
Metalproteinasas	p53	Mcl-1
Ligando CD95 (FASL))	c-jun	A1
Perforina; proteína p53	hrk	brag-1, bfl-1

### 3. Generalidades sobre el factor de crecimiento tipo insulina-I (IGF-I).

En el ser humano, el IGF-I es el producto de un gen localizado en el cromosoma 12. El gen para IGF-I tiene una longitud de 95 kilobases y esta constituido por cinco exones y cuatro intrones. La transcripción de este gene, y el procesamiento alternativo del RNA mensajero correspondiente,

puede originar dos pre-pro péptidos. El primero de ellos (IGF-IA) con una longitud de 153 aminoácidos, es codificado por los exones uno al cuatro. El segundo (IGF-IB) con una longitud de 195 aminoácidos, es codificado por los exones uno al tres y cinco. El gen para IGF-I contiene dos promotores en el extremo 5' terminal que son regulados diferencialmente en distintos tipos celulares.

En los vertebrados, el IGF-I pertenece a una familia de tres proteínas que incluye además al IGF-II y a la insulina (De la Rosa, Bondy, Hernández, Wu, Zhou, Carranza, Scavo, De Pablo, 1994). El IGF-I es un péptido de 70 aminoácidos (7500Da de peso molecular) organizados en cuatro dominios denominados A, B, C, y D. El dominio B es importante para la interacción del IGF-I con el receptor tipo 1 y el dominio A es aquél que media la unión de IGF-I a sus proteínas fijadoras (Hill y Pell, 1998). El sitio de unión de IGF-I con su receptor se encuentra ubicado entre los aminoácidos 24 y 60 de su secuencia primaria. El advenimiento de la clonación molecular en la década de los 80 ha probado que los dos IGFs son proteínas altamente conservadas encontrándose en muchas especies de vertebrados (Stewart y Rotwein, 1996). El IGF-I y el IGF-II tienen una homología del 70% y sus dominios A y B son 50% idénticos a las cadenas alfa y beta de la insulina. Por otro lado, el procesamiento alternativo (splicing) del RNA mensajero del IGF-I humano produce proteínas precursoras con diferentes propéptidos. Se han descrito moléculas de IGF-I "truncas" que carecen de los tres primeros residuos del dominio B en extractos fetales de cerebro. Esta variante tiene una menor afinidad por las proteínas fijadoras y se ha observado que es más potente para estimular funciones tipo IGF que el IGF-I completo (Kiess, Kessler,

Schmitt y Fuxe, 1993).

El IGF-I ejerce sus efectos tróficos a través de su unión a receptores específicos situados en la superficie celular. Cada receptor es una glicoproteína tetramérica transmembranal de 330 a 350 KDa de peso molecular. Consiste de dos subunidades alfa y dos beta, unidas por puentes disulfuro que forman el denominado complejo beta - alfa - alfa - beta. Las dos subunidades alfa se localizan en el dominio extracelular del receptor, y median la unión con el ligando. Las dos subunidades beta contienen un pequeño dominio extracelular, uno transmembranal y un dominio citoplasmático. La porción citoplasmática de las subunidades beta contiene un sitio de unión para ATP y un dominio con actividad de tirosina cinasa (Fig. 1). Al unirse el IGF-I a la subunidad alfa, el receptor se activa provocándose así un cambio conformacional de la subunidad beta. Este cambio promueve la activación de la tirosina-cinasa lo que provoca autofosforilación de la subunidad beta. La tirosina cinasa del receptor también fosforila a los substratos endógenos IRS-I e IRS-II (sustrato de respuesta a la insulina, las siglas significan insulin responsive substrate) que al unirse con Grb2 y Sos son translocados a la membrana celular para activar a RAS, una proteína G. La liberación de RAS al citoplasma celular activa una cascada de mediadores intracelulares entre los que destacan Raf, GAP, Sh-PTP2, p85 y Shc (Dartsch, 1999). Así, a través de estos mecanismos intracelulares, el IGF-I regula la expresión genética de proteínas asociadas al control del ciclo y diferenciación celulares.

Los IGFs circulantes se unen a proteínas acarreadoras conocidas como proteínas de unión a IGFs (IGFBPs). Las IGFBPs son un grupo de proteínas

solubles que se unen a los IGFs con alta afinidad. Se han descrito al menos 6 proteínas de unión, las cuales comparten características estructurales; en cada molécula hay 2 regiones ricas en cisteína y las 18 cisteínas se encuentran alineadas. Las proteínas de unión son sintetizadas en diferentes tejidos como hígado, útero, músculo liso y endotelio, y sirven como proteínas transportadoras de los IGFs a través de la sangre. Además de esta función, las IGFBPs prolongan la vida media biológica de los IGFs (Kiess, et al., 1993), ayudan a los IGFs a reconocer tejidos y tipos celulares específicos, controlan la disponibilidad e interacción de los IGFs con sus receptores en la superficie membranal, y modulan las acciones biológicas de los IGFs al liberar sólo cantidades pequeñas de IGF-I libre (Kiess, et al., 1993). Con respecto a éste último aspecto, existen reportes en los que se documenta que las IGFBPs inhiben los efectos mitogénicos o metabólicos de los IGFs (Burch, Correa, Shively, Powell, 1991), mientras que en otros sistemas facilitan o potencian sus efectos (Blum, Jenne, Reppin, Kietzmann, Ranke, Bierich, 1989).

El IGF-I tiene un amplio rango de funciones en el embrión, feto y adulto, además de ejercer diversas acciones en varios procesos biológicos de las células en cultivo. Este péptido promueve la proliferación celular facilitando el paso del ciclo celular de la fase G1 a S (Pardee, Baserga, Rubin, 1989; Sell, Du Menil, 1994) y promoviendo la síntesis de ADN (DiCicco y Black, 1989). Dicho efecto explica el marcado retardo en el crecimiento embrionario y fetal que se observa en ratones con falta de receptor para IGF-I (Liu, Baker, Perkins, Robertson y Estratiadis, 1993). Los ratones transgénicos con falta de este receptor muestran una deficiencia en



el crecimiento corporal, asociada a hipoplasia del músculo esquelético y de la piel, disminución en la maduración pulmonar (Stewart y Rotwein, 1996), retardo en la oscificación y cambios en la arquitectura celular de la médula espinal y cerebro (Liu, et al. 1993). La mayor alteración encontrada en el SNC de ratones deficientes en el receptor a IGF-I fue una marcada disminución de las células no nerviosas especialmente de oligodendrocitos (Liu, et al., 1993). Por otro lado, el IGF-I regula el crecimiento corporal postnatal, la producción de gametos en las gónadas, estimula la reabsorción ósea regulando la actividad osteoclástica, participa como factor quimiotáctico de las células endoteliales promoviendo la angiogénesis, y fomenta la proliferación de los precursores hematopoyéticos de la línea eritroide, entre otras acciones ( Gutiérrez-Ospina, 1997). Desde el punto de vista metabólico, regula la captación de glucosa a través de inducir la producción de los transportadores membranales (Le Roith, 1993).

El IGF-I actúa vía mecanismos autócrinos o parácrinos, es decir se sintetiza, secreta y actúa de manera local. La hormona del crecimiento es el principal regulador hepático de la producción de IGF-I operando principalmente a nivel transcripcional (Mathews, Norstedt, Palmiter, 1986). La hormona de crecimiento también regula los niveles de ARNm para IGF-I en el tejido extrahepático, incluyendo cerebro (Hynes, VanWyck, Brooks, D'Ercole, Jansen y Lund, 1987). El exceso de glucocorticoides puede impedir el crecimiento y desarrollo del organismo mediante mecanismos que incluyen efectos supresivos en el cerebro. Se ha sugerido que estos efectos inhibitorios pueden ser mediados por la reducción en los niveles de ARNm para IGF-I tanto en el hígado como en el cerebro (Straus y Takemoto, 1990).

#### 4. El IGF-I y desarrollo neural

El IGF-I es secretado principalmente en el hígado, pero existe evidencia de que es sintetizado por la mayoría de los tejidos y funciona como factor trófico parácrino o autócrino (Stewart y Rotwein, 1996). En el sistema nervioso, la producción de IGF-I es particularmente abundante durante el desarrollo postnatal temprano (Ishii, 1993 ; Raizada, 1993 ; De Pablo y De la Rosa, 1995). Se ha observado que el IGF-I es secretado, desde la célula de origen, en la vecindad del soma y de los procesos dendríticos (Andersson I,K., Edwall, Morstedt, Rozall , Skottner y Hansson, 1988). Neuronas inmunorreactivas para IGF-I se han detectado en el bulbo olfatorio, neocorteza, tálamo, tectum, hipocampo, núcleo estriado, núcleo endopiriforme, amígdala, núcleos diencefálicos, sustancia nigra, colículo mesencefálico, corteza cerebelosa, tallo cerebral y retina de ratas y pollos en desarrollo y adultas (De Pablo y De la Rosa, 1995). Los niveles decrecen desde el nacimiento hasta el día 14, permaneciendo estables posteriormente (Santucci, et al. 1994 ; Bartlett, Li, Williams y Benkiviv, 1991). Asimismo, el IGF-I, su receptor y sus proteínas de unión se expresan tempranamente en el desarrollo del sistema nervioso central.. El ARNm para IGF-I es muy abundante durante el desarrollo cerebral de la rata (Bondy, 1991; Sara, Sandberg-Nordquist, Carlsson-Skwirut, Bergman, Ayer-LeLievre, 1991; Rotwein, Burgess, Milbrandt, Krause, 1998). El ARNm para IGF-I se expresa de manera transitoria en las células ganglionares de la retina (Lee, et. al., 1992).

El tratamiento con IGF-I estimula la mitosis de neuroblastos simpáticos en cultivo primario (DiCicco-Bloom, 1990), favorece la viabilidad de diferentes

tipos de neuronas (DiCiccio-Bloom y Black, 1990 ; Drago ; Murphy, Carroll, Harvey, Bartlett 1991; D'Mello, Galli, Ciotti y Calissano, 1993) y células gliales (Barres, Hart, Coles, Burne, Voyvodic, Richardson y Raff, 1992) y promueve la diferenciación neuronal y protege ante el daño por excitotoxicidad (D 'Mello, et. al., 1993). Se ha observado que el IGF-I modula el crecimiento neuronal durante el desarrollo de la vía somatosensorial, (Gutiérrez-Ospina, Calikoglu, Ye, y D'Ercole, 1996.) así como el desarrollo dendrítico de neuronas corticales (Niblock, Brunso-Bechtold y Riddle, 2000). Estudios hechos con ratones transgénicos que sobreexpresan IGF-I muestran un incremento en el peso cerebral postnatal debido a un aparente aumento en el número de células así como en el contenido de mielina. (Mathews, L.S., Hammer, R.E., Behringer, R.R., D 'Ercole, A.J., Bell, G.I., Brinster, R.L y Palmiter, R.D. 1988).

De entre las seis IGFBPs que han sido identificadas a la fecha, IGFBP2 e IGFBP5 se expresan principalmente en el cerebro y ambas se presentan en mayor proporción en el parénquima, coincidiendo con la expresión de IGF-I que es durante las primeras dos semanas de vida postnatal (Bondy y Lee, 1993). La IGFBP más abundante en el sistema nervioso central de humano y rata es la IGFBP-2. Durante el desarrollo embrionario temprano en la rata, la IGFBP-2 se localiza en la porción ventral de la médula espinal, en el metencéfalo y en el infundíbulo. Estas son áreas del neuroepitelio que se piensa están involucradas en guiar axones a su órgano blanco (Wood, Brown, Rechler y Pintar 1990). Durante el desarrollo embrionario tardío y hasta el estado adulto, esta proteína de unión se localiza en el plexo coroideo. La IGFBP-2 tiene una relación espacio-temporal con el IGF-I

durante el desarrollo cerebelar y retiniano (Lee, Javedan y Bondy, 1992). Esto sugiere que esta proteína de unión está relacionada con la acción del IGF-I en el sistema nervioso en desarrollo (Lee, Trojanowski, Schlaepfer, 1982). Además, se han generado líneas de ratones transgénicos que expresan ectópicamente IGFBP-1 en cerebro. Estos ratones muestran retardo en el crecimiento cerebral, déficit en el número de neuronas y células gliales, así como una disminución en la sobrevivencia y función de los oligodendrocitos (Ye, Carson, D'Ercole, 1995).

La mayor concentración de receptores de IGF-I en el cerebro se presenta durante el desarrollo embrionario (Drakenberg, Sara, Lindahl y Kewish 1989; Valentino, Ocrant y Rosenfeld 1990) en un patrón similar al de IGFBP-2. Existen receptores para IGFs en numerosas regiones del cerebro. Estos receptores difieren estructuralmente con relación a aquellos presentes en otros tejidos; son significativamente más pequeños y contienen residuos de ácido polisiálico (Le Roith, Roberts, Werner, Bondy, Raizada, Adamo, 1988). Estas diferencias sugieren que los receptores a IGF en el cerebro son específicos para neuronas. También se ha demostrado la presencia de receptores IGF-I en la retina encontrándose altos niveles de expresión en todas sus capas. Ya que el ARNm para IGF-I se expresa en la retina (Waldbilling, Fletcher, Chader, Rajagopalan, Rodríguez, Le Roith 1987; Rosenzweig, A., 1990 en Loughlin y Fallon, 1993), la presencia de éstos receptores sugiere acciones autócrinas y parácrinas de el IGF-I en la retina. En particular, de la Rosa, et al. (1994) detectaron en la retina de pollo ARNm de IGF-I en las células ganglionares desde el día embrionario 9 hasta el 15, en tanto que el ARNm de los receptores a IGF-I, se encontró distribuido

homogéneamente en la retina.

### **5. El ojo: Generalidades sobre su anatomía y fisiología.**

El ojo está formado por tres túnicas de las cuales, la más externa, se conoce como capa fibrosa, la intermedia se denomina vascular y la interna se ha designado con el nombre de retina. La capa fibrosa del ojo está dividida a su vez en dos zonas; la esclerótica en su tres cuartos posteriores y la córnea en el cuarto anterior. La túnica media o vascular también está dividida en la coroides que ocupa los tres cuartos posteriores, y el cuerpo ciliar y el iris que ocupan el cuarto anterior. El cuerpo ciliar está a su vez formado por los procesos ciliares, que sujetan al cristalino o lente, y el músculo ciliar encargado de regular el grado de curvatura del cristalino. El iris, por otro lado, es un disco fino perforado situado delante del cuerpo ciliar, entre el cristalino y la córnea, dotado de un epitelio pigmentario que le provee su color característico. En el centro del iris se define un espacio circular denominado la pupila. El diámetro de la pupila cambia dependiendo del estado de contracción de los músculos esfínter y dilatador de la pupila contenidos en la matriz del iris. Finalmente, la túnica interna esta constituida por la retina que da origen, en su extensión anterior, a la estructura denominada ora serrata .

En términos generales, la túnica fibrosa esta constituida de tejido conectivo tanto en su porción esclerótica como en la corneal. El grado de hidratación de la córnea es muy bajo, con lo que gana transparencia. La córnea constituye el principal medio refractario del ojo, y es encargada de dirigir la luz hacia la retina. La esclera le brinda rigidez y le provee de resistencia al ojo. La túnica media, en su porción coroidea, es la responsable

de proveer vascularización al ojo. Esta constituida, por tanto, de vasos sanguíneos de calibre fino que nutren e intercambian metabolitos de desecho provenientes de las distintas poblaciones celulares localizadas en las tunicas fibrosa e interna del ojo. El cuerpo ciliar, constituido de tejido fibromuscular, sirve de inserción al ligamento del cristalino y es el responsable de modificar, mediante el reflejo de acomodación, la curvatura del mismo, alterando así su capacidad de refracción. A través del reflejo de acomodación, el cuerpo ciliar y el cristalino permiten al ojo enfocar adecuadamente los objetos visualizados. El iris, también parte de la túnica media del ojo, hace las veces un diafragma que permite el paso de la luz en mayor o menor grado mediante el aumento o la reducción, respectivamente, del diámetro de la pupila. La pigmentación de iris, por otro lado, absorbe parte del exceso de luz que incide sobre el ojo.

Finalmente, la túnica interna o retina, contiene a las células sensoriales o fotorreceptores encargadas de la fototransducción, y las neuronas responsables del procesamiento primario de la información visual. Esta es enviada al cerebro a través del nervio óptico el cual esta constituido por los axones de las denominadas neuronas ganglionares. El nervio óptico emerge del ojo por el polo posterior del mismo. Este sitio, llamado punto ciego, no está revestido por la retina por lo que carece de fotorreceptores. Medial al punto ciego se encuentra la mácula y la fovea. Esta última estructura permite la visión diurna de alta discriminación.

Para terminar, entre la córnea y el cristalino se extiende un espacio o cavidad llamada cámara anterior llena de una sustancia líquida clara, el humor acuoso, gracias al cual se mantiene la presión interna del globo

ocular. Además, el humor acuoso producido en los procesos ciliares y reabsorbido en los conductos de Schlemm ubicados en el ángulo irido-corneal, brinda nutrición y un medio de remoción de los metabolitos de desecho a las estructuras oculares vecinas a la cámara anterior. La cavidad delimitada en la parte anterior por el cristalino y en el resto de su diámetro por la retina y ora serrata, se conoce con el nombre de cámara posterior. Este espacio está ocupado por una sustancia gelatinosa constituida por colágena y glicosaminglicanos conocida como humor vítreo. El vítreo provee de soporte físico al ojo lo que le permite mantener su esfericidad, elemento fundamental para la adecuada formación de las imágenes. Además, el vítreo brinda soporte estructural a la retina (Ganong, 1996.; Tresguerres, 1992.)

## **6. Citoarquitectura de la retina**

La retina está organizada en láminas o capas, a saber:

### **6.1 Capa del epitelio pigmentario**

Siendo esta capa la más externa de la retina, se encuentra en estrecha relación con la túnica coroides del ojo. Está constituida por un epitelio cúbico simple que contiene una gran cantidad de pigmento. El epitelio pigmentario tiene funciones muy importantes entre las que destacan la absorción del exceso de luz en el interior del ojo, la fagocitosis de los segmentos externos de los fotorreceptores que se recambian frecuentemente, y fungir como barrera de filtración entre los vasos sanguíneos y el resto de la retina neural..

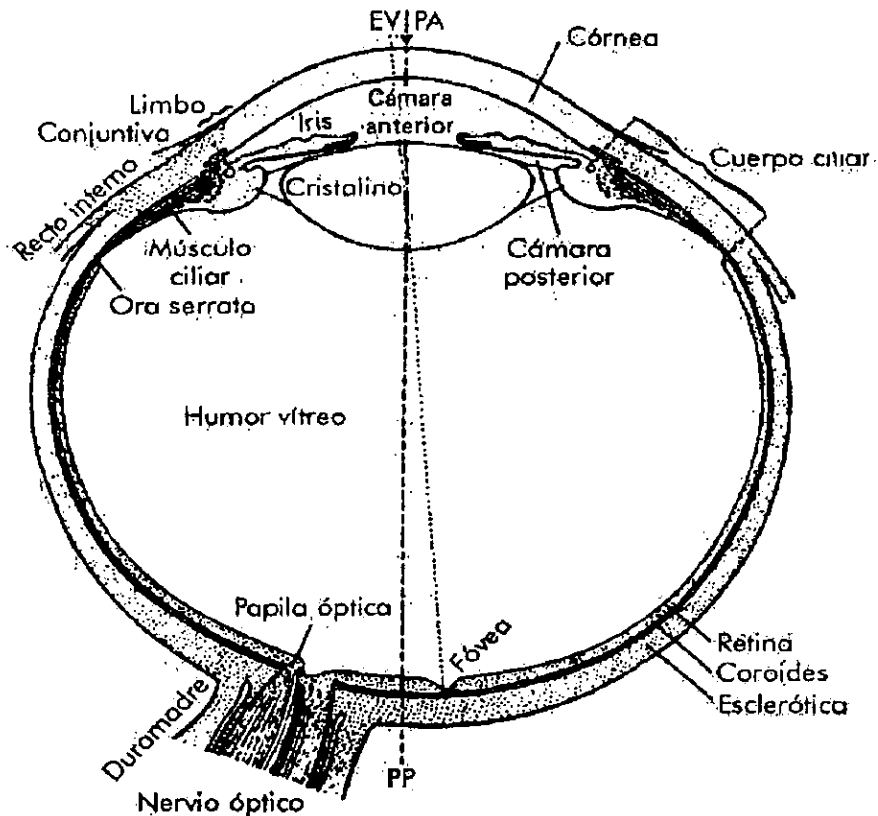


Figura 1 Dibujo de las diferentes estructuras del ojo en mamíferos.

## 6.2 Capa de conos y bastones

Esta lámina de la retina se denomina así porque en ella se encuentran los fotorreceptores o células sensibles a la luz. Existen, en términos generales, dos tipos de fotorreceptores. Los llamados bastones, responsables de transducir los estímulos visuales durante la noche o en lugares de iluminación reducida (i.e., visión nocturna), y los denominados conos, responsables de la visión diurna, a color y de alta discriminación. La distribución de ambos tipos celulares difiere a lo largo de la retina. En la fovea existen solamente conos. Conforme nos dirigimos del polo posterior a las porciones más anteriores de la retina, el porcentaje de conos disminuye mientras que el de bastones aumenta. Los fotorreceptores están constituidos



por tres segmentos de los cuales el conocido como segmento externo muestra una serie de sáculos (bastones) o pliegues membranales (conos) que contienen los pigmentos visuales rodospina para los bastones y opsinas verde, azul y roja para los conos así también denominados. El segmento medio de los fotorreceptores contiene al núcleo de la célula, y finalmente, el segmento interno constituye la terminal desde la cual se libera ácido glutámico hacia el siguiente relevo de la vía, formado por las neuronas bipolares.

### 6.3. *Capa nuclear externa*

Contiene los somas de las neuronas horizontales, además de los segmentos medios o nucleares de los fotorreceptores. Existen al menos cuatro tipos de neuronas horizontales, uno de ellos se relaciona estructural y funcionalmente con los bastones, y los otros tres tipos de células horizontales establecen contactos con los distintos tipos de conos.

### 6.4. *Capa plexiforme externa*

Esta lámina está formada básicamente por los segmentos internos de los fotorreceptores y los procesos postsinápticos o dendritas de las neuronas bipolares. También se encuentran en esta capa las terminales originadas en los procesos de las neuronas horizontales que modulan el paso de la información desde los fotorreceptores hacia las neuronas bipolares.

### 6.5. *Capa nuclear interna*

Esta lámina está formada por los somas de las neuronas bipolares y de las neuronas amacrinas. Como es el caso para las neuronas horizontales, existen distintos tipos de neuronas bipolares y amacrinas. Las neuronas bipolares producen glutamato como neurotransmisor, mientras que las

amacrinas producen una gran diversidad de péptidos y GABA, los que son utilizados para modular el paso de la información desde las neuronas bipolares a las neuronas ganglionares. Un dato interesante de las neuronas amacrinas es que no poseen axones, y los neuromoduladores por ellas producidos son liberados desde sus dendritas.

#### 6.6. *Capa plexiforme interna*

Esta lámina de la retina está constituida de los procesos celulares de las neuronas bipolares, y por los procesos dendríticos de la neuronas amacrinas y de la neuronas ganglionares.

#### 6.7. *Capa de células ganglionares*

Esta lámina contiene los somas de la neuronas ganglionares. Existen diversos tipos de neuronas ganglionares que reciben información de distintos tipos de neuronas bipolares. La neuronas ganglionares constituyen el último relevo sináptico antes de que la información visual salga del ojo al unirse sus axones y formar el nervio óptico.

#### 6.8. *Capa Fibrosa*

Está formada por los axones de las neuronas ganglionares en su recorrido para formar el nervio óptico.

Los elementos neuronales de la retina reciben apoyo estructural y funcional de las células gliales denominadas de Muller. Los procesos de dichas células forman una membrana limitante interna sobre la superficie interna de la retina y una membrana limitante externa en la capa de fotorreceptores. Además de estas células gliales, se encuentran astrocitos y oligodendrocitos entre las fibras del nervio óptico (Ganong, 1996 ; Kandel ,

Schwartz , Jessell , 1991 ; Tresguerres., 1993)

La retina está organizada de forma tal que la información luminosa que alcanza simultáneamente a conos y bastones ubicados en distintas regiones de la misma se transmite también de manera simultánea a lo largo de circuitos en paralelo. Los bastones están organizados de tal manera que la información que reciben converge en la misma interneurona (célula bipolar), es decir, muchos bastones hacen sinapsis con la misma célula. Así mismo, varias neuronas bipolares proyectan a una sola neurona ganglionar. Existe pues un principio de convergencia en la organización estructural y funcional de la retina. Esto disminuye significativamente, por un lado, el porcentaje de área que el cerebro tendría que dedicar al procesamiento de la información visual, y por otro, el tiempo en el que una "cantidad" importante de información alcanza a las neuronas ganglionares, y por tanto, al cerebro. Por otro lado, este arreglo también permite que la retina pueda llevar a cabo las primeras operaciones de filtrado, análisis y procesamiento de la información visual.

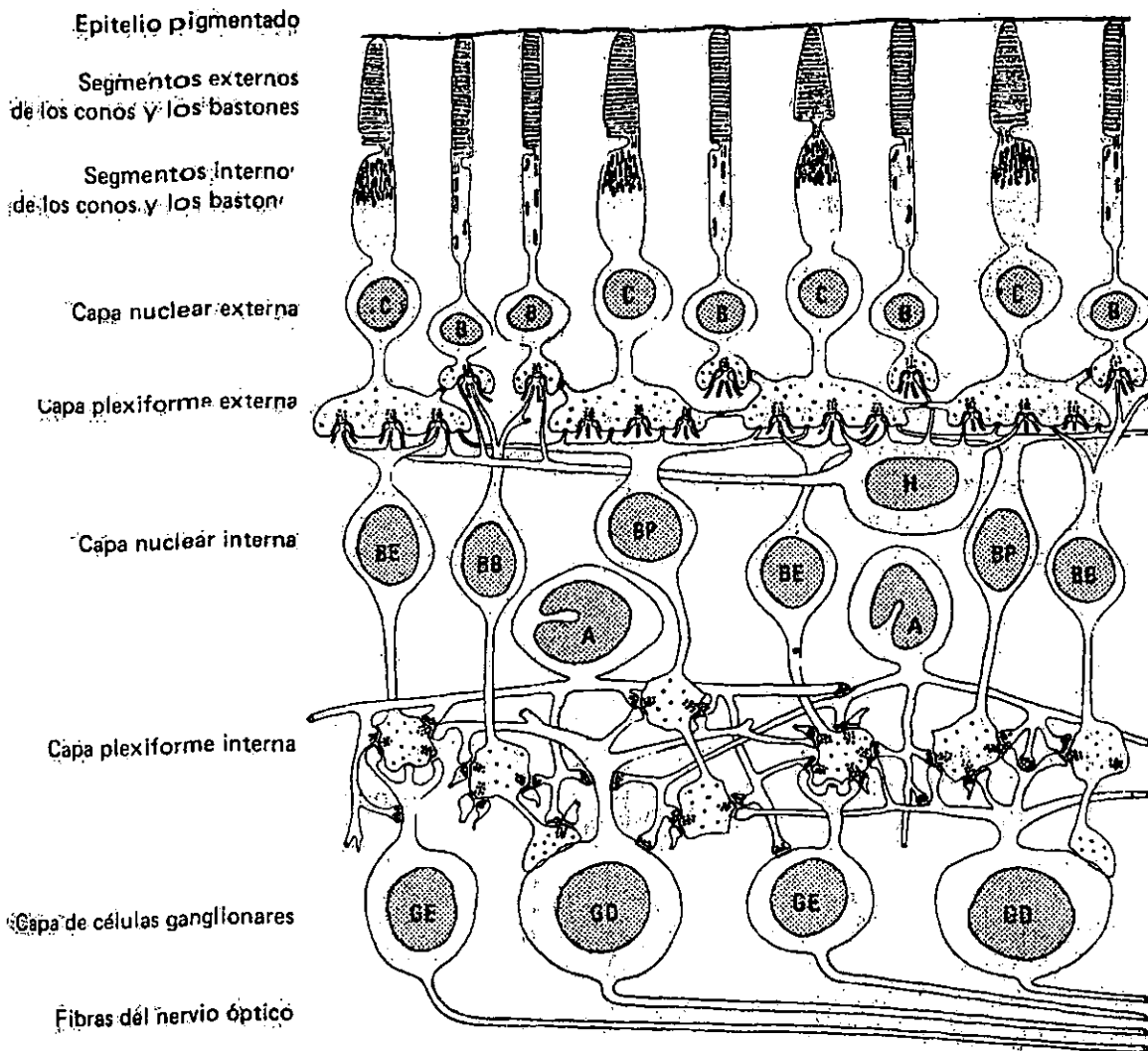


Figura 2. Capas de la retina (Ganong , 1996)

## **7. Aspectos generales sobre el desarrollo de la retina en mamíferos: Neuronas ganglionares y muerte celular**

La formación de los ojos inicia muy temprano en el desarrollo embrionario de los mamíferos. Los primeros eventos relacionados con la formación de los ojos se observan durante la gastrulación cuando el mesodermo se pliega formando la vesícula óptica, la que interactúa con el ectodermo suprayacente a nivel cefálico. Esta interacción provee al ectodermo una tendencia para formar el cristalino (i.e., placoda de cristalino), y al tejido subyacente para diferenciarse en retina. Más tarde, cada vesícula se aplana y gradualmente se invagina para transformarse en una especie de copa óptica formada por dos capas. La capa interna formará posteriormente la capa neural de la retina y la externa formará la capa de células pigmentadas. Las células de la capa interna proliferan y se diferencian en las células de linaje glial o neuronal descritas en la sección previa. Estudios de linaje celular han mostrado que un precursor puede originar tres tipos de neuronas o dos tipos de neuronas y una célula glial. De los tipos celulares presentes en la retina madura, los fotorreceptores son los últimos en diferenciarse. Finalmente, más adelante en el desarrollo y conforme continúa la invaginación de la copa óptica, la apertura hacia el mesencéfalo se vuelve más estrecha dando paso a la formación del tallo óptico que será atravesado por el nervio óptico. El patrón laminar de la retina emerge como resultado de los procesos de proliferación, migración, y sobre todo, muerte celular diferencial durante el desarrollo.

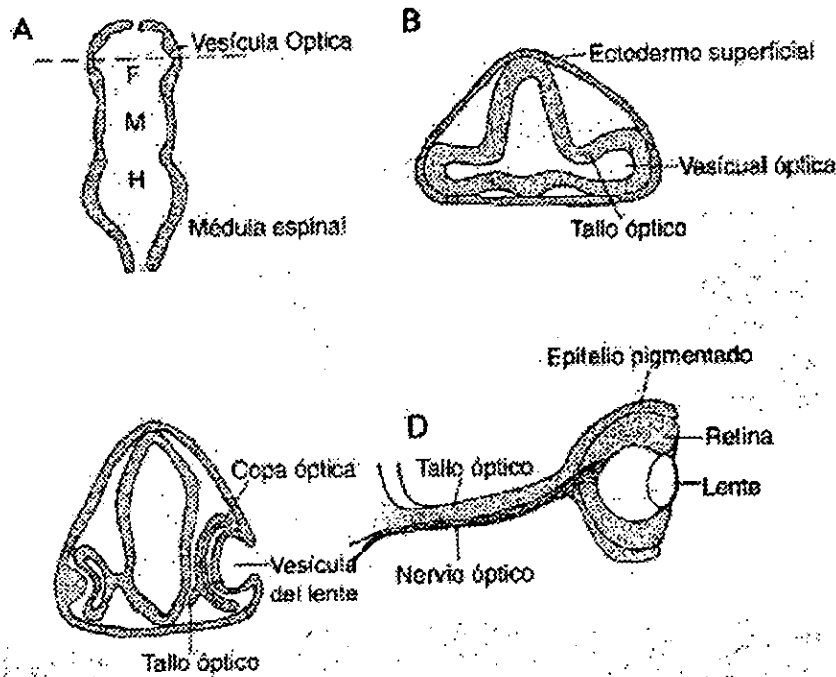


Figura 3 Embriogénesis de la retina. (A) vista dorsal del tubo neural. (B) Las vesículas ópticas se forman por evaginación de las paredes laterales. (C) La invaginación de las vesículas ópticas crea dos capas ópticas. (D) La capa óptica se diferencia en el apitelio pigmentario y la capa neural de la retina (Coleman, 1990)

Al nacimiento, la retina en los mamíferos está aún muy inmadura (Vogel, 1978 ; Hendrickson y Yvodelis, 1984). Esta inmadurez se manifiesta por la alta densidad neuronal, la estructura y densidad de las sinapsis y la morfología de las células de la retina (Coleman, 1990). En particular, las neuronas ganglionares muestran una excesiva cantidad de ramificaciones dendríticas y axónicas, así como de espinas dendríticas y somáticas (Ramoá, Campbell y Shatz, 1988). Al nacimiento, las neuronas ganglionares no responden a la luz. Esto cambia a lo largo del desarrollo postnatal temprano de manera tal que alrededor del día 8 postnatal, el 10% de estas neuronas responden a estímulos visuales, y para el día 13 postnatal, el 100% de las

ellas responden a la presentación de estímulos visuales (Coleman, 1990).

Durante el desarrollo de la retina, se presenta una sobreproducción de células ganglionares. Sin embargo, para el adecuado funcionamiento de la retina se requiere de un mayor refinamiento de los circuitos neuronales. Así, muchas de las neuronas ganglionares mueren durante las primeras dos semanas de vida en distintas especies de mamíferos (Coleman, 1990 ; Lam, et al., 1991; Provis, 1985, Young, 1984 citado en Jacobson, 1993), siendo éste proceso más intenso durante los primeros 2-5 días en los roedores (Young, 1984; citado en Jacobson 1993). Si bien el significado de esta muerte no es claro, el hecho de que corresponda a los periodos de refinamiento de la circuitería mesencefálica y talámica sugiere que estos procesos están relacionados (Jeffrey y Perry, 1982; Rakic y Riley, 1983). No obstante esto, se ha observado que la eliminación de axones en el nervio óptico comienza cuando el núcleo geniculado lateral y el colículo superior se encuentran poco inervados, lo que sugiere que los axones no compiten por espacios sinápticos sino por factores tróficos (Jacobson, 1993). Por otro lado, la muerte de células ganglionares retinianas parece estar involucrada en una serie de ajustes de las proyecciones visuales. El primero de éstos es el desarrollo y convergencia de los procesos de las células bipolares y amacrinas sobre las dendritas de las células ganglionares, lo que genera competencia dendrítica (Linden y Perry, 1982). El segundo, corresponde al ajuste de la densidad numérica de células ganglionares en diferentes áreas de la retina (Sengelaub y Finlay, 1982). Finalmente, la muerte de células ganglionares también está involucrada en la eliminación de axones ópticos desviados; el establecimiento de las aferentes ópticas naso-temporales

requiere de la eliminación de células ganglionares con proyecciones anormales.

En apoyo a los datos que documentan la muerte postnatal de neuronas ganglionares, y teniendo en mente que sus axones forman el nervio óptico, se ha documentado que el número de axones en el nervio óptico de roedores neonatos es mayor que aquel observado en los animales adultos. Hacia el sexto día, sin embargo, el número de fibras que constituyen al nervio óptico en animales neonatos es similar al observado en animales adultos. Con base en lo anterior, se ha estimado que la población de neuronas ganglionares en la retina decrece aproximadamente un 60% durante los primeros 5 días postnatales en los roedores (Lam, et al., 1982; Perry y Linden, 1982).

## **Justificación**

El balance numérico de la poblaciones de neuronas es uno de los eventos más importantes en el desarrollo del sistema nervioso central pues permite ajustar el número de neuronas “inervadoras” al tamaño del órgano diana y al número de células blanco en él contenidas. Se ha sugerido que dicho ajuste numérico es regulado por el órgano blanco a través de la liberación de factores de crecimiento. Debido a que, por un lado, las neuronas “inervadoras” son “sobreproducidas” durante el desarrollo y requieren de factores tróficos para asegurar su subsistencia, y por otro, a que los factores de crecimiento son producidos en cantidades minúsculas por el órgano blanco, muchas de la neuronas en desarrollo mueren por no tener el aporte trófico necesario. No obstante esto, existe un periodo en el que las neuronas



requiere de la eliminación de células ganglionares con proyecciones anormales.

En apoyo a los datos que documentan la muerte postnatal de neuronas ganglionares, y teniendo en mente que sus axones forman el nervio óptico, se ha documentado que el número de axones en el nervio óptico de roedores neonatos es mayor que aquel observado en los animales adultos. Hacia el sexto día, sin embargo, el número de fibras que constituyen al nervio óptico en animales neonatos es similar al observado en animales adultos. Con base en lo anterior, se ha estimado que la población de neuronas ganglionares en la retina decrece aproximadamente un 60% durante los primeros 5 días postnatales en los roedores (Lam, et al., 1982; Perry y Linden, 1982).

## **Justificación**

El balance numérico de la poblaciones de neuronas es uno de los eventos más importantes en el desarrollo del sistema nervioso central pues permite ajustar el número de neuronas “inervadoras” al tamaño del órgano diana y al número de células blanco en él contenidas. Se ha sugerido que dicho ajuste numérico es regulado por el órgano blanco a través de la liberación de factores de crecimiento. Debido a que, por un lado, las neuronas “inervadoras” son “sobreproducidas” durante el desarrollo y requieren de factores tróficos para asegurar su subsistencia, y por otro, a que los factores de crecimiento son producidos en cantidades minúsculas por el órgano blanco, muchas de la neuronas en desarrollo mueren por no tener el aporte trófico necesario. No obstante esto, existe un periodo en el que las neuronas

sobreviven y crecen de manera independiente de la presencia de factores de crecimiento. Este periodo se extiende por varias horas hasta que alcanzan ciertas dimensiones o hasta que llegan a sus órganos diana, después de lo cual, su dependencia por factores de crecimiento derivados del órgano diana se hace absoluta. Estos datos hacen suponer 1) que durante el desarrollo temprano, el programa de muerte no se encuentra en progreso, 2) que las neuronas poseen un programa que contempla un periodo refractario a la influencia de los factores de crecimiento, y 3) que las neuronas poseen un mecanismo que les permite generar sus propios factores de crecimiento, los que actuando de manera autócrina interrumpen la progresión de su programa de muerte celular al menos hasta que su proceso axónico alcance su órgano diana. Esta última posibilidad fue la abordada experimentalmente en el presente trabajo.

## **Hipótesis**

El IGF-I promueve la supervivencia de la neuronas ganglionares en animales neonatos al ser aplicado intraocularmente.

## **Objetivo General**

Evaluar los efectos de IGF-I aplicado intraocularmente sobre la muerte de células ganglionares de la retina en ratas neonatas.

## **Objetivos Específicos**

### Objetivo específico 1.

Establecer el patrón de desarrollo del nervio óptico en ratas neonatas de entre 0 y 10 días de vida, utilizando técnicas de microscopía electrónica.

### Objetivo específico 2.

Determinar el efecto de varias dosis de IGF-I sobre el área del nervio

sobreviven y crecen de manera independiente de la presencia de factores de crecimiento. Este periodo se extiende por varias horas hasta que alcanzan ciertas dimensiones o hasta que llegan a sus órganos diana, después de lo cual, su dependencia por factores de crecimiento derivados del órgano diana se hace absoluta. Estos datos hacen suponer 1) que durante el desarrollo temprano, el programa de muerte no se encuentra en progreso, 2) que las neuronas poseen un programa que contempla un periodo refractario a la influencia de los factores de crecimiento, y 3) que las neuronas poseen un mecanismo que les permite generar sus propios factores de crecimiento, los que actuando de manera autócrina interrumpen la progresión de su programa de muerte celular al menos hasta que su proceso axónico alcance su órgano diana. Esta última posibilidad fue la abordada experimentalmente en el presente trabajo.

## **Hipótesis**

El IGF-I promueve la supervivencia de la neuronas ganglionares en animales neonatos al ser aplicado intraocularmente.

## **Objetivo General**

Evaluar los efectos de IGF-I aplicado intraocularmente sobre la muerte de células ganglionares de la retina en ratas neonatas.

## **Objetivos Específicos**

### Objetivo específico 1.

Establecer el patrón de desarrollo del nervio óptico en ratas neonatas de entre 0 y 10 días de vida, utilizando técnicas de microscopía electrónica.

### Objetivo específico 2.

Determinar el efecto de varias dosis de IGF-I sobre el área del nervio

sobreviven y crecen de manera independiente de la presencia de factores de crecimiento. Este periodo se extiende por varias horas hasta que alcanzan ciertas dimensiones o hasta que llegan a sus órganos diana, después de lo cual, su dependencia por factores de crecimiento derivados del órgano diana se hace absoluta. Estos datos hacen suponer 1) que durante el desarrollo temprano, el programa de muerte no se encuentra en progreso, 2) que las neuronas poseen un programa que contempla un periodo refractario a la influencia de los factores de crecimiento, y 3) que las neuronas poseen un mecanismo que les permite generar sus propios factores de crecimiento, los que actuando de manera autócrina interrumpen la progresión de su programa de muerte celular al menos hasta que su proceso axónico alcance su órgano diana. Esta última posibilidad fue la abordada experimentalmente en el presente trabajo.

## **Hipótesis**

El IGF-I promueve la supervivencia de la neuronas ganglionares en animales neonatos al ser aplicado intraocularmente.

## **Objetivo General**

Evaluar los efectos de IGF-I aplicado intraocularmente sobre la muerte de células ganglionares de la retina en ratas neonatas.

## **Objetivos Específicos**

### Objetivo específico 1.

Establecer el patrón de desarrollo del nervio óptico en ratas neonatas de entre 0 y 10 días de vida, utilizando técnicas de microscopía electrónica.

### Objetivo específico 2.

Determinar el efecto de varias dosis de IGF-I sobre el área del nervio

sobreviven y crecen de manera independiente de la presencia de factores de crecimiento. Este periodo se extiende por varias horas hasta que alcanzan ciertas dimensiones o hasta que llegan a sus órganos diana, después de lo cual, su dependencia por factores de crecimiento derivados del órgano diana se hace absoluta. Estos datos hacen suponer 1) que durante el desarrollo temprano, el programa de muerte no se encuentra en progreso, 2) que las neuronas poseen un programa que contempla un periodo refractario a la influencia de los factores de crecimiento, y 3) que las neuronas poseen un mecanismo que les permite generar sus propios factores de crecimiento, los que actuando de manera autócrina interrumpen la progresión de su programa de muerte celular al menos hasta que su proceso axónico alcance su órgano diana. Esta última posibilidad fue la abordada experimentalmente en el presente trabajo.

## **Hipótesis**

El IGF-I promueve la supervivencia de la neuronas ganglionares en animales neonatos al ser aplicado intraocularmente.

## **Objetivo General**

Evaluar los efectos de IGF-I aplicado intraocularmente sobre la muerte de células ganglionares de la retina en ratas neonatas.

## **Objetivos Específicos**

### Objetivo específico 1.

Establecer el patrón de desarrollo del nervio óptico en ratas neonatas de entre 0 y 10 días de vida, utilizando técnicas de microscopía electrónica.

### Objetivo específico 2.

Determinar el efecto de varias dosis de IGF-I sobre el área del nervio

óptico y el número de axones presentes en el mismo, en ratas neonatas de 5 días de edad utilizando técnicas de microscopía electrónica.

### Objetivo específico 3.

Determinar el efecto de la administración de anticuerpos contra IGF-I sobre el área del nervio óptico y el número de axones presentes en el mismo, en ratas neonatas de 5 días de edad utilizando técnicas de microscopía electrónica.

### Objetivo específico 4.

Determinar si la co-administración de IGF-I y del anticuerpo contra IGF-I previene el efecto del IGF-I sobre el área del nervio óptico y del número de axones presentes en el mismo, en ratas neonatas de 5 días de edad utilizando técnicas de microscopía electrónica.

## **Materiales y Métodos**

### **1. Animales**

Para la ejecución de todos los experimentos descritos en este trabajo se utilizaron crías de rata de ambos sexos de la cepa Sprague-Dawley del vivario del Centro de Neurobiología. Después del nacimiento, las camadas se mantuvieron con agua y alimento a libre acceso y cicladas con 12 horas de luz - 12 horas de oscuridad. Los animales fueron asignados a cuatro grupos: animales control intactos, animales inyectados con IGF-I, animales inyectados con anticuerpos contra IGF-I, y animales inyectados con IGF-I y anticuerpos. Todas las inyecciones intraoculares fueron unilateralmente. El grupo de animales inyectados con IGF-I se subdividió en tres subgrupos de ratas a las que se les administraron dosis diferentes (ver procedimientos quirúrgicos).

óptico y el número de axones presentes en el mismo, en ratas neonatas de 5 días de edad utilizando técnicas de microscopía electrónica.

### Objetivo específico 3.

Determinar el efecto de la administración de anticuerpos contra IGF-I sobre el área del nervio óptico y el número de axones presentes en el mismo, en ratas neonatas de 5 días de edad utilizando técnicas de microscopía electrónica.

### Objetivo específico 4.

Determinar si la co-administración de IGF-I y del anticuerpo contra IGF-I previene el efecto del IGF-I sobre el área del nervio óptico y del número de axones presentes en el mismo, en ratas neonatas de 5 días de edad utilizando técnicas de microscopía electrónica.

## **Materiales y Métodos**

### **1. Animales**

Para la ejecución de todos los experimentos descritos en este trabajo se utilizaron crías de rata de ambos sexos de la cepa Sprague-Dawley del vivario del Centro de Neurobiología. Después del nacimiento, las camadas se mantuvieron con agua y alimento a libre acceso y cicladas con 12 horas de luz - 12 horas de oscuridad. Los animales fueron asignados a cuatro grupos: animales control intactos, animales inyectados con IGF-I, animales inyectados con anticuerpos contra IGF-I, y animales inyectados con IGF-I y anticuerpos. Todas las inyecciones intraoculares fueron unilateralmente. El grupo de animales inyectados con IGF-I se subdividió en tres subgrupos de ratas a las que se les administraron dosis diferentes (ver procedimientos quirúrgicos).

## **2. Procedimientos quirúrgicos**

Transcurridas unas horas después del nacimiento (<10 horas), las crías fueron anestesiadas mediante hipotermia durante 10 min. Se realizó entonces una pequeña incisión sobre los párpados y se inyectó en la cámara posterior de un ojo 1ul de IGF-I recombinante humano (100, 300, 600ng/ $\mu$ l; donado por Genetech Inc.) y/o anticuerpos monoclonales contra IGF-I (clonas 5B7 y 8E6 a 200 ó 400ng/ $\mu$ l; donado por Genetech Inc., San Francisco, CA) con ayuda de una jeringa Hamilton de 10ul. Una vez terminada la infusión, los animales se colocaron en un colchón térmico hasta su recuperación, después de lo cual se regresaron con sus madres. Los animales control recibieron el mismo volumen de vehículo sin IGF-I o anticuerpo.

## **3. Obtención y procesamiento de las muestras**

Las crías fueron anestesiadas por hipotermia y sacrificadas a las edades correspondientes (animales control a los 0,3,5,10 días de vida; animales experimentales a los 5 días de vida). Los animales se perfundieron a través del corazón con una solución amortiguadora de cacodilato de sodio (0.1M, pH 7.4) que contenía glutaraldehído (2.5%) y paraformaldehído (1%). Cada animal se perfundió durante 15 minutos usando un volumen de fijador de 20ml. Los nervios ópticos junto con el quiasma óptico se obtuvieron removiendo la corteza y realizando un corte en el polo posterior del ojo. Los nervios se mantuvieron en amortiguador de cacodilatos hasta su procesamiento. Después de un lavado en el mismo amortiguador, las muestras se sumergieron en tetróxido de osmio al 1% por una hora a temperatura ambiente, se deshidrataron en series graduadas de alcohol o



acetona y se incluyeron en Epon. Se obtuvieron cortes coronales semifinos (1-2  $\mu\text{m}$ ) de cada nervio y se tiñeron con azul de toluidina (2%). También se obtuvieron cortes finos (60-90 nm), que fueron montados en rejillas de cobre (300 mesh) recubiertas de formvar, y contrastados con acetato de uranilo (2%) por 20 minutos y citrato de plomo (2%) durante 10 min. a temperatura ambiente.

#### **4. Obtención y análisis de los datos.**

##### 4.1 Área de sección del nervio, y estimación del área ocupada por vasos sanguíneos y células gliales.

El área de sección transversal del nervio se estimó utilizando los cortes semifinos teñidos con azul de toluidina. Para ello, se obtuvieron dibujos bidimensionales con la ayuda de una cámara lúcida trazando el perímetro total del nervio (320X). Así mismo, para estimar el área ocupada por vasos sanguíneos y células gliales, se contornearon con ayuda de una cámara lúcida, tanto los vasos sanguíneos (320X) como los cuerpos y la mayor parte de los procesos celulares gliales (320X) visibles en el corte. Todos estos dibujos fueron digitalizados y las áreas para cada parámetro obtenidas con ayuda de un sistema computarizado de análisis de imágenes (IPLab). Los valores correspondientes para cada animal fueron utilizados para obtener el promedio por grupo de cada uno de los parámetros. Para determinar el área corregida promedio del nervio por grupo, región ocupada predominantemente por fibras nerviosas, al área total del nervio se le restaron las áreas ocupadas por vasos sanguíneos y por células gliales. El número de cortes dibujados por nervio fue de uno, y el total de nervios así analizados por grupo fue de cuatro o cinco.

#### 4.2 Estimación del número de fibras nerviosas

Las observaciones de los cortes finos se hicieron en un microscopio electrónico (Jeol, Modelo JEM1010 a 80 kV). Con el objeto de estimar el número de fibras nerviosas se obtuvieron al menos cuatro micrografías (12,000X) tomadas al azar de los cortes semifinos obtenidos de cada nervio. Cada micrografía representó  $53 \mu\text{m}^2$ . Así, se contabilizaron el número total de fibras nerviosas por micrografía. Estos valores se promediaron con el objeto de estimar el número de fibras en  $53 \mu\text{m}^2$  para cada nervio de cada animal. Con la finalidad de estimar el número total promedio de fibras en cada uno de los grupos de animales estudiados, se multiplicó el número de fibras promedio en  $53 \mu\text{m}^2$  por el valor promedio del área corregida del nervio óptico para cada grupo. El número de cortes fotografiados por nervio fue de al menos cuatro, y el total de nervios así analizados por grupo fue de cuatro a cinco en cada experimento.

#### 4.3 Análisis estadístico de los datos

Para cada animal se obtuvieron los valores promedio de los diferentes parámetros estudiados. Para evaluar el efecto de los diferentes factores se utilizó un análisis de varianza de Kruskal Wallis, seguido de la prueba de U de Mann-Whitney para comparar áreas y número de axones entre pares de grupos. El nivel de significancia elegido fue  $p < 0.05$ .

## RESULTADOS

### 1. PATRÓN DE DESARROLLO AXÓNICO DEL NERVIÓ ÓPTICO EN LOS ANIMALES NORMALES.

La figura 4 ilustra el patrón de desarrollo del nervio óptico en animales normales a lo largo de los diez primeros días de vida postnatal. Los nervios ópticos en los animales recién nacidos muestran una gran cantidad de fibras no mielinizadas de calibre pequeño (Figura 4a). Conforme el desarrollo avanza, el número de fibras disminuye y su diámetro aumenta notoria y progresivamente durante los primeros 10 días de edad (Figura 4b, c, d). Los primeros nervios mielinizados se empiezan a observar alrededor del día postnatal 5 (Figura 4c) y con mayor frecuencia el día postnatal 10 (Figura 4d). Estos resultados concuerdan con aquellos previamente reportados por otros autores (Lam, et al. 1982; Perry, et al., 1983; Sefton y Lam, 1984).

Con relación al área promedio ocupada por fibras nerviosas, estimada al restar las áreas promedio ocupadas por glia y por vasos sanguíneos del área total de sección del nervio óptico, se mostró que decremента significativamente (prueba de Kruskal-Wallis:  $H(3, n=16) = 12.40, p < 0.02$  seguida de prueba U de Mann-Whitney  $U = 0.0, p < 0.05$ ) a lo largo de los 5 primeros días de vida (Figura 5a), con respecto a los animales recién nacidos. Dicho decremento quizás refleje la eliminación de axones durante este periodo (Lam, et al., 1982; Perry, et al., 1983; Sefton y Lam, 1984; también ver abajo). Después de los 5 días de edad, el área del nervio óptico ocupada por fibras aumenta de manera significativa

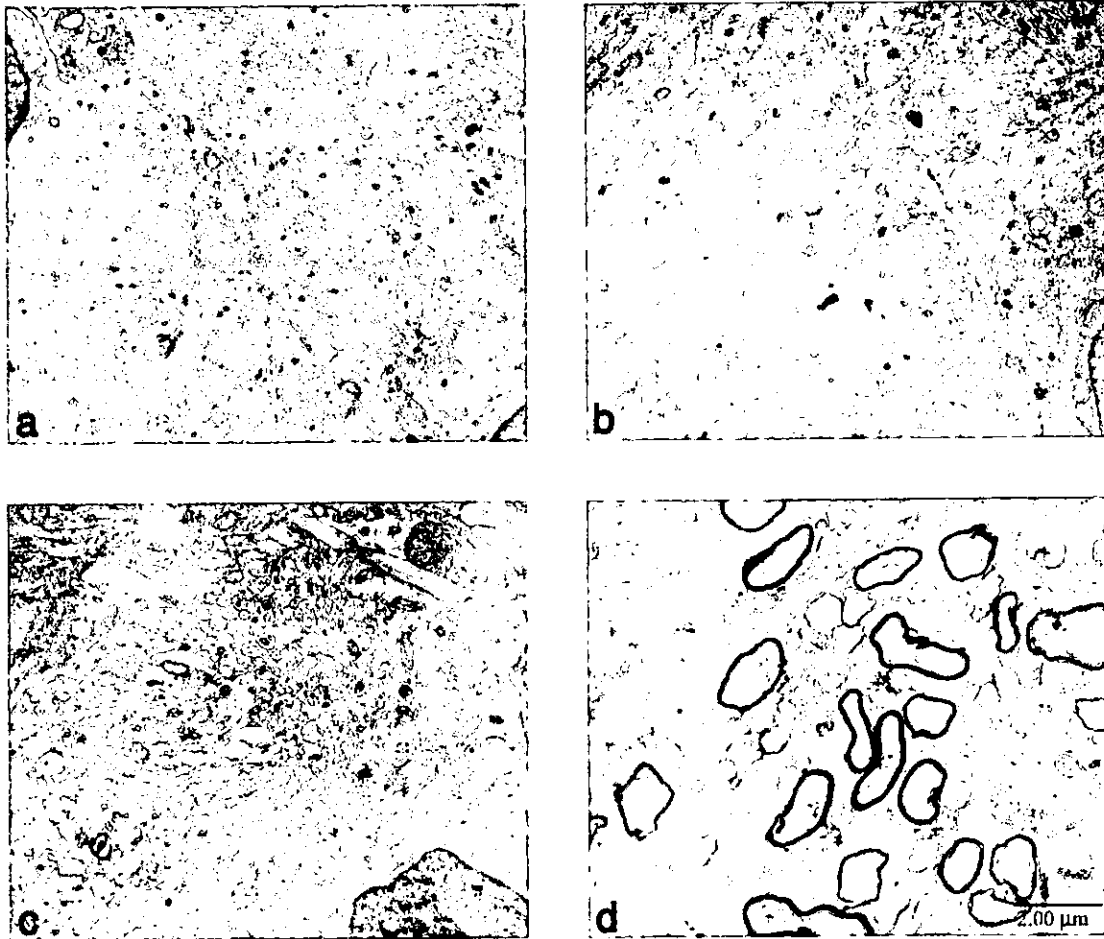
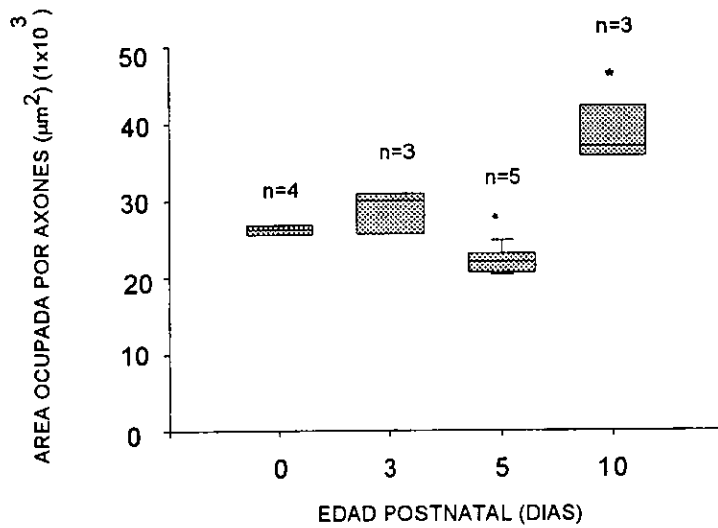
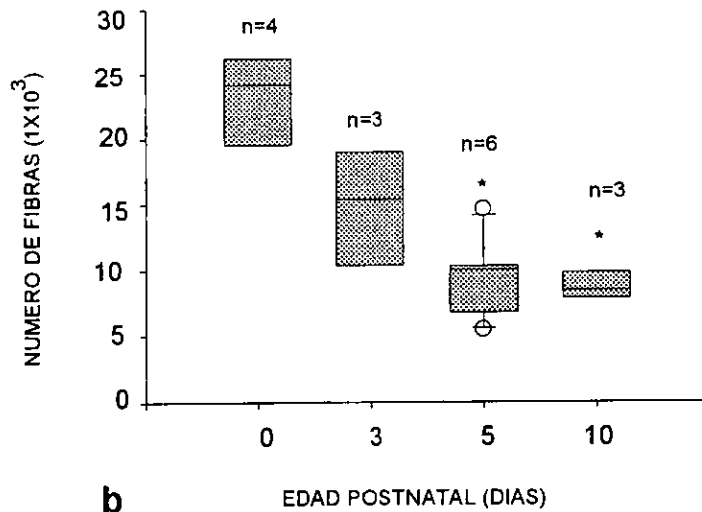


Figura 4. Micrografías que muestran el aspecto y grado de maduración de axones en el nervio óptico de ratas recién nacidas (a) , y de 3 (b) , 5 (c), y 10 (d) días de edad. Nótese la diferencia en el número, diámetro y grado de mielinización de las fibras a distinta edad.



a



b

Figura 5. a) Gráfico que muestra las variaciones del área ocupada por fibras nerviosas en los nervios ópticos de ratas control de distinta edad postnatal. Estas variaciones son significativas según la prueba Kruskal Wallis ( $H(3, n=16) = 12.40, p < 0.02$ ). b) Gráfico que muestra la disminución de las fibras nerviosas estimadas en los nervios ópticos de ratas de distinta edad postnatal ( $H(3, n=16) = 9.09, p < 0.05$ ). Se representan las medianas, el extremo superior de cada rectángulo represente el cuartil 75 y el inferior el cuartil 25, la barra superior representa el centil 90 y la inferior el centil 10, en algunos casos se muestran los puntajes más extremos (círculos vacíos). \* significativamente diferente del día 0, según prueba U de Mann-Whitne

( $U= 0.00$ ,  $p<0.05$  Figura 2a), con relación a los animales neonatos. Este efecto quizás resulte del incremento en el diámetro individual y del proceso de mielinización de las fibras nerviosas que constituyen al nervio óptico (compare Figura 4a y d).

En contraste con el comportamiento bimodal del área ocupada por axones en el nervio óptico, el número de fibras nerviosas decrece significativamente, con relación a los valores al nacimiento, a lo largo de los primeros 10 días de edad (prueba de Kruskal-Wallis:  $H(3, n=16)= 9.09$ ,  $p<0.05$ ). Este decremento es abrupto durante los primeros 5 días, para luego estabilizarse entre esta edad y los 10 días de vida (Figura 5b). Finalmente, la densidad de fibras nerviosas por unidad de área también disminuye con la edad (prueba de Kruskal-Wallis:  $H(3, n=16)= 11.12$ ,  $p<0.05$ , datos no mostrados). Todos los grupos difirieron significativamente al ser comparados contra el grupo al nacimiento ( $U=0.0$ ,  $p<0.05$ ) con excepción del grupo de 3 días de edad en número de fibras por área ocupada por axones (Figura 5b).

## **2. EFECTO DE LA ADMINISTRACION NEONATAL INTRAOCULAR DE IGF-I SOBRE EL ÁREA DEL NERVIO ÓPTICO OCUPADA POR FIBRAS, Y SOBRE EL NÚMERO Y DENSIDAD DE AXONES EN EL NERVIO ÓPTICO DE ANIMALES DE CINCO DÍAS DE EDAD.**

La administración neonatal intraocular de IGF-I produjo efectos diferentes, dependiendo de la dosis, sobre el desarrollo del nervio óptico al ser evaluados en animales de cinco días de edad. La aplicación de  $100\text{ng}/\mu\text{l}$

y 300ng/ $\mu$ l condujo a un incremento del área ocupada por axones (Figura 6a), con relación a los animales control de la misma edad. En contraste, aquellos nervios provenientes de ojos tratados con una dosis de 600ng/ $\mu$ l de IGF-I no mostraron cambio alguno en el área presumiblemente ocupada por fibras nerviosas (Figura 6a).

Solamente se estimó el número y la densidad de fibras en los nervios ópticos de animales tratados con 100ng/ $\mu$ l de IGF-I intraocular. A esta dosis, IGF-I incrementó significativamente el número de axones en el nervio óptico (Figura 6b), aunque no modificó su densidad (fibras por unidad de área) con respecto a los animales control de la misma edad (promedio en los controles  $3.63 \pm 0.84$  y tratados con IGF-I  $4.06 \pm 0.66$ ). Esta constancia en la densidad de fibras nerviosas en el nervio óptico de animales tratados intraocularmente con IGF-I, no obstante el incremento en el número de fibras, puede ser el resultado del incremento en el área ocupada por fibras observado en estos animales.

### **3. EFECTO DE LA ADMINISTRACION NEONATAL INTRAOCULAR DE ANTICUERPOS MONOCLONALES DIRIGIDOS CONTRA IGF-I SOBRE EL ÁREA DEL NERVIÓ ÓPTICO OCUPADA POR FIBRAS, Y SOBRE EL NÚMERO Y DENSIDAD DE AXONES EN EL NERVIÓ ÓPTICO DE ANIMALES DE CINCO DÍAS DE EDAD.**

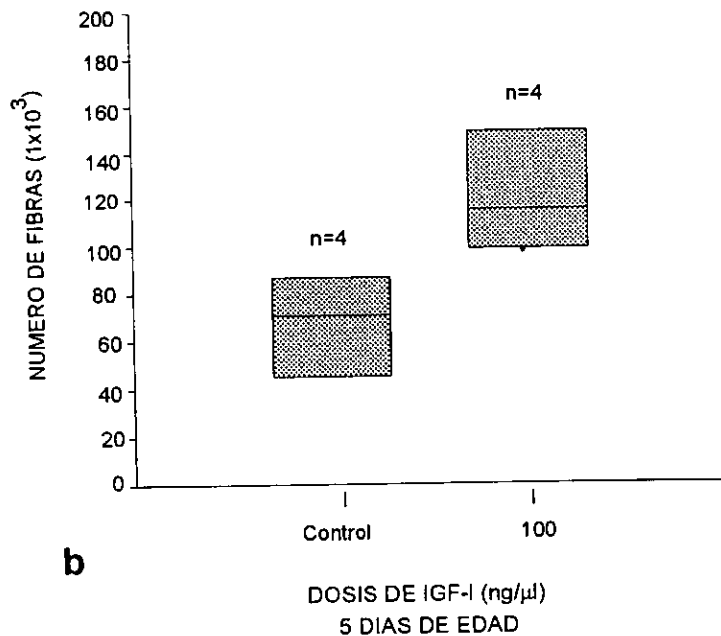
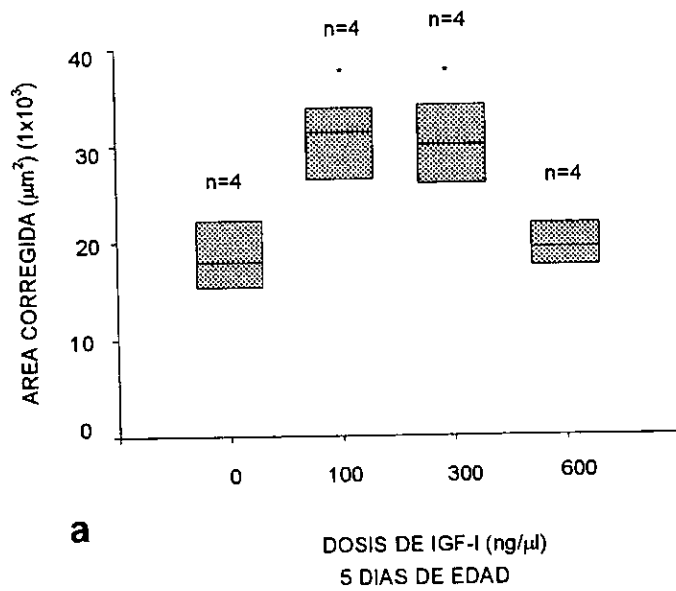


Figura 6. a) Gráfico que muestra los efectos de distintas dosis de IGF-1 sobre el área del nervio óptico ocupada por fibras nerviosas (medianas, véase descripción Fig. 5a). La prueba de Kruskal Wallis mostró que el efecto de IGF-1 fue significativo ( $H(3, n=16) = 10.69, p < 0.05$ ).

\*significativamente diferente del grupo control según prueba U de Mann-Whitney ( $U = 1.0, 0.0, p < 0.05$  respectivamente).

b) Gráfico que muestra los efectos de la administración intraocular de distintas dosis de IGF-1 sobre el número de fibras nerviosas en el nervio óptico (medianas, ver descripción 5a).

\*Kruskal Wallis ( $H(1, n=8) = 5.33, p < 0.05$ ).



La figura 7 muestra los efectos de la administración de anticuerpos monoclonales anti IGF-I (clona 8E6) sobre el desarrollo de las fibras nerviosas que forman al nervio óptico en animales control y tratados de cinco días de edad. Sorprendentemente, la administración de este anticuerpo incrementó significativamente el área del nervio óptico ocupada por axones (Figura 7a; prueba de Kruskal Wallis:  $H(2, n=12) = 7.54, p<0.05$ ). De manera similar, los nervios asociados a ojos tratados con el anticuerpo mostraron una tendencia a tener mayor número de axones con relación a los nervios ópticos de animales control, si bien la diferencia no alcanzó niveles de significancia estadística (Figura 4b). La densidad de fibras nerviosas en los nervios ópticos de ambos grupos fue similar. Resultados semejantes fueron obtenidos con el anticuerpo monoclonal 5B7.

Aunque estos resultados parecen paradójicos, es decir que aumente el área corregida que no es acompañada por un aumento en el número de fibras, esto puede explicarse por dos maneras, por un efecto del volumen de las fibras, el cual no es aparente en las micrografías electrónicas o bien por un efecto deletéreo sobre vasos y glía. Esta posibilidad parece ser la más adecuada dados los resultados obtenidos al cuantificar el área ocupada por estos elementos celulares. Ya que la administración de los anticuerpos monoclonales anti IGF-I (clonas 5B7 y 8E6), redujo significativamente el área ocupada por vasos sanguíneos ( $H(2, n= 12) = 9.27, p<0.01; U= 1.0, 0.0, p<0.05$ , en ambos casos) y el área de glía ( $H(2, N=12) = 7.88, p<0.05; U= 0.0, p<0.05$ , en ambos casos en comparación con el grupo control).

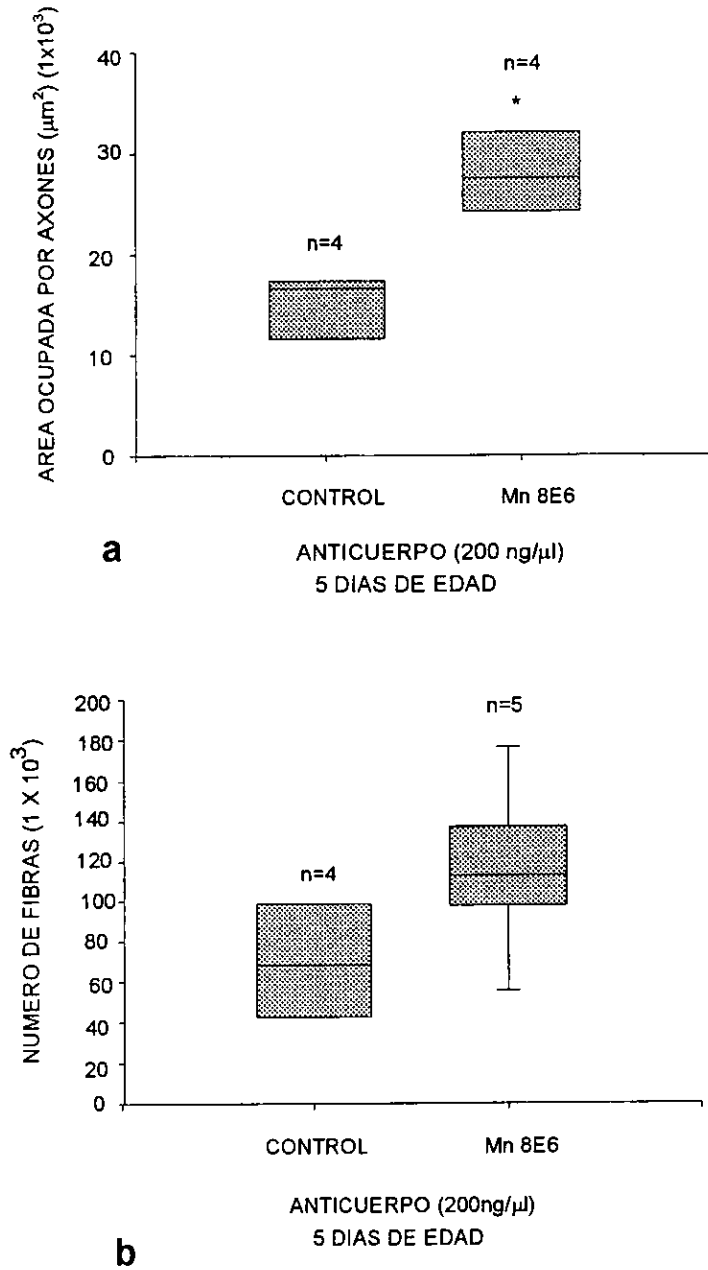


Figura 7. a) Gráfico que muestra los efectos de la administración del anticuerpo monoclonal 8E6 (200 ng/ $\mu\text{l}$ ) sobre el área del nervio óptico ocupada por fibras nerviosas (medianas, ver descripción Fig. 5a). b) Gráfico que muestra los efectos de la administración intraocular del anticuerpo monoclonal 8E6 sobre el número de fibras nerviosas en el nervio óptico (medianas ver descripción Fig. 5a).

\*significativamente diferente del control según prueba U de Mann-Whitney  $U(5,5) = 0.0, p < 0.05$

#### **4.- EFECTO DE LA ADMINISTRACION CONJUNTA DE IGF-I Y ANTICUERPO (CLONA 8E6 ) AL NACIMIENTO SOBRE EL AREA OCUPADA POR FIBRAS NERVIOSAS EN EL NERVIO ÓPTICO DE ANIMALES DE CINCO DÍAS DE EDAD.**

La aplicación conjunta del IGF-I (100ng/ $\mu$ l) y del anticuerpo monoclonal 8E6 (200 y 400 ng/ $\mu$ l) “bloqueó” el efecto que la administración de IGF-I tuvo sobre el valor del área del nervio óptico presumiblemente ocupada por fibras nerviosas. El co-tratamiento redujo significativamente este parámetro en los animales tratados con respecto a los animales control de la misma edad (H (3, n=17) = 13.91,  $p < 0.01$ ); (U(5,5)= 0.0,  $p < 0.05$ , en ambos casos), datos no mostrados. Desafortunadamente, el efecto del anticuerpo fue tan intenso que hizo imposible el realizar un estimado del número de fibras nerviosas que constituyen al nervio en los animales tratados (Figura 5). Debido a que el anticuerpo por sí solo parece mimetizar, en cierto grado, los efectos de IGF-I (compare Figuras 6 y 7) y que dosis altas de IGF-I parecen ser tóxicas para las fibras nerviosas (ver Figura 6), nuestras observaciones parecen apoyar que la co-administración el anticuerpo potencia los efectos de IGF-I a dosis de 100ng/ $\mu$ l, llevándolos a la toxicidad. Se debe recordar que en los experimentos anteriores esta misma dosis de IGF-I tiene efectos tróficos y no tóxicos (ver Figura 6).

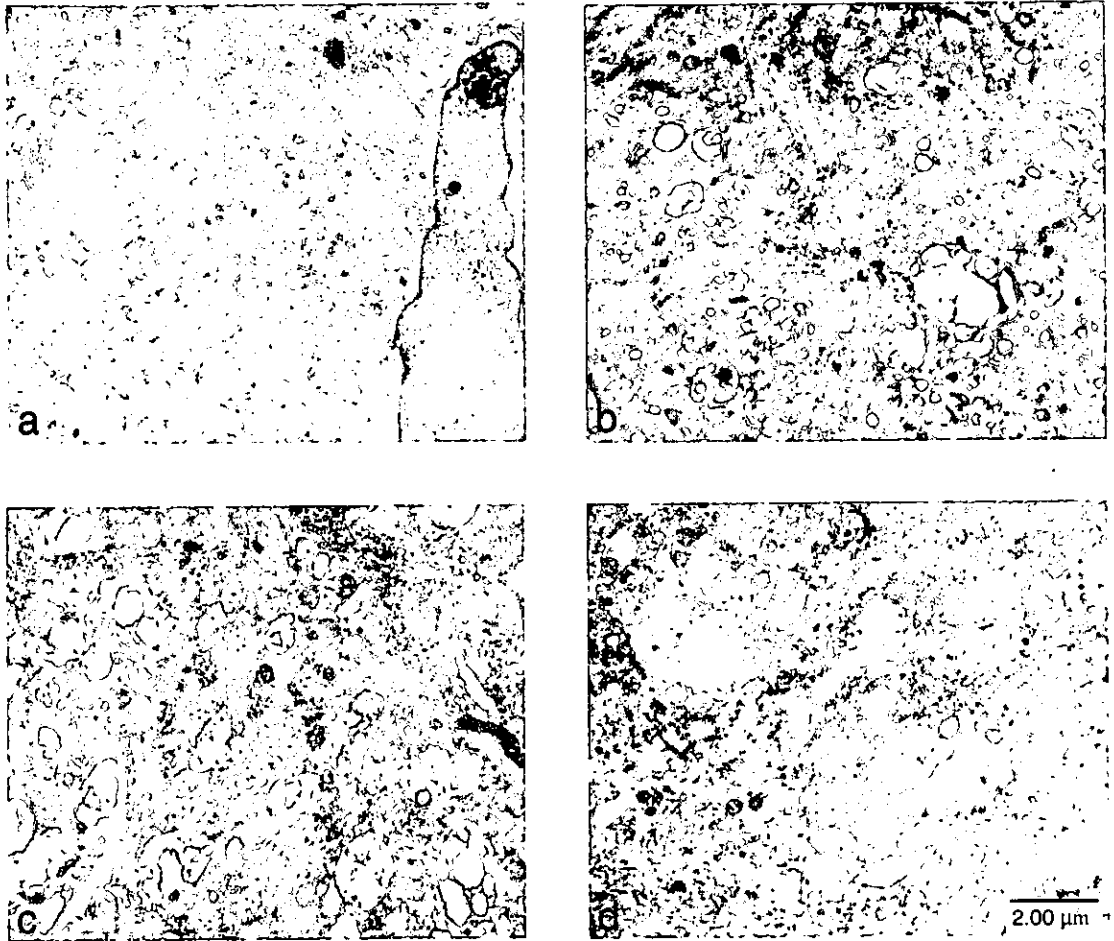


Figura 8. Micrografías que muestran el aspecto de los axones en el nervio óptico de ratas control (a), con IGF-I 100 (b), tratadas con anticuerpo 200 ng / $\mu$ l + IGF-I (c), y tratadas con anticuerpo 400 ng / $\mu$ l + IGF-I (d).

## DISCUSIÓN

La muerte de neuronas a lo largo del desarrollo es uno de los eventos que esculpen la arquitectura cerebral. Este proceso de muerte subyace a la remoción de elementos neuronales redundantes, promueve la regionalización del cerebro, y ajusta el número de neuronas al tamaño de los territorios a ser inervados. En la retina de los roedores, un porcentaje significativo de neuronas (aproximadamente el 50%) muere durante las primeras dos semanas de vida postnatal. Este fenómeno se asocia con 1) el refinamiento de la circuitería retiniana, 2) la creación de un gradiente de densidad celular en la retina, 3) la eliminación de axones con proyecciones aberrantes, 4) el establecimiento de la topografía de las divisiones nasal y temporal en la vía óptica, y 5) la segregación de los campos receptivos de ambos ojos en la corteza cerebral.

Se ha observado que el inicio de la muerte celular en la retina coincide, por un lado, con la llegada de los axones de las neuronas ganglionares retinianas al colículo superior y al núcleo geniculado lateral, y por el otro, con la muerte neuronal en estas regiones cerebrales. Estas observaciones han sido interpretadas como indicadores de que existe una interdependencia trófica entre las aferentes retinianas y sus territorios diana. En verdad, las neuronas coliculares visuales parecen ser fuente del factor derivado del cerebro (BDNF). Cuando las aferentes retinianas alcanzan a los colículos, las neuronas coliculares decrecen la producción de BDNF provocando la muerte de neuronas ganglionares de la retina. Estas últimas,

por su parte, producen IGF-I y lo liberan en el colículo. Cuando las aferentes retinianas alcanzan al colículo superior, decrecen su producción de IGF-I lo que quizás conlleve a la muerte de las neuronas coliculares visuales. En resumen, la idea dominante sugiere que la muerte de neuronas ganglionares en la retina en desarrollo, resulta de la restricción de factores neurotróficos liberados por su órgano blanco, a saber, el colículo superior y el núcleo geniculado lateral.

El IGF-I, sin embargo, parece tener funciones autócrinas/parácrinas en distintos órganos del cuerpo y regiones del sistema nervioso, incluyendo la retina. En apoyo a esta idea, receptores y proteínas fijadoras para IGF-I han sido identificados en la retina de distintas especies animales en desarrollo. Además, el IGF-I ejerce efectos tróficos sobre varios de los linajes celulares que constituyen a la retina. Así, es posible que éste factor pudiera jugar un papel importante en la regulación de la muerte de neuronas ganglionares en la retina, a través de un mecanismo autócrino/parácrino, complementario al mecanismo trófico dependiente del colículo superior y del tálamo. En éste sentido, es importante destacar que la producción de IGF-I en la retina decrece de manera coincidente con la progresión de la muerte de neuronas ganglionares (Santucci, et al., 1994 ; Bartlett, et al., 1991). Así, en presente trabajo, evaluamos la posibilidad de que el IGF-I regule la muerte de neuronas ganglionares retinianas a través de un mecanismo autócrino/parácrino. Para ello, administramos IGF-I intraocularmente al nacimiento con el objetivo de limitar la extensión de muerte neuronal que sucede en la retina de los roedores durante las primeras dos semanas de vida. El análisis anatómico, sin embargo, no se realizó directamente en la

retina. Nuestra atención fue dirigida al nervio óptico, pues existe evidencia sólida de que el número de axones que corren a lo largo de éste, es directamente proporcional al número de neuronas ganglionares en la retina (revisado en Jacobson, 1990); lo que brinda una ventaja técnica y facilita enormemente la ejecución del trabajo morfométrico. Además, nuestras observaciones fueron hechas exclusivamente a los cinco días de edad, momento en el cual la retina muestra el pico máximo de muerte neuronal (revisado en Jacobson, 1990; ver también resultados). Esto evita la necesidad de realizar inyecciones intraoculares múltiples, con los riesgos que esto conlleva.

La administración intraocular al nacimiento de 100 y 300 ng/ $\mu$ l de IGF-I tuvo un efecto protector que se reflejó en un aumento del área ocupada por fibras nerviosas, así como en el número estimado de ellas. Dicho de otra forma, el incremento en la disponibilidad de IGF-I en la cámara posterior de ojo debida a la administración exógena, pausa el programa de muerte celular en las neuronas ganglionares en desarrollo. Recientemente, se ha demostrado que el efecto anti-apoptótico de IGF-I no sólo se observa en poblaciones neuronales en desarrollo (D'Mello, et al., 1993), sino que también es capaz de pausar el programa de muerte celular en neuronas ganglionares adultas axotomizadas (Kermer, Klöcker, Labes y Bähr, 2000). Por otro lado, es interesante el hecho de que aunque se documentó un aumento en el área del nervio óptico ocupado por fibras, así como en el número de las mismas, consecutivas al tratamiento con IGF-I, el número de fibras por unidad de área permanece constante. Esto sugiere que la densidad y el diámetro de las fibras nerviosas que constituyen el nervio

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

óptico son factores estructurales que se mantienen relativamente constantes. El significado biológico de éste hecho es aún desconocido, si bien existen diversos parámetros estructurales que se mantiene constantes a lo largo de la evolución del sistema nervioso en distintas especies de animales (Gutiérrez-Ospina et al., en preparación).

Una observación inesperada fue que dosis mayores de 300 ng/ $\mu$ l de IGF-I parecen tener un efecto tóxico sobre el desarrollo de las neuronas ganglionares de la retina. Esto es apoyado por la disminución del área ocupada por axones en los nervios ópticos provenientes de animales tratados con una dosis de 600 ng/ $\mu$ l. Si bien este resultado pudiera ser considerarse como contradictorio, estudios previos han mostrado que los miembros de la familia de las neurotrofinas pueden tener efectos deletéreos e incluso proapoptóticos en neuronas sensoriales corticales y oligodendrocitos cuando están presentes a dosis elevadas. El mecanismo por el que estos efectos se presentan apenas empieza a ser dilucidado para las neurotrofinas. Dado que para el caso de IGF-I, a nuestro conocimiento, no existen reportes previos que muestren efectos tóxicos de éste factor sobre células nerviosas, aún se desconoce el probable mecanismo de su toxicidad. Sin embargo, existe evidencia de que el IGF-I modula la actividad neuronal in vivo (Gutiérrez-Ospina et al., 1998). Es probable que la muerte de neuronas ganglionares que sigue a la administración de dosis altas de éste factor, pudiera producir excitotoxicidad. Es claro, no obstante, que para evaluar la plausibilidad de esta propuesta se requiere de más estudios.

Con el objeto de bloquear el efecto protector del IGF-I endógeno sobre el desarrollo de las neuronas ganglionares, y de antagonizar aquel observado



después de su administración exógena, se inyectaron intraocularmente anticuerpos monoclonales (clonas 5B7 y 8E6) dirigidos contra IGF-I solos o en combinación con éste factor. Sorprendentemente, la administración de los anticuerpos solos incrementó significativamente el área ocupada por axones. Aunque los nervios de los animales tratados muestran una tendencia a incrementar en número, ésta no alcanzó significancia estadística. Así, estos resultados sugieren que el anticuerpo condujo a cambios en el diámetro de las fibras que constituyen el nervio óptico. Es aún desconocido, sin embargo, si este cambio refleja cierto grado de toxicidad (e.g., cambios en la permeabilidad seguidos de edema celular), o bien un efecto trófico real como el que ha sido documentado para algunos otros anticuerpos que mimetizan el efecto del ligando contra el que fueron generados (Hill y Pell, 1998; Stewart, Bates, Calder, Woodall y Pell, 1993). Es claro que una tercera posibilidad es que las dosis del anticuerpo hayan sido inadecuadas para producir el efecto (ver sin embargo más abajo).

En contraste con lo observado después de la administración de los anticuerpos solos, la co-aplicación intraocular del IGF-I (100 ng/ $\mu$ l) con los anticuerpos condujo a la disminución del área del nervio óptico ocupada por axones y a un daño tisular tan extenso que hizo imposible la cuantificación de fibras en el nervio. Si bien uno podría interpretar estos resultados como un claro efecto de bloqueo del anticuerpo, el hecho de que ambos el IGF-I y el anticuerpo al ser administrados independientemente no muestren efectos deletéreos sobre la estructura del nervio óptico, que la aplicación de dosis elevadas de IGF-I parece tener efectos tóxicos sobre el desarrollo de nervio óptico, y que el daño en el nervio consecutivo a la co-aplicación de ambos

sea extremo, sugieren en conjunto que el anticuerpo potencia la toxicidad del IGF-I en los experimentos de co-aplicación. Esto no es extraño ya que se ha descrito, como se mencionó mas arriba, que ciertos anticuerpos pueden servir como agonistas de los ligandos contra los que fueron creados (Schacher, Melitta, 1997. Warner- Lambert Lecture "Neural Plasticity and the Surprising Functions of Recognition Molecules" 27<sup>th</sup> Annual Meeting Soc. for Neuroscience, New Orleans. LA.). De hecho, este efecto de potenciación del efecto del ligando por un anticuerpo, ha sido descrito previamente para un anticuerpo policlonal dirigido contra IGF-I (Stewart, et al., 1993; Hill y Pell, 1998). Este grupo sugiere que el anticuerpo podría funcionar como una proteína de unión de IGF, incrementando su biodisponibilidad, y por ende, potenciando su efecto.

Fawcett (1992) ha propuesto que las neuronas poseen un programa intrínseco de crecimiento que las hace refractarias a los efectos de los factores neurotróficos derivados de los órganos diana durante la fase inicial de su desarrollo. Así mismo, se ha propuesto que esta refractoriedad se pierde una vez que los axones de las neuronas alcanzan su órgano diana (revisado en Fawcett, 1992). Es decir, la dependencia por el o los factores neurotróficos derivados del órgano diana se "activa", cuando los axones los reciben por vez primera una vez que llegan a su vecindad y lo penetran. Nuestros resultados sugieren que la aparente refractoriedad de las neuronas en desarrollo a los factores neurotróficos derivados el órgano blanco se debe a que, durante un tiempo, las neuronas se proveen a sí mismas de manera autócrina/parácrina de los factores que requieren para promover su crecimiento hasta que encuentran a sus órganos diana. Éste encuentro

quizás detenga la secreción autócrina, haciendo a las neuronas dependientes de su órgano blanco. Esto garantizaría a las neuronas el pausar el programa de muerte celular, al menos mientras crecen, dando la oportunidad de que las células alcancen sus órganos blanco en igualdad de condiciones, antes de ser seleccionadas por este último.

En conclusión, estudios previos han sugerido que la muerte de neuronas ganglionares es inducida, y su extensión regulada, por la restricción del aporte trófico derivado del mesencéfalo y del tálamo. Existe, sin embargo, un decremento en la producción retiniana de IGF-I por parte de las neuronas ganglionares que coincide con el pico de muerte celular de este tipo neuronal, que sugiere que éste factor pudiera regular la muerte celular de manera autócrina. Debido a que la administración de IGF-I mejora las probabilidades de supervivencia de las neuronas ganglionares durante la fase aguda de su muerte, nuestros datos apoyan la idea de que la secreción autócrina de IGF-I y la regulación de su biodisponibilidad juegan un papel fundamental en la regulación de la muerte celular en la retina. Dicho papel seguramente complementa, aunque aún desconocemos de que manera, a aquél descrito para las interacciones tróficas entre las neuronas ganglionares y sus órganos diana. Por otro lado, dado que IGF-I tiene efectos en otros linajes celulares de la retina, sería interesante estudiar si la supervivencia de otros tipos celulares también se va afectada por la administración local de IGF-I. De ser así, y debido a que la muerte de neuronas ganglionares determina una parte los fenómenos de segregación de las aferentes talámicas en la corteza cerebral, sería de gran importancia el evaluar si la administración temprana de IGF-I en pacientes estrámbicos,

retrasa los cambios en la circuitería cortical el tiempo suficiente, para poder hacer correcciones quirúrgicas antes de que las modificaciones anatómo-funcionales relacionadas a éste padecimiento se tornen irreversibles.

## REFERENCIAS

- Andersson, I.K., Edwall, D., Norstedt, G., Rozell, B, Skottner A., Hansson, A. 1988 Differing expression of insulin-like growth Factor-I in the developing and in the adult rat cerebellum. *Acta Physiol. Scand.* **132**, 167-173.
- Baker, N.L., Russo, V.C., Bernard, O., D'Ercole, A.J., Werther, G.W. 1999 Interactions between Bcl-2 and the IGF-I system control apoptosis in the developing mouse brain. *Dev. Brain Res.* **118**, 109-118.
- Banasiaka, K. J., Xiab, Y., Haddadbc, G.G., 2000 Mechanisms underlying hypoxia-induced neuronal apoptosis. *Progress Neurobiology* 62:215-249
- Barres BA, Hart IK, Coles HSR, Burne JF, Voyvodic JT, Richardson WD y Raff MC. 1992. Cell death and control of cell survival in the oligodendrocyte lineage. *Cell*, **70**, 31-46.
- Barres BA. 1997. Neuron-Glia interactions. En WM Cowan, TM Jessell y SL Zipursky (Eds.), *Molecular and Cellular approaches to neuronal development.* (pp. 64-107). Oxford: Oxford University Press.
- Bartlet W.P., Li, X.S., Williams M., Benkovic, S. 1991. Localization of insuline like growth factor-I mRNA in murine central nervous system during postnatal development. *Dev. Biol.*, **147**, 239- 250.
- Baserga R, Porcu P, Rubini M, Sell C. 1993. Cell cycle control by the IGF-1 receptor and its ligands. *Adv Exp Med Biol* **343**, 105-12.
- Behringer RR., Lewin TM, Quaife CJ, Palmiter RD, Brinster RL y D'Ercole AJ. 1990. Expression of insuline like growth factor I stimulates normal somatic growth in growth hormone deficient transgenic mice. *Endocrinology*, **127**, 1033-1040.
- Blum W.F., Jenne E.W., Reppin, F., Kietzmannk, Ranke, M.B., Bierich, J.R. 1989 Insulin-like growth factor I (IGF-I)-binding protein complex is a better mitogen than free IGF-I *Endocrinology* **124**,766-768.
- Bondy, C.A., Werner, H., Roberts Jr., C.T. and Le Roith, D. 1990 Cellular pattern of insuline-like growth factor-I (IGF-I) and

type IGF-I receptor gene expression in early organogenesis: comparison with IGF-II gene expression. *Mol. Endocrinol.*, **4**,1386-1398.

Bondy CA, Werner H, Roberts CT Jr y Le Roith D. 1992. Cellular pattern of type I insulin like growth factor receptor gene expression during maturation of rat brain: comparison with insulin like growth factor I and II. *Neuroscience*, **46**, 909-923.

Bondy, CA. 1991. Transient IGF-I gene expression during the maturation of functionally related central projection neurons. *J. Neurosci.* **11**, 3444-55.

Bondy, CA., Lee, W-H. 1993. Correlation between insulin-like factor (IGF)-binding protein 5 and IGF-I gene expression during brain development. *J Neurosci* **13**, 5092-5104.

Burch, W.M., Correa, J., Shively, J.E., Powell, D.R. 1991 The 25 kilodalton insulin-like growth factor (IGF)-binding protein} inhibits IGF-I mediated growth of chick embryo pelvic cartilage in vitro. *J. Clin Endocrinol Metab*, **70**:173-180.

Coleman, J. (Ed). 1990 *Development of sensory systems in mammals*. New York: John Wiley and Sons.

Connor, B, Dragunow M. 1998 The role of neuronal growth factors in neurodegenerative disorders of the human brain. *Brain Res Rev.*, **27**, 1-39.

D'Ercole, A.J., Ye, P., Calikoglu, A.S., Gutiérrez-Ospina, G. 1996 The role of the insulin-like growth factors in the central nervous system. *Mol. Neurobiol.* **13**, 227-255.

D'Mello, SR, Galli C., Ciotti T y Calissano P. 1993. Induction of apoptosis in cerebellar granule neurons by low potassium: Inhibition of death by insulin like growth factor I and cAMP. *Proc Natl Acad Sci USA*, **90**, 10989-10993.

Dahmer MK., Perlman, RL. 1988 Insulin and insulin like growth factors stimulate deoxyribonucleic acid synthesis in PC12 pheochromocytoma cells. *Endocrinology*, **122**, 2109-2113.

Dartsch, D.C. 1999. Mechanisms of Toxicity. En *Toxicology* (pp. 245-255) New York: Academic Press.

De la Rosa E.J., Bondy C, Hernández C. Wu, X, Zhou, J Carranza A. Scavo L, de Pablo F. 1994 Insulin and Insulin-like Growth Factor System Components Gene Expresión in the Chicken

retina From Early Neurogenesis Until Late Development and their Effect on Neuroepithelial Cell *Eruopean Journal of Neuroscience*, **6**, 1801-1810

De Pablo F. y De la Rosa E.J. 1995 The developing CNS: a scenario for the action of proinsulin, insulin and insulin like growth factors. *TINS*, **18**, 143-150.

Desnoyers, S y Hengartner, M. 1997 *Genetics of Apoptosis* en Scott, H. *Apoptosis*, New York: Academic Press

DiCicco-Bloom, E. 1990 Neuroblast mitosis in dissociated culture regulation and relationship to differentiation. *J.Cell Biol* 110 2073-2086

DiCicco, E., Black, I.B. 1989. Insulin growth factors regulate the mitotic cycle in cultured rat sympathetic neuroblasts. *Brain Res*, **491**, 403-406.

Drago J, Murphy M, Carroll SM, Harvey RP y Bartlett PF. 1991. Fibroblast growth factor mediated proliferation of central nervous system precursors depends on endogenous production of insulin like growth factor I. *Proc Natl Acad Sci USA*, **88**, 2199-2203.

Drakenberg K, Sara VR, Lindahl KI, Kewish B. 1989. The study of insulin-like growth factors in Tilapia, *Oreochromus mossambicus*. *Gen Comp Endocrinol*, **74**,173-80.

Eissen, J. S. 1999. Patterning motoneurons in the vertebrate nervous system. *Trens Neurosci*. **22**:321-326.

Fawcett, JW. 1992. Intrinsic neuronal determinants of regeneration. *TINS* **15**, 5-9

Fernandez Almonacid R y Rosen R. 1987. Structure and ligand specificity of the *Drosophila melanogaster* insulin receptor *Mol Cell Biol*, **7**, 2718-27.

Flyvbjerg A, Nielsen S, Sheikh MI, Jacobsen C, Orskov H, Christensen EI. 1993. Luminal and basolateral uptake and receptor binding of IGF-I in rabbit renal proximal tubules. *Am J Physiol*. **265**(5 Pt 2):F624-33.

Ganong, W.F. 1996. *Fisiología Médica*. México, D.F.: Manual Moderno.

Goldstein, J., Moerman E.J. 1993 Insulin like growth factor binding protein-3 is overexpressed in senescent and quiescent human fibroblast. *Exp. Geront*. **28**, 361-370.

- Guler HP, Zapf J, Scheiwiller E, Froesch ER. 1988. Recombinant human insulin-like growth factor I stimulates growth and has distinct effects on organ size in hypophysectomized rats. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **85**, 4889-93.
- Gutiérrez-Ospina G, Calikoglu AS, Ye, P y D'Ercole, J.A. 1996. *In vivo* effects of insulin-like growth factor-1 on the development of sensory pathways: Analysis of the primary somatic sensory cortex of transgenic mice *Endocrinology* **137** 5484-5492.
- Gutiérrez-Ospina G. 1997. Efectos del factor de crecimiento tipo insulina-I (IGF-I) sobre el crecimiento cerebral y el desarrollo del sistema somático sensorial: Estudios anatómicos en la corteza somatosensorial primaria (S1) de ratones transgénicos. Tesis Doctoral. Centro de Neurobiología, UNAM. México.
- Heidenreich KA, y Toledo SP. 1989 Insulin receptors mediate growth effects in cultured fetal neurons. Rapid stimulation of protein synthesis. I. *Endocrinology* **125**, 1451-1457.
- Hendrickson A.E y Yuodelis D. 1984. The morphological development of the human fovea. *Ophthalmol.* **6**, 603-612.
- Hill RA y Pell JM. 1998. Regulation of insulin-like growth factor I (IGFI) bioactivity in vivo: further characterization of an IGF-I-enhancing antibody. *Endocrinology*, **139**:1278-1287.
- Hynes MA, vanWyk JJ, Brooks PJ, D'Ercole AJ, Jansen M y Lund PK. 1987. Growth hormone dependence of somatomedin C/insulin like growth factor-I and insulin like growth factor II messenger ribonucleic acids. *Mol Endocrinol* **1**, 233-242.
- Ishii DN. 1989. Neurotrophic effects and mechanisms of insulin, insulin like growth factors and nerve growth factor in spinal cord and peripheral neurons. En D. Le Roith y MK Raizada (Eds.), *Molecular Cellular Biology of Insuline-like growth factors and their receptors.* (pp. 403-425). New York: Plenum.
- Ishii DN. 1993 Neurobiology of insulin and insulin-like growth factors. En SE. Loughlin y JH Fallon (Eds.), *Neurotrophic factors.* (pp. 415-441). New York: Academic Press.
- Jacobson, M. 1991. *Developmental Neurobiology.* Third Edition. New York: Plenum.
- Jeffery, G y Perry, V.H. 1982. Evidence for ganglion cell death during development of the ipsilateral retinal projection in the



- rat. *Dev Brain Res.* **2**:176-180.
- Johnson, S. y Harrison, D. 1997. En Scott H.K. (Ed) Apoptosis (p 1-28) New York : Academic Press.
- Jones, J.I., Clemmons D.R. 1995 Insuline -like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev* **16**, 3-34.
- Kandel, E., Schwartz, J., Jessell, T. 1991. *Principles of Neural Science* Third Ed. New York: Elsevier.
- Kermer P, Klöcker N, Labes M y Bähr M. 2000. Insulin-like growth factor-1 protects axotomized rat retinal ganglion cells from secondary death via PI3-K-Dependent Akt phosphorylation an inhibition of caspase-3 in vivo. *J Neurosci*, **20**:722-728.
- Kiess W, Kessler U, Schmitt S, Funk B. 1993. Growth hormone and insulin-like growth factor I: Basic aspects. En A. Flyvbjerg, H. Orskov, G. Alberti, *Growth hormone and insulin-like growth factor I in human and experimental diabetes.* (pp. 1-21). Chichester: John Wiley and Sons.
- Knusel B, Michel PP, Schwaber JS y Hefti F. 1990 Selective and nonselective stimulation of central cholinergic and dopaminergic development in vitro by nerve growth factor, basic fibroblast growth factor, epidermal growth factor, insulin and the insulin like growth factors I and II. *J Neurosci*, **10**, 558-570.
- Lam K, Sefton A J y Bennett MR. 1982. Loss of axons from optic nerve of the rat during early postnatal development. *Dev Brain Res*, **3**, 487-491.
- Lee V, Trojanowshi JO, Schlaepfer WW. 1982. Induction of neurofilament triplet proteins in PC12 cells by nerve growth factor. *Brain Res*, **238**, 169-180.
- Lee WH, Javedan S, Bondy CA. 1992. Coordinate expression of insulin like growth factor system components by neurons and neuroglia during retinal and cerebellar development. *J Neurosci*, **12**, 4737-4744.
- LeRoith, D. Roberts Jr. C. T, Werner H, Bondy C. Raizada, M, Adamo ML. 1993. Insulin-like growth factors in brain. En S. E. Loughlin y J.H. Fallon. (Eds). *Neurothrophic Factors* (pp. 390-415). New York: Academic Press.
- Linden, R., Perry, V.H. 1982. Ganglion cell death within the development retina: A regulatory role for retinal dendrites

*Neuroscience*, **7**, 2813-2827.

- Liu JP, Baker J, Perkins AS, Robertson EJ y Efstratiadis A. 1993 Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin like growth factor I (IGF-I) and type I IGF receptor (IGF-Ir). *Cell*, **75**, 59-72.
- Mathews LS, Norstedt G., Palmiter RD. 1986. Regulation of insulin like growth factor I gene expression by growth hormone. *Proc Natl Acad. Sci, USA* **83**, 9343-9347.
- Mathews LS, Hammer RE, Behringer RR, D'Ercole JA, Bell, GI, Brinster, RL, Palmiter RD. 1988 Growth Enhancement of transgenic mice expressing human insulin-like growth factor-I. *Endocrinology*, **123**, 2827-2833.
- Milam, A. 1993 Strategies for rescue of retinal photoreceptor cells. *Curr Op Neurobiol*, **3**, 797-804.
- Niblock, M. M.Brunso-Bechtold, J. K.Riddle, D. R. 2000. Insulin-like growth factor I stimulates dendritic growth in primary somatosensory cortex. *Journal of Neurosci* 20:4165-76.
- Nilsen Hamilton M. 1994. *Growth Factors and signal transduction in Development*. Ames: Wiley-Liss.
- Parnovelae, J.G., 2000 The origin and migration of control neuron. *Trens Neurosc.* **23**, 126-131
- Pardee AG, Baserga R, Rubin R. 1989. G1 events and regulation of cell proliferation. *Science*, **246**, 603-608.
- Perry VH, Linden R. 1982. Evidence of dendritic competition in the developing retina. *Nature*, **297**, 683-687.
- Perry VH, Henderson Z, Linden R. 1983. Postnatal changes in retinal Ganglion cell and optic axon populations in the pigmented rat. *J Comp Neurol*, **219**, 356-368.
- Primi, M., Clark, P. 1996 Retrograde neurotrophin mediated control of neurone survival in the developing central nervous system . *Neuroreport*, **7**, 473-476.
- Provis M. 1985. Development of the human retina: Patterns of cell distribution and redistribution in the ganglion cell layer. *J Comp Neurol*, **233**, 429-451
- Purves D y Lichtman J. 1985. *Principles of neural development*. Massachusetts: Sinauer.

- Purves D. 1988. *Body and brain: A trophic theory of neural connections*. Cambridge: Harvard University Press.
- Raizada MK. 1993. Insulin receptor related receptor: an orphan with neurotrophic/neuromodulatory potential. *Endocrinol*, **133**, 1-2.
- Rakic P y Riley K.P. 1983. Overproduction and elimination of retinal axons in the fetal rhesus monkey. *Science*, **219**, 1441-1444.
- Ramoas AS, Campbell G, Shatz CJ. 1988 Dendritic growth and remodeling of cat retinal ganglion cells during fetal and postnatal development. *J Neurosci*, **8**, 4239-4261.
- Rechler MM, Zapf J, Nissley SP, Froesch ER, Moses AC, Podskalny JM, Schilling EE, Humbel RE. 1980 Interactions of insulin-like growth factors I and II and multiplication-stimulating activity with receptors and serum carrier-proteins. *Endocrinol*, **107**, 1451-1459.
- Recio-Pinto E, Rechler MM y Ishii DN. 1986. Effects of insulin, insulin-like growth factor-II and nerve growth factor on neurite formation and survival in cultured sympathetic and sensory neurons. *J Neurosci*, **6**, 1211-1219.
- Reichardt LF, Fariñas I. 1997. Neurotrophic factors and their receptors. En: Cowan, M.W., Jessell, T. M., Zipursky, S. L. *Molecular and cellular approaches to neural development*. (pp 220-263). Oxford: Harvard University Press.
- Rinderknecht E, Humbel RE. 1978. The aminoacid sequence of human insulin like growth factor I and its structural homology with proinsulin. *J Biol Chem*, **253**, 2769-2776.
- Rotwein P, Burgess SK, Milbrandt JD, Krause JE. 1988 Differential expression of insulin like growth factor genes in rat central nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 265-269
- Santucci D, Cagiano R, Calamandrei G. 1994. IGF-I and IGF-I<sub>24-41</sub> but not IGF-I<sub>57-70</sub> affect somatic and neurobehavioral development of newborn male mice. *Brain Res Bull*, **35**, 367-371
- Sara VR, Hall K, Misaki M, Fryklund L, Christensen N y Wetterborg L. 1983. Ontogenesis of somatomedin and insulin receptors in

1984. the human fetus. *J Clin Invest*, **71**, 1084-1094.
- Sara VR, Sandberg-Nordqvist AC, Carlsson-Skwirut C, Bergman T, Ayer-LeLievre C. 1991. Neuroactive products of IGF-1 and IGF-2 gene expression in the CNS. *Adv Exp Med Biol*, **293**, 439-48.
- Sefton AJ y Lam K. 1984. Quantitative and morphological studies on Developing optic axons in normal and enucleated albino Rats. *Exp. Brain Res*, **57**, 107-17.
- Sell C, Dumenil G, Deveaud C, Miura M, Coppola D, DeAngelis T, Rubin R, Efstratiadis A, Baserga R. 1994. Effect of a null mutation of the insulin-like growth factor I receptor gene on growth and transformation of mouse embryo fibroblasts. *Mol Cell Biol*, **14**, 3604-12.
- Sengelaub, D.R., Finlay, H. 1982. Cell death in the mammalian visual system during normal development: Retinal ganglion cells. *J Comp Neurol*, **204**, 311-317.
- Spencer M. (Ed.) 1991 *Modern Concepts of Insulin Like Growth Factors*. New York: Elsevier.
- Straus DS y Takemoto C. 1990 Effect of dietary protein deprivation on insulin like growth factor -I (IGF-I) and -II, IGF binding protein-2 and serum albumin gene expression in rat. *Endocrinol*, **127**, 1849-1860.
- Stewart CEH, Bates PC, Calder TA, Woodall SM y Pell JM. 1993. potentiation of insulin-like growth factor (IGF-I) activity by an antibody: supportive evidence for enhancement of IGF-I bioavailability in vivo by IGF binding proteins. *Endocrinol*, **133**, 1462-1465.
- Stewart CEH, Rotwein P. 1996. Growth, differentiation and survival. multiple physiological functions for insulin like growth factor. *Physiol Rev*, **76**, 1005-1026.
- Tresguerres A. 1992. *Fisiología Humana*. España: Interamericana McGraw-Hill.
- Valentino KL, Ocrant I, Rosenfeld RG. 1990. Developmental expression of insuline like growth factor-II receptor immunoreactivity in the rat nervous system. *Endocrinol*, **126**, 914-920.
- Vogel, M. 1978. Postnatal development of the cat's retina. *Adv Anat Embryol Cell Biol*, **54**, 1-65.

- Von Bartheld CS, Byers MR, Williams R y Bothwell M. 1996. anterograde transport of neurotrophins and axodendritic transfer in the developing visual system. *Nature*, **379**, 830-833.
- Waldbillig RJ, Fletcher RT, Chader GJ, Rajagopalan S, Rodrigues M, LeRoith D. 1987. Retinal insulin receptor. 2. Characterization and insulin induced tyrosine kinase activity in bovine retinal rod outer segments. *Exp Eye Res*, **45**, 837-844.
- Werner H, Raizada MK, Mudd LM, Foyt HL, Simpson IA, Roberts CT Jr, LeRoith D. 1989. Regulation of rat brain/Hep G2 glucose transporter gene expression by insulin and insulin like growth factor-I in primary cultures of neuronal and glial cells. *Endocrinol*, **125**,314-320.
- Wood TL, Brown AL, Rechler MM, Pintar JE. 1990. The expression pattern of an insulin-like growth factor, (IGF)-binding protein gene is distinct from IGF-II in the midgestational Rat embryo. *Mol Endocrinol*, **4**, 1250-1263.
- Ye P, Carson J y D'Ercole AJ. 1995. In vivo actions of insulin-like growth factor-I on brain myelination: Studies of IGF-I and IGF binding protein-1 transgenic mice. *J Neurosci*, **15**, 7344-7356.
- Young M. 1980. Radiohistochemical localization of insulin receptors in the adult and developing rat brain. *Neuropeptides*, **1**, 15-22