

UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

DEPARTAMENTO DE MORFOLOGÍA



TESIS DOCTORAL

**AFECTACIÓN DEL NERVIÓ ÓPTICO EN LA DIABETES: ESTUDIO
MORFOMÉTRICO Y ESTRUCTURAL**

RAFAEL ALEMÁN FLORES

Las Palmas de Gran Canaria, 1997

UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS
DE GRAN CANARIA
FACULTAD DE CIENCIAS MEDICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA

AFECTACION DEL NERVIO OPTICO EN LA DIABETES:
ESTUDIO MORFOMETRICO Y ESTRUCTURAL.

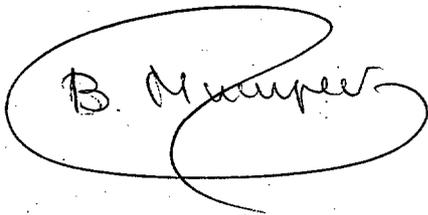
Memoria para optar al grado de doctor.
Rafael Alemán Flores.

Las Palmas de G.C. 1.997.

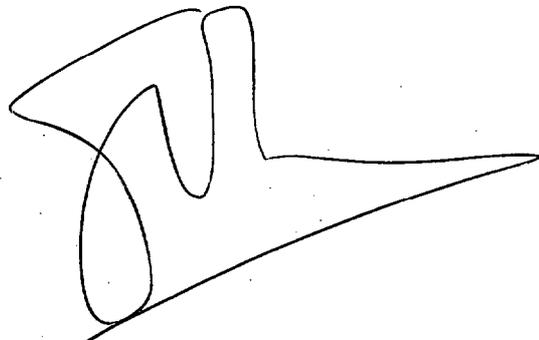
Los doctores **Blanca Mompeó Corredera**, profesora titular interina de la Universidad de Las Palmas de G. C., y **Francisco Ortega Santana**, profesor titular de la Universidad de Las Palmas de G. C.,

INFORMAN: que **Rafael Alemán Flores**, licenciado en Medicina y Cirugía, ha realizado bajo nuestra dirección, en el departamento de Morfología de la Facultad de Ciencias Médicas y de la Salud, el trabajo titulado **Afectación del nervio óptico en la diabetes: estudio morfométrico y estructural**, que a nuestro juicio reúne las condiciones exigidas por la legislación vigente para optar al grado de doctor.

Y para que así conste, firmamos el presente en Las Palmas de G. C., a tres de Febrero de mil novecientos noventa y siete.



Directora:
Blanca Mompeó Corredera



Co-director:
Francisco Ortega Santana

*A mis padres
Rafael y M^a Rosa.*

Indice

AGRADECIMIENTOS	1
1.-INTRODUCCION	5
1.-1.-ANATOMÍA DEL NERVIÓ OPTICO	7
1.-1.-1.-ANATOMIA MACROSCOPICA Y RELACIONES	7
1.-1.-2.-ESTRUCTURA DE LA VIA VISUAL	9
.-RETINA	9
.-CUERPO GENICULADO	13
.-FIBRAS NERVIOSAS	15
1.-1.-3.-VASCULARIZACION DEL NERVIÓ OPTICO	23
.-ARBOL VASCULAR	23
.-CELULAS ENDOTELIALES	25
.-PERICITOS	27
.-LAMINA BASAL	28
1.-1.-4.-CELULAS GLIALES	29
.-MACROGLIA	31
.-ASTROCITOS	31
.-OLIGODENDROCITOS	35
.-MICROGLIA	37
1.-2.-DIABETES	40
1.-2.-1.-GENERALIDADES	40
1.-2.-2.-COMPLICACIONES	41
.-MECANISMOS RESPONSABLES	43
.-VASCULOPATIA DIABETICA	45
.-NEUROPATIA DIABETICA	47
.-COMPLICACIONES OCULARES	49
1.-3.-NERVIÓ OPTICO Y DIABETES	54

2.-OBJETIVOS	59
3.-MATERIAL Y METODO	63
3.-1.-ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	65
3.-2.-OBTENCION DE MUESTRAS	66
3.-3.-PROCESADO DE MUESTRAS	66
3.-3.-1.-ESTUDIOS DE MICROSCOPIA OPTICA	
-DEPOSITOS DE SCHIFF	67
-PROTEINA ACIDA FIBRILAR GLIAL	68
-ALBUMINA	70
3.-3.-2 ESTUDIO ULTRAESTRUCTURAL	
71	
3.-4.-OBTENCION DE IMAGENES	72
3.-5.-ESTUDIO MORFOMETRICO	73
3.-6.-ESTUDIO ESTADISTICO	74
4.-RESULTADOS	75
4.-1.-CARACTERISTICAS GENERALES	77
4.-2.-FIBRAS NERVIOSAS	80
4.-2.-1.-ESTUDIO MORFOMETRICO	80
4.-2.-2.-ESTUDIO MORFOLOGICO	84
4.-3.-VASOS SANGUINEOS	97
4.-3.-1.-ESTUDIO MORFOMETRICO	97
4.-3.-2.-ESTUDIO MORFOLOGICO	101
4.-4.-CELULAS GLIALES	133
5.-DISCUSION	155
6.-CONCLUSIONES	175
7.-BIBLIOGRAFIA	179

Agradecimientos

A la **Dra. Blanca Mompeó Corredera** que, con su inagotable capacidad de trabajo, su rigor científico y su paciencia para los que nos iniciamos en el terreno de la investigación, ha hecho posible la realización de este proyecto.

Al **Dr. Francisco Ortega Santana** que ha supervisado en todo momento la evolución de la investigación, por sus aportaciones a la misma y el compartir conmigo su experiencia investigadora.

A ambos quiero agradecerles la maravillosa posibilidad que me han brindado al permitirme trabajar bajo su tutela durante estos años, la amabilidad con que me han tratado en todo momento y la experiencia que ha supuesto trabajar con personas de su categoría, tanto en lo científico como en lo personal.

Al **Prof. José Regidor García** por la generosa aportación de sus conocimientos en biología celular a la hora de realizar esta investigación, poniendo a mis disposición tanto sus medios materiales como personales.

Al **Dr. José M^a Limiñana Cañal**, profesor de estadística de la ULPGC, por su asesoramiento en el programa estadístico.

A las **Dras. Lilian Pérez y Lourdes Sarmiento**, profesoras del Departamento de Morfología de la ULPGC, por su estímulo diario y su colaboración en la realización de esta memoria.

A **Francisca Rodríguez Afonso**, técnico de laboratorio del Departamento de Morfología de la ULPGC, por su labor, siempre con alegría y buena disposición, en el procesado de las muestras.

A **Irene Castaño**, futura doctora, por su colaboración en la obtención de los datos morfométricos de este estudio, llevada a cabo con gran exactitud y esmero.

Al **Servicio Central de Microscopía Electrónica de la ULPGC** por poner a mi disposición su trabajo y los medios materiales a su alcance.

A la **Sección de Histología del Departamento de Morfología de la ULPGC** por el estímulo recibido y poner a mi disposición tanto sus conocimientos como material que he necesitado a lo largo de estos años.

A **Juan M. López y Miguel Alemán** por su colaboración en el campo de la informática a la hora de elaborar y redactar este texto.

Este trabajo ha sido financiado en parte por el Proyecto de Investigación: Estudio ultraestructural y análisis morfométrico del nervio óptico de ratas diabéticas por efecto de la estreptozotocina, concedido por la **Universidad de Las Palmas de Gran Canaria**.

A todos quisiera darles mi más sincero agradecimiento ya que este trabajo no habría llegado a su fin sin la preciosa colaboración de todos y cada uno de ellos.

Asímismo quiero agradecer a todos los familiares y amigos que con su ánimo y ayuda han permitido que esta investigación no cayera en el olvido y hoy la veamos culminada.

1.-Introducción

1.-1.-ANATOMIA DEL NERVIO OPTICO

1.-1.-1 ANATOMIA MACROSCOPICA Y RELACIONES

Clásicamente se define como nervio óptico el cordón nervioso que, originado de las células ganglionares de la retina, emerge de la porción posterior del globo ocular, atraviesa la órbita y alcanza la fosa craneana media a través del agujero óptico hasta llegar al quiasma.

Se puede considerar dividido en cuatro porciones:

1) *Intrabulbar* o zona del nervio comprendida en la esclerótica y la coroides. En este punto el nervio óptico se ensancha gradualmente formando una especie de tronco de cono cuya punta corresponde en el humano a la lámina cribosa.

2) *Orbitaria*. En la que el nervio atraviesa la órbita y el anillo de Zinn formado por los tendones de origen de los músculos rectos del ojo.

3) *Intracanalicular* o porción del nervio situada dentro del agujero óptico, entre la cavidad orbitaria y la craneana. Dentro del conducto el nervio está fuertemente unido al mismo y la arteria oftálmica se sitúa en su parte inferior.

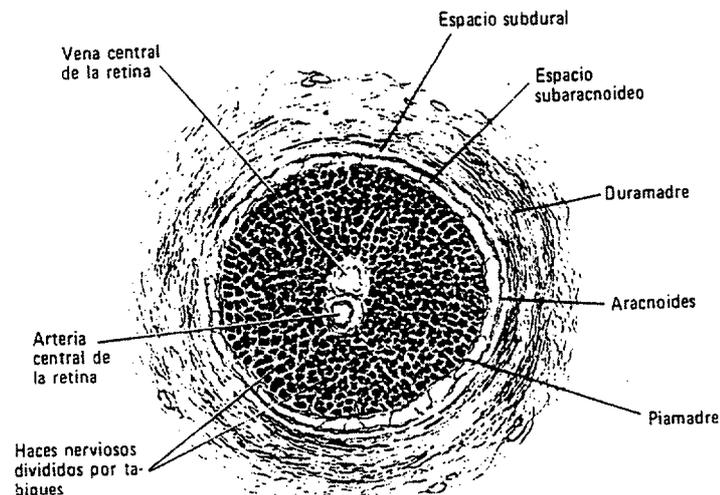
4) *Intracraneal*, dentro de la fosa craneana, próxima al quiasma óptico donde se relaciona con grandes vasos y tallo de la hipófisis.

(Saraux et al. '85, Testut L. and Latarjet A. '79).

Aunque se le denomina nervio, clásicamente se ha considerado como una prolongación del cerebro anterior primitivo (Testut L. and Latarjet A. '79).

La primera manifestación del nervio óptico en el desarrollo embrionario del hombre se produce cuando, en el embrión de tres semanas, comienza a invaginarse la vesícula óptica del prosencéfalo y forma la cúpula óptica. Esta cúpula óptica posee una pared doble, pero al continuar el desarrollo estas capas se unen y en el reborde ventral forman la hendidura ocular o cisura coroidea que se extiende siguiendo la cara inferior del pedículo óptico. La formación de esta hendidura permite a la arteria hialoidea llegar a la cámara anterior del ojo (Langman J. '76).

El nervio óptico básicamente está constituido por fibras nerviosas, células gliales, vasos sanguíneos, tabiques de tejido conectivo y rodeado por cubiertas meníngeas (De Juan J. y col. '78).



Representación esquemática del nervio óptico humano. (Tomado de Oftalmología General de Vaughan y Asbury)

La longitud del nervio óptico es muy variable. En el hombre oscila entre 35 y 55 mm y su diámetro es de 3 a 4 mm en el interior de la órbita,

siendo mayor en la porción intracraneal (Saraux et al. '85). En la rata adulta la longitud del nervio óptico es de aproximadamente 11 mm. (Miller y col. '89) y su área es de aproximadamente 97.10^{-3} mm^2 (Kjellström C. and Conradi N. '93).

1.-1.-2.-ESTRUCTURA DE LA VIA VISUAL.

Esta estructura pertenece a una vía de conducción sensorial que consta de:

- a) un aparato de recepción que son las células visuales de la retina o fotorreceptores: conos y bastones,
- b) un aparato de transmisión que son las tres neuronas que unen la retina a la corteza cerebral (célula bipolar-intrarretiniana, célula ganglionar-retinodiencefálica y neurona diencéfalo-cortical), y
- c) un aparato de percepción en la corteza del lóbulo occipital que contiene la cuarta neurona (Bouchet A. y Cuilleret J. '78).

Estructura de la retina:

Los receptores de la luz en cada ojo incluyen más de 100 millones de bastones y unos 7 millones de conos, los cuales convergen hacia el millón de neuronas ganglionares (Noback Ch. et al. '93).

Entre los fotorreceptores y las células ganglionares se sitúan las células bipolares. Estas poseen dos prolongaciones dirigidas en sentido inverso: una prolongación periférica que recoge las impresiones lumínicas que llevan los fotorreceptores (conos y bastones) y una prolongación central que se dirige hacia las células ganglionares de la retina (Testut L. and Latarjet. A. '79).

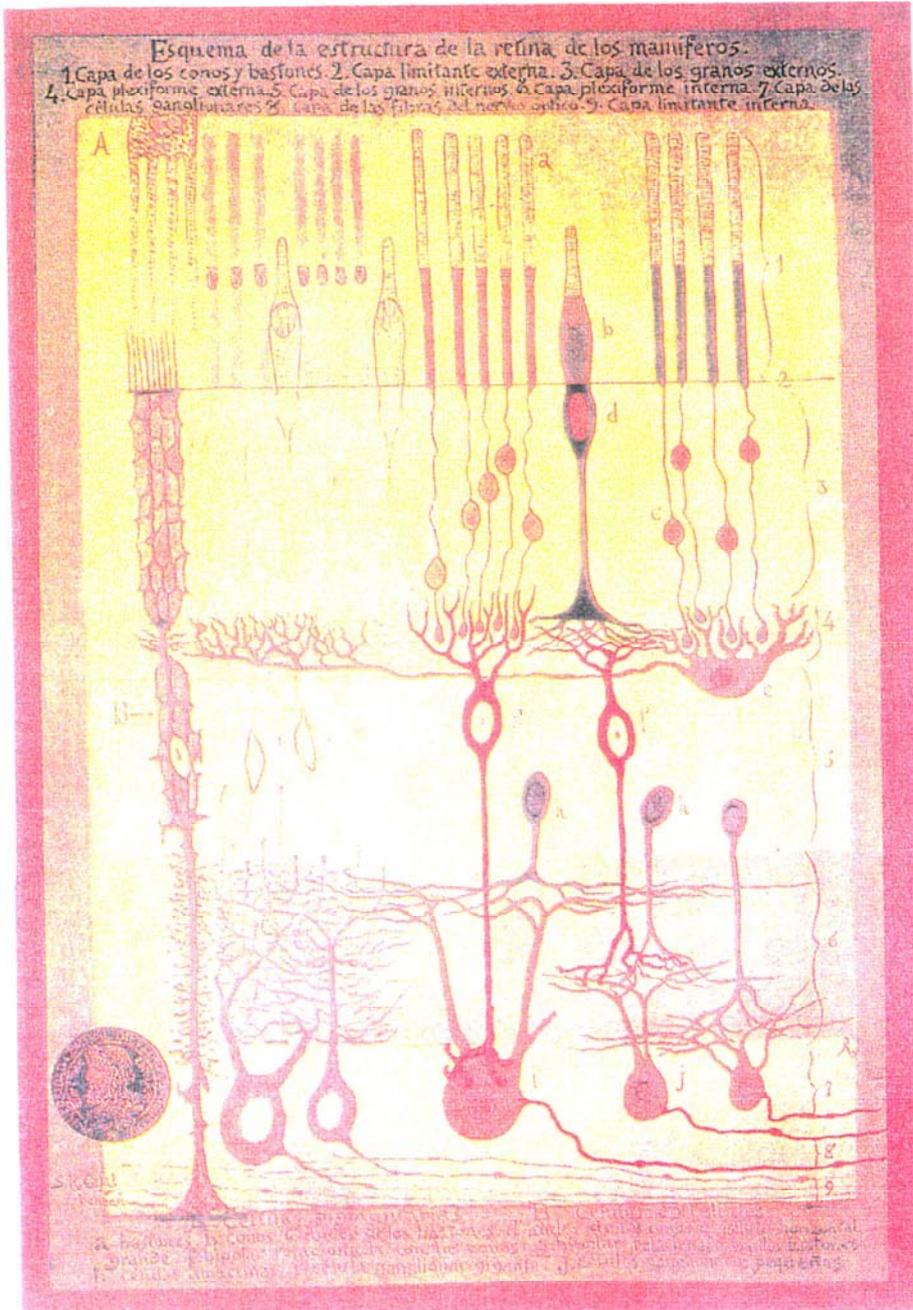
La organización morfológica de la retina permite distinguir la existencia de una vía sensorial directa y dos sistemas transversales:

a) *vía sensorial directa*: formada por fotorreceptor-célula bipolar-célula ganglionar. Existe una vía para bastones, que se caracteriza por la gran convergencia de receptores a nivel de una célula ganglionar, y una vía especial para conos que se caracteriza por su conexión uno a uno entre conos, células bipolares y células ganglionares, localizada en la fovea central.

b) *sistemas transversales*: Existen dos y se encuentran localizados uno a nivel de la conexión entre fotorreceptores y célula bipolar, constituido por las células horizontales y otro a nivel de la conexión entre células bipolares y células ganglionares, constituido por las células amacrinas.

El número de células ganglionares presentes en la retina varía según las especies. Así en los roedores parece haber un número aproximado de 506.703 células por ojo, según los estudios de L. Silveira en 1.989, y en los primates el número asciende a 1.200.000 aproximadamente (Smelser G. '80). El total de células ganglionares no está distribuido uniformemente por toda la retina sino que, según la mayoría de los estudios en diferente animales, la densidad celular disminuye a medida que nos alejamos de la fovea y nos

acercamos a la periferia ocular (Fukuda Y.'77, Silveira L.'89, Smelser G.'80). Asimismo en la fovea las células ganglionares se disponen en 6 ó 7 capas, mientras que en la periferia están muy separadas y en capa única (Silveira L. and Picanco-Diniz C.'89).



Dibujo de una sección transversal de las células nerviosas de la retina realizado por Santiago Ramón y Cajal y válido aún en nuestros días.

Las células ganglionares en el adulto poseen poca densidad electrónica, un núcleo pálido, nucleolo prominente y abundante sustancia de Nissl en su citoplasma y están recorridas por neurotúbulos y neurofilamentos orientados longitudinalmente (Silveira L. and Picanco-Diniz C.'89).

Muchos estudios han concluido en establecer tres tipos de células ganglionares (Fukuda Y.'77, Hollyfield J.'80, Kock J.'89, Rowe and Stone'76,).

Basándonos en la clasificación de Kock de 1.989, las células ganglionares se distribuyen atendiendo a sus características morfológicas y la extensión de su campo dendrítico en:

1.-*Células pequeñas*: muy numerosas y con campo dendrítico denso sin formar capas. (G1).

2.-*Células medianas*: con dos capas dendríticas, una hacia el vítreo y otra, menos densa, hacia la esclera.(G2).

3.-*Células grandes*: a su vez se dividen en tres grupos según sus prolongaciones dendríticas:

-prolongaciones hacia el vítreo y hacia la esclera (G3).

-sólo prolongaciones esclerales (G4).

-sólo prolongaciones vítreas (G5).

Esta clasificación puede ser superponible a la clasificación funcional de Enroth-Cupel y Robson (1.966) y de Stone y Hoffman (1.973) que se basan en los campos funcionales de acción y en la velocidad de conducción.

En tales clasificaciones se describen también tres tipos de células ganglionares denominadas X, Y, y W.

Las células X poseen cuerpos celulares de tamaño medio y axones con una velocidad de conducción media que se proyectan desde la fovea al cuerpo geniculado lateral. Las células Y poseen cuerpos celulares grandes cuyos axones conducen de forma rápida proyectándose desde la retina al núcleo geniculado lateral y al colículo superior. Son neuronas destinadas a la detección del movimiento, así como a la conducción de los reflejos luminosos y de acomodación (Noback Ch. et al. '93). Las células W presentan cuerpos celulares de diversos tamaños y se proyectan hacia el núcleo geniculado lateral y al colículo superior. Se desconoce su función.

Cuerpo geniculado lateral:

El cuerpo geniculado lateral es el núcleo talámico de relevo del sistema visual. Es una estructura celular laminar que en los cortes transversales tiene una configuración en forma de herradura.

En la rata posee cuatro capas de células pero en el humano y primates consta de seis capas celulares concéntricas separadas por bandas de fibras. Estas capas se subdividen en magnocelulares (capas 1 y 2) y en parvocelulares (capas 3 a 6).

La representación topográfica de la superficie de la retina en el cuerpo geniculado lateral está muy organizada y es muy precisa. Consta de seis láminas celulares dentro de un registro exacto, de manera que las columnas

celulares reciben impulsos de puntos correspondientes de la retina de cada ojo relacionados con el campo visual binocular contralateral.

El cuerpo geniculado es la principal estación terminal de la cintilla óptica. Se proyecta a la corteza calcarina (área 17) a través del haz geniculocalcarino o radiación visual, y recibe fibras corticogeniculadas de la misma área. (Carpenter M. '94).

En la retina, los axones de estas células ganglionares están envueltos, ya sea aisladamente o en grupos pequeños, por células gliales o de Müller. Las células de Müller se detienen en el borde de la papila, donde los axones se incurvan para formar el nervio óptico (Smelser G. '80). Otras células gliales (astrocitos y oligodendrocitos) aumentan en número en este punto y continúan envolviendo los axones hasta el cerebro.

Durante el desarrollo de la esclerótica, tanto en el hombre como en el mono, las fibras colágenas penetran en el nervio óptico, discurriendo entre los grupos de axones cubiertos por glia. Colaboran de esta manera a tapizar el agujero óptico con una red que dará origen a la lámina cribosa.

La lámina cribosa no está netamente definida en la parte posterior; donde sus fibras se interconectan con los extremos anteriores de los tabiques conectivos longitudinales del nervio óptico. Estos se originan como extensiones de la piamadre hacia el interior del nervio y separan fascículos de fibras nerviosas. Es considerado por diversos autores que la lámina cribosa representa una barrera para la migración de los oligodendrocitos (Berliner '33, French-Constant y cols. '88), considerando este último que al frenar la migración del precursor glial O2A, procedente del nervio óptico, impide que aparezcan astrocitos tipo II y oligodendrocitos a este nivel.

A diferencia de lo que ocurre en los vertebrados superiores, la rata carece de una auténtica lámina cribosa. Todo lo más que se observa a este nivel son proyecciones perpendiculares de vasos procedentes de la región periférica del nervio que, rodeados de una pequeña cantidad de tejido conectivo, profundizan en un corto trayecto hacia el interior del mismo (De Juan y col. '79).

En la mayoría de los casos los axones de la porción intraocular del nervio son amielínicos hasta que, según se separan del globo ocular para formar la porción intraorbitaria o nervio óptico propiamente dicho, son rodeados por las prolongaciones de los oligodendrocitos y se mielinizan.

Fibras nerviosas:

Los axones de las células ganglionares recubiertos de células gliales, constituyen la mayoría de las fibras del nervio óptico o **Fibras Ópticas**. Diversos estudios han comprobado que aproximadamente un 10% corresponden a fibras que desde el cerebro se extienden hacia la retina (Wakakura M. and Ishikawa S. '82, Wolter J. '79). Sacks and Linderberg (1.969) consideran que proceden del hipotálamo anterior y hoy día se les atribuye la función de ejercer un control tipo retroalimentación sobre la información transmitida por los axones de las células ganglionares de la retina (Wolter '79) de forma semejante a como se supone que ocurre con las fibras eferentes observadas en el oído interno humano (Ross '69,73).

En el nervio óptico las fibras nerviosas se disponen en sentido paralelo entre sí, formando un cilindro compacto y aparentemente homogéneo aunque en su interior se diferencian dos fascículos con diferente procedencia retiniana y que corresponden a los fascículos directo (retina temporal) y cruzado (retina nasal) entre los que se coloca el pequeño fascículo correspondiente al área macular, que en el hombre tiende a situarse centralmente conforme se aleja del globo ocular (Miller S. '91, Testut L. and Latarjet A. '79).

En los estudios morfométricos del nervio óptico se han observado variaciones importantes en cuanto al número de fibras que lo componen. Estas diferencias dependen de la especie animal y de la óptica empleada. Así en los casos en que se usaron microscopios ópticos con bajo poder de resolución se perdieron las fibras de pequeño calibre (De Juan y col. '78).

Así nos podemos encontrar con:

Autor/Año	Especie	Nº de fibras
Ariëns y Kappers/21	Hombre	500.000
Bruesch y Arey/42	Hombre	1.000.000
Polyak/57	Hombre	1.000.000
Oppel/63	Hombre	1.000.000
Kupfer/42	Hombre	1.000.000
Bruesch y Arey/42	Pato	413.000
O'Fleherly/71	Pato	1.500.000
Van Crevel/63	Gato	64.000
Bruesch y Arey/42	Gato	120.000
Bishop/53	Gato	120.000
Bruesch y Arey/42	Rata albina	74.000
Forrester y Peters/67	Rata albina	118.300

González Valverde en 1.979 calcula unas 60.000 fibras en la rata adulta y Balazsi en 1.984 sugiere en el hombre unas 1.244.000 fibras, aunque parece ser que con la edad este número disminuye (Balzsi et al. '84).

En el nervio óptico de la rata y el humano el 96% de los axones están cubiertos de mielina (Cuenca-Navarro J. y col. '87'89, González Valverde P. '79, De Juan y col. '92), aunque también se ha descrito un pequeño porcentaje de fibras carentes de cubierta miélnica (De Juan y col. '92,) que suelen corresponder a las fibras de menor tamaño y cuya proporción varía de una especie a otra.

La fibra mielinizada está formada por un axón o proceso neuronal continuo y un conjunto de oligodendrocitos que se colocan externamente al mismo. Las prolongaciones de cada oligodendrocito rodean segmentos de varios axones con una serie de vueltas de su membrana celular, formando la envuelta miélnica. Los puntos de encuentro de dos oligodendrocitos consecutivos aparecen como cortos segmentos de axón carentes de mielina (Nódulos de Ranvier), de aproximadamente una micra.

Los axones de estas fibras son lisos, de calibre bastante uniforme, limitados por una membrana celular o axolema perteneciente a la célula que le da origen. Estos axones se distribuyen en grupos que se mantienen más o menos constantes a lo largo de todo el nervio (Hocog J. and Cruz O. '78), presentando zonas de especialización a lo largo de su longitud que parecen representar puntos claves en la electrogénesis (Black J. '83, Hildebrand and Waxman '83, Waxman et al. '82). El axoplasma está formado por un fluido citosol con organelas, como mitocondrias, retículo endoplásmico, cuerpos

densos lamelares y citoesqueleto, microtúbulos y microfilamentos, cuya proporción varía con el desarrollo (Hocog J and Cruz O. '78).

Las fibras no presentan el mismo calibre (Hocog J. and Cruz O. '78, De Juan y col. '78'92, Kirby M. et al. '82, Rhoades R. et al. '79), variando tanto el diámetro del axón como el grosor de la mielina que lo envuelve. Para explicar las diferencias entre los diámetros axonales en un mismo nervio óptico se han propuesto dos teorías: Una de ellas considera que el diámetro del axón viene dado por la edad del mismo ya que en los estadios iniciales del desarrollo sólo existen axones pequeños mientras que los grandes aparecen en etapas posteriores. La otra apunta hacia que el diámetro del axón depende del tipo morfofuncional de la célula ganglionar de la que proceda (Hocog J and Cruz O. '78). En este sentido, ya se ha indicado que en la retina se pueden diferenciar tres tipos principales de células ganglionares y que, por otro lado, en el nervio óptico se pueden distinguir tres tipos diferentes de axones según sus características morfológicas así como por su velocidad de conducción (Fukuda Y. '77).

Según estudios multivariantes realizados por De Juan y colaboradores, las fibras ópticas se pueden dividir en tres grupos atendiendo al número de neurofilamentos, el grosor de la vaina de mielina, el diámetro de la fibra y el número de microtúbulos. Estos grupos quedarían distribuidos de la siguiente forma:

- Grupo A: (1,5-5%). Axones mielinizados de mayor tamaño.
- Grupo B: (30%). Axones de tamaño medio, y
- Grupo C: (66%). Axones pequeños

Aunque existen algunas variaciones se observa una gran similitud entre estos porcentajes y los que se corresponden con los de los tres tipos de células ganglionares (De Juan J. y col. '92):

Tipo I: (5%). Células grandes

Tipo II: (67%). Células pequeñas

Tipo III: (28%). Células intermedias

El diámetro de estas fibras también varía según la técnica empleada para su estudio, ya que con microscopía óptica no se aprecian las fibras menores de 0.7μ de diámetro. Con técnicas de microscopía electrónica se ha comprobado que el diámetro de las fibras del nervio óptico de la rata oscila entre las 0.3 y las 5μ de diámetro (De Juan J. y col. '84, Rhoades R. et al. '79), y de acuerdo a los siguientes porcentajes:

Fibras pequeñas: menores de 2.0 micras: 90.27%

Fibras medianas: entre 2.1 y 3.5 micras: 9.39%

Fibras grandes: mayores de 3.5 micras: 0.34%

Estos resultados son similares a los obtenidos por Oppel en 1963 en el nervio óptico humano

Para que se genere el potencial de acción en una célula ha de producirse una entrada masiva de iones positivos al interior de la misma, lo que altera el potencial de membrana y se dispara el potencial de acción. Este

potencial eléctrico se conduce de célula a célula por medio del axón. Dos son los mecanismos de conducción del potencial de acción por la fibra nerviosa: conducción continua y saltatoria. La conducción continua se produce en las fibras amielínicas y requiere de la existencia de canales de Na^+ y K^+ a lo largo de todo el axón. La conducción saltatoria se produce en las fibras mielínicas que tienen una alta densidad de canales de Na^+ y K^+ sólo en los nódulos de Ranvier (Guyton A.C.'77, Shepherd G.'85). La mediación del Calcio en los potenciales de acción también es significativa. Por un lado el flujo de calcio al interior de la célula durante un impulso es una forma efectiva de aumentar la concentración intracelular de calcio libre. Por otro lado, el calcio modula la concentración de otros iones, particularmente el potasio (Shepherd G.'85).

La velocidad de conducción, tanto en las fibras amielínicas como en las mielínicas, depende fundamentalmente del diámetro del axón y de la presencia o no de cubierta mielínica, aunque otros factores (densidad de canales iónicos, composición del axoplasma, etc.) también son importantes. Cuando aumenta el diámetro del axón disminuye bruscamente la resistividad de axoplasma, lo que favorece el flujo de corriente y la propagación del potencial de acción (Guyton A.C.'77).

En un intento de relacionar los parámetros de diámetro axonal, grosor de la vaina de mielina y velocidad de conducción de la fibra surge el concepto de Relación G (G-ratio) o relación existente entre el diámetro del axón y el diámetro de la fibra (axón y cubierta mielínica).

$$\text{Relación G} = \frac{\text{Diámetro Axón}}{\text{Diámetro Fibra}}$$

Parece ser que la velocidad de conducción es máxima cuando la G-ratio está entre 0.6 y 0.7 según los estudios de Rushton en 1.951 y Smith y Koles en 1.971.

La velocidad de conducción de la fibra nerviosa en general varía de 0.5 m/seg. de las fibras amielínicas más pequeñas a 100 m/seg. en las mielinizadas más gruesas (Guyton A. C.'77, Thomas P. et al.'93). En las fibras mielínicas la velocidad de conducción es mayor y, a su vez, tiene un menor coste energético que en las amielínicas, ya que la cantidad de iones de Na^+ que entran en el citosol por unidad de superficie es menor y por lo tanto requiere menos actividad de la bomba de Na^+ para su transporte al exterior.

Los estudios electrofisiológicos del sistema visual que se utilizan para determinar la integridad del sistema visual son fundamentalmente el Electrorretinograma (ERG) y los Potenciales Evocados Visuales (PEV) (Weintein G.W. et al.'91).

El ERG mide el potencial de masa que se produce frente a un destello luminoso utilizando un electrodo corneal y electrodos neutros colocados sobre la piel que rodea el reborde orbitario. Si se realiza con destellos luminosos (conocido como sistema de flash) informa sobre el estado funcional de las capas más externas de la retina y, si se utiliza el sistema en

el que el paciente fija la mirada en un tablero o rejilla de inversión (conocido como sistema de patrones) informa sobre todas las capas de la misma, incluidas las células ganglionares.

Según el estímulo utilizado, con estos procedimientos se obtienen diferentes tipos de onda, pudiéndose incluso diferenciar las respuestas de los conos de las los bastones. El ERG realizado con tablero normal presenta una primera onda positiva, P₅₀, a aproximadamente 52 mseg., seguida por una negativa mayor, N₉₅, en la región de 93 mseg. Recientes trabajos sugieren que la onda N₉₅ se genera en las células ganglionares y que puede afectarse de forma selectiva en procesos que cursen con degeneración axonal retrógrada (Spalton D. et al. '95).

Los PEV se basan en la actividad eléctrica recogida en el cortex visual en respuesta a la estimulación de la retina, con lo que se está estudiando la integridad de la via visual completa. El PEV, como el ERG, varía con el estímulo y los parámetros de registro, pero el patrón normal contiene un pico principal positivo de unos 100 mseg., denominado componente P₁₀₀, del que se miden su amplitud y su latencia. Es muy útil para diagnosticar patologías del nervio óptico, en especial la desmielinización subclínica (Spalton D. et al. '95).

1.-1.-4.-VASCULARIZACION DEL NERVIO OPTICO

Arbol vascular:

Según los trabajos de De Juan y colaboradores en 1.978, existe una gran semejanza entre la angioarquitectura del nervio óptico humano y la de la rata.

En ambos casos la vascularización arterial del nervio óptico corre a cargo, fundamentalmente, de los vasos sanguíneos de la circulación carotídea, aunque algunas ramas de la arteria central de la retina, que en la porción orbitaria se encuentra adosada al nervio en su porción inferior, también contribuyen al aporte arterial del nervio. Sin embargo, la contribución de la arteria central de la retina es pequeña y discutida por algunos autores (Sturroch R. '87).

En la región más proximal del nervio el aporte sanguíneo procede de las arterias hipofisarias. En la región orbitaria, dorsalmente al punto de penetración de la arteria central, la vascularización se realiza sólo por ramas piales procedentes de la arteria oftálmica. Por delante del punto de penetración de la arteria axial, en la porción orbitaria e intraocular, hay una doble vascularización: axial, por ramas intraneurales de la arteria central de la retina, y periférica, por ramas de la arteria central de la retina, arteria oftálmica y ciliares posteriores.

Las ramas periféricas forman un sistema pial que rodea al nervio y siguen un trayecto longitudinal al mismo. De ellas surgen ramas colaterales que profundizan en el interior del fascículo óptico, siguiendo el trayecto de

los tabiques interfasciculares, y se dividen sucesivamente en forma de T para formar los capilares (De Juan J. y col. '78).

En la rata no existen los septos fibrosos que delimitan los fascículos de fibras nerviosas. El nervio se halla rodeado de vasos periféricos de los que arrancan ramas colaterales perpendiculares que profundizan en la masa del nervio y que se van dicotomizando a medida que penetran en él (Sturroch R. '87).

La arteria oftálmica se encuentra adosada al nervio en la porción orbitaria y luego inicia un proceso de hundimiento en la masa del fascículo óptico para terminar ocupando la porción central del mismo. En el hombre la porción intraneural de estos vasos se inicia en la zona orbitaria, mientras que en la rata lo hace en la zona intraocular del nervio (De Juan y col. '78).

En la porción intraocular y la porción orbitaria el drenaje venoso está asegurado por la vena central de la retina. En la porción intracanalicular el drenaje se realiza por la vena posterior de Kunht que en un principio es central y que luego abandona el nervio a su entrada en el cráneo. El drenaje de la porción intracraneal está asegurado por venas de la piamadre (Saraux H. '85).

En general estos vasos se encuentran íntimamente relacionados con regueros de células macrogliales gliales que cubren casi totalmente la superficie del capilar. Sólo en determinados lugares dejan pequeños espacios del capilar sin cubrir (Cervós-Navarro J. et al. '88, Janzer R. and Raff M. '87).

La barrera hematoencefálica está formada a este nivel por capilares de endotelio continuo, lámina basal, pericitos y pies astrocíticos aunque estructuralmente está representada por las uniones estrechas mediante las

que se conectan las células endoteliales entre sí y que restringen la difusión intercelular (Raparort S. '77).

En condiciones normales, la barrera sanguínea sólo es permeable a nivel de la lámina cribosa (Kierman J. '85).

Las arterias y arteriolas en la rata muestran leiomiocitos circundando al endotelio así como abundantes vesículas de micropinocitosis en el citoplasma endotelial (De Juan J. y col. '78).

Aunque las venas y vénulas estructuralmente son similares a las de otras localizaciones, es de destacar que las vénulas presentan abundantes fibras de colágeno externamente a la lámina basal endotelial.

Células endoteliales:

Las células endoteliales en general presentan un espesor pequeño, con mitocondrias, ribosomas libres, escaso retículo endoplásmico rugoso, organelas específicas (cuerpos de Weibel Palade), vesículas plasmalémicas y elementos del citoesqueleto. El núcleo no muestra características especiales, aunque en algunas ocasiones es voluminoso y prominente hacia la luz capilar. Presentan una marcada actividad micropinocítica con abundantes cuerpos multivesiculares. Se ha demostrado la presencia de filamentos contráctiles en el endotelio (Zwerfach B. '73), con lo que es posible que la célula sea capaz de cambiar de forma e incluso separarse unas de otras.

Los capilares del nervio óptico son de endotelio continuo. Estas células se unen entre sí mediante especializaciones de unión de tipo "occludens" (De Juan J. y col. '78).

El endotelio fue considerado durante mucho tiempo como una simple barrera mecánica entre el flujo sanguíneo y el tejido circundante. Hoy día se le reconoce como un sistema extremadamente activo que juega un papel muy importante en procesos metabólicos y funciones fisiológicas. Entre ellas destacan: 1.-regulación de los mecanismos de coagulación, 2.angiogénesis, 3.-aclaramiento de lípidos circulantes,4.- regulación del sistema renina-angiotensina, 5.- síntesis de componentes estromales y 6.-participación en los mecanismos de inflamación y respuesta inmune (Fajardo L.'89, Molinatti G. et al'90).

El papel del endotelio como vehículo de paso de numerosas sustancias desde la sangre a la matriz extracelular o en sentido contrario ha quedado ampliamente demostrado (Casley-Smith J.'90). El paso de estas sustancias se puede realizar a través del propio citoplasma de la célula endotelial o a través de las uniones intercelulares, poros intracelulares o por las vesículas endoteliales descritas por Palade para el paso de macromoléculas. Estas vesículas tienen entre 200 y 300 Å (Zwefach B.'73), ocupan aproximadamente el 30% del citoplasma celular y su papel fundamental consiste en el transporte de macromoléculas, habiéndose sugerido que no son estructuras libres sino que casi todas son sesiles y están conectadas entre sí o a la membrana plasmática de la célula endotelial (Casley-Smith J.'90).

El papel del endotelio en la coagulación ha quedado claramente demostrado. La célula endotelial es capaz de sintetizar componentes del sistema de coagulación y fibrinólisis, moléculas adhesivas celulares e intercelulares, moduladores de la adhesión y agregación plaquetaria y factor Von Willebrand (Bloom A.'90).

Asímismo en respuesta a estímulos angiogénicos algunas células endoteliales de un "vaso madre" (generalmente vénula) se separan unas de otras dejando segmentos de membrana basal no cubiertos y que son rápidamente digeridos enzimáticamente. Por ese agujero formado emigran células endoteliales y otras se dividen formando los brotes neovasculares que se dirigen hacia el estímulo angiogénico (Diaz Flores L. et al'91). Las características fenotípicas del vaso neoformado dependen del estroma que lo rodea (Fajardo L. '89).

Dentro de la actividad metabólica del endotelio cabe destacar también su papel en la captación, transporte y degradación de la insulina circulante. Las células endoteliales juegan un papel crítico en el aclaramiento de la insulina y cambios en el número de receptores para insulina en la célula endotelial pueden alterar significativamente la eficacia de la misma, tanto endógena como exógena. (Pillion D. and Meezan E. '90).

Como secretor de los componentes del estroma participa en la formación de la membrana basal, principalmente segregando el colágeno tipo IV y la laminina, así como participar en su remodelación ante determinadas circunstancias.

Pericitos:

Los pericitos son células de origen mesenquimal y forman una envuelta incompleta alrededor de las células endoteliales (De Juan y col. '78, Diaz Flores et al. '91). Son células largas y polimorfas con un cuerpo celular elongado del que salen ramas longitudinales y circunferenciales.

Generalmente un pericito emite procesos mayores que se orientan paralelamente al eje vascular y otros pequeños que envuelven circunferencialmente al vaso cubriendolo incompletamente.

En la microcirculación retiniana del hombre la relación pericito/celula endotelial es de 1:1, mientras que en la rata es de 1:3. (Diaz Flores et al.'91).

En el nervio óptico los pericitos son muy escasos, siendo lo más habitual observar que sus prolongaciones ocupan menos del 50% de la periferia del capilar (De Juan y col. J.'78). Se pueden encontrar células con un gran núcleo, citoplasma y organelas escasas o por células en estado muy activo con organelas más numerosas (Scott'84). Al microscopio electrónico presentan una red citoplásmica de filamentos.

Están envueltos por la misma lámina basal que las células endoteliales excepto en las zonas donde se unen entre sí las células (Diaz Flores et. al'91).

Al pericito se le atribuyen funciones de contractilidad, regulador de la permeabilidad, mantenimiento de la integridad mecánica, modulador del crecimiento endotelial y potencial progenitor de células mesenquimatosas.

La asociación entre pericitos y células endoteliales parece mediar la motilidad, metabolismo y alteraciones en la morfología de las células endoteliales durante la angiogénesis (Diaz Flores et al.'91).

Lámina basal:

La Lámina basal es una red continua de material especializado de matriz extracelular compuesta principalmente de colágeno tipo IV, proteoglicanos, heparán sulfato, laminina y entactina (Mosher J. et al.'92).

Está formada por una "lámina densa", de 20-50 nm. de grosor, que se sitúa paralelamente a la membrana celular del endotelio y separada de ella por una "lámina clara", de aproximadamente 10 nm., conocida como lámina lúcida o lámina rara (Gist Farquharh '91).

Esta lámina basal envuelve tanto a las células endoteliales como a los pericitos y envía prolongaciones entre los elementos gliales circundantes (De Juan y col.'78). En el resto del organismo en los lugares donde la Membrana Basal separa a la célula endotelial del pericito está fenestrada permitiendo el contacto directo entre ellas (Diaz-Flores R. y col.'91), pero en el nervo óptico no existen estos espacios sino que la membrana basal es continua.

Parece ser que tanto las células endoteliales como los pericitos contribuyen a la formación de la membrana basal (Cohen 1.980) y que su grosor puede aumentar con la edad y procesos patológicos (Diaz-Flores R. y col.'91).

1.-1.-4.-COMPONENTE GLIAL

El término NEUROGLIA fue acuñado en 1.840 por el patólogo alemán R. Virchow para designar a las regiones existentes entre las neuronas, de manera análoga, en su opinión, al tejido conectivo de otros órganos (Kimmelberg H. and Norenberg M. '90).

Al igual que las neuronas, estas células en su mayoría tienen un origen ectodermal (Angevine '70, Sidman '70, Sidman and Rakic '73), aunque hoy se

hoy se discute si proceden de las mismas células precursoras que las neuronas o de otras diferentes (Peters A. et al. '76).

Como el nervio óptico es una prolongación del sistema nervioso central pero no posee cuerpos neuronales, es una estructura muy utilizada para el estudio de la neuroglia.

En el nervio óptico de la rata adulta se han diferenciado tres tipos celulares. La mayoría de ellas constituyen la Macroglía (Astrocitos y Oligodendrocitos), mientras que el tercer tipo celular es la Microglía.

Aunque la neuroglía ya está presente en las primeras etapas del desarrollo embrionario de la rata, parece ser que la gran proliferación de células neurogliales se produce después del nacimiento (Bignami A. '91).

Son células que no forman sinapsis entre sí y tienen la posibilidad de dividirse, sobre todo ante daño del sistema nervioso.

En la retina de los mamíferos también se demuestran dos tipos de células gliales: las células de Müller y los astrocitos. Estos últimos aparecen solamente en retinas vascularizadas. Aparecen inicialmente alrededor de la papila y luego van extendiéndose radialmente hasta alcanzar las zonas más periféricas de la retina. Esto ha hecho suponer que los astrocitos retinianos emigran desde el nervio óptico hacia la retina (Ling T. et al '89).

Se ha discutido mucho, y se han realizado numerosos estudios con el fin de determinar el origen de las células gliales del sistema nervioso, si proceden todas de una misma célula precursora o de varias. Hoy día parece claro que las células de la macroglia proceden de células ectodermales del neuroepitelio primitivo, pero de células diferentes que las que dan origen a las neuronas (Peters A. et al. '76). Las células de la microglía, por su parte, proceden de células de origen mesodérmico.

Dentro de las células de la macroglía, gracias a estudios de cultivo celular *in vitro* y a la inmunohistoquímica, se ha podido demostrar que la primera célula glial en aparecer en el nervio óptico son los astrocitos tipo I (alrededor del día 16 de desarrollo embrionario), luego aparecen los oligodendrocitos (primer día postnatal) y, por último los astrocitos tipo II (segunda semana postnatal).

Así mismo se ha observado (Raff M. and Miller R. '84, Raff M. '89, Miller et al '89) que los oligodendrocitos y los astrocitos tipo II proceden de una misma célula progenitora común (0-2A) y el astrocito tipo I procede de otra célula precursora diferente. Esta célula precursora común del oligodendrocito y el astrocito tipo II no se desarrolla a partir del neuroepitelio del tracto óptico sino parece ser que es una célula que emigra desde el cerebro y que estaría especializada en la formación de la mielina. Las condiciones ambientales son las que hacen que se dirija la diferenciación hacia un tipo celular u otro. Las células del neuroepitelio del tracto óptico dan lugar sólo a los astrocitos tipo I, que son los primeros en aparecer y podrían también influir en la diferenciación de los otros dos tipos celulares (Raff M. '89).

MACROGLIA

ASTROCITOS

Son elementos celulares estrellados que presentan múltiples ramificaciones finas, algunas de las cuales se dirigen hacia los capilares de la vecindad con quienes establecen contactos (pies terminales)(Gómez

P.'74). Otras ramificaciones se extienden hacia la superficie del sistema nervioso central constituyendo una membrana limitante (Kimbelberg H. and Noremberg M.'90).

Conocidos desde finales del siglo XIX, durante mucho tiempo se les atribuyó funciones puramente estructurales o de sostén de las neuronas. Hoy día, sin embargo, se sabe con certeza que los astrocitos tienen funciones fundamentales en la fisiología normal y en el desarrollo del cerebro así como que participan en situaciones patológicas del sistema nervioso (Kimbelberg H. and Noremberg M.'90).

Desde el punto de vista ultraestructural se pueden distinguir dos tipos de Astrocitos:

-Astrocitos Fibrosos: llamados así porque presentan numerosas fibrillas o filamentos perinucleares que se extienden a lo largo de sus procesos. Los filamentos son de 8-9 nm de diámetro y en los cortes transversales aparecen con una pared densa de 2 a 5 nm de grosor. Su núcleo es redondo u oval, presentando su cromatina en acúmulos densos localizados (Gómez P.'74).

Los astrocitos fibrosos han sido muy estudiados en el nervio óptico y en él los procesos principales emergen de forma radial desde el cuerpo celular. Estos y sus divisiones se unen a procesos de otras células para formar las láminas que dividen a las fibras nerviosas en grupos (Peters A. et al.'76).

También estas prolongaciones forman los pies terminales en la superficie de los capilares que se interponen entre las fibras nerviosas y las células endoteliales. Separando la membrana plasmática de la célula glial de

la del endotelio queda un espacio de 40 a 100 nm que es ocupado por la lámina basal (Bignami A. '91).

-Astrocitos Protoplásmicos: Presentan fibrillas citoplásmicas en menor cantidad que los astrocitos fibrosos, su retículo endoplásmico es poco abundante y su citoplasma es más claro. Los cuerpos celulares y los procesos son más irregulares que en los fibrosos pero también forman pies terminales alrededor de los capilares y forman parte de la glia limitante del sistema nervioso.

Clásicamente los astrocitos eran identificados con tinciones selectivas de los filamentos gliales pero gracias al descubrimiento de la Proteína Ácida Fibrilar Glial (PAFG) se ha producido un gran avance en el conocimiento de las funciones de los astrocitos. La PAFG es la subunidad de los filamentos intermedios de los astrocitos y se puede identificar fácilmente por medio de inmunohistoquímica. Esta proteína se encuentra exclusivamente en los astrocitos, lo que ha sido de gran ayuda para su identificación y estudio de sus funciones.

Por medio de estudios inmunohistoquímicos se han distinguido también dos subtipos de astrocitos en el nervio óptico (Raff et al '83) y que difieren en algunas de sus propiedades. Estos subtipos se conocen como:

-Astrocitos tipo I: con cuerpo celular grande y que no responden a la presencia de anticuerpo monoclonal A2B5, aunque sí lo hacen ante la presencia del factor de crecimiento epidermal y glial (Eisenbarth et al '79).

-Astrocitos tipo II: con cuerpo celular pequeño, cuya superficie sí responde al anticuerpo A2B5, pero no lo hacen ante el factor de crecimiento

epidermal y glial. Este tipo celular es más abundante en el nervio óptico. Aparece en la rata después del nacimiento y contribuye a la formación de la membrana glial limitante (Mokuno K. et al.).

El anticuerpo A2B5 fue demostrado por Raff y colaboradores para identificar a la célula precursora de los oligodendrocitos y los astrocitos tipo II.

Entre las diferentes funciones atribuidas a los astrocitos, las más aceptadas hoy día son:

-Soporte estructural: Los astrocitos y sus prolongaciones ofrecen una “funda” a toda la superficie externa del sistema nervioso central y forman un esqueleto de soporte al mismo.

-Reparadora: Cuando se producen lesiones en el sistema nervioso central, las células neurogliales, especialmente los astrocitos, reparan el defecto proliferando y llenando el espacio que estaba ocupado por las neuronas (Peters A. et al.'76, Hatten M. et al.'91). Se ha observado un aumento de la Proteína Ácida Fibrilar en los casos de lesión del sistema nervioso, debido al aumento o crecimiento de los astrocitos.

-Barrera hematoencefálica: Formando parte del complejo célula endotelial-lámina basal-astrocito que regula parte del paso de determinadas sustancias desde el torrente circulatorio al sistema nervioso. Parece ser que entre los astrocitos no se forman uniones ocludens sino tipo gap junction e incluso parece ser que si entre ellos se forma una unión completa algunas sustancias pueden pasar entre ellos (Peters. A. et al.'76).

-Aislamiento de las superficies receptoras, manteniendo el equilibrio iónico y de neurotransmisores necesario para la transmisión entre neuronas (Peters et al. '76).

OLIGODENDROCITOS

El término Oligodendroglía fue introducido por Del Rio Hortega en 1.921 para describir aquellas células neurogliales que presentaban pocos procesos teñidos con las técnicas de impregnación metálica.

En el nervio óptico de la rata se localizan preferentemente en el interior del mismo, asociadas a grupos de fibras mielinizadas. En el animal adulto poseen un cuerpo celular relativamente pequeño y un citoplasma característicamente electrodensos del que emergen pocas prolongaciones celulares. Estas prolongaciones celulares son las que van a envolver los axones de las células ganglionares de la retina dando varias vueltas sobre sí mismas, proporcionándoles la cubierta o esqueleto miélnico.

Su núcleo, con forma circular, elipsoidea o en herradura (Peters A. et al. '76) es más pequeño y regular que el de los astrocitos y la cromatina tiende a agruparse en acúmulos. El retículo endoplásmico y el aparato de Golgi están bien desarrollados.

A diferencia con los Astrocitos, tienen pocas fibrillas citoplásmicas y gránulos de glucógeno en su citoplasma, pero los microtúbulos sí son abundantes.

A menudo es frecuente encontrar cuerpos densos en su citoplasma que pueden ser homogéneos o contener gránulos, filamentos o componentes de membranas.

En la rata los Oligodendrocitos aparecen en el nervio óptico alrededor de la segunda o tercera semana postnatal, coincidiendo con el comienzo de la mielinización de los axones de las células ganglionares de la retina y aumentando la eficacia de la propagación del potencial de acción en el nervio óptico (Miller R. et al. '85).

Desde el punto de vista morfológico se han descrito varios tipos de Oligodendrocitos: claros, medianos y oscuros pero parece ser que se trata de distintas fases en la maduración del mismo tipo celular (Mori and Leblond '70, Vaughn and Peters '71) en la que los oligodendrocitos más claros corresponden a células inmaduras que están activamente dividiéndose, con muchos procesos finos ricos en microfilamentos y con un cuerpo celular que contiene muchos microtúbulos. Estas células se van haciendo progresivamente más oscuras a medida que van madurando, presentando procesos más finos y que contienen microtúbulos y no microfilamentos (Wilson and Brophy '89).

Esta idea está en relación con los estudios de Vaughn y Peters en 1.971 que encontraron que los oligodendrocitos más inmaduros o activos en el nervio óptico en desarrollo se presentaban como células grandes con grandes procesos citoplásmicos que aparecían justo antes del proceso de mielinización.

Estos oligodendrocitos procederían de la célula O-2A, precursor común de ellos y los astrocitos tipo II como se describe en los trabajos de Raff M. y Miller R. en 1.984.

Son las únicas células del nervio óptico que se pueden marcar con anticuerpos anti galactocerebrósidos, el mayor componente glicolípido de la mielina (Miller R. et al. '89, Raff M. et al. '78), lo cual es muy útil para su identificación en las preparaciones de inmunohistoquímica.

No poseen conexiones con los vasos sanguíneos y se les han atribuido dos funciones: formación de la mielina y nutrición de las neuronas (Gómez P. '74, Peters A. et al. '76).

El papel de los oligodendrocitos en la formación de la mielina se basa en el hecho de que dichas células aparecen inmediatamente antes de que comience la mielinización (Davison '68, Vaughn '69). Al mismo tiempo que se produce el mayor grado de mielinización se produce la proliferación y diferenciación celular de los oligodendrocitos (Hirose and Bass '73,49.). También se han demostrado conexiones entre cubiertas miélicas inmaduras y oligodendrocitos jóvenes en el tejido en desarrollo (Jhaveri S. et al. '92).

La idea de que los Oligodendrocitos juegan un papel en la nutrición de las neuronas se basa en las observaciones que muestran que frecuentemente estas células neurogliales se sitúan satélites a los cuerpos neuronales y que ya fue descrito por Holmgren en 1.900 y por Cajal en 1.913.

MICROGLIA

Es el "tercer elemento celular" del nervio óptico descrito por Del Rio Hortega, quien estableció su origen mesodérmico y su capacidad fagocítica.

Son elementos de origen mesenquimatoso, no derivados del epitelio neural primitivo (Gómez P.'74, Kimelberg H. and Noremborg M.'90) que penetran en el sistema nervioso junto con los vasos sanguíneos (Peters A. et al.'76) en el curso del desarrollo. Esta localización perivascular se mantendrá, rodeando los pies de los astrocitos o en posición perineural (Peters A. et al.'76). Aunque están presentes tanto en la sustancia blanca como en la gris, es en esta última donde son más abundantes, y suponen alrededor de un 5 a un 10% del total de células gliales (Peters A. et al.'76).

La microglía es una célula relativamente pequeña en comparación con los Astrocitos. Su citoplasma, algo oscuro y pobre en orgánulos, posee escasos ribosomas y mitocondrias. El retículo endoplásmico rugoso y el aparato de Golgi están bien diferenciados y forman un anillo alrededor del núcleo (Peters A. et al.'76) del que parten algunas proyecciones cortas en forma de espinas.

Contiene algunos microtúbulos pero carece de gránulos de glucógeno y de filamentos, lo que permite distinguirlas de los astrocitos.

Su núcleo es alargado o triangular y rico en cromatina que se dispone en acúmulos (Gómez P.'74, Peters A. et al.'76). Esta cromatina suele ser más densa y ocupa mayor proporción del volumen nuclear que la de los oligodendrocitos.

Es frecuente encontrar en su citoplasma cuerpos densos laminares, gotas lipídicas, lisosomas y lipofuscina en mayor proporción que en las células de la macroglía.

Aunque se ha dicho que en el animal adulto son células inactivas Vaughn y Peters consideran que las células de la microglía son células multipotenciales y se ha demostrado que son capaces de multiplicarse por

mitosis bajo determinados estímulos (Peters A. et al. '76), sobre todo ante lesiones inflamatorias o degenerativas del sistema nervioso. En estos casos retraen sus procesos y emigran hacia el lugar del daño, donde se convierten en macrófagos y "retiran" los desechos. Una vez cargada de desechos la célula se vuelve globulosa y los transporta a los vasos sanguíneos vecinos. Se desconoce si la célula descarga sus detritus al torrente sanguíneo o es ella misma la que pasa directamente a él.

En casos de degeneración Walleriana del nervio óptico esta células aumentan en número rodeando a los fragmentos de mielina degenerada (Bignami A. '91) y cargándose de inclusiones lipídicas.

Además de su capacidad fagocítica también se ha descrito su capacidad de producción de citokinas y de procesar antígenos, sobre todo durante el desarrollo de desórdenes de naturaleza inmune del sistema nervioso central (Giulian D. and Young D. '86).

1.-2.-DIABETES

1.-2.-1.-GENERALIDADES

La Diabetes Mellitus puede definirse como un trastorno crónico caracterizado por dos tipos de manifestaciones:

a) un síndrome metabólico consistente en hiperglucemia, glucosuria, polifagia, polidipsia, poliuria y alteraciones en el metabolismo de los lípidos y de las proteínas como consecuencia de un déficit absoluto o relativo en la acción de la insulina.

b) un síndrome vascular, que puede ser macro o microangiopático, y que afecta a todos los órganos, pero especialmente al corazón, circulación cerebral, riñones y aparato visual (Farreras P. y Rozman C.'82).

Los conocimientos sobre la fisiopatología de la Diabetes Mellitus han cambiado mucho desde la época de Galeno en que se consideraba a la Diabetes como “enfermedad del riñón que es incapaz de retener agua”. Este postulado sería válido hasta 1.889 en que se involucra al páncreas como origen de la enfermedad (Farreras P. y Rozman C.'82, Fernández Vigo'92).

La Diabetes Mellitus es una de las enfermedades más frecuentes en la clínica humana. Se estima que en el mundo occidental la incidencia es del 1 al 2 % de la población general, aunque esta proporción puede variar según la zona estudiada.

Hoy día se considera a la enfermedad diabética como un síndrome, del cual se extraen varias entidades bien delimitadas. En la práctica común se pueden diferenciar dos grandes categorías:

a) *Diabetes primaria*, que a su vez puede ser :

.- Diabetes insulino dependiente, juvenil o tipo I

.- Diabetes no insulino dependiente, del adulto o tipo II

b) *Diabetes secundaria* a otros procesos sistémicos

existiendo muchas excepciones a esta clasificación.

Aunque las causas de esta enfermedad no son aún bien conocidas, se sabe que en su patogénesis intervienen distintos factores ambientales a la vez que distintos grados de susceptibilidad genética (Barbosa J.'86, Ascaso J.'86). Se han identificado varios factores de riesgo que están claramente relacionados con ella, tales como obesidad, malnutrición, infecciones víricas, ciertas toxinas, fenómenos de inmunidad, etc.

Con la introducción de los antibióticos y, sobre todo, con el descubrimiento de la Insulina por Banting y Best en 1.921 (Espí F. y Carmena R,'86) se consigue una reducción notable de la mortalidad y aumenta la expectativa vital del diabético, en función del correcto control metabólico a que se halle sometido (Ministerio de Sanidad y Seguridad Social'81), pero se desenmascara el espectro de las complicaciones crónicas de la enfermedad, principalmente las vasculares y las neurológicas.

1.-2.-2.-COMPLICACIONES

Las complicaciones tardías de la diabetes incluyen una serie de cuadros, principalmente relacionados con alteraciones en los grandes vasos

(macroangiopatía), pequeños vasos (microangiopatía) y el sistema nervioso periférico (neuropatía).

Aunque ha sido un tema ampliamente estudiado, todavía hoy existen muchas incógnitas en cuanto a las características de dichas complicaciones. Su presencia en casi todos los tipos de diabetes indica que hay un mecanismo patogénico común que puede ser identificado como el alto nivel de glucosa en sangre y las alteraciones bioquímicas inducidas por la misma (Hsueh W and Anderson P. '92, Mandario L. '92, Squadrito G. and Cucinotta D. '91). La frecuencia e intensidad de las complicaciones se correlacionan directamente con los niveles de glucemia pero, por otro lado, las anormalidades metabólicas de la diabetes son necesarias pero no suficientes para el desarrollo de dichas complicaciones (Lorenzi M. '92). La interacción entre factores genéticos y factores metabólicos y hormonales es, probablemente, quien determina la incidencia y severidad de las complicaciones de la diabetes (Baxter M. '91).

Los estudios realizados en los últimos 15 años han establecido que la hiperglucemia, consecuencia metabólica de la falta de insulina, es la responsable de la mayoría de las complicaciones crónicas de la diabetes. El control estricto de la hiperglucemia parece prevenir el desarrollo de muchas de estas complicaciones, aunque desafortunadamente, cuando estas complicaciones están ya presentes el control de la glucemia no es suficiente para prevenir el progreso de las mismas (Brownlee M. et al. '84).

Las células más sensibles o susceptibles a las anormalidades de la diabetes (endotelio, células nerviosas y células mesangiales) no requieren

insulina para el transporte de la glucosa. Por ello el aumento de glucosa en sangre se traduce en aumento de glucosa intracelular (Kreisberg J.'92).

MECANISMOS RESPONSABLES

Dos mecanismos fisiopatológicos se han postulado como responsables de que la hiperglucemia produzca el daño tisular irreversible:

A) La **hiperglucemia** produce niveles alterados de productos metabólicos y sintéticos que alteran la función tisular. Un ejemplo bien estudiado es la vía del Polyol, que aumenta su actividad en presencia de hiperglucemia (Robison W.'91). Esta vía cuenta con dos enzimas, la Aldosa-reductasa y la Sorbitol-dehidrogenasa, que convierten a la glucosa en sorbitol y al sorbitol en fructosa, respectivamente. Bajo condiciones normales la glucosa intracelular es rápidamente fosforilada por la Hexokinasa, pero en la diabetes la alta concentración de glucosa intracelular desborda a la Hexokinasa, y el exceso de glucosa se convierte en sorbitol por la acción de la Aldosa-reductasa, a pesar de que esta última tiene menos afinidad por la glucosa que la Hexokinasa (Schmidt M. and Michal M.'89). El aumento del grado de reducción de glucosa por la enzima Aldosa-reductasa utilizando NADPH como donante de hidrógeno da lugar a deplección de NADPH requerido para la actividad antioxidante de la Glutación reductasa. El NADPH reducido es requerido por enzimas, incluidas la reductasa del citocromo P-450 y la Oxido nítrico sintasa, por lo cual estos sistemas pueden verse afectados por el incremento de la actividad de la Aldosa reductasa (Cohen R.D.'93, Lorenzi M.'92). Como también

produce niveles elevados de sorbitol, por un lado crea un desequilibrio osmótico y por otro un desequilibrio en las condiciones de reducción-oxidación, afectando de esta forma a una serie de funciones celulares como la actividad Na^+/K^+ -ATPasa, en relación con los cambios en la hemodinámica y la permeabilidad vascular (Nasr H. et al. '94).

Al sorbitol intracelular se le ha atribuido un papel importante en la patogénesis de las complicaciones de la diabetes, como la afectación microvascular, la retinopatía, la neuropatía y la catarata (Nasr. H. et al '94, Schmidt M. and Michal M. '89, Brownlee M. et al. '84).

B) La excesiva **glicosilación no enzimática de las proteínas** parece estar muy relacionada con un gran número de los procesos patofisiológicos potencialmente relacionados con el desarrollo de las complicaciones tardías de la diabetes (Brownlee M. et al. '84).

La glucosa intracelular excedente se une a grupos amino de la lisina de proteínas ya formadas. Esta unión, irreversible, está en relación con los niveles de glucosa y no está mediada por enzimas, por lo que no tiene "límite" (Fernández Vigo J. '92).

Con ello se produce una importante desnaturalización de las proteínas afectadas, dando lugar a cambios estructurales e inmunológicos además de alterar sus funciones.

En tal sentido se ha demostrado que la glicosilación no enzimática de determinadas proteínas produce alteraciones en el colágeno de la membrana basal y lesiones en las células endoteliales y en la estructura de la matriz extracelular (Fernández Vigo J. '92, Brownlee et al. '84).

Junto a estos mecanismos brevemente expuestos, se sabe que otros factores pueden favorecer el desarrollo de complicaciones en la diabetes. Entre ellos pueden destacarse:

.-Hipertensión arterial: es aceptado en la clínica diaria que la hipertensión arterial es el factor que más contribuye al desarrollo de las complicaciones vasculares de la diabetes, o por lo menos que favorece el avance de las mismas (Hsueh W. and Anderson P. '92).

.-Presencia de anticuerpos contra células endoteliales: También puede jugar un papel relevante en el desarrollo de las complicaciones la presencia de anticuerpos contra células endoteliales vasculares demostrados en pacientes diabéticos en mayor proporción que en sujetos normales (Jones D. et al. '92).

Las complicaciones más frecuentes e invalidantes de la diabetes mellitus se pueden agrupar en dos cuadros principales: Vasculopatía y Neuropatía diabéticas.

VASCULOPATIA DIABETICA

En la afectación de los vasos sanguíneos por la diabetes tenemos que distinguir:

a) La MACROANGIOPATIA con afectación de los grandes vasos por placas de ateroma de forma más severa y temprana que en la población general. Se desconoce la causa de esta aterosclerosis acelerada pero se ha

sugerido que pueden desempeñar un papel importante las proporciones de lipoproteínas de alta y baja densidad en la sangre. Las lipoproteínas de baja densidad oxidadas no se unen a sus receptores normales y contribuyen al desarrollo de la arterioesclerosis depositándose en las arterias. Estos depósitos pueden causar isquemia periférica con claudicación intermitente, infartos de miocardio o impotencia de origen vascular en los varones (Wilson J. et al '91).

Otros factores discutidos son el aumento de la adherencia plaquetaria como consecuencia de un aumento en la síntesis del tromboxano A₂ y la disminución en la síntesis de prostaciclina.

b) La MICROANGIOPATIA con afectación capilar, sobre todo en riñón, retina y músculo (Farreras P. and Rozman C.' 86, Wilson J.'91).

La enfermedad renal es una de las complicaciones más frecuentes, presentándose en el 40-50% de los diabéticos, y una de las causas principales de muerte en dicha población (Wilson J.'91). La nefropatía diabética puede presentar dos patrones patológicos característicos que pueden o no coexistir: difuso y nodular. La forma difusa, más frecuente, se caracteriza por un ensanchamiento de la membrana basal glomerular y un engrosamiento mesangial generalizado. La glomeruloesclerosis nodular o lesión de Kimmelstiel-Wilson se presenta como una masa hialina PAS+ que aparece cerca del glomérulo, con engrosamiento de la membrana basal y de la región mesangial (Wilson J. et al '91).

NEUROPATIA DIABETICA

La neuropatía diabética se presenta generalmente en forma de polineuropatía sensorial, aunque existen otras forma de presentación como mononeuropatías o afectacion del sistema nervioso autónomo (Thomas P. and Tomlinson D. '93). La prevalencia difiere mucho de unos autores a otros (del 5 al 60 %) según los métodos de estudio o los criterios de inclusión que se tengan en cuenta e, incluso, se puede considerar que el 100% de los pacientes diabéticos presentan algun tipo de manifestación neurológica si se tienen en cuenta las anomalías subclínicas en la conducción nerviosa (Fernández Vigo J. '92, Thomas P. and Tomlinson D. '93).

La frecuencia de presentación aumenta directamente con los años de evolución de la enfermedad, la edad de los pacientes y con ciertos factores no muy estudiados como son la altura, el sexo masculino y cierta labilidad genética.

Es de destacar que, de acuerdo con algunos estudios, como los realizados por Goodman y Pirart en 1.978 sobre más de 4000 pacientes, alrededor de un 8% de los diabéticos presentan algún signo de neuropatía en el momento del diagnóstico y hasta un 50% de los mismos después de 25 años de evolución de la enfermedad.

Sin embargo la neuropatía diabética es muy rara en los niños, afectando sólomente a un 2% de los mismos.

El principal problema en la clasificación de la neuropatía diabética son los cuadros mixtos, aunque una clasificación presentada por Thomas en 1.973 incluye la mayoría de los cuadros:

.-Polineuropatías simétricas:

.-Polineuropatías sensitivas o sensitivomotoras

.-Neuropatía autonómica

.-Neuropatía motora simétrica del miembro inferior proximal

.-Neuropatía focal y multifocal:

.-Neuropatía de pares craneales

.-Mononeuropatía asimétrica de tronco y miembros

.-Neuropatía asimétrica motora del miembro inferior

.-Formas mixtas.

El indicador más consistente de neuropatía subclínica es la anormalidad en la conducción nerviosa. Se produce una disminución en la velocidad de conducción, con disminución en la amplitud y dispersión temporal de los potenciales de acción sensoriales. La causa de esta disminución en la velocidad de conducción parece ser una pérdida en la fibras de mayor tamaño y cierta desmielinización segmentaria de las restantes (Thomas P. and Tomlinson D. '93).

En el hombre se han observado lesiones de base isquémica en nervio periféricos y se ha conseguido mantener la velocidad de conducción aumentando la presión parcial de oxígeno en los tejidos de animales diabéticos (Thomas P. and Tomlinson D. '93).

Estudios epidemiológicos sugieren que las anormalidades microvasculares juegan un papel en el desarrollo de la polineuropatía (Giannini C. y Dyck P. '95). Sin embargo, la causa última de la neuropatía diabética no está demostrada, aunque probablemente no se trate de un mecanismo único sino de la interacción entre mecanismos vasculares, metabólicos e inmunológicos.

COMPLICACIONES OCULARES

Se calcula que la tasa de ceguera entre los diabéticos es diez veces superior que entre los no diabéticos (Fernández Vigo J. '92).

Las manifestaciones de la Diabetes a nivel ocular son muy variadas y complejas y, aunque no lleguen a ser mortales, repercuten grandemente en la vida del diabético. Al mismo tiempo hay que considerar que algunas situaciones pueden empeorar los trastornos visuales. Entre ellos podemos citar la pubertad, el embarazo, la hipertensión arterial, etc..

De las manifestaciones de la Diabetes a nivel visual, las que pueden conducir a la ceguera son cuatro (Fernández Vigo J. '92): Retinopatía, Catarata, Glaucoma y Neuropatía.

1º.-Retinopatía:

Es la causa más frecuente de ceguera entre la población activa y puede ser debida a dos procesos:

- *Maculopatía diabética*: fundamentalmente el edema macular, caracterizado por acúmulo de exudación plasmática a nivel de la mácula y

que se manifiesta por engrosamiento de la retina y exudados lipídicos y proteicos, experimentando el paciente una gran pérdida de visión central.

- *Retinopatía diabética proliferante*, en la que predominan la hipoxia tisular y la neovascularización, perdiéndose la visión por hemorragias de vítreo o desprendimientos de retina traccionales.

La retinopatía diabética es una microangiopatía que afecta a las arteriolas precapilares, los capilares y las vénulas de la retina, presentando características de oclusión microvascular y hemorragias, aunque hay autores que encuentran indicios de que el daño precoz se produce sobre las células gliales o neuronales antes que el daño vascular (Frank R.N. '91).

Se considera que probablemente son las alteraciones bioquímicas la consecuencia directa y más importante de la hiperglucemia y la disfunción de la insulina y estas alteraciones darían lugar a medio y largo plazo a alteraciones estructurales que afectan a la pared vascular y a la sangre. Sobre esta base estructural se desencadenan las alteraciones hemorreológicas y circulatorias y a partir de ahí la retinopatía diabética (Fernández Vigo J. '92).

La frecuencia y gravedad de la retinopatía diabética aumentan con el tiempo de evolución de la enfermedad y con el mal control metabólico de la misma (Thomas P. and Tomlinson D. '93).

La retinopatía diabética se caracteriza histológicamente por presentar pérdida selectiva de pericitos intramurales de los capilares (Robinson W. '91, Mandario L. '92), a la que sigue un engrosamiento de la membrana basal, la proliferación de células endoteliales, dilatación capilar,

formaciones varicosas y el aumento de la permeabilidad (Danis R. and Yang Y. '93).

Básicamente la retinopatía diabética se divide en tres fases que se suceden en el tiempo:

1.- En una primera fase se produce daño en las estructuras vasculares de la retina y la patología se circunscribe a ellas. Es la microangiopatía diabética.

2.-En un estadio posterior se producen alteraciones en la retina propiamente dicha y se constituye la retinopatía diabética clínica.

3.-En una fase final la participación del vitreo configura un cuadro severo multiforme denominado vitreoretinopatía diabética.

Los fenómenos hemorrágicos parecen ser debidos a la reducción del número de pericitos en el paciente diabético. Como consecuencia de ello se produce una distensión de la pared capilar y la rotura de la barrera hematorretiniana. Tras una fase de incapacidad de los vasos para mantener la irrigación de la retina por el fenómeno oclusivo se sucede otra fase de reparación. Con ella se pretende mejorar la irrigación retiniana creando nuevos canales vasculares. Este proceso de neovascularización se inicia con una degradación de la matriz extracelular por acción de las proteasas, después se produce la extensión de los microvilli citoplásmicos de la matriz seguida de una migración de células endoteliales al extremo del capilar nuevo con formación activa de luz vascular, dividiéndose posteriormente las células más allá del extremo y elongando los neovasos (Williams J.M. et al'88).

2°.-Catarata: En general se acepta que la catarata aparece más frecuente y más tempranamente en los diabéticos que en los individuos no diabéticos, siendo la diferencia menor por encima de los 65 años (Fernández Vigo'92).

Las opacidades del cristalino no difieren de otras opacidades presentadas en la población general salvo en el caso de la catarata en copos de nieve que se define como típica de la diabetes y que, por otro lado, es bastante excepcional.

Son también frecuentes en el diabético los cambios refractivos debidos a pérdida del poder de acomodación del cristalino sin presencia de una catarata como tal.

La ceguera por catarata diabética es fácilmente reversible mediante cirugía con resultados bastante buenos.

Las alteraciones cristalinianas en la diabetes se han relacionado clásicamente con alteraciones en la vía de la aldosa reductasa (sorbitol) y con la glicosilación no enzimática de las proteínas. El cristalino es una estructura no insulino dependiente y la glucosa penetra en su interior y difunde libremente.

3°.-Glaucoma: Los aumentos agudos o crónicos de la presión intraocular pueden conducir a la ceguera por atrofia progresiva e irreversible de las fibras del nervio óptico.

En el paciente diabético podemos encontrar los glaucomas comunes, cuya prevalencia se discute si difiere de la población no diabética, y los

glaucomas típicos del diabético, como son el glaucoma neovascular y el glaucoma por células fantasmas. El glaucoma más típico y severo del diabético es el glaucoma neovascular, que se produce por crecimiento de un tejido fibrovascular a nivel del ángulo iridocorneal con la consiguiente falta de drenaje del humor acuoso y el aumento de la presión intraocular. Existe un estado previo en el que aparece neovascularización de iris sin aumento de la presión intraocular, aumento que es posible evitar con la prevención y el tratamiento adecuados.

4°.-Neuropatía diabética. Afectando tanto a los pares craneales III, IV y VI (oculomotores) como al NERVIO OPTICO, principal objeto del presente estudio.

La parálisis de los nervios oculomotores (III, IV y VI) son más frecuentes en los individuos diabéticos que en los sanos (Thomas P. y Tomlinson D. '93). Afecta fundamentalmente a pacientes con edades superiores a los 45-50 años, presentándose de forma aguda y sin otros signos de neuropatía anteriores. La más frecuente es la parálisis del tercer par. En ella es característico que se afecte la fracción motora del nervio, con la consiguiente parálisis de los músculos inervados por ella pero sin desaparición total de los reflejos pupilares.

Esto se ha tratado de explicar por la disposición de las fibras parasimpáticas pupilomotoras en la periferia del nervio, a salvo de las lesiones isquémicas fundamentalmente centrofasciculares.

Otra característica fundamental de la oftalmoplegia diabética es la tendencia a la recuperación espontánea, lo que ha hecho suponer que se

trata de procesos de desmielinización con mínima lesión axonal y que pueden ser rápidamente reparadas (Fernández Vigo J. '92)

Estas podrían ser las consideradas como manifestaciones típicas de la diabetes a nivel ocular. Aparte existen otras manifestaciones que, no siendo típicas, son más frecuentes en los diabéticos. Entre ellas están las alteraciones en la película lagrimal, blefaritis, queratitis punteada, hipoestesia corneal, hialitis asteroide, etc..

1.-3.-NERVIO OPTICO Y DIABETES.

Casi todas las alteraciones que puede sufrir el nervio óptico se han intentado relacionar, al menos por la frecuencia de aparición, con la diabetes. Sin embargo, la mayoría de los cuadros no se ha demostrado que se presenten en mayor proporción en los individuos diabéticos (Fernández Vigo '92).

Actualmente se aceptan tres formas clínicas de afectación del nervio óptico en el curso de una diabetes: La isquemia papilar aguda, la papilopatía diabética y el síndrome de Wolfram (patología hereditaria).

La **neuropatía optica isquémica anterior** es la causa más común de neuropatía óptica en la edad adulta (Hayesh S. et al. '94, Newman '96), presentándose como un cuadro agudo de pérdida de visión en pacientes de más de 50 años acompañado de dolor ocular y que puede agravarse en el curso de horas o días.

En el fondo de ojo se observa un edema de la papila óptica asociado a pequeñas hemorragias y exudados.

Se han intentado múltiples terapias, desde antiinflamatorios sistémicos hasta la descompresión quirúrgica del nervio, pero ninguna de ellas ha resultado realmente efectiva.

Suele evolucionar hacia la atrofia total o parcial del nervio óptico y puede ser bilateral en un gran porcentaje de casos.

Es un cuadro que se puede asociar a múltiples procesos locales o sistémicos pero que se relaciona con la diabetes en un elevado porcentaje de los pacientes (Hayresh et al. '94, Newman '96).

La mayoría de los mecanismos patofisiológicos propuestos implican a los pequeños vasos que proceden de la circulación coroidea y que suministran el aporte sanguíneo a la porción del nervio anterior a la lámina cribosa (Fernández Vigo '92).

Hay casos de neuritis óptica posterior en pacientes diabéticos que también sugieren un origen isquémico de los mismos (Bertram B. et al. '95)

La papilopatía diabética o edema papilar agudo del diabético es un cuadro poco frecuente pero muy característico del diabético juvenil. Suele ser bilateral y se presenta en la segunda o tercera década de la vida, afectando a ambos sexos por igual.

Clinicamente se presenta como un edema de la papila de intensidad variable con importante dilatación de los capilares radiales peripapilares.

Suele ser asintomática aunque puede presentarse con una moderada pérdida de agudeza visual y los reflejos pupilares suelen estar conservados.

La patogenia del cuadro es muy discutida. Para algunos autores (Lubow y Makley '71) se trata de una afectación de las vasos más superficiales de la papila y para otros (Brancato et al '86) se trata de

afectación de los vasos de la red capilar radial peripapilar. Como en el caso de la neuropatía óptica anterior aguda, la patogenia isquémica es la más aceptada por la mayoría de los autores.

Un cuadro muy raro descrito en la literatura es la **atrofia óptica hereditaria o síndrome de Wolfram** en el que se asocian diabetes mellitus, atrofia óptica, diabetes insípida y sordera neurosensorial. En la mayoría de los casos es de herencia autosómica recesiva, aunque se han descrito casos de presentación esporádica.

En las fases iniciales de la atrofia óptica se pueden presentar alteraciones en la visión de los colores o alteraciones campimétricas y luego alteraciones en la agudeza visual y ceguera. En este caso no se puede considerar a la atrofia del nervio óptico como consecuencia de la diabetes sino como un componente más del síndrome.

Estos son los cuadros con los que el clínico se suele encontrar en la práctica de la oftalmología, pero a nivel experimental se han realizado numerosos intentos para tratar de diagnosticar estados previos de afectación del nervio óptico en el curso de la diabetes antes de que se produzcan las manifestaciones clínicas.

En este sentido se ha demostrado un cierto retraso en la latencia del reflejo pupilar a la luz en los enfermos diabéticos con respecto a sujetos normales, lo que sugiere una afectación del sistema nervioso vegetativo. Hay autores que encuentran esta amplitud en la latencia en más del 50% de los sujetos diabéticos aparentemente asintomáticos (Pozzessere G. et al'91).

Otro parámetro en estudio es la amplitud de los Potenciales Evocados Visuales (PEV) que parece encontrarse también elevada en un gran

porcentaje de sujetos diabéticos sin signos clínicos de afectación del nervio óptico (Kamijo M. et al. '93, Lanting et al '91, Parisi V. et al. '94).

Lanting y colaboradores encuentran en sus series de estudio una alteración de los PEV no relacionada con las alteraciones en la conducción del reflejo pupilar y no relacionada con neuropatía cardiorrespiratoria. Para ellos existe una afectación en la vía aferente de conducción visual o del nervio óptico sin relación con otros parámetros de neuropatía diabética (Lanting et al '91).

Otros estudios demuestran una alteración en la conducción del nervio óptico, con potenciales visuales alterados, en pacientes diabéticos recientemente diagnosticados y sin signos de retinopatía diabética (Uccioli L. et al. '95).

2.-Objetivos

OBJETIVOS

Pretendemos estudiar las alteraciones que se producen en el nervio óptico de animales de experimentación al inducirles una diabetes mediante Estreptozotocina intraperitoneal, método ampliamente aceptado en la bibliografía.

Los estudios se realizarán tras seis y doce semanas de la inducción de la diabetes.

Los principales objetivos de este estudio son:

1.- Estudiar los aspectos macroscópicos del nervio óptico, como son el área de su sección transversal, el número de vasos sanguíneos en los animales sanos y en las ratas diabéticas y sus posibles modificaciones como consecuencia del estado diabético.

2.- Comparar las características morfológicas y morfométricas de las fibras nerviosas de los animales enfermos con respecto a los sanos según el tiempo de evolución de la enfermedad. En este aspecto se estudiarán en número de fibras por nervio, diámetro de sus axones y grosor de su cubierta miélica.

3.- Observar los distintos elementos constituyentes de la pared de los vasos sanguíneos, haciendo un estudio morfométrico y morfológico de los mismos. Se analizará el grosor de la pared capilar, el grosor de la célula endotelial y de la lámina basal, comparando los valores de los animales diabéticos con los de los sanos y los diabéticos entre sí, según el tiempo de evolución de la enfermedad.

Se analizará el grado de afectación de la luz vascular, valorando si se produce colapso de la misma como consecuencia del estado diabético.

4.- Estudiar las características morfológicas de las células gliales de los animales diabéticos y sus posibles alteraciones como consecuencia de la enfermedad.

Con todo ello se pretende hallar una relación entre la enfermedad diabética experimental y la afectación del nervio óptico, encontrar una relación entre el grado de afectación del mismo y el tiempo de evolución de la enfermedad e intentar relacionar la afectación de los distintos componentes estructurales del nervio entre sí, así como poder dar una explicación estructural a la clínica y las alteraciones de las pruebas complementarias que se producen en los enfermos diabéticos.

Estos datos podrían constituir el pilar sobre el que continuar experiencias sobre la posible secuencia de alteraciones que se producen a nivel nervioso en la diabetes y establecer posibles actitudes terapéuticas y/o preventivas de la misma.

3.-Material y método

3.-1.-ANIMALES DE EXPERIMENTACION.

Se utilizaron un total de 72 ratas de la cepa Sprague Dawley adultas de dos meses de edad, en igual proporción de sexos y pesos equivalentes (263,12±58,65 grs).

Se indujo diabetes en 40 de ellas mediante una única inyección intraperitoneal de Estreptozotocina a dosis de 65 mg./kg. de peso disuelta en tampón citrato Ph 4.5.

Se mantuvieron los animales en condiciones de luz/oscuridad (12h./12h.) con alimento y agua "ad libitum".

Semanalmente se controló el peso y las glucemias mediante analizador Glucocard® de Laboratorios MENARINI.

La mitad de los animales fueron sacrificados a las seis semanas y el resto lo fueron a las doce semanas. En ese momento se obtuvo el peso y la glucemia de cada animal.

Los animales fueron anestesiados con Equithesin (9,7 mgr. de Pentobarbital sódico, 76,0 mgr. de Etanol, 42,5 mgr. de Hidrato de cloral, 42,8 mgr. de Propilen glicol, 21,0 mgr. de Sulfato magnésico y completar hasta 11 con agua destilada con 0,1 ml. de atropina al 0,1% en solución salina) (Lumb'63), a dosis de 3.3 ml./kg. de peso via intraperitoneal respetando las normas del Real Decreto 223/1.988 del 14 de marzo, sobre la protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos (BOE 18 de marzo de 1.988).

3.-2.-OBTENCION DE MUESTRAS

Una vez anestesiados los animales, se canalizó el ventrículo izquierdo y mediante perfusión se lavó el árbol vascular con suero fisiológico y posteriormente fueron fijados con una solución de glutaraldehído al 2% en tampón fosfato 0.1 M a Ph 7.4 cuando eran destinados a estudios de microscopía electrónica o con formol tamponado al 10% cuando los estudios a realizar eran con microscopio óptico.

Fijados los animales se extrajeron ambos nervios ópticos, mediante craneotomía. Se cortaron en secciones de aproximadamente 1mm. y se dejaron en la misma solución empleada para la perfusión durante 4 horas.

Estas secciones se pasaron a tampón fosfato con sacarosa hasta el momento de su inclusión.

3.-3.-PROCESADO DE LAS MUESTRAS.

3.-3.-1.-ESTUDIOS DE MICROSCOPIA OPTICA

Se hicieron cortes transversales semifinos de aproximadamente 0.5 micras de grosor con microtomo tipo Heidelberg de la casa R. Jung® que se tiñieron con azul de Toluidina en bórax al 1%.

El resto de las muestras se procesaron siguiendo diversos protocolos.

Tinción de depósitos Schiff (PAS)-positivos.

Se tomaron cortes semifinos de los nervios ópticos de animales controles y diabéticos de diferentes tiempos de evolución.

Las secciones se trataron según el siguiente protocolo:

.-desparafinación.

.-hidratación.

.-ácido periódico al 0.5% en agua destilada durante 20 minutos.

.-deshidratación en concentraciones creciente de etanol.

.-incubación durante una hora con Dimedone al 5% en etanol de 100° a una temperatura de 60°C.

.-rehidratación en concentraciones decrecientes de etanol.

.-reactivo de Schiff durante 20 minutos a temperatura ambiente. El reactivo de Schiff se realizó con:

.-Fucsina básica.....1 gr.

.-Agua destilada.....200 cc.

.-Acido clorhídrico 1M.....1 cc.

.-Bisulfito sódico anhidro...1 gr.

.-Finalmente se lavaron con agua destilada durante 10 minutos y se montaron en medio acuoso.

Determinación de la Proteína Ácida Fibrilar Glial (PAFG).

La determinación de la misma se realizó según el siguiente protocolo:

- .-Tres lavados de un minuto con tampón fosfato.
- .-Alcohol de 70° durante una hora.
- .-Alcohol de 96° dos veces durante una hora cada una.
- .-Alcohol de 100° tres veces durante una hora cada una.
- .-Alcohol de 100° y Xilol (1/1) durante media hora.
- .-Xilol dos veces durante media hora cada una.
- .-Parafina 1 durante dos horas.
- .-Parafina 2 durante dos horas.
- .-Parafina 3 durante dos horas.
- .-Parafina limpia para hacer el bloque.

Se hicieron cortes de aproximadamente 5 micras con un microtomo tipo Heidelberg de la casa R. Jung® que se colocaron en portaobjetos tratados con poliglicina. Para desparafinarlos se siguió el siguiente protocolo:

- .-Se calentaron en estufa a 60°C durante media hora.
- .-Xilol dos veces durante 15 minutos cada una.
- .-Alcohol de 100° durante cinco minutos.
- .-Alcohol de 96° durante cinco minutos.
- .-Alcohol de 70° durante cinco minutos.

-PBS dos lavados seguidos.

Posteriormente se procedió a la determinación de la Proteína Ácida Fibrilar Glial mediante el Kit GFAC.Prot de la casa Sigma* según el siguiente protocolo:

-destrucción de los enlaces entre el formol y las proteínas del tejido con Proteasa al 0.1 % en PBS durante 10 minutos.

-tres lavados rápidos con PBS.

-inhibición de la peroxidasa endógena con una solución de peróxido de hidrógeno al 3% en agua desionizada durante 5 minutos.

-lavado con PBS.

-incubación con el agente bloqueante (suero normal de cabra) al 5 % en PBS durante 10 minutos.

-Se escurrió sin lavar y se añadió el anticuerpo primario (anticuerpo de conejo anti-proteína ácida fibrilar humana) en solución salina. A los cortes destinados a ser control negativo se les añadió IgG de conejo durante 60 minutos.

-lavado con PBS y se añadió el anticuerpo secundario (anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo) durante 20 minutos.

-lavado con PBS.

-complejo ExtraAvich-Peroxidasa conjugado con tampón salino durante 20 minutos.

-nuevo lavado y se incubó en el sustrato compuesto de agua desionizada, tampón acetato, 3-amino-9-etilcarbazole en N, N dimetilformamida y peróxido de hidrógeno al 3% durante 10 minutos.

.-lavado con agua desionizada y se tiñió con hematoxilina de Mayer durante 2 minutos. Se lavó con agua corriente y se montó en medio acuoso para su observación en microscopio óptico.

Determinación de la albúmina.

Para la determinación de la albúmina se tomaron secciones de los nervio ópticos de 10 micras de grosor, se desparafinaron y se rehidrataron en concentraciones decrecientes de alcohol y se siguió el siguiente protocolo:

.-Tripsina al 0,1% en TRIS (ph=7,8) durante dos horas a 37°C en cámara húmeda.

.-Lavado con agua destilada. Tres lavados de dos minutos cada uno.

.-Lavado con PBS. Dos lavados de dos minutos cada uno.

.-Lavado con TPBS al 0,1% (PBS y Tween 20 al 0,5%). Dos lavados de cinco minutos cada uno.

.-Incubado con suero normal de cabra al 10% durante 20 minutos a temperatura ambiente.

.-Drenado del duero.

.-Incubado a temperatura ambiente con el anticuerpo de conejo anti-albúmina humana 1:32 y con suero normal de conejo 1:32 los controles negativos.

.-Lavado con TPBS. Tres lavados de cinco minutos cada uno.

- .-Incubado con el segundo anticuerpo-FITC (1:100) durante 30 minutos a temperatura ambiente y en cámara húmeda.
- .-Lavado con TPBS tres veces.
- .-Montaje en PBS-glicerol.

3.-3.-2.- ESTUDIO ULTRAESTRUCTURAL

Para los estudios ultraestructurales las muestras se procesaron según el siguiente protocolo:

- .-Tetraóxido de osmio al 1% durante 2 horas.
- .-Lavado con agua. Tres lavados seguidos de 5 minutos cada uno.
- .-Uranilo al 2% en agua entre dos y cuatro horas.
- .-Alcohol de 40°. Tres veces de 5 minutos cada una.
- .-Alcohol de 60°. Tres veces de 5 minutos cada una.
- .-Alcohol de 70° con uranilo al 1%. 24 horas.
- .-Alcohol de 70°. Tres veces de 5 minutos cada una.
- .-Alcohol de 96°. Tres veces de 10 minutos cada una.
- .-Alcohol de 100°. Tres veces de 10 minutos cada una.
- .-Oxido de propileno. Tres veces de 10 minutos cada una.
- .-Oxido de propileno con EPON (resina Agar 100). De 12 a 24 horas.
- .-EPON en cámara de vacío. 24 horas.
- .- Se colocan en los moldes en estufa a 60°C durante 48 horas.

Se hicieron cortes transversales ultrafinos de entre 500 y 600 Å con ultramicrotomo modelo Ultracut S de la casa Reichert® y se contrastaron con uranilo y citrato de plomo con el método de Reynolds.

3.-4.-OBTENCION DE IMAGENES.

Las muestras de las tinciones de PAS y de PAFG, al igual que los cortes semifinos se observaron con microscopio óptico modelo ORTHOPLAN de la casa Leitz y se tomaron fotografías a diferentes aumentos según la zona a estudiar.

Las secciones ultrafinas se observaron con microscopio electrónico Phillips modelo 301 y se tomaron fotografías a 13.000 aumentos de los campos axonales, a diferentes aumentos para los vasos según el tamaño del mismo y a 36.000 aumentos para fotografiar la lámina basal de cada vaso.

De cada nervio se tomaron diez fotografías de campos axonales elegidos al azar que no contuvieran vasos ni elementos gliales, de cuatro vasos sanguíneos elegidos al azar de la zona periférica del nervio y de cuatro zonas de lámina basal de cada uno de los vasos elegidos.

Las células gliales se fotografiaron a diferentes aumentos según el tamaño de la misma y los detalles a destacar.

3.-5.-ESTUDIOS MORFOMETRICOS.

3.-5.-1.-CARACTERISTICAS GENERALES

Sobre las fotografías de cortes semifinos de cada nervio se midió el área transversal del mismo y su perímetro.

Para ello se utilizó el programa de tratamiento d imágenes IMAGEPRO (V: 1.6) de Media Cygernetics (®) de 1.986.

3.-5.-2.-ESTUDIO DE AXONES Y FIBRAS NERVIOSAS

Las fotografías de cortes ultrafinos se estudiaron mediante analizador de imágenes y el mismo programa IMAGEPRO (®).

En los diez campos seleccionados de cada nervio se contó el número de axones correspondientes a un área de $2,96.10^5 \text{ mm}^2$.

De cada axón se midió su área transversal, su perímetro y el grosor de su cubierta mielínica, si estaba mielinizado, para lo que se tomaron cuatro medidas de zonas de la misma elegidas al azar y se calculó su media.

3.-5.-3.- ESTUDIO DE LOS VASOS SANGUINEOS

En los cortes semifinos se contó el número total de vasos de cada nervio.

En los cortes ultrafinos de cada vaso se midió: 1.- el área y perímetro de la luz vascular, para lo cual se midió el contorno luminal de la célula endotelial, 2.- el área y el perímetro de la célula endotelial y 3.-el grosor de la lámina basal, la cual se calculó a partir de la media de cuatro medidas de diferentes zonas de la misma.

3.-6.-ESTUDIO ESTADISTICO

De todas las medidas obtenidas de cada estructura se calculó la media y la desviación estándar y se realizó estudio estadístico. En los casos en que se compararon dos muestras (diabéticos y control) se utilizó el test de Mann-Whitney y en los casos en que se compararon más de dos muestras (diabéticos y controles teniendo en cuenta el tiempo de evolución de la enfermedad) se utilizó el test no paramétrico de Kruskal-Wallis. Se tomó como nivel de significancia $P=0,05$.

4.-Resultados

4.-1.-CARACTERISTICAS GENERALES

Al inicio del estudio todos los animales eran sanos y de pesos equivalentes y se distribuyeron en cuatro grupos: a dos de los grupos se les inyectó estreptozotocina a dosis de 65 mgr/ Kg de peso por vía intraperitoneal y los otros dos grupos se inyectaron sólo el tampón para control.

De los animales inyectados uno no presentó niveles elevados de glucemia por los que se desechó para el estudio. El resto presentó glucemias elevadas durante todo el tiempo de evolución (6 ó 12 semanas) siendo la media de 312 mgr/100ml para el 30% de ellos y de más de 500 mg/100 ml para el resto. De ellos 16 murieron antes de cumplirse el tiempo estipulado para su sacrificio y el resto presentó un deterioro de su estado general manifestado principalmente por una disminución importante de peso y manifestaciones de ceguera, como son una leucocoria franca, dificultad para moverse si se cambiaban de ambiente y falta de la higiene tan característica de estos animales.

En la tabla 1 se pueden observar los pesos al inicio del estudio, los pesos finales una vez transcurridas las 6 o las 12 semanas y el porcentaje de variación de los mismos (aumento de peso en los animales sanos y disminución del mismo en los diabéticos). Se presenta la media de cada grupo y su desviación estandar.

Tabla 1. Variaciones en el peso de los animales.

	C6(n=6)	D6(n=6)	C12(n=6)	D12(n=6)
Peso inicial (gr.)	263.33±66.15	263.33±64.08	271.66±64.70	254.16±39.67
Peso final (gr.)	363.66±91.20	233.33±88.75	377.16±99.27	199.16±56.07
Variación (%)	+38.1%	-11.39%(*)	+38.8%	-24.26%(*)

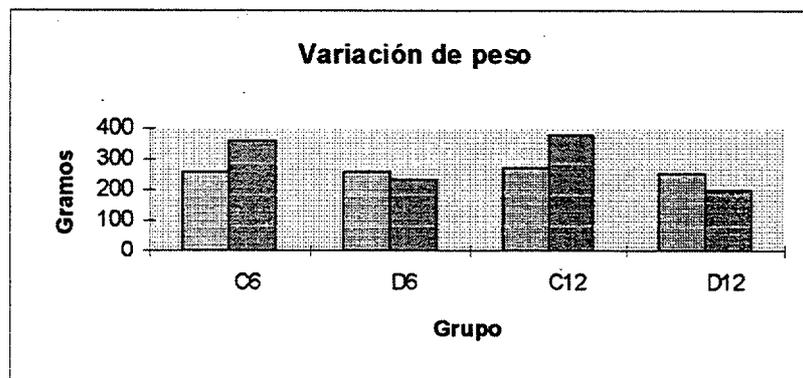
Test de Mann-Whitney. (*)Diferencia estadísticamente significativa respecto al grupo control (P<0.05).

C6 Grupo control de seis semanas

D6 Grupo de diabéticos de seis semanas de evolución

C12 Grupo control de doce semanas

D12 Grupo de diabéticos de doce semanas de evolución.



En ella se aprecia una pérdida de peso significativa de los animales diabéticos con respecto al grupo control, siendo esta pérdida mayor en los animales con diabetes de más tiempo de evolución, un 24,26% a las doce semanas frente a un 11,39% a las seis semanas.

Los animales a los que se les inyectó sólo tampón continuaron ganando peso según avanzaba el tiempo y no presentaron ningún signo de enfermedad.

En los cortes semifinos se tomó medida del área total de cada nervio. El número total de fibras de cada nervio se calculó a partir de número de fibras de los campos axonales que se seleccionaron de cada uno y haciendo el cálculo para el área total del nervio. Ambos datos quedan reflejados en la tabla 2.

Tabla 2. Area total del nervio y número de fibras por nervio.

	C6(n=6)	D6(n=6)	C12(n=6)	D12(n=6)
AREA mm ²	0.27±0.038	0.25±0.066	0.30±0.036	0.26±0.050
Nº de fibras	122.320 ±18.609	126.939 ±44.956	93.437 ±14.655	123.982 ±30.126

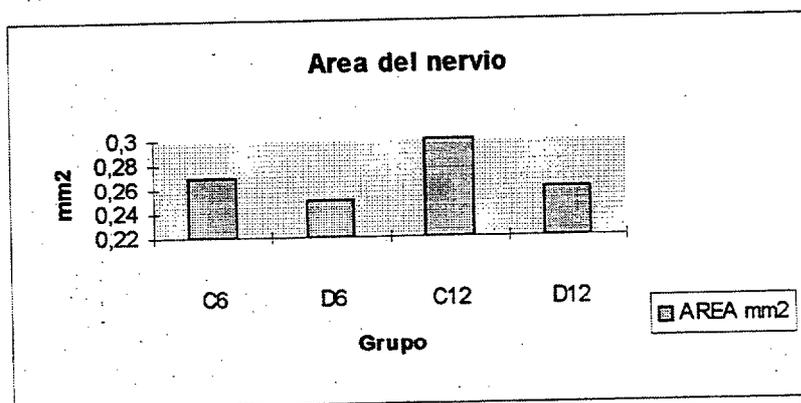
Test de Mann-Whitney. Diferencia no estadísticamente significativa.

C6 Grupo control de seis semanas

D6 Grupo de diabéticos de seis semanas de evolución

C12 Grupo control de doce semanas

D12 Grupo de diabéticos de doce semanas de evolución.



Se observa una disminución del 8.9% del área en los nervios de los animales diabéticos con respecto a los grupos control pero esta diferencia no es estadísticamente significativa. Con respecto al número de fibras por nervio se observa una disminución del 25 % de las mismas en los animales

del grupo control de 12 semanas de evolución con respecto a los otros tres grupos, en los que se mantiene un número similar de fibras.

4.-2.-FIBRAS NERVIOSAS.

4.-2.-1.- ESTUDIO MORFOMETRICO.

AXONES.

A partir del perímetro de cada axón se calculó su diámetro y se obtuvo el diámetro medio de los axones de cada nervio. Los resultados quedan reflejados en la tabla 3.

Tabla 3. Diámetro medio de los axones.

	C6(n=6)	D6(n=6)	C12(n=6)	D12(n=6)
Diámetro (micras)	1.28±0.39	1.14±0.28	1.38±0.33	1.30±0.28

Test de Mann-Whitney. Diferencia no estadísticamente significativa.

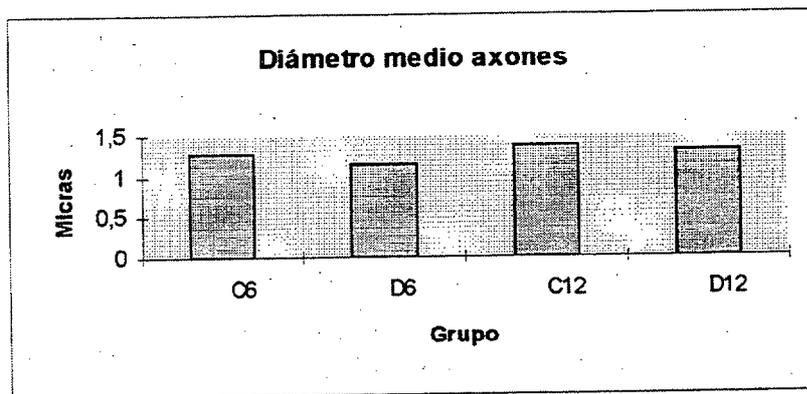
C6 Grupo control de seis semanas

D6 Grupo de diabéticos de seis semanas de evolución

C12 Grupo control de doce semanas

D12 Grupo de diabéticos de doce semanas de evolución.

En ella se observa una disminución del 8.3% en los diámetros medio de los axones de los nervios de los animales diabéticos con respecto a los grupos control pero esa diferencia, al igual que con el área total del nervio, no es estadísticamente significativa.



Si distribuimos esos axones en tres grupos según su diámetro y siguiendo los estudios de De Juan (1.978) vemos que las proporciones de los mismos difieren de unos grupos a otros. Esta distribución de axones según su diámetro queda reflejado en la tabla 4

Tabla 4. Proporción de axones según su diámetro.

Diámetro	C6(n=6)	D6(n=6)	C12(n=6)	D12(n=6)
< 2 micras	93.9%	94.9%	89.6%	89.3%
2-3.5 micras	5.5%	4.8%	7.7%	10.0%
> 3.5 micras	0.6%	0.2% (*)	2.6%	0.8% (*)

Test no paramétrico de Kruskal-Wallis. (*)Diferencia estadísticamente significativa. (P<0.05)

C6 Grupo control de seis semanas

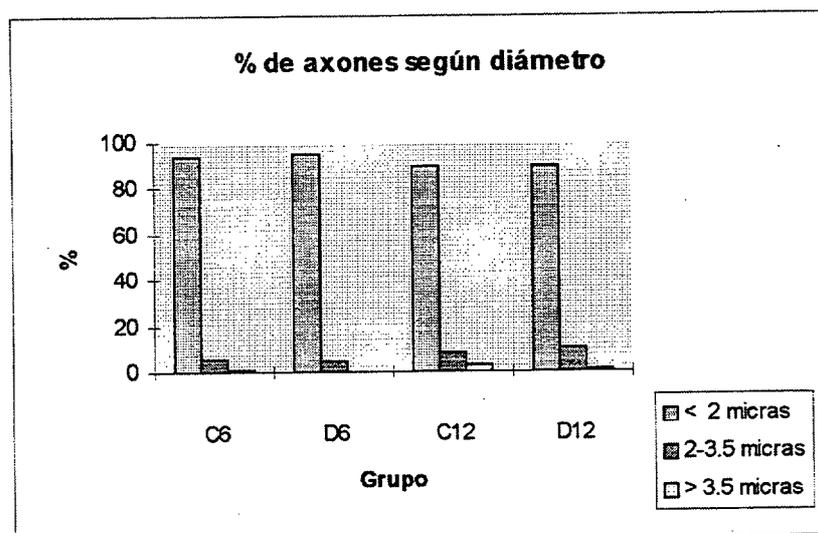
D6 Grupo de diabéticos de seis semanas de evolución

C12 Grupo control de doce semanas

D12 Grupo de diabéticos de doce semanas de evolución.

Si comparamos los grupos control vemos que se produce un crecimiento de las fibras, aumentando cuatro veces la proporción de fibras gruesas en los animales de más edad y disminuyendo proporcionalmente las

fibras de mediano y menor calibre. En los animales diabéticos se observa una disminución en igual proporción que en los animales no diabéticos de las fibras de menor tamaño con aumento de las fibras del grupo intermedio pero sin aumentar la proporción de fibras gruesas.



FIBRAS.

Encontramos un promedio de 2.132 axones por nervio que han permanecido sin mielinizar en los animales sanos, lo que supone un 1.97 % del total. En los animales diabéticos el promedio es de 1.739 axones sin mielinizar por nervio, lo que supone un 1.38 %.

En este caso la diferencia no es estadísticamente significativa y los axones sin mielinizar pertenecen al grupo de axones de menos de 2 micras de diámetro.

Se hizo un estudio de la Razón G (G-ratio) de cada axón (relación entre el diámetro axonal y el diámetro de la fibra completa). Los resultados para cada grupo quedan reflejados en la tabla 5.

Tabla 5. Razón G de las fibras

	C6(n=6)	D6(n=6)	C12(n=6)	D12(n=6)
G-Ratio	0.76±0.06	0.76±0.09	0.72±0.07	0.73±0.06

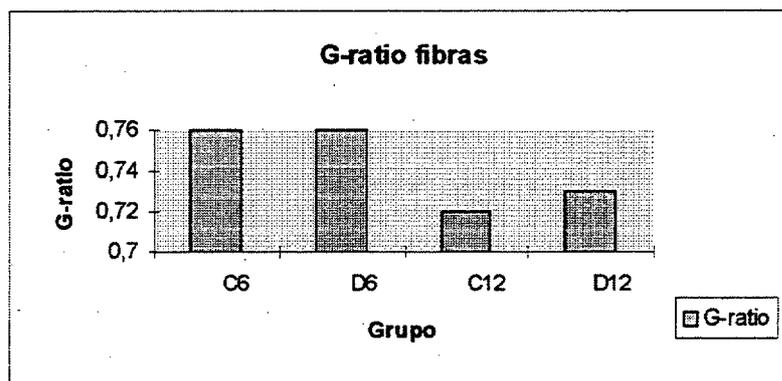
Test de Kruskal-Wallis. Diferencia no estadísticamente significativa.

C6 Grupo control de seis semanas

D6 Grupo de diabéticos de seis semanas de evolución

C12 Grupo control de doce semanas

D12 Grupo de diabéticos de doce semanas de evolución



No se observa una diferencia estadísticamente significativa entre los diferentes grupos.

Se hizo el mismo cálculo pero dividiendo el total de axones por tamaños (según su diámetro) en los tres grupos descritos por De Juan en 1.978 y tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas. Los valores de G-Ratio por grupos quedan reflejados en la tabla 6, donde P son los axones pequeños (menos de 2 micras), M son los medianos (entre 2 y 3.5 micras) y G los grandes (mayores de 3.5 micras).

Tabla 6. Relación G por tamaño de axón.

	C6 n=6			D6 n=6			C12 n=6			D12 n=6		
	P	M	G	P	M	G	P	M	G	P	M	G
G-ratio	0.69	0.78	0.75	0.70	0.74	0.75	0.74	0.76	0.76	0.72	0.74	0.72

Test de Kruskal-Wallis. Diferencia no estadísticamente significativa.

C6 Grupo control de seis semanas

D12 Grupo de diabéticos de doce semanas de evolución.

D6 Grupo de diabéticos de seis semanas de evolución

C12 Grupo control de doce semanas

4.-2.-2.-ESTUDIO MORFOLOGICO DE LAS FIBRAS NERVIOSAS.

GRUPO CONTROL.

Los nervio ópticos se hallan constituídos por numerosas fibras nerviosas de diferentes tamaños dispuestas en fascículos separados por prolongaciones de células gliales, colágeno y vasos sanguíneos. Son lisas y están limitadas por membrana celular o AXOLEMA que rodea al axon o AXOPLASMA. Este axoplasma presenta escasa densidad electrónica y en él se observan organelas citoplásmicas siendo abundantes las mitocondrias, estructuras membranosas, microtúbulos y neurofilamentos, en su mayoría orientados longitudinalmente (Fig. 1).

Aproximadamente el 98% de ellas están mielinizadas, perteneciendo el escaso número de las no mielinizadas al grupo de axones más pequeños (Fig. 2). Diferenciamos estas fibras no mielinizadas de aquellas mielinizadas pero que han sido cortadas a nivel de un nódulo de Ranvier por la presencia

en estas últimas de condensación citoplasmática justo debajo de la membrana celular.

La mielina que rodea a los axones mielinizados aparece como un anillo denso, más o menos compacto, que rodea al axón formando una estructura laminar con bandas claras y oscuras y con un grosor más o menos constante en un mismo axón (Fig. 3).

Algunas fibras presentan restos del citoplasma del oligodendrocito entre el axón y la cubierta mielínica (Fig. 4).

GRUPO DIABETICO.

La mayoría de las fibras nerviosas en los animales diabéticos no presentan diferencias estructurales importantes con respecto a la del grupo control. No cambia la densidad electrónica del citoplasma y presentan aparentemente la misma distribución de neurotúbulos, neurofilamentos y mitocondrias (Fig. 5)

El número de axones no mielinizados es similar al de los grupos control, un 1.38%, y éstos siguen perteneciendo al grupo de axones de menor tamaño (Fig. 6).

Sin embargo existen fibras en las que se observan diferencias estructurales con respecto a las fibras de los animales del grupo control. Así hemos podido observar:

- 1.-Algunos axones presentan acumulación de vacuolas y estructuras membranosas en el citoplasma y éste aparece densamente ocupado por

múltiples cuerpos vesiculares que no aparecen en los animales no diabéticos (Fig.7).

2.-Asimismo se observa algún resto de mielina sin la presencia de axón en su interior (Fig. 8).

También aparece algún caso que presenta axones con una cubierta mielínica más fina de la que presentan el resto de los axones y en varios axones se observó cierta separación entre el axoplasma y la cubierta mielínica (Fig. 9).

En ocasiones aparecen axones con su cubierta mielínica parcialmente destruída y rodeada por elementos pertenecientes al citoplasma de una célula glial, lo que podrían ser acúmulos de mielina aparentemente englobada por el citoplasma de una célula glial (Fig. 10).

Figuras 1 y 2: Cortes transversales de fibras del nervio óptico de animales del grupo control de seis semanas. Se observan axones de diferentes diámetros, la mayoría de ellos con su cubierta mielínica rodeándolo totalmente. a=axón, m=mielina, ►=neurofilamento, —►=microtúbulo, ◄=axón sin mielinizar, As=prolongaciones astrocíticas. La barra equivale a 0,55 micras.

Figura 3: Campo axonal de animal del grupo control de seis semanas. Se aprecia la estructura laminar de la mielina (—►) rodeando los axones (a) del nervio. El grosor de la cubierta mielínica varía según el diámetro del axón al que envuelve. La barra equivale a 0,52 micras.

Figura 4: Grupo de axones de animal control de seis semanas de evolución. Destaca la presencia de un mesoaxón (—►) en el que se aprecia el citoplasma de la célula glial rodeando al axón (a). La barra equivale a 0,53 micras.

Figura 1

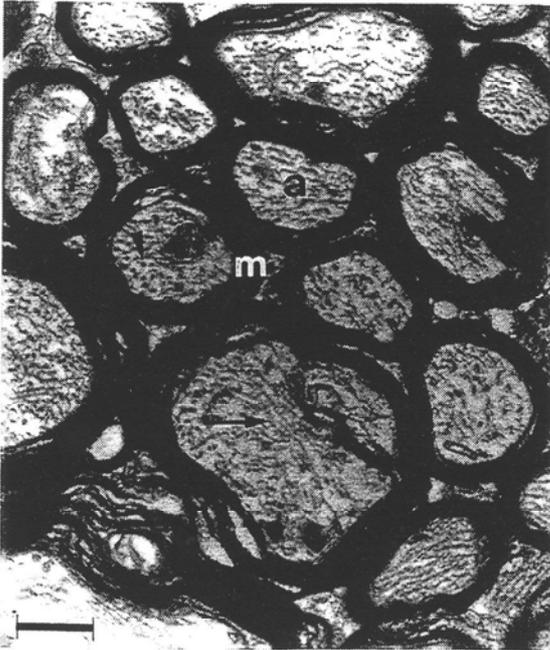


Figura 2

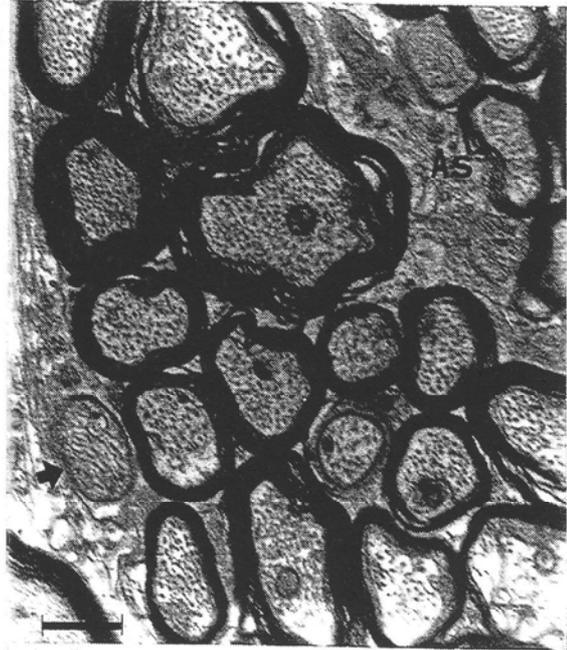


Figura 3

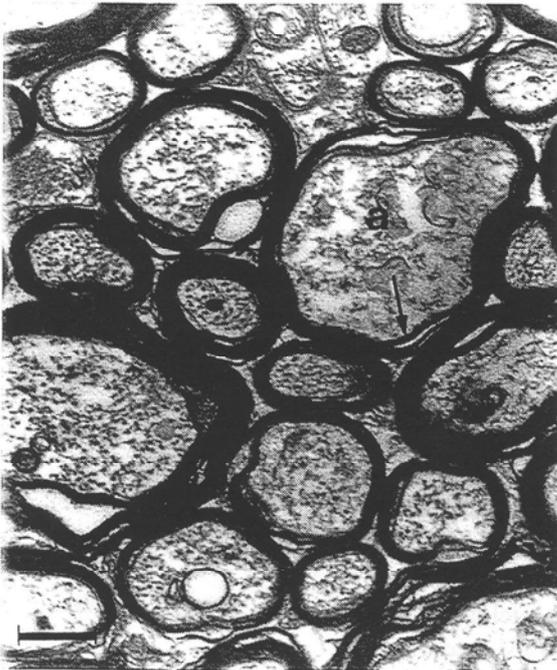


Figura 4

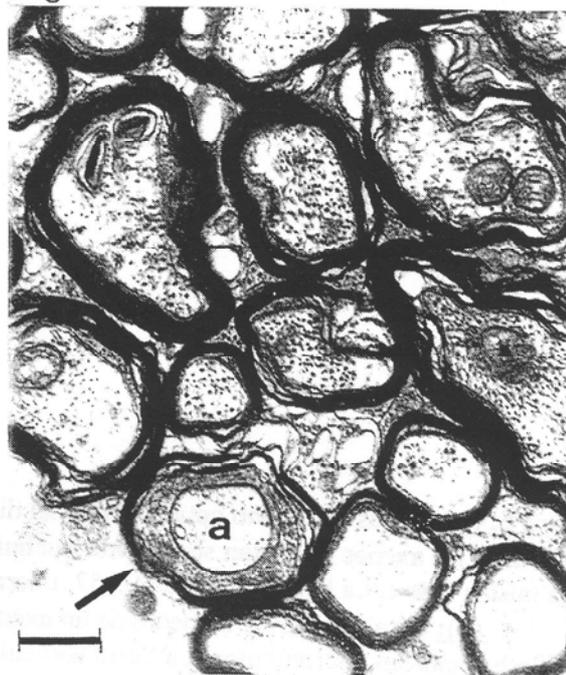


Figura 5: (a): Fibras del nervio óptico de animal diabético de doce semanas de evolución. La mayoría de los axones presentan su cubierta mielínica compacta, aunque algunos de ellos carecen de la misma (↔). La barra equivale a 0,52 micras.

(b): Detalle a mayor aumento de un axón sin mielinizar (a) junto a un mesoaxón (ma). Las flechas indican microtúbulos. La barra equivale a 0,09 micras.

Figura 6 : Campo de fibras de animal diabético de doce semanas de evolución. Los axones sin mielinizar (flechas) pertenecen al grupo de axones de menor tamaño. En este caso se encuentran agrupados y rodeados por axones mayores mielinizados. La barra equivale a 0,30 micras.

Figura 5a

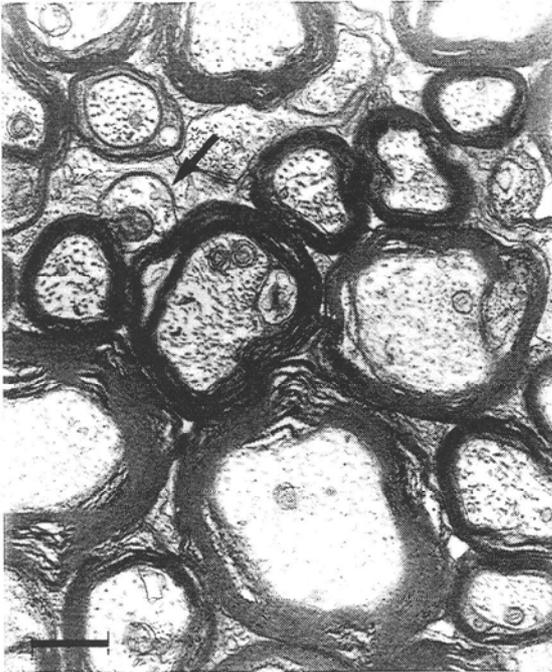


Figura 5b



Figura 6

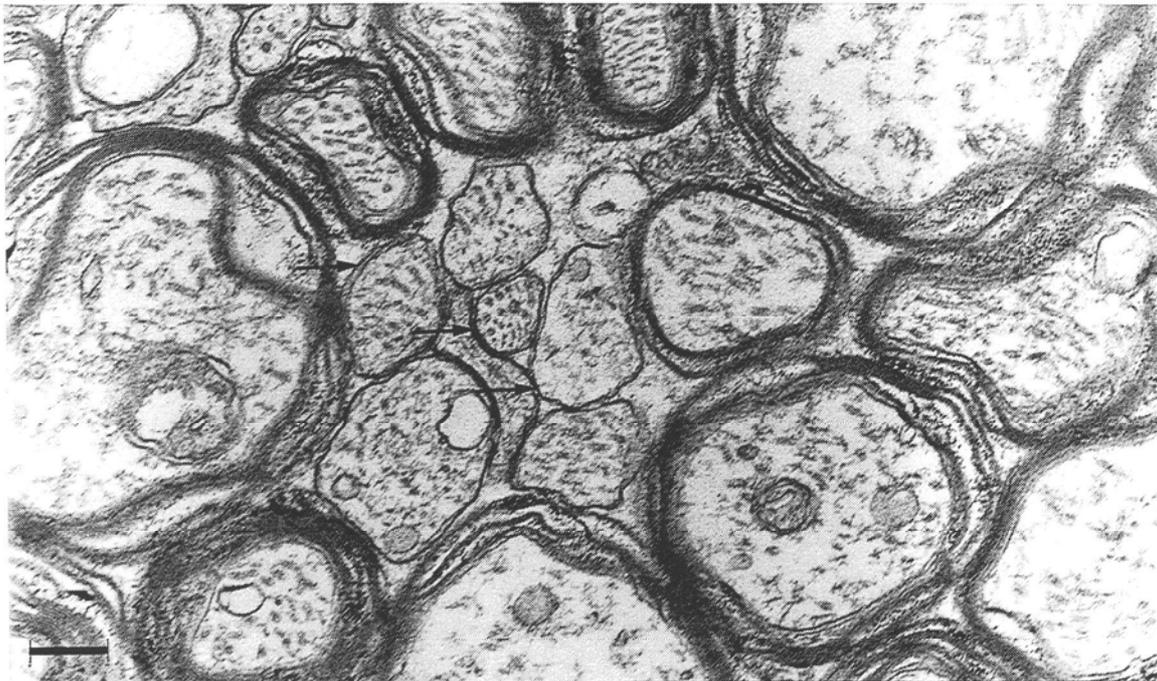


Figura 7 a y b: Fibras desestructuradas pertenecientes a animales diabéticos de seis semanas de evolución. Se observa gran proporción de estructuras membranosas y múltiples cuerpos vesiculares. ►=vesículas, —▶=vacuolas.
En la figura a se observan, junto a una fibra desestructurada, restos citoplásmicos (▲) y de cubierta mielínica (m).
La barra equivale a 0,28 micras.

Figura 7a

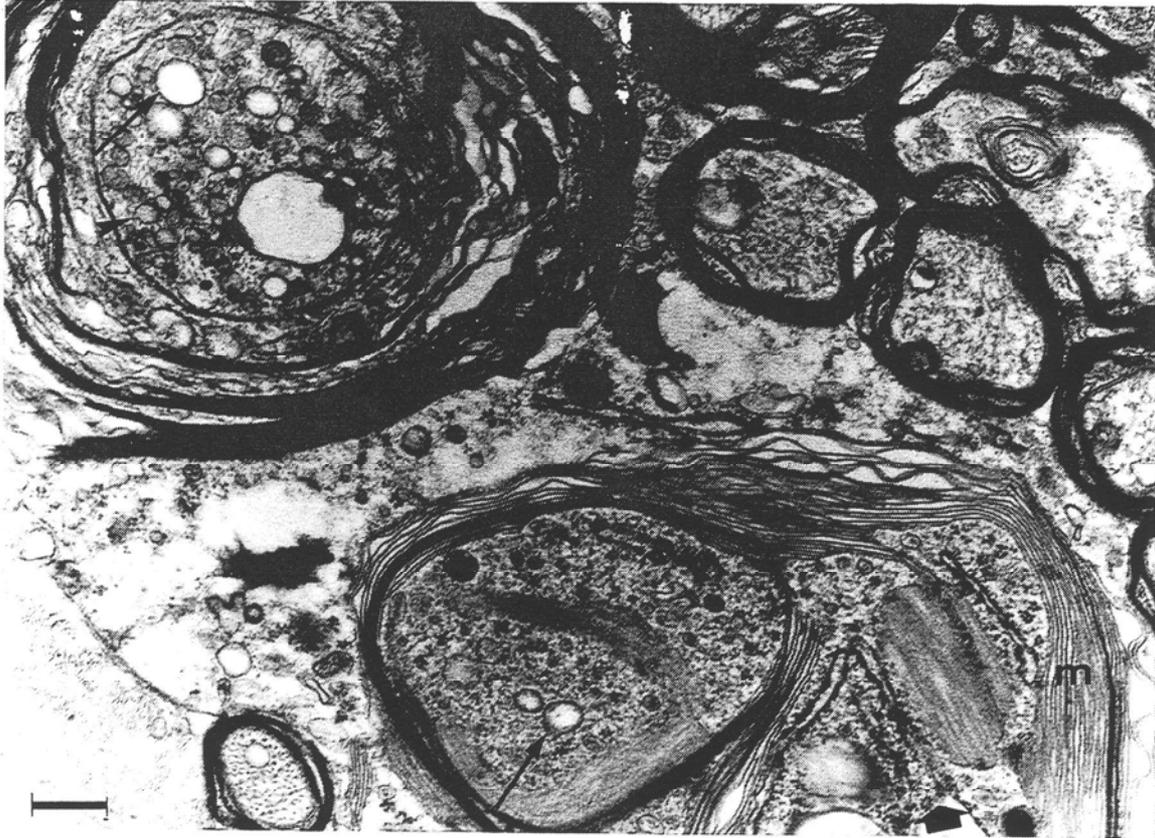


Figura 7b



Figura 8: Microfotografías de animales diabéticos en las que se aprecian restos mielínicos en los que parece haber desaparecido el axón de su interior. X=ausencia de axón, m=mielina, N=núcleo de célula glial, C=citoplasma de célula glial.

Obsérvese en la figura c la gran condensación de túbulos que presentan algunos axones (flechas).

La barra equivale a : figura a= 0,68 micras

figura b= 0,18 micras

figura c= 0,90 micras.

Figura 8a



Figura 8b

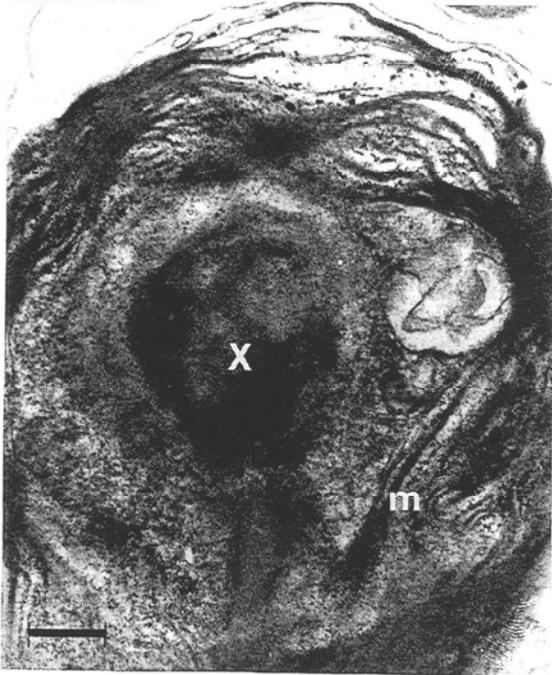


Figura 8c

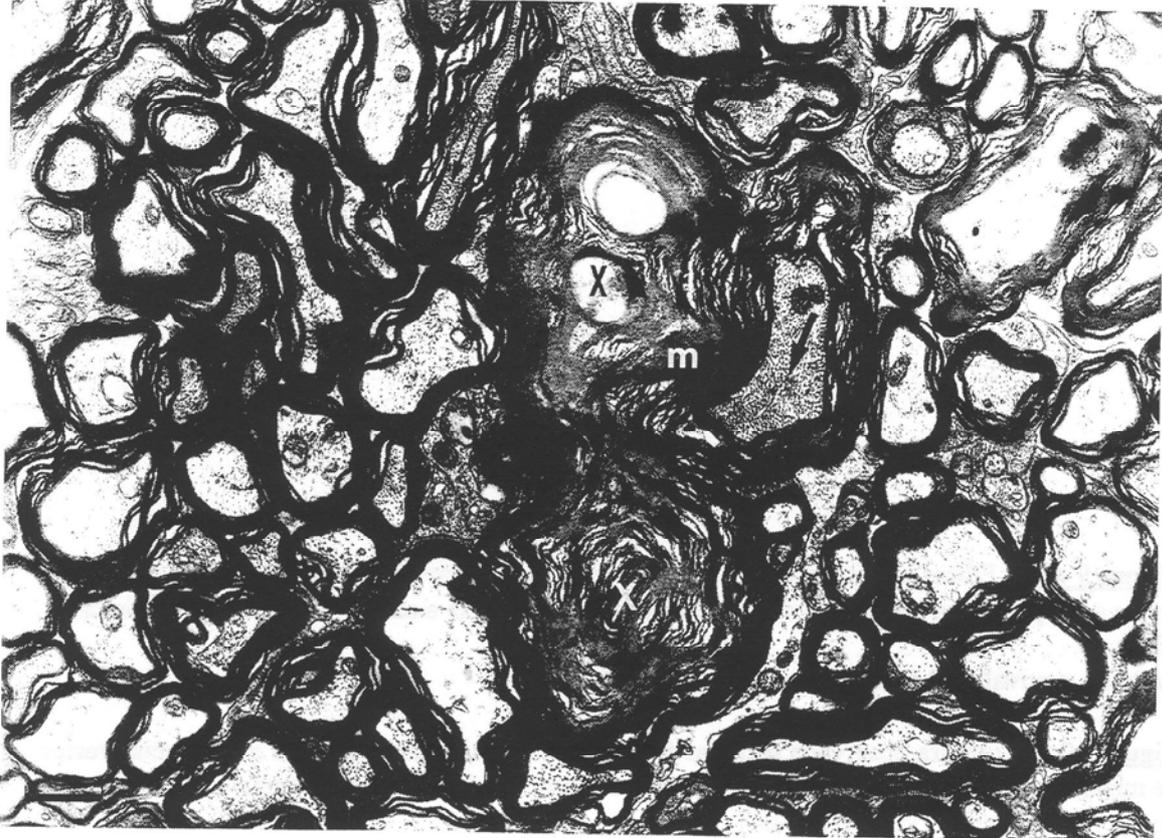


Figura 9 a y b: Fibras nerviosas cortadas transversalmente de animal diabético de seis semanas en las que aprecia un espacio de separación entre la membrana axónica y la cubierta mielínica (flechas).

La barra equivale a 0,50 micras.

Figura 10: Estructura observada entre las fibras de un animal diabético en la que se aprecian restos de mielina rodeados por elementos citoplásmicos de una célula glial, con formación de numerosos cuerpos de estructura lamelar (→).

La barra equivale a 0,53 micras

Figura 9a

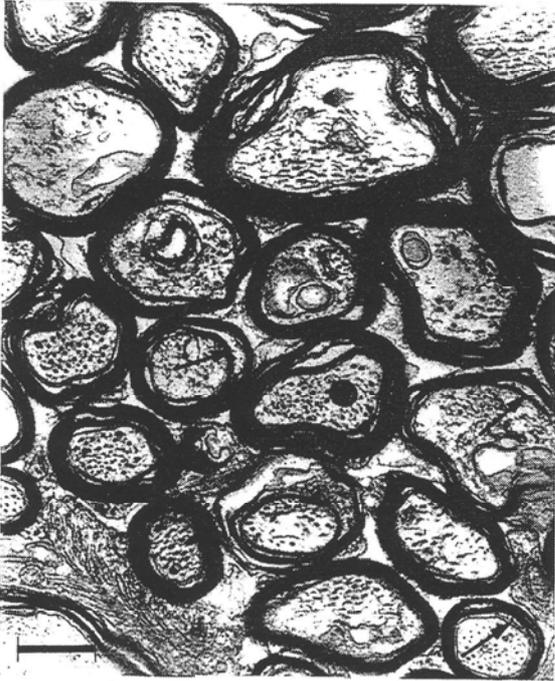


Figura 9b

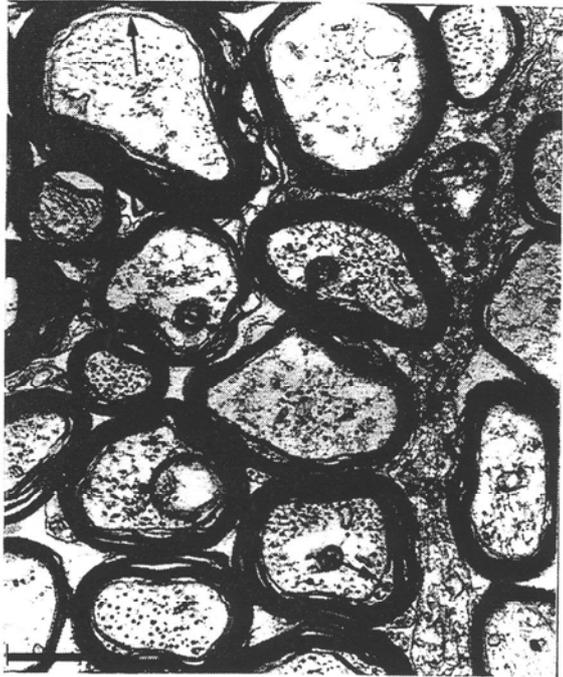
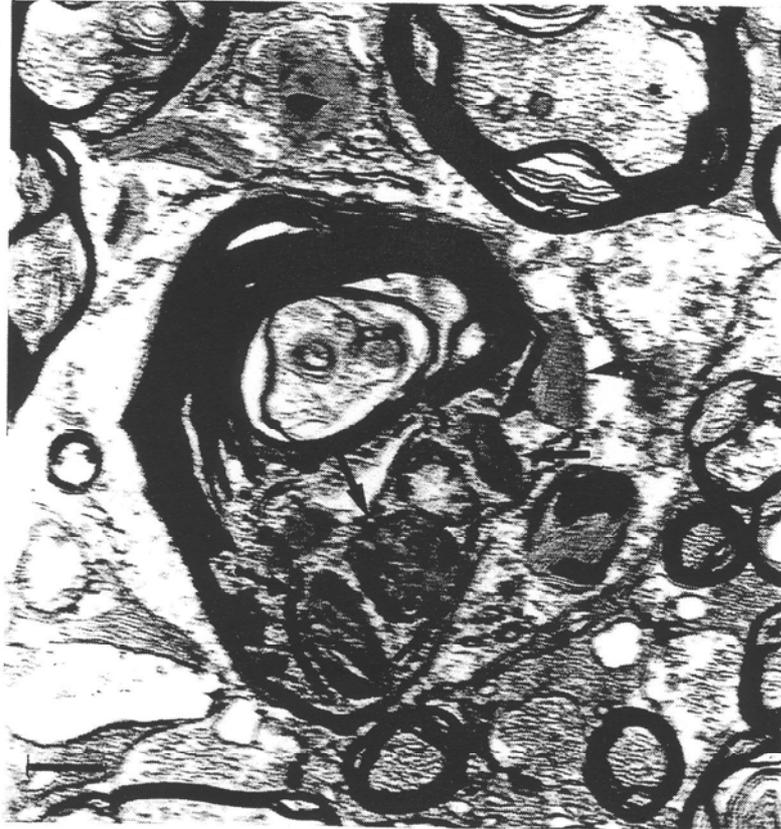


Figura 10



4.-3.-VASOS SANGUINEOS.

4.-3.-1.-ESTUDIO MORFOMETRICO.

Número de vasos.

Se ha observado una disminución no estadísticamente significativa en el número total de vasos de los nervios de los animales diabéticos con respecto a los grupos control. A las seis semanas de evolución de la diabetes el número total de vasos del nervio es del 95% de los que presentan los nervios de los grupos control y a las doce semanas de evolución es del 90.5%.

Esta disminución en el número de vasos queda reflejada en la tabla 7.

Tabla 7. Número de vasos sanguíneos por nervio.

	C6(n=6)	D6(n=6)	C12(n=6)	D12(n=6)
Nº de vasos	42.66 ±5.46	40.00 ±6.69	42.00 ±8.29	38.66 ±8.64
% del grupo control		95%		90.5%

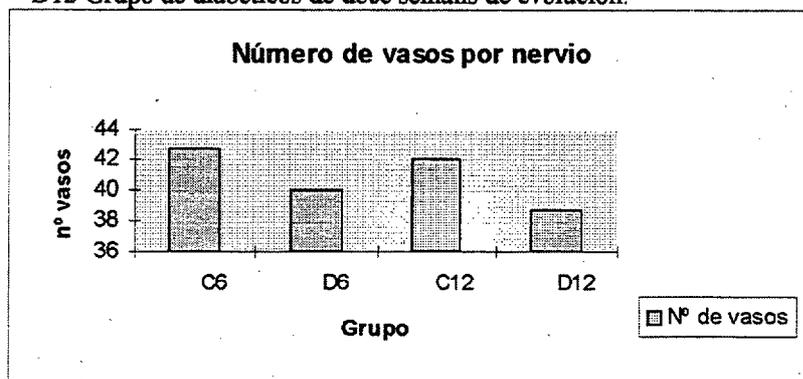
Test de Mann-Whitney. Diferencia no estadísticamente significativa.

C6 Grupo control de seis semanas

D6 Grupo de diabéticos de seis semanas de evolución

C12 Grupo control de doce semanas

D12 Grupo de diabéticos de doce semanas de evolución.



Colapso vascular.

Como índice del posible colapso vascular se tomó la diferencia en porcentaje entre el área teórica que tendrían los vasos no colapsados, calculado a partir del perímetro de su luz vascular, y el área real de la misma.

Estos resultados quedan reflejados en la tabla 8.

Tabla 8. Colapso vascular.

	C6(n=6)	D6(n=6)	C12(n=6)	D12(n=6)
Area teórica (micras ²)	28.53 ±20.32	25.03 ±25.51	20.66 ±8.83	45.90 ±85.83
Area real (micras ²)	19.72 ±15.21	17.42 ±16.32	16.86 ±7.89	15.65 ±11.87
Colapso	30,88%	29,17%	19,59%	65,91% (*)

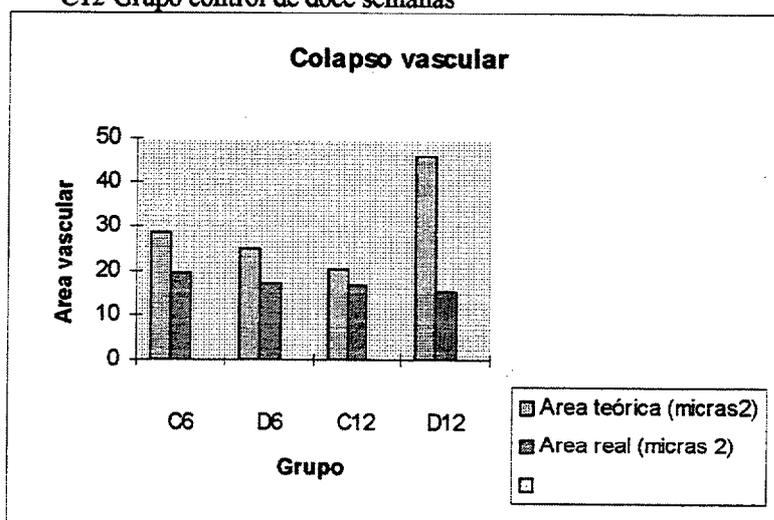
Test de Mann-Whitney. (*)Diferencia estadísticamente significativa. (P<0.005).

C6 Grupo control de seis semanas

D12 Grupo de diabéticos de doce semanas de evolución.

D6 Grupo de diabéticos de seis semanas de evolución

C12 Grupo control de doce semanas



Se observan unos valores similares entre los animales de los grupos controles y los diabéticos de seis semanas de evolución, donde no se

observa colapso vascular significativo. En cambio el colapso vascular es significativo en los animales diabéticos de doce semanas de evolución, donde llega a ser de casi el 50% de la luz vascular.

Grosor endotelial.

Se calculó el grosor endotelial como área de endotelio por unidad de perímetro de luz vascular. Para ello se dividió el área total del endotelio entre el perímetro de la luz vascular. Los resultados demuestran un engrosamiento endotelial significativo en los animales diabéticos con respecto a los grupos control, y que este engrosamiento aumenta a medida que aumenta el tiempo de evolución de la enfermedad. Los datos quedan reflejados en la tabla 9.

Tabla 9. Grosor del endotelio. (micras²/micras)

	C6(n=6)	D6(n=6)	C12(n=6)	D12(n=6)
Grosor	0.27	0.35(*)	0.29	0.51(*)(**)

Test deMann-Whitney.(*) Diferencia estadísticamente significativa co respecto al grupo control. (P<0.05).(**) Diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo de diabéticos de seis semanas de evolución.(P<0.05).

C6 Grupo control de seis semanas

D6 Grupo de diabéticos de seis semans de evolución

C12 Grupo control de doce semanas

D12 Grupo de diabéticos de doce semans de evolución.

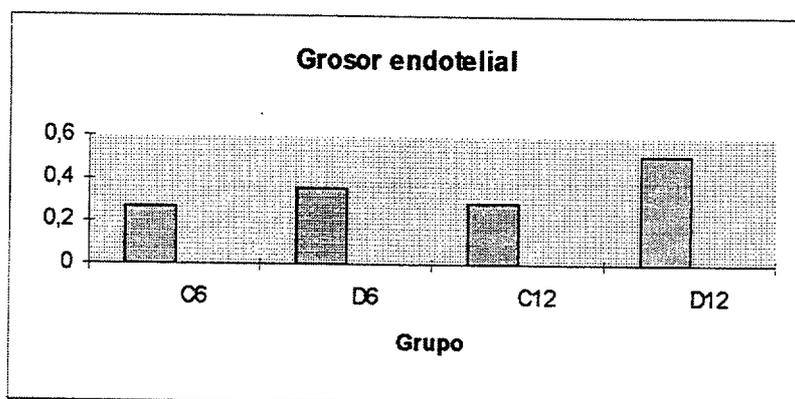


Lámina basal.

En la lámina basal se midió solamente la lámina densa por considerarlo la medida más fiable. Se observó un engrosamiento significativo de la misma en los vasos de los animales diabéticos con respecto a los grupos control, no encontrando diferencia entre los vasos de los animales diabéticos de seis semanas y los de doce semanas de evolución. Los datos quedan reflejados en la tabla 10.

En los animales del grupo control de doce semanas se observó un engrosamiento de la lámina basal con respecto al grupo control de seis semanas, pero esa diferencia no es estadísticamente significativa.

Tabla 10. Lámina basal.

	C6(n=6)	D6(n=6)	C12(n=6)	D12(n=6)
Lámina basal (micras)	0.056 ±0.01	0.094 ±0.01 (*)	0.076 ±0.01	0.102 ±0.01 (*)

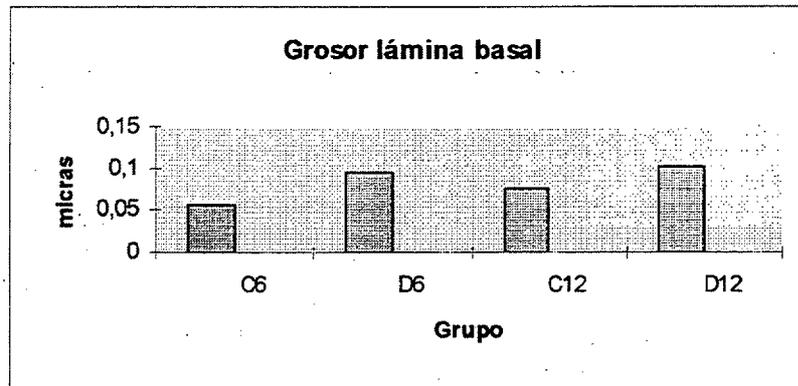
Test de comparaciones múltiples de Scheffé. (*) Diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo control. (P<0.05).

C6 Grupo control de seis semanas

D6 Grupo de diabéticos de seis semanas de evolución

C12 Grupo control de doce semanas

D12 Grupo de diabéticos de doce semanas de evolución.



4.-3.-2.-ESTUDIO MORFOLOGICO

Grupo control

Los microvasos que pudimos observar en el interior del nervio óptico fueron fundamentalmente capilares y vénulas.

En los cortes transversales los capilares están constituidos por células endoteliales unidas entre sí formando un endotelio continuo. Estas células endoteliales presentan un núcleo voluminoso y en su citoplasma se observan mitocondrias, ribosomas, retículo endoplásmico rugoso escaso, aparato de Golgi y filamentos (Fig. 11). En algunas de ellas se observa una marcada actividad micropinocítica.

Rodeando a estas células endoteliales observamos una lámina basal fina y continua sobre la que terminan numerosas prolongaciones o pies vasculares de los astrocitos (Fig. 12). A su vez la lámina basal tiende a emitir proyecciones entre las prolongaciones de los astrocitos.

Rodeando algunas zonas de los capilares aparecen pericitos caracterizados por presentar un núcleo prominente y un citoplasma escaso con algunos orgánulos (Fig. 13).

Las vénulas están constituidas por células endoteliales sobre una lámina basal continua y rodeadas por un espacio perivascular más ancho que en los capilares y en el que abundan las fibras de colágeno (Fig. 14).

En los vasos estudiados no se han observado células musculares que los rodeen.

Al realizar el marcaje de material PAS-D positivo con el reactivo de Schiff nos encontramos con que se ha depositado una pequeña cantidad de esta sustancia en las células endoteliales de los vasos sanguíneos de los animales de los grupos control, pero este depósito de material no se observa en los alrededores de los mismos (Fig 15)..

Mediante la determinación inmunohistoquímica no pudimos detectar la presencia de albúmina en el espacio perivascular de los animales sanos (Fig. 16).

Grupo diabético.

En el estudio morfológico de los vasos de los animales diabéticos de seis semanas de evolución la mayoría de los capilares presentan una luz vascular normal y mantienen los elementos celulares aparentemente intactos (Fig 17). Sin embargo también se observaron algunos capilares con cierta tendencia al cierre de su luz vascular (Fig 18) y algunos signos de degeneración endotelial. En estos casos la cromatina del núcleo apareció más densa, en acúmulos y periférica en el núcleo de las células y aumentó

el número de cuerpos multivesiculares y de mitocondrias dilatadas en el citoplasma endotelial

En numerosos vasos se observaron zonas de protusión de la célula endotelial, así como la presencia de digitaciones y vacuolizaciones dirigidas hacia la luz vascular, que en algunos casos llegan a desprenderse hacia la misma y que no se observan en los vasos de los animales sanos (Fig. 19 y 20).

La lámina basal está engrosada.

En general los vasos de los animales diabéticos de seis semanas de evolución presentan luces vasculares más irregulares y en las vénulas el espacio extravascular es aparentemente más ancho que en el grupo control y con abundante colágeno (Fig 21).

El endotelio presenta una apariencia más irregular con unas zonas estrechas y otras más ensanchadas y con abundantes vesículas y cuerpos densos en su interior, algunos de los cuales llegan a presentar un tamaño considerable (Fig 22).

Las uniones entre células endoteliales permanecen conservadas.

La lámina basal que rodea al vaso se encuentra engrosada (Fig. 23).

Parece existir cierta afectación de los pericitos con ciertos signos que hacen sospechar un aumento de su actividad (Fig. 24), como puede ser la presencia de numerosas vacuolas en su citoplasma.

En los animales diabéticos de doce semanas de evolución llama la atención el grado de colapso de la luz vascular que se observa en numerosos vasos, tanto capilares como vénulas, y que en algunos de ellos llega casi a desaparecer por completo (Fig. 25). Aunque se da en ambos tipos de vasos, el cierre de la luz es más manifiesto en las vénulas que en los capilares.

El endotelio es muy irregular, con zonas de protusión hacia la luz vascular, cuerpos densos abundantes y poca actividad micropinocítica. (Fig. 26).

La lámina basal está claramente engrosada (Fig. 27) y se observó La presencia de algunas uniones estrechas entre las células endoteliales. (Fig 28).

Así mismo se observó cierta afectación de los pericitos y que parecen estar en menos número que los animales del grupo control (Fig. 29).

En el grupo de animales diabéticos de seis semanas de evolución comenzamos a ver la presencia de material PAS-D positivo alrededor de los vasos. Observamos como este marcaje se realizaba tanto en las células endoteliales como en los alrededores de algunos de los vasos. En los animales diabéticos de doce semanas de evolución este marcaje ya fué mucho más intenso. Se marcaron casi la totalidad de las células endoteliales y en todos los vasos se visualizó la presencia de material PAS-D positivo a su alrededor Fig.30).

Al determinar inmunohistoquímicamente la albúmina, observamos su presencia alrededor de algunos vasos de los animales diabéticos de seis semanas y alrededor de casi todos los de los diabéticos de doce semanas de evolución (Fig.31)

Figura 11: Vasos sanguíneos de animales controles. La luz vascular (L) es amplia y el contorno endotelial es regular. Se observan claramente los núcleos voluminosos de las células endoteliales (N) y citoplasma de pericitos alrededor del vaso (►), separado del endotelio por la lámina basal. En la figura b se aprecia la unión interendotelial (flecha). La barra equivale a : figura a: 0,80 micras, figura b: 1,75 micras.

Figura 12: a: Capilar de animal control de doce semanas. Se observa el núcleo endotelial (N), la lámina basal que rodea al capilar y el citoplasma de un pericito (►). Se aprecian las terminaciones de astrocitos rodeando al capilar (A). La barra equivale a 1,30 micras.

b: Detalle de la lámina basal (flecha grande) rodeando a una célula endotelial. Se observan vesículas (►) en el interior de la célula y aparato de Golgi prominente (flecha pequeña). La barra equivale a 0,20 micras.

c: Porción de célula endotelial donde se aprecia la gran actividad micropinocítica con vesículas (►) abiertas al espacio abluminal. la barra equivale a 0,20 micras.

Figura 11a

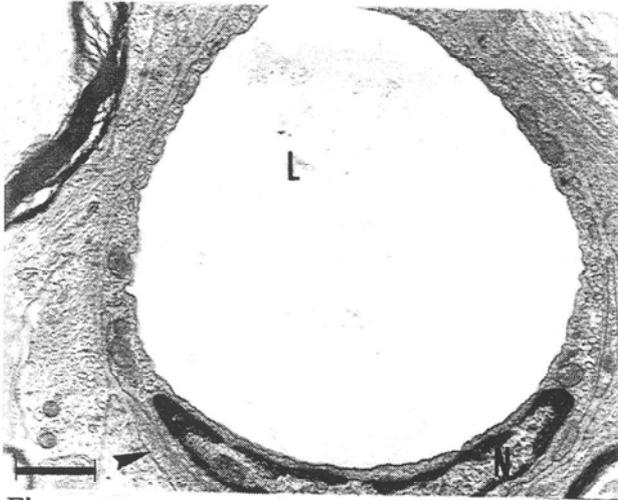


Figura 11b

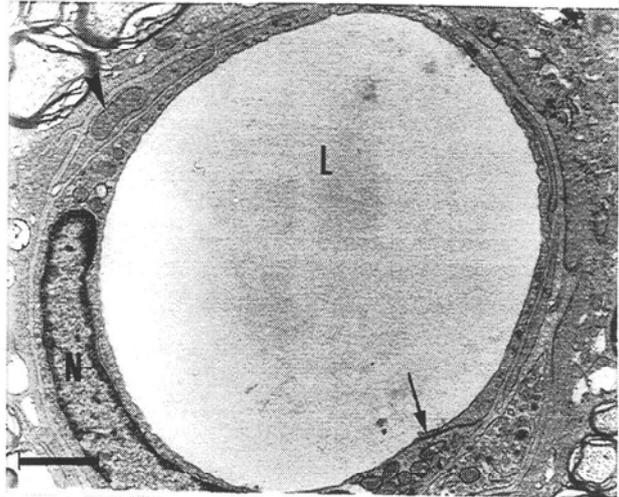


Figura 12 a

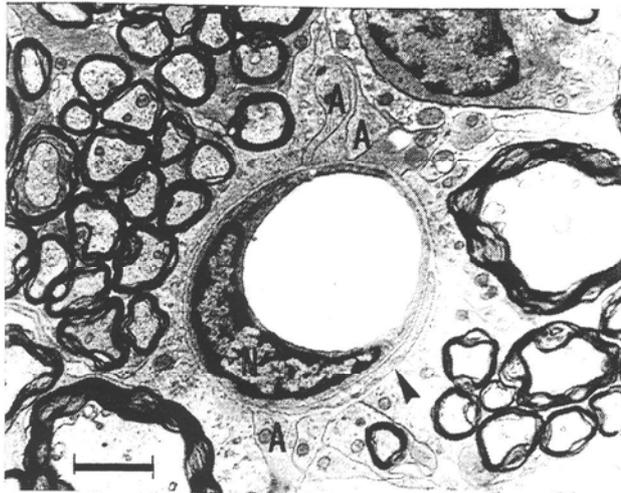


Figura 12b

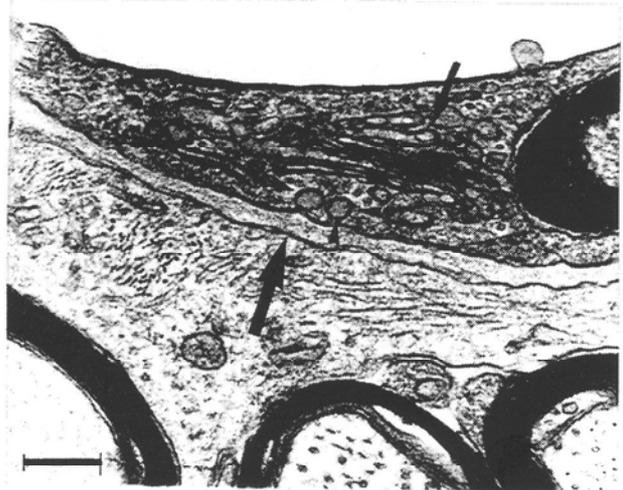


Figura 12c

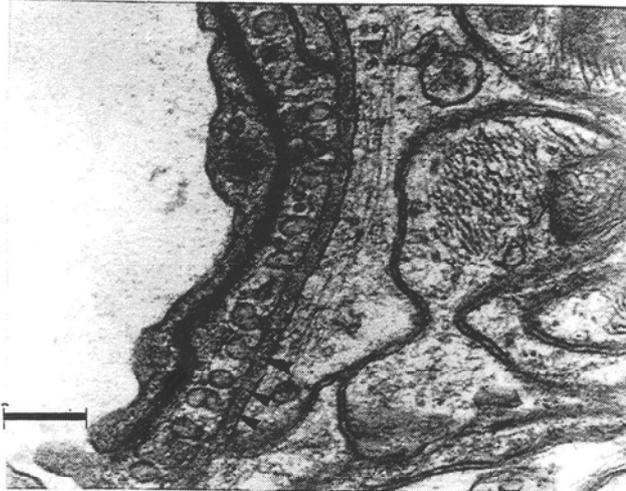


Figura 13: Vénula de animal control. Destaca el núcleo de un pericito (P) y el espacio perivascular más ancho que en los capilares y con abundante colágeno (►). L= luz vascular. E= endotelio. La barra equivale a 0,98 micras.

Figura 14: Vénulas de animales controles de doce semanas. Se observa una luz vascular amplia (L), endotelio regular (E), un espacio perivascular relativamente ancho, pies astrocíticos terminales (a), colágeno perivascular (►) y el citoplasma de un pericito (P). En la figura c se muestra detalle del colágeno en el espacio perivascular. La barra equivale en figura a: 1,3 micras, figura b: 1 micra y figura c: 0,17 micras.

Figura 13

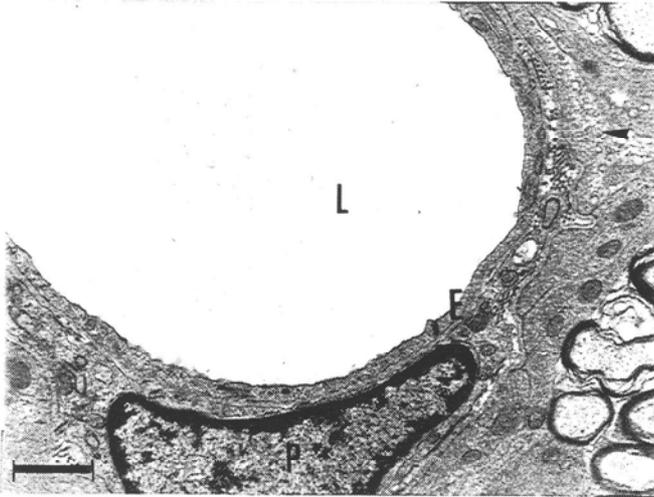


Figura 14a

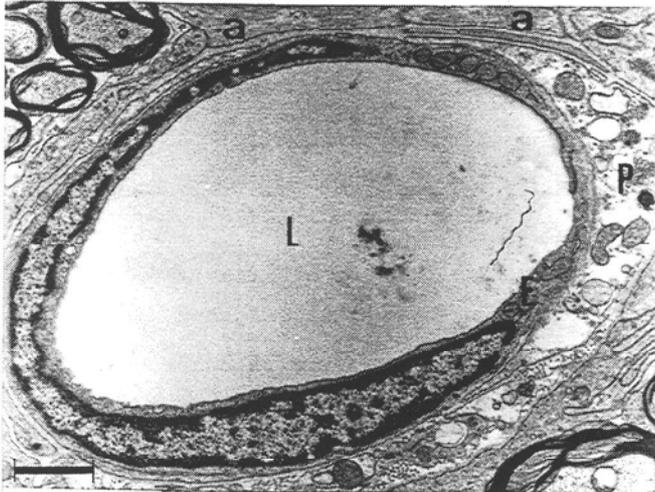


Figura 14b

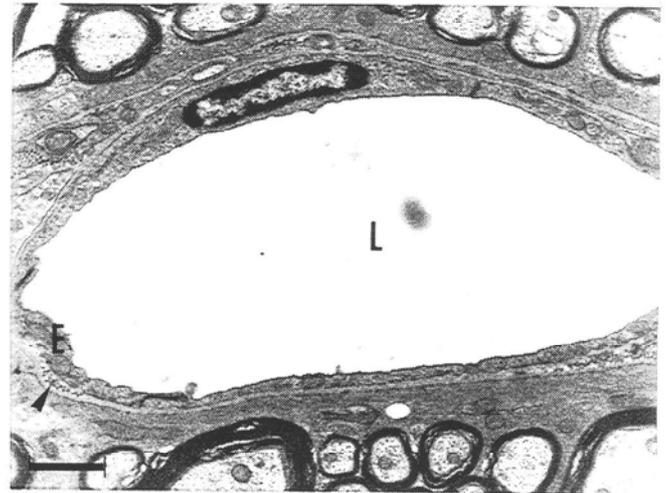


Figura 14c

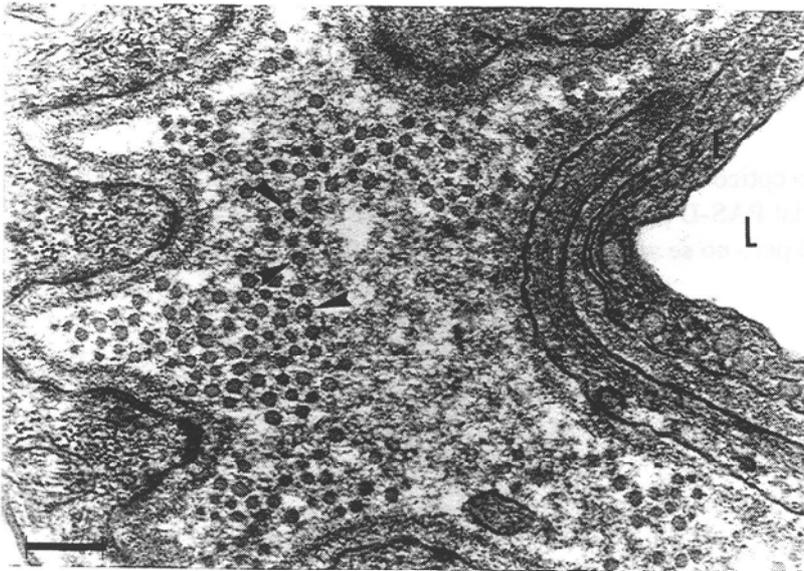


Figura 15: Sección transversal de nervio óptico de animal control teñida con el reactivo de Schiff. Se observa la presencia de material PAS-D positivo en células gliales (►) y en el interior de las células endoteliales (←→) pero no se aprecia depósito del material en la periferia de los vasos.

La barra equivale a 27 micras.

Figura 16: Determinación de la albúmina por inmunohistoquímica. No se observa la presencia de la proteína en el tejido de nervio óptico de animal control.

La barra equivale a 27 micras.

Figura 15

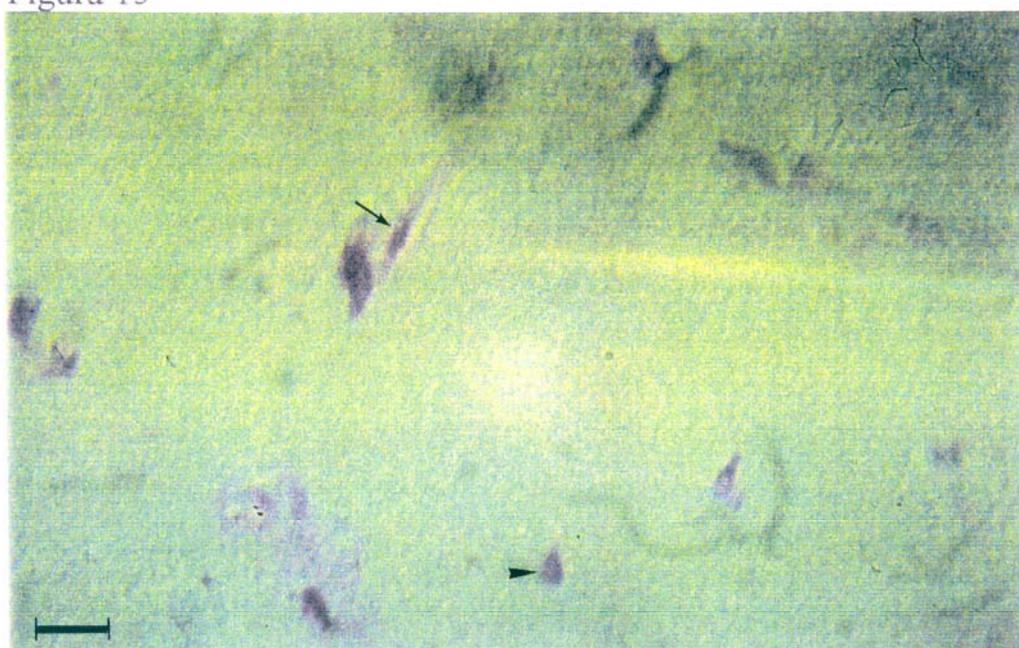


Figura 16

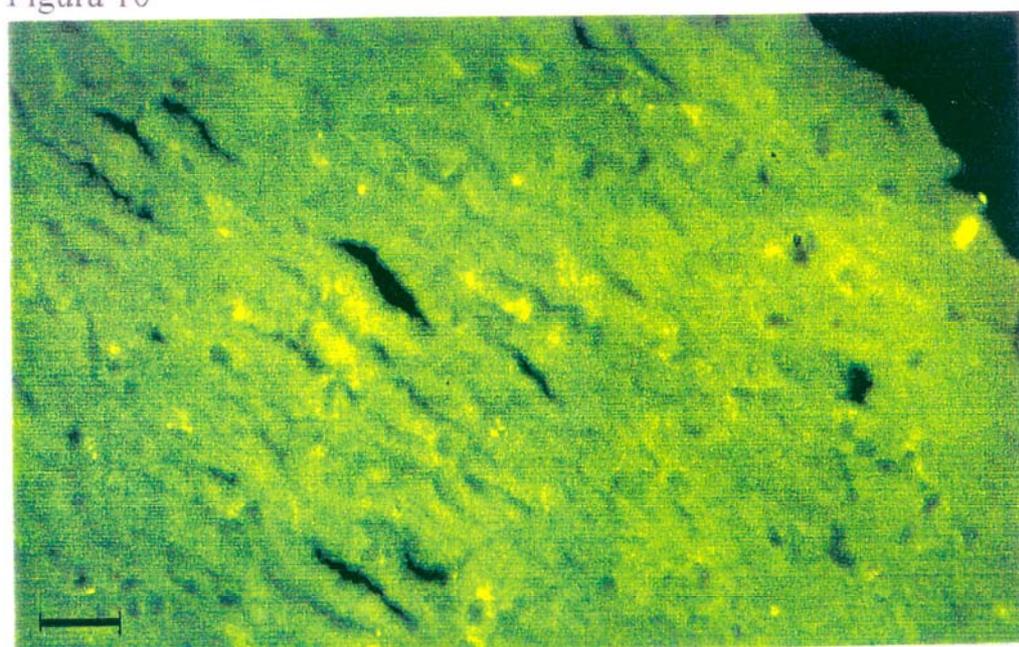


Figura 17: Capilares de animales diabéticos de seis semanas de evolución. Se observa una luz vascular amplia, célula endotelial sin signos degenerativos y pericito de apariencia normal. L= luz vascular, E= endotelio, P= pericito, a=prolongaciones astrocitarias, ► =lámina basal. La barra equivale en la figura a: 1,18 micras y en la figura b: 0,7 micras.

Figura 18: Capilares de animales diabéticos de seis semanas en los que se aprecia cierta tendencia al cierre de la luz vascular, pericito (P) con núcleo muy grande (figura a) así como el núcleo de la célula endotelial (E) que tiende a ocupar la luz del vaso (L) (figura b). ► =lámina basal. La barra equivale en la figura a: 1 micra y en la figura b: 0,53 micras.

Figura 17a

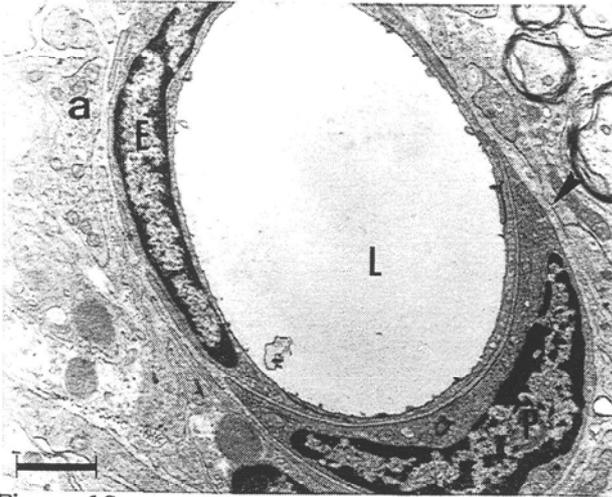


Figura 17b

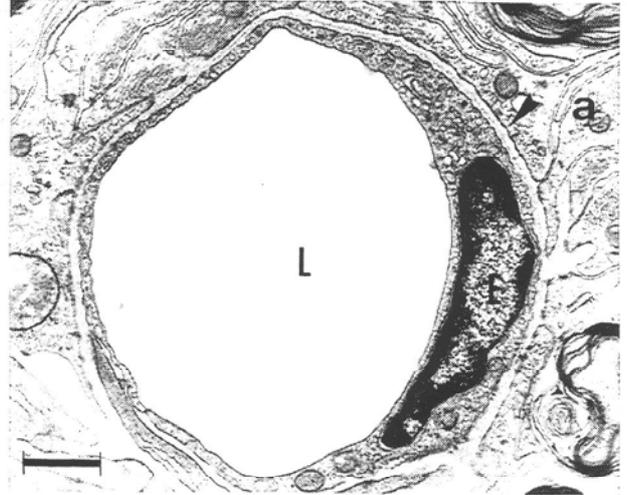


Figura 18a

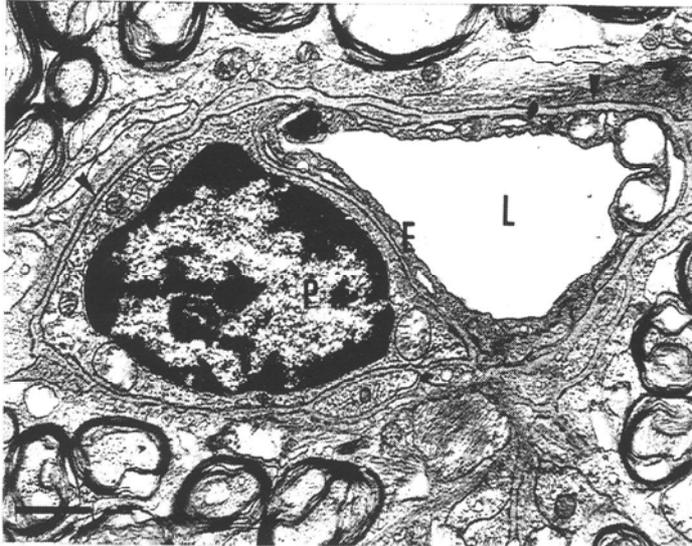


Figura 18b

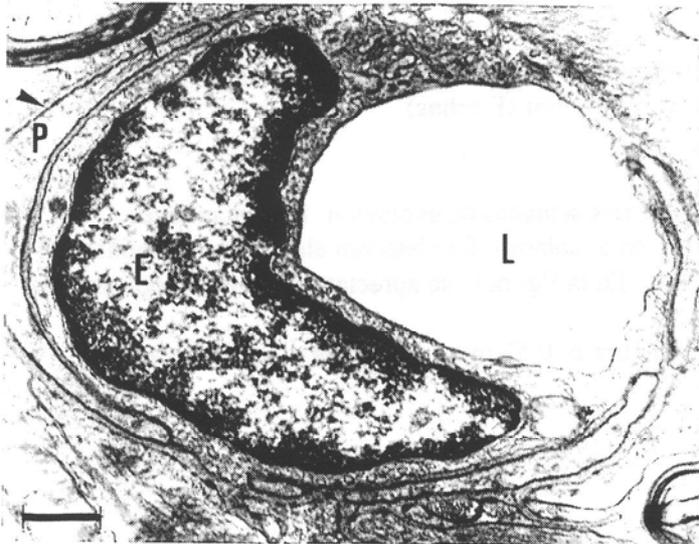


Figura 19: Protusión vacuolar de la célula endotelial (Flecha) hacia la luz vascular (L) e un vaso de animal diabético de doce semanas.

La barra equivale a 1,12 micras.

Figura 20: Detalle de una de las protusiones endoteliales en vaso de animal diabético de doce semanas. Nótese la presencia de vacuolas en su interior (Flechas).

La barra equivale a 0,14 micras.

Figura 21: Vénulas de animales diabéticos de seis semanas de evolución. Presentan luces vasculares (L) de forma irregular y que tienden al colapso. Se observan elementos vesiculares en el citoplasma de las células endoteliales (►). En la figura C se aprecian restos del citoplasma de un pericito de aspecto degenerado (p)

La barra equivale en figura a: 0,93 micras, figura b: 0,53 micras y figura c: 0,18 micras.

Figura 19

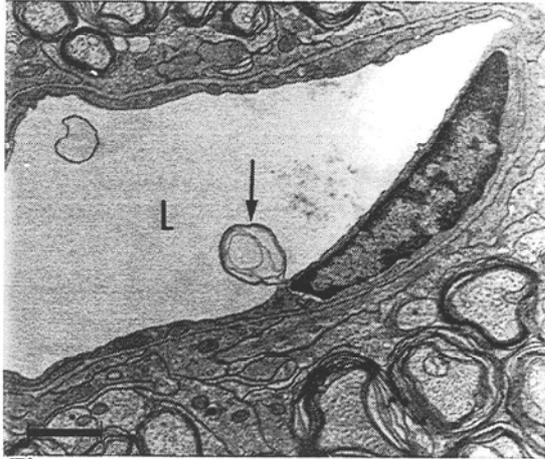


Figura 21a

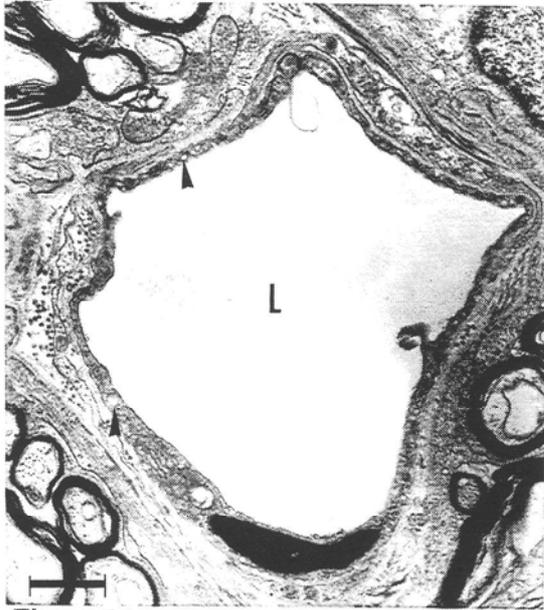


Figura 21c

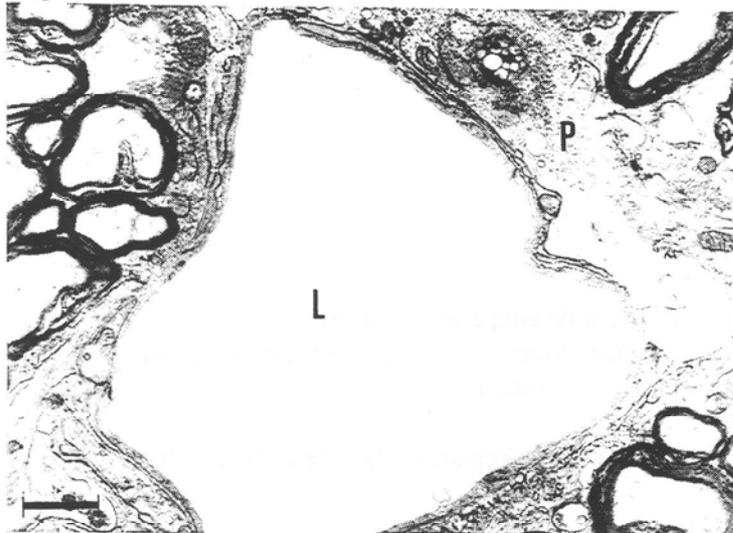


Figura 20

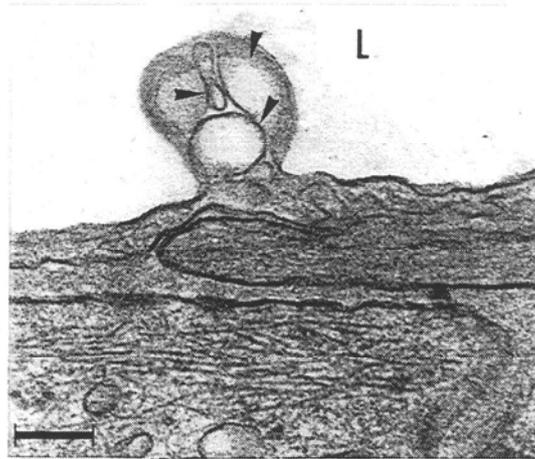


Figura 21b



Figura 22: Detalles de zonas de endotelio de vasos de animales diabéticos.

En la figura a destaca la irregularidad de la célula endotelial (E), con cambios de grosor y elementos vesiculares en su citoplasma (►), L=luz vascular.

La barra equivale a 0,48 micras.

En la figura b se aprecia un cuerpo denso (flecha) en el citoplasma de la célula endotelial.

L=luz vascular.

La barra equivale a 0,18 micras.

Figura 22a

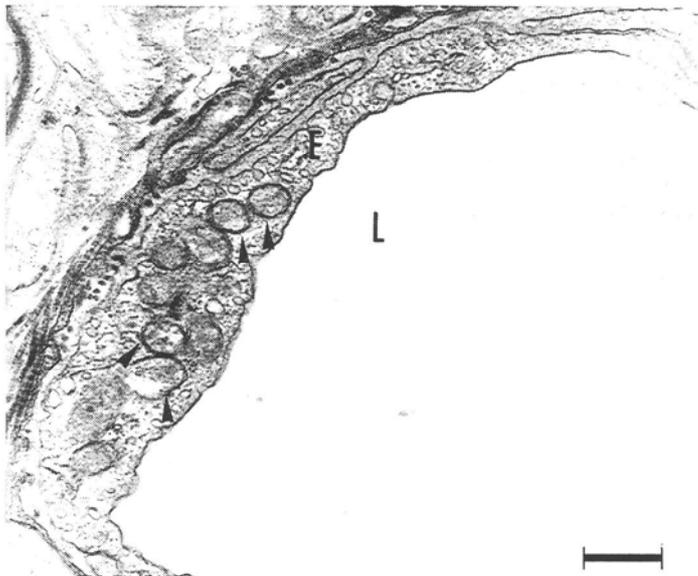


Figura 22b

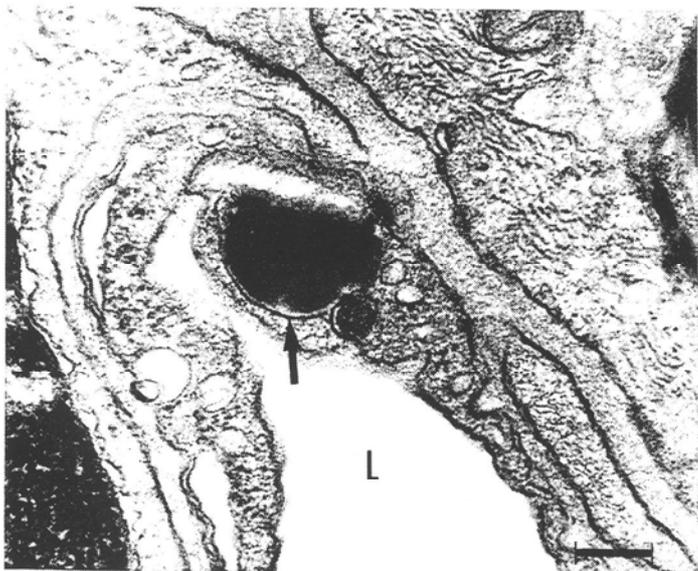


Figura 23: Detalles de lámina basal de vasos de animales diabéticos de seis semanas de evolución. Lámina basal (flechas) discurre entre la célula endotelial (E) y los pies terminales de los astrocitos (a) y en estos casos se encuentra engrosada. L=luz vascular. En la figura a se observan múltiples vesículas de micropinocitosis abiertas al espacio perivascular. La barra equivale en la figura a: 0,18 micras y en la figura b: 0,13 micras.

Figura 23a

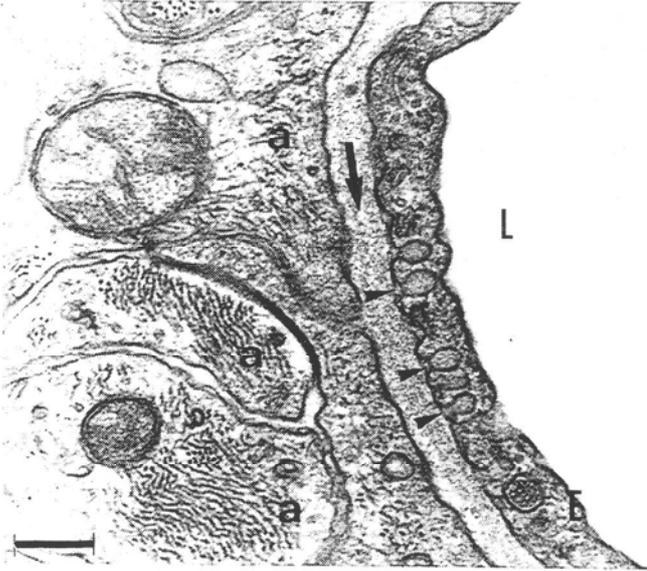


Figura 23b

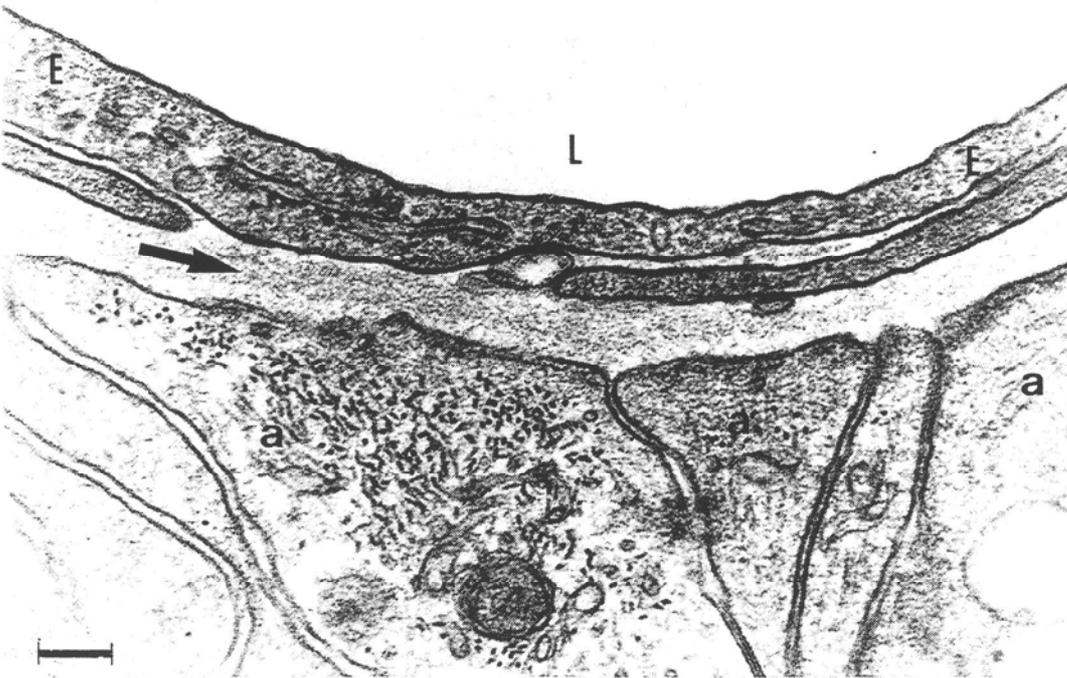


Figura 24: Detalles del citoplasma de varios pericitos pertenecientes a animales diabéticos. En la figura a se aprecia un cuerpo denso (flecha). L=luz vascular. E= célula endotelial. ► =colágeno perivascular. La barra equivale a 0,14 micras. En las figura b y c se observan abundantes vacuolas (V) gotas lipídicas y cuerpos densos (flechas) en el citoplasma celular. L=luz vascular. La barra equivale en figura b: 0,30 micras y figura c: 0,7 micras.

Figura 24a

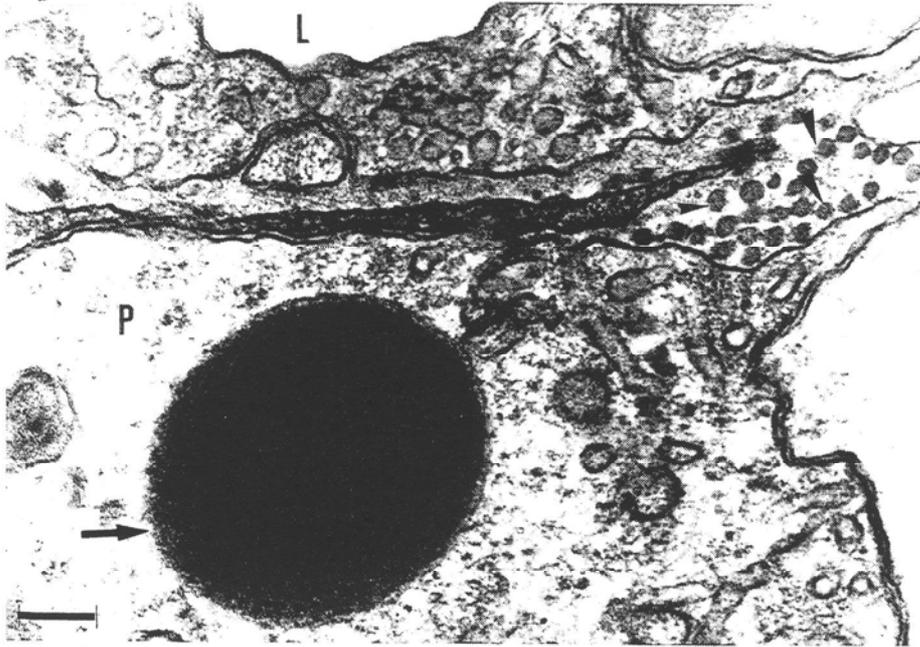


Figura 24b

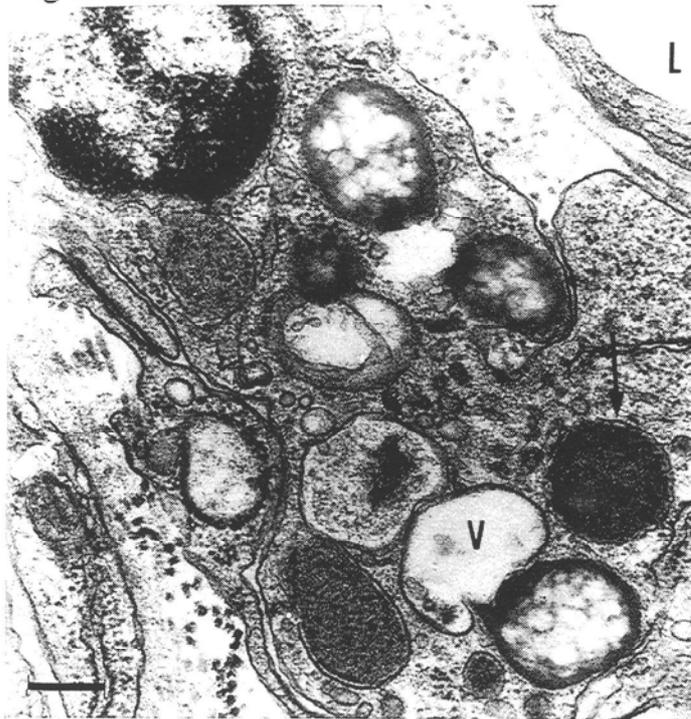


Figura 24c

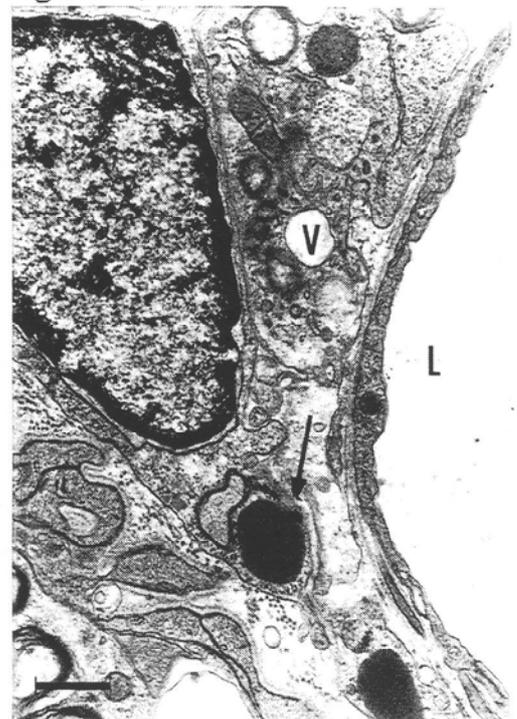


Figura 25: Vasos de nervio óptico de animales diabéticos de doce semanas de evolución. En las tres figuras se pone de manifiesto el cierre de las luces vasculares (L) por aposición de las paredes del vaso (►). El cierre de la luz vascular en algunos puntos es total. La barra equivale en la figura a: 1,75 micras y en las figuras b y c: 2,4 micras.

Figura 25a

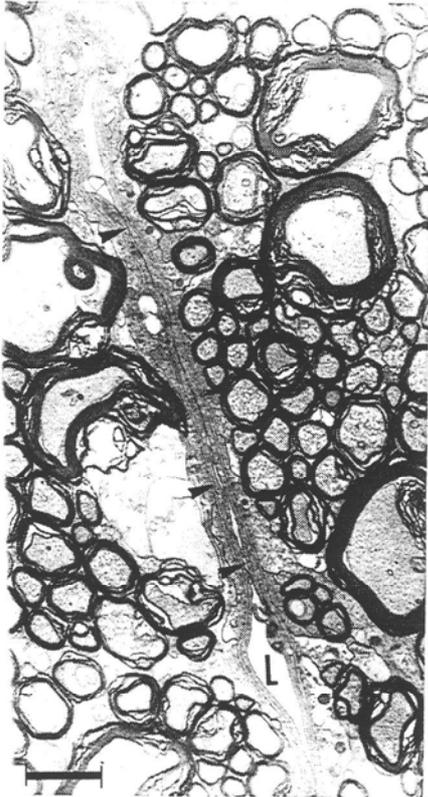


Figura 25b

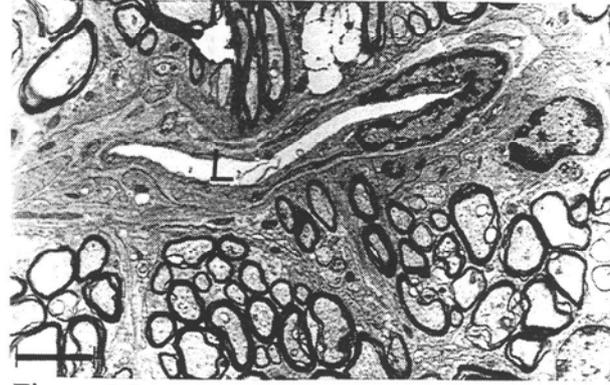


Figura 25c

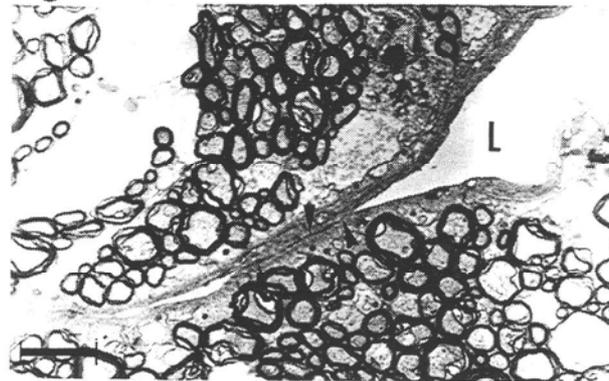


Figura 26: Vasos de animales diabéticos de doce semanas de evolución. Destaca el aspecto irregular de las células endoteliales, con digitaciones (►) y zonas de protusión hacia la luz vascular (L). La actividad micropinocítica es poco manifiesta. La barra equivale en la figura a: 0,98 micras y en la figura b: 1,75 micras.

Figura 27: Detalles de la lámina basal engrosada de animales diabéticos (►). En la figura a se aprecia un cuerpo denso en el citoplasma de la célula endotelial. L=luz endotelial. En la figura b se observan las múltiples capas de la lámina basal. la barra equivale a 0,15 micras.

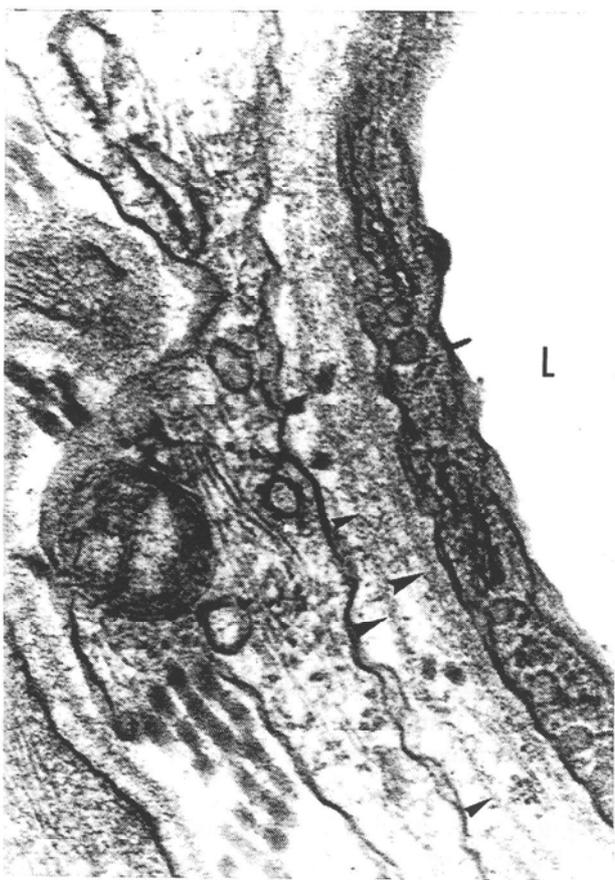
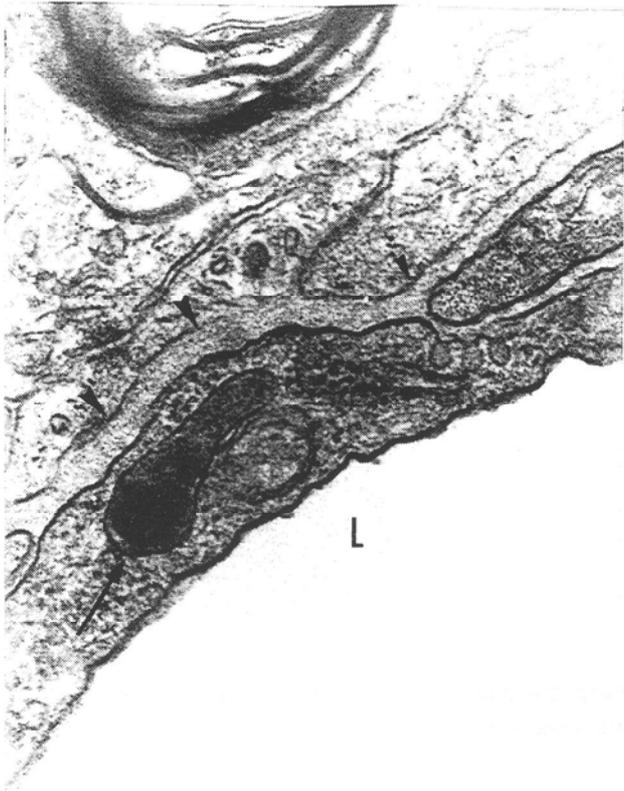
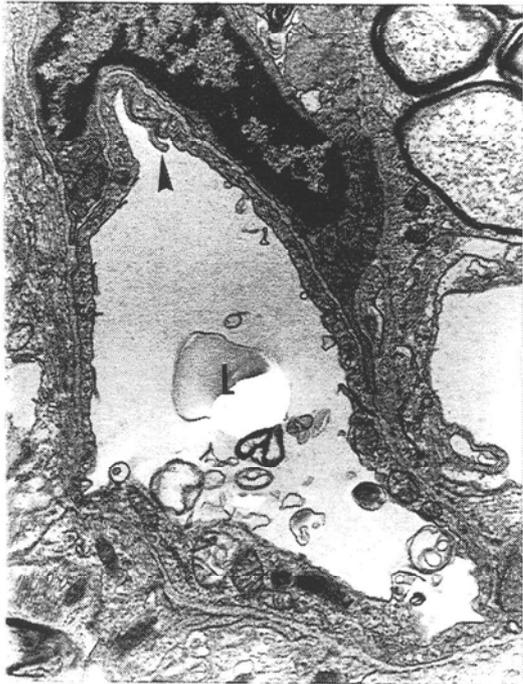


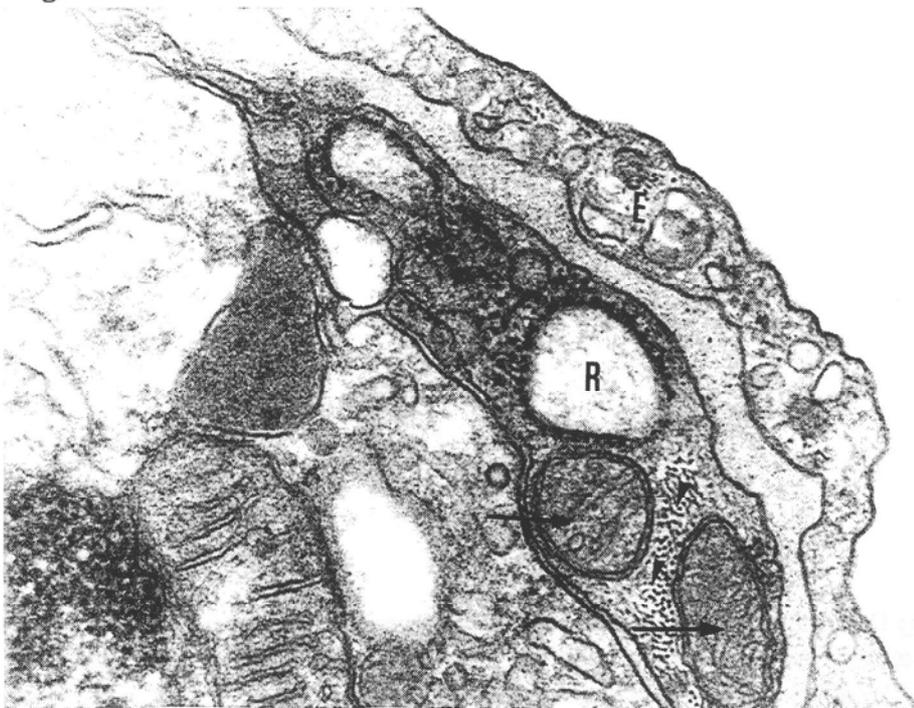
Figura 28: Detalle de endotelio de animal diabético. Se aprecia una unión estrecha interendotelial (flecha). También se observa el engrosamiento de la lámina basal (▶).
La barra equivale a 0,14 micras.

Figura 29: Detalle del citoplasma de un pericito de animal diabético de doce semanas. Se observan mitocondrias (→), retículo endoplásmico dilatarado (R) y filamentos (▶).
E=endotelio.
La barra equivale a 0,14 micras.

Figura 28



Figura 29



Figuras 30 a y b: Determinación de material PAS-D positivo con el reactivo de Schiff en nervios de animales diabéticos. Se observa la presencia de dicho material en el interior de las células endoteliales (►) y alrededor de algunos vasos (—→). La barra equivale a 27 micras.

Figura 30 (a)

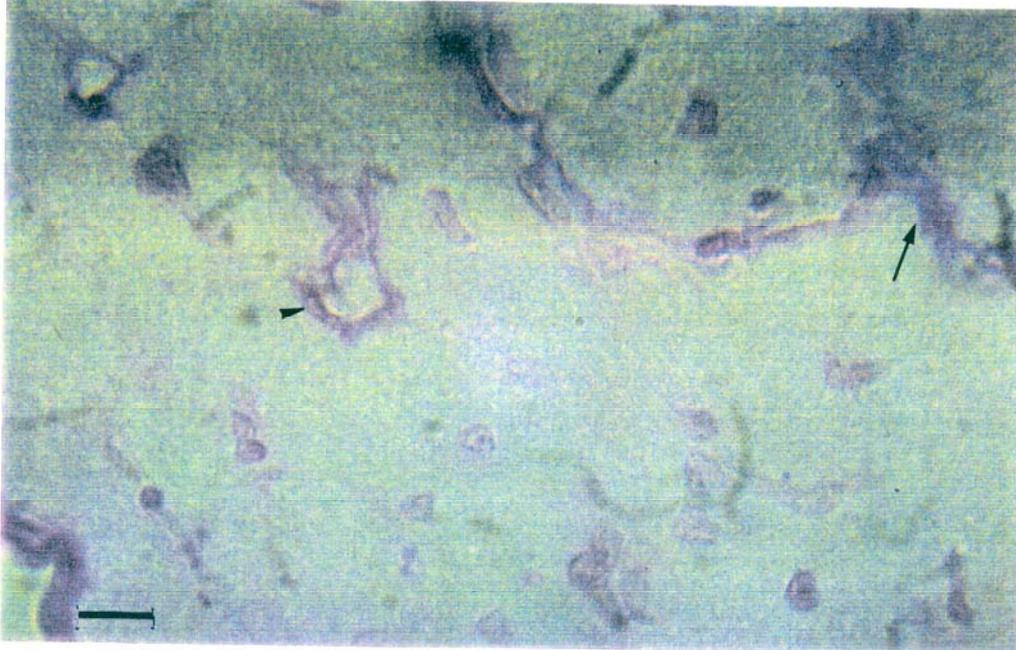


Figura 30 (b)

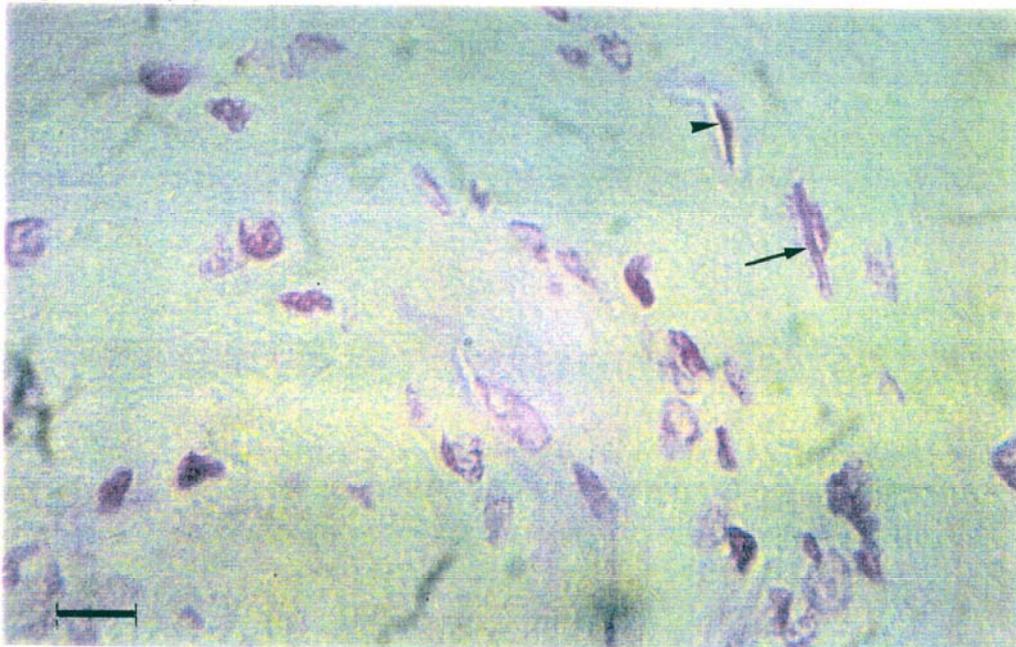
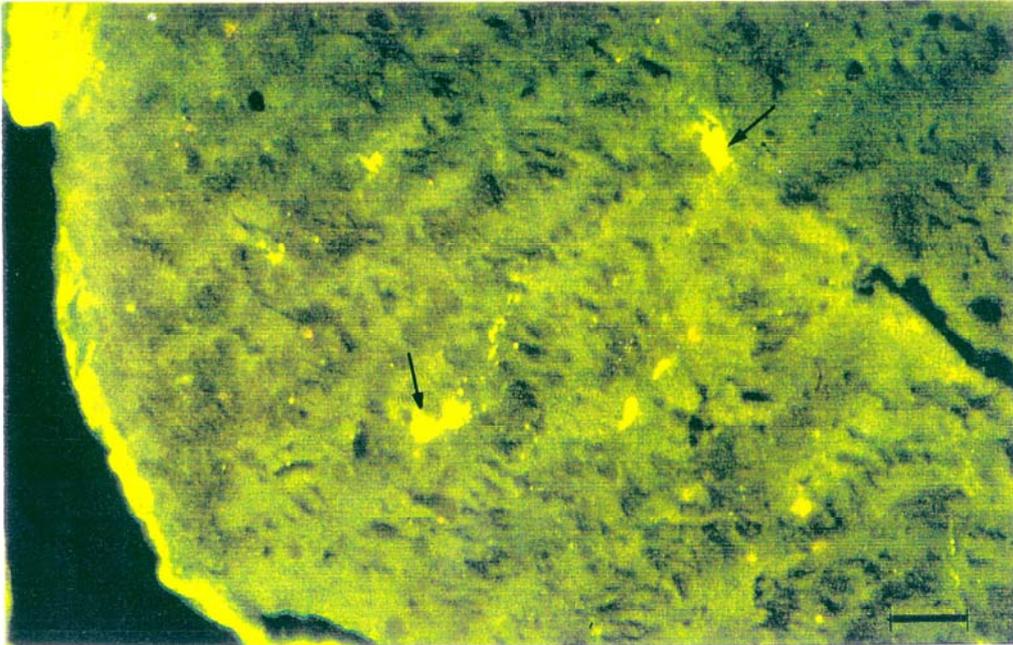


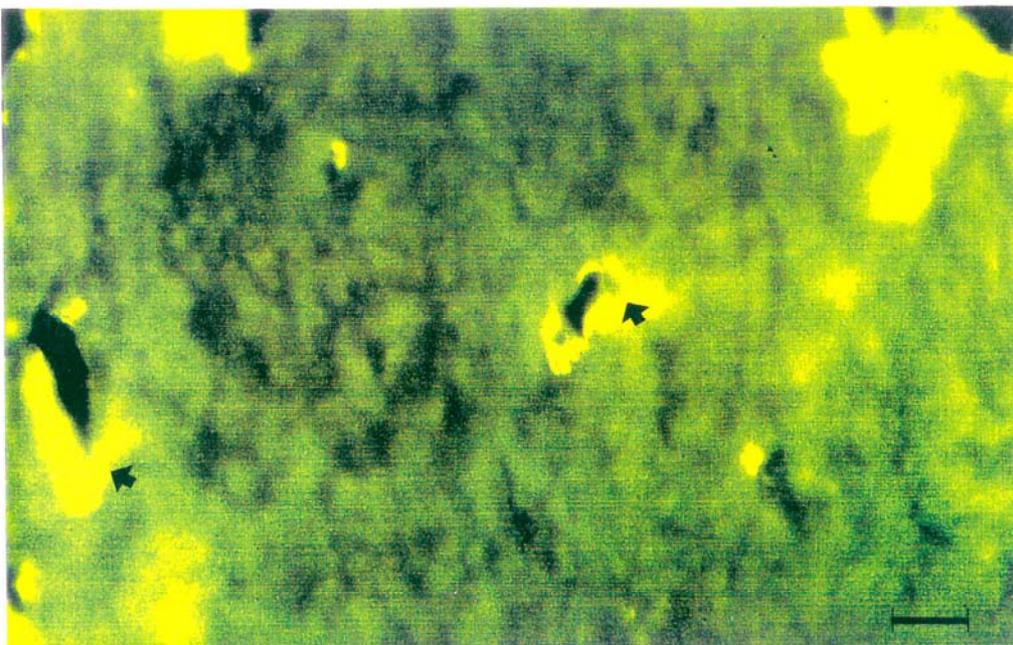
Figura 31 a y b: Determinación por inmunohistoquímica de la presencia de albúmina en nervio óptico de animales diabéticos. Se detecta la presencia de la proteína fuera del torrente circulatorio (flechas) a las seis semanas (a) y más acentuado a las doce semanas de evolución de la enfermedad (b).
La barra equivale en la figura a: 70 micras y en la figura b: 27 micras.

Figura 31

(a)



(b)



4.-4.-COMPONENTE CELULAR

En los cortes semifinos de los nervio ópticos de todos los animales se observaron grupos de fibras nerviosas separados entre sí por prolongaciones de células gliales.

Estas prolongaciones forman también una cubierta en la zona periférica del nervio, separando al conjunto de fibras de las cubiertas meníngeas.

Del mismo modo estos procesos gliales rodean parcialmente a los vasos sanguíneos del nervio óptico (Fig. 32).

La disposición del componente celular es diferente según la zona del nervio estudiada como se puede observar en los cortes realizados a diferentes niveles (Fig. 33), no encontrando diferencias en dicha distribución entre los animales diabéticos y los de los grupos control.

La determinación de material PAS(+) nos mostró en los animales que recibieron la inyección intraperitoneal de tampón citrato (controles) algunas células que presentaron depósitos granulares de este material en su interior. Estas escasas células se distribuyen por todo el nervio.

Muchas otras células con núcleos claros no presentaron marcaje con el reactivo de Schiff.(Fig. 34)

En los animales diabéticos tras seis semanas de evolución de la enfermedad el acúmulo de material PAS-D se presentó en un mayor número de células y con mayor intensidad que en los animales del grupo control. Este material se acumuló también en algunas de aquellas células de núcleo más claro que no presentaron depósitos en ningún caso en los animales que recibieron sólo la inyección de tampón (Fig. 35).

Después de doce semanas de evolución tras la inyección de la estreptozotocina los animales presentaron acúmulos de material PAS-D positivo en mayor cantidad de células y con mayor intensidad que los animales del grupo control y que los animales diabéticos de seis semanas (Fig 36). Ese material presenta un aspecto granular y se localizó también en aquellas células de núcleo más claro que no presentaron depósitos, en ningún caso, en los animales que recibieron sólo la inyección de tampón, y sólo en algunas de los animales diabéticos de seis semanas.

Mediante la localización inmunohistoquímica de la Proteína Ácida Fibrilar Glial (PAFG) obtuvimos la distribución y morfología de los astrocitos.

En los animales controles los astrocitos presentaron su característico cuerpo celular triangular y sus prolongaciones en forma estrellada (Fig. 37) o pies vasculares que se distribuyen preferentemente en la zona periférica del nervio y alrededor de las vasos sanguíneos.

En el grupo de animales diabéticos de seis semanas de evolución se observó un descenso en la inmunoreactividad de la GFAP en los astrocitos con respecto al grupo sano.

La inmunoreactividad fue marcada en la zona periférica del nervio (glia periférica) y rodeando a los vasos sanguíneos (pies vasculares), pero se realiza de una manera menos intensa que en el grupo control (Fig. 38).

Al realizar el marcaje en los animales diabéticos de doce semanas, éste resultó estar claramente disminuido con respecto a los animales de seis semanas de evolución y los controles. La mayor intensidad del marcaje se manifestó en la zona periférica del nervio y alrededor de los vasos como en

los demás grupos pero estando muy disminuída en el resto, tanto del cuerpo celular como en las prolongaciones de los astrocitos (Fig 39 y 40).

El estudio ultraestructural de los grupos control nos muestra la presencia de astrocitos y oligodendrocitos (Fig. 41)

Los astrocitos presentaron un citoplasma abundante y un núcleo poco denso y con la cromatina dispuesta en la zona periférica. El citoplasma se caracteriza por presentar algunos gránulos densos, gotas lipídicas y numerosos microfilamentos, más abundantes a nivel de las prolongaciones celulares (Fig. 42).

Los oligodendrocitos se presentan como células aparentemente más pequeñas que los astrocitos. Su núcleo es más redondeado, más voluminoso, de mayor densidad electrónica y con la cromatina dispuesta en acúmulos. Mostraron citoplasma escaso, con abundantes neurotúbulos, aparato de Golgi bien desarrollado, ribosomas y en ocasiones algunos cuerpos densos (Fig. 43).

El componente celular de los animales diabéticos de seis semanas mostró los mismos tipos celulares que los animales sanos, es decir Astrocitos y Oligodendrocitos.

En la mayoría de las células el aspecto del núcleo y su cromatina fue aparentemente normal.

Presentan en su citoplasma aparato de Golgi y Retículo endoplásmico con cisternas dilatadas, cuerpos multivesiculares, mitocondrias, microtúbulos y neurofilamentos.

En relación a los animales controles los animales diabéticos presentaron en el citoplasma de los astrocitos un aumento en el número de gotas lipídicas y cuerpos densos, conservando aparentemente una

distribución de filamentos similar al grupo control. En los oligodendrocitos observamos un aumento de figuras lamelares (Fig. 44 y 45).

En los animales diabéticos tras doce semanas de enfermedad observamos los mismos tipos celulares pero con una mayor cantidad de gotas lipídicas en su citoplasma, así como cuerpos densos y lamelares (Fig.46). Aunque la mayoría de las células presentan las características descritas también se observaron algunas células con claros signos degenerativos de su citoplasma (Fig. 47).

Figura 32 a: Detalle de sección transversal de nervio óptico de animal sano teñido con azul de Toluidina. Se aprecian los grupos de fibras nerviosas separados por prolongaciones de las células gliales (►). Así mismo se observan los vasos sanguíneos, también rodeados por dichas prolongaciones (—►) y la presencia de la glía periférica bordeando la región más externa del nervio. La barra equivale a 76,6 micras.

En la **figura 32 b** se presenta la sección transversal de un nervio en la que se aprecia la presencia de un vaso central. La barra corresponde a 0,17 mm.

Figura 33: Cortes transversales de nervio ópticos hechos a distintos niveles. En la figura a se presenta la zona más anterior del nervio, la b corresponde a una zona media y la c a la porción más posterior del mismo.

La barra corresponde a 0,2 mm.

Figura 32

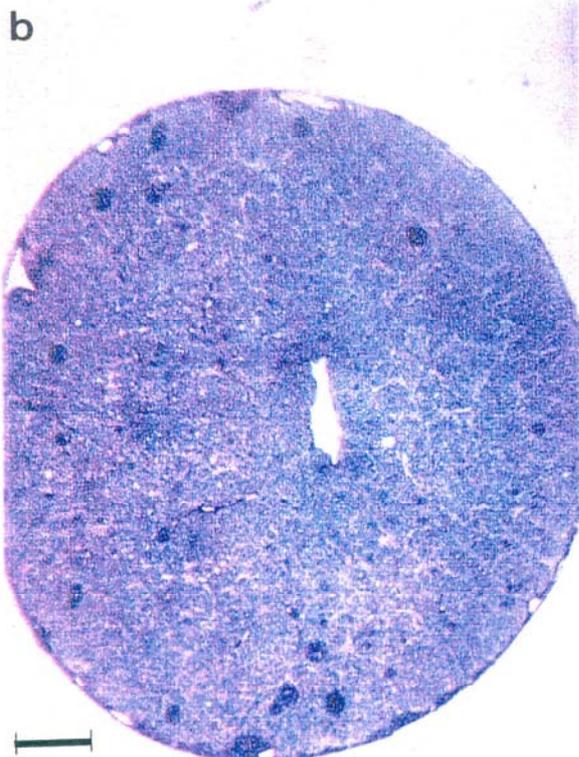
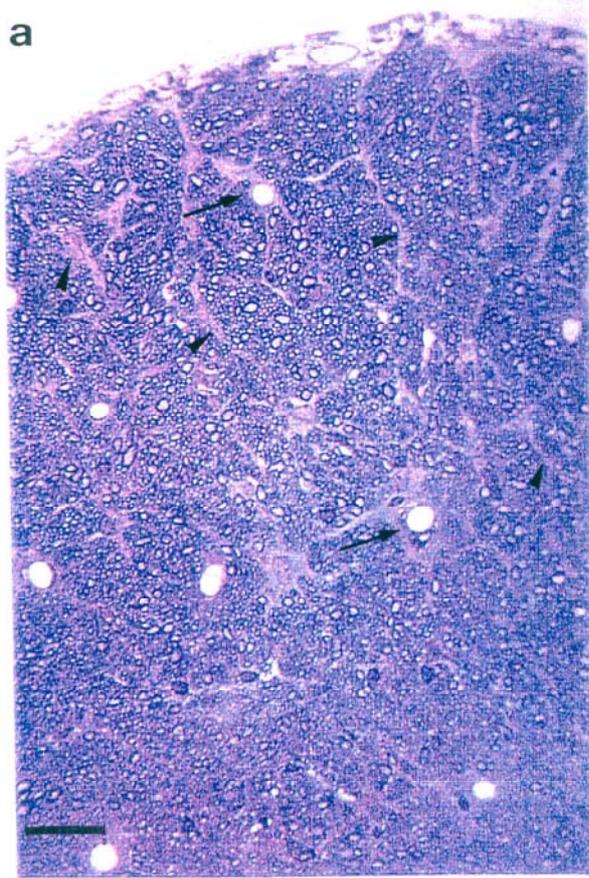
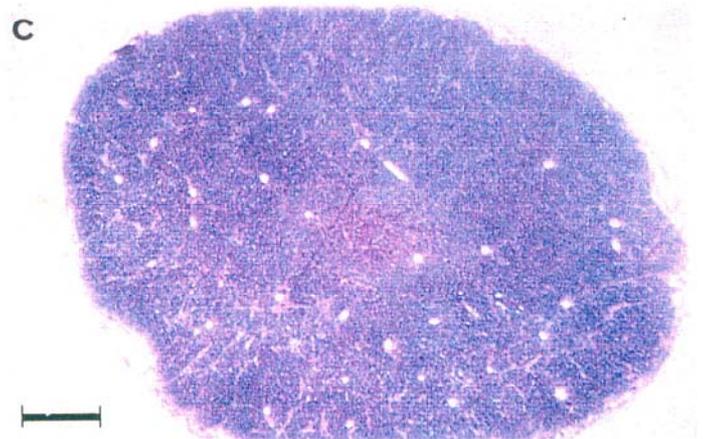
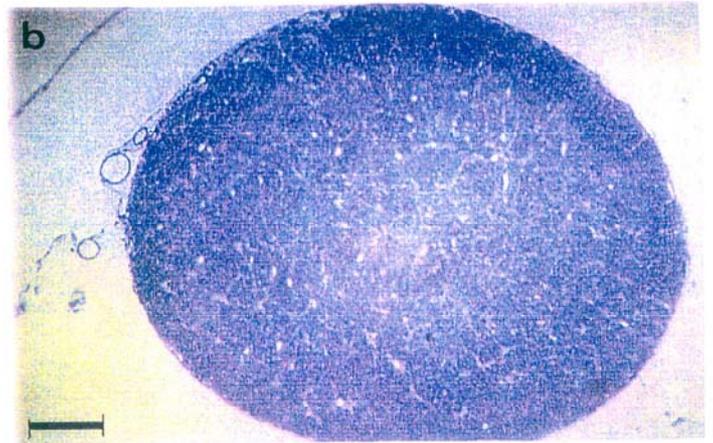
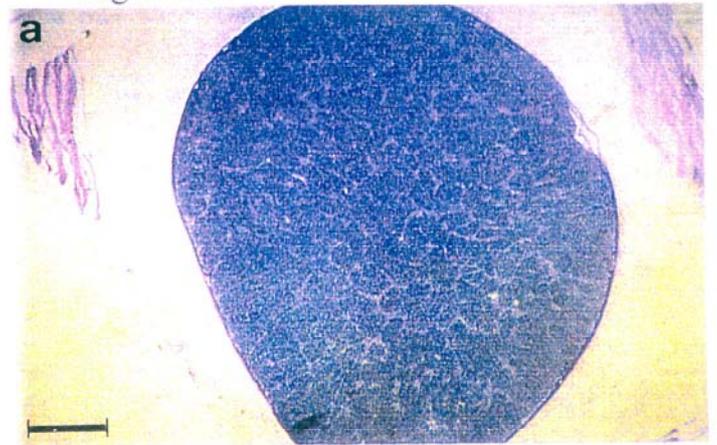


Figura 33



Figuras 34,35 y 36: Marcaje con el reactivo de Schiff para detectar la presencia de material PAS-D positivo en las células de nervios ópticos. Observamos la presencia de este material en algunas células de los nervios de animales controles (Fig. 34) pero el marcaje fué más acentuado y en mayor número de células en los animales diabéticos (Fig 35 y 36). Nótese la diferencia del marcaje entre los animales diabéticos de seis semanas (Fig. 35) y los de doce semanas (Fig. 36). La barra equivale a 70 micras.

Figura 34

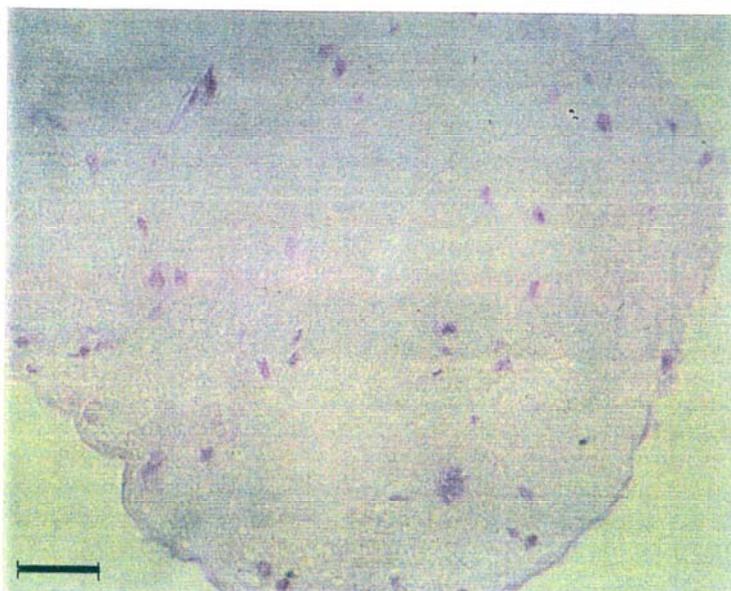


Figura 35

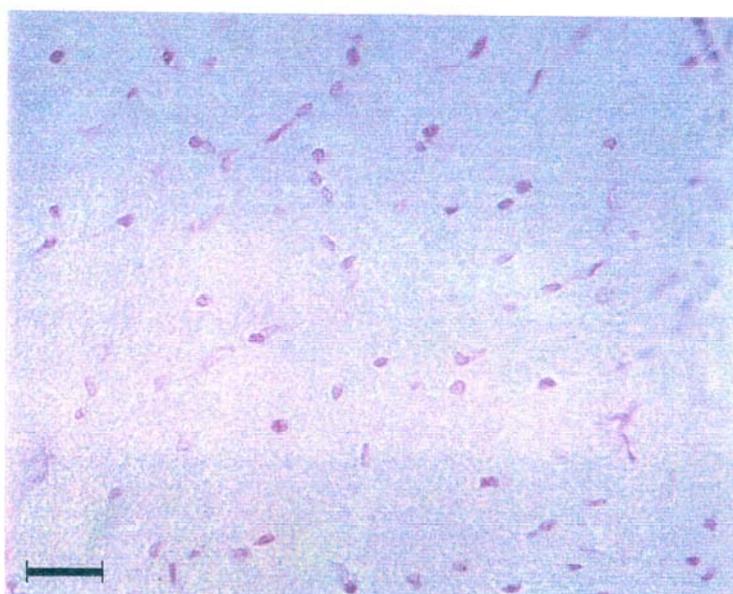


Figura 36

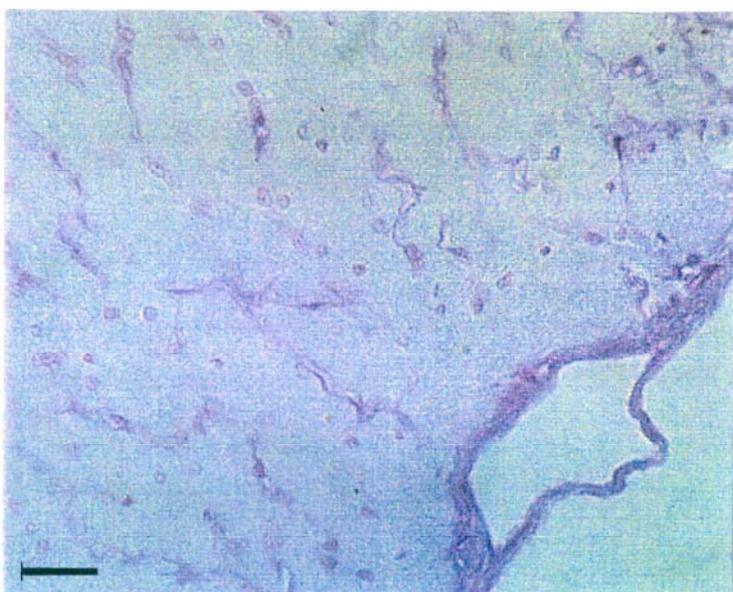


Figura 37,38 v 39: Determinación de la Proteína ácida fibrilar glial en secciones transversales de nervios ópticos. En los animales sanos (Fig. 37) se aprecia la estructura normal de los astrocitos con su cuerpo estrellado y sus prolongaciones celulares. Nótese la mayor presencia celular en la periferia del nervio y alrededor de los vasos sanguíneos (flecha) En los animales diabéticos de seis semanas se aprecia una disminución clara del marcaje de la PAFG (figura 38) y esta disminución es mucho más manifiesta en los animales de diabetes de doce semanas de evolución (Fig 39). La barra equivale en la figura a:70 micras y en las figuras b y c: 27 micras.

Figura 37

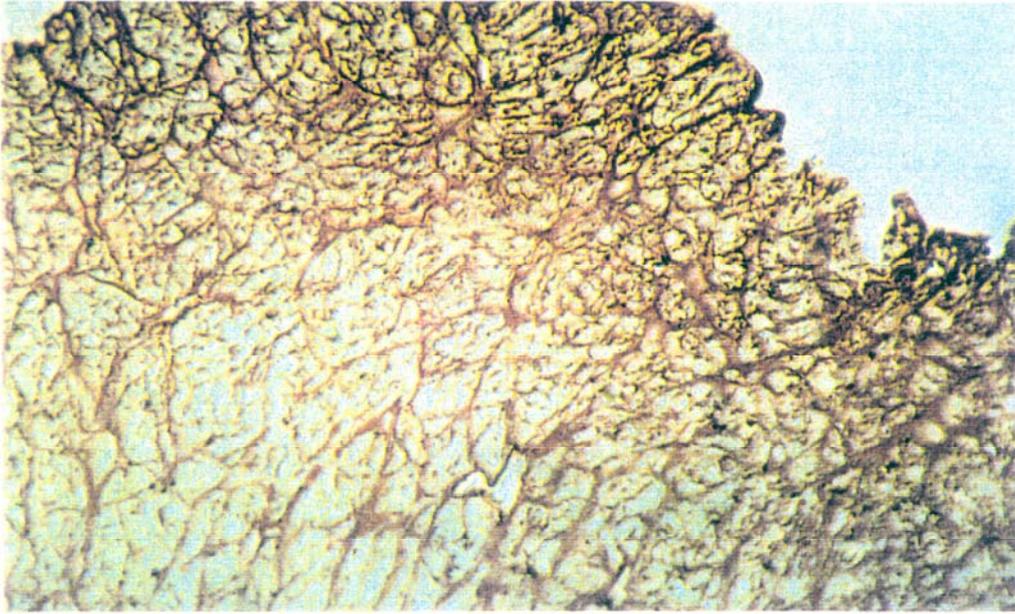


Figura 38

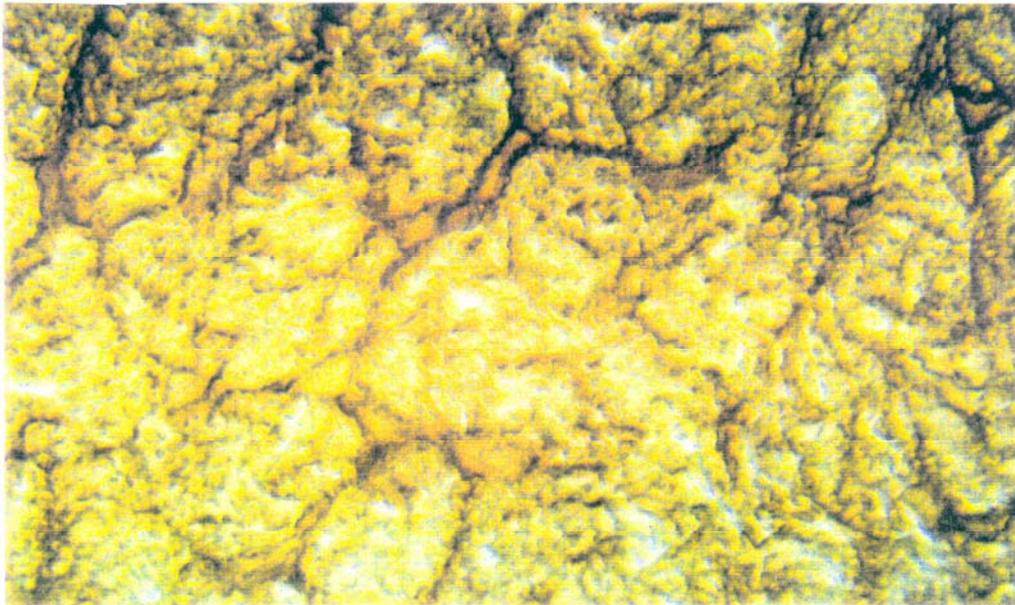


Figura 39

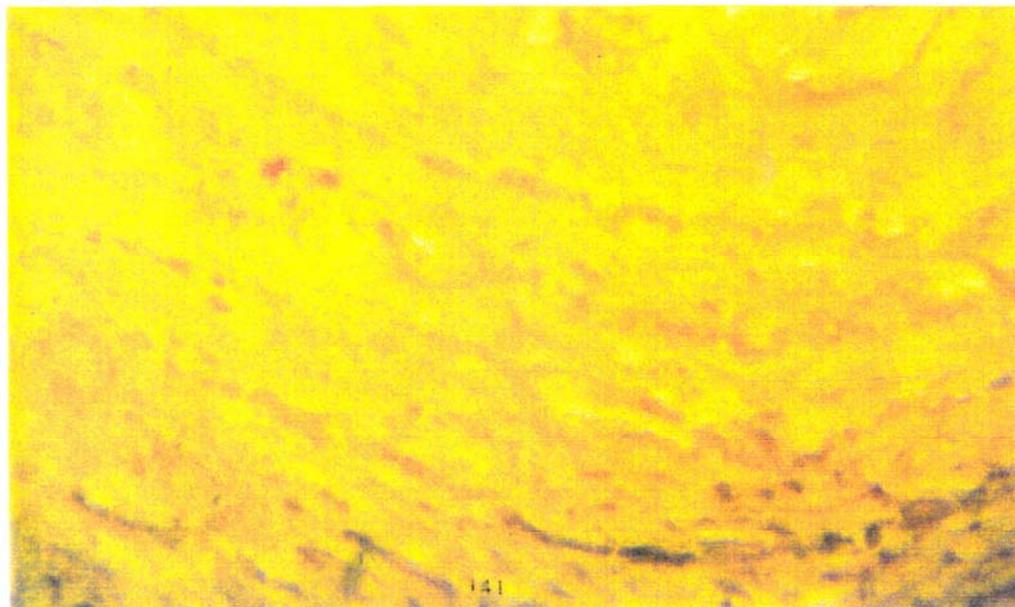


Figura 40: Detalle que ilustra de la disminución del marcaje de la PAFG en los animales diabéticos de seis semanas (B) y de los de doce semanas © con respecto a los animales sanos (A). La barra equivale a 27 micras.

Figura 40

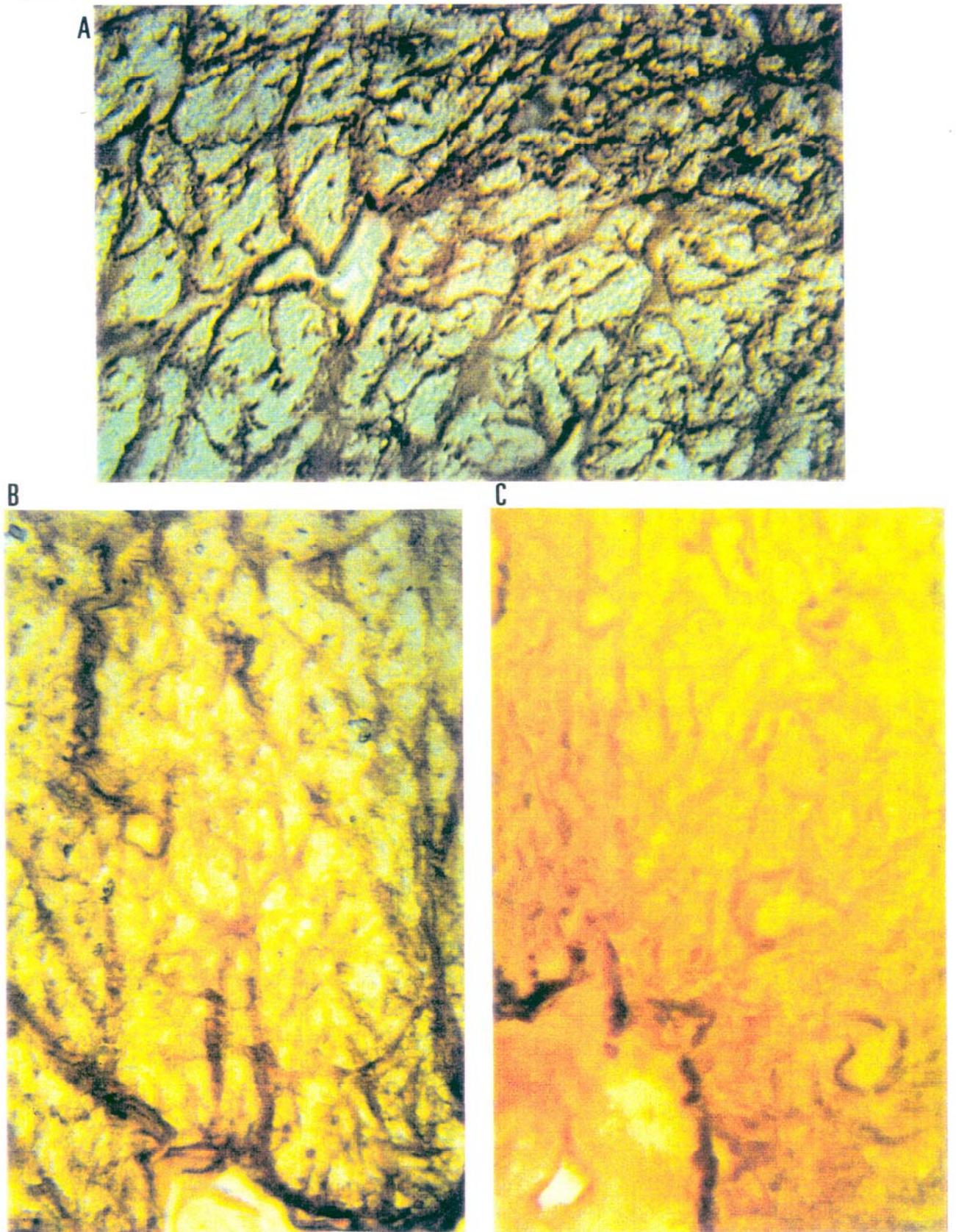


Figura 41: Astrocito (a) junto a oligodendrocito (o) en animal del grupo control de doce semanas. Se aprecia la diferencia de intensidad y disposición de la cromatina del núcleo así como el diferente tamaño del citoplasma celular.

La barra corresponde a 0,9 micras.

Figura 42 a: detalle del citoplasma de un astrocito de animal control de seis semanas. Se observan los orgánulos citoplasmáticos, gránulos densos (G), gotas lipídicas (L) y gran cantidad de neurofilamentos (F). La barra equivale a 0,5 micras.

En la **figura 42 b** se observa un astrocito (a) perteneciente a la parte periférica del nervio junto a las cubiertas menínges del mismo (m). La barra equivale a 2 micras.

Figura 43: Oligodendrocitos pertenecientes a animales controles de seis semanas. Se aprecia una célula más pequeña que los astrocitos pero con un núcleo más voluminosos y con cromatina más densa. En la figura b se presenta detalle del citoplasma donde destaca el aparato de Golgi (G) bien desarrollado, mitocondrias (m), neurotúbulos (t) y ribosomas abundantes (►). La barra equivale en la figura a: 1 micra y en la figura b: 0,4 micras.

Figura 41

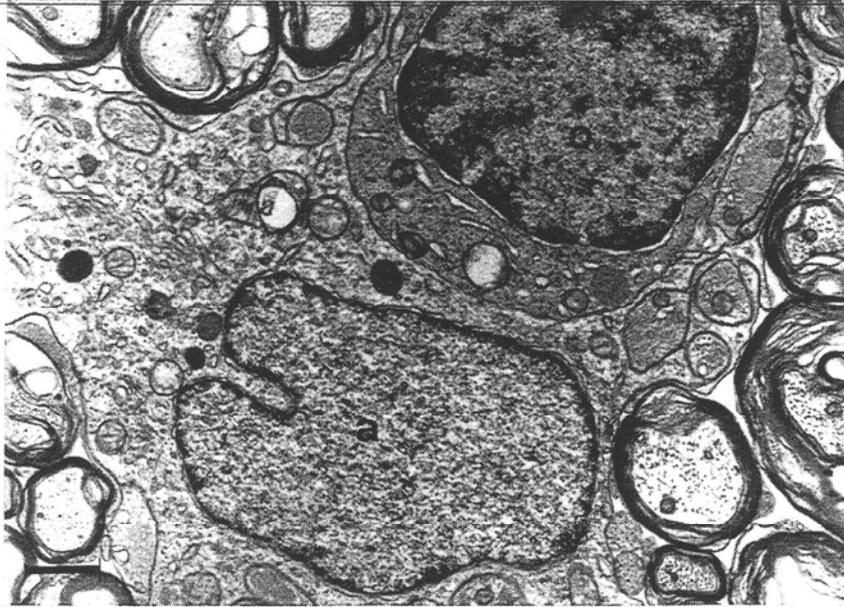


Figura 42a

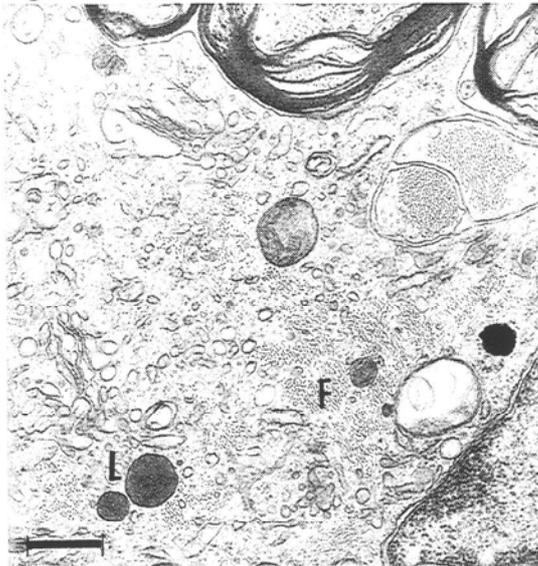


Figura 42b

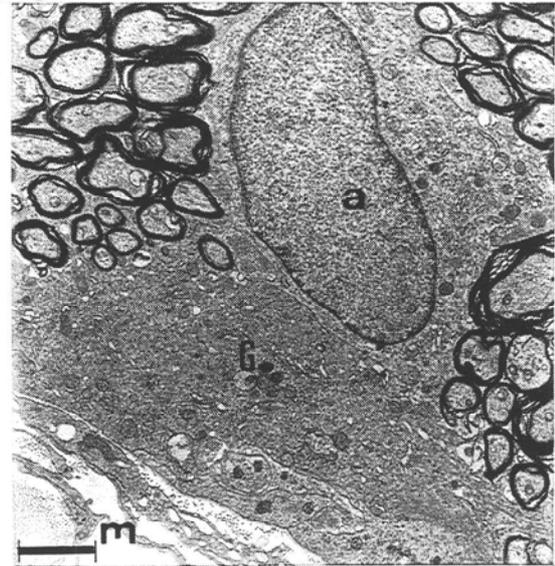


Figura 43a

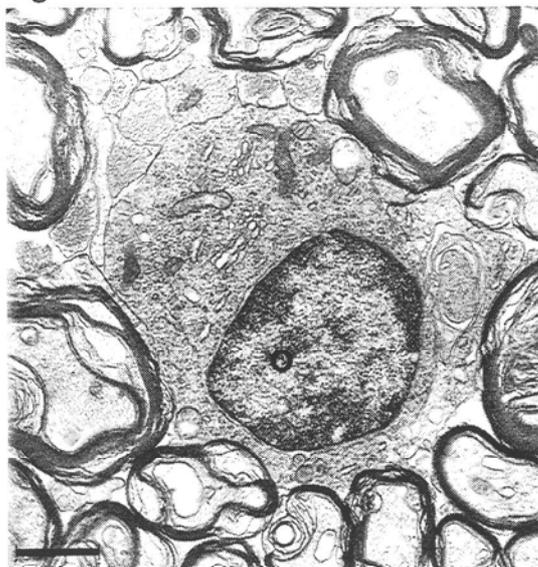


Figura 43b

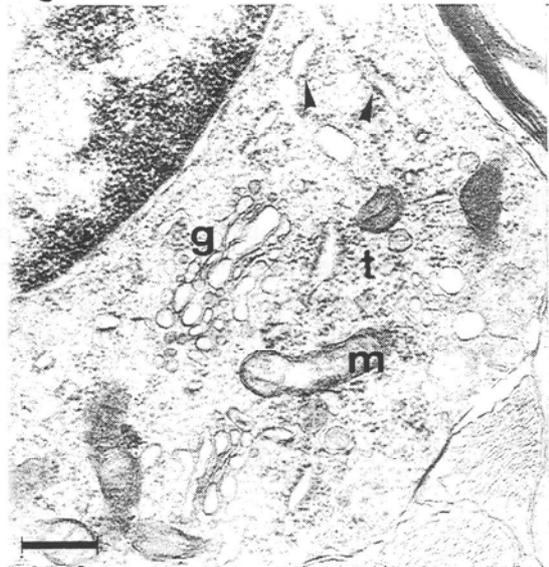


Figura 44: Oligodendrocitos pertenecientes a animales diabéticos de seis semanas de evolución. El aspecto del núcleo celular es aparentemente normal. En la figura b se observa un aparato de Golgi (g) y retículo endoplásmico (r) con sistemas algo dilatados y en la figura c se observan cuerpos lamelares (flechas) en su citoplasma. La barra corresponde en las figuras a y b a 0,9 micras y en la figura c a 0,4 micras.

Figura 44a

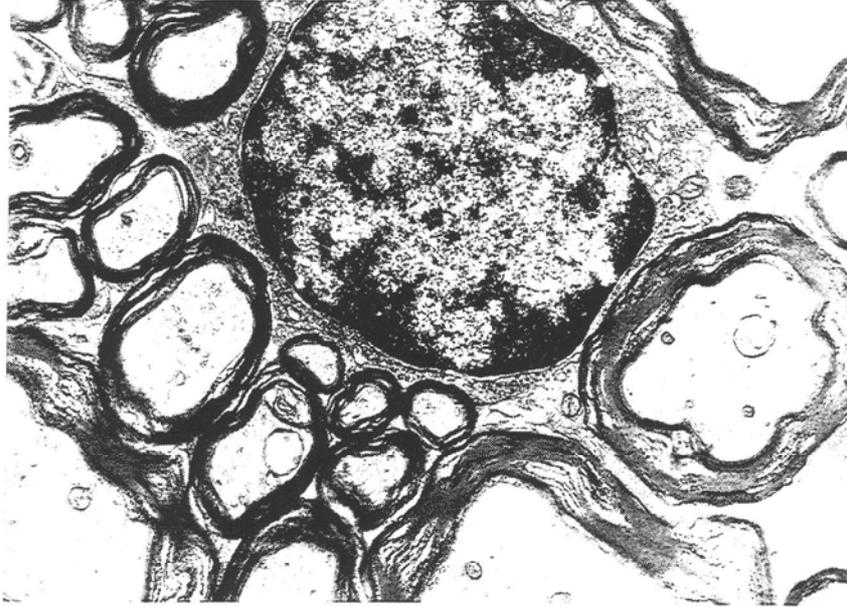


Figura 44b



Figura 44c

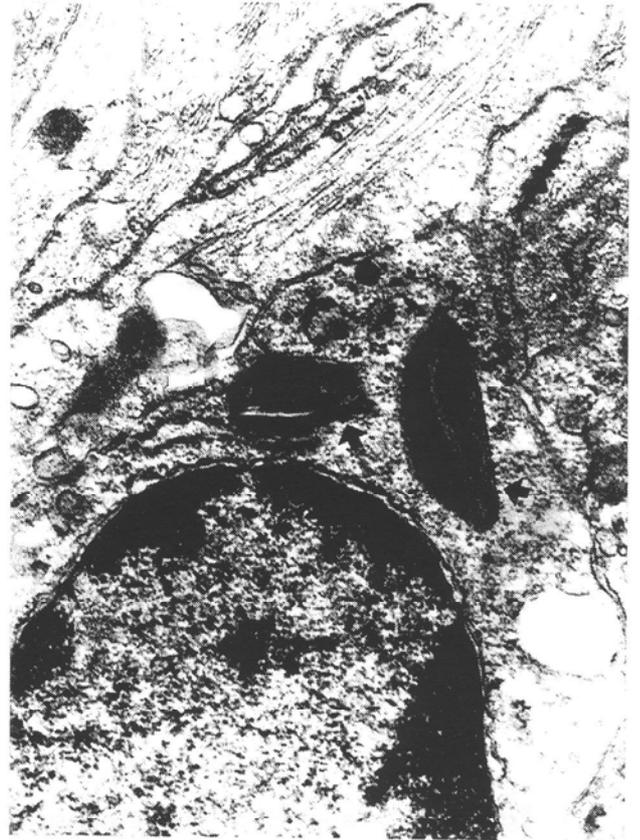


Figura 45: Detalles del citoplasma de astrocitos de animales diabéticos de seis semanas de evolución. Destaca la presencia de cisternas dilatadas (C) y abundantes gotas lipídicas (flechas). En la figura b se aprecia un centriolo perteneciente a un cilio (). La barra corresponde en la figura a: 0,55 micras y en la figura b: 0,30 micras.

Figura 45a

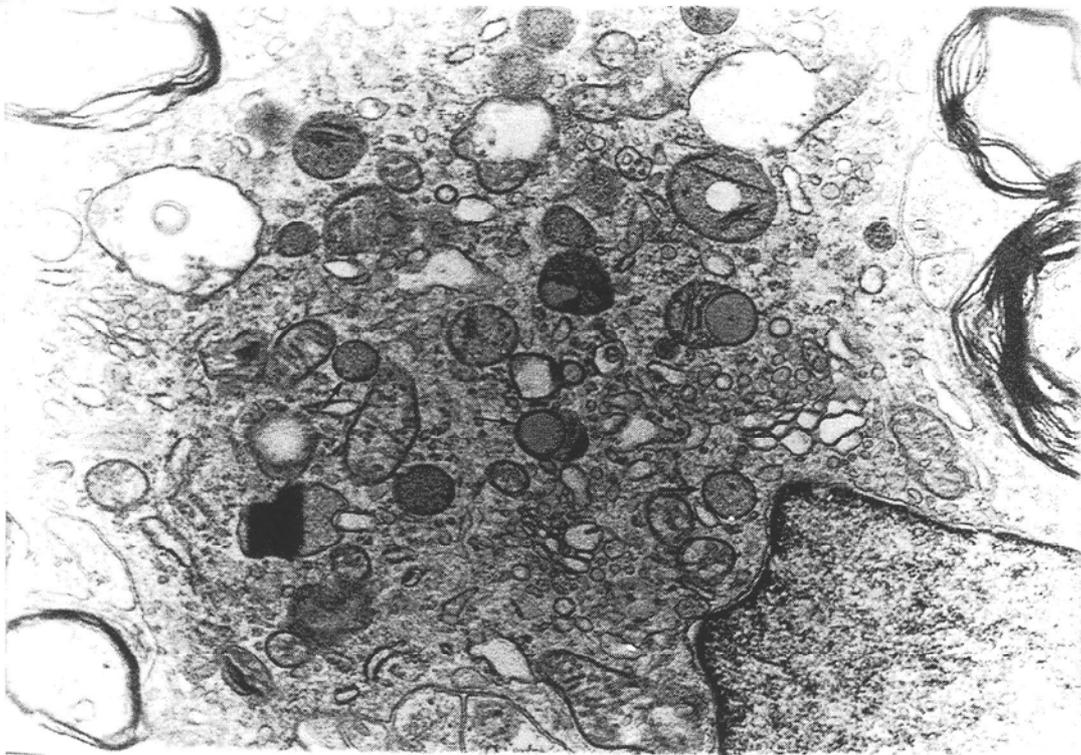


Figura 45b

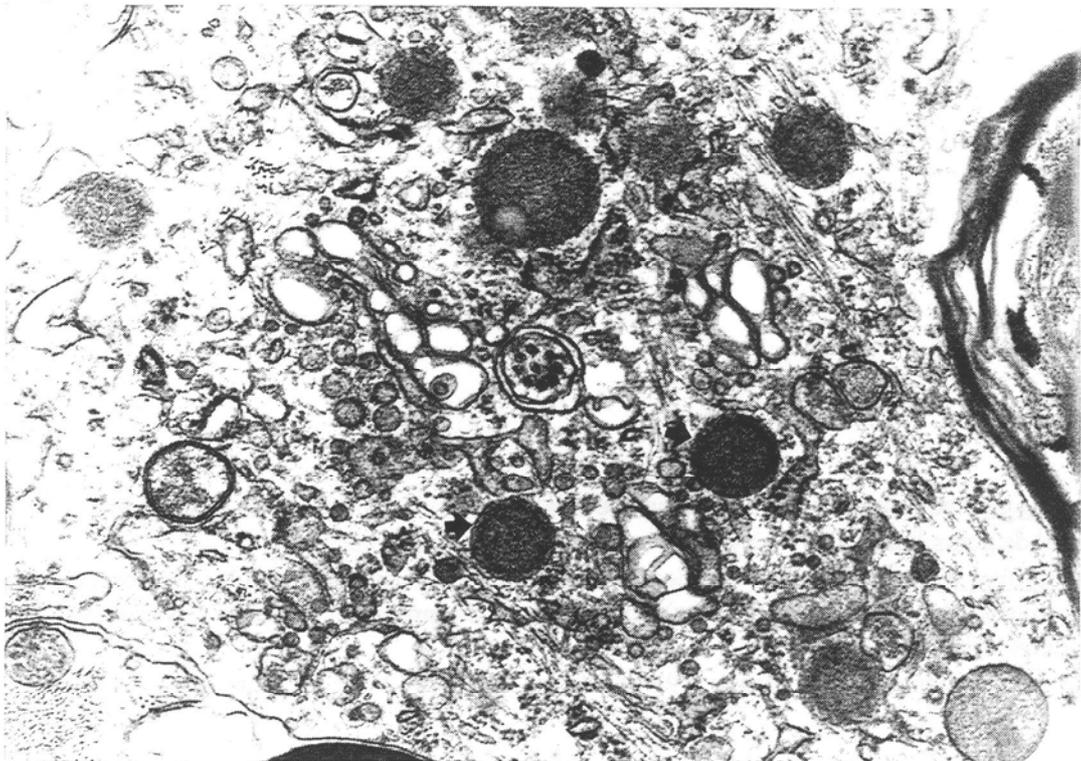


Figura 46 a: Astrocito de animal diabético de seis semanas de evolución. Se observa gran cantidad de gotas lipídicas () y cuerpos densos (d) en su citoplasma. En las **figuras b y c** se presentan detalles de citoplasmas del mismo tipo celular. Se observan los cuerpos densos (d) y lamelares (flechas). En la figura c se aprecia un centriolo © y cuerpos vesiculares (flechas). La barra corresponde en la figura a: 0,9 micras y en las figura b y c a: 0,3 micras.

Figura 46a

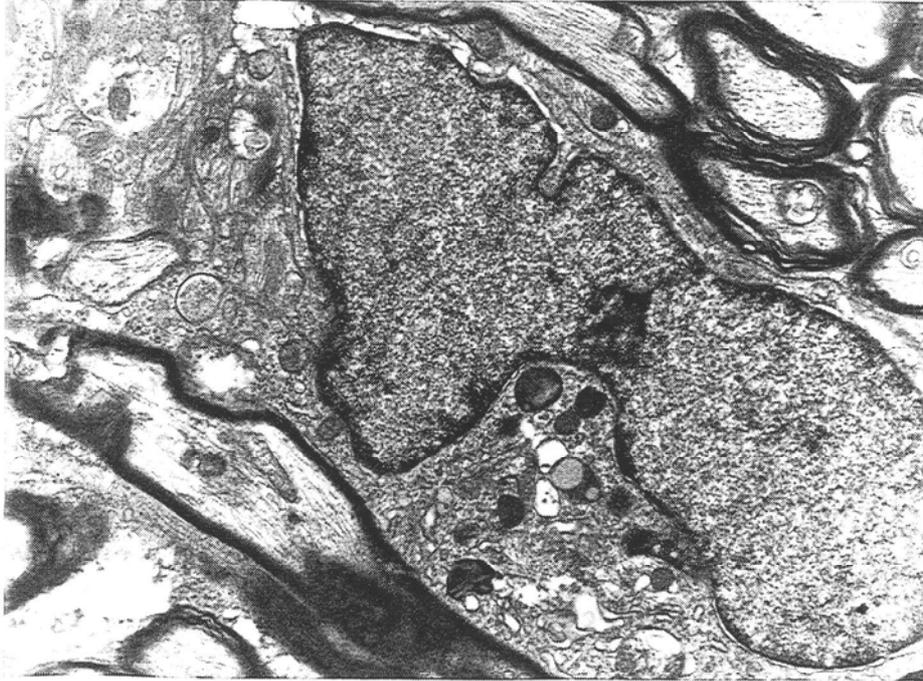


Figura 46b

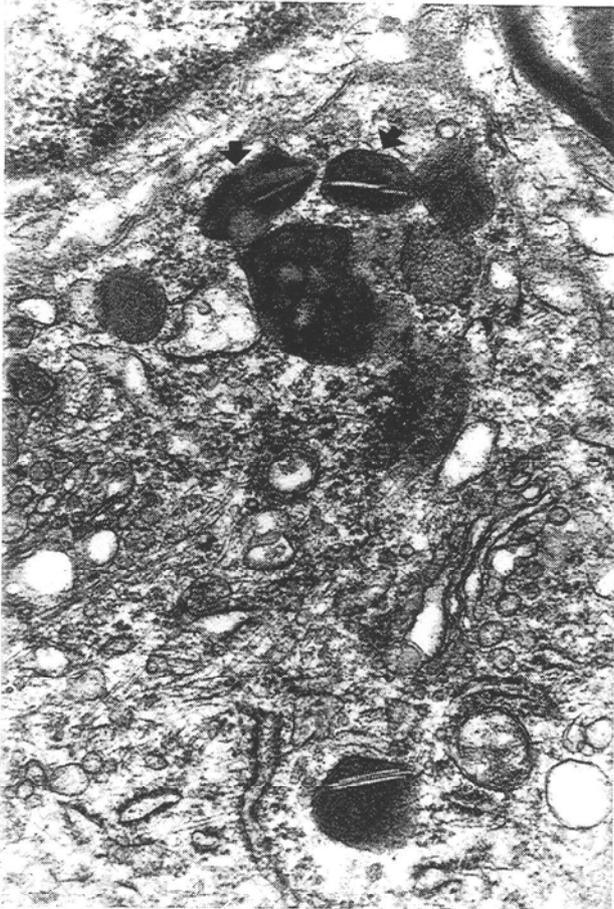
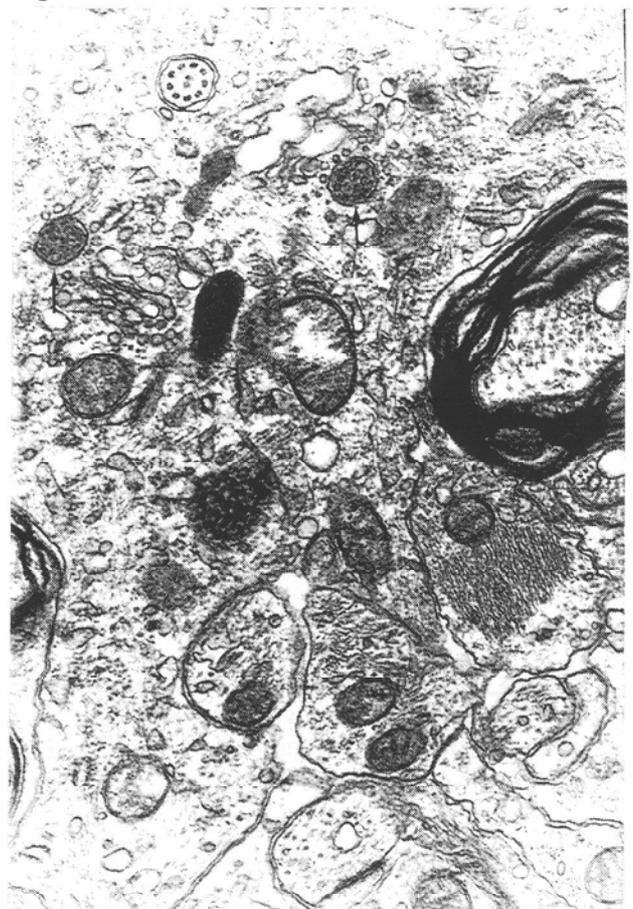
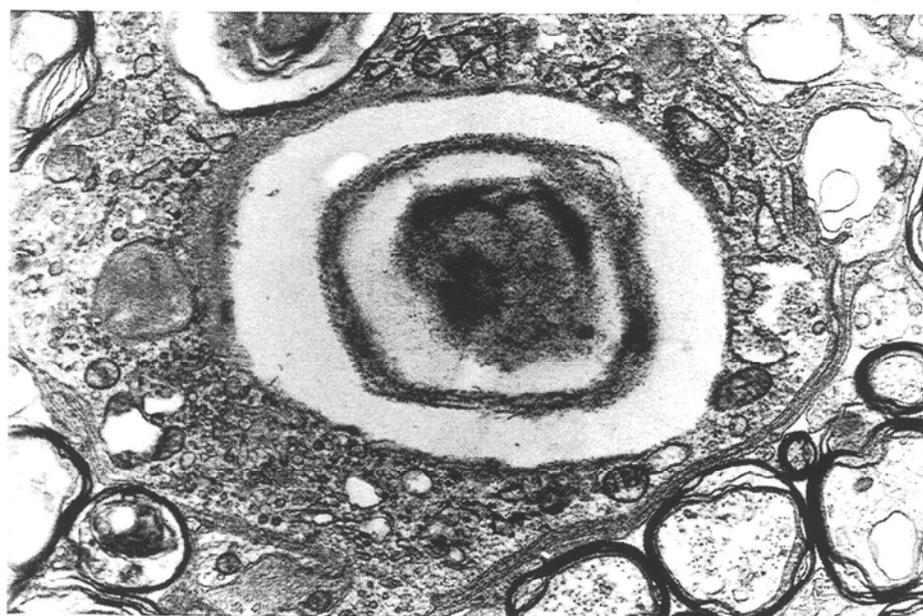
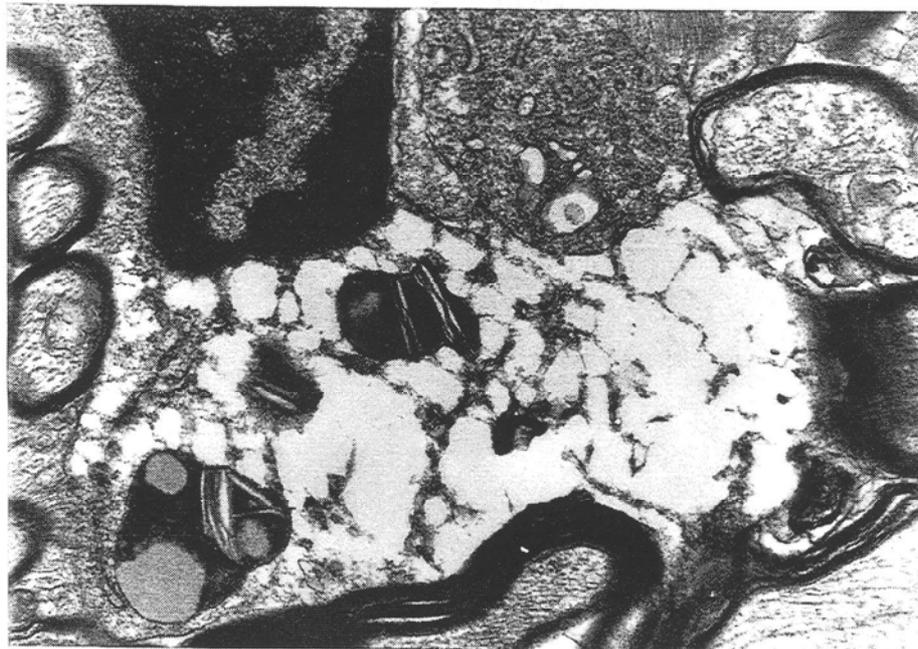


Figura 46c



Figuras 47 a y b: Imágenes de células gliales de nervios ópticos de animales diabéticos en las que se aprecian signos degenerativos de las mismas.
La barra equivale en la figura a: 0,55 micras y en la figura b: 0,70 micras.

Figura 47



5.-Discusión

DISCUSIÓN

El nervio óptico del animal diabético mostró diferencias con respecto al animal del grupo control. Estas diferencias se presentaron en los axones, las fibras, los vasos sanguíneos y en las células gliales.

Los animales del grupo control no presentaron en ningún momento del estudio niveles elevados de glucemia, su estado general fue bueno y fueron ganando peso a medida que transcurría el tiempo.

Obtenida el área de los nervios de los animales sanos nos encontramos con valores ligeramente superiores a los descritos en la literatura. Nuestro estudio comenzó con animales de dos meses de edad y se prolongó durante seis semanas para un grupo de ellos y durante doce semanas para el otro. Nuestros resultados en el primer grupo de animales sacrificados, con una edad de dos meses y seis semanas, demuestran un área del nervio óptico mayor que el descrito por N. Cuenca-Navarro en 1.989 y por Y. Fukuda en 1.982, y estos valores son aún mayores en los animales del segundo grupo, con una edad de dos meses y doce semanas.

El número de fibras por nervio tras seis semanas de control de los animales no diabéticos coincide con los descritos por Y. Fukuda y colaboradores en 1.982 para la rata albina de tres meses de edad, con los obtenidos por J. De Juan y colaboradores en la rata albina adulta en 1.978 y con los de R. Rhoades y colaboradores en el Golden Hámster de entre 5 y 8 meses de edad en 1.979.

Sin embargo en el grupo bajo control durante doce semanas nos encontramos con una aparente disminución en el número total de fibras del nervio óptico con respecto al grupo control de seis semanas.

El número total de fibras de cada nervio óptico se calculó mediante el método utilizado por la mayoría de los autores (De Juan J. y col.'78, Fukuda Y. et al.'82, Hokoç J and Oswaldo-Cruz e.'78 y Rhoades R. et al.'79). Este valor se calcula a partir de la media del número de fibras presentes en cada uno de los campos axonales que se seleccionaron de cada nervio. Estos campos axonales fotografiados tienen un área constante para todos los animales y con la media de fibras de los campos axonales y el área de cada nervio se calculó el número total de fibras del mismo.

Como veremos más adelante creemos que los animales sanos tras doce semanas de control presentan una mayor proporción de fibras grandes que a las seis semanas. Por tanto es lógico pensar que en un mismo área caben menos fibras si éstas son de mayor tamaño y al hacer el cálculo para el área total del nervio, el número total de fibras obtenido es menor.

Resumiendo creemos que no se produce un cambio significativo en el número de fibras de los animales sanos con el paso del tiempo.

La mayoría de las fibras son fibras pequeñas, menores de 0.7 micras de diámetro, que se pierden en los estudios realizados con microscopía óptica, lo cual puede justificar las diferencias encontradas con otros autores acerca del número total de fibras del nervio óptico.

Según los estudio de J. De Juan y colaboradores en 1.978 realizados con microscopía electrónica sobre nervio óptico de rata los valores de los diámetros axonales varían entre 0.3 y 5 micras. Nuestros valores a los dos meses y seis semanas coinciden plenamente con los suyos aunque hemos

encontrado alguna fibra aislada con un valor ligeramente superior a las cinco micras de diámetro.

Hemos calculado el diámetro medio de los axones de cada nervio en ambos grupos de animales. El diámetro axonal medio a las seis semanas, que en nuestro estudio es de 1.2 micras, coincide con los resultados de R. Rhoades y colaboradores en 1.979 para el Golden Hámster adulto, pero es ligeramente superior al valor obtenido por J. De Juan para la rata albina en 1.978.

El animal sano de dos meses y doce semanas de edad presenta un valor medio de diámetro axonal superior al descrito en la bibliografía y es superior al encontrado por nosotros a los dos meses y seis semanas de control.

En cuanto al porcentaje de fibras sin mielinizar encontradas en los dos grupos de animales sanos, nuestros resultados son similares a los descritos por otros autores (Cuenca-Navarro N. y col.'89, Rhoades R. et al.'79). Los axones sin mielinizar suponen menos del 10% del total de fibras y se corresponden con los axones de menor tamaño, no encontrando axones medianos o grandes carentes de la cubierta mielínica. El porcentaje y tamaño de los axones sin mielinizar tampoco varía con la edad del individuo.

Hemos hecho una distribución de axones según su diámetro siguiendo los estudios de J. De Juan y colaboradores en 1.978. En ellos se describen tres tamaños axonales que se corresponden con fibras pequeñas, menores de 2 micras, fibras medianas, entre 2.1 y 3.5 micras y fibras grandes, mayores de 3.5 micras.

Al hacer dicha distribución de axones en los animales no diabéticos de nuestro estudio nos encontramos con que el grupo de animales de dos meses y seis semanas es el que presenta una proporción de fibras similar a la descrita por los autores. En ellos más del 90% de las fibras corresponden a fibras pequeñas, menos del 10% a fibras medianas y no llega a un 1% la proporción de fibras grandes.

Sin embargo en el grupo de animales bajo control durante dos meses y doce semanas nos encontramos con que esta proporción ha variado de una manera significativa. En este grupo ha disminuido algo la proporción de fibras pequeñas, ha aumentado ligeramente la de fibras medianas pero es más significativo el aumento de las fibras de mayor diámetro.

Está ampliamente descrito en la bibliografía que un parámetro que influye en una correcta propagación de la conducción eléctrica por la fibra nerviosa es la relación entre el diámetro axonal y el diámetro de la fibra, o Relación-G (G-ratio). Es aceptado por la mayoría de los autores que el valor ideal de esta G-ratio está entre 0.6 y 0.8 para cada fibra. En nuestro estudio el valor de la relación en los animales sanos se ha mantenido siempre dentro de estos valores, incluso cuando hemos distribuido las fibras según el diámetro axonal y en ambos periodos de tiempo.

En el estudio morfológico de las fibras nerviosas de los animales sanos no hemos encontrado alteraciones significativas en el citoplasma axonal ni en la cubierta mielina. El axoplasma presenta poca densidad electrónica y se observan organelas citoplásmicas sin variaciones en su número o morfología. La proporción de microtúbulos y de neurofilamentos no parece modificarse con la edad del individuo.

La cubierta mielínica aparece más o menos compacta y aumenta su grosor de manera proporcional al diámetro del axón pero sin modificarse su estructura.

Al recopilar todos estos datos hemos comprobado que los valores obtenidos en nuestro estudio de los animales sanos tras dos meses y seis semanas de control coinciden con los descritos por otros autores como parámetros de animales adultos. Sin embargo, vemos como al dejar transcurrir seis semanas más de estudio, hay parámetros, como el área del nervio óptico completo o la proporción de fibras gruesas en el mismo, que han aumentado en los animales sanos. Esto nos ha hecho pensar, por un lado que quizá a los dos meses la rata no deba ser considerada todavía como animal adulto ya que su peso ha seguido aumentando, así como el área transversal de su nervio óptico. Por otro lado, también ha aumentado el porcentaje de fibras de mayor tamaño, lo cual puede ser debido a que el animal no ha terminado de desarrollarse, o bien, que el diámetro de los axones de las fibras del nervio óptico continúan creciendo a lo largo de gran parte de la vida del individuo.

Simultáneamente hemos realizado los mismos estudios en los dos grupos de animales a los que se les indujo la diabetes y que se dejó evolucionar sin tratamiento durante diferente período de tiempo. En estos casos sí nos hemos encontrado con alteraciones significativas en los parámetros estudiados.

El estado general de los animales diabéticos se fue deteriorando a medida que transcurría el tiempo. Fueron perdiendo peso y en muchos de ellos se observaron signos de ceguera.

Al estudiar las secciones transversales de su nervio óptico y medir su área total nos encontramos con valores ligeramente inferiores a los obtenidos en los animales sanos y que pensamos están en relación directa con la disminución general de peso que presentaron los animales diabéticos. El área total del nervio óptico en los animales diabéticos no sólo no aumentó con el paso del tiempo sino que disminuyó con respecto a los grupos controles.

El número total de fibras del nervio, calculado con el método anteriormente explicado, no varía de manera significativa con respecto a los grupos control y tampoco varía según el tiempo de evolución de la enfermedad. Sin embargo, en el estudio morfológico de las fibras nerviosas de los nervios de los animales diabéticos sí nos encontramos con signos de muerte axonal. Esto nos haría pensar en una disminución del número total de fibras del nervio, pero o bien esta muerte axonal no es lo suficientemente significativa como para influir en el número total de fibras, o el método indirecto para el cálculo de las fibras sobrevalora el número de fibras al hacer el estudio en cortes donde el porcentaje de fibras pequeñas es mucho mayor que en los nervios donde el porcentaje de fibras pequeñas es menor.

En el diámetro medio de los axones de estas fibras sí encontramos una ligera disminución del mismo en los animales diabéticos con respecto a los grupos control. Sin embargo aún siendo estos valores menores que en los grupos control hemos comprobado que el diámetro medio de los axones en

el animal diabético de más edad sigue siendo mayor que en el animal diabético de menos edad.

Al hacer la distribución de fibras según su diámetro axonal nos encontramos con que en los animales de los grupos diabéticos existe una menor proporción de fibras grandes con respecto a los grupos de animales sanos, siendo esta disminución mucho más manifiesta en el grupo de animales diabéticos de más tiempo de evolución. Estos datos coinciden con los de A. Sima y colaboradores realizados en ratas BB/W que también encuentran una desviación de los porcentajes de fibras hacia el grupo de fibras de menor tamaño con disminución de las fibras grandes. Ellos relacionan esta disminución en el diámetro medio de los axones con las alteraciones en los Potenciales Evocados Visuales demostrados en animales diabéticos.

Esto puede interpretarse de dos formas diferentes. Por un lado podemos pensar que si a los dos meses de edad, según los resultados de los grupos control, el crecimiento de los axones sigue produciéndose, puede ser que en los animales diabéticos este crecimiento no se produce o se produce más lentamente que en los animales sanos. Esto haría que aumentase el porcentaje de fibras pequeñas y medianas pero que éstas no crecieran hasta alcanzar el tamaño de fibras grandes.

A favor de ésto tenemos que en el grupo de animales diabéticos de más edad existe una muy ligera mayor proporción de fibras gruesas que en los diabéticos de seis semanas, lo cual quiere decir que, aunque menor que en los controles, se produce cierto crecimiento de las fibras.

Por otro lado en el estudio morfológico de las secciones transversales del nervio óptico de animales diabéticos hemos encontrado axones grandes

con claros signos degenerativos, en lo que podrían ser diferentes estados previos a la desaparición del axón, así como restos de mielina sin la presencia de axón en su interior, lo que puede hacer pensar que ese axón ha degenerado y muerto. En estos casos siempre que aparecen restos mielínicos vacíos corresponden a cubiertas mielínicas grandes que se relacionan con las fibras de mayor tamaño.

Estos restos mielínicos no aparecen en ninguno de los campos axonales de los animales sanos, lo que puede hacer pensar que con el estado diabético se produce una muerte de fibras nerviosas, sobre todo de las de mayor tamaño.

Podemos concluir que con la diabetes se produce una disminución del porcentaje de fibras grandes en el nervio óptico y que esa disminución puede ser debida a un retraso en el crecimiento de las mismas, a una muerte de las fibras de mayor tamaño o, lo que creemos más factible, a ambos procesos a la vez.

Los estudios electrofisiológicos realizados en individuos diabéticos han demostrado un retraso en la conducción nerviosa de los mismos. A nivel ocular se constata un retraso en el reflejo fotomotor pupilar. Por fisiología neurológica sabemos que la velocidad de conducción del impulso nervioso por una determinada fibra viene dado, entre otros parámetros, principalmente por el diámetro de su axón. Si en los sujetos diabéticos se produce una disminución de fibras de mayor tamaño, bien por falta de crecimiento de ellas o por muerte de las mismas, podemos justificar ese retraso en la conducción nerviosa del reflejo fotomotor, que según los estudios de Noback y colaboradores (1.993) está conducido por las células ganglionares de mayor tamaño.

Por otro lado, recientes estudios sobre pequeñas alteraciones del campo visual de enfermos diabéticos que no se justifican por lesiones en la retina de los mismos como pueden ser edema, hemorragias o exudados, podrían quedar justificados por muerte de fibras grandes procedentes de células ganglionares grandes que pueden abarcar zonas relativamente importantes del campo visual.

En las secciones transversales de los nervios ópticos se hizo un estudio del número total de vasos de los mismos. Los valores son similares entre los dos grupos de animales controles, visualizándose una media de 42 vasos por nervio en cada uno de los grupos. Estos datos no coinciden con los obtenidos por J. Fernández Vigo y colaboradores en 1.994, ya que ellos encuentran un número de vasos menor, con un promedio de 19 vasos por nervio en animales sanos.

En los animales controles los vasos presentaron unas luces vasculares amplias y regulares. En ningún caso se observaron signos de tendencia al cierre de las mismas.

El endotelio presentó un aspecto regular y de espesor en general pequeño. Todos los vasos observados fueron de endotelio continuo y, al medir su grosor, el valor fue similar para los dos grupos de animales sanos, sin variar su valor según el tiempo de evolución del control.

La mayoría de los vasos presentó algún pericito de características similares a las descritas en la bibliografía.

Al estudiar la lámina basal de estos vasos hemos tomado como medida de referencia el valor de la lámina densa por considerarlo el valor

más fiable a la hora de medirla. En este caso nos hemos encontrado con que el valor de la misma en los animales de más edad, dos meses y doce semanas, es claramente superior al valor obtenido en los animales de menor edad, dos meses y seis semanas. Esto está en concordancia con lo descrito en la bibliografía sobre el engrosamiento de la lámina basal que se produce con la edad del individuo (Vracko R. and Benditt E. '70) y demostrado por Ashworth y Erdmann en 1.960 en el glomérulo renal.

En nuestro estudio se confirma la existencia en el nervio óptico de capilares de endotelio continuo, con uniones estrechas entre ellos, rodeados por una membrana basal fina y continua que a su vez se encuentra envuelta por prolongaciones de la glía fibrosa que, unidas entre sí, forman un anillo a su alrededor. Existen prolongaciones de la lámina basal entre los elementos de la glía circundante. Estos elementos forman la estructura de la barrera hematoencefálica descrita a este nivel

Para estudiar la integridad de dicha barrera hematoencefálica realizamos las técnicas de Schiff para detectar material PAS-D positivo a su alrededor y la determinación por inmunofluorescencia de albúmina en la periferia de los vasos.

La reacción de Schiff para detectar material PAS positivo es utilizada para teñir una variedad de componentes que contienen carbohidratos tanto en el interior de la célula como en la matriz extracelular. Incluye glucógeno, glicoproteínas, glicolípidos, esfingolípidos y algunos proteoglicanos (Culling CFA, '74).

Utilizando la técnica modificada con Dimedona (5,5-dimethyl-1,3-cyclohexanedione) se mejora la selectividad de la reacción PAS al bloquear los azúcares que experimentan oxidaciones mínimas por efecto del tratamiento.

De esta forma se tiñen glucógeno, algunas glucoproteínas y algunos glucolípidos.

El mecanismo de producción de material PAS-D positivo en las células o alrededor de los vasos es desconocido pero se ha relacionado con lesiones del sistema nervioso donde se ha producido rotura o alteración de la barrera hematoencefálica (Bennett S. et al. '95).

En el caso de los animales de los grupos control no observamos en ningún momento depósito de material PAS-D positivo en los alrededores de los vasos del nervio óptico.

Con la misma intención realizamos la determinación de albúmina en el nervio óptico de los animales controles. La albúmina es una proteína de bajo peso molecular y que, en condiciones normales, no debe presentarse fuera del torrente circulatorio. Mediante inmunofluorescencia vemos cómo en los animales de los grupos controles no se detecta albúmina en la periferia de los vasos.

Por la tanto, a nivel vascular observamos que con la edad del individuo no se producen cambios significativos en el sistema vascular del nervio óptico. La arquitectura vascular se mantiene, no varía el número de vasos o el área de las luces vasculares y sí se produce un engrosamiento de la lámina basal a medida que envejece el sujeto, sin producirse alteración en su función de barrera entre la luz vascular y el tejido nervioso.

En cuanto al estudio del sistema vascular de los animales diabéticos nos encontramos con una ligera disminución en el número de vasos del nervio óptico. Esta disminución es más marcada en el grupo de animales de diabetes de más tiempo de evolución lo que iría en contra de los resultados

obtenidos por Fdez.-Vigo y colaboradores en 1.994. Ellos encuentran un aumento significativo en el número de vasos de los nervio ópticos de animales diabéticos, con un promedio de $25,6 \pm 6,15$ vasos en cada uno, número que sigue siendo menor al encontrado por nosotros. Así y todo, pensamos que no se debe a una desaparición real de los vasos sanguíneos sino que este menor número se debe al grado de colapso de las luces vasculares que se observó en este grupo de animales y que pudo hacer que a la hora de contarlos con microscopía óptica no se contaran aquellos vasos cuyas luces habían desaparecido.

Este colapso de la luz vascular es más aparente a nivel venular que capilar. De hecho hemos observado dos formas de producirse ese colapso. Por un lado vemos vasos, generalmente capilares, en los que se observa una protusión del endotelio, sobre todo de su núcleo, o de un pericito hacia la luz vascular. Esta luz parece ir desapareciendo por ocupación de la misma por el núcleo de la célula endotelial. En otros casos, generalmente en vénulas, las paredes del vaso se unen entre sí manteniendo su perímetro inicial pero haciendo que desaparezca el espacio entre ellas.

Esta disminución en la luz vascular que se aprecia en los vasos del nervio óptico de los animales diabéticos ha sido ya descrita por otros autores (Fdez.-Vigo y col'94).

En el estudio morfológico de la célula endotelial encontramos signos degenerativos de la misma que coinciden plenamente con los encontrados por Mathieu-Costello y colaboradores en 1.995 y por Benstead T. y colaboradores en 1.990 en la células endoteliales de capilares de animales sanos sometidos a diferentes períodos de isquemia. Estos autores encuentran un aumento en el grosor de la célula endotelial y de la lámina

basal con una disminución en el área de la luz vascular y aumento significativo en la presencia de gotas lipídicas en el citoplasma de la célula endotelial.

De manera similar en los vasos de los animales diabéticos nosotros encontramos un engrosamiento significativo de la célula endotelial que además es más acentuado en los animales con diabetes de más tiempo de evolución. De igual forma la lámina basal de los vasos de los animales diabéticos muestran un aumento de grosor estadísticamente significativo. En los estudios de A. Sima en 1.992 sobre ratas diabéticas tratadas con insulina se describe un engrosamiento de la lámina basal de aproximadamente un 30% con respecto a animales sanos. Estos datos coinciden plenamente con los nuestros, siendo además un engrosamiento que aumenta con el tiempo de evolución de la diabetes. Según los estudios de Vracko en 1.970 el engrosamiento de la lámina basal se produce por episodios de muerte y regeneración de la célula endotelial, en los que una nueva célula regenerada “fabrica” una nueva lámina basal que se superpone a la anterior. En estos casos ellos observan la presencia de restos del citoplasma de la célula endotelial muerta entre lamelas de la lámina basal. Nosotros hemos constatado signos de afectación del endotelio en los animales diabéticos pero en ningún caso indicios de que se haya producido muerte de la célula. Este engrosamiento de la lámina basal también se ha relacionado con la glicosilación no enzimática de sus proteínas que daría lugar a una disfunción de la misma (Browlee y col. '84 y Kreisberg '92).

Sawada G. y colaboradores en 1.986 describen también un engrosamiento de la lámina basal en vasos de músculo esquelético de animales genéticamente diabéticos y que este engrosamiento está en relación

directa con los niveles de glucemia. En nuestro estudio pensamos que el engrosamiento de la lámina basal está más en relación con el tiempo de evolución de la enfermedad que con los niveles de glucemia alcanzados, dado que los animales presentaron en todo momento niveles similares de glucemia y la única variación entre los grupos fue el tiempo de evolución de la diabetes.

La realización de la técnica de Schiff permite demostrar que, a diferencia de los animales de los grupos control, los animales diabéticos presentan depósito de material PAS-D positivo alrededor de los vasos, que comienza a manifestarse en los animales diabéticos de seis semanas de evolución y aumenta en los de doce semanas. Este mismo depósito ha sido demostrado en el ser humano por T. Bek y T. Ledet en 1.996 alrededor de los vasos retinianos de sujetos diabéticos.

Al hacer la determinación de albúmina en las secciones de nervio óptico de los animales diabéticos nos encontramos la presencia de la misma alrededor de algunos de los vasos. Como se ha indicado anteriormente, la albúmina es una proteína del suero sanguíneo que no debe presentarse en el espacio extravascular. La presencia de dicha proteína en los alrededores de los vasos de los animales diabéticos es un signo más de alteración en la función de la barrera hematoencefálica por el estado diabético.

En el estudio del componente celular de los nervios ópticos de los animales sanos nos encontramos fundamentalmente con células macrogliales. Astrocitos y oligodendrocitos presentan las características celulares descritas en la literatura y no encontramos diferencias significativas con los demás autores. Los astrocitos se presentan como

células estrelladas con sus ramificaciones separando grupos de fibras nerviosas y rodeando los vasos sanguíneos en forma de pies terminales. Su núcleo es electrónicamente claro y en su citoplasma se visualizan organelas y gran cantidad de filamentos característicos de estos elementos celulares maduros.

Los oligodendrocitos se presentan como células más pequeñas que los astrocitos, con núcleo más electrodenso y con menos cantidad de prolongaciones celulares. Presentan un retículo endoplásmico y un aparato de Golgi más desarrollados así como abundantes ribosomas. Los filamentos son menos abundantes pero destacan más los microtúbulos.

La disposición de las células es diferente según la zona del nervio a estudiar pero vemos que esta disposición no se modifica en los diferentes grupos. En la zona más anterior del nervio la glía dibuja el trayecto de entrada de la arteria central de la retina y sus ramificaciones. A medida que nos acercamos al quiasma óptico y el nervio óptico se hace más ovalado, las células gliales parecen marcar la diferencia entre los fascículos de fibras y adaptarse a la disposición de la glía en el quiasma óptico.

Al hacer la determinación de material PAS-D positivo en las células del nervio óptico intentamos relacionar el estado diabético con alteraciones degenerativas del sistema nervioso. La etiología de estos depósitos es desconocida pero en la literatura se ha relacionado la presencia de depósitos de material PAS-D positivo con enfermedades degenerativas del sistema nervioso como son el Alzheimer, Parkinson, etc. (Forno L. and Langston J. '93, Kobayashi K. et al. '92, Mann D. et al. '87).

Desde el punto de vista de microscopía óptica, y de acuerdo con las descripciones morfológicas de Smart y Leblond, se aprecia material PAS-D positivo en oligodendrocitos de sujetos sanos.

A medida que transcurre el tiempo de padecimiento de la diabetes vemos cómo también se va depositando en otras células con núcleos más claros, que son astrocitos, y que no se habían teñido en los sujetos sanos.

Para Determinar las características del componente astrogial y detectar la posible presencia de astrocitos reactivos, utilizamos la determinación de la Proteína Ácida Fibrilar Glial. Esta proteína se localiza en los filamentos de los astrocitos, es fácilmente detectable por inmunohistoquímica y el aumento de la misma es característico de la presencia de astrocitos reactivos (Penkowa M. y Moos T. '95).

Nosotros detectamos una disminución de la PAFG en los animales diabéticos con respecto a los animales sanos. Del mismo modo que detectamos una disminución de la misma según avanza el tiempo de evolución de la diabetes. Esto nos hace pensar que, o bien no hay una reacción glial o que si ésta se presenta, la proteína está alterada y no se detecta por esta técnica inmunohistoquímica. Hemos de recordar que en la diabetes se produce una glicosilación no enzimática de las proteínas y esto puede, de alguna manera, alterar su función.

Por otro lado en los estudios estructurales y ultraestructurales no hemos observado una aparente disminución del componente astrogial ni de sus neurofilamentos.

En el estudio ultraestructural del componente celular sí se han detectado alteraciones citoplasmáticas en las células de los animales diabéticos. Entre ellas destacan el aumento del número de gotas lipídicas

que, si bien están presentes en los sujetos sanos, hay un aumento considerable de su número en los animales diabéticos. También detectamos un aumento en los cuerpos lamelares en el citoplasma de los astrocitos y más marcado en el de los oligodendrocitos. Este aumento en la presencia de cuerpos lamelares en el citoplasma de las células gliales nos indica un proceso degenerativo de las mismas como consecuencia del estado diabético, habiéndose descrito recientemente (Guille y col. 1.995) la presencia de cuerpos lamelares en las células gliales con depósitos de material PAS-D positivos en un sujeto con graves lesiones degenerativas del sistema nervioso.

Si podemos extrapolar estos resultados, con las reservas que ello conlleva, al ser humano podemos encontrarnos con que se pueden justificar algunos de los hallazgos más frecuentes en la clínica diaria del enfermo diabético.

Vemos como existe algún tipo de alteración en todos los componentes estructurales del nervio óptico.

Por un lado nos encontramos con una disminución en el número de fibras grandes en los sujetos diabéticos con respecto a los sanos. Ya hemos indicado que creemos que se produce por un enlentecimiento en el crecimiento de las fibras, pero que también se produce por muerte de esos axones de mayor tamaño. Con ello podemos justificar el retraso en la transmisión de los Potenciales Evocados Visuales que se observa en los enfermos diabéticos sin otra sintomatología visual o neurológica. Así mismo, podríamos entender el enlentecimiento en el reflejo pupilar a la luz que se

constata también en los diabéticos, así como pequeñas alteraciones del campo visual, sin lesión retiniana que las justifique, descritas recientemente.

No podemos descartar que este retraso de crecimiento y muerte axonal se produzca por daño directo de la hiperglucemia, o sus consecuencias metabólicas, sobre la fibra nerviosa pero casi todo indica a que ese deterioro se produce por hipoxia como consecuencia del daño en el sistema vascular.

Por otro lado, sí parece claro que se produce una microangiopatía con, aparentemente, las mismas características que la que se produce en la retina y en el riñón del diabético. Esta microangiopatía con un componente isquémico marcado y una falta en su función de barrera sí puede justificar las alteraciones estructurales que observamos en las fibras nerviosas y en las células gliales. Así mismo encontramos una razón para la alta incidencia de neuropatía óptica isquémica que se presenta en los enfermos diabéticos. Sabemos que los procesos isquémicos del nervio óptico se presentan también en los sujetos sanos pero que la incidencia aumenta significativamente en presencia de la enfermedad. Hemos comprobado que en los sujetos diabéticos se produce un terreno vascular alterado idóneo para que una mínima descompensación conlleve a un proceso isquémico del tejido nervioso.

Resumiendo, creemos que el daño principal se produce a nivel vascular, produciéndose una microangiopatía clara y manifiesta, sin descartar un posible daño directo sobre las células gliales y las fibras nerviosas.

6.-Conclusiones

Tras la realización de esta investigación podemos concluir que:

A) En los animales sanos:

1.-Entre los tres meses y medio y los cinco meses se produce un crecimiento de las fibras que componen el nervio óptico, con un aumento del porcentaje de fibras grandes y el consiguiente aumento del área total del nervio.

2.-Se produce un aumento de grosor de la lámina basal de los vasos del nervio óptico con la edad del individuo.

b) Con el estado diabético:

3.-Disminuye el porcentaje de fibras grandes por enlentecimiento en el crecimiento normal de las mismas y por muerte de algunas fibras del grupo de mayor tamaño.

4.-No se altera la razón-G de las fibras como consecuencia de la enfermedad, manteniéndose la proporción entre el diámetro del axón y el diámetro de la fibra completa.

5.-Se produce un engrosamiento de las células endoteliales de los vasos del nervio óptico y que aumenta con el tiempo de evolución de la enfermedad.

6.- Se produce un engrosamiento de la lámina basal independiente del que se produce con la edad del sujeto y que no aumenta con el tiempo de evolución de la diabetes.

7.-Existe un colapso vascular manifiesto a las doce semanas de evolución de la enfermedad.

8.-Se produce una alteración en la permeabilidad de la barrera hemato-encefálica manifestado por la presencia de material PAS-D positivo y albúmina en la periferia de los vasos sanguíneos.

9.- Disminuye la manifestación de la Proteína Ácida Fibrilar Glial.

10.-Aparecen procesos degenerativos de las células gliales demostrados mediante estudio ultraestructural y la presencia de depósito de material PAS-D positivo en el interior de las mismas.

7.-Bibliografia

BIBLIOGRAFIA

- Apaydin C., Oguz Y., Agar A., Yargicoglu P., Demir N., Aksu G. 1.993.**
Visual evoked potentials and optic nerve histopathology in normal and diabetic rats and effect of ginkgo biloba extract.
Acta-Ophthalmol-Copenh. 71(5):623-8.
- Ascaso J.F. 1.986.**
Patogenia de la Diabetes Mellitus tipo II.
Tratado de Medicina Interna, 4ª Edición, De. Doyma.
- Ashworth C., Erdman R. 1.960.**
Age changes in the renal basement membrane in rats.
Amer. J. Pathol. 36: 165.
- Balazsi A., Rootman J., Drance S. M., Schulzer M., Douglas G. R. 1.984.**
The effect of age on the nerve fiber population of the human optic nerve.
Am. Journal of Ophthalmology. Vol. 97 N6.
- Barbosa J. 1.986**
Inmunogenética de la Diabetes Mellitus.
Tratado de Medicina Interna, 4ª Edición, Ed. Doyma.
- Baxter M.A. 1.991.**
Role of myo-inositol in the pathogenesis of diabetic complications.
T.E.M. Vol 2 N° 5.
- Bek T., Ledet T. 1.996.**
Vascular occlusion in diabetic retinopathy.
Acta Ophthalmologica Scandinavica. 74:36-40.
- Bennett S., Stevenson B., Staines W., Roberts D. 1.995.**
Periodic acid-Schiff(PAS)-positive deposits in brain following kainic acid-induced seizures: relationships to fos induction, neuronal necrosis, reactive gliosis, and blood-brain barrier breakdown.
Acta Neuropathol 89: 126-138.
- Benstead T., Sangalang V., Dyck P. 1.990.**
Acute endothelial swelling is induced in endoneurial microvessels by ischemia.
Journal of the Neurological Science.99: 37-49.
- Berliner M.L. 1.933.**
Citologic studies on the retina I. Normal coexistence of oligodendroglia and myelinated nerve fibers.
Arch.Ophthalmol. 6:740-751.

Bertram B. Reim H. Reim M. 1.995.

Bilateral posterior ischemic optic neuritis in an adolescent with diabetes mellitus with decompensated blood glucose homeostasis.

Klin Monatsbl Augenheilkd. Jan 206 (1).p 39-45.

Bignami A. 1.991.

Discussions in neuroscience. Vol VIII. Nº1.

De. Pierre J. Magistretti.

Black J.A. 1.983.

Freeze-fracture ultrastructure of developing and adult non-myelinated ganglion cell axolemma in the retinal nerve fiber layer.

J. Neurol 12:201-212.

Bloom A.L. 1.990.

The role of the endothelium in the regulation of haemostasis.

Molinatti G., Bar R., Belfiore F. Porta M. (eds): Endothelial Cell function in diabetic microangiopathy: Problems and clinical aspects.

Front diabetes. Basel, Karger, vol 9 p139-155.

Bouchet A. and Cuilleret J. 1.978.

Anatomía descriptiva. Topográfica y funcional. 7ª edición.

De. Panamericana.

Brancato R., Menchini U., Bandello F.M. 1.986.

Diabetic Papillopathy: Fluorangiography aspects.

Metab. Pediatr. Syst Ophthalmol. 9/2-4: 57-61.

Brownlee M., Vlassara H., Cerami A. 1.984.

Nonenzymatic glycosylation and the pathogenesis of diabetic complications.

Annals of internal medicine. 101:527-537.

Canal N., Comi G.

Central and peripheral somatic neuropathies in diabetic patients.

Serono symposia publications from Raven Press. Vol 69:236-245.

Carpenter M. 1.994.

Neuroanatomía. Fundamentos. 4ª edición.

De. Panamericana.

Casley-Smith J.R. 1.990.

The fine structure and fine function of the blood exchange vessels.

Molinatti G., Bar R., Belfiore F. Porta M. (eds): Endothelial Cell function in diabetic microangiopathy: Problems and clinical aspects.

Front diabetes. Basel, Karger, vol 9 p1-13.

Cervós-Navarro J., Kannuki S., Nakagana Y. 1.988.

Blood-Brain Barrier (BBB). Review from morphological aspect.

Histol Histopath. 3:203-213.

Cohen R.D. 1.993.

Disfunction of vascular endothelium in diabetes mellitus.

Circulation: 87 V67-V76.

Cuenca N., Fernández E., De Juan J., Carreras J, Iñiguez C. 1.987.

Postnatal development of microtubules and neurofilaments in the rat optic nerve: a quantitative study.

The Journal of comparative neurology. 263: 613-617.

Cuenca N., De Juan J., Fernández E. 1.989.

Etapas en la maduración del nervio óptico: cambios morfométricos durante el período crítico.

Arch. Neurobiol. 52:1 (1-8).

Danis R.P. Yang Y. 1.993.

Microvascular retinopathy in the Zucker diabetic fatty rat.

Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 34(7). 2367-71.

De Juan J., Cortejoso A., Iñiguez C. 1.979.

Estructura general de la porción intraocular del nervio óptico de la rata.

Morfología normal y patológica. sec.A.Vol.3, págs.93-105.

De Juan J., Cuenca N., Iñiguez C., Fernández E. 1.992.

Axon types classified morphometric and multivariate analysis in the rat optic nerve.

Brain Research. 585: 431-434.

De Juan J., Cortejoso A., Moreda A., Armero F.. 1.978.

Estudio morfológico de la vascularización del nervio óptico de la rata.

Morfología normal y patológica. Sec.A.Vol. 2, págs. 187-200.

De Juan J., Iñiguez C., Carreras J. 1.978.

Number, diameter and distribution of the rat optic nerve fibers.

Acta Anat. 102:294-299.

Diaz-Floes L., Gutierrez R., Varela H., Rancel N., Valladares F. 1.991.

Microvascular pericytes: a review of their morphological and functional characteristics.

Histol Histopath. 6:269-286.

Enroth-Cugell C. and Robson J. 1.966.

The contrast sensitivity of retinal ganglion cells of the cat.

J. Physiol. 187: 517-552.

Espí F., Carmena R. 1.986.

Neuropatía Diabética.

Tratado de Medicina Interna, 4ª Edición, De. Doyma.

Fajardo L.F. 1.989.

The complexity of endothelial cells.

Am Jur of Clinical Pathology. Vol 92, Nº 2 241-249.

Farreras P. Rozman C. 1.992.

Medicina Interna, 4ª Edición, Ed. Salvat.

Fernández -Vigo J. 1.992.

Diabetes Ocular.

LXVIII Ponencia Oficial de la Sociedad Española De Oftalmología.

Madrid.

Fernández-Vigo J., Arias B., Pizarro M.C., González P., Torres J., Macarro A. 1.994.

Modelo experimental de neuropatía óptica diabética. Análisis morfométrico.

Arch. Soc. Españ. Oftalmol. 67: 625-630.

Forno L., Langston J. 1.993.

Lewy bodies and aging: relation to Alzheimer's and Parkinson's diseases.

Neurodegeneration 2: 19-24.

Frank R.N. 1.991.

On the pathogenesis of diabetic retinopathy.

Ophthalmology. 98:586-593.

French-Constant R.J., Miller J. Burne F. Martin C.R. 1.988.

Evidence that migratory oligodendrocyte-type II astrocyte O2A progenitor cell are kept out of the rat retina by a barrier at the eye-end of the optic nerve.

J. Neurocytol. 17:13-25.

Fukuda Y. 1.977.

A three group classification of rat retinal ganglion cells: Histological and physiological studies.

Brain research 119: 327-344.

Giannini C. and Dyck P. 1.995

Basement membrane reduplication and pericyte degeneration precede development of diabetic polyneuropathy and are associated with its severity.

Annals of Neurology. Vol.37 No4. pp 498-504.

Gille M., Brucher J., Indeko P., Bistean M., Kollmann P. 1.995.

Maladie de Kufs avec leucoencephalopathie.

Rev. Neurol. 151(67) 392-397.

Gist Farquhar M. 1.991.

The glomerula basement membrane. A selective macromolecular filter.

Cell Biology of extracellular matrix. 2º edición by Elizabeth D. Hay, Plenum Press. New York.

González-Valverde P., Rivera J., Aguirre C., Pizarro M.C., De la Hoz M. C. 1.979.

Estudio cuantitativo de la mielinización del nervio óptico de la rata durante el desarrollo postnatal.

Anales de anatomía. vol. 28: 75, 565-576.

Guyton A.C. 1.977.

Tratado de fisiología médica. 5ª Edición.

Editorial Interamericana.

Hayreh S.S., Joos K.M., Podhajsky P.A., Long C.R. 1.994.

Systemic diseases associated with nonarteritic anterior ischemic optic neuropathy.

Am. Jr. of Ophthalmol 118: 766-780.

Hildebrand C., Waxman S. 1.983.

Regional node-like membrane specializations in non-myelinated axon of rat retinal nerve fibers layer.

Brain Research, 258: 23-32.

Hirose G. and Bass N. 1.973.

Maturation of oligodendroglia and myelinogenesis in rat optic nerve: a quantitative histochemical study.

J. Comp. Neur. 152: 201-210.

Hocog J., Oswald-Cruz E. 1.978.

Quantitative analysis of the Opossum's Optic nerve: An electron microscope study.

The Journal Comparative neurology. Vol. 178.N4.

Hollyfield J. 1.980.

The structure of the eye.

Cap. 19. Editorial Elsevier Biomedical.

Hsuch W.A., Anderson P.W. 1.992.

Hypertension, the endothelial cell and the vascular complications of diabetes mellitus.

Hypertension. Aug. 20(2).P.253-63.

Janzer R.C., Raff M.C. 1.987.

Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cell.

Nature 325: 253-257.

Jhaveri S., Erzurumlu R., Friedman B., Schneider G.. 1.992.

Oligodendrocytes and myelin formation along the optic tract of the developing hamster: an immunohistochemical study using the Rip antibody.

Glia 6: 138-148

Jones D.B., Wallace R., Frier B.M. 1.992.

Vascular endothelial cell antibodies in diabetic patients.

Diabetes Care. Apr. 15(4). 552-5.

Kamijo M., Cherian P.V., Sima A.A. 1.993.

The preventive effect of aldose reductase inhibition on diabetic optic neuropathy in the BB/W-rat.

Diabetologia. 36(10):893-8.

Kiernan J. A.. 1.985.

Axonal and vascular changes following injury to the rat's optic nerve.

J. Anat. 141: 139-154.

Kimelberg H., Noremborg M.. 1.990.

Astrocytes.

Investigación y Ciencia. 44-45.

Kirby M., Forsberg c.L., Wilson P., Rapisardi S. 1.982.

Quantitative analysis of the optic nerve in the north american Opossum (Didelphis Virginiana): An electron microscopic study.

The Journal of comparative neurology: 211:318-327.

Kjellström C., Conradi N. 1.993.

Decreased axonal calibers without axonal loss in optic nerve following chronic alcohol feeding in adult rats: a morphometric study.

Acta Neurologica. 85:117-121.

Kobayashi K., Miyazu K., Fukutani Y., Nakamura I., Yamaguchi N. 1.992.

Gallyas-Schiff stain for senile plaques.

Biotech Histochem 67: 256-260.

Kock J-H., Mecke E., Yu O., Reuter T., Väisänen R., Wallgren J. 1.989.

Ganglion cells in the frog retina: discriminant analysis of histological classes.

Vision Res. Vol 29, No. 1, pp 1-18.

Kreisberg J.I. 1.992.

Hiperglycemia and microangiopathy. Direct regulation by glucose of microvascular cells.

Laboratory Investigation. Vol. 67, nº 4, 416.

Langman J. 1.976.

Embriología médica. 3ª Edición.

Nueva Editorial Interamericana. México.

- Lanting P., Strijers R., Bos J., Faes T., Heimans J. 1.991.**
The cause of increased pupillary light reflex latencies in diabetic patients: the relationship between pupillary light reflex and visual evoked potentials latencies.
Electroencephalogr-Clin-Neurophysiol. 78(2):111-5.
- Ling T., Mitrofanis J., Stone J. 1.989.**
Origin of retinal astrocytes in the rat: evidence of migration from the optic nerve.
The Journal of comparative neurology 286: 345-352.
- Lorenzi M. 1.992.**
Glucose toxicity in the vascular complications of diabetes. The cellular perspective.
Diabetes. Metabolism Reviews. Vol 8, N° 2, 85-103.
- Lubow M. and Makley T.A. 1.971.**
Pseudopapilledema of juvenile onset diabetes mellitus.
Arch. Ophthalmol 85: 417-422.
- Mandario L.J. 1.992.**
Current hypotheses for the biochemical basis of diabetic retinopathy.
Diabetes Care. Dec. 15(12). P.1.892-901.
- Mann D., Sumpter P., Davies C., Yates P. 1.987.**
Glycogen accumulates in the cerebral cortex in Alzheimer's disease.
Acta Neuropathol (Berl) 73: 181-185.
- Martinelli V., Filippi M., Meshi F., Pozza G., Canal N., Comi G. 1.991.**
Electrophysiological study of the optic pathways in insulin dependent diabetes mellitus.
Clin. Vision Sci. 6(6):437-443.
- Marinelli V., Piatti P., Filippi M., Pacchioni M., Pastore M., Canal N., Comi G. 1.992.**
Effects of hyperglycaemia on visual evoked potentials in insulin dependent diabetic patients.
Acta-Diabetol. 29(1):34-7.
- Mathieu-Costello O., Manciet L., Tysl K. 1.995.**
Capillary ultrastructure and functional capillary density.
Int. J. Microcirc. 15: 231-237.
- Miller R.S., David S., Patel R., Abney R., Raff M. 1.985.**
A quantitative immunohistochemical study of macroglial cell development in the rat optic nerve: in vivo evidence for two distinct astrocyte lineages.
Developmental biology 111, 35-41

- Miller R.S., Ffrench-Constant Ch., Raff M.C. 1.989.**
The macroglial cells of the rat optic nerve.
Ann Rev.Neurosci. 12:517-34.
- Miller S. 1.991.**
Parson's diseases of the eye.
18ª edición. Churchill Livingstone.
- Ministerio de Sanidad y Seguridad Social. 1.981.**
Diabetes Mellitus.Epidemiología y prevención.
Boletín epidemiológico semanal. Nº 1.479.
- Mokuno K., Baron P., Grinspan J., Sobue G., Kreider B., Pleasure D.**
Neurological lineages and neurological diseases.
Department of neurology. University of Pennsylvania. Philadelphia.
- Molinatti G., Bar R., Belfiore F. Porta M. 1.990.**
Endothelial Cell function in diabetic microangiopathy: Problems and clinical aspects.
Front diabetes. Basel, Karger, vol 9 p75-85.
- Mosher D., Sottile J., Chuanyue W., McDonald J. 1.992.**
Assembly of extracellular matrix.
Current Opinion in Cell Biology 4:810-818.
- Nasr H.S., Shalash B., Salem M. 1.994.**
Influencia del dobesilato de calcio sobre el nivel de sorbitol en sangre en pacientes con retinopatía diabética.
European Journal of Clinical research. Vol 5 P.107-116.
- Newman N.J. 1.996.**
Optic Neuropathy.
Neurology 46:315-322.
- Noback Ch., Strominger N., Demarest R. 1.993.**
El sistema nervioso. 4ª edición.
Interamericana McGraw Hill.
- Oppel O. 1.963.**
Microscopic examinations of the number and thickness myelinated nerve fibers in the human optic nerve.
Graefes Arch. Ophthal. 166:19-27.
- Parisi V., Uccioli L., Monticone G., Parisi L., Menzinger G., Bucci M.C. 1.994.**
Visual evoked potentials after photostress in insulin-dependent diabetic patients with or without retinopathy.
Graefes-Arch-Clin-Exp-Ophthalmol. Apr. 232(4):193-8.

Penkowa M. and Moos T. 1.995.

Disruption of the Blood-Brain interface in neonatal rat neocortex induces a transient expression of metallothionein in reactive astrocytes.

Glia 13: 217-227.

Peters A., Palay S., Nebster H. 1.976.

The fine structure of the nervous system. The neurons and supporty cells.

W.B. Saunders Company.

Pillion D., Meezan E. 1.990.

Microvascular receptors for insulin and insulin-like Growth factors.

Molinatti G., Bar R., Belfiore F. Porta M. (eds): Endothelial Cell function in diabetic microangiopathy: Problems and clinical aspects.

Front diabetes. Basel, Karger, vol 9 p75-85.

Pozzessere G., Valle E., Crignis S., Cordischi V.M., Fattapposta F., Rizzo P.A. Pietravalle P., Cristina G., Morano S., Mario U. 1.991.

Abnormalities of cognitive functions in IDDM revealed by P300 event-related potential analysis. Comparison with short-latency evoked potentials and psychometric tests.

Diabetes. Aug; 40(8): 952-8.

Raff M.C. 1.989.

Glial cell diversification in the rat optic nerve.

Science, Vol 243, p 1450-55.

Raff M.C., Miller R. 1.984.

Glial cell development in the rat optic nerve.

TINS. Dec.. Elsevier publications.

Rapaport S. I. 1.987.

Osmotic opening of blood-brain and blood ocular barriers.

Exp. Eye Res. 25/suppl. 499-509.

Reimer W.J. 1.979.

Electrom microscopic demonstration of centrifugal nerve fibers in the human optic nerve.

Graefes Arch. Klin. exp. Ophthal. 210: 31-34.

Rhoades R., Hsu L., Parfett G. 1.979.

An electronmicroscopic analysis of the optic nerve in the golden hamster.

Jour. Comparative Neurology. Vol. 186.N3.491-504.

Robison W.G. 1.991.

Degenerated intramural percytes (Ghost cells) in the retinal capillaries of diabetic rats.

Curr. Eye Res. Apr. 10(4) P.339-50.

Ross M.D. 1.969.

The general visceral efferent component of the eight cranial nerve.
J. Comp. Neurol. 135:453-467.

Ross M.D. 1.973.

Autonomic component of the VIII nerve.
Adv Othorinolarinol. 20:316-336.

Rowe M.H., Stone J. 1.976.

Properties of ganglion cells in the visual streak of the cat's retina.
Journal of comparative neurology 169, 99-126.

Sacks J.G. Lindenberg R. 1.969.

Efferent nerve fibers in the anterior visual pathway in bilateral congenital cystic eye balls.
Am. J. Ophthalmol. 68. 691.

Saraux H., Le Masson C., Offret H., Renard G. 1.985.

Anatomía e histología del ojo. Ediciones Masson S.A.

Sawada G., Wyse B., Blanks M., Vidmar T., Gerritsen G., Diani A. 1.986.

Morphometric evaluation of capillary basement membrane thickness in the quadriceps muscle of diabetic and nondiabetic Chinese hamster.
Histol Histopath 1:1-8.

Schmidt M., Michal M. 1.989.

Inhibición de la formación de sorbitol en los eritrocitos humanos por dobesilato de calcio.
Arzneim-Forsch/Drugs Res. 39(1).4.493-495.

Scott T.M., Foot J. 1.984.

The postnatal development of blood vessels in the optic nerve of normotensive and hypertensive rats.
J. Anat 138(4):635-642.

Shepherd G. 1.985.

Neurobiología.
De. Labor.

Silveira L., Picanco-Diniz C. 1.989.

Distribution and size of ganglion cells in the retinae of large amazon rodents.
Vis. Neurosci. (23). 221.

Silveira L., Picanco-Diniz C. 1.989.

Retinal ganglion cells in the Cebus monkey. A comparison with the cortical magnification factors.
Vis. Res. Vol 29 N11. Nov. P 1.471.

- Sima A.A., Zhang W.X., Cherian P.V., Chakrabarti S. 1.992.**
Impaired visual evoked potential and primary axonopathy of the optic nerve in the diabetic BB/W rat.
Diabetología. 35(7):602-7.
- Smart I., Leblond P. 1.961.**
Evidence for division and transformation of neuroglia cells in the mouse brain, as derived from radioautography after injection of thymide H3.
J. Comp. Neurol. 116: 349-367.
- Smelser G. 1.980.**
La moroflogía del ojo. Histología y estructura microscópica.
Editorial Universitaria. Puerto Rico.
- Spalton D., Hitchings R., Hunter P. 1.995.**
Atlas de oftalmología clínica. 2ª Edición.
Editorial Mosby-Doyma.
- Squadrito G., Cucinotta D. 1.991.**
The late complications of diabetes mellitus.
Ann. Ital. Med. Int., Jan-Mar. 6 (126-36).
- Stone J. and Hoffmann K. 1.972.**
Very slow-conducting ganglion cells in the cat's retina: a major, new functional type?
Brain Res. 43: 610-616.
- Sturroch R. 1.987.**
Vascularization of the human embryonic optic nerve.
J. Hirnforsch, 28, 6, 615-624.
- Testut L., Latarjet A. 1.979.**
Anatomía Humana. Editorial Salvat. Tomo II. Págs. 1.158-65.
- Thomas P.K., Tomlinson D.R. 1.993.**
Diabetic and hypoglycemic Neuropathy.
Peripheral Neuropathy. 3ª Edición. Saunders W. Company.
- Thomas S.V., Alexander M., Mohan P.K., Narendranathan M. 1.993.**
Visual evoked potential changes in patients with tropical pancreatic diabetes.
Acta-Neurol-Napoli. 15(6):427-32.
- Uccioli L., Parisi V., Monticone G., Parisi L., Durola L., Pernini C., Neuschuler R., Bucci M.G., Menzinger G. 1.995.**
Cattedra di endocrinologia. Università di Roma tor Vergata. Italy.
Electrophysiological assessment of visual function in new IDDM patients.
Diabetología. 38(7). 804-8.
- Vaughn J. and Peters A. 1.971.**
A third neuroglial cell type. An electron microscopic study.

- J. Com. Neur. 133: 269-288.
- Vracko R., Benditt E.. 1.970.**
Capillary basal lamina thickening.
The Journal of Cell Biology. 47: 281-285.
- Wakakura M., Ishikawa S. 1.982.**
Ultrastructural study on centrifugal fibers in the feline retina.
Japanese Journal of Ophthalmology. Vol 26: 282-291.
- Wassle H., Grunert U. 1.990**
Retinal ganglion cell density and cortical magnification factor in the primate.
Vis. Res. V30.N11.Nov.. P.1897.
- Waxman S.G., Black J.A., Foster R.E. 1.982.**
Freeze-fracture heterogeneity of the axolema of premyelinated fibers in the C.N.S.
Neurol. 52(4). 418-422.
- Weintin G.W., Odom J.V., Cavender S. 1.991.**
Visually evoked potentials and electroretinography in neurologic evaluation.
Neurol-Clin.. Feb 9(1): 225-242.
- Williams J. M., De Juan E., Machemar R. 1.988.**
Ultrastructural characteristics of new vassels in proliferative diabetic retinopathy.
Am. J. Ophthalmol. 105/5 491-499.
- Williams R., Chalupa L. 1.983.**
An analysis of axon caliber within the optic nerve of the cat: evidence of size groupings and regional organization.
The Journal of Neuroscience.. Vol 3. N8. pp 1.554-64.
- Wilson J., Braunwald E., Isselbacher K., Petrsdorf R., Martin J. Fauci A., Root R. 1.991.**
Principios de Medicina Interna. 12ªEdición.
Editorial Interamericana. McGraw-Hill.
- Wilson R. and Brophy P. 1.989.**
Role for the oligodendrocyte cytoskeleton in myelination.
Journal of Neuroscience Research 22: 439-448.
- Wolter J.R. 1.979.**
Electron microscopic demonstration of centrifugal nerve fibers in the human optic nerve.
Graefe's Arch.Ophthalmol. 210.31-41.
- Zwerfach B.W. 1.973.**
Microcirculation.
Ana Rev. Physiol. 35.117-150.