

**INSTITUTO DE BIOLOGÍA DEL DESARROLLO
DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA Y EMBRIOLOGÍA HUMANA**

**FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DE SEVILLA**



**EXPRESIÓN ANTIGÉNICA DE LAS CÉLULAS PERIPAPILARES EN LA
RETINA DE LOS VERTEBRADOS**

**Trabajo que para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Sevilla
presenta la Licenciada Dña. Rosalía Pereira Gutiérrez**

**EXPRESIÓN ANTIGÉNICA DE LAS CÉLULAS PERIPAPILARES EN LA
RETINA DE LOS VERTEBRADOS**



**Trabajo presentado por la Licenciada Dña. Rosalía Pereira Gutiérrez para
optar al grado de Doctor por la Universidad de Sevilla**

Fdo: Rosalía Pereira Gutiérrez

Fdo: Francisco A. Prada Elena

**Director del Dpto. de Anatomía y Embriología Humana
Universidad de Sevilla**

D. FRANCISCO A. PRADA ELENA, Dña. ADELA QUESADA RUÍZ Y Dña. ROSALÍA CAPARRÓS FERNÁNDEZ; CATEDRÁTICO, PROFESORA TITULAR Y PROFESORA ASOCIADA DE UNIVERSIDAD DEL DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA Y EMBRIOLOGÍA HUMANA DE LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA



CERTIFICAN: Que, el trabajo titulado “**EXPRESIÓN ANTIGÉNICA DE LAS CÉLULAS PERIPAPILARES EN LA RETINA DE LOS VERTEBRADOS**”, ha sido realizado en el Instituto de Biología del Desarrollo y en el Departamento de Anatomía y Embriología Humana bajo nuestra dirección.

Y para que conste y surta los efectos oportunos lo firmamos en Sevilla a 29 de Septiembre de Dos mil once

Fdo: F. A. Prada Elena

Fdo: A. Quesada Ruíz

Fdo: R. Caparrós Fernández

Hace ya algunos años que surgió la idea de este proyecto que por distintas causas se ha ido posponiendo hasta que por fin se ha llevado a cabo. Es por ello por lo que me gustaría que estas líneas puedan servir para expresar mi más profundo y sincero agradecimiento a todas aquellas personas que durante estos años, con su ayuda y ánimos, han contribuido a hacer posible que este trabajo llegue a su fin.

En primer lugar me gustaría agradecer de una forma sincera y especial a mis directores Dr. D. Francisco A. Prada Elena, Dra. Dña. Adela Quesada Ruiz y Dra. Dña. Rosalía Caparrós Fernández, por su orientación, enseñanza, confianza y numerosas horas de dedicación que me han prestado sin las cuales no podría estar hoy aquí.

Asimismo a todo el personal del departamento de Anatomía y Embriología Humana por su colaboración y ánimos recibidos.

No puedo dejar de agradecer también a todos mis compañeros y amigos que de igual forma siempre han estado ahí para animarme y hacer que siguiera adelante con este proyecto.

Así como a toda mi familia, en especial a José Luis y May por su implicación. Y cómo no, mi agradecimiento más íntimo y especial a Pepe y a mis hijos que han sido los sufridores últimos de todo este trabajo, por lo que también es un poco suyo.

A todos, muchas gracias.

INDICE

ABREVIATURAS	10
RESUMEN	12
INTRODUCCIÓN	15
1.-RETINA DE LOS VERTEBRADOS.....	16
2.-ONTOGÉNESIS DE LA RETINA	18
3.-ORGANIZACIÓN ESTRUCTURAL Y CITOLÓGICA DE LA RETINA	19
3.1.-Capas de la retina	19
3.1.1.-Epitelio pigmentario	21
3.1.2.-Capas de la retina neural.....	22
3.2.-Células de la retina neural	25
3.2.1.-Las células Fotorreceptoras.....	26
3.2.2.-Neuronas de transmisión	28
3.2.2.1.-Las célula bipolares	28
3.2.2.2.-Las células ganglionares.....	29
3.2.3.-Neuronas de asociación	30
3.2.3.1.-Las células horizontales	30
3.2.3.2.-Las células amacrinas.....	30
3.2.3.3.-Las células interplexiformes.....	31
3.2.4.-Células Gliales de la retina.....	31
4.-LA NEUROGLIA DEL SNC	32
4.1.-Microglia	34
4.2.-Macroglia	38
4.2.1.-Astrocitos.....	39
4.2.2.-Oligodendrocitos	44
4.2.3.-Glia radial.....	50
4.2.4.-Célula de Müller	51
4.2.4.1.-Clasificación	51
4.2.4.2.-Distribución.....	52
4.2.4.3.-Desarrollo.....	53
4.2.4.4.-Morfología.....	55

4.2.4.5.-Citología	60
A. Membrana Plasmática	60
B. Orgánulos intracelulares	62
C. Citoesqueleto	63
4.2.4.6.- Función.....	65
A. Función de soporte y aislamiento.....	65
B. Función nutritiva y metabólica	67
C. Mantenimiento de la homeostasia retiniana	67
D. Papel en la migración celular durante el desarrollo.....	70
E. Mecanismos de comunicación con las neuronas.....	70
5.-MARCADORES GLIALES Y NEURONALES.....	71
5.1.-Marcadores de Astrocitos y células de Müller	71
5.1.1.-Anticuerpo que reconoce GS.....	71
5.1.2.-Anticuerpo 3CB2.....	74
5.1.3.-Anticuerpo que reconoce GFAP	75
5.2.-Marcadores de Oligodendrocitos y mielina	76
5.2.1.-Anticuerpo que reconoce MOSP	76
5.2.2.-Otros marcadores de oligodendrocitos y mielina	77
5.3.-Marcadores de Microglia.....	77
5.3.1.-Anticuerpo His-C7.....	77
5.3.2.-Lectina. Lycopersicon Esculentum (LEA)	78
5.4.-Marcadores neuronales.....	79
5.4.1.-Anticuerpo 3BA8	79
6.-ORGANIZACIÓN GLIAL DE LA PAPILA DE LOS VERTEBRADOS	79
PLANTEAMIENTOS Y JUSTIFICACIÓN	87
MATERIAL Y MÉTODOS.....	89
1.-MATERIAL	90
1.1.-Material Biológico.....	90
1.1.1.-Animales Adultos.....	90
1.1.2.-Embriones de pollo.....	90
1.2.-Anticuerpos empleados.....	91

1.2.1.-Marcadores de astrocitos y células de Müller	91
1.2.2.-Marcadores de oligodendrocitos y mielina.....	92
1.2.3.-Marcadores de microglía.....	93
1.2.4.-Marcadores de neuronas	93
1.3.-Otros reactivos	95
2.-MÉTODOS.....	96
2.1.-Preparación del material para técnicas de tinción de plata.....	96
2.1.1.-Método de Golgi Stensaas.....	96
2.1.2.-Método de Golgi Colonier	97
2.2.-Preparación del material para microscopia electrónica	98
2.3.-Preparación del material para inmunohistoquímica.....	99
2.4.-Preparación del material para la expresión inmunohistoquímica de GS	
a nivel experimental	101
2.4.1.-Inyección de hidrocortisona en saco vitelino.....	101
2.4.2.-Deprivación de luz en pollo postnatales	102
2.5.-Preparación del material para histoquímica (LEA).....	103
3.-ANÁLISIS DE IMAGEN	104
RESULTADOS	105
1.-CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE LAS CÉLULAS PERIPAPILARES ESTUDIADAS	
CON EL MÉTODO DE TINCIÓN DE GOLGI.....	107
2.-EXPRESIÓN DE ANTÍGENOS GLIALES Y NEURONALES EN LAS CÉLULAS PERIPAPILARES	
DE LA RETINA DEL POLLO.....	108
2.1.-Expresión del antígeno que reconoce el anticuerpo monoclonal 3CB2	108
2.2.-Expresión de Proteína Ácido Fibrilar Glial (GFAP)	110
2.3.-Expresión de Glutamina Sintetasa (GS).....	110
2.4.-Expresión experimental de GS mediante la inducción con Hidrocortisona (HC)	
durante el desarrollo de la papila	112
2.5.-Expresión de antígenos de oligodendrocitos y de la mielina durante el	
desarrollo de la papila	114

2.6.-Expresión de Marcadores microgliales durante el desarrollo de la papila ...	117
2.6.1.-Expresión de LEA en la papila	117
2.6.2.-Expresión de HIS-C7 en la papila	118
2.7.-Expresión del antígeno que reconoce el anticuerpo monoclonal 3BA8 durante el desarrollo de la papila	118
3.-EXPRESIÓN DE ANTÍGENOS GLIALES Y NEURONALES EN LA PAPILA DE OTRAS ESPECIES DE VERTEBRADOS	119
ICONOGRAFÍAS	121
DISCUSIÓN	135
CONCLUSIONES	143
BIBLIOGRAFÍA	146

ABREVIATURAS

CAMs: Moléculas asociadas con la adhesión celular	GS: Glutamina sintetasa
CCB: Capa de conos y bastones	HC: Hidrocortisona
CCG: Capa de células ganglionares	HRP: Peroxidasa de rábano
CFNO: Capa fibras del nervio óptico	Ig: Inmunoglobulina
CGPP: Células Gliales peripapilares	K: Potasio
CNE: Capa nuclear externa	LEA: Lycopersicon esculentum
CNI: Capa nuclear interna	MAG: Glicoproteína asociada a la mielina
CNO: Cabeza nervio óptico	MBP: Proteína básica de mielina
CPE: Capa plexiforme externa	MLE: Membrana limitante externa
CPI: Capa plexiforme interna	MLI: Membrana limitante interna
DAB: 3'3 diaminobencidina	MOSP: Proteína específica de mielina y oligodendrocitos
DAPI: 4'6-diamidino-2 phenylindol	Na: Sodio
DO: Disco óptico	NO: Nervio óptico
DPX: Dibutilfenitalato + Poliestireno + Xileno	CPO: Células precursoras de oligodendrocitos
ECM: Matriz extracelular	PBS: Tampón fosfato de sodio
EP: Epitelio pigmentario	PLP: Proteína proteolípida
ES: Espacio subretinal	PP: Peripapilar
FITC: Isocianato de fluoresceína	SN: Sistema Nervioso
GABA: Ácido γ -aminobutírico	SNC: Sistema Nervioso Central
GALC: Galactocerebrósido-C	SNP: Sistema Nervioso Periférico
GFAP: Proteína ácida fibrilar glial	TRICT: Tetrametil Rodamina

RESUMEN

En este estudio realizamos una caracterización molecular de las células peripapilares de la retina del pollo y otros vertebrados, usando técnicas inmunohistoquímicas. Las células peripapilares son un tipo especial de glia, no sólo por su posición, formando una barrera entre la retina, la cabeza del nervio óptico y el pecten; sino también porque expresan marcadores de astrocitos, oligodendrocitos, y neuronas. Nosotros demostramos que las células peripapilares expresan un nuevo antígeno neuronal (3BA8) que en la retina adulta se localiza en las células amacrinas y en la plexiforme interna. También expresan un antígeno específico de la mielina y de los oligodendrocitos (MOSP) y un antígeno (3CB2) que se expresa en la glía radial y en los astrocitos del SNC. Por el contrario las células peripapilares no expresan GS que es uno de los marcadores universales mas usado para el reconocimiento de los astrocitos. En otras especies de vertebrados como el camaleón y la salamanguesa, las células peripapilares no expresan el antígeno neuronal (3BA8). Todos los hallazgos encontrados en el curso de la realización de esta tesis, demuestran que las células peripapilares constituyen un tipo diferente de célula glial, que en el caso de las aves, sospechamos que debe jugar un papel muy importante, el cual estaría relacionado con los mecanismos de guía y diferenciación de los axones de las células ganglionares y de las fibras centrífugas de la retina.

El hecho de que las células peripapilares de la retina no expresen GS refuerza la hipótesis de que los astrocitos sólo la expresan si a su alrededor hay contactos sinápticos. Además, nuestros resultados experimentales usando estimulación corticoidea, también demuestran que la programación genética de estas células es

determinante en su comportamiento durante el desarrollo de la retina, de la capa de fibras del nervio óptico y la papila.

INTRODUCCIÓN

1.- RETINA DE LOS VERTEBRADOS

El sistema nervioso está compuesto por un gran número de células que continuamente reciben información, la elaboran y toman decisiones que en última instancia van a conducir a la percepción. El 38% de todas las fibras cerebroaférentes pertenecen al sistema visual (Jonas y cols., 1990), lo que justifica el papel predominante de este sistema sensorial en la percepción humana.

Aunque todas las partes del ojo son importantes para percibir la información visual, la retina es quizás la parte vital del sistema. La retina es esencialmente una porción del cerebro que se proyecta hacia las estructuras superficiales del organismo con el fin de recibir los rayos luminosos que provienen del mundo exterior. Su fácil acceso, unido a la posibilidad de estudiar el procesamiento de la información en una porción intacta del sistema nervioso convierte a esta estructura en un modelo único y de gran utilidad para estudios fisiológicos y morfológicos del sistema nervioso en general (Dowling, 1987)

La retina es una membrana sensorial nerviosa que se sitúa por dentro del globo ocular entre la coroides por fuera y la membrana hialoide del cuerpo vítreo por dentro. En la parte posterior del globo ocular, la retina se continúa con el nervio óptico, mediante el disco óptico. En la parte anterior del globo ocular, la retina se adelgaza progresivamente hasta que queda reducida a un epitelio cilíndrico revestido externamente por la capa pigmentaria de la retina. De esta forma es como la retina alcanza los límites más anteriores, revistiendo los procesos ciliares y la cara posterior del iris. Cerca del centro de la retina se distingue una zona amarillenta oval (la mancha amarilla, mácula lútea), en cuyo centro se

observa una depresión, es la fosita central o fovea de la retina donde la resolución visual es máxima (Fig. 1).

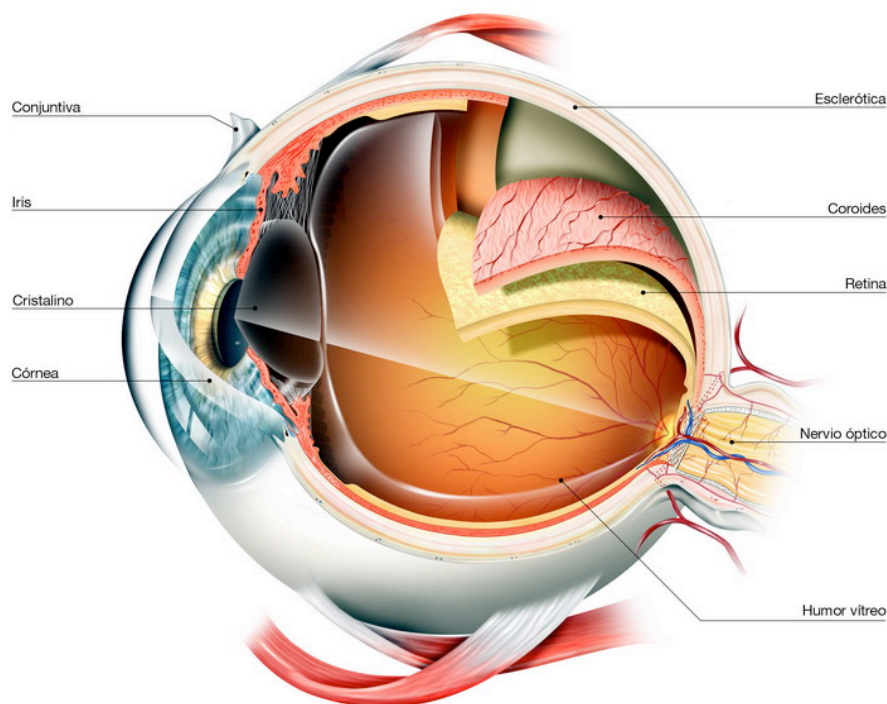


Figura 1. Dibujo del globo ocular

Esta fina lámina de tejido nervioso que forma parte del Sistema Nervioso Central (SNC), y a la que denominamos retina, se trata de un órgano especializado cuya función es recibir las señales luminosas y transformarlas en una serie de impulsos nerviosos. La conversión de la energía luminosa en señales eléctricas se efectúa mediante moléculas fotosensibles a nivel de las células fotorreceptoras de la retina, las cuales detectan la energía luminosa, la absorben y la convierten en señales eléctricas. Estas señales, a su vez, viajan a través de una red sináptica de neuronas dentro de la retina para finalmente ser enviadas a través del nervio óptico a centros específicos del cerebro donde la información es procesada.

2.-ONTOGENESIS DE LA RETINA

El origen embrionario de la retina es ectodérmico al igual que el resto del SNC. Se desarrolla a partir de una parte del prosencéfalo que posteriormente se diferencia formando el diencéfalo embrionario

La retina se forma durante el desarrollo embrionario a partir de dos vesículas ópticas que nacen directamente por una evaginación del tubo neural (Fig. 2). Estas dos vesículas se van aproximando poco a poco hacia las porciones laterales del ectodermo superficial. Su interacción con el ectodermo superficial va haciendo que este se vaya diferenciando para formar la cornea y el cristalino; y que las vesículas ópticas, invaginadas, se vayan transformando en copa ópticas de doble capa, que queda unida al resto del cerebro por el tallo óptico y posteriormente por el nervio óptico (Rodiek, 1973).

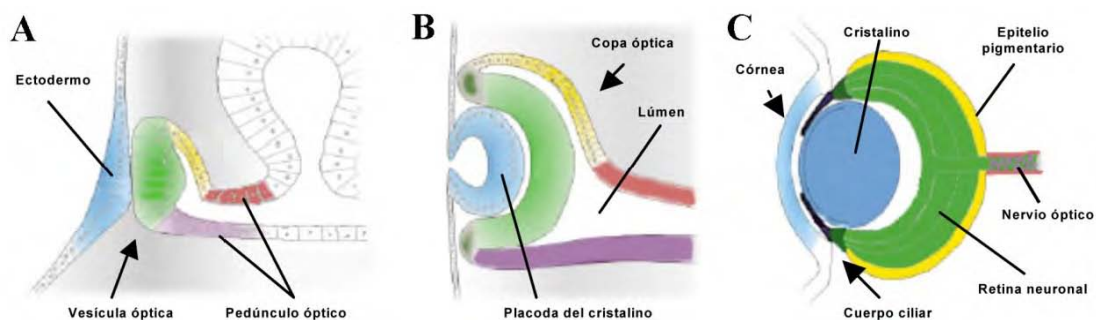


Figura 2. Esquema representando la morfogénesis del ojo de vertebrados. Chow y Lang, 2001.

Inicialmente cada una de las dos capas de la copa óptica está formada por una sola capa de células. A lo largo del desarrollo la capa más externa se diferencia para formar el epitelio pigmentario de la retina, el cual permanece con una sola capa de

células que no se diferencia como tejido nervioso. La capa interna da lugar a un neuroepitelio, del que se formará la retina adulta, y autentico tejido nervioso del cual progresivamente se desarrollan las células sensoriales y neuronas, que se organizan en capas conformando la estructura de la retina.

3.-ORGANIZACIÓN ESTRUCTURAL Y CITOLÓGICA DE LA RETINA

3.1.-Capas de la retina

Gran parte de los conocimientos que hoy tenemos sobre la estructura de la retina lo debemos a los trabajos de Ramón y Cajal (1892), realizados en un buen número de especies de vertebrados. Ramón y Cajal estudió y describió todas las clases de neuronas de la retina menos las células interplexiformes, así como dos tipos de células gliales, los astrocitos y las células de Müller (Fig. 3).

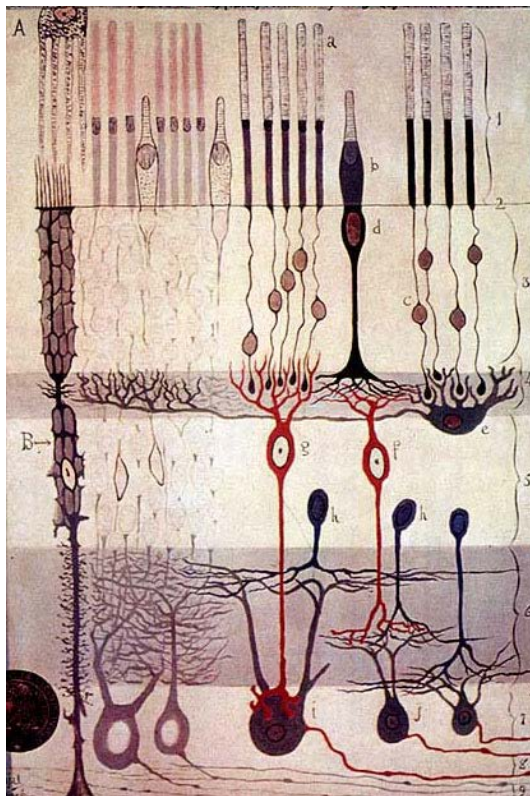


Figura 3. Dibujo de las neuronas de la retina de mamíferos tomado de Cajal (1980). Método de Golgi.

La retina de los distintos vertebrados mantiene una organización similar de sus capas y células. La retina está formada por diferentes tejidos. Uno de ellos está constituido por células neuroepiteliales que se disponen en monocapas, denominada epitelio pigmentario (retina pigmentaria), y el otro, constituido por neuronas y células gliales que se denomina retina neural. La característica principal de la retina neural es su organización en capas (Fig. 4) que cubren aproximadamente los dos tercios interiores del globo ocular. Esta citoarquitectomía se complementa con dos membranas limitantes (la externa y la interna) que delimitan la retina neural y entre las que se encuentran seis capas en las que se sitúan las neuronas y las células gliales.

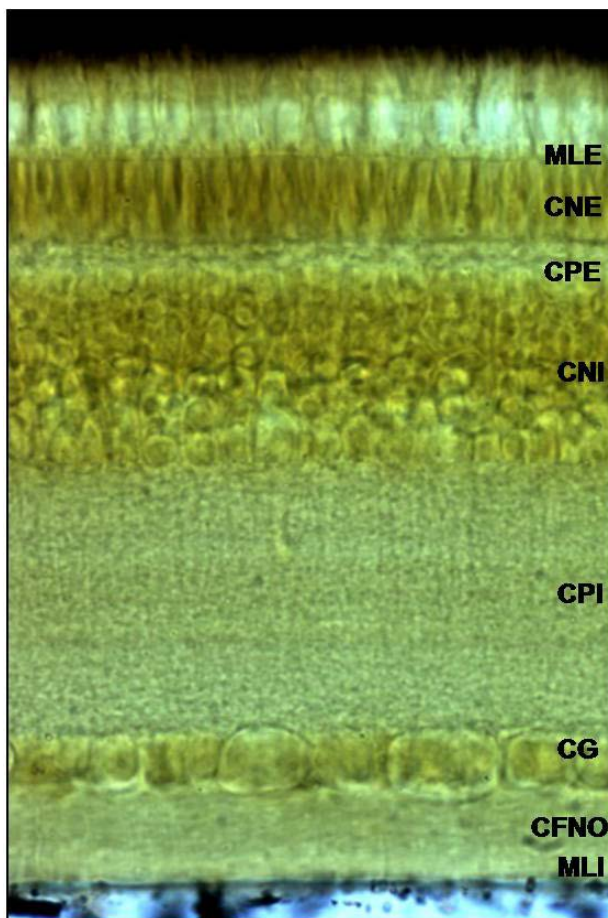


Figura 4. Sección vertical de retina central de pollo postnatal observada con ténica de Nomarski. **MLE:** Membrana limitante externa. **CNE:** Capa nuclear externa. **CPE:** Capa plexiforme externa. **CNI:** Capa nuclear interna. **CPI:** Capa plexiforme interna. **CG:** Capa ganglionar. **CFNO:** Capa de fibras del nervio óptico. **MLI:** Membrana limitante interna.

3.1.1.-Epitelio pigmentario

El epitelio pigmentario está formado por células cuboideas que forman una capa continua simple que reviste la superficie externa de toda la retina neuronal y en su periferia más anterior se continúa con el epitelio ciliar.

El núcleo de estas células se encuentra localizado en la parte externa de las mismas, próximo a la lámina basal de la coroides. En el extremo interno, las células pigmentarias poseen microvellosidades que hacen contactos y se proyectan entre los extremos externos de los conos y los bastones. El citoplasma es rico en mitocondrias y contiene numerosos gránulos de melanina, además se observan restos de los segmentos externos de los conos y bastones fagocitados (Fig. 5). Estas células contienen un citoesqueleto muy rico en filamentos de actina, microtúbulos y filamentos intermedios.

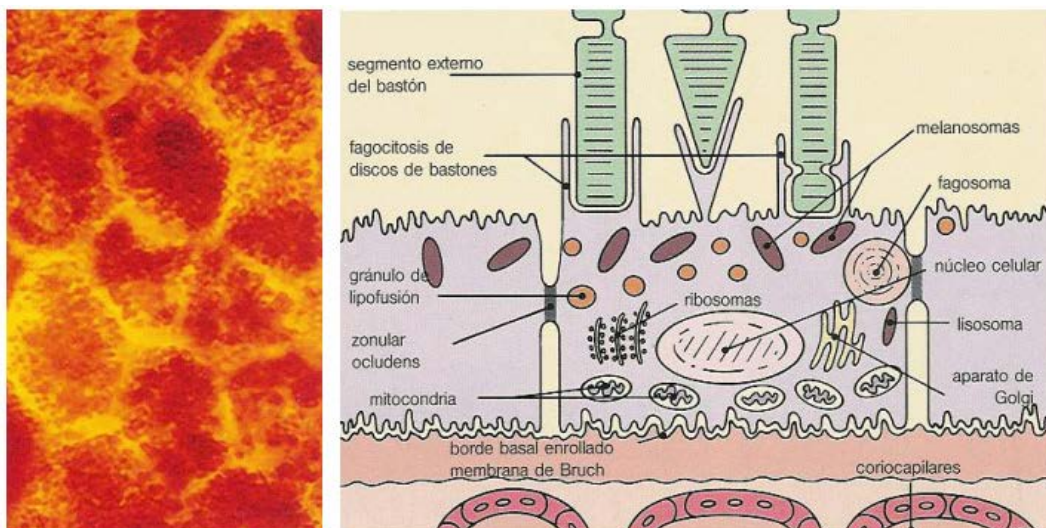


Figura 5. Microfotografía y esquema de las células del epitelio pigmentario de la retina.

Las células de la retina pigmentaria realizan un conjunto de actividades que son fundamentales para la visión (Bok, 1993). En primer lugar, a través de sus microvellosidades, realizan la fagocitosis de las partes terminales de los segmentos de conos y bastones, constituyendo a la renovación de la membrana receptora de los mismos. En segundo lugar, el epitelio pigmentario actúa como un dispositivo antireflectante, que evita la pérdida de definición de la imagen. En tercer lugar, el epitelio pigmentario hace de barrera hemoretiniana entre la retina y la coroides.

3.1.2.- Capas Retina neural

La retina neural de los vertebrados se encuentra constituida por elementos derivados del primitivo neuroepitelio, entre los que se puede distinguir un elemento transductor, encargado de transformar la energía lumínica en eléctrica, representado por los fotorreceptores. Elementos de unión, nutrición y sostén, que son las células gliales. Los restantes constituyentes de la retina son las células bipolares, horizontales, amacrinas y ganglionares, que refuerzan las débiles ondas generadas en los conos y bastones, y las transmiten, conducen y encauzan hasta los centros o estaciones secundarias del encéfalo.

En la retina neural se distinguen seis capas (Fig.4), formadas éstas por los somas de las células y sus prolongaciones. Los somas celulares están dispuestos en tres capas nucleares, mientras que las prolongaciones forman las dos capas sinápticas denominadas capas plexiformes, y por último, la capa de fibras del nervio óptico. Estas seis capas clásicamente descritas son (Fig. 6) las siguientes:

1.- Capa nuclear externa (CNE). En esta capa se sitúan, en varios niveles, los somas de los fotorreceptores: conos y bastones.

2.- Capa plexiforme externa (CPE). Es una capa de contactos sinápticos entre las prolongaciones internas de los fotorreceptores y las prolongaciones de las células horizontales, bipolares e interplexiformes.

3.- Capa nuclear interna (CNI). En ella se encuentran los somas de las células horizontales, bipolares, amacrinas, interplexiformes y ganglionares desplazadas así como los de las células de Müller. Las células horizontales se sitúan formando la fila más externa de los somas. Los dos tercios más externos de esta capa los ocupan los somas de las células bipolares y de Müller, mientras que las células amacrinas, interplexiformes y ganglionares desplazadas se sitúan en el tercio más interno.

4.- Capa plexiforme interna (CPI). En ella sináptan las células bipolares, amacrinas, ganglionares desplazadas e interplexiformes por un lado y las células ganglionares y amacrinas invertidas por otro. En esta capa se distinguen hasta 7 estratos o subcapas, según la especie y la zona de la retina.

5.- Capa de células ganglionares (CCG). Está formada por los somas de las células ganglionares y de las células amacrinas invertidas.

6.- Capa de fibras del nervio óptico (CFNO). Está formada por los axones de todas las células ganglionares y ganglionares desplazadas. Estos están orientados hacia la salida del nervio óptico y su grosor aumenta desde la retina periférica hasta la zona papilar.

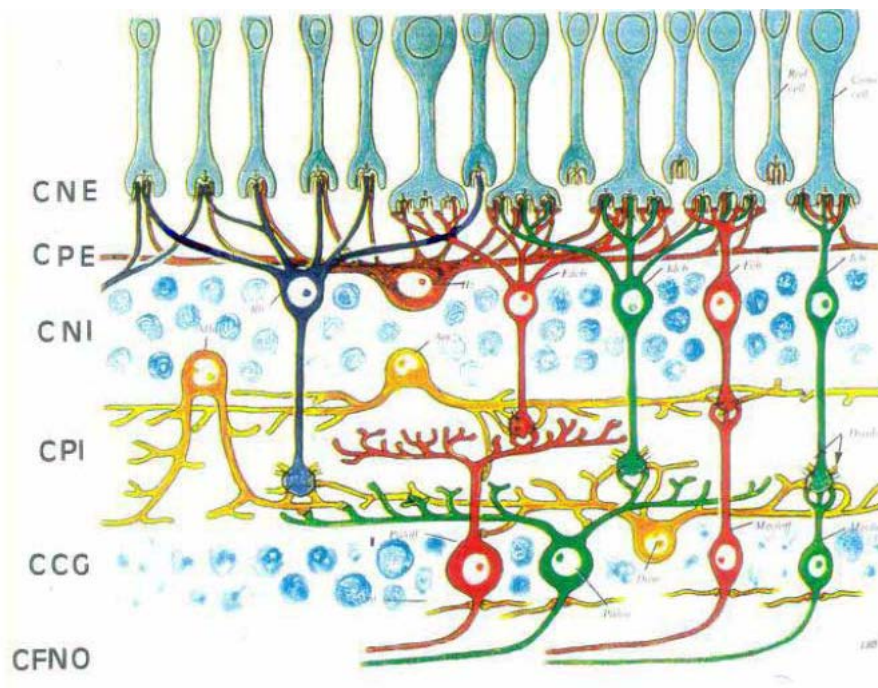


Figura 6. Esquema que muestra las capas y las principales neuronas en la retina de los vertebrados: Los fotorreceptores, las células bipolares y las células horizontales establecen conexiones sinápticas entre sí en la capa plexiforme externa, mientras que las células bipolares, amacrinas y ganglionares lo hacen en la capa plexiforme interna. (Adaptado de Dowling, 1979).

En la retina neural se distinguen dos membranas limitantes, la externa y la interna.

La **membrana limitante externa (MLE)** está formada por uniones especializadas (uniones adherentes) entre los segmentos internos de los fotorreceptores, las Mazas de Landolt (prolongaciones de algunas células bipolares) y las prolongaciones externas de las células de Müller. La MLE separa lo que es segmento externo del segmento interno de los fotorreceptores.

Entre la MLE y el epitelio pigmentario se observa una capa clara al microscopio óptico, la **capa de conos y bastones (CCB)**, también llamada **espacio subretinal (ES)**,

formada por los segmentos internos y externo de los fotorreceptores, el *microvilli* de las células de Müller y las prolongaciones internas de las células pigmentarias cuyos somas forman el **epitelio pigmentario (EP)**.

La **membrana limitante interna (MLI)** está formada por la yuxtaposición, sin uniones de tipo especializado, de los pies de conexión vítreos de las células de Müller. Se encuentra separada del humor vítreo por una lámina basal.

La célula de Müller (Fig. 7).es la única célula retiniana que ocupa todas las capas de la retina, desde la MLE hasta la MLI.

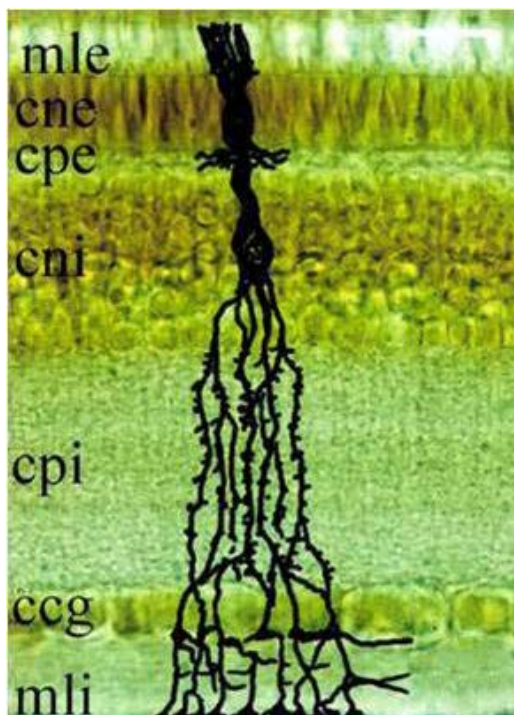


Figura 7. Esquema de una célula de Müller de la retina del pollo, sobre una microfotografía de retina tomada por contraste de Nomarski donde se observa como dicha célula ocupa todo el espesor retiniano, desde la membrana limitante externa (**mle**) hasta la interna (**mli**).

3.2.-Células de la retina neural

Cajal sugirió que existían dos tipos principales de vías de procesamiento de la información visual. Una cadena principal (transmisión vertical), en la que la

información procedente de los fotorreceptores (conos y bastones) pasaría a las células bipolares y de aquí a las células ganglionares y una cadena de asociación lateral (u horizontal) en la que intervendrían las células horizontales (a nivel de la plexiforme externa) y las células amacrinas (a nivel de la plexiforme interna) que modulan tangencialmente la transmisión vertical anteriormente señalada (Fig.8).

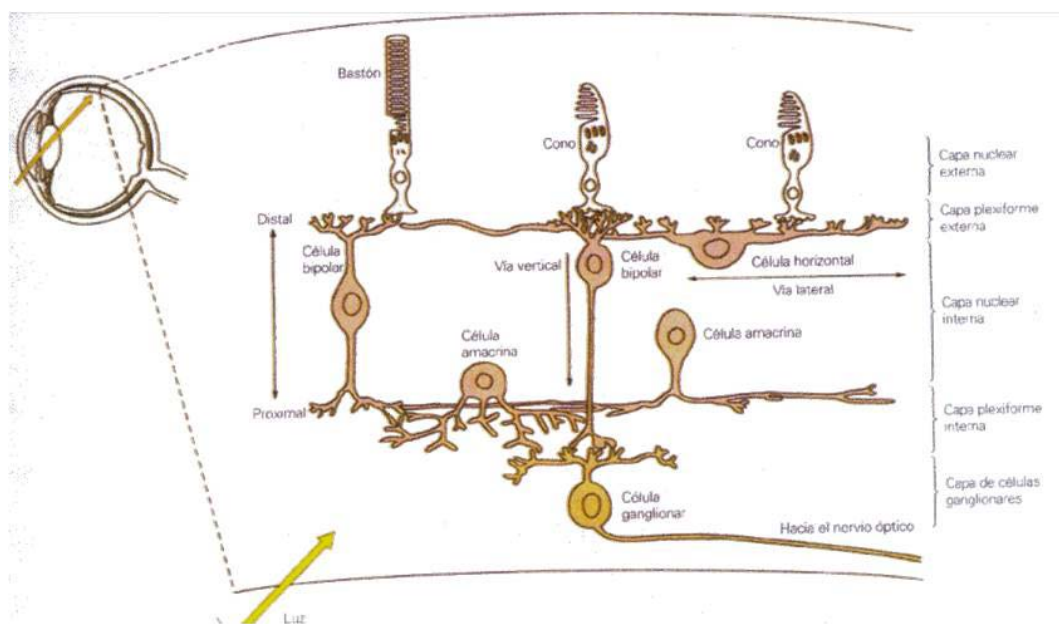


Figura 8. La información visual fluye verticalmente desde los fotorreceptores a las células bipolares y desde éstas a las células ganglionares, y lateralmente a través de las células horizontales en la capa plexiforme externa y de las células amacrinas en la capa plexiforme interna. (Adaptado de Dowling, 1979).

3.2.1.-Las Células Fotorreceptoras.

Son células alargadas, denominadas conos y bastones que se orientan radialmente. En ambos tipos de fotorreceptores se pueden distinguir morfológicamente, tres partes (Fig. 9).

- El segmento externo, orientado hacia el epitelio pigmentario, está especializado en la fotoconversión.
- El segmento interno, localizado en la zona más proximal de la retina, se encuentra el núcleo de la célula y la mayor parte de su maquinaria de biosíntesis.
- El terminal sináptico, localizado en un ensanchamiento a modo de pedículo (conos) o esférula (bastones), donde se realizan contactos sinápticos con las células horizontales y bipolares.

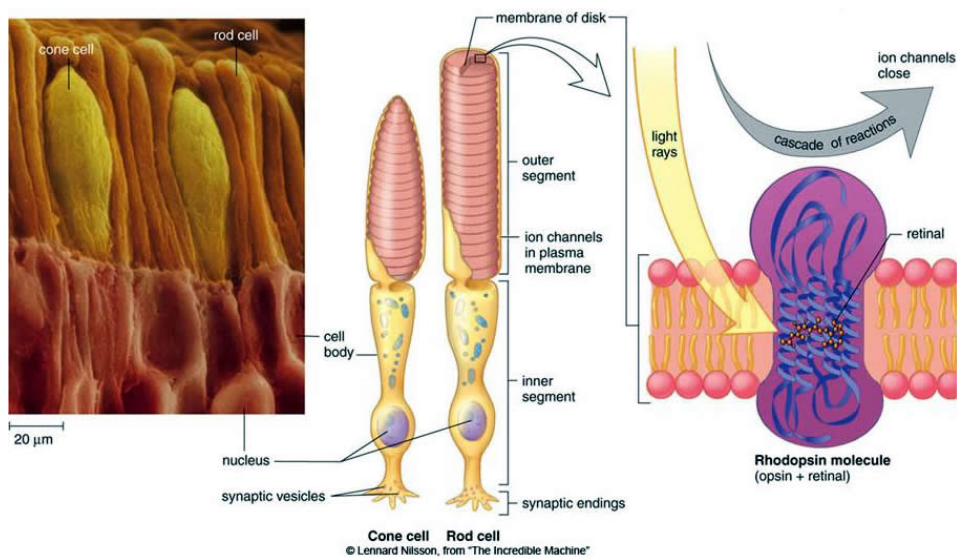


Figura 9. Microfotografía y esquema que representa las principales características morfológicas de los fotorreceptores de la retina: bastones y conos.

Los conos y bastones se diferencian estructuralmente, por la forma de sus segmentos internos y por la forma de terminar la célula en la capa plexiforme externa (CPE); y funcionalmente, por su sensibilidad a distintos tipos de luz.

Los **conos** (aproximadamente 60-70 millones en cada retina) son responsables de la resolución espacial y de los colores. El mayor número de conos se observa en la retina central y sobre todo en la fovea, con ausencia total de bastones.

Los **bastones** (aproximadamente 120-130 millones en cada retina) tienen una elevada sensibilidad monocromática. Predominan en animales de hábito nocturno. Su distribución es casi inversa a los conos.

3.2.2.- Neuronas de Transmisión

Se ha comprobado que el número de fotorreceptores es superior al de las neuronas de transmisión vertical (bipolares y ganglionares). Por lo tanto, esto significa que numerosos fotorreceptores participan en la activación final de una única vía axónica en el nervio óptico (Fig. 10).

3.2.2.1.-Las Células Bipolares

Las células bipolares se disponen al igual que los fotorreceptores, de manera radial. Tienen forma bipolar y en ellas se distinguen a partir del cuerpo de las células, dos prolongaciones: una externa que alcanza la capa plexiforme externa (CPE) donde se ramifica en distintas dendritas que sinaptan con los fotorreceptores y las células horizontales. La otra prolongación representa el axón de la célula, se originan del cuerpo y se dirigen internamente hasta la capa plexiforme interna (CPI) donde se ramifica en numerosas expansiones tangenciales que sinaptan con las células ganglionares y amacrinas. La mayoría de las células bipolares son excitadoras y utilizan el glutamato como neurotransmisor (Kalloniatis y Fletcher, 1993).

3.2.2.2.-Las Células Ganglionares

Las células ganglionares representan el último eslabón funcional de la retina, a través del cual ésta envía los estímulos nerviosos originados a partir de la fotoestimulación, hacia distintos centros del S.N.C.

Las células ganglionares son neuronas multipolares, con cuerpo celular voluminoso, que recogen con sus dendritas los estímulos procedentes de las células bipolares y amacrinas a nivel de la capa plexiforme interna y envían esa información sináptica al SNC a través de sus axones. Convierten estas señales en potenciales de acción y las transmiten a través del nervio óptico a la corteza visual occipital.

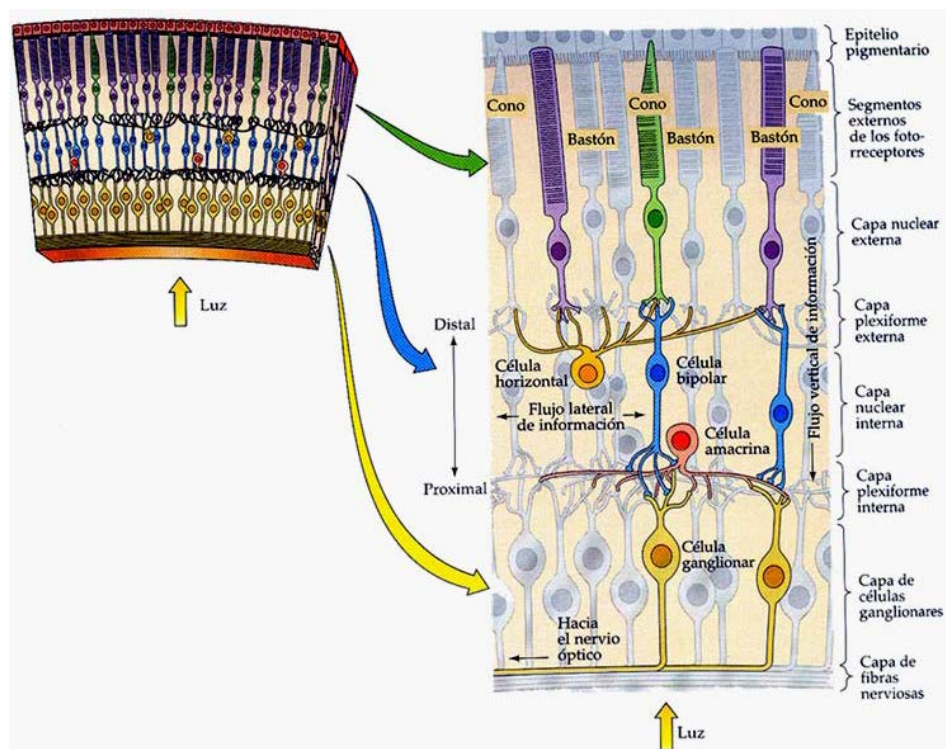


Figura 10. Representación esquemática de la estructura retiniana donde se observan las distintas capas y tipos neuronales. La luz incide a través de las capas internas de la retina hasta alcanzar los fotorreceptores donde se convierte la energía luminosa en energía eléctrica.

3.2.3.-Neuronas de Asociación

Las neuronas de asociación también llamadas interneuronas son en la retina las células horizontales y las células amacrinas y las células interplexiformes (Fig. 8 y 10).

3.2.3.1.-Las Células Horizontales

Las células horizontales son interneuronas cuyos cuerpos celulares se localizan en la parte más externa de la capa nuclear interna. Sus dendritas y axones se ramifican en la capa plexiforme externa donde realizan sinapsis con las bases de los conos y bastones, y con las células bipolares. También se comunican entre sí a través de sus dendritas.

Las conexiones que realizan con los fotorreceptores y con las células bipolares, son de naturaleza inhibitoria y el neurotransmisor que utilizan es el ácido γ -aminobutírico (GABA). Parece que estas células intervienen funcionalmente facilitando el contraste e incrementando la resolución visual.

3.2.3.2.-Las Células Amacrinas

Cajal denominó así a estas células carentes de axón y que por lo tanto se salían del patrón propuesto en la teoría neuronal. Con el tiempo se ha descubierto que las dendritas de estas células hacen sinapsis aferente o eferente, comportándose bien como axones o bien como dendritas. Su cuerpo se localiza en la parte más interna de la capa nuclear interna y sus dendritas se ramifican por los distintos estratos de la capa plexiforme interna, donde realizan sinapsis con las células bipolares y con las células ganglionares y reciben sinapsis de otras células amacrinas y de los axones de las células bipolares.

Algunas de las células amacrinas se localizan entre los cuerpos de las células ganglionares y sus dendritas se extienden por la capa plexiforme interna son las células “amacrinas desplazadas”, y expresan los mismos neurotransmisores inhibidores y excitadores que sus homólogas de la capa nuclear interna, es decir, GABA, Glicina y Acetil-Colina.

3.2.3.3.-Las células interplexiformes

Como indica su nombre, conectan las dos capas plexiformes externa y interna. Sus cuerpos celulares se disponen a lo largo del borde interno de la capa nuclear interna. Además, envían prolongaciones en dirección a la capa de los fotorreceptores, donde sinaptan con éstas células. Se trata de células dopaminérgicas (Negishi and Drujan, 1978; Cohen and Dowling, 1983; Teranishi y cols., 1985, O’Connor y cols., 1987).

3.2.4.-Células Gliales de la retina

Las células gliales tienen características morfológicas, funcionales y metabólicas que las distinguen claramente de las neuronas: No generan ni conducen potenciales de acción; tienen prolongaciones, pero no son ni axones ni dendritas; no forman sinapsis y mantienen la capacidad de división celular.

En la retina existen todos los tipos de células gliales que están presentes en el resto del SNC (Fig.11), así en la mayoría de las retinas de los distintos vertebrados se observan: Astrocitos, Oligodendrocitos (en las retinas que cuentan con una capa de fibras del nervio óptico mielinizadas) y Microglia (fundamentalmente relacionada con las retinas vasculares). Además de estos tipos celulares, todas las retinas de los

animales vertebrados tienen un tipo especial de célula glial denominada célula de Müller (Müller, 1851; Ramón y Cajal, 1892), a la que se ha definido como un astrocito modificado.

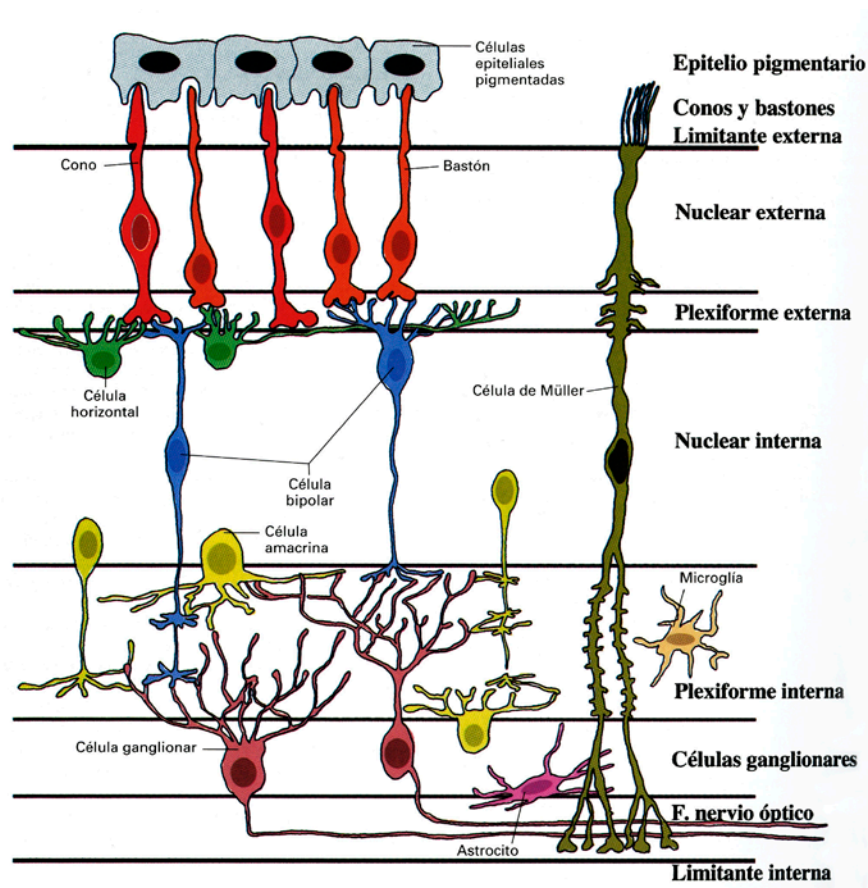


Figura 11. Dibujo representativo de las capas de la retina y sus principales células nerviosas y gliales. (Tomado de García Porrero y Hurlé, 2005).

4.-LA NEUROGLIA DEL SNC

La neuroglia comprende un grupo heterogéneo de células que sirven de soporte al tejido nervioso y realizan diversas funciones.

El término “tejido glial” procede del griego glia que significa “pegamento”. Fue en 1846 cuando Rudolf y Virchow reconocieron, por primera vez, la existencia en el SNC de un componente de naturaleza no nerviosa (tejido conjuntivo) constituido por células morfológicamente distintas a las neuronas y a las que denominó neuroglía o “pegamento nervioso”.

Contrario a lo que tradicionalmente se ha establecido al resaltar la función de las neuronas en detrimento de la glía, la relación de asociación entre neuronas y glía no se limita a la coexistencia anatómica, ya que hay entre ellas claras relaciones de interdependencia fisiológica. Aunque las células gliales no son eléctricamente excitables ni establecen sinapsis con las neuronas, mantienen un diálogo continuo entre ellas y con las neuronas de un modo bastante complejo, asegurando el soporte estructural, metabólico y trófico durante toda la vida.

Así pues, aunque durante mucho tiempo las células gliales fueron consideradas un simple soporte de la estructura del tejido nervioso, hoy en día, se les atribuye una participación más activa en la modulación y transmisión de las señales nerviosas (Kirchhoff y cols., 2001), son fundamentales en el desarrollo, maduración, migración, y funcionamiento de las neuronas, así como también toman parte activa de los procesos locales de defensa. No en vano, las células gliales exceden (5 a 10 veces) en número a las neuronas.

Teniendo en cuenta el tamaño, forma y situación se distinguen varios tipos de células gliales. Clásicamente la glía del SNC se divide en dos grupos: La macroglía, que son las células de mayor tamaño, e incluye a los astrocitos, a los oligodendrocitos y a la

glía radial; y la microglía, las células de menor tamaño (Fig.12), (Ling y Leblond, 1973; Sturrock, 1983; Raine, 1998; Vincent y cols., 1989).

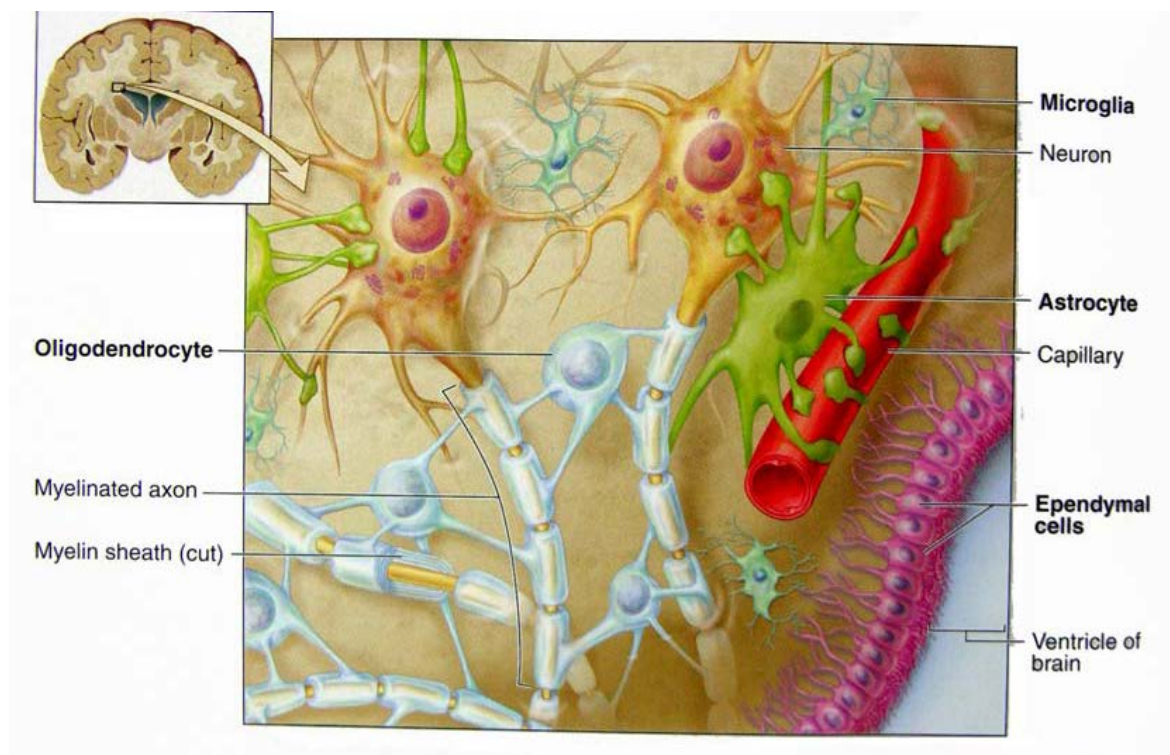


Figura 12. Representación esquemática de la disposición de los diferentes tipos de células neurogliales.

4.1.-Microglia

La microglía, descrita por primera vez por Río-Hortega (1919), está formada por poblaciones celulares que tienen función fagocítica.

Río-Hortega apuntó que las células microgliales podrían originarse de monocitos sanguíneos; pero su origen sigue presentando controversias. La mayoría de los autores consideran que la microglía tiene un origen mesodérmico, probablemente de tipo hematopoyético (Wolter, 1956; Boya y cols., 1986; 1987; 1991; Jordan y

Thomas, 1988; Leong y Ling, 1992; Ling y Wong, 1993; Sievers y cols., 1994). Sin embargo, otros autores sostienen la idea de que igual que la neuronas y la macroglía, se originan de células neuroepiteliales (Fig. 13) (Richardson y cols., 1993; Federoff, 1995; Federoff y cols., 1997). Posteriormente, las células microgliales una vez dentro del parénquima nervioso proliferan y migran (Navascués y cols., 2000; Cuadros y Navascués., 2001) durante el desarrollo y en respuesta a diversas lesiones.

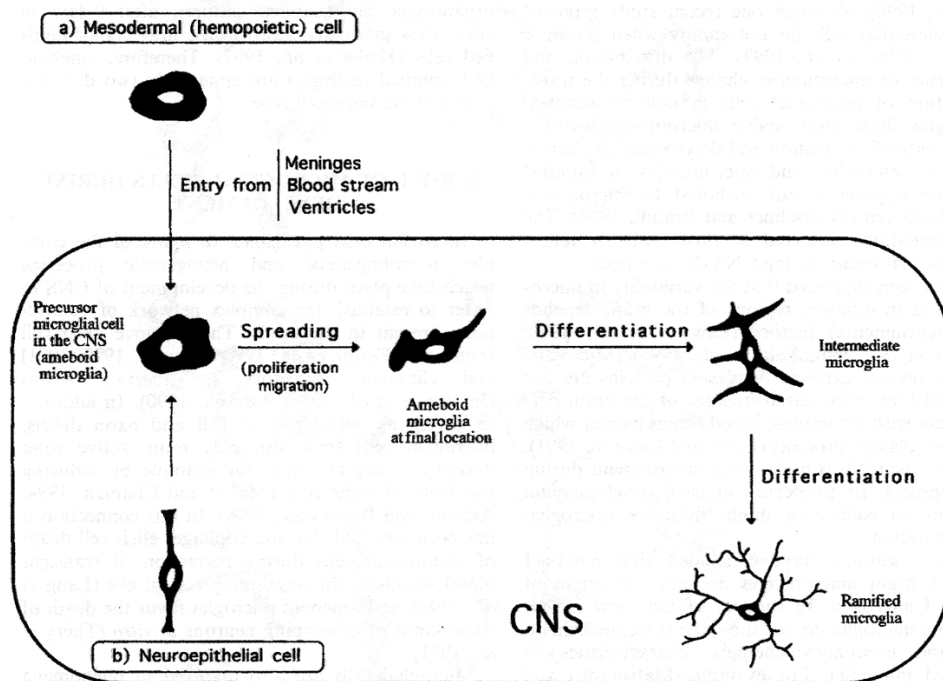


Figura 13. Esquema representativo del origen y la diferenciación de las células microgliales durante el desarrollo del SNC (Cuadros y Navascués, 1998).

La microglia son células de tamaño pequeño y más oscuras que los oligodendrocitos; su núcleo es denso, tienen escaso citoplasma y prolongaciones retorcidas de corto alcance con pequeñas espinas. Están formadas por poblaciones

celulares con diferentes morfologías, desde ameboides hasta ramificadas (Fig.14), según su estado fagocítico.

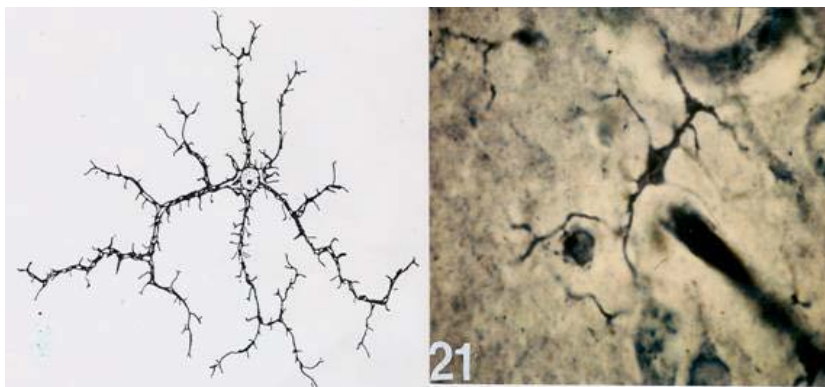


Figura 14. Esquema y tinción de plata de célula microglial

La microglía se halla dispersa por todo el SNC. En condiciones normales, se encuentra en reposo o inactiva (ramificada), proliferando en los procesos patológicos y volviéndose activamente fagocítica (ameboide) (Fig.15) (Streit, 2002).

Los primeros estudios de microglia en vías ópticas de mamíferos fueron hechos en la retina de conejo por López-Enrique en 1926. Desde entonces, se han realizado diversos estudios sobre la microglia en la retina de los mamíferos (Marchesani, 1926; Dubois, 1934; Polyak, 1941; Vrabec, 1968; Gallego, 1976; Boycott y Hopkins, 1981). Pero sorprendentemente se han hecho muy pocos estudios sobre la microglia en las vías ópticas de vertebrados no mamíferos (Goodbrand y Gaze, 1991; Dowding y cols, 1991; Navascués y cols, 1994, 1995, 1996; Marín-Teva y cols, 1998)

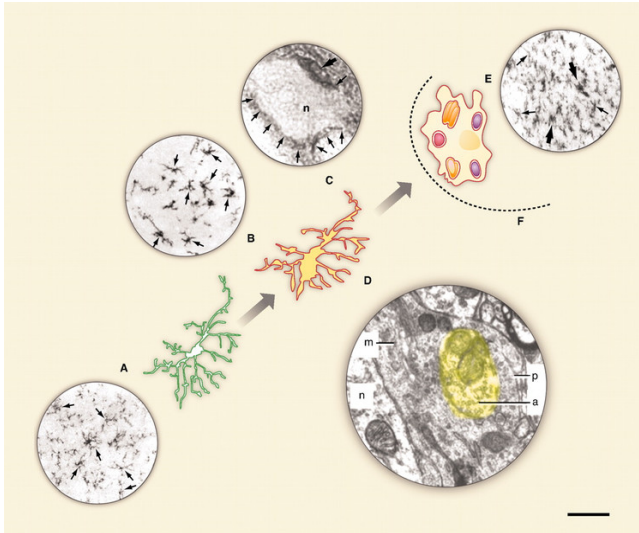


Figura 15. Plasticidad funcional de la microglía en respuesta a lesiones neuronales y adquisición del fenotipo fagocítico.

En los últimos años, la retina de la codorniz ha constituido un modelo eficaz para estudiar y conocer mejor la histología y el desarrollo de las células microgliales en las retinas avasculares de las aves (Navascués y cols., 1994; 1995; Marín-Teva y cols., 1998; Cuadros y cols., 1997).

En la retina de las aves los precursores microgliales migran tangencialmente desde la zona del pecten/CNO hacia la periferia de la retina por la membrana limitante interna, colonizando la superficie retinal, y radialmente hacia las capas plexiformes (Navascués y cols., 1995. Marín-Teva y cols., 1998). Además, existe una migración por el margen ciliar (Marín-Teva y cols., 1999).

Clásicamente se le ha considerado a la microglía como los macrófagos del SNC (Streit y cols., 1999), constituyendo el sistema inmune del SN por su capacidad de respuesta ante la invasión de microorganismos y la eliminación de los restos celulares.

Además, intervienen en la neurogénesis y gliogénesis (Mallat y cols., 1989; Shimojo y cols., 1991). Controlan la proliferación y diferenciación astroglial (Giulian y

cols., 1985 a.b.c), y están envueltas en procesos de apoptosis, en la vasculogénesis y angiogénesis (Streit., 2001)

Muy recientemente se ha sugerido un nuevo papel de la microglía como células madre multipotenciales que dan lugar a neuronas, astrocitos y oligodendrocitos (Yokohama y cols., 2004). Además también se ha demostrado que las células microgliales pueden expresar nestina, A2B5, y O4, los cuales son marcadores para células precursoras de los oligodendrocitos (Yokohama y cols., 2004); Así como 3CB2, que es un marcador para glia radial y astrocitos (Di Wu y cols., 2005).

Existen diversos marcadores ampliamente utilizados para el reconocimiento de las células microgliales, Entre los que destacamos, la lectina del tomate y el anticuerpo QH1 (reconoce microglía en retina de codorniz, pero no en pollo) (Navascues y cols., 1994). En el presente trabajo nosotros mostramos el anticuerpo HIS-C-7, como un marcador específico de microglía y macrófagos de las vías ópticas del pollo.

4.2.-Macrogli

La macroglía incluye a los astrocitos, oligodendrocitos y glia radial; y al igual que el resto de las células del SNC, son de origen ectodérmico. Ambas, neuronas y macroglía se originan a partir de precursores en las capas germinales del cerebro en desarrollo, concretamente en la zona ventricular y subventricular. No obstante, hace unos años se demostró la existencia de precursores separados para neuronas y células microgliales (Raff y cols., 1983; Luskin y cols., 1988; Rao y cols., 1998; Mayer-Proschele y cols., 1997; Shi y cols., 1998).

4.2.1.-Astrocitos

Los astrocitos son las células macrogliales mayoritarias del SNC, descritas por primera vez por Ramón y Cajal (1892) como células de aspecto estrellado con somas pequeños e irregulares y numerosas prolongaciones en sentido más o menos radial (Fig. 16). Las dilataciones que se aprecian en sus extremidades (pies terminales) rodean las superficies de los capilares sanguíneos y se hallan también superpuestos a las membranas neuronales.

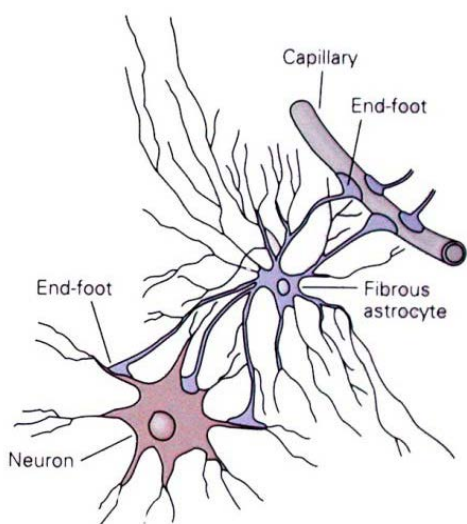


Figura 16. Astrocito fibroso unido a una neurona y a un capilar sanguíneo.

Los astrocitos se caracterizan ultraestructuralmente por tener un núcleo eucromático pálido, redondeado u oval. En su citoplasma presentan gránulos de glucógeno, así como numerosos microtúbulos y abundantes paquetes microfilamentos denominados gliófilamentos.

Uno de los gliofilamentos más importantes, que se extienden tanto por el soma como por las prolongaciones, está constituido por gran cantidad de haces de filamentos intermedios compuestos de proteína ácida fibrilar glial (GFAP) de 51Kda. La presencia de GFAP, permite su identificación mediante técnicas de inmunotinción, revelándose éstas como uno de los métodos más eficaces para su identificación (Bignami, 1984; Shimada y cols., 1992; Baba y cols., 1997). Asimismo, se han sugerido otros marcadores que permiten la identificación de los astrocitos, como la enzima específica glial glutamina sintetasa (GS), la α -isoenzima de enolasa, la proteína de unión a calcio o S-100 y la proteína SC1 (Mckinnon y Margolskee, 1996; Ramírez-Expósito y Martínez-Martos, 1998b).

Clásicamente los astrocitos se han clasificado atendiendo a las diferentes morfologías observadas en (Fig. 17):

- **Astrocitos protoplásmicos (astrocitos tipo-1)**, están localizados preferentemente en la sustancia gris. Son ramificados, con prolongaciones cortas y rugosas.
- **Astrocitos fibrosos o estrellados (astrocitos tipo-2)**, se localizaron fundamentalmente en la sustancia blanca, situándose entre los haces de axones mielinizados. Se caracterizan por tener unas prolongaciones largas, cilíndricas y lisas.

Se ha comprobado que ambos tipos de astrocitos presentan filamentos intermedios pero en distinta proporción (Privat y Rataboul, 1986) constituyendo (Inagaki y cols., 1991) dos poblaciones distintas denominadas astrocitos tipo I y tipo II. Ambas poblaciones, también difieren en sus antígenos de superficie, línea de

desarrollo, sistemas de transporte activo, expresión de receptores y canales iónicos (Inagaki y cols., 1991; Tardy, 1991; Seidman y cols., 1997).

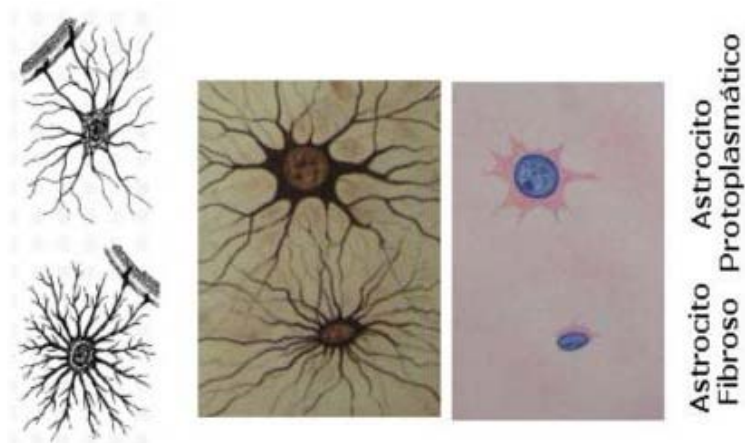


Figura 17. Astrocitos fibrosos y protoplásmicos.

En relación a su origen, se ha sugerido que los astrocitos podrían proceder de la glía radial (Goldman, 1996; Merkle y cols. 2004), mientras que por otro lado, pueden actuar como células madre multipotenciales dando lugar a neuronas y glía (Steindler y Laywell, 2003; Götz y cols., 2005)

En la retina los astrocitos son de origen extrarretinal e invaden la retina desde el nervio óptico junto con los vasos que entran en ella (Stone y Dreher, 1987; Ling y Stone, 1988; Watanabe y Raff, 1988; Chang-Ling y Stone, 1991; Huxlin y cols., 1992), situándose principalmente por la CFNO y la CCG. Su distribución y localización está íntimamente relacionada con los vasos sanguíneos (Stone y Dreher, 1987), estando estos presentes en todas las retinas de mamíferos vascularizadas (Wolter, 1957; Ogden, 1978; Schnitzer, 1987, 1988; Ramírez y cols., 1996; Triviño y cols., 1997).

En las retinas avasculares como las de las aves, no se habían encontrado astrocitos (Meyer, 1977; Reichenbach y cols., 1993), hasta que Prada y cols. (1998) describieron en la CCG y en la CFNO de la retina de pollo una población de células gliales similares a los astrocitos. Estas células expresan el antígeno 3CB2, marcador de glía radial y de astrocitos en cerebro y de la célula de Müller (Prada y cols., 1995).

Inicialmente, los astrocitos se consideraban elementos de soporte pasivo de las neuronas del SNC. Posteriormente se ha comprobado que tienen importantes funciones en el SNC que permiten el adecuado funcionamiento de éste.

Una de las principales funciones de los astrocitos es mantener los niveles de K^+ extracelular contribuyendo al mantenimiento de la homeostasis iónica en el medio; así mismo, mantiene los niveles de aminoácidos como glutamato y ácido γ -aminobutírico (GABA) en el medio extracelular, previniendo de esta forma los procesos de neurotoxicidad (Rothstein y cols., 1996; Ramírez-Expósito y Martínez-Martos, 1998 a, b). También regulan el pH y participan en la captación de determinados neurotransmisores, además, poseen una notoria capacidad de regulación del volumen celular (Fig. 18).

Los astrocitos configuran el espacio sináptico, mantienen una comunicación bidireccional con las neuronas a través de los neurotransmisores y participan en la formación de sinápsis (Ullian y cols., 2001). Además, los astrocitos son células que proporcionan sustratos metabólicos esenciales para el metabolismo neuronal (Magistretti y Pellerin, 1996; Giaume y cols., 1997)

Los astrocitos a diferencia de las neuronas, poseen una elevada actividad glutamina sintetasa (GS), una enzima que convierte el glutamato en glutamina. Los astrocitos al poder liberar glutamato modulan la actividad eléctrica neuronal y la transmisión sináptica (Araque y cols., 2001).

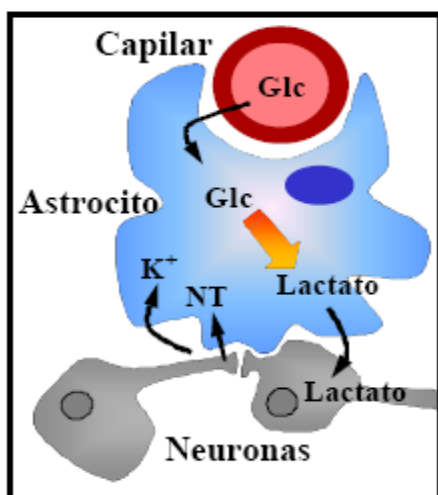


Figura 18. Representación esquemática de la relación citológica entre los astrocitos, las neuronas y los vasos sanguíneos. **Glc:** glucosa; **NT:** neurotransmisores

Conocemos igualmente, que la astroglia estimulan el crecimiento y la supervivencia de las neuronas en cultivos (Manthorpe y cols, 1986; Manthorpe y cols., 1989; Ferrer y cols., 1990 y son los encargados de favorecer la migración neuronal sirviendo de guía para el crecimiento de los axones (Purpura y González-Monteagudo, 1960; Tardy, 1991).

Otra función importante es que los astrocitos juegan un papel central en el metabolismo energético del SNC, ya que son los principales candidatos en el aporte de nutrientes a las neuronas. Los astrocitos tienen acceso a la glucosa (principal fuente de energía del cerebro), que es transportada por la circulación sanguínea, y actúan como intermediarios en su transporte hasta las neuronas. Por lo tanto, el astrocito, a

diferencia de la neurona, es capaz de almacenar la glucosa en forma de glucógeno como fuente de energía (Maher y cols., 1994; Wiesinger y cols., 1997, Ramírez-Expósito y Martínez-Martos, 1998b; Raivich y cols., 1999; Dong y Benveniste, 2001; Chen y Swanson, 2003).

Es importante señalar el papel prominente de los astrocitos en la defensa contra la muerte neuronal mediada por estrés oxidativo (Chen y Swanson, 2003; Takuma y cols., 2004). Además, poseen la función de reparar el tejido dañado en el SNC, cicatrizando las áreas lesionadas, proceso de reparación que se conoce con el nombre de astrocitosis.

4.2.2.-Oligodendrocitos

El nombre de los oligodendrocitos significa “glía poco ramificada” y fueron descritos por Cajal (1892) y por Río-Hortega (1919) como células neurogliales multipolares que interactúan con el soma y el axón de las neuronas del SNC. Estas células sintetizan la mielina que envuelve gran parte de los axones del sistema nervioso (Fig. 19).

Su tamaño es pequeño y posee menos prolongaciones que los astrocitos, el soma es grande y redondeado y posee ramificaciones cortas y finas. A microscopía electrónica presentan un aspecto más oscuro a los electrones que los astrocitos y el citoplasma no contiene filamentos intermedios ni gránulos de glucógeno pero presenta gran número de microtúbulos en sus procesos (Peters y cols., 1991).

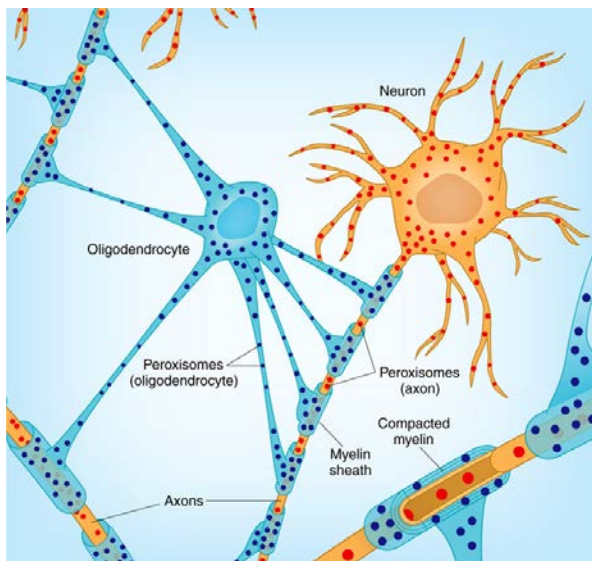


Figura 19. Relación entre un oligodendrocito y las fibras nerviosas mielínicas en el SNC.

Los oligodendrocitos presentan una elevada variabilidad morfológica según su localización y función, describiéndose tres tipos morfológicos (Fig 20):

- **Oligodendrocitos satélites** son de pequeño tamaño, se localizan en la sustancia gris y rodean toda la superficie del cuerpo de algunas neuronas (Rio-Hortega, 1919), lo que sugiere un papel importante en el mantenimiento de la fisiología neuronal.
- **Oligodendrocitos interfasciculares o mielinizantes** tienen un tamaño medio; se localizan en la sustancia blanca donde se disponen paralelos a lo largo de los axones mielinizados; son los responsables del proceso de mielinización durante el desarrollo y se encargan de mantener las vainas de mielina en el adulto.
- **Oligodendrocitos intermedios** se cree que son células precursoras que pueden dar lugar a los dos tipos anteriores, y se distribuyen tanto por la sustancia gris como por la blanca. (Ramírez-Expósito y Martínez- Martos, 1998b; Ness y cols., 2005).

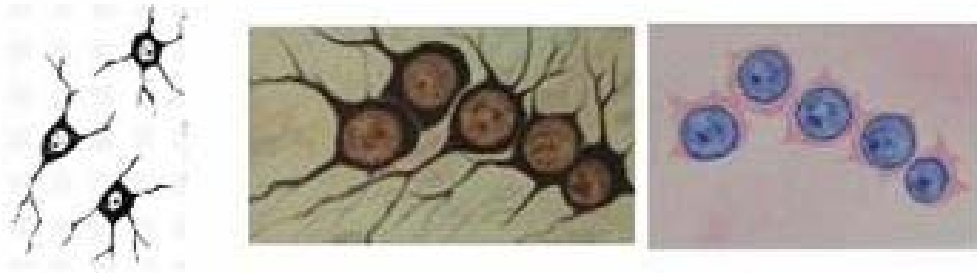


Figura 20. Oligodendrocitos

Los oligodendrocitos se originan de regiones concretas del neuroepitelio del tubo neural (Ono y cols., 1997; Spassky y cols., 1998), donde las células progenitoras se diferencian pasando por diversos estadios intermedios caracterizados por la expresión de distintos antígenos de membrana (Miller, 2002). También parecen generarse de la glia radial (Goldman., 1996. Merkle y cols., 2004) y durante el desarrollo del sistema nervioso son el último tipo de glía en generarse.

La estirpe oligodendrogial está compuesta por una serie de fenotipos celulares que va desde células madre indiferenciadas, las células precursoras de oligodendrocitos (OPC), hasta células maduras formadoras de mielina (Fig. 21).

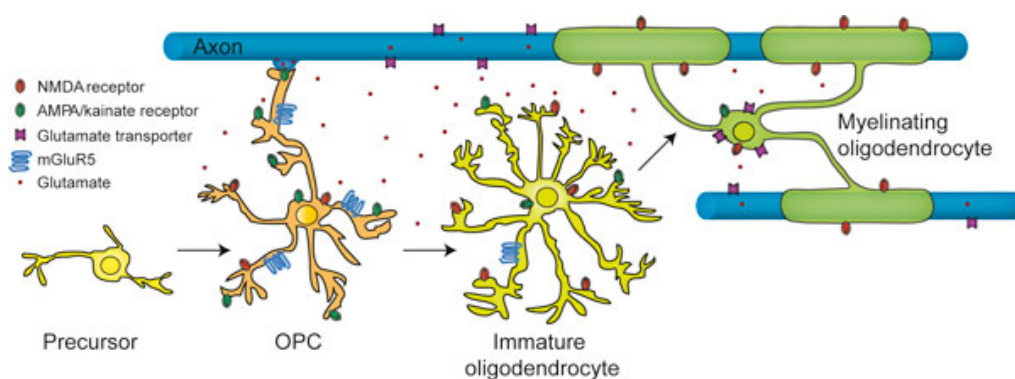


Figura 21. Fenotipos de las diferentes estirpes celulares.

Existen diferentes moléculas (marcadores de superficie e intracelulares) que permiten la identificación de los oligodendrocitos dependiendo de su estado de maduración. Los anticuerpos A2B5, O4 y O1 identifican el progenitor de oligodendrocito temprano (OPC), el progenitor de oligodendrocito tardío y los oligodendrocitos postmitóticos inmaduros respectivamente (Scolding y cols., 1995; 1999; Armstrong y cols., 1997; De Castro y Bribián, 2005). El fenotipo de oligodendrocitos maduros se identifica por la aparición secuencial de antígenos específicos de mielina, como la proteína proteolípídica (PLP), la proteína básica de mielina (MBP) (Ness y cols., 2005), la proteína específica de mielina y oligodendrocitos (MOSP) (Sternberger y cols., 1985) y el galactocerebrósido-C (GALC) (Raff y cols., 1978; Ghandourm y cols., 1980). Otros marcadores específicos de oligodendrocitos son el anticuerpo NG2 (progenitores de oligodendrocitos jóvenes y adultos), Rip, la gelsolina, las anfoterinas P-30 y HMG-1, la isoenzima anhidrasa carbónica II y la transferrina (Ramírez-Exposito y Martínez-Martos, 1998b).

La **principal función** de los oligodendrocitos es la producción de bandas de mielina en el SNC (Maturana, 1960; Peters, 1960; Bunge, 1968; Huber y cols., 1994; Kalwy y Smith, 1994; Slavin y Bernard, 1994; Connor y Menzeies, 1996; Compston y cols., 1997; Couve y cols., 1997; Kramer y cols., 1997; Li y cols, 1997; Martini y Schachener, 1997; Slavin y cols., 1997; Solly y cols., 1997; Vos y cols., 1997).

Las prolongaciones de los oligodendrocitos rodean en forma espiral a los axones de las neuronas formando **La mielina compacta** (Fig.22) que consiste en una membrana condensada, enrollada alrededor de los axones para formar la vaina aislante segmentada que es necesaria para la conducción saltatoria (Bunge, 1968).

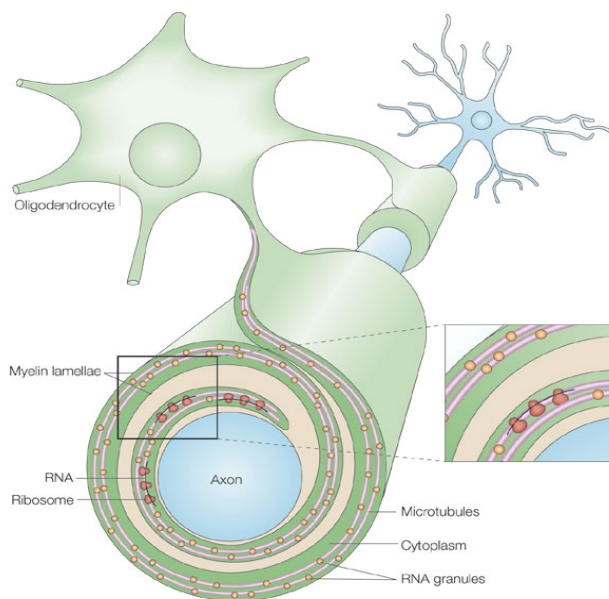


Figura 22. Axón mielinizado por un oligodendrocito.

Copyright © 2005 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Neuroscience

La mielina altera las propiedades eléctricas del axón, incrementando la velocidad de conducción eléctrica del impulso nervioso entre las neuronas y disminuyendo el gasto de energía. La mielina cumple además una función protectora, ya que asegura la continuidad de la conducción del impulso nervioso.

La retina de los mamíferos en general carece de mielina, a excepción de la retina del conejo que tiene mielina compacta, al igual que el resto del SNC, en una pequeña zona cerca de la cabeza del nervio óptico, llamada rayos medulares (Reichenbach y cols., 1988b). En dicha zona se localizan oligodendrocitos mielinizantes en la CFNO y CCG que son similares a los del resto del SNC (Reichenbach y cols., 1988c; Ehinger y cols., 1994; Morcos y Chan-Ling, 2000).

La retina del pollo tiene oligodendrocitos en la CFNO y la CCG del tipo electródenso, también similares a los del resto del SNC (Smith, 1982; Nakazawa y cols., 1993; Fujita y cols., 2001). Los oligodendrocitos mielinizantes de la CFNO se localizan en un área pequeña alrededor de la cabeza del nervio óptico (CNO), mientras que los que están en la CCG son más numerosos pero no mielinizan a los axones (Seo y cols., 2001) y prácticamente no existen en la retina periférica.

Sin embargo, los axones de gran tamaño de las células ganglionares de la retina de las aves están envueltos por una mielina no compacta (Ladman y Soper, 1962; Hughes y La Velle, 1974; Inoue y cols., 1980; Smith, 1982; Prada y cols., 1989b; Yamada, 1989). La retina de los vertebrados no mamíferos tiene un tipo especial de mielina que envuelve a los axones de las células ganglionares de la retina, denominada **mielina laxa** (Villegas, 1960; Pedler, 1963; Kohsaka y cols., 1980; Wolburg, 1980; Smith, 1982; Earster y cols., 1984; Prada y cols., 1989b; Santos y cols., 2006).

En la mielina laxa, que se caracteriza por envolver de forma floja a los axones (Villegas, 1960; Kohsaka y cols., 1980; Wolburg, 1980; Smith, 1982; Santos y cols., 2006), se observa ultraestructuralmente la existencia de espacios intercelulares entre dichas envueltas, hecho que no ocurre en la mielina compacta (Kohsaka y cols., 1980).

Estudios con M/E, realizados en la retina del pollo y de la paloma, han demostrado que la mayoría de las prolongaciones de las células de Müller, están en continuidad con la mielina que envuelve a los axones de las células ganglionares; (Ladman y Soper, 1962; Hughes y LaVelle, 1974; Inoue y cols., 1980; Smith, 1982; Prada y cols., 1989b; Yamada, 1989).

En base a todo lo anterior, se propone que la mielina formada por los oligodendrocitos en la retina del pollo es escasa y está restringida al área más central de la misma, mientras que el resto de la mielina estaría formada por las prolongaciones de la célula de Müller (Seo y cols., 2001).

4.2.3.-Glia Radial

Las células gliales radiales, descritas por primera vez a finales del siglo pasado, son consideradas en la actualidad como un grupo especial de neuroglía que tiene una importancia considerable. Estas células aparecen pronto durante el desarrollo encefálico, a partir de células neuroepiteliales, presentando una característica morfología radial para transformarse después en otros tipos gliales (por ejemplo, astrocitos) a medida que madura el SNC.

Las células de la glía radial son cruciales en el desarrollo del SNC ya que están involucradas en procesos claves, desde el diseño de la citoarquitectura y migración neuronal hasta su reciente papel como precursores durante la neurogénesis (Campbell y Gotz, 2002; Merkle y cols., 2004; Noctor y cols., 2001).

Muchas de estas células poseen una forma alargada, frecuentemente bipolar, con dos o más prolongaciones celulares importantes que se extienden a distancias relativamente largas a través del tejido nervioso y que terminan frecuentemente en las membranas superficiales o en las paredes de los vasos sanguíneos.

Estas células pierden su morfología típica en los estadios adultos excepto en el caso de al menos dos subtipos celulares, la glía de Bergmann en el cerebelo y las células de Müller en la retina.

4.2.4.-Células de Müller

La célula de Müller es un tipo especial de glía radial de origen neuroepitelial, que se encuentra tanto en retinas vasculares como avasculares.

La célula de Müller es la glía predominante de la retina de los vertebrados. Fue descrita por Müller en 1851 quien la describió como “fibra radial”. Inicialmente se pensaba que su papel era meramente estructural; pero en los últimos años, han aparecido numerosos trabajos que tratan de su morfología, fisiología, citología, distribución y diferenciación, descubriendo que es una célula funcionalmente muy importante. Recientemente ha cobrado especial interés, al descubrirse que podrían ser células madre de la retina adulta en regeneración (Dyer y Cepko, 2000; Reh y Fischer, 2001).

4.2.4.1.-Clasificación

La clasificación de las células de Müller siempre ha sido motivo de controversia. Ramón y Cajal (1892) hizo una distinción clara entre astrocitos y células de Müller considerándolas un tipo diferente de neuroglía y clasificándolas como “células epiteliales”.

Sin embargo, son numerosos los autores que consideran a las células de Müller como una célula glial especial capaz de desarrollar funciones y comportarse como astrocitos (Polyak, 1941; Magalhaes y Coimbra, 1973; Holländer y cols., 1991), ya que al igual que éstos, las células de Müller poseen prolongaciones citoplasmáticas finas que engloban los somas y terminales axónicos de neuronas. Contienen numerosas partículas de glucógeno, filamentos intermedios, y expresan marcadores específicos de

astrocitos como la glutamina sintetasa (GS) (Linser y Moscona, 1979;1981; Lewis y cols.,1988; Prada, y cols, 1998) y la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) (Bignami, 1984; Linser y col., 1985; Jones y Schechter, 1987, Nona y col., 1989; Torelli y cols, 1989; Semple-Rowland, 1991; Sassoé y cols., 1992; De Guevara y cols., 1994).

Otros autores han señalado que las células de Müller, presentan también características ultraestructurales de oligodendrocitos, pudiendo mielinizar los axones de las células ganglionares (Rhodes, 1984; Steffanson y cols, 1984; Prada, y cols, 1989a; Moo y cols.,2000) y expresan anhidrasa carbónica, molécula también expresada por oligodendrocitos (Linser y Moscona, 1981; Linser y col., 1984; Lewis y col., 1988; Robinson y Dreher, 1990; Palatroni y col., 1990; Peterson y col., 2001), e incluso pueden desempeñar funciones de microglía (Prada y cols., 1989 a, b).

4.2.4.2.-Distribución

Las células de Müller se distribuyen por toda la retina variando su densidad, desde 16.650 células/mm² hasta 5.600células/mm², en función de las distintas regiones retiniana (Reichenbach y cols., 1995). En los mamíferos, en general se encuentran en mayor proporción en las áreas centrales que en las áreas periféricas (Chao y cols., 1997; Dreher y cols., 1992). A modo de ejemplo mostramos un mapa con las áreas de isodensidad de células de Müller en retina de distintos animales vertebrados (Fig. 23), obteniéndose un patrón de distribución parecido, variando sólo los valores absolutos (Dräger y col. 1984; Newman, 1984; Gaur y cols., 1988).

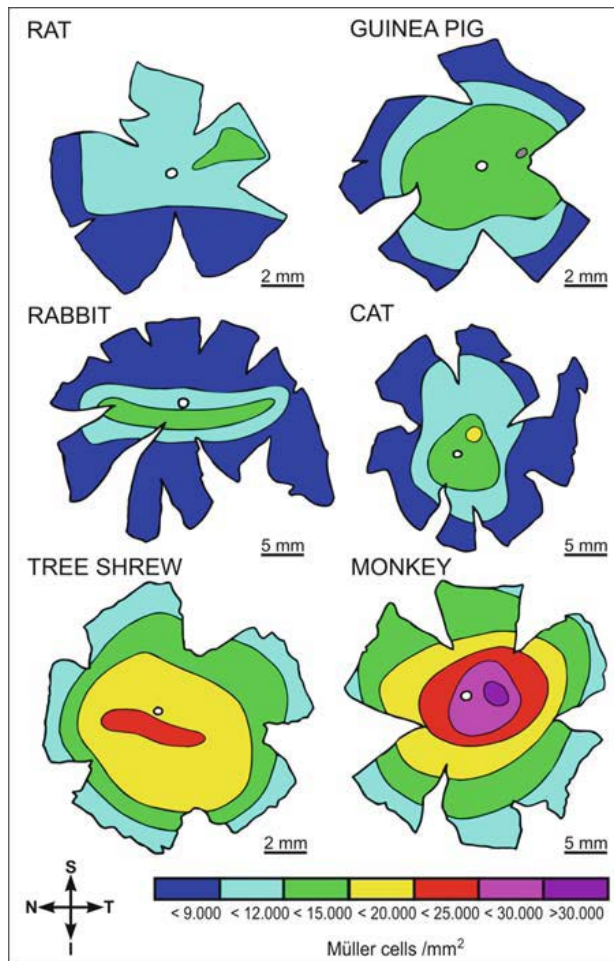


Figura 23. Mapa de distribución espacial de las densidades de las células de Muller en función de las diferentes regiones topográficas de la retina. Las zonas más centrales corresponden a las áreas de mayor densidad de células de Müller. Reichenbach and Robinson (1995).

4.2.4.3.-Desarrollo

Ramón y Cajal (1892) describió en los primeros estadios los glioblastos de la Müller como células elongadas y fusiformes; con somas ovales y dispersos por toda la retina excepto la CCG y la CFNO; sin embargo, cuando progresa el desarrollo los somas se desplazan hacia el centro de la CNI, las prolongaciones alcanzan las dos limitantes y se unen a ellas por engrosamientos. Los contornos se van haciendo más irregulares y su final vítreo aparece bifurcado en algunas células. El extremo de la prolongación ventricular se transforma en un disco del que salen finas prolongaciones que penetran

entre los precursores de los fotorreceptores. Por último, las células crecen en grosor y emiten expansiones laminares (Fig. 24).

Prada y cols., (1991), usando la técnica de autorradiografía y en extensiones de células disgregadas, demostraron en retina de pollo que las células de Müller comienzan a abandonar el ciclo celular muy pronto en E5 y terminan en E11 en toda la retina. Anteriormente, habían demostrado, que las células de la retina periférica llevan un retraso en su desarrollo de entre 2 y 4 días con respecto a la retina central (Prada y cols., 1989b, 1998).

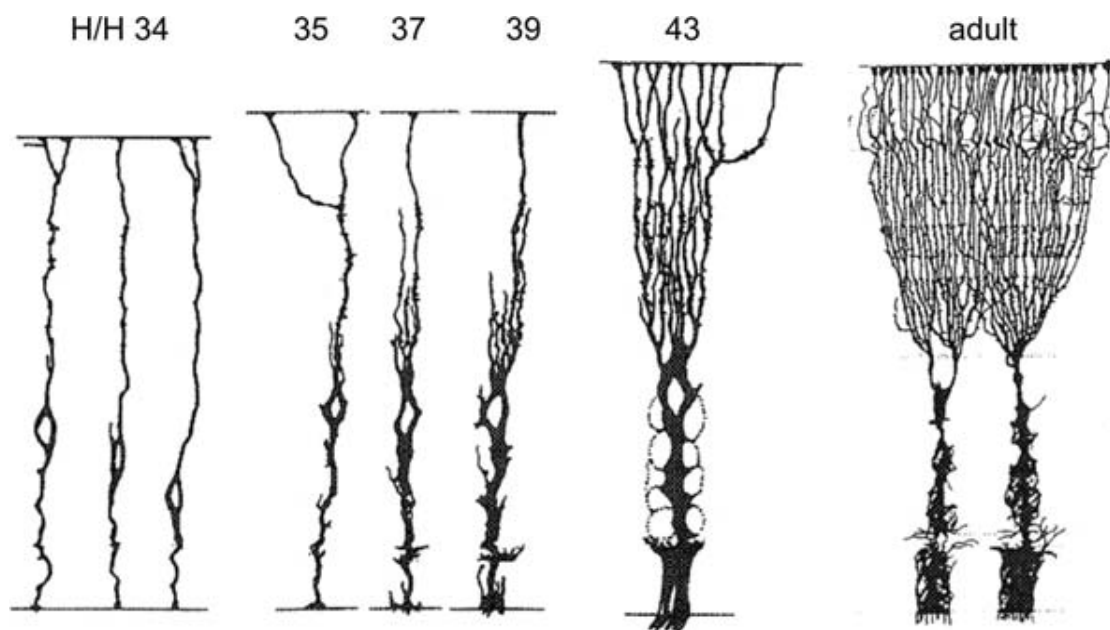


Figura 24. Dibujos en cámara lúcida de las células de Müller de la retina del pollo, teñidas con Golgi, en diferentes estadios del desarrollo según Hamburger/Hamilton (H/H) 34–43 y en el adulto. Muestra como la diferenciación de las células de Müller va acompañada por una creciente complejidad en su forma. Prada y cols. 1989b).

Meller y Glees (1965) estudiaron el desarrollo de la célula de Müller del pollo, mediante microscopía electrónica de transmisión, y encontraron que en E-6 gran parte

de las células son neuroepiteliales sin diferenciar. En E-9 ya se pueden distinguir los glioblastos de la célula de Müller, su porción externa se une con las células adyacentes, aunque hacia el E-18 se sitúan definitivamente en la porción externa. Al mismo tiempo, de esta región externa surgen los *microvilli* que se hacen más numerosos con el tiempo.

Recientemente, mediante la técnica de disgregación celular, Anezary y cols., (2001) descubrieron que la célula de Müller del pollo no termina su diferenciación en estadios prenatales como se pensaba, sino que continúa durante el primer mes de vida.

4.2.4.4.-Morfología

Cajal en 1892, mediante el método de Golgi, estudió con gran detalle la morfología de las células de Müller en la retina de todas las clases de vertebrado, y aunque la estructura básica es similar, cada uno posee características propias (Fig. 25). Las variaciones de la forma entre especies, así como las diferencias de su forma en las capas de una misma retina no son meros adornos, sino que representan las múltiples funciones que esta célula desempeña.

Dentro de la complejidad que presentan estas células, se aprecia que en peces, anfibios y mamíferos son relativamente simples, mientras que en reptiles y aves son más complejas.

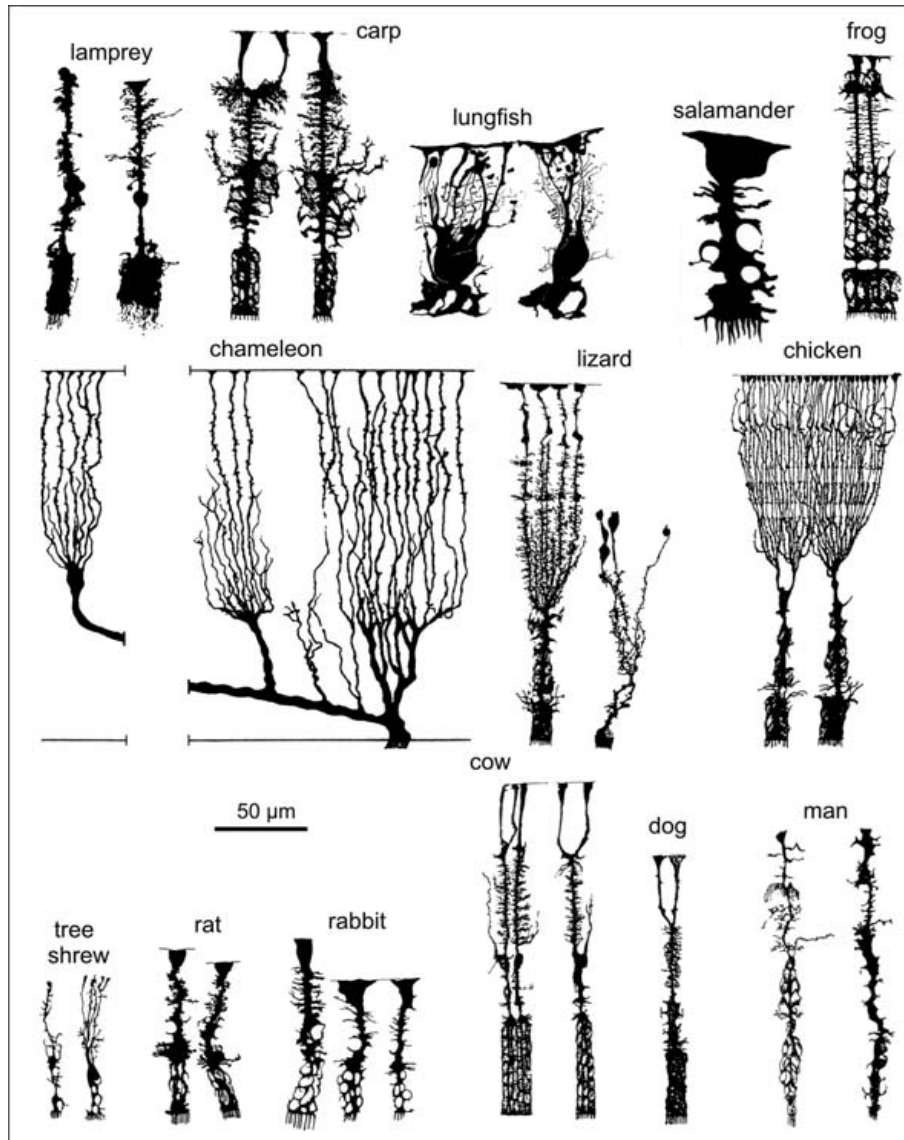


Figura 25. Dibujos en cámara lúcida de células de Müller con tinción de Golgi que muestra la complejidad y la diversidad morfológica en distintas especies de animales vertebrados. (Reichenbach y Wolburg 2005).

En las primeras descripciones realizadas por Cajal (1892), se muestra que la célula de Müller tiene una disposición radial y ocupa todo el grosor de la retina, extendiéndose entre las dos limitantes de la misma. Su soma se encuentra en la capa nuclear interna y las prolongaciones, que parten desde sus dos polos hacia las membranas limitante externa e interna, se denominan prolongaciones ventricular o externa y vitrea o interna respectivamente (FIG. 26).

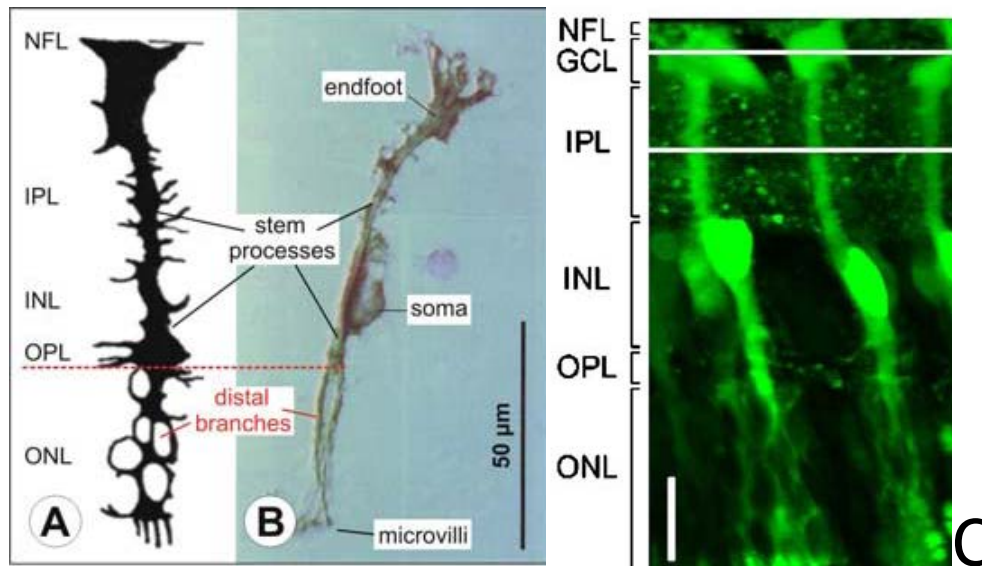


Figura 26. (A, B) Morfología de la célula de Müller de retina de conejo. (A) dibujo cámara lúcida de retinas teñidas con Golgi, (B) células disgregadas enzimáticamente. (C) cortes verticales de retina de cobaya con tinción inmunohistoquímica. En las imágenes se observa la diferente morfología de los procesos que muestran las células de Müller en las diferentes capas de una misma retina. (Reichenbach y cols. 1988a, 1989; Andreas y cols. 2006).

La prolongación ventricular tiene unas características similares en todas las especies. A nivel de la MLE muestra una placa de la que salen *microvilli* hacia el exterior. En la CNE la prolongación es ancha formando una especie de red de expansiones laminares que parecen recubrir completamente los somas de los fotorreceptores, aunque en la lagartija y el pollo no aparece tan claro. A nivel de la CPE la prolongación se estrecha y en algunas especies en esta capa confluyen pequeñas prolongaciones que parten de la célula a nivel del borde interno de la CNE y del borde externo de la CNI.

La prolongación vítrea puede ser simple como en *la carpa, la rana, el buey* o más compleja como ocurre en *los reptiles y las aves*. En el primer caso desde la prolongación vítrea se emiten tangencialmente numerosas prolongaciones pequeñas e

irregulares, principalmente a nivel de la CPI y en ocasiones pueden apreciarse bifurcaciones de esta prolongación a nivel de la CCG. En aquellas especies con prolongaciones vítreas más complejas, se descomponen en varias prolongaciones desde el soma o cerca de él. En éstas también se observan las prolongaciones tangenciales en la CPI.

Tanto en las prolongaciones simples como en las complejas, es frecuente encontrar engrosamientos a nivel de la CCG, además de las bifurcaciones señaladas anteriormente, que a la altura de la MLI forman los llamados " pies terminales o vítreos " que son unos engrosamientos cónicos.

Los estudios de Cajal (1892) han sido completados por otros más recientes utilizando, además del método Golgi, otras técnicas como son la disgregación celular y la inmunohistoquímica (Fig.26). Ejemplos de tales estudios son los realizados: en el conejo (Reichenbach y Wohlrad, 1986; Reichenbach, 1987; Reichenbach y cols., 1989; Robenson y Dreher, 1990), gato (Stone y cols., 1991), musaraña (Reinchenbach y cols., 1995), y pollo (Prada. y cols., 1989a, b).

Prada y col. (1989 a) estudiaron la célula Müller en las diferentes regiones de la retina, y encontraron que en la parte central, las células son largas y estrechas y tienen pies de anclaje vitreos también estrechos. A veces se ramifica a nivel de la CFNO y forma 2 ó más pies vítreos. Cuanto más periférica es la retina, la célula es mucho más corta y gruesa y los pies de anclaje vitreos son también mucho más gruesos y menos numerosos (Fig. 27).

Robenson y Dreher (1990), mediante técnicas inmunohistoquímicas, dedujeron que a nivel de la CNE la prolongación ventricular se divide. Dreher y cols., (1992), encontraron que en retinas vasculares las células son más cortas y presentan prolongaciones vítreas y ventriculares más gruesas; además, las prolongaciones que rodean los somas de los fotorreceptores siguen recorridos más sinuosos que las retinas avasculares.

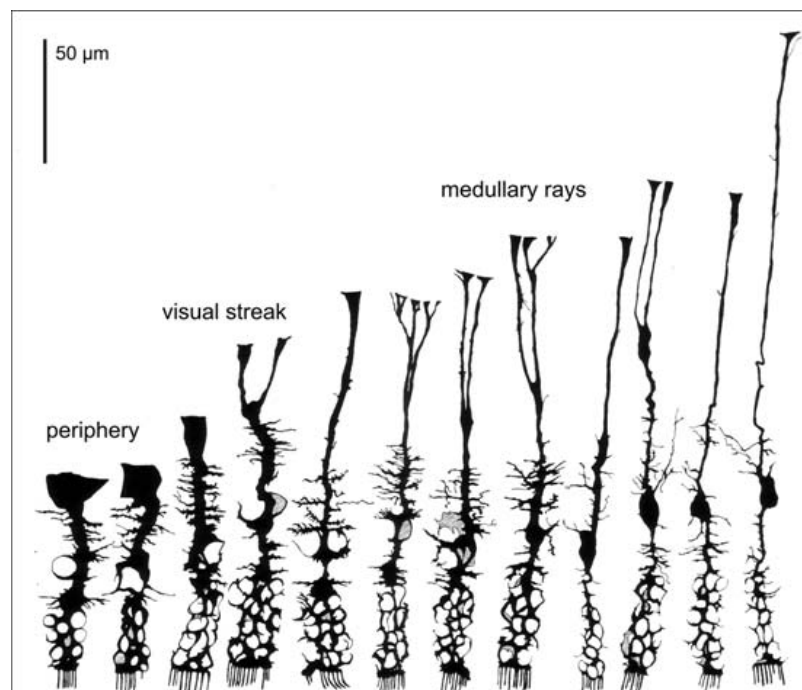


Figura 27. Dibujo en cámara lúcida de células de Müller teñidas con el método de Golgi en distintas regiones de la retina de conejo. A la izquierda está representada la zona más periférica y hacia la derecha la parte más central. (Tomado de Reichenbach y col., 1989a).

A nivel ultraestructural la célula de Müller tienen una morfología bastante coincidentes entre humanos, conejo, rata, tortuga, anfibios, pollo y otras especies (Fine y Zimmerma, 1962; Magalhaes y Coimbra, 1972; Reichenbach y cols., 1988 1995; Rasmussen 1972, 1974; Sarthy y Bunt 1982; Miller y Dowling 1970; Meller y Gless,

1965; Prada. y cols, 1989 b; Uga y Smelser, 1973) Prácticamente todas las células de la retina se hallan recubiertas por prolongaciones o expansiones de la célula de Müller, al igual que los contactos sinápticos de la capas plexiformes.

En la retina de mamíferos se ha descrito que la célula de Müller emite, a nivel interno, pequeñas prolongaciones que forman una especie de corona en torno a los axones de la CFNO con una estructura similar a la de los nódulos de Ranvier, a las que se les denomina “perinodales” (Reichenbach y cols., 1988c).

4.2.4.5.-Citología

La célula de Müller se caracteriza por presentar una distribución no homogénea de los orgánulos, de las proteínas de membrana y del citoesqueleto, variando la distribución de éstos en relación a las capas de la retina (Fig. 28).

A. Membrana plasmática

La distribución de diferentes oligosacáridos de la membrana ha sido estudiada mediante unión de lectinas específicas, empleando células disgregadas. Se detecta un gran número de sitios de unión en la región de los microvilli (Sarthy y cols., 1981; Reichenbach y cols., 1985).

La bomba de Na^+/K^+ (Na^+/K^+ ATPasa) se encuentra también en mayor concentración en la región de los microvilli (Stirling y Sarthy, 1985), así como en las partes de la célula situadas en las capas plexiformes (Reichenbach y cols., 1988a). Otra proteína de membrana que también se distribuye asimétricamente es la $5'$ -

nucleotidasa que se localiza principalmente en la CNE y CPE (Kreutzberg y Hussain, 1982).

LAYERS	STRUCTURES	MOLECULARE CONSTITUENTS
VITREOUS BODY	basal lamina orthogonal arrays	collagen, laminin, etc AQP-4, Kir4.1
NERVE FIBER/ GANGLION CELL LAYERS	coated pits lysosome smooth ER finger-like corona membranous body intermediate filaments β -particles velate sheath	clathrin acid phosphatase glucose-6-phosphatase BB glycogen phosphorylase NADH-diaphorase aldose reductase vimentin glycogen cathepsin B
INNER PLEXIFORM LAYER	β -particles smooth ER polysomes synaptic sheaths intermediate filaments lysosome	vimentin R-/mRNA glycogen BB glycogen phosphorylase NADH-diaphorase aldose reductase, G6PDH glutamine synthetase acid phosphatase cathepsin B LDH, CA II
INNER NUCLEAR LAYER	intermediate filaments velate sheaths granular ER nucleus microfilaments	vimentin NADH-diaphorase LDH, CA II glutamine synthetase DNA F-actin aldose reductase
OUTER PLEXIFORM LAYER	granular ER synaptic sheaths Golgi complex	CA II glutamine synthetase
OUTER NUCLEAR LAYER	microtubules velate sheaths vesicles multivesicular body mitochondria centriole zonulae adherents	tubulin etc \uparrow CA II \downarrow 5'-nucleotidase \uparrow S-100 β \downarrow CRALBP oxidative enzymes
SUB-RETINAL SPACE	microvilli microfilaments	F-actin CRALBP, WGA binding sites

Figura 28. Esquema del estudio de la especialización citotopográfica de la célula de Müller del conejo. Muestra la distribución de los diferentes orgánulos, proteínas de membrana y citoesqueleto a lo largo de la célula de Müller y en relación con las diferentes capas de la retina (Reichenbach, 1989b).

Pero no todo es asimétrico en la célula de Müller, así la glicoproteína asociada a la mielina (MAG), la encontramos distribuida por toda la célula (Stefansson y cols, 1984). Esta proteína es propia de oligodendrocitos y curiosamente su expresión se ha descrito en la retina humana que no se mieliza.

A nivel de la MLE las células de Müller tienen uniones entre sí y con los fotorreceptores. Las uniones más frecuentes observadas son del tipo *zónula adherens* o uniones adhesivas (Reichenbach y Robinson, 1995 b). En conejo existen uniones tipo gap entre astrocitos, oligodendrocitos y células de Müller (Robinson y cols., 1993) que permiten el tráfico de moléculas desde los astrocitos y oligodendrocitos hacia las células de Müller, pero no en sentido inverso.

B. Los orgánulos intracelulares

El núcleo se sitúa en la parte media de la célula, a distintos niveles dentro de la CNI. Su forma general es aproximadamente elíptica, con el eje mayor paralelo al longitudinal de la célula (Rasmussen, 1972; 1974). Muchos autores destacan que tiene una forma algo irregular, como si su perfil se impresionara con la morfología de las neuronas que le rodean (Reichenbach, y cols., 1988a).

Las mitocondrias se distribuyen de distintas formas dependiendo de la especie. Cuando la retina está vascularizada superficialmente se encuentran por toda la célula pero más concentrada en la mitad interna. Cuando la retina es avascular se encuentra en la parte ventricular, cerca de los *microvilli* (Uga y Smelser, 1973a; Rasmussen, 1974; 1975).

El **retículo endoplásmico liso** se concentra a nivel de las capas más internas, mientras que el **retículo endoplásmico rugoso, los ribosomas y el aparato de Golgi** se encuentra en general, en la zona de la CNI, en torno al núcleo (Magalhaes y Coimbra, 1972; 1973; Uga y Smelser, 1973a; Reichembach y cols., 1988a, b). En la porción externa de la célula se encuentran cuerpos multivesiculares (Reichembach y cols., 1988a).

El **glucógeno** que se puede encontrar en las retinas, principalmente en las avascularizadas, (Uga y Smelser, 1973a) tiene su principal almacén en las células de Müller. Su distribución en el conejo es asimétrica, encontrándose el mayor número de gránulos de glucógeno en la parte interna y disminuyendo a medida que nos aproximamos a las capas externas (Magalhaes y Coimbra, 1970)

C. Citoesqueleto

Los estudios ultraestructurales pusieron de manifiesto que la célula de Müller contiene microtúbulos, microfilamentos y filamentos intermedios (Magalhaes y Coimbra, 1972; Uga y Smelser, 1973b). La mayor información en este apartado ha sido obtenida mediante técnicas inmunohistoquímicas.

La **vimentina**, es expresada por las células de Müller de todas las especies de vertebrados, encontrándose asociada a los filamentos intermedios. La **proteína ácida fibrilar glial (GFAP)**, que se encuentra fundamentalmente en astrocitos, también la expresan las células de Müller de la retina de los peces (Bignami, 1984; Linser y cols., 1985; Jones y Schechter, 1987; Nona y cols., 1989; De Guevara y cols., 1994), anfibios (Szaro y Gainer, 1988), réptiles (Sassoé y cols., 1992) y aves (Torelli y cols., 1989;

Chabot y Vincent, 1990; Semple-Rowland, 1991; Sassoé y cols., 1992). El hallazgo de coexpresión de vimentina y GFAP condujo a Bignami (1984) a proponer que los filamentos intermedios de esta célula son heteropolímeros de esas dos proteínas.

Existen controversias sobre la expresión de GFAP por las células de Müller de la retina normal (no lesionada) de mamíferos, sin embargo hay consenso sobre la inmunoreactividad positiva para GFAP de las células de Müller de las retinas de mamíferos lesionadas o en degeneración (Bignami y Dahl, 1979; Shaw y Weber, 1983; Lewis y cols., 1989; Reinchenbach y cols., 1992; Rungger-Brändle y cols., 2000).

En tinciones inmunohistoquímicas contra filamentos intermedios de la célula de Müller, la máxima intensidad de marcaje se observa en la zona de la CFNO y disminuye en las capas más externas.

Además de filamentos intermedios, también se han identificado algunas proteínas asociadas al citoesqueleto como la proteína S-100 en las células de Müller de los mamíferos (Cocchia y cols., 1983; Kondo y cols., 1983) pero no en la de pollo (Linsler y Moscona, 1981).

Las células de Müller expresan proteínas asociadas a microfilamentos de actina (F-actina) que se distribuyen principalmente por el *microvilli* en pollo (Williams y cols., 1990; Arikawa y Williams, 1991), en ratón (Woodford y Blanks, 1989), en rata (Lucian y cols., 1987), en conejo (Vaughan y Fisher, 1987) y en humano (Woodford y Blanks, 1989) entre las que encontramos la: filamina (Lemon, 1986), gelsolina (Legrand y cols., 1991), vilina (Hofer y Drenckhahn, 1993), ezrina (Hofer y Drenckhahn, 1993; Kivela y cols., 2000) actinina α (Arikawa y Williams, 1991) y miosina (Williams y cols., 1990).

Por último, se han obtenido varios anticuerpos que marcan compuestos fibrilares de las células de Müller, y por tanto, es presumible que sean proteínas del citoesqueleto.

Entre ellos están los monoclonales R4 y R5 (Drager y cols., 1984) que reconocen antígenos que podrían estar relacionados con filamentos de vimentina. El monoclonal 3CB2 (Prada y cols., 1995) marca intensamente toda la célula de Müller en varias especies de vertebrados, al igual que los axones de las células horizontales de la retina de pollo. La proteína que reconoce tiene un peso molecular similar al de la vimentina. Por todo esto, se propone que el antígeno 3CB2 podría ser una proteína asociada a filamentos intermedios.

4.2.4.6.-Función

Al ser la célula de Müller el único tipo de glía en la retina de muchas especies y el tipo predominante en todas, podría ser por lo que debe asumir funciones (Fig. 29) propias de aquellas células de la neuroglia presentes en otros territorios del SNC pero que se adolecen en la retina.

A. Función de soporte y aislamiento

La primera función que se asignó a la célula de Müller fue la meramente estructural, proveer a la retina de una especie de trama interna que soporte su compleja arquitectura.

Paralelamente se hizo especial hincapié en su función de aislamiento de las neuronas. Las prolongaciones las células de Müller rodean casi totalmente los somas

de algunas neuronas (Ramón y Cajal, 1892); aíslan los contactos sinápticos en las capas plexiformes (Ramón y Cajal, 1892; Meller y Glees, 1965) y también rodean los vasos sanguíneos (Kondo y cols., 1983; Hollander y col., 1991).

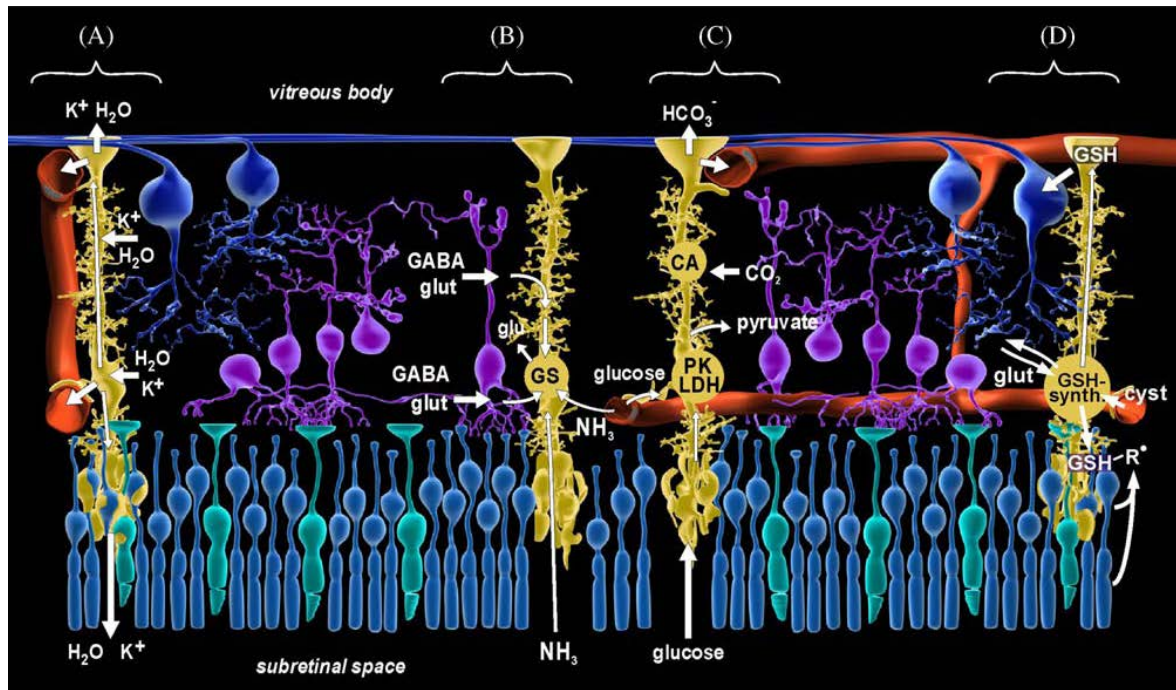


Figura 29. Esquema que muestra la importancia de la interacción entre neuronas-células de Müller de retinas normales y las principales funciones que realizan. **(A)** Regulación o amortiguación (homeostasis) espacial de los iones K⁺ y agua **(B)** reciclaje de neurotransmisores **(C)** simbiosis metabólica/mantenimiento del pH extracelular. **(D)** metabolismo de glutatión/basurero de radicales libres. **CA**, Anhidrasa carbónica; **cyst.**, cisteína; **GABA**, Ácido gamma-aminobutírico; **glut**, Glutamato; **GS**, Glutamina sintetasa; **GSH**, glutatión; **LDH**, Lactato deshidrogenasa; **PK**, Piruvato quinasa; **Rd**, Molécula de radical libre. (Andreas y cols. 2006)

A partir de las prolongaciones internas de las células de Müller se originan las vainas de mielina que en la capa de fibras del nervio óptico (CFNO) se observan alrededor de algunos axones en las porciones más próximas al nervio óptico. (Ladman y Soper, 1962; Hughes y la Velle, 1975; Prada y cols., 1989).

B. Función nutritiva y metabólica

Clásicamente se le ha adjudicado a las células de Müller un importante papel nutricional, por el hecho de poseer abundantes *microvilli* (Uga y Smelser, 1973 a, b), por ser el principal almacén de glucógeno de la retina (Magalhes y Coimbra, 1970) y por tener vesículas picnóticas en su superficie (Prada y cols., 1989)

Relacionado con el *metabolismo de la glucosa* (Fig.29) se ha descrito la existencia de las proteínas transportadoras de glucosa por difusión facilitada en células de Müller de retinas humanas y de rata (GLUT1 y GLUT-2). Así mismo, se ha demostrado la presencia de la enzima glucógeno fosforilasa, esencial en la movilización de las reservas de glucógeno (Ohanian, 1972; Pfeiffer y cols., 1994).

También, se ha propuesto que podrían contribuir a regular el flujo sanguíneo mediante la liberación de óxido nítrico el cual tiene acción vasodilatadora (Liepe y cols., 1994).

Parece también desempeñar una importante función en el metabolismo de la vitamina A (11-trans retinal), esencial para el proceso de fototransducción, pues es la única célula de la retina neural en la que se localiza la proteína ácida ligante de retina (Bunt-Milam y Saari y col., 1983) y la proteína celular ligante de retinol (Bok y col., 1984).

C. Mantenimiento de la homeostasia retiniana

Dentro de esta función están involucrados varios procesos en los cuales la célula de Müller juega un papel fundamental (Fig.29).

La célula de Müller **regula la concentración de K⁺ extracelular** en la retina (Newman, 1984, 1985 Newman y Reichenbach, 1996). La actividad neuronal genera un aumento de la concentración de K⁺ extracelular en la CPE y CPI, y una reducción de la misma en la parte más externa de la retina (Karwoski y Proenza, 1977; Steinberg y cols., 1980). Las células de Müller toman del espacio extracelular el exceso de K⁺ generado por la actividad neuronal y lo vierte principalmente al vítreo, pero también al espacio subretinal.

La célula de Müller juega un papel muy importante en la **retirada de neurotransmisores** liberados en la transmisión sináptica, lo que contribuye a eliminar la excitabilidad neuronal. Esta célula posee sistemas de captación de varios neurotransmisores y/o neuromoduladores como es el caso del glutamato, GABA y taurina. También se han encontrado sistemas enzimáticos para la inactivación y/o degradación del glutámico, GABA y acetilcolina

En el caso concreto del glutamato éste después de ser liberado por las neuronas es captado por estas células y amidado a glutamina. Esta transformación es catalizada por la enzima glutamina sintetasa (GS) (Hamberger y cols., 1979).

El **mantenimiento del pH extracelular** es otra función de la célula de Müller importante para la homeostasia de la retina. Cambios muy pequeños de pH extracelular producen una reducción sustancial en la transmisión sináptica.

Conocemos que las células de Müller poseen grandes cantidades de anhidrasa carbónica (Musser y Rosen, 1973; Sarthy y Lam, 1978; Linser y Moscona, 1981), lo que indica la importancia de esta célula en el equilibrio ácido-base de la retina. Como es

sabido esta enzima cataliza la reacción de hidratación (H_2O) del CO_2 para formar el ácido carbónico (CO_3H_2), el cual se disocia en H^+ y HCO_3^- , eliminándose así el exceso de CO_2 generado en el metabolismo de las células de la retina.

También relacionada con la homeostasia está la capacidad de inducir la **formación de la barrera hemato-retinal** en las retinas vascularizadas; según algunos autores (Tout y col., 1993) estudios realizado en conejo, las células de Müller pueden inducir la formación de la barrera, aunque otros autores (Small y col. , 1993) estudios realizado en cobaya, no han observado tal inducción.

Por otra parte, la célula de Müller está implicada en los procesos de **respuesta a lesiones**, pues experimenta cambios morfológicos, celulares y moleculares (proteínas de citoesqueleto, enzimas) significativos cuando hay situaciones anormales u ocurren lesiones en la retina. Algunos cambios están relacionados con la cicatrización de heridas y reparación del tejido, mientras otros reflejan la participación de la célula de Müller en proteger a la retina de un daño mayor (Madeperla y cols., 1994). Además la célula de Müller puede producir óxido nítrico (Goureau y col., 1994; Liepe y cols., 1994), una de cuyas posibles funciones es la participación en procesos de defensa o de respuesta a lesiones.

Desde principios del siglo pasado se sabe de la capacidad fagocítica de esta célula (Friedenwald y Chan, 1932); posteriormente se descubrió que se convierte en fagocito muy intenso cuando entran partículas extrañas a la retina como el carbón, o cuando por hemorragia se destruyen eritrocitos y tejido retinal (Rosenthal y Appleton, 1975; Koshibu, 1978; Algvere y Kock, 1983; Mano y Puro, 1990).

D. Papel en la migración celular durante el desarrollo de la retina

Diversos autores (Bhattacharjee y Sanyal, 1975; Meller y Tezlaff, 1976; Prada y cols., 1989b; Reichenbach y cols., 1992, 1994) sugieren que las células de Müller pueden jugar durante el desarrollo de la retina un papel similar al adjudicado a la glía radial en el desarrollo del SNC, especie de raíles a los que se adhieren determinados neuroblastos para emigrar (Rakic, 1972). Es notoria la semejanza entre los glioblastos de Müller en sus primeros estadios y la glía radial de otras zonas del SNC en desarrollo.

E. Mecanismo de comunicación con las neuronas

En la célula de Müller se han descrito varios tipos de canales y receptores que podrían servir como mecanismos de comunicación entre neuronas y glía o como sensores de actividad neuronal.

En retinas vascularizadas puede haber comunicación entre la célula de Müller y otros tipos de glía de la retina, como se sugiere por la presencia de uniones tipo *gap* entre astrocitos y células de Müller (Robinson y cols., 1993).

Un claro ejemplo de interacción entre neuronas y células de Müller lo constituye la expresión de glutamina sintetasa, de hecho esta enzima no se expresa cuando se impiden estas interacciones (Linser y Moscona, 1979; Linser y Perkins, 1987; Grosche y cols., 1995), además esta necesidad parece estar restringida al periodo crítico de la diferenciación y el crecimiento.

5.- MARCADORES GLIALES y NEURONALES

A lo largo de los últimos años, los anticuerpos monoclonales han sido extensamente utilizados en el estudio del SNC como marcadores inmunológicos para el estudio de las neuronas y las células gliales (Valentino y cols., 1985). Su uso ha permitido la caracterización molecular y la determinación de los patrones de distribución de diferentes clases de neuronas y glías del SNC adulto y en desarrollo. También existen marcadores histoquímicos, clásicamente utilizados para la identificación de diferentes poblaciones celulares. En el presente estudio hemos utilizado los siguientes marcadores:

5.1.-Marcadores de astrocitos y células de Müller.

5.1.1.-Anticuerpo que reconoce GS

La principal vía para la propagación de la señal visual es la glutamatérgica (Ehinger, 1989; Massey, 1990; Barnstable, 1993). Por lo tanto, el glutamato es el mayor neurotransmisor excitador del SNC. La localización inmunohistoquímica de las células glutamatérgicas se ha realizado en numerosas estructuras neuronales tales como el hipocampo (Storm-Mathisen y cols., 1986), cerebelo (Somogyi y cols., 1986) y retina (Ehinger, 1977; Ehinger y cols., 1988).

Estudios inmunohistoquímicos revelan la presencia de glutamato en los fotorreceptores, células bipolares y ganglionares de la retina (Brecha, 1983; Massey y Redburn, 1987; Kageyama y Meyer, 1989; Marc y cols., 1990; Massey, 1990; Van

Haesendonch y Missotten, 1991; Cardoso y cols., 1991; Crooks y Kolb, 1992; Kalloniatis y Fletcher, 1993).

La **glutamina sintetasa** es fundamentalmente una enzima glial (Bito y cols., 1977; Norenberg y Martínez-Hernández, 1979; Patel y cols., 1982).

El glutamato, liberado por las neuronas, es captado por las células gliales para su transformación mediante la acción de la enzima GS. La función de la GS es la de convertir el glutamato que se absorbe continuamente desde el espacio extracelular, en glutamina que se difunde fácilmente desde la glía al espacio circundante. La glutamina, al contrario que el glutamato es fisiológicamente inactiva y puede acumularse en el líquido intersticial hasta concentraciones relativamente altas. Al mismo tiempo que la glutamina se forma en las células gliales, se extrae amoníaco (Benjamín y Quastel, 1975). Así pues el metabolismo del amoníaco en el tejido nervioso resulta controlado de forma particular por esta enzima.



De esta forma las células gliales se encuentran involucradas en sistemas importantes de homeostasis del amoníaco y los intercambios intercelulares de glutamato y glutamina. También cumple una importante misión como regulador en el medio de los neurotransmisores glutamato y γ -aminobutírico (GABA).

Es sabido que los corticosteroides juegan un papel importante en la inducción de enzimas en las células animales (Vento y cols., 1987,). Por tanto, glucocorticoides administrados de forma exógena, como el cortisol, pueden influir en el desarrollo de la retina, actuando como sustancias inductoras de la actividad GS en estadios

tempranos del desarrollo de la retina del embrión de pollo. (Prada y cols.; 1998). Pero para la inducción de la GS, se requiere además una interacción específica neuronaglíica mediada a través de contactos celulares (Linser y Moscona, 1979; Vardimon y cols., 1988; Hayashi y cols., 1988; Wu y cols., 1988; Mearow y cols., 1990; Prada y cols., 1998).

De la misma forma, la expresión de GS puede verse claramente disminuida si utilizamos agentes inhibidores de corticoides como pueda ser la metopirona.

La GS en un principio pareció estar restringida a los astrocitos del SNC tanto *in vivo* (Martínez- Hernández y cols., 1977; Norenberg, 1979; Norenberg y Martínez- Hernández, 1979; Roots, 1981; Patel y cols., 1982; Norenberg, 1983, De vellis y cols., 1986; Mearow y cols., 1989) como *in vitro* (Juurlink y cols, 1981).

Posteriormente se observó que también existía inmunorreactividad GS en los oligodendrocitos de rata en distintas partes del SNC (D'Amelio y cols, 1990; Cammer, 1990)

En la retina, la GS se expresa en las células de Müller (Riepe y Norenberg, 1977; Linser y Moscona, 1979; Moscona y cols., 1980; Norenberg y cols., 1980; Linser y Moscona, 1983; Pow y cols., 1993). Durante el desarrollo de la retina del pollo, Prada y col. (1998) observaron inmunotinción GS no sólo en la célula de Müller, sino también en células posiblemente gliales ubicadas en la capa de células ganglionares y en la capa de fibras del nervio óptico.

En el caso de la retina en desarrollo, la GS muestra un incremento de actividad paralelo al desarrollo morfológico de la célula de Müller (Olney, 1968; La Vail y Reif-Lehrer, 1971; Chader, 1971; Moscona, 1972)

5.1.2. Anticuerpo 3CB2

El anticuerpo monoclonal 3CB2 se aisló de la fusión de células de mieloma y linfocitos de ratón inmunizados con extractos de cerebro completo de pollo recién nacido. Una vez obtenido el anticuerpo, mediante estudios bioquímicos e inmunohistoquímicos, se caracterizaron los patrones de tinción durante el desarrollo de pollo (Prada y cols., 1995). Dicho anticuerpo reconoce un antígeno que es una proteína citoplásmica de 55KDa, cuyo patrón de tinción, asociado a estructuras citoesqueléticas, sugería que podría ser una proteína asociada a filamentos intermedios.

La proteína que reconoce 3CB2 tiene un peso molecular similar al de vimentina, pero su patrón de marcaje en secciones es distinto al obtenido con los anticuerpos anti-vimentina comerciales, Prada y cols., (1995).

El antígeno reconocido por el anticuerpo monoclonal 3CB2, se expresa exclusivamente en células en ciclo, astrocitos y glía radial en todo el SNC de distintas especies de vertebrados. Por añadidura, dicho antígeno no se expresa ni en células microgliales, ni en oligodendrocitos.

Se ha estudiado la expresión del antígeno 3CB2 en la retina de diferentes vertebrados y el patrón de inmunotinción marca intensamente las células de Müller

desde el día embrionario 7'5-8, y en la retina de *pollo* marca también los axones de las células horizontales.

5.1.3.-Anticuerpo que reconoce GFAP

La **proteína gliofibrilar acida** (GFAP), de 50 kDa (Albert y cols., 1996), fue descubierta al analizar muestras de esclerosis múltiple (Eng y cols., 2000). Forma parte de los gliofilamentos de células astrogliales, glía de Bergmann y glía radial en vertebrados (Ghandour y cols., 1983; Eng. 1980; Levitt y Rakic., 1980; Dahl y cols., 1985; Monzón-Mayor y cols., 1990 1998; Yanes y cols., 1990), así como en los endimocitos (Bodega y cols, 1990; Didier y cols., 1986; Rubio y cols., 1992). Es una proteína del citoesqueleto, que modula la forma y movimiento de los procesos astrocitarios. Se desregula frente a lesiones y traumatismos, sobreexpresándose y produciendo astrogliosis (Bignami y Dahl., 1979; Latov y cols. 1979; Nathaniel y Nathaniel., 1977; Hozumi y cols., 1990). Juega un papel importante en el mantenimiento de la mielina (Liedtke y cols., 1996) y participa en la formación de la barrera hematoencefálica en el SNC (Pékny y cols., 1998).

Recientemente se ha descrito la GFAP en células progenitoras neuronales (Laywell y cols., 2000; Malatesta y cols., 2000; Campbell y Gótz., 2002).

En relación a la retina, la GFAP en mamíferos se ha observado en astrocitos (Schnitzer., 1988; Huxlin y cols., 1992; Distler y cols., 1993; Karim y cols., 1996) y los pies de las células de Müller (Bjóklund y Dahl., 1985; Stone y Dreher., 1987; Ekstróm y cols., 1988; Lewis y cols., 1989; Huxlin y cols., 1995). También se expresa en el nervio óptico (NO) postnatal cuando ocurre la mielinización (Dahl, 1981).

En vertebrados no mamíferos, se ha observado en células de Müller en teleósteos, anfibios, reptiles y aves (Sassoe y cols., 1992). En el reptil *G. galloti*, la GFAP se ha observado en astrocitos del nervio óptico y en los pies vitreales de las células de Müller (Sassoe y cols., 1992, Casañas, 2005). En peces, marca las células de Müller de la retina (Velasco, 1994) y la limitante glial de la cabeza del nervio óptico (CON) (Lillo y cols., 1998; Parrilla y cols., 2009); pero no la expresa la astrogliá del NO (Dahl y Bignami, 1982). En la retina de pollo, la GFAP aumenta su expresión durante el desarrollo en las células de Müller (Semple-Rowland., 1991).

5.2.-Marcadores de oligodendrocitos y mielina

5.2.1.-Anticuerpo que reconoce MOSP

La mielina producida por los oligodendrocitos en el SNC y por las células de Schwann en el sistema nervioso periférico (SNP) altera las propiedades eléctricas del axón incrementando la velocidad de conducción de su potencial de acción. Tanto la mielina del SNC como la del SNP tiene en común que comparte una variedad única de lípidos y proteínas (Lees y Brostoff, 1984; Lemke, 1988) ambos tipos de mielina se diferencian en que la mielina del SNC es la única que expresa específicamente unas proteínas determinadas (Lee y Brostoff, 1984; Lemke, 1988; Mikol y cols., 1990; Linington y cols., 1984). Este hecho fue estudiado por Dyer y col. (1991) quienes describieron una nueva proteína de superficie de membrana, con un peso molecular de 48 kDa, que se expresa solamente en la mielina del SNC y en los oligodendrocitos de los vertebrados superiores: la proteína específica de mielina y oligodendrocitos (MOSP). Quesada y cols. (2011) mostraron que las células de Müller

también expresan MOSP. A nivel de la retina del pollo adulto, MOSP se encuentra mayoritariamente en las prolongaciones internas de las células de Müller y en las terminaciones axónicas de las células horizontales.

Los resultados de trabajo de Dyer y col. (1991) sugieren que MOSP juega un importante papel en las interacciones de las membranas del citoesqueleto durante la formación y el mantenimiento de la mielina del SNC. Así mismo, MOSP juega también un papel crucial en los desordenes patológicos en la mielina del SNC.

5.2.2.-Otros marcadores de oligodendrocitos y mielina

Existen también, otros marcadores con los que se pueden identificar a los oligodendrocitos en diferentes estados de maduración. Así podemos destacar, al anticuerpo A2B5, que es un marcador de precursores gliales tempranos y de preoligodendrocitos. Como marcador de oligodendrocitos maduros, tenemos el anticuerpo MAG, que reconoce a una glicoproteína asociada a la mielina. Finalmente, mencionamos el anticuerpo que reconoce galactocerebrósido β -galactosidasa-galactosilceramidasa (GalC), que permite la identificación de los axones mielínicos.

5.3.-Marcadores microgliales

5.3.1.-Anticuerpo His-C7

La mayoría de los estudios sobre las células microgliales han sido publicados en relación con diferentes áreas del SNC de los vertebrados y con la retina de los mamíferos. Sólo unos pocos estudios han sido publicados en relación con las retinas de los vertebrados no mamíferos (Goodbrand y Gace, 1991; Dowding y cols., 1996). En los

últimos años la retina de la codorniz ha sido usada como modelo para estudiar y arrojar luz sobre la histología y el desarrollo de las células microgliales en retinas avasculares de las aves (Navascués y cols., 1994; 1995; Marín-Teva y cols., 1998) El anticuerpo QH1 que reconoce específicamente la microglía en la retina de la codorniz no es eficaz en la retina del pollo. Estudios recientes en la retina del pollo (Prada y cols trabajo en vías de publicación) han demostrado que el anticuerpo monoclonal HIS-C7, que reconoce un determinante antigénico presente en leucocitos de pollo (Jeurissen y cols., 1988), identifica con seguridad a las células microgliales de la retina del pollo.

5.3.2.-Lectina. *Lycopersicon Esculentum* (LEA)

Las lectinas, son proteínas que se unen a secuencias específicas de monosacáridos, intervienen en el reconocimiento celular (Paniagua., 2002) y son marcadores de células microgliales (Mannoji y cols., 1986; Streit y Kreutzberg., 1987; Suzuki y cols., 1988; Streit., 1990; Kaur y cols., 1990; Boya y cols., 1991, Acarín y cols., 1994; Dalmau y cols., 2003; Nagai y cols., 2005; Park y cols., 2005).

Esta técnica utiliza la tinción histoquímica con *Lycopersicon esculentum* (LEA) como marcaje específico de células microgliales, y está basada en la afinidad que presenta la lectina obtenida del tomate por determinados residuos glucosilados que se encuentran en la membrana citoplásmica de las células microgliales. Reconocen selectivamente residuos de D-galactosa tanto en las formas ramificadas como en las ameboides de la microglía.

La lectina de tomate (LEA), con afinidad por residuos de azúcar de poly-N-acetil lactosamina, ha permitido la identificación de células microgliales en el cerebro de

ratas postnatales y adultas (Acarín y cols., 1994) y durante el desarrollo del telencéfalo y mesencéfalo en el lagarto *G. galloti* (Plaza y cols., 2004). También, se han detectado células LEA-positivas durante la regeneración de la vía óptica en peces (Velasco y cols., 1995; Jimeno y cols., 1999) y del lagarto *G. galloti* (Romero-Alemán y cols., 2004).

5.4.-Marcadores Neuronales

5.4.1.-Anticuerpo 3BA8

3BA8 es un anticuerpo monoclonal que reconoce una proteína de aproximadamente 50 KDa, que se localiza en la superficie de la célula, y se expresa mayoritariamente en neuronas de asociación a nivel del S.N.C. y en otros tejidos como las células del epitelio olfatorio (estos datos son parte de un trabajo en preparación sobre la caracterización morfológica y bioquímica del antígeno que reconoce 3BA8).

El anticuerpo monoclonal 3BA8 identifica una molécula que, en la retina adulta es expresada sólo por una población de células amacrinas (De la Rosa y cols., 1994). En la retina del pollo es expresada intensamente por la capa plexiforme interna, con una débil expresión en la capa de células amacrinas (Quesada y cols., 2004).

6.- ORGANIZACIÓN GLIAL DE LA PAPILA DE LOS VERTEBRADOS

El nervio óptico (NO) de vertebrados es una estructura del sistema visual que conecta la retina neural con los centros diana en el mesencéfalo, diencefalo y telencéfalo. El NO se ha dividido en diferentes regiones para su estudio en función de los distintos grupos de vertebrados.

En este trabajo nos vamos a centrar únicamente en el estudio de la región intraocular o disco óptico (DO) que es una zona de transición entre la retina y la región extraocular o nervio óptico propiamente dicho, y más concretamente en la región del margen del disco óptico; zona limítrofe entre la retina y la cabeza del nervio óptico (CON).

En la parte posterior del globo ocular, la retina se continúa con el nervio óptico, mediante el disco óptico (papila óptica). Se trata de una zona especializada en la que las capas de células de la retina se interrumpen para dejar pasar los axones de las células ganglionares en su camino para formar el nervio óptico.

La papila es un área de forma circular u oval localizada en el centro de la retina que mide aproximadamente 2 x 1.5 mm y que carece de fotorreceptores (denominado punto ciego). En la porción central de la papila o cabeza del nervio óptico (CON), se encuentra situada la arteria central de la retina de la que emergen los vasos sanguíneos que llegan a las retinas vasculares.

En general, la zona del disco óptico (DO) está formado por los axones de las células ganglionares, células gliales, vasos sanguíneos y tejido conjuntivo (Bunt, 1982; Levine, 1989; Maggs y Scholes, 1986; 1990; Tapp, 1973; Wolburg, 1981); jugando un papel fundamental tanto en el desarrollo del sistema visual, como durante el crecimiento y la regeneración. En esta zona se observa un elevado número de células gliales, cuya tipología presenta variaciones en los distintos vertebrados, y en cada grupo, tiene una organización y características particulares.

En mamíferos, concretamente humanos, en la zona de papila, entre las fibras

del nervio óptico y el resto de los tejidos (vítreo, retina, coroides y esclera), se observan bandas de células gliales que forman las denominadas membranas limitantes. Dichas membranas están constituidas por astrocitos (Ramírez y cols., 1994), con distribución y tipología diferente, lo que sugiere distinta especialización y gran heterogeneidad (Ramírez y cols., 1994; Salazar y cols., 1998; Triviño y cols., 1996; Ye y Hernandez, 1995). Se ha observado que en el cerdo, el tejido intermediario de Kuhnt está formado principalmente por células de Müller y probablemente astrocitos adosados (Hirata y cols., 1991).

En humanos, es importante destacar que los astrocitos muestran variaciones en sus características citoplasmáticas dependiendo de su localización en el DO. En zonas cercanas a la CFNO tienen poca cantidad de gliofilamentos y se piensa que básicamente se encuentran organizando los axones. Sin embargo, en zonas posteriores, y principalmente formando las membranas limitantes, sus citoplasmas contienen grandes cantidades de filamentos intermedios, aislando los axones del resto de tejidos circundantes y soportando fuerzas tensionales (Triviño y cols., 1996).

Tanto en mamíferos como en aves, en la parte posterior de la CON, los axones de las células ganglionares se encuentran empaquetando y organizando junto con elementos de tejido conjuntivo, formando una estructura característica denominada **lámina cribosa** (Fujita y cols., 2000; Morcos y Chan-Ling, 2000; Sun y cols., 2009; Triviño y cols., 1996). En mamíferos, se ha observado que tanto los oligodendrocitos como la mielinización de los axones, no aparecen hasta la parte posterior de la lámina cribosa, lugar de inicio del segmento extraocular (Fujita y cols., 2000; Morcos y Chan-Ling, 2000; Sun y cols., 2009), probablemente porque la migración de estos es parada

en la lámina cribosa de la cabeza del nervio óptico (Perry y Lund, 1990).

En **teleósteos**, son las células de Müller las que se encuentran delimitando el NO con la retina y el vítreo (Lillo y cols., 2002). En la zona del disco óptico, estas células de Müller presentan unos procesos vitreales más gruesos que en el resto de la retina, y están íntimamente asociadas a astrocitos y células microgliales (Lillo y cols., 2002), formando en conjunto una barrera real entre la CNO y la retina. Además, los procesos de Müller están formados por varias prolongaciones no observadas en el resto de la retina (Lillo y cols., 2002).

En teleósteos, no existe **lámina cribosa**, y limitando la parte posterior de la CON con la coroides y la esclera, aparecen astrocitos (GFAP-positivos) formando la limitante glial (Lillo y cols., 2002; Parrilla y cols., 2009). También se ha descrito tanto en la CNO como en la CFNO la presencia de axones mielinizados por oligodendrocitos (Fujita y cols., 2000; Lillo y cols., 1998; 2002).

La **retina de aves y reptiles**, a diferencia de mamíferos, es avascular; y la CNO se caracteriza por presentar una estructura vascularizada, denominada *pecten oculi* en aves y *conus papillaris* en reptiles, las cuáles se consideran homólogas y se proyectan hacia el humor vítreo desde la cabeza del nervio óptico (Jasinski., 1977; Braekevelt., 1989; Braekevelt y Richardson., 1996).

En **reptiles**, el **conus papillaris** está formado principalmente por células endoteliales y gliales pigmentadas o melanocitos (Braekevelt y Richardson., 1996; Braekevelt., 1989. Casañas., 2005). En el lagarto *G. gallori*, se han detectado que las células gliales pigmentadas expresan Vimentina y S-100 durante el desarrollo

(Casañas., 2005). Aunque en el adulto se siguen observando ultraestructuralmente células gliales (Alfayate y cols., 2005), éstas son GFAP, S-100, GS y Vimentina negativas (Casañas., 2005).

En el DO de **reptiles**, los estudios realizados en la tortuga *Mauremys caspica*, muestran que la astroglia forma la glía limitante que separa el nervio óptico del cuerpo vítreo, la retina, coroides y esclerótica (Dávila y cols., 1987). Estudios recientes en el lagarto *G. gallori*, demuestran la existencia de astrocitos en la zona donde se encuentra la glía peripapilar de pollos, estableciéndose también la naturaleza astrocitaria de las membranas limitantes (Casañas., 2005), dicha glía expresa marcadores como la GFAP. Vimentina, y S-100 durante el desarrollo (Casañas., 2005).

En reptiles parece no existir lamina cribosa, y son los astrocitos (GFAP-positivos) los que se disponen en finas columnas formando una laxa red a través de la cuál pasan los axones, de modo similar a la lámina cribosa de mamíferos y aves (Dávila y cols., 1987; Casañas., 2005). También, en la CNO y CFNO de reptiles se observan oligodendrocitos, así como axones mielínicos y amielínicos (Dávila y cols., 1987).

En las **aves**, el **pecten oculi** consiste en una estructura vascular con 8 a 10 prolongaciones que adoptan la forma de un peine, cerca del nervio óptico. Cada prolongación tiene numerosos vasos sanguíneos, nutrientes, vesículas de desecho y numerosos melanocitos pleomórficos. La teoría más aceptada sobre la función del pecten es que provee de nutrientes y oxígeno al ojo, así como la de recoger desperdicios metabólicos (Smith y cols., 1996).

El pecten está formado principalmente por dos tipos de células: pigmentadas y endoteliales. Las células pigmentadas son de origen neuroectodermal y se definen como células gliales (Yew., 1978; Uehara y cols., 1990; Liebner y cols., 1997; Wolburg y cols., 1999; Gerhardt y cols., 1999).

En el pecten se ha descrito un tipo específico de glía denominada glía pecteneal (Gerhardt y cols., 1999; Schuck y cols., 2000), con numerosos gránulos de pigmento y asociada a los vasos sanguíneos. Inmunohistoquímicamente, es GS-positiva y Vimentina-positiva. Hechos que revelan características comunes con la glía de Müller y con las células del epitelio pigmentario (Gerhardt y cols., 1999), a partir de las que se originan (Yew., 1978; Uehara y cols., 1990; Liebner y cols., 1997).

En el pollo, la región del DO se subdivide en varias zonas: retinal. coroidal. esclerótica y periférica, atendiendo a las características de los astrocitos existentes (Fujita y cols., 2001).

En el pollo tanto los astrocitos del *pecten* como una glía muy específica denominada glía peripapilar, que se encuentra limitando la retina con el NO en el DO, muestran características muy especiales (Quesada y cols., 2004; Schuck y cols., 2000).

En la retina de pollo, los axones de las células ganglionares dejan la retina atravesando entre los procesos internos de la glía peripapilar. Como su nombre indica, estas células se colocan alrededor de la papila o disco óptico, formando un límite entre la retina de un lado y la cabeza del nervio óptico (CNO) y el pecten por el otro. La papila, es el punto central de la retina desde el cual el NO sale hacia el cerebro y el pecten hacia el cuerpo vítreo.

Las células gliales peripapilar se estudiaron por primera vez por Marchesani (1926), quien los describió como células araña. Posteriormente, estas células fueron estudiadas por Prada y cols. (1989a,b), utilizando microscopía electrónica y tinción de Golgi, quienes describieron en la región del disco óptico, un tipo especial de célula glial que en principio creyó que podría ser una célula de Müller modificada, y a la que llamó "células de Müller en el margen del disco óptico.". En esta célula la forma está muy alterada, siendo lo más llamativo que la parte interna de la célula se ramifica en 5 a 8 prolongaciones gruesas y arqueadas formando una densa red.

Prada y cols., (1989a) también estudiaron por primera vez la morfogénesis de las células gliales peripapilares, identificaron las primeras formas con morfología semejante a dichas células, en el día embrionario E12. Pero la principal transformación morfológica de las células, es decir, el engrosamiento de la parte externa y el desarrollo arqueado de los procesos internos, se encontró que se producía entre E12 y E14.

Posteriormente, (Schuck y cols., 2000, Gerhardt y cols., 2000) estudiando la diferenciación de las células peripapilares, mediante técnicas inmunohistoquímicas y microscopía electrónica. Propusieron que eran una población celular heterogénea, en base a los patrones de expresión de los filamentos intermedios (vimentina, GFAP) y R y B-cadherinas. Al ser la retina de las aves avascular, se ha propuesto que las células peripapilares podrían estar implicados en la prevención de la entrada de los vasos sanguíneos de la CNO en la retina durante el desarrollo (Prada y cols., 1989a; Schuck y cols., 2000). Sin embargo, no existe evidencia experimental de esta función.

En la presente tesis, mediante la utilización de anticuerpos específicos frente a antígenos gliales y neuronales, durante el desarrollo y en el adulto, valoramos la naturaleza de las células peripapilares, así como algunas de sus posibles relaciones funcionales.

*PLANTEAMIENTOS
Y JUSTIFICACIÓN*

En los últimos años se ha discutido mucho sobre la naturaleza y el papel funcional de las células peripapilares de la retina. La posición de estas células y su parecido con las células de Müller ha dado pie a que se le considere una variación morfológica de las mismas. Sin embargo el papel funcional de las células peripapilares plantea numerosas incógnitas que sólo pueden comenzar a resolverse si conocemos su verdadera naturaleza y la composición molecular de las distintas partes. El empleo de marcadores inmunológicos que reconoce la composición antigénica de estas células nos permite establecer, capacidades estructurales y funcionales de las mismas.

Por ello, el objetivo de esta tesis es analizar la expresión antigénica de las células peripapilares durante el desarrollo de la papila del pollo y en el animal adulto y confrontar y comparar estos datos con los que se observa en la papila de distintas especies de vertebrados.

*MATERIAL
Y MÉTODOS*

1.-MATERIAL

1.1.-Material biológico

1.1.1.-Animales Adultos

Se han utilizado dos camaleones (*Chamaleo chamaleo*) y dos salamansas comunes (*Tarentola mauritanica*) que fueron cedidos por el Prof. Dr. Manuel Blasco Ruiz, del Departamento de Morfología y Biología Celular de la Universidad de Badajoz, de cuyo animalario procedían dichos animales; y siete pollos de la raza White leghorn procedentes del animalario de nuestra universidad.

Los protocolos del cuidado de los animales en el animalario de la Universidad y en nuestros laboratorios fueron conforme a la legislación nacional vigente (Decretos 223/1998, BOE nº 67) y a las pautas de la Comunidad Europea (Directiva del Consejo 86/609/EEC).

A los animales se les realizó una anestesia profunda para la extracción de las retinas usadas en las distintas técnicas que emplearíamos para realizar los experimentos planificados según los objetivos expuestos en esta tesis. Los camaleones, las salamansas y los pollos adultos fueron anestesiados con vapor del éter.

1.1.2.-Embriones de Pollo

Hemos utilizado embriones de pollo de la raza White leghorn. Los huevos fecundados se obtuvieron de diferentes granjas especializadas. Se registraba el día en que se ponían a incubar a 37,5 °C en atmósfera húmeda al 60%, siendo éste el día cero del desarrollo. En el momento de la extracción, los embriones fueron tabulados utilizando las tablas de Hamburger y Hamilton (1951), una vez estadiados se

sacrificaron por decapitación. Aquéllos cuyo estadio del desarrollo no coincidía con el día de incubación eran desechados. Algunos embriones se incubaron hasta eclosionar y los pollos recién nacidos se mantuvieron en el animalario hasta alcanzar la edad deseada.

Los embriones fueron sacrificados desde el día 3 de incubación (E-3) hasta el momento de la eclosión (E-21). Las fechas del sacrificio fueron elegidas muy próximas unas de otras, cada 24 horas, con objeto de detectar acontecimientos que tienen lugar en períodos breves de tiempo. Para cada estadio estudiado, se utilizaron dos embriones por estadio.

1.2.-Anticuerpos empleados

Todos los anticuerpos primarios utilizados han sido monoclonales (Tabla 1). Los anticuerpos secundarios utilizados son policlonales, desarrollado en cabra y todos de Sigma (Tabla 2).

1.2.1.-Marcadores de Atrocitos y células de Müller:

- **Anti-3CB2.** 3CB2 reconoce una proteína asociada a filamentos intermedios, la cual se expresa en células derivadas del ectodermo y mesodermo en el SNC (Prada y cols., 1991). Este anticuerpo fue aportado por el Dr. Enrique De la Rosa (CSIC, Madrid). Como segundo anticuerpo se utilizó un anti-ratón IgM conjugado con isocianato de fluoresceína (FITC); o conjugado con peroxidasa de rábano (HRP), o bien un anti-ratón IgM conjugado con isocianato de tetrametil rodamina (TRICT).

- **Anti-glutamina sintetasa.** El glutamato es el mayor neurotransmisor excitador del SNC, éste es captado por las células gliales y amidado a glutamina mediante la acción de la enzima glutamina sintetasa (GS). Clon 6, de BD Laboratorios Transducción. Como segundo anticuerpo se utilizó para inmunofluorescencia bien, un anti-ratón IgG conjugado con isocianato de fluoresceína (FITC), o bien un anti-ratón IgG conjugado con isocianato de tetrametil rodamina (TRICT) y para inmunoperoxidasa un anti-ratón IgG conjugado con peroxidasa de rábano (HRP).

- **Anti.-GFAP** que reconoce un antígeno con peso molecular de 51 kDa (Nona et al., 1989) de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) (Sigma) es una proteína del citoesqueleto. Es un marcador específico de astrocitos que forma parte de los gliofilamentos de células astrogiales, glía radial en vertebrados. Como segundo anticuerpo utilizamos un anti-ratón IgG conjugado con isocianato de fluoresceína (FITC).

1.2.2.-Marcadores de oligodendrocitos y mielina:

- **Anti-MOSP**, proteína de superficie de membrana que se expresa sólo en la mielina del SNC y en oligodendrocitos de los vertebrados superiores. Clon CE1, Millipore Bioscience Research Reagents. Como segundo anticuerpo un anti-ratón IgM conjugado con isocianato de fluoresceína (FITC), o anti-ratón IgM conjugado con isocianato de tetrametil rodamina (TRICT).

- **Anti-A2B5**, como marcador de precursores gliales tempranos y de preoligodendrocitos. Boheringer Mannheim, clon A2B5-105. Como segundo anticuerpo se utilizó un anti-ratón IgM conjugado con isocianato de fluoresceína (FITC).

- **Anti-MAG**, glicoproteína asociada a la mielina, como marcador de oligodendrocitos maduros. Millipore Bioscience Research Reagents, clon 513. Como segundo anticuerpo anti-ratón IgG conjugado con isocianato de fluoresceína (FITC).
- **Anti-Gal-C**, galactocerebrósido β -galactosidasa-galactosilceramidasa que permite identificar los axones mielínicos. Boheringer Mannheim, clon mGalC1. Como segundo anticuerpo se utilizó un anti-ratón IgG conjugado con peroxidasa de rábano (HRP).

1.2.3.-Marcadores de microglía:

- **Anti-His-C7** HIS-C7 reconoce un antígeno común presente en todos los leucocitos del pollo (Jeurissen et al., 1988). Cedi Diagnostics B.U. (Mab a ch/CD45. His-C7 Pan-leucocytes). Como segundo anticuerpo se utilizó un anti-ratón IgG, conjugado con isocianato de fluoresceína (FITC).

1.2.4.-Marcador de neuronas:

- **Anti-3BA8 (IgG)** es un anticuerpo monoclonal que reconoce una proteína de aproximadamente 50 KDa, que se localiza en la superficie de la célula, y se expresa mayoritariamente en neuronas de asociación a nivel del SNC. Este anticuerpo fue aportado por el Dr. Enrique De la Rosa (CSIC, Madrid). Como segundo anticuerpo se utilizó para inmunofluorescencia un anti-ratón IgG conjugado con isocianato de fluoresceína (FITC); o bien un anti-ratón IgG conjugado con isocianato de tetrametil rodamina (TRICT) y para inmunoperoxidasa un anti-ratón IgG conjugado con peroxidasa de rábano (HRP).

Antígeno	Anticuerpo monoclonal	Dilución	Clon/Referencia	Casa comercial
GS	IgG ratón	1:200	(ref. G45020)	Transduction Laboratories
GFAP	IgG ratón	1:100	(ref. G6171)	Sigma (St. Louis, MO),
3CB2	IgM ratón	1:200		Cedidos por Dr. E. De la Rosa. (CSIC)
MOSP	IgM ratón I	1:100	(ref. Mab 328)	Chemicon International
MAG	IgG ratón	1:100	clon 513, (ref: MAB1567)	Millipore Bioscience Research Reagents
GAL-C	IgG ratón	1:100	clon mGalC1 (ref. 1351621)	Boheringer Mannheim
A2B5	IgM ratón	1:100	clon A2B5-105 (ref. 1300016).	Boheringer Mannheim
HIS-C7	IgG ratón	1:100	(Mab a ch/CD45. His-C7-Pan leucy) (ref. 7500970).	Cedi Diagnostics B.U.
3BA8	IgG ratón	1:100		Cedidos por Dr. E. De la Rosa. (CSIC)

Tabla 1. Tabla de anticuerpos primarios utilizados.

Método	Antígeno	Anticuerpo	Conjugado	Casa comercial/referencia
Peroxidasa	IgG ratón	Anti-ratón IgG	HRP	Sigma. (ref: A3682)
	IgM ratón	Anti- ratón IgM	HRP	Sigma.(ref: A8786)
Fluorescencia	IgG ratón	Anti- ratón IgG	FITC	Sigma.(ref: F8521)
	IgM ratón	Anti- ratón IgM	FITC	Sigma.(ref: F9259)
	IgG ratón	Anti- ratón IgG	TRITC	Sigma.(ref: T7782)
	IgM ratón	Anti- ratón IgM	TRITC	Sigma.(ref: T7782)

Tabla 2. Tabla de anticuerpos secundarios utilizados.

1.3.-Otros reactivos

- **DAPI:** 4´6-diamidino-2 phenylindol (DAPI) de Sigma (ref: D-9542). DAPI se utiliza como marcador nuclear mediante inmunofluorescencia debido a que tiene una alta afinidad por DNA de modo que se une a él y marca los núcleos celulares emitiendo fluorescencia azul.

- **LEA:** Lycopersicon esculentum (LEA). Lectina de tomate (LEA L0651) (Sigma). Como técnica específica de marcaje de células microgliales, hemos utilizado la tinción histoquímica con LEA. Esta técnica se basa en la afinidad que presenta la lectina obtenida del tomate por determinados residuos glucosilados que se encuentran en la membrana citoplásmica de las células microgliales.

- **Extra Avidin Po:** Avidina-peroxidasa (E2886) (Sigma) a una dilución 1:100. Complejo utilizado en tinción histoquímica de LEA.
- **DAB:** 3'3 diaminobencidina (Sigma). Se utilizo para el revelado de las secciones teñidas inmunohistoquímicamente e histoquímicamente con peroxidasa.
- **Hidrocortisona (HC):** Hidrocortisona sodio fosfato (Actocortina 100™ vial). Diluida en suero fisiológico a razón de 3mg/ml, equivalente a 150µg/50µl y también a una concentración de 6mg/ml, equivalente a 300µg /50µl. Productos químicos inyección en saco vitelino y utilizados para la inducción de la enzima GS.

2.-MÉTODOS

2.1.-Preparación del Material para Técnicas de Tinción con Plata.

Ojos de embriones de pollo desde E-3 hasta E-14 y los pollos adultos procesados con el método de tinción de Golgi Stensaas (1967) y Golgi Colonnier (1964) fueron estudiados en preparaciones obtenidas de las ya existentes en la embrioteca del I.B.D.

2.1.1.-Método de Golgi Stensaas.

Las preparaciones histológicas de los embriones de pollo de E-3 a E-12 se realizaron siguiendo el método de Golgi Stensaas (1967) consistente en: 100 ml de agua destilada, 5 gr. de dicromato potásico, 5 gr. de hidrato de cloral, 5 ml de glutaraldehído 25%, 5 ml de formaldehído 40%, 5 gotas de dimetilsulfósido. La duración de la fijación oscila entre 24 y 48 horas según el tamaño de la pieza. A continuación tras un breve lavado en agua destilada, las piezas se pasaron a una solución de nitrato de plata 0,75% donde permanecieron de 2 a 3 días. Una vez

finalizada la impregnación se realizó una deshidratación en la serie de los alcoholes para pasarlo a través de una mezcla de alcohol-eter 50%, a las soluciones de nitrocelulosa de baja viscosidad al 5%, 10% y 20% donde finalmente se incluyeron.

Los bloques permanecieron conservados en cloroformo a 4°C hasta el momento de seccionarlos, en el que se sumergieron en aceite de cedro para aclarar el tejido. Después, el bloque se colocó en un microtomo de deslizamiento, orientándolo para cortar la retina según un plano frontal. Los cortes se realizaron seriadamente a 80 μ , recogiendo éstos en tolueno para su ulterior montaje bajo cubreobjetos en un medio neutro DPX.

2.1.2.-Método de Golgi Colonnier.

Los embriones de pollo mayores de 12 días de incubación, así como los pollos adultos, fueron enucleados, y se sumergieron en una solución fijadoras de Golgi Colonnier (1964), consistente en: 80 ml. de agua destilada, 5 gr. de dicromato potásico, 20 ml. de glutaraldehído 25%, en la que estuvieron de 5 a 7 días según el tamaño de la pieza. Después de ser lavados en agua destilada se sometieron a una impregnación con nitrato de plata al 0,5% durante 3 días. El resto del procesado fue idéntico al realizado con los embriones de pocos días de desarrollo.

Las observaciones se hicieron en un microscopio ZEISS Axioplan con cámara fotográfica incorporada

Fueron observadas un total de 78 retinas satisfactoriamente teñidas. Cada una de ellas fue observada seriadamente con objeto de ver los diferentes detalles morfológicos de las células en todo su grosor. Dado que el grosor de los cortes, 80-90 μ

incluye varias capas de células, las observaciones siempre se hicieron asegurándonos de que la célula estudiada se hallara en un plano medio en el grosor del corte.

2.2.-Preparación del material para microscopía electrónica.

Se sacrificaron pollos adultos que fueron destinados al estudio ultraestructural. La técnica empleada para el procesado de microscopía electrónica es la descrita por Palay y Chan Palay (1974) para el Sistema Nervioso Central: se sumergieron las retinas a 4°C en fijador con 2,5% paraformaldehído, 25% glutaraldehído, tampón fosfato, 0,4 M, 0,5% cloruro cálcico y agua destilada, donde permanecieron durante 24 horas.

Posteriormente pasaron a una solución de lavado, fueron postfijadas durante 2 horas a 4°C con tetróxido de osmio y deshidratadas en soluciones progresivamente concentradas de etanol. A continuación, permanecieron durante 30 minutos en una mezcla de óxido de propileno y resina TAAB a partes iguales y otra de óxido de propileno y resina en proporción 1:2 durante una noche a 60°C.

Las retinas se incluyeron en resina epóxica de baja densidad, según la fórmula propuesta por Spurr (1969): 10 gr. VCD, 6 gr. DER-76, 20 gr. NS, 0,4 gr. dimetil-amino-etanol.

Los cortes ultrafinos, efectuados con cuchilla de diamante a 600-800 Å se realizaron con ultramicrotomo ULTRACUT y se tiñeron con acetato de uranilo y citrato de plomo durante 10 minutos (Reynolds, 1963; Venable y Coggeshall, 1965), examinándose con un microscopio electrónico de transmisión JEOL 100C a 80 Kv.

2.3.-Preparación del material para Inmunohistoquímica

Una vez tabulados según las tablas de Hamburger y Hamilton (1951), a los embriones de pollos jóvenes se les seccionó las cabezas, y a los embriones de pollos mayores de E-12 se les enuclearon los ojos; los globos oculares de los embriones mayores de E-16, destinados a esta técnica, se eliminó la córnea y el cristalino. Los tejidos se sumergieron en el fijador Zambonys: paraformaldehído 2% en tampón fosfato 0,1 M a pH 7.6, ácido pícrico a saturación (1,18%), durante 12-48h, a 4°C.

Los pollos adultos, camaleones y salamandras, fueron anestesiados con vapor de éter y a continuación, se les enuclearon los globos oculares, quitando la córnea y el cristalino, y los polos posteriores fueron sumergidos en esta solución fijadora, de paraformaldehído al 4% en tampón fosfato de sodio 0,1M (PBS), a pH 7.6., durante 12-48h, a 4°C.

Después los tejidos fueron lavados tres veces con tampón fosfato salino (PBS), crioprotectados en soluciones crecientes de sacarosa al 15%, 20% y 30% durante 24h cada paso, para posteriormente ser incluidos en un medio de inclusión para criostato Tissue-teck (OCT. Compound: optimal cutting temperature) y congelados mediante inmersión en nitrógeno líquido, guardándose a -80°C hasta su utilización.

Las secciones de retina fueron realizadas en criostato a un grosor entre 20 y 40µm y en dos planos para cada muestra. El plano transversal, útil para el estudio de los gradientes central a periférico y dorsal a ventral y el plano perpendicular a éste, para el estudio de los gradientes central a periférica y temporal a nasal. Las secciones

pasando por las diferentes áreas se montaron en portas cubiertos de gelatina y se almacenaron a -40°C hasta el momento de la inmunorreacción.

Las secciones de retina fueron posteriormente procesadas según los protocolos estandarizados de inmunohistoquímica con tinción de inmunofluorescencia o inmunoperoxidasa.

Los portas con los cortes de tejido se preincubaron primero en suero del pollo al 10% en PBS, a pH 7.4, conteniendo 0.25% Tritón X-100, durante 30 minutos, para bloquear la impregnación y la coloración no específica. Posteriormente fueron incubados con los anticuerpos primarios citados anteriormente, diluidos en PBS con 0.1% Tritón X-100 y suero de pollo al 1%, a temperatura ambiente, durante 2h. Después de lavar 3 veces durante 15 minutos en PBS con el 0.1% Tritón X-100, las secciones fueron incubadas con los segundos anticuerpos conjugados con FITC, TRICT, o con HRP durante 2h a temperatura ambiente y en oscuridad. Las diluciones de trabajo de los anticuerpos fueron las recomendadas por los fabricantes (1/200 y 1/100). Las secciones incubadas con el anticuerpo secundario conjugado con FITC o TRICT, fueron lavadas 3 veces durante 10 minutos en 0.1% Tritón X-100 en PBS, aclaradas en PBS y montadas con un medio o-fenilendiamina. Las secciones de las retinas incubadas con HIS-C7, fueron montadas con un medio que contenía DAPI, para marcar los núcleos celulares, y la o-fenilendiamina. Las secciones incubadas con el anticuerpo secundario conjugado con HRP fueron aclaradas en PBS y la peroxidasa fue desarrollada usando el procedimiento estándar 3,3'-diaminobenzidina. Después fueron aclaradas en PBS, deshidratadas, aclaradas en xileno, y montadas con medio DPX.

Las secciones de control fueron procesadas en cada experimento, substituyendo el anticuerpo primario por la solución usada para bloquear la coloración no específica.

Las secciones inmunorreaccionadas con el anticuerpo secundario conjugadas con HRP fueron estudiadas en campo claro usando un microscopio Zeiss Axioplan. Las secciones inmunorreaccionadas con el anticuerpo secundario conjugada con FITC o TRITC fueron estudiadas con un microscopio del epifluorescencia Zeiss equipado con filtros apropiados para la visualización de FITC y de TRITC.

2.4.-Preparación del material para la expresión inmunohistoquímica de GS a nivel experimental

2.4.1.-Inyección de hidrocortisona en saco vitelino

Conocemos que la inyección experimental de corticoides, como la hidrocortisona (HC), durante el desarrollo tiene la capacidad de inducir a las células de Müller para que sinteticen GS.

Las inyecciones en saco vitelino hay que hacerlas en condiciones de asepsia y manteniendo el embrión aislado el mayor tiempo posible, para ello es necesario el uso de guantes y mascarillas adecuadas, así como realizar la manipulación completa bajo la cámara de flujo laminar con rayos ultravioleta incorporado (Telstar, modelo CAM1400).

Se practicaron inyecciones de Hidrocortisona correctamente diluidas, en embriones de pollo desde E-10 hasta eclosión, que fueron sacrificados de uno a dos

días después de la inyección con HC, para observar los efectos de la misma a nivel de la retina y papila.

Cogemos el huevo fecundado y sin moverlo de la posición en que ha sido incubado lo colocamos en la cámara de flujo laminar, previamente esterilizada con luz ultravioleta. Abrimos una pequeña ventana en el polo superior con ayuda del material adecuado, posteriormente practicamos la inyección en saco vitelino de un pequeño volumen (50-150-300 μ l) de Hidrocortisona sodio fosfato (Actocortina 100 TM vial), esto se realiza haciendo una pequeña incisión en la membrana con la punta estéril de la micropipeta de inyección. Seguidamente, se procede a cerrar herméticamente la ventana de apertura utilizando parafilm y asegurándonos del sellaje perfecto. Después se coloca el huevo ya inyectado en otra incubadora hasta el momento de la extracción del embrión.

Posteriormente se realizó el protocolo de inmunotinción estándar, antes mencionado, para el marcaje experimental con GS.

2.4.2.-Deprivación de luz en pollo postnatales

Realizamos deprivación de luz durante 2 horas en pollos recién nacidos y en postnatales de 2 días de vida. Posteriormente los pollos fueron sacrificados siguiendo el procedimiento antes descrito, y se continuó realizando el protocolo de inmunotinción estándar, para estudiar el efecto de la oscuridad sobre la expresión inmunohistoquímica de GS en la retina y papila del pollo.

2.5.-Preparación del material para histoquímica. Lectina Lycopersicon esculentum (LEA)

Se sacrificaron y utilizaron los globos oculares de embriones de pollo desde E11 hasta E-21, según el protocolo descrito anteriormente.

Los globos oculares de los embriones destinados a esta técnica, se sumergieron en fijador de Zambonys, durante 12-48h, a 4°C. Después se lavaron varias veces con tampón fosfato salino (PBS) durante 15 minutos a 4° C. A continuación se realizó la crioprotección del tejido sumergiendo las piezas oculares en una solución de sacarosa al 15% a 4° C, durante 24 horas, a continuación en solución de sacarosa al 30% otras 24 horas. Los bloques se realizaron utilizando Tissue Tex (OCT. Compound: optimal cutting temperature) para posteriormente ser congeladas mediante inmersión en vapores de nitrógeno líquido, guardándose a -80° C hasta su utilización.

Se realizan cortes histológicos de 10 y 20 μm en el criostato. Con los portas gelatinizados que contenían los cortes de retina se procedió de la siguiente manera. Después de ser lavados con PBS a pH 7.6 durante 5 minutos, tratarlas con agua oxigenada al 1% en metanol durante 15 minutos para bloquear la peroxidasa endógena y lavadas con PBS más Triton X-100 (Merck) al 1% durante 10 minutos, los portas se incubaron con Lectina biotinizada, Lycopersicon esculentum (LEA L0651) (Sigma) a una concentración de 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, en PBS durante 12h a temperatura ambiente. A continuación se incubaron con el complejo avidina-peroxidasa (Extra Avidin Po E2886) (Sigma) a una dilución 1:100 en PBS con 0,7% de lambda carrageenan (Sigma) y 0,5% de Triton X-100 (Merck) durante 1-2 horas a temperatura ambiente. Después de ser lavados en PBS, fueron sumergidos en una solución de 40 mg/ml de 3'3

diaminobencidina (Sigma) en PBS, al que se añadieron 50 µl de H₂O₂ al 30% durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después de sucesivos lavados fueron deshidratados, aclarados y montados en DPX para su observación.

1.3.-ANÁLISIS DE IMAGEN

Se obtuvieron imágenes de las distintas preparaciones utilizando un microscopio (Zeiss Axioplan) equipado con campo claro y epifluorescencia, conectado a una cámara digital (Axioplan HRc). Todas las imágenes digitales fueron capturadas en un ordenador con un software: Axio Vision 4.7.

Las ultramicrofotografías se realizaron en un microscopio electrónico de transmisión JEOL 100C a 80 kV. Como película se utilizaron placas Microscope film 4489 de Kodak.

Las imágenes fueron transferidas y optimizadas mediante el programa informático Adobe Photoshop CS5 (Adobe Systems Inc., San Jose, CA, EE.UU.), donde se realizaron pequeños ajustes de brillo y contraste en algunas fotos. Para la elaboración de las láminas se utilizó el programa informático Corel Draw X5.

RESULTADOS

La papila óptica es desde el punto de vista anatómico, la zona de la retina a través de la cual los axones de las células ganglionares y las fibras centrifugas se proyectan hacia y desde el cerebro para formar el nervio óptico. En el pollo, esta estructura se desarrolla entre E-4 y E-17 y en este periodo de formación embrionaria se distinguen dos fases. Durante la primera entre E-4 y E-8 tiene lugar la formación inicial del Pecten y el desarrollo del nervio óptico a partir de los axones de las células ganglionares que se proyectan desde la retina hasta el tectum. Por lo tanto en esta primera fase ocurren los cambios estructurales que dan lugar a la Papila y al Nervio Óptico. En los últimos estadios de esta primera fase, las "células gliales peripapilares" forman una barrera que separa ambos epitelios neural y pigmentario de la cabeza del nervio óptico.

La segunda fase tiene lugar entre E-9 y E-17. En este periodo, los pliegues del Pecten se desarrollan completamente en número de 16 a 18 alcanzando la forma del adulto y las células peripapilares se diferencian completamente hasta adquirir las características morfológicas que muestran las del animal adulto. En la figura 1 esquematizamos en E-4 (a) y E-8 (b) las zonas que corresponden a la retina, el pecten y la cabeza del nervio óptico. A partir de E-8, la papila está delimitada por una población especial de células gliales, las células peripapilares, las cuales separan estructuralmente la retina neuronal del pecten y de la cabeza del nervio óptico. En conjunto estas células forman una estructura como un anillo que refuerza la zona a través de la cual pasan los axones de la capa de fibras de la retina hacia el cerebro.

1.-CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE LAS CÉLULAS PERIPAPILARES ESTUDIADAS CON EL MÉTODO DE TINCIÓN DE GOLGI

Las células peripapilares, observadas en preparaciones de Golgi, muestran importantes modificaciones morfológicas respecto a las células de Müller de la retina (Fig. 1, e flechas). Se trata de células con forma de araña como las denominó Marchesani (1926). La mayor parte de su citoplasma está polarizado hacia la parte más externa de la célula y en ella se localiza el núcleo (Fig. 1, e flechas). El polo externo del pericardio de estas células se continúa por medio de bandas filamentosas (Fig. 1, f cabezas de flechas), a partir de las cuales surgen algunas prolongaciones que discurren en dirección oblicua hacia el interior de la papila. La parte interna de las células peripapilares está formada por cinco a ocho prolongaciones arqueadas que se distribuyen unas por dentro de la papila, y otras por fuera bordean la retina, infiltrando la capa plexiforme interna para separarla de la capa de fibras del nervio óptico. Algunas de las prolongaciones internas de las células peripapilares finalizan a nivel de la membrana limitante interna de la retina constituyendo parte de la misma; y el resto terminan formando la membrana limitante interna de la papila. La morfología de algunas de estas células evoca la que muestran los típicos astrocitos protoplásmicos del SNC. En conjunto podemos decir que las células peripapilares forman una red de prolongaciones arqueadas que separan y refuerzan estructuralmente la retina y la cabeza del nervio óptico.

En la figura 1, c y d, mostramos las células peripapilares, en dos estadios del desarrollo, en los que claramente se aprecia que su forma y la manera de diferenciarse morfológicamente es distinta a la que muestran las células de Müller de la retina.

Las células peripapilares inician el desarrollo morfológico, expresando formas bipolares (Fig. 1, c flechas) y continúan con formas multipolares en las que rápidamente se aprecia un incremento del grosor citoplásmico en la parte externa de la célula y progresivamente van apareciendo prolongaciones internas (Fig. 1, c Cabezas de flechas).

2.-EXPRESIÓN DE ANTÍGENOS GLIALES Y NEURONALES EN LAS CÉLULAS PERIPAPILARES DE LA RETINA DEL POLLO

Hemos estudiado la expresión de diferentes antígenos gliales y neuronales durante el desarrollo de la retina, papila y cabeza del nervio óptico en el pollo. A continuación describimos los patrones de expresión inmunohistoquímica que muestran cada anticuerpo.

2.1.-Expresión del antígeno que reconoce el anticuerpo monoclonal 3CB2

3CB2 es un anticuerpo monoclonal que reconoce una proteína de aproximadamente 52 KD la cual está asociada a filamentos intermedios del citoesqueleto de las células, y se encuentra mayoritariamente en células gliales del SNC, y células del mesodermo embrionario (Prada y cols., 1995). Hemos estudiado la expresión del antígeno 3CB2 en la retina de diferentes vertebrados y hemos observado que se expresa en todas las células de Müller, ocupando toda su extensión. Nuestros datos corroboran los obtenidos por Prada y cols. (1995) y son coincidentes con la interpretación que hoy se hace de este antígeno, considerándolo como una “vimentin like”.

A nivel de la papila, 3CB2 se expresa desde los primeros estadios del desarrollo embrionario (E-3), en la zona prospectiva de la copa óptica a partir de la cual se formará el pecten (Fig. 2, a cabezas de flecha) y en las células ectodérmicas del epitelio pigmentario que limita con el tallo óptico (Fig. 2, a flechas). A este nivel es donde mayor intensidad de antígeno detectamos.

Entre E-5 y E-14 las células peripapilares se diferencian (Prada y cols., 1989-b). Coincidiendo con este proceso del desarrollo, observamos un progresivo incremento de la inmunorreactividad para 3CB2 (ver Prada y cols., 1995). Entre E-11 y E-14, el patrón de expresión de 3CB2 se distribuye por toda la retina, pero la mayor intensidad de la inmurreactividad se localiza en las células peripapilares (Fig. 2, b cabezas de flecha), en la raíz del pecten (Fig. 2, b flechas) y en la cabeza del nervio óptico (Fig. 2, b, CNO). Las cabezas de flecha señalan además el límite entre la retina neural y la papila.

A partir de E-18, la expresión de 3CB2 es idéntica a la que se observa en la retina y la papila del pollo adulto (Fig. 2, c). Los gradientes de intensidad de expresión del antígeno y su distribución siguen el mismo patrón descrito anteriormente en E-11, pero madurando progresivamente la celularidad e incrementándose la concentración del antígeno.

En la figura 2 d, mostramos esquemáticamente la forma y distribución de las células peripapilares, y su relación con la retina, la cabeza del nervio óptico y la raíz del pecten.

La expresión de 3CB2 es también muy intensa durante el desarrollo y en el adulto, en otras zonas del S.N.C. tales como la placa del suelo de la medula espinal y el rafe troncoencefálico (imágenes no mostrados).

2.2.-Expresión de Proteína Ácido Fibrilar Glial (GFAP)

Los anticuerpos que reconocen a la proteína ácido fibrilar glial, han sido considerados y se han usado habitualmente como marcadores específicos de astrocitos. En la retina, GFAP se ha usado principalmente en retinas de mamíferos coincidiendo con su mayor contenido en astrocitos, y menos en retinas de aves y otras especies, donde el reconocimiento específico de las células gliales se ha realizado fundamentalmente con anticuerpos anti Vimentina. GFAP se localiza en los filamentos del citoesqueleto de las prolongaciones de los astrocitos.

En la retina del pollo, GFAP se expresa en las células peripapilares, y en los astrocitos de la papila y nervio óptico (Fig. 3). La mayor intensidad de GFAP se localiza en los pies de las prolongaciones internas de las células peripapilares; en las prolongaciones externas a nivel de la confluencia de la membrana limitante externa con el nervio óptico y en la cabeza del nervio óptico (Fig. 3 flechas y CNO).

2.3.-Expresión de Glutamina Sintetasa (GS)

Los anticuerpos que reconocen a la enzima glutamina sintetasa (GS) han sido los más usados para identificar a los astrocitos del SNC. En la retina también se han usado para identificar a los astrocitos y a las células de Müller en condiciones

normales y experimentales (Prada y cols., 1997). Los resultados que nosotros hemos obtenido en células de Müller, corroboran todos los descritos con anterioridad por otros autores. Es decir, la GS se localiza en todas las células de Müller de la retina. Salvo en la papila óptica, la GS se distribuye más o menos homogéneamente por todo el citoplasma de las células de Müller y ninguna otra célula de la retina del pollo expresa GS, con excepción de unos pocos astrocitos que se localizan en la capa de células ganglionares.

A nivel de la papila, existe ausencia total de GS en células gliales (Figs. 4, 5 y 6) y la expresión de GS queda reducida a las células del pecten (Fig. 4, a, c; P). Este hecho demuestra que ni las células peripapilares, ni los astrocitos de la papila y nervio óptico, contienen GS.

La expresión de GS comienza durante el desarrollo de la retina a partir de E-15 (Prada y cols. 1997). En E-18, el patrón de expresión es similar al del adulto (Fig. 4 a, c). Las cabezas de flecha en esta figura indican el límite entre las capas de la retina y la papila. Se puede observar que las células peripapilares, la cabeza del nervio óptico y el nervio óptico, no expresan inmunorreactividad para la GS.

La inducción de GS por inyección de hidrocortisona en el huevo en E-10, sólo determina la síntesis de GS por parte de las células de Müller (Fig. 4,b-m); mientras que las células gliales de la papila no muestran inmunorreactividad para la GS (Fig. 4, b). Por lo tanto la expresión de GS sólo se encuentra en las zonas de la retina, es decir, donde existen capas sinápticas.

La figura 5 muestra con la técnica de tinción con peroxidasa, una panorámica inmunohistoquímica de la mitad de la papila de un pollo adulto, cuyo corte transversal del globo ocular y retina, muestra el origen del pecten. La figura 5b, muestran una ampliación de la zona señalada con un asterisco en la figura 5a. Se puede apreciar que sólo la parte externa de las células de Müller contienen GS. La expresión de GS en estas células, se extiende en forma de gradiente; quedando este regulado por la presencia de sinapsis entre sus neuronas. De esta forma podemos comprobar, que donde no hay capa plexiforme interna ni capa de células ganglionares, las prolongaciones internas de las células de Müller dejan de expresar GS. Las células que conforman la pared del pecten si expresan GS. Este hecho sugiere que el contenido en GS de las células de Müller y el de las células del pecten juega un papel funcional diferente.

2.4.-Expresión experimental de GS mediante la inducción con Hidrocortisona (HC) durante el desarrollo de la papila

Actualmente sabemos que hasta E-10, la célula de Müller no tiene capacidad de sintetizar GS. A partir de E-10 adquieren esta capacidad y si reciben el estímulo provocado por el incremento del nivel de corticoides en el medio, sintetizan la enzima. En condiciones naturales durante el desarrollo normal de la retina, esto ocurre en E-14 y por ello a partir de E-15 se observa expresión de GS. Experimentalmente, como hemos demostrado anteriormente en la figura 4 b, si inyectamos en el saco vitelino durante E-10 150 µg/µl de HC, las células de Müller sintetizan GS. En este caso, la mayor concentración-expresión de GS, la encontramos en la zona que ocupan las capas plexiforme interna, capa de células

ganglionares y capa de fibras del nervio óptico. Los pies de las células de Müller a nivel de la membrana limitante interna, aparecen intensamente marcados (Fig. 4, b flechas). Durante E-14, todas las zonas de la retina tienen capacidad para responder a los estímulos de los corticoides (Fig. 6a y 6b).

La papila, la región peripapilar y el nervio óptico no expresan en ningún caso GS. Hemos forzado la expresión de GS inyectando el doble de concentración de HC, es decir 300 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. (Fig. 6a y 6b) y las células peripapilares siguen mostrándose mudas a la expresión de GS. Sólo la retina central dorsal y ventral que limitan con la peripapila expresan fuertemente GS.

Nos ha llamado la atención, que a diferencia de lo que ocurre durante el desarrollo normal de la retina, cuando elevamos la concentración de hidrocortisona para inducir la expresión de GS obtenemos como efecto contrario que las células del pecten dejan de expresar GS (Figs. 4b y 6b, cabezas de flecha). Por otro lado, nos encontramos que la mayor concentración de corticoides induce con más intensidad a las células de Müller ocasionando una sobreexpresión de GS en las partes de las células de Müller que se localizan a nivel de las capas nucleares de la retina; mientras que las capas plexiformes contienen poca expresión de GS (Figs. 6a y 6b). En otros términos, podemos señalar que la capacidad de respuesta de la célula de Müller para expresar GS está incrementada a nivel de las capas nucleares y capa de células ganglionares y está disminuida a nivel de las capas plexiformes externa e interna.

En nuestros experimentos, siempre hemos observado que por mucho que forcemos la inducción de GS con mayor dosis de corticoides, la papila y las zonas peripapilares continúan mostrando una inmunoreactividad negativa.

Realizamos privación de luz durante 2 horas en pollos recién nacidos y en postnatales de 10 días de vida. El resultado de la privación de luz, no tiene ningún efecto sobre la expresión inmunohistoquímica de GS. La retina sigue expresando con absoluta normalidad GS en todas las zonas donde las células de Müller tienen influencia de los contactos sinápticos (Fig. 6c) y no expresan GS en aquellas zonas donde no existen contactos sinápticos. En las zonas peripapilares, no hay expresión inmunohistoquímica de GS (Fig. 6c; pp entre flechas); mientras que en la zona externa a la peripapila donde existen capas de neuronas con contactos sinápticos, las células de Müller sí expresan GS.

2.5.-Expresión de antígenos de oligodendrocitos y de la mielina durante el desarrollo de la papila

El anticuerpo monoclonal (IgM) CE1 reconoce una proteína específica de la mielina de los oligodendrocitos (MOSP) la cual representa una nueva proteína de la superficie de la membrana expresada sólo en la mielina y en los oligodendrocitos del SNC de los vertebrados superiores (Dyer y cols. 1991). A nivel de la retina del pollo adulto, MOSP se encuentra mayoritariamente en las prolongaciones internas de las células de Müller (Fig.7a, m) y en las terminaciones axónicas de las células horizontales (Fig.7a, AT).

Durante el desarrollo de la retina del pollo, MOSP comienza su expresión entre E-II y E-12 a nivel del nervio óptico y de la papila óptica (Quesada y cols., 2011). Un día más tarde E-13, MOSP también se expresa en la zona dorso-temporal de la retina y luego va apareciendo por el resto de la retina.

La expresión de MOSP en la papila muestra un patrón espacial en el que fundamentalmente se marcan las células peripapilares. Desde E-12 hasta E-17 aumenta progresivamente la intensidad de la expresión (datos no mostrados), y a partir de E-20, la expresión de MOSP en la papila (Fig. 7, a) es similar a la que se observa en estadios posteriores y en el animal adulto (Fig. 8, a). Las células peripapilares aunque se observan marcadas en toda su extensión, concentran la mayor cantidad de proteína (MOSP) en la parte interna, fundamentalmente a nivel de los pies terminales que forman la membrana limitante interna (Figs. 7 a, flechas) y en las prolongaciones que se proyectan hacia la base del pecten y a nivel de la cabeza del nervio óptico (Figs. 8 a, flechas). Relacionando la expresión de MOSP con las estructuras nerviosas, podemos decir que la mayor expresión de MOSP se concentra en la zona de la papila donde la capa de fibras del nervio óptico se proyecta hacia la cabeza del nervio óptico. La expresión de MOSP en la zona de la papila que se proyecta al nervio óptico (Figs. 7 a y 8 a, NO), muestra un patrón punteado y difuso, de menor intensidad.

La existencia de dos patrones de expresión de MOSP bien diferenciados en la retina y en la papila, sugiere un diferente papel funcional de esta proteína relacionada con la mielinización de los axones del nervio óptico. Por ello, hemos estudiado desde el punto de vista de la microscopía electrónica las diferencias que existen entre la

mielina de la capa de fibras del nervio óptico de la retina y la mielina de la región peripapilar. La figura 7 b, muestra un corte vertical de la retina del pollo adulto a nivel de la capa de fibras del nervio óptico. Se pueden observar con intensa electrondensidad, las prolongaciones internas de las células de Müller formando con sus pies terminales la membrana limitante interna de la retina (Fig. 7 b, m). Entre las distintas prolongaciones de las células de Müller, se observan diversos paquetes de axones amielinicos y algunos axones de mayor tamaño, que se encuentran rodeados por envolturas mielínicas catalogadas como mielina laxa por la presencia de espacios entre las envolturas (Fig. 7 b, flechas). A nivel de la región peripapilar, la configuración de la capa de fibras es diferente; no se observan las prolongaciones de las células de Müller porque a este nivel no existen, pero si se ven prolongaciones gliales de las células peripapilares y sobre todo muchos axones de gran tamaño que se encuentran rodeados por mielina densa (Fig. 7 c, cabezas de flechas), similar a la que existe en el resto del SNC. Por lo tanto, es posible como luego discutiremos, que las células de Müller formen mielina laxa y las células peripapilares formen mielina densa y su comportamiento mielinizante sea más parecido al de los oligodendrocitos del cerebro.

A la vista de los resultados obtenidos con MOSP, testamos la expresión de otras proteínas que se relacionan con la mielina: MAG, GAL-C y A2B5. Hemos comprobado que las células peripapilares también expresan de forma transitoria A2B5 en las primeras fases del desarrollo (Fig. 8 b, flecha), lo cual habla a favor de que estas células se comporten como oligodendrocitos; pues se sabe que A2B5 es marcador de preoligodendrocitos.

En cuanto a MAG y GAL-C, no podemos asegurar que se expresen en las células peripapilares, pues el patrón inmunohistoquímico de expresión de estas proteínas se realiza mediante un fino punteado que aunque se sitúa en la zona de ubicación de las células, no permite relacionar su morfología con las de estas (Figs. 8 c y d). Se necesita realizar nuevas técnicas inmunohistoquímicas combinadas con M/E para poder asegurar la colocalización exacta de estas proteínas. No obstante no nos cabe la menor duda que su expresión está relacionada con los axones mielínicos de las células ganglionares y/o con las fibras centrifugas que desde otros centros nerviosos se dirigen a la retina.

2.6.-Expresión de Marcadores microgliales durante el desarrollo de la papila

2.6.1.-Expresión de LEA en la papila

Desde hace muchos años, la lectina del tomate (LEA) se ha usado como un marcador histoquímico para reconocer células microgliales y vasos sanguíneos. Nosotros hemos utilizado la lectina de tomate LEA (*Lycopersicon esculentum*) para estudiar la microglia de la retina del pollo. El mayor número de células se localiza durante el desarrollo, en la cabeza del nervio óptico, pecten y en la capa de fibras del nervio óptico a nivel de la retina central próxima a la papila (Fig. 9, flechas).

Aunque no observamos de forma clara que las células peripapilares se rellenen con la peroxidasa que revela la lectina, si apreciamos mayor intensidad tintorial en los espacios que ocupan estas células (Fig. 9) y sobre todo, observamos que los pies de estas células se rellenan de peroxidasa (Fig. 9, cabezas de flechas).

2.6.2.-Expresión de HIS-C7 en la papila

Hemos usado un anticuerpo monoclonal HIS-C7 que reconoce un determinante antigénico presente en leucocitos de pollo (Jeurissen et al., 1988), para identificar con seguridad las células microgliales de la retina. El estudio inmunohistoquímico se ha realizado a la vez que el estudio histoquímico con lectina de tomate.

HIS-C7 reconoce el mismo patrón de células que la lectina del tomate durante el desarrollo y en la retina adulta. El mayor número de células se localiza en la capa de fibras del nervio óptico, en la capa de células ganglionares, y en la capa plexiforme interna (Fig. 10, CPI). En la papila, tampoco podemos reconocer con la técnica inmunohistoquímica, un patrón general de marcaje de las células peripapilares; pero si observamos mayor intensidad de expresión HIS-C7 positivo en la zona de localización de estas células (Fig. 10, flechas), y nuevamente aparecen, al igual que ocurría con LEA, marcados los pies de las células peripapilares (Fig. 10, cabezas de flechas).

2.7.-Expresión del antígeno que reconoce el anticuerpo monoclonal 3BA8 durante el desarrollo de la papila

3BA8 es un anticuerpo monoclonal que reconoce una proteína de aproximadamente 50 KD, que se localiza en la superficie de la célula, y se expresa mayoritariamente en neuronas de asociación del SNC. 3BA8 se expresa al inicio del desarrollo, en la membrana limitante ventricular y en el límite externo de la capa ventricular del epitelio neural de la retina (imágenes no mostradas). A partir de E-8 desaparece la expresión de 3BA8 en el límite externo de la zona ventricular de la retina, y comienza a expresarse en la capa plexiforme interna de la retina (Fig. 11b,

CPI). En estadios posteriores y en la retina adulta, 3BA8 se localiza exclusivamente en células amacrinas, mostrando la mayor inmunorreactividad a nivel de la capa plexiforme interna (Fig. 11c, d, CPI).

Desde los estadios iniciales del desarrollo, observamos intensa inmunorreactividad para 3BA8 en las células peripapilares (Fig. 11a flechas). A medida que avanzamos en el desarrollo, la expresión de 3BA8 se extiende al resto de las zonas de la papila, aunque sigue expresándose más intensamente en las células peripapilares (Figs. 11 b, c, d). La fig. 11 d, muestra el patrón definitivo de la expresión de 3BA8 en la papila adulta. Toda la capa plexiforme interna de la retina aparece marcada; la barrera de células peripapilares aparece marcada, separando claramente la papila de la retina, y la cabeza del nervio óptico y el propio nervio óptico se observan rellenos por la expresión de 3BA8.

3.-EXPRESIÓN DE ANTÍGENOS GLIALES Y NEURONALES EN LA PAPILA DE OTRAS ESPECIES DE VERTEBRADOS

Para comprobar si la expresión antigénica de las células peripapilares sigue un patrón idéntico en otras especies de vertebrados, se testó inmunohistoquímicamente, las retinas y papilas del lagarto, galápago, camaleón y salamanesa. De ellos, sólo mostramos imágenes de la papila y la retina del camaleón y de la salamanesa, por ser las más representativas a nivel de los cortes histológicos practicados y por tener la mejor definición de marcaje.

La retina del camaleón y de la salamanesa, muestran una intensa expresión de GS a nivel de todas las células de Müller (Figs. 12a; 13a; M), sólo la parte más

interna de sus prolongaciones internas, expresan menor intensidad de marcaje; lo cual demuestra que al igual que en el pollo, la producción y almacenamiento de la GS está en relación con las necesidades y funcionalidad sináptica de las neuronas que están en vecindad.

A nivel de la papila y células peripapilares, no existen contactos sinápticos y por lo tanto, no hay expresión de GS (Figs. 12a; 13a, CP, CNO).

Tanto en el camaleón como en la salamandresa, 3BA8, sólo se expresa en la capa plexiforme interna de la retina (Figs. 12b; 13b, CPI). Las células peripapilares, no expresan 3BA8 en ninguno de los dos animales (Figs. 12b; 13b). Por lo tanto, esta es la diferencia más importante entre la expresión antigénica de las células peripapilares de la retina del pollo y la del camaleón y la salamandresa.

ICONOGRAFÍAS

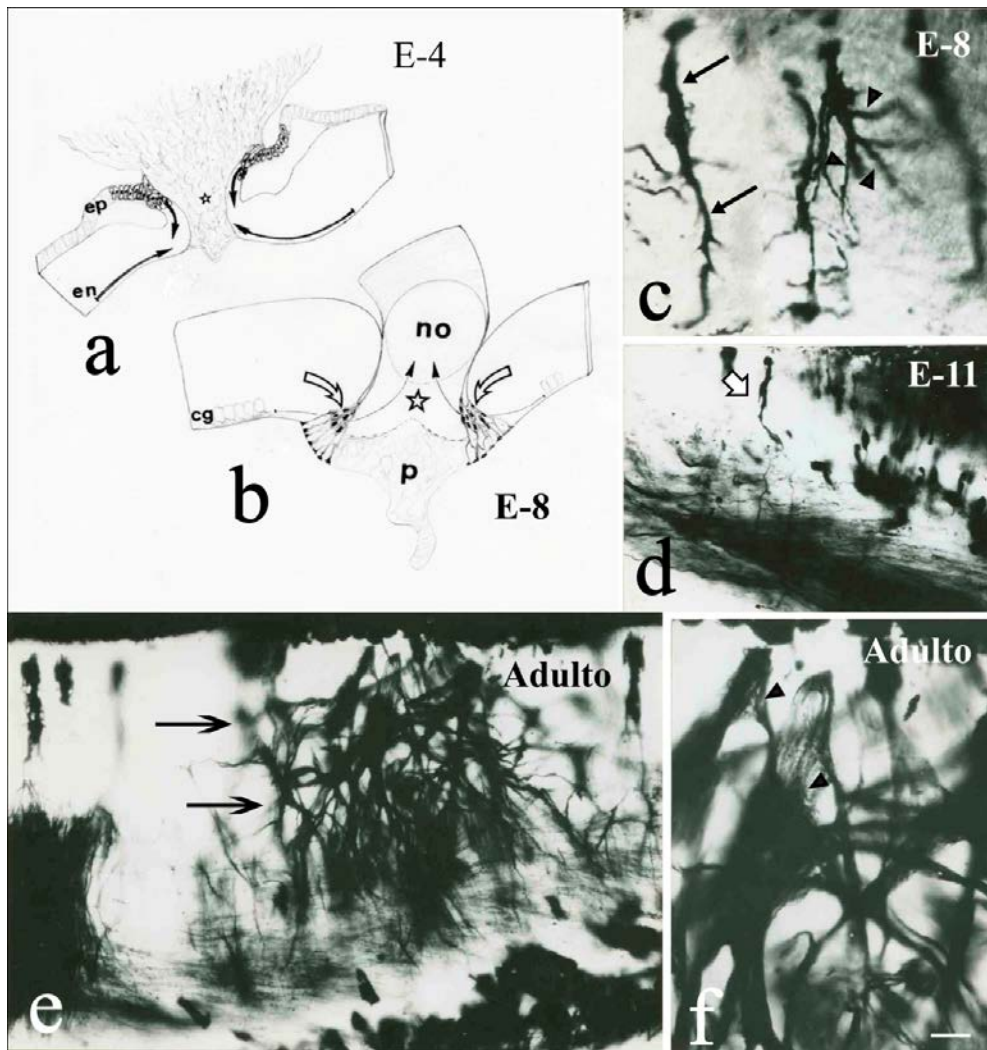


Figura 1. **a:** Esquema de papila de embrión de pollo en E-4. Desde el límite del epitelio pigmentario (ep) con la futura cabeza del nervio óptico (*), las futuras células gliales de la papila se diferencian según la dirección que indican las flechas, (en) epitelio neural, las flechas señalan la dirección de las fibras del nervio óptico. **b:** Esquema de papila de embrión de pollo en E-8. Las flechas huecas curvas señalan las células de la papila que constituyen la barrera entre la retina y la cabeza del nervio óptico. **(c-f)** cortes histológicos de una zona peripapilar, teñida con el método de Golgi. **c:** En E-8 las células peripapilares poseen una forma bipolar (flechas), de la que progresivamente van apareciendo prolongaciones internas (cabezas de flechas). **d:** Embrión de pollo en E-11 la flecha hueca muestra una célula peripapilar en el margen del disco óptico. **e-f:** células peripapilares de pollo adulto en el margen del disco ópticos. **e:** Las flechas horizontales muestra la zona de localización del pericario de esas células. **f:** detalle del anterior, donde las cabezas de flecha señalan unas expansiones en forma de cabellera que se continúan con prolongaciones arqueadas. cg, capa de células ganglionares; p, pecten; *, cabeza del nervio óptico; no, nervio óptico. La barra = 30 μ m en d, c, d, e; 15 μ m en f.

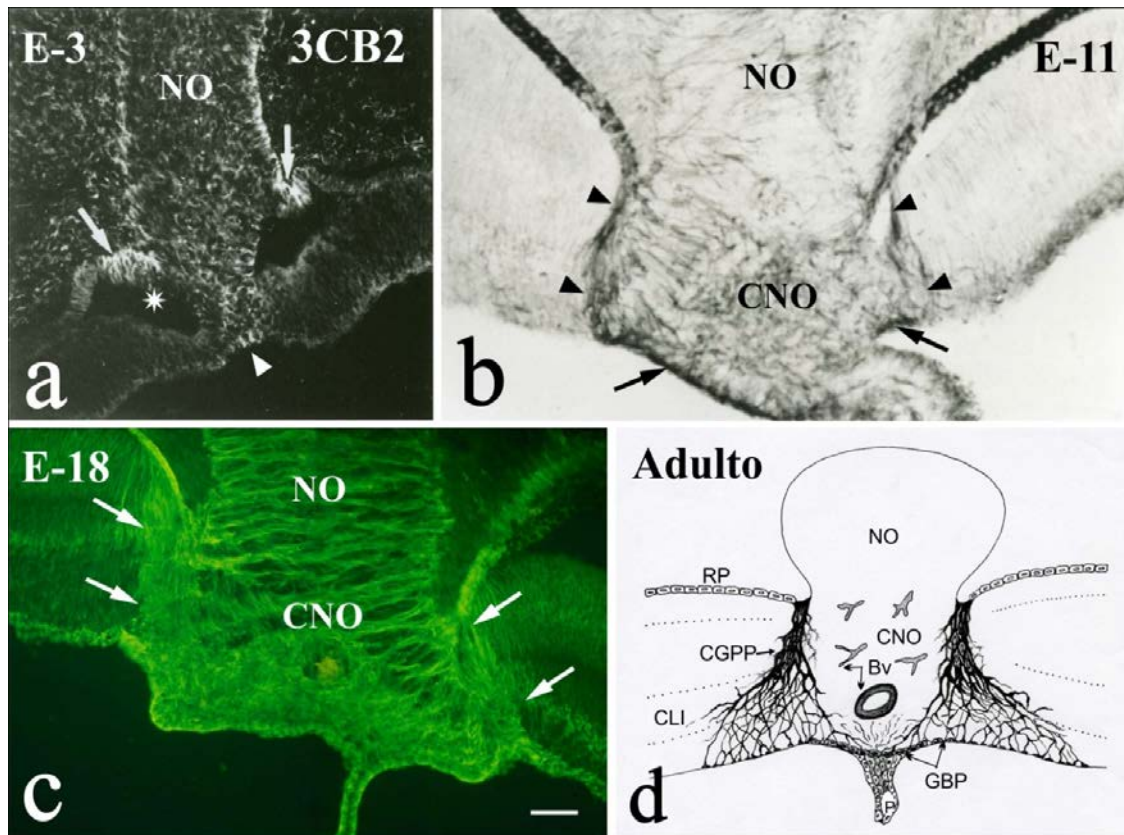


Figura 2. (a-c) muestra la expresión inmunohistoquímica de **3CB2** en el disco óptico, en diferentes estadios del desarrollo. **a:** Se observa una alta intensidad de marcaje en un grupo de células (flechas) en la parte externa del ventrículo óptico, en la transición del neuroepitelio al futuro NO en E-3. **b:** marcaje de moderada intensidad en la CNO en E-11. El límite del territorio de células gliales peripapilares en su frontera con la retina se indica mediante cabezas de flechas. **c:** alta intensidad de marcaje en el NO, CNO y en la región peripapilar (flechas). **d:** Esquema de la morfología, orientación y localización de las células gliales peripapilares adultas. Las CGPP forman una frontera que separa las capas de la retina de la cabeza del nervio óptico y Pecten. Poseen una alineación radial de sus somas, localizados a nivel de la CNI de la retina (Prada y cols. 1989b). Sus procesos internos en forma de arco van hacia las capas internas de la retina o CNO (Prada y cols. 1989b); y las extensiones de sus procesos internos llegan hasta el humor vítreo o la base del pecten (Schuck et al., 2000). Además, existe una “glía limitante” en la base del pecten (GBP) que separa la CNO del pecten (Schuck et al., 2000). RP, la retina pigmentaria; CPI, la capa plexiforme interna retina; Bv, los vasos sanguíneos en la CNO; NO, nervio óptico; CNO, cabeza nervio óptico; p, pecten; Asterisco, ventrículo; CGPP, células gliales peripapilares. La barra = 40 μ m en a; 30 μ m en b, c.

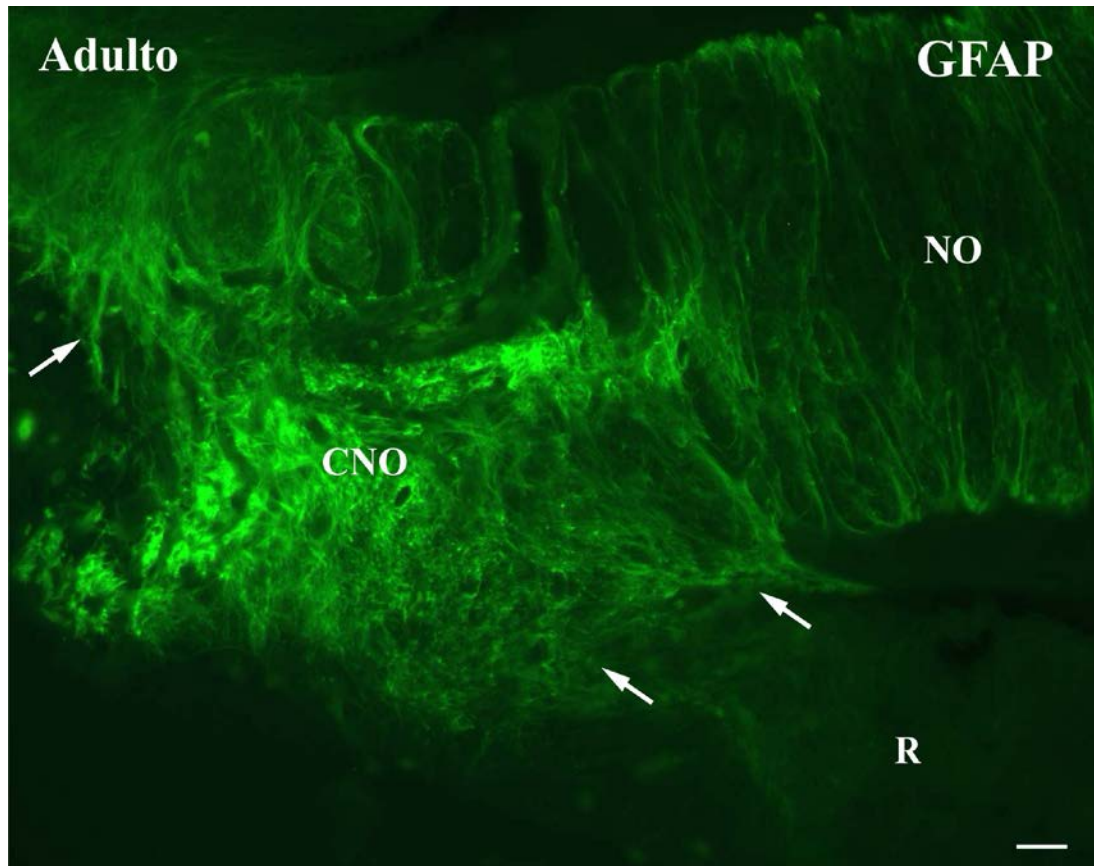


FIGURA 3. Expresión inmunohistoquímica de **GFAP** en una sección a nivel de papila (Disco óptico) de pollo adulto. Se muestra moderado marcaje en el NO, así como en la región peripapilar (flechas) en la zona límite entre la retina y la CNO, intensificándose el marcaje a nivel de la CNO. NO, nervio óptico; CNO, cabeza nervio óptico; R, retina. La barra = 30 μ m

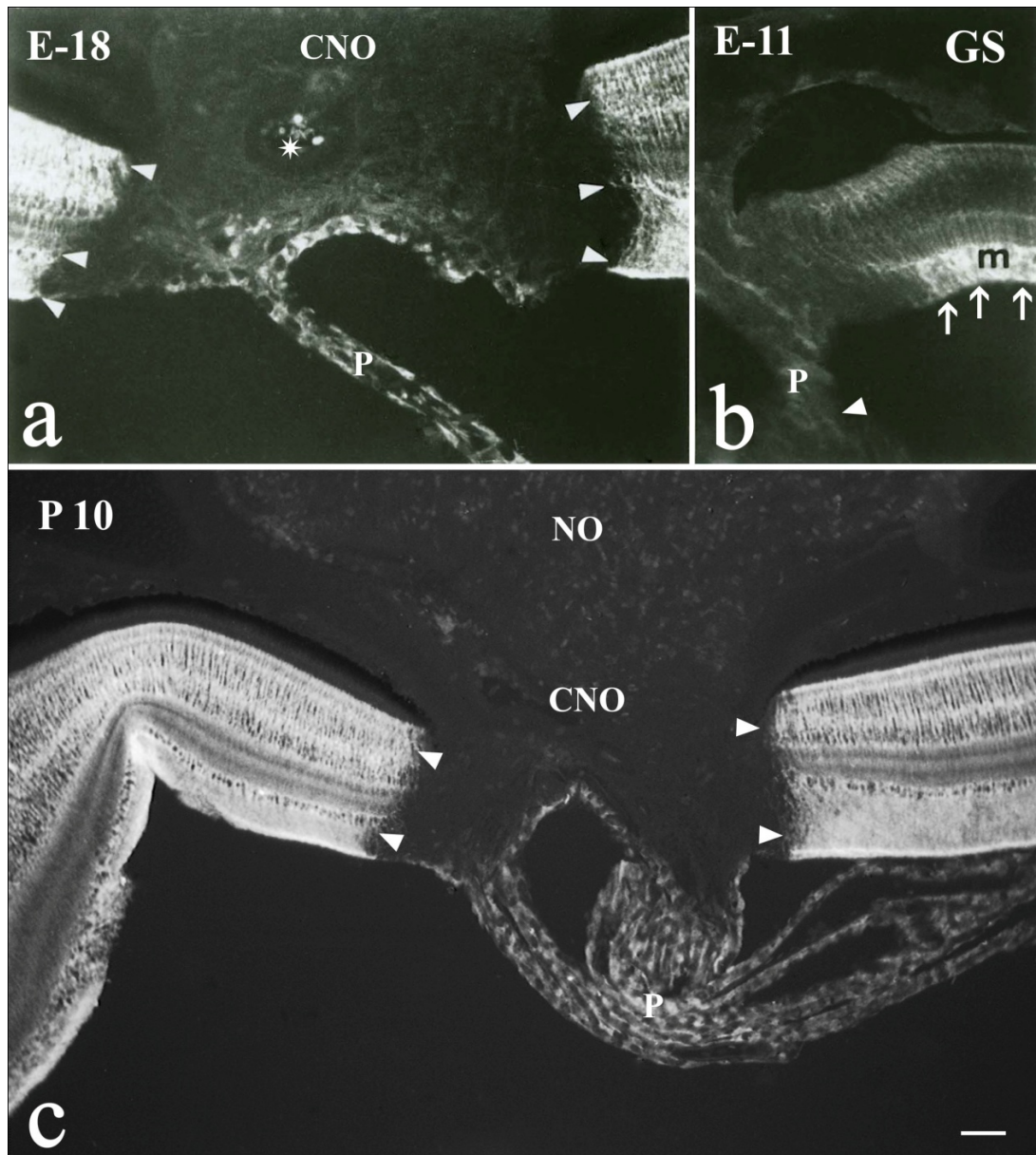


Figura 4. a, c: Expresión de **GS** en secciones de retina y papila (disco óptico) de pollo en E-18 y P-10 respectivamente. Intenso marcaje de las células de Müller de la retina a ambos lados del disco óptico; débil tinción tanto en la base del pecten como en el propio pecten; y tinción negativa en la región de las células peripapilares, CNO y NO. La frontera (en forma de S) entre las células peripapilares y la retina, está indicado por las cabezas de flechas. **b:** Se observa la expresión de **GS** en la papila óptica y retina de un embrión de pollo en E-11 al que previamente se le había inyectado hidrocortisona en E-10 para inducir la síntesis de **GS**. Muestra ausencia de marcaje en las células peripapilares, y marcaje en las células de Müller de la retina (m), con especial intensidad en los pies de estas (flechas). Muestra una ausencia total de marcaje en el pecten (Cabezas de flechas). CNO, cabeza nervio óptico; NO, nervio óptico; P, pecten; asteriscos, vasos sanguíneos. La barra = 30 μ m en a, b. c.

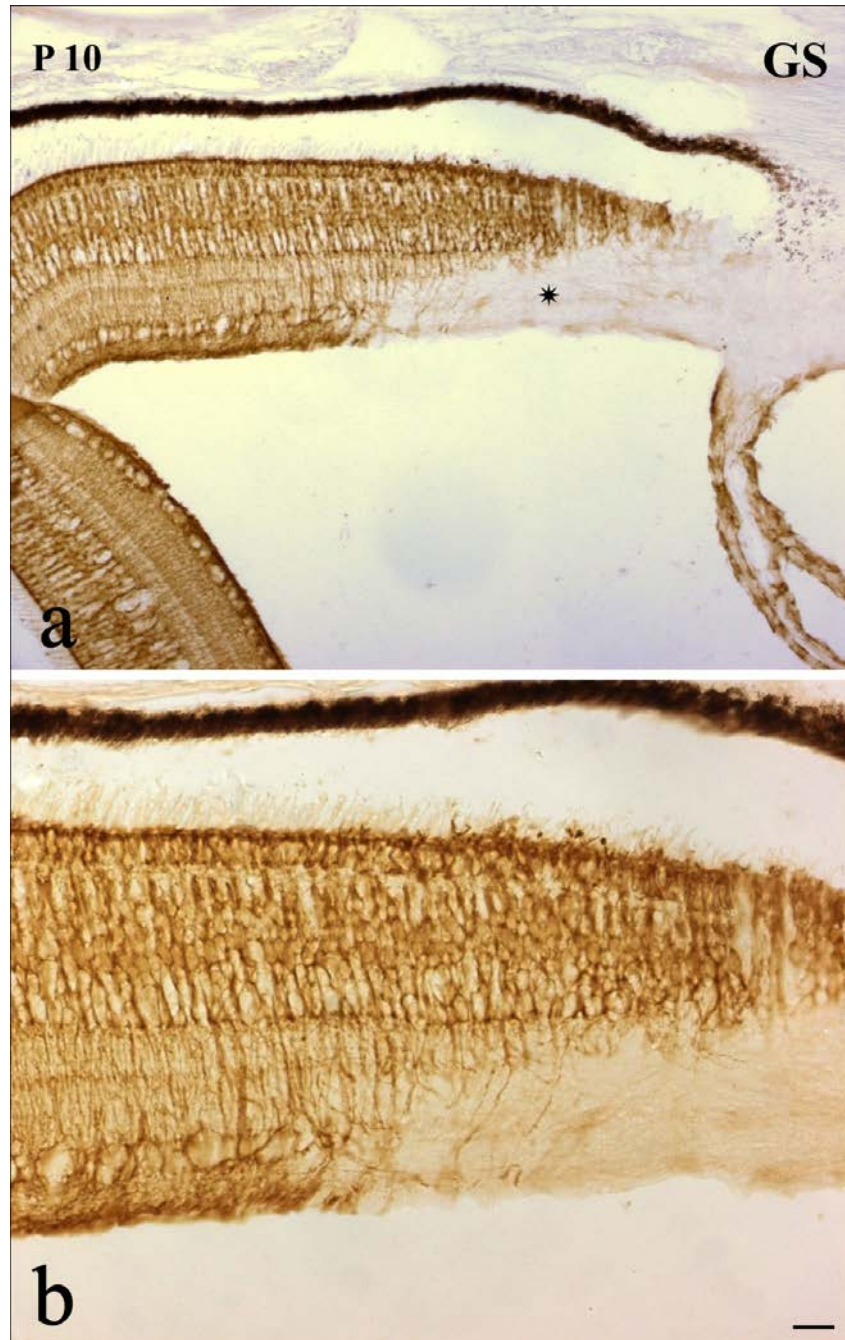


Figura 5. a, b: Inmunoperoxidasa de **GS** en una sección vertical sagital de retina adulta (P-10) que pasa por papila (margen del disco óptico). El asterisco muestra la zona de la retina la cual se observa a mayor aumento en **b**. Muestra ausencia total de marcaje de GS en las células peripapilares del margen del disco óptico. Se puede apreciar el gradiente de expresión de GS que muestran las células de Müller desde la parte más interna a la más externa de la retina. Las células de Müller solo expresa GS en las zonas de la retina donde hay sinapsis neuronal. La barra = 40 μ m en a; 30 μ m en b.

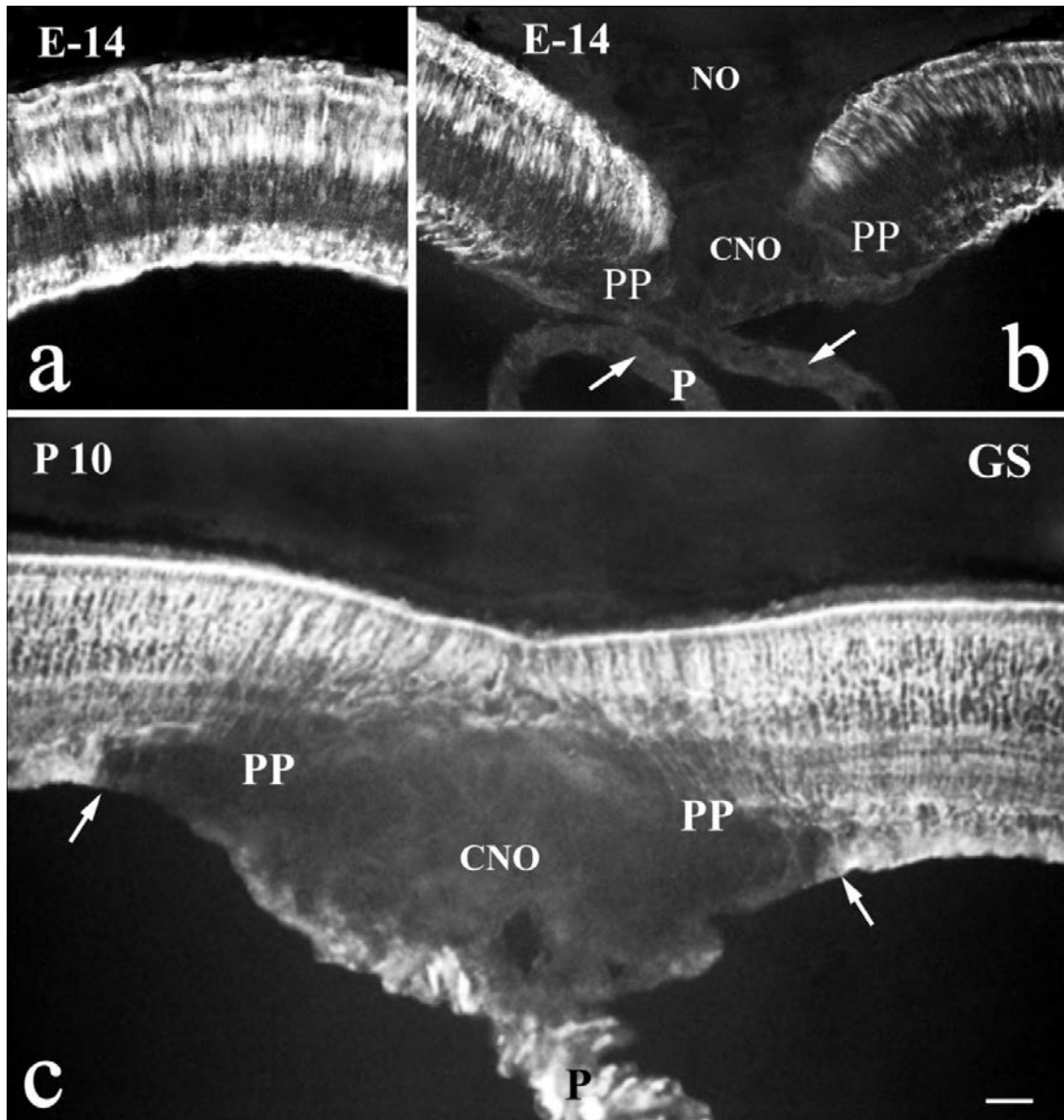


Figura 6. Expresión inmunohistoquímica de **GS** a nivel experimental. Expresión de GS en secciones verticales de retina **(a)**, y de retina y papila **(b)** de pollo inyectado con 300μg de hidrocortisona en saco vitelino en E-12 y sacrificado en E-14. La papila y las zonas peripapilares muestran ausencia total de inmunorreactividad. En la figura **b**, las flechas muestra la ausencia total de marcaje en el pecten. En la figura **c**, expresión de GS en papila en un pollo adulto (P-10) privado de luz durante 2 horas anteriores al sacrificio. Como se puede observar, la luz no altera la expresión de GS. P, pecten; PP, peripapila. Las flechas muestran los límites internos de la zona peripapilar. Scale bars = 30 μm en a, b, c.

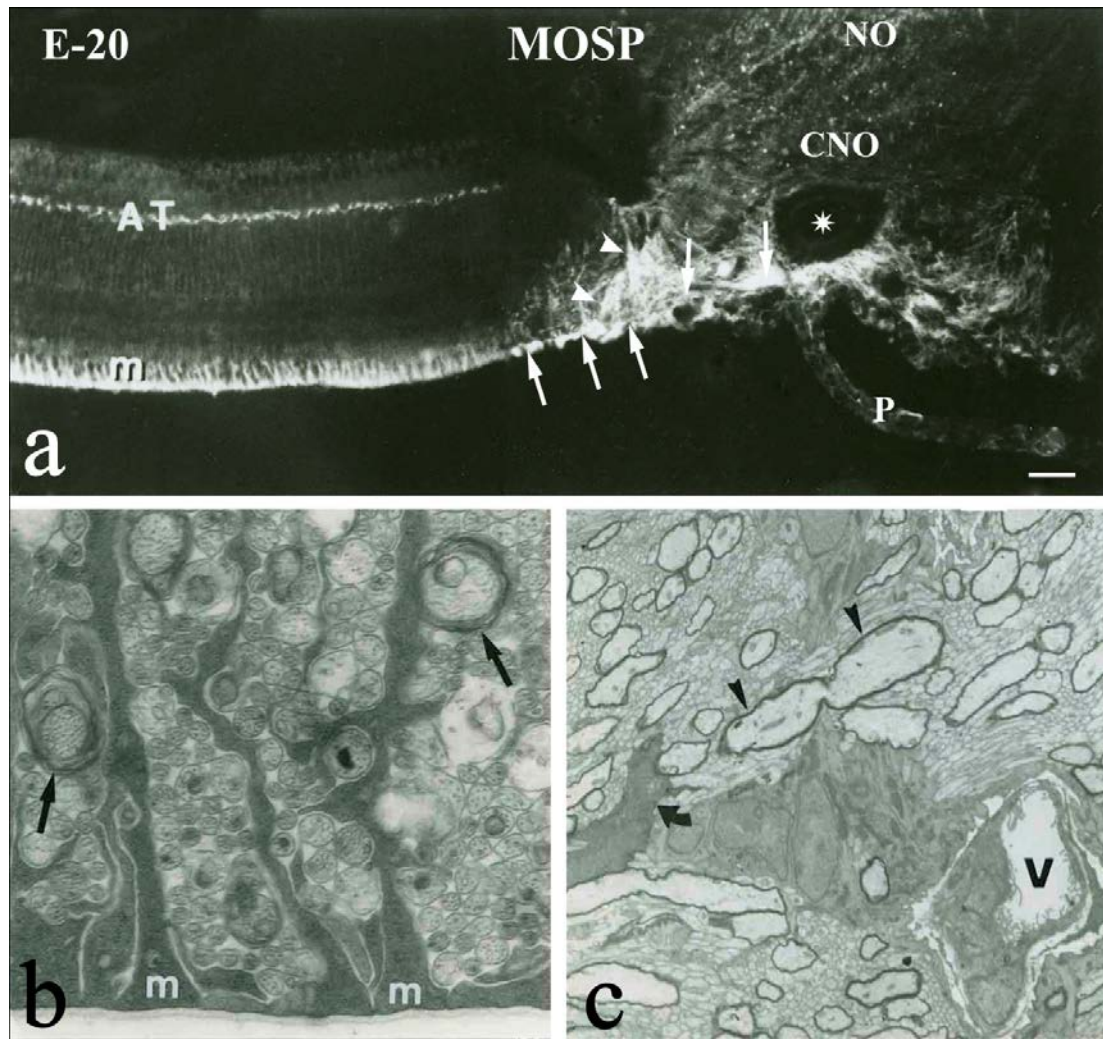


Figura 7. a: Expresión de **MOSP** en una sección vertical de retina y papila de embrión de pollo de E-20 . Las expresión de MOSP se observa en las células peripapilares, con una expresión más intensa la parte interna de estas células (pies) (flechas), y en la porción de CNO entre el vaso central (asterisco) con tinción negativa y el pecten. Las cabezas de flechas muestran el límite entre la retina y el territorio peripapilar. La expresión de MOSP en la retina se localiza, en los terminales axónicos de las células horizontales de la CPE; y en la parte más interna de la retina, en los pies de las células de Müller. **b, c:** fotografías realizadas al M/E de la capa de fibras del nervio óptico de la retina central y la zona peripapilar (cabeza nervio óptico) respectivamente. **b:** muestra los axones mielínico laxos (flechas), formados por las células de Müller (m), típicos de esa zona de la retina. **c:** Muestra los axones mielínicos densos (cabeza de flechas), formados por los oligodendrocitos (flecha curva), como en otras zonas del SNC. CNO, cabeza nervio óptico; NO, nervio óptico; P, pecten; Asteriscos, vasos sanguíneos; m, células de Müller; AT, axones de las células horizontales. La barra = 30 μ m en a; 800 nm en b, c.

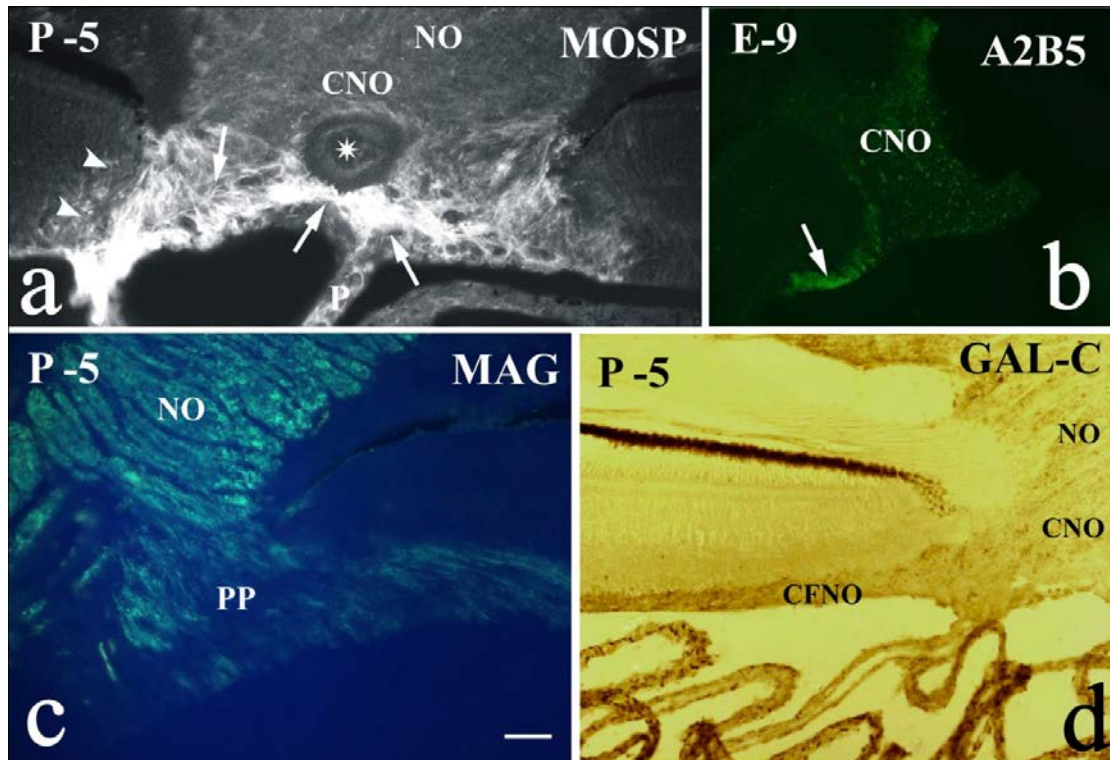


Figura 8. a: Expresión de **MOSP** en una sección vertical del disco óptico de pollo adulto (P-5). **MOSP** se expresa intensamente en las células peripapilares, en la zona cercana a la retina (las cabezas de flechas indican la frontera con la retina), y una expresión más intensa en la parte interna de estas células y en la porción de CNO (flechas) entre el vaso central con tinción negativa (asterisco) y el pecten (P). **b:** Expresión inmunohistoquímica de **A2B5** en secciones verticales de papila embrionaria de pollo en E-9. Se observa marcaje en la CNO y en la región de las células peripapilares, con mayor intensidad de expresión en los procesos internos (pies) de las células peripapilares (Flechas). **c:** Expresión inmunohistoquímica de **MAG** en secciones verticales de papila de pollo adulto (P-5). Marcaje en el NO y en región peripapilar. **d:** Expresión inmunohistoquímica de **Gal-C** en secciones verticales de retina y disco óptico adulto (P-5) de pollo. El marcaje se localiza en forma punteada a nivel de la capa de fibras del nervio óptico (CFNO) de la retina, la región peripapilar, en la CNO y en el NO. CNO, cabeza nervio óptico; NO, nervio óptico; P, pecten; asteriscos, vasos sanguíneos; PP, región peripapilar; CFNO, capa de fibras del nervio óptico. La barra = 30 µm en a, b, c, d.

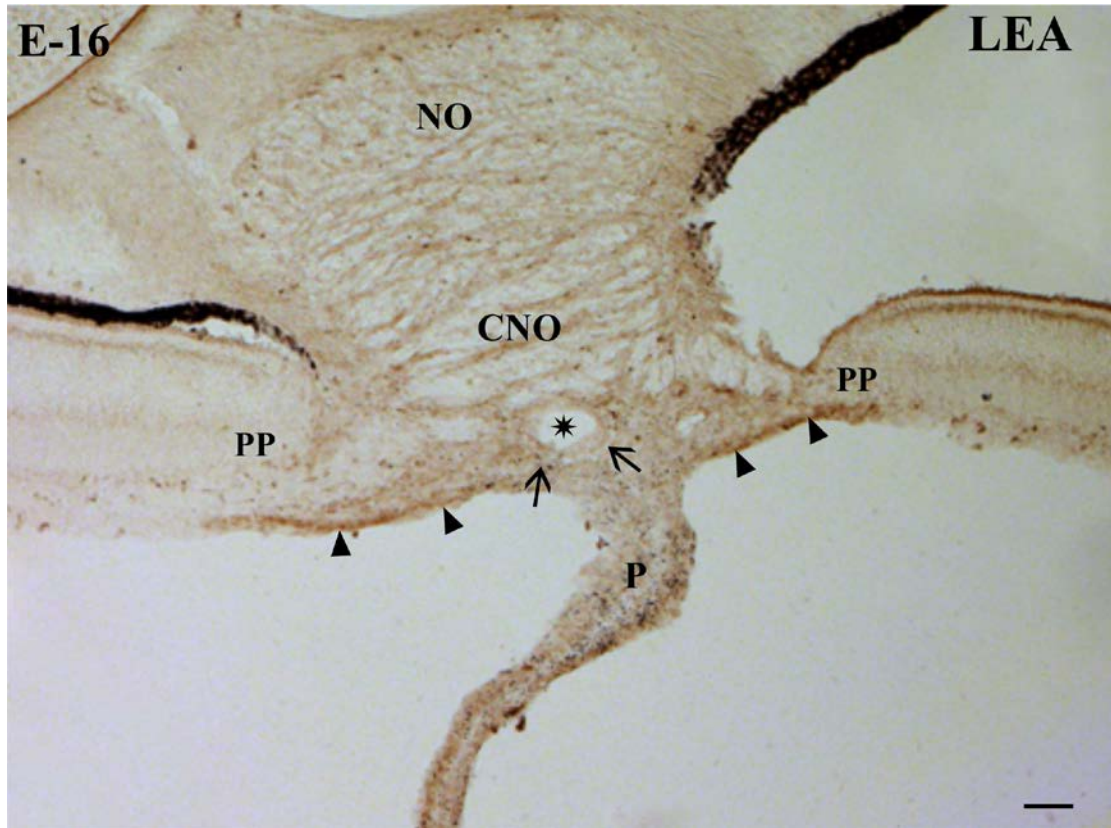


Figura 9. Marcaje histoquímico de **LEA** (*Lycopersicon esculentum*) en sección vertical de disco óptico de embrión de pollo en E-16. Se observa marcaje en el NO, CNO y en el pecten. En la región de las células peripapilares se muestra marcaje, con mayor intensidad en la zona de prolongaciones internas de dichas célula (cabezas de flechas), así como en la base del pecten (flecha) en la región alrededor de la arteria central de la CNO. NO, nervio óptico; CNO, cabeza nervio óptico; P, pecten; PP, peripapila; asterisco, arteria central. La barra = 30 μ m

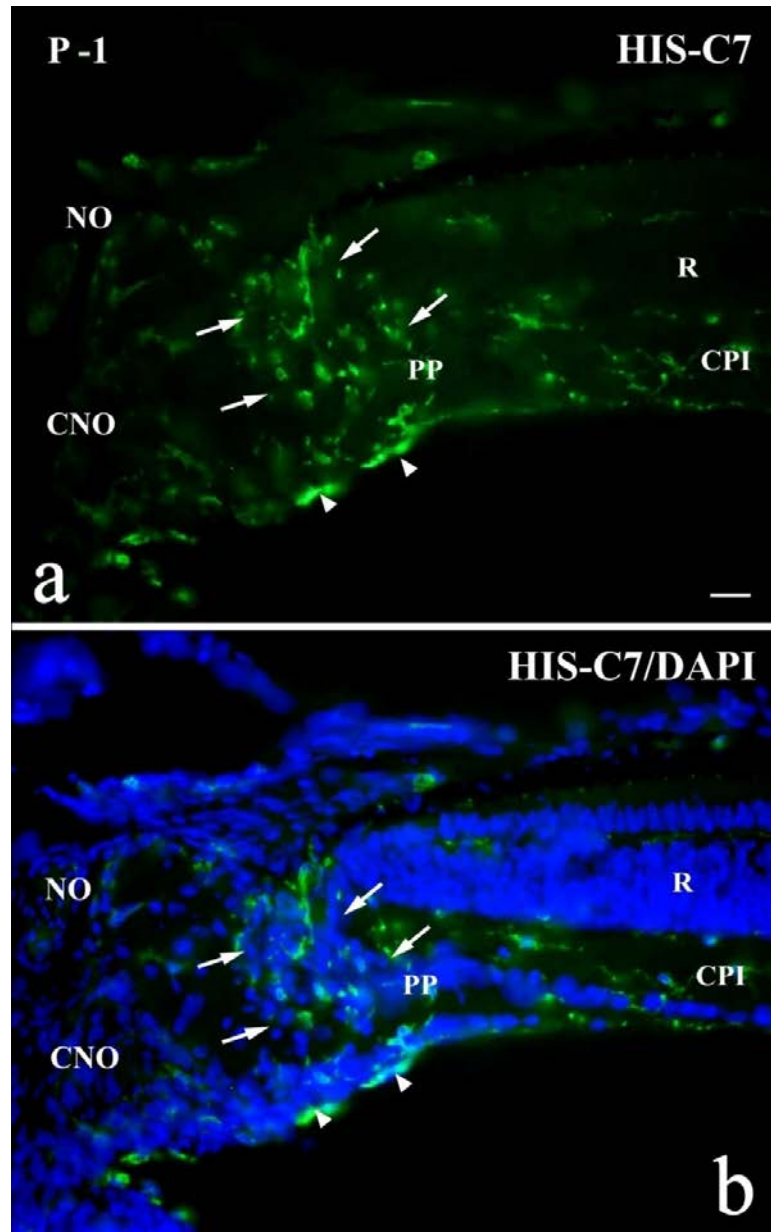


Figura 10. a, b: Expresión inmunohistoquímica de HIS-C7 y HIS-C7/DAPI respectivamente en secciones verticales a nivel de papila de pollo recién nacido (P-1). **a:** Muestra marcaje de HIS-C7 en la región del margen del disco óptico. Las flechas muestran los límites del territorio de la región peripapilar, donde se observa marcaje. En la zona interna de la región peripapilar se muestra claramente un intenso marcaje de células microgliales (cabezas de flechas). Expresión de HIS-C7 en distintas capas de la retina, con una mayor concentración en la CPI y CFNO. **b:** Doble marcaje HIS-C7/DAPI. Donde DAPI muestra la localización de los núcleos en la región peripapilar, coincidiendo con la mayor expresión de HIS-C7 (flechas). En la zona interna de la región peripapilar se muestra la colocalización de los núcleos de células microgliales (cabezas de flechas). La barra = 15 μ m en a, b.

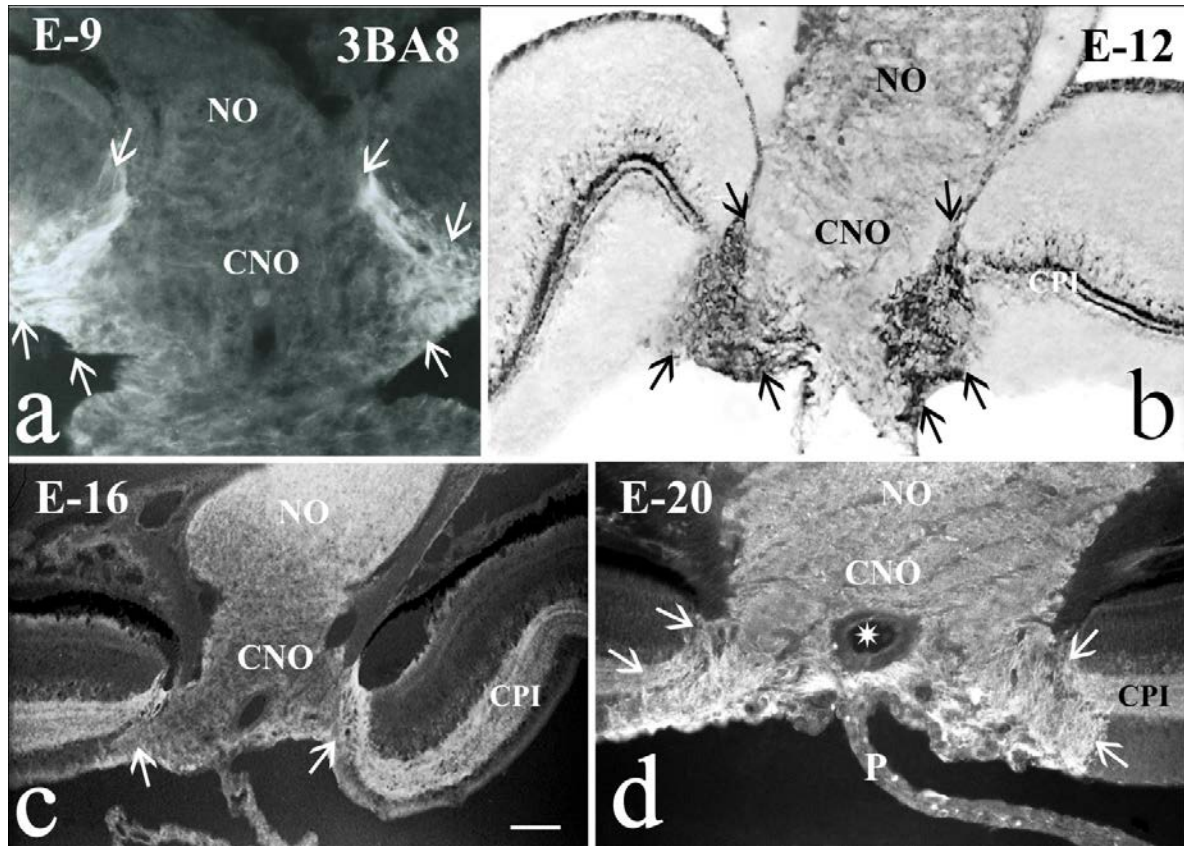


Figura 11. Expresión de **3BA8** en el disco óptico de pollo en diferentes estadios del desarrollo. **a:** En E-9 3BA8 muestra intenso marcaje en el territorio de las células peripapilares y débil o nulo marcaje en la CNO y NO. las flechas delimitan los vértices del territorio triangular de las células peripapilares. **b:** en E-12 muestra una intensidad de marcaje mayor que en (a) en la región de las células peripapilares (flechas). Marcaje débil, pero más intenso que en (a) en la CNO y en el NO. Inicio del marcaje de la CPI de la retina. **c:** en E-16 mayor intensidad de marcaje en NO, CNO, CPI y en la región de las células gliales peripapilares (flechas). **d:** En E-20 muestra una intensa expresión de 3BA8 en todo el territorio de las células gliales peripapilares, cuya frontera en forma de S entre las células peripapilares y la retina se indica con flechas; Expresión muy intensa de 3BA8 en la zona de la CNO, entre el vaso central y el pecten y expresión algo más débil en la CPI. Patrón de inmunotinción similar al del adulto. NO, nervio óptico; CNO, cabeza nervio óptico; P, pecten; Asterisco, vaso central; CPI, capa plexiforme interna. La barra = 30 μ m en a, b, c, d.

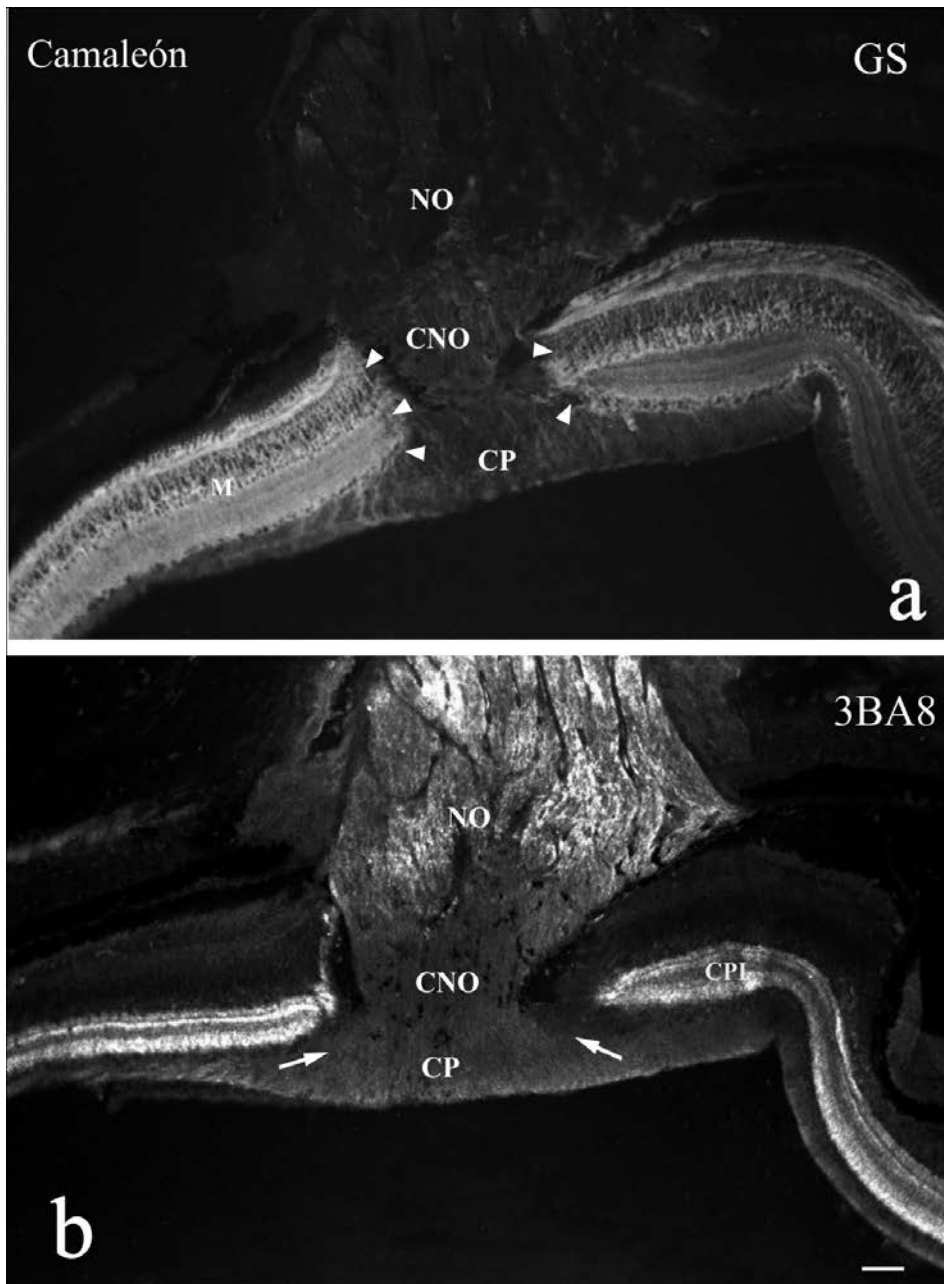


Figura 12. a: Expresión inmunohistoquímica de **GS** en sección vertical de disco óptico de camaleón. Marcaje nulo o muy débil en la CNO y el conus papilaris y territorio peripapilar. La cabezas de flechas muestran el límite de la región peripapilar con la retina. Marcaje intenso a nivel de retina, mostrando la expresión de GS en las células de Müller. **b:** Expresión inmunohistoquímica de **3BA8** en sección vertical disco óptico de camaleón. Ausencia de marcaje en CNO y conus papilaris y región peripapilar (flechas). Marcaje en el NO y en la CPI. CNO, cabeza nervio óptico; CP, conus papilaris; CPI, capa plexiforme interna; M, células de Müller. La barra = 30 μm / 15 μm en a, b.

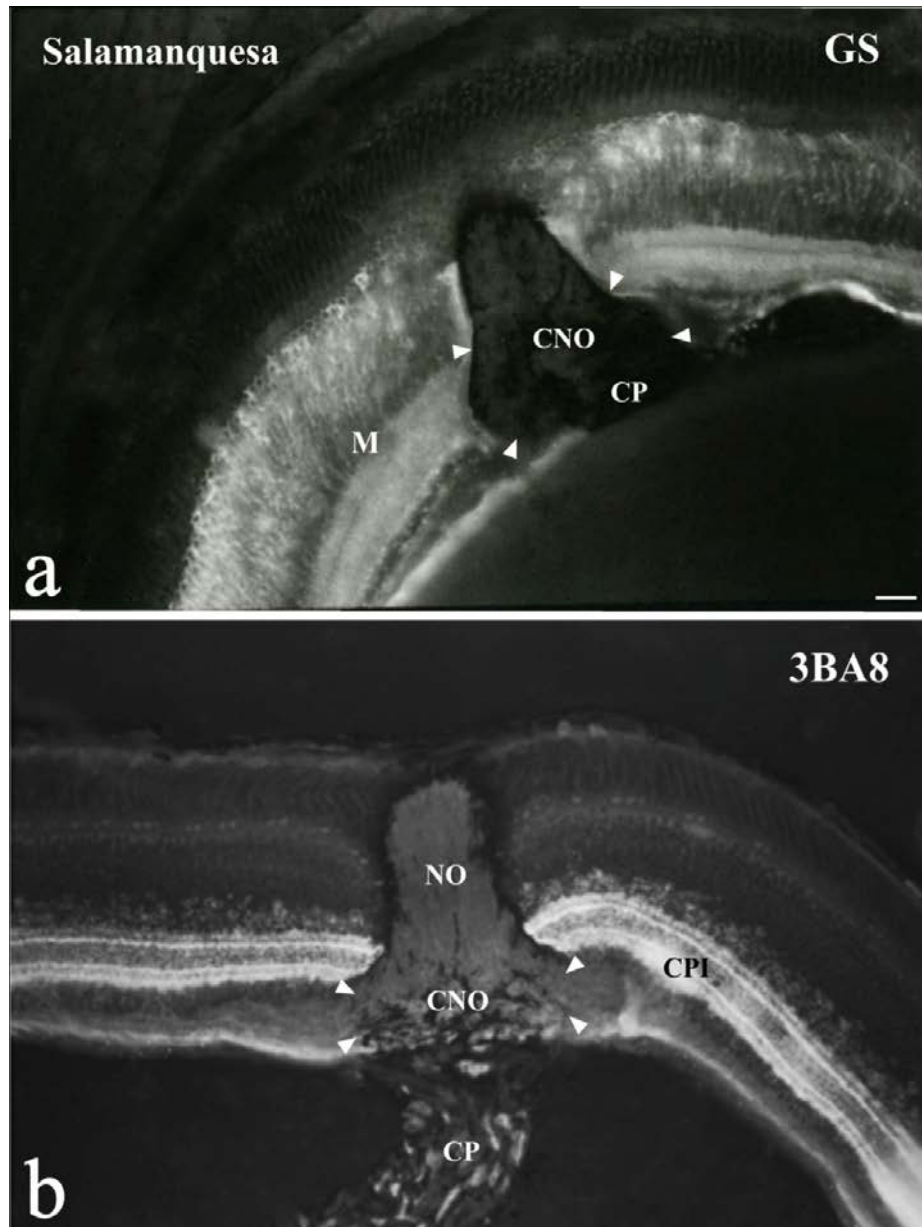


Figura 13. a: Expresión inmunohistoquímica de **GS** en sección vertical de disco óptico de salamanquesa. Marcaje nulo en la CNO, conus papilaris y región peripapilar. Las cabezas de flechas muestran el límite entre la retina y el territorio peripapilar. Marcaje a nivel de retina, mostrando la expresión de GS en las células de Müller. **b:** expresión inmunohistoquímica de **3BA8** en sección vertical de retina y disco óptico de salamanquesa. Ausencia de marcaje en la CNO, NO y en la región peripapilar; Las cabezas de flechas muestran el límite entre la retina y el territorio peripapilar. Debil marcaje en forma discontinua en el conus papilaris. En la retina muestra un fuerte marcaje en la CPI. CNO, cabeza nervio óptico; CP, conus papilares; CPI, capa plexiforme interna; M, celulas de Müller. La barra = 30 μ m en a, b.

DISCUSIÓN

La papila representa desde el inicio del desarrollo una región donde las necesidades estructurales son más evidentes que en otras zonas del globo ocular. En la papila se produce la unión de los epitelios pigmentario y neural, y la retina interrumpe sus capas para permitir la salida de las fibras del nervio óptico. Estos hechos determinan que las células peripapilares tengan características especiales respecto a las típicas células neuróglícas del SNC o respecto a las células de Müller de la retina y que adapten su morfología y composición molecular a los requerimientos funcionales de la zona.

Las células peripapilares realizan la conducción ordenada de los axones de las células ganglionares de la retina y fibras centrífugas que discurren por la cabeza del nervio óptico. Además, mantienen las condiciones estructurales necesarias para proteger los citados axones durante los movimientos del globo ocular. Por este motivo, interpretamos que como necesidad estructural adquieren en el curso del desarrollo forma de araña. El cuerpo de la célula está desplazado hacia la parte más externa o escleral de la papila, probablemente para no interrumpir el paso de axones hacia el nervio óptico. Las prolongaciones internas son gruesas, largas y arqueadas y forman un entramado glial que a modo de lámina cribosa, separan la retina de la cabeza del nervio óptico. Todos los datos hasta aquí planteados, justifican el elevado contenido de proteínas relacionadas con el citoesqueleto celular que tienen estas células. La parte más externa de la papila es donde hay un mayor requerimiento estructural y en concordancia con este hecho encontramos, durante el desarrollo y también en el tejido adulto, la mayor expresión de inmunorreactividad para 3CB2. En otras zonas del SNC donde el armazón celular juega un papel estructural parecido como en la placa del

suelo medular o el rafe troncoencefálico, el contenido del antígeno 3CB2 es también muy elevado (Prada y cols. 1995).

El hecho que 3CB2 esté presente en las células de la papila desde los estadios iniciales del desarrollo, sugiere la posibilidad que esta proteína asociada a filamentos intermedios, pueda jugar algún papel relacionado con la diferenciación celular como también fué sugerido en el caso de las células de Müller de la retina (Prada y cols. 1995). Además de 3CB2, las células de la papila muestran una elevada inmunorreactividad para 3BA8 durante todo el desarrollo. El antígeno que reconoce 3BA8, es una proteína que se encuentra localizada en la superficie celular fundamentalmente de neuronas de asociación como son las células amacrinas de la retina. Los distintos tipos de células gliales del sistema nervioso, no expresan 3BA8. Pero las células de la papila óptica si lo contienen. Por lo tanto, sospechamos que algún papel específico tiene que desempeñar a este nivel, y por ello hay que pensar que el comportamiento de las células peripapilares es diferente al de la mayoría de las células macrogliales del SNC.

Las células de la placa del suelo medular, son células gliales modificadas que expresan numerosas moléculas asociadas con la adhesión celular (CAMs) y con la matriz extracelular (ECM). Entre ellas podemos citar, N-cadherina, P-tubulina, laminina, fibronectina, proteoglicanos como el sulfato de heparina, y el colágeno IV (Shiga y Oppenheim, 1991). Experimentos in vitro han mostrado que las moléculas CAMs y ECM promueven el crecimiento neurítico y/o la fasciculación. La N-cadherina estimula el crecimiento neurítico in vitro (Bixby y Zhang, 1990). Las glicoproteínas ECM, tales como laminina, fibronectina, sulfato de heparina, y los colágenos tipo I y IV

estimulan la extensión neurítica de neuronas en cultivo (Akers y cols, 1981; Lander y cols. 1982; Vlodaysky y cols. 1982; Thompson y Pelto, 1982; Carbonette y cols. 1983; Rogers y cols. 1983; Liesi y cols. 1984; Hammarback y cols. 1985; Tomaselli y cols. 1986; Hall y cols. 1987; Chernoff, 1988).

En contraste con los numerosos estudios *in vitro*, sólo unos pocos estudios *in vivo* han analizado el papel de algunas de estas moléculas (Silver y Rutishauser, 1984; Fraser y cols. 1988; Shiga y Oppenheim 1991). En la placa del suelo, se ha sugerido que algunas de estas moléculas, sobre todo las glicoproteínas de la superficie celular, podrían mediar interacciones que promueven el avance de los conos de crecimiento así como un importante papel en la guía y la proyección de los axones a través de la placa del suelo (Shiga y Oppenheim, 1991). En el pollo, las células de la placa del suelo expresan una elevada inmunorreactividad para 3CB2 en los estadios que migran los axones de las neuronas comisurales de la medula espinal (Prada y cols. 1995). La expresión de los antígenos 3CB2 y 3BA8 en la papila óptica, coincide también con la migración de los axones de las células ganglionares de la retina, los cuales son guiados y ordenados en esta zona para dirigirse por el nervio óptico hacia el cerebro. Por lo tanto, estos datos sugieren una participación de las células peripapilares a través de las moléculas reconocidas por 3CB2 y 3BA8 en las funciones anteriormente descritas. El presente estudio provee de fundamentos para un análisis experimental del papel de estas moléculas en el crecimiento, elongación y guía de los axones del nervio óptico a través de la papila.

La presencia de MOSP en células peripapilares durante el desarrollo, cuando todavía no se ha formado la mielina, sugiere que MOSP podría tener alguna participación

en alguno de los procesos del desarrollo. El hecho de que MOSP se localice sobre todo en la parte interna de las prolongaciones de las células de Müller, sugiere que esta molécula podría jugar un papel importante en el proceso de mielinización de los axones de gran tamaño que discurren por la capa de fibras del nervio óptico. Otras proteínas relacionadas con la mielina como es el caso de la MAG, también se encuentran en células de Müller de la retina humana (Stefansson y cols. 1984). Por lo tanto las células de Müller podrían tener una función de oligodendrocito, además de las funciones de astrocito que ellas realizan en la retina de los vertebrados. Este hecho justificaría la presencia de abundantes axones mielinizados (mielina laxa) en la capa de fibras del nervio óptico de la retina, en ausencia de oligodendrocitos. A este respecto, Prada y cols. (1989 a) sugirieron, mediante microscopía electrónica, que las células de Müller de la retina del pollo eran las que formaban la mielina de la capa de fibras del nervio óptico de la retina. Nuestros resultados de microscopía electrónica, también muestran en la papila óptica, que las células peripapilares pueden ser las responsables de la mielinización de los axones que pasan por esta zona. La presencia de MOSP en las células peripapilares representa un dato muy importante, pues es una aportación más para sugerir que en el SNC algunos tipos de células gliales, tienen la capacidad de comportarse según los requerimientos neuronales de la zona donde se encuentren. Por lo tanto son células pluripotentes, capaces de realizar funciones que hasta ahora se pensaba que sólo eran privativas de diferentes tipos celulares. También en relación con la mielina de la papila hemos señalado en el apartado de resultados, que se trata de mielina densa como la que se observa en general en el resto del SNC donde existen vasos sanguíneos, y no de mielina laxa como la que se aprecia en el resto de la retina.

Este hecho podría interpretarse de dos maneras: la laxitud de la mielina podría ser un artefacto de la fijación provocado por la ausencia de vasos sanguíneos en la retina del pollo; o bien que se trate de dos procesos distintos de acuerdo con los cuales, las células de Müller de la retina se comportarían como oligodendrocitos atípicos y las células de la papila seguirían un proceso de mielinización similar al de los oligodendrocitos del resto del SNC.

Hemos comprobado que las células de Müller de la región peripapilar muestran una expresión parcial de GS. Sólo la parte externa de estas células expresan GS. Por otro lado, las células gliales peripapilares no expresan GS. Por lo tanto, podemos concluir que la inducción indiscriminada con hidrocortisona está regulada por algún otro factor, que presumiblemente podría ser la activación de los genes que codifican selectivamente las células o los territorios de expresión celular donde se sintetiza la GS en el animal adulto.

La otra explicación sería que la hidrocortisona sólo actúa en las células que contienen receptores para esta hormona y es posible que las células peripapilares carezcan de ellos. Esta misma explicación serviría para las zonas internas de las células de Müller localizadas en la proximidad de la papila. El experimento que realizamos duplicando la dosis de hidrocortisona demuestra que no por poner más concentración de corticosteroides se estimulan las células peripapilares. En este caso, la expresión de GS sigue siendo inexistente.

Teniendo presentes las dos tendencias científicas comentadas en esta discusión, para explicar la inducción y los mecanismos que activan la síntesis de GS por parte de las células de Müller, nosotros interpretamos que el proceso se pone en

marcha gracias a la regulación y aparición de distintos factores y mecanismos que son complementarios entre sí y se encuentran dentro de las dos propuestas científicas. Por un lado, los corticosteroides son absolutamente necesarios, pues cuando se inyecta metopirona y se inhiben los corticoides, las células de Müller dejan de expresar GS. Cuando el tiempo de inhibición de la HC es superior a 24 horas, y los niveles de HC se recuperan, de nuevo las células de Müller vuelven a sintetizar GS. Por otro lado, hemos comprobado que los contactos celulares, fundamentalmente los realizados en zonas donde hay sinapsis, son absolutamente necesarios para que los corticoides puedan inducir la síntesis de GS. Por otro lado, podríamos interpretar que: O las células peripapilares no tienen receptores para la hidrocortisona y ello explicaría la incapacidad para sintetizar GS o el programa de regulación génica de todos estos mecanismos excluye a las células peripapilares. A todo esto hay que agregar el posible papel que debe jugar la presencia de distintos niveles de glutamato en el medio extraneuronal activando los receptores neuronales o bien actuando directamente sobre la propia célula de Müller.

Las células peripapilares de otras especies como el camaleón y la salamandresa, no expresan 3BA8. Por lo tanto, deducimos que también actúa funcionalmente de forma diferente. Este hecho podría estar relacionado con las diferencias anatómicas y funcionales que presenta la vía visual de las aves y la de los reptiles; y estaría en concordancia con el tectum óptico de las aves, el cual está muy desarrollado, al igual que la vía centrifuga de fibras procedente del núcleo istmo-óptico.

Las células peripapilares, representan un tipo especial de neuroglia capaz de realizar las funciones normalmente asignadas por separado al resto de las células gliales del SNC, pero con excepciones; pues se admite que la GS es un marcador de astrocitos en el SNC y sin embargo en el caso de las células de la papila este hecho por las razones que hemos señalado, no se cumple.

Pensamos que los datos aportados y discutidos en este estudio, abren nuevas vías experimentales para conocer mejor la naturaleza y funciones de las células de la neuroglia y para comprender las relaciones neurogliales durante el desarrollo del SNC.

CONCLUSIONES

1. Las características morfológicas y la composición antigénica que hemos observado en las células peripapilares, demuestran que son células especializadas con naturaleza propia y funciones muy cualificadas.
2. Las células de la papila forman un entramado glial que a modo de lámina cribosa, separan la retina de la cabeza del nervio óptico y protegen a los axones durante los movimientos del globo ocular.
3. A diferencia de lo que ocurre en la retina, los axones del nervio óptico muestran un recubrimiento mielínico denso como ocurre en otras zonas del SNC.
4. La ausencia de GS en las células de la papila óptica y la existencia de un gradiente de expresión de GS, el cual es dependiente de la presencia de sinapsis, demuestra que las células gliales necesitan los contactos neuronales para expresar GS.
5. La capacidad de respuesta a la inducción corticoidea está en concordancia con el gradiente de diferenciación de la retina y de sus células nerviosas. En ningún caso la papila, la región peripapilar y el nervio óptico expresan GS.
6. El incremento de la concentración de corticoides induce con más intensidad a las células de Müller y éstas muestran una mayor expresión de GS. Sin embargo, aunque forcemos la inducción de GS con mayor dosis de corticoides, los astrocitos de la papila y las células peripapilares siguen mostrando una inmunoreactividad negativa para la GS.
7. Los contactos celulares, fundamentalmente los realizados en zonas donde hay sinapsis, son absolutamente necesarios para que los corticoides puedan inducir la síntesis de GS. En este sentido, las células peripapilares no tienen receptores para

-
- la hidrocortisona y ello explicaría la incapacidad para sintetizar GS o el programa de regulación génica de todos estos mecanismos excluye a las células peripapilares.
8. La coincidencia temporal y espacial del antígeno 3BA8 en las células peripapilares, con la formación de la capa de fibras del nervio óptico y la papila, sugiere que este antígeno podría estar implicado con algún mecanismo para guiar los axones de las células ganglionares de la retina del pollo hacia el nervio óptico.
 9. La presencia de proteínas relacionadas con la mielina, en las células peripapilares, unido a las evidencias que hemos observado con el microscopio electrónico sobre los axones mielinizados de la papila y su relación con las células peripapilares, sugieren que estas células son formadoras de mielina densa igual a la que fabrican los oligodendrocitos.
 10. Las células peripapilares de otras especies como el camaleón y la salamandera, no expresan 3BA8. Por lo tanto, deducimos que también actúa funcionalmente de forma diferente. Este hecho podría estar relacionado por las diferencias anatómicas y funcionales que presentan la vía visual de las aves y la de los reptiles, a nivel del tectum y del núcleo istmo-óptico.
 11. Las células gliales de la papila óptica, representan un tipo especial de neuroglia capaz de realizar las funciones normalmente asignadas por separado al resto de las células gliales del SNC.

BIBLIOGRAFIA

A

Acarin, L.; Vela, J.M.; González, B. y Castellano, B. (1994). Demonstration of poly-N-acetyl lactosamine residues in ameboid and ramified microglial cells in rat brain by tomato lectin binding. *J. Histochem. Cytochem.* **42**:1033-1041.

Albert, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K. y Watson, J.D. (1996). El citoesqueleto. En *Biología molecular de la célula*. Omega S.A. tercera edición, **cap. 16**. pp. 852-860.

Alfayate, M.C.; Santos, E.; Vanes, C.; Casañas, N.; Viñoly, R.; Romero- Alemán, M. y Monzón- Mayor, M. (2005). Is the conus papillaris of the lizard a model of blood brain barrier?. *VII European meeting on Glial Cell Function in Health and Disease. Amsterdam.*

Algere, P. y Kock, E. (1983). Experimental epiretinal membranes induced by intravitreal carbon particles. *Am. J. Ophthalmol.* **96**:345-353.

Anezary, L.; Medina, J.I.; Sánchez-Nogueiro, J.; López-Gallardo, M. y Prada, C. (2001). Shape diversity among chick retina Muller cells and their postnatal differentiation. *J Comp Neurol.* **438**:32-49.

Araque, A.; Carmignoto, G. y Haydon, P.G. (2001) Dynamic signaling between astrocytes and neurons. *Annu Rev Physiol.* **63**:795-813.

Arikawa, K. y Williams, D.S. (1991). Alpha-actinin and actin in the outer retina: a double immunoelectron microscopic study. *Cell Motility and the cytoskeleton.* **18**:15-25.

Armstrong, R.; Aja, T.; Hoang, K.; Gaur, S.; Bai, X.; Alnemri, E.; Litwack, G.; Karanewsky, D.; Fritz, L. y Tomaselli, K. (1997). Activation of the CED3/ICE-related protease CPP32 in cerebellar granule neurons undergoing apoptosis but not necrosis. *J Neurosci.* **17**:553-562.

B

- Baba, H.; Nakahira, K.; Morita, N.; Tanaka, F.; Akita, H.; y Ikenaka, K. (1997):** Gfapp gene-expression during development of astrocyte. *Dev. Neurosci.* **19**: 49-57.
- Barnstable, C.J. (1993).** Glutamate and GABA in retinal circuitry. *Curr. Opin. Neurobiol.* **3**:520-525.
- Benjamin, A.M. y Quastel, J.H. (1975).** Metabolism of amino acids and ammonia in rat brain cortex slices in vitro: a possible role of ammonia in brain function. *J Neurochem.* **25(3)**:197-206.
- Bhattacharjee, J. y Sanyal, S. (1975).** Developmental origin and early differentiation of retinal Müller cells in mice. *J. Anat.* **120**:367- 372.
- Bignami, A. (1984).** Glial fibrillary acidic (GFA) protein in Müller glia. Immunofluorescence study of the goldfish retina. *Brain Res.* **300**:175-178.
- Bignami, A. y Dahl, D. (1979).** The radial glia of Müller in the rat retina and their response to injury. An immunofluorescence study with antibodies to the glial fibrillary acidic (GFA) protein. *Exp. Eye Res.* **28**:63-69.
- Bito, L.Z.; Davson, H. y Fenstermacher, J.D. (1977).** The ocular and cerebrospinal fluids. Eds. Fenstermacher, J.D. and Davson, H Academic Press, New York.
- Björklund, H. y Dahl, D. (1985).** Glial fibrillary acidic protein (GFAP)-like immunoreactivity in the rodent eye. *J Neuroimmunol.* **8**:331-345.
- Bodega, G.; Suárez, I.; Fernández, B. (1990).** Radial astrocytes and ependymocytes in the spinal cord of the adult toad (*Bufo bufo* L.). An immunohistochemical and ultrastructural study. *Cell Tissue Res.* **260**:307-14.
- Bok, D. (1993).** The retinal pigment epithelium: a versatile partner in vision. *J. Cell Sci Suppl.* **17**:189-95.
- Boya, J.; Calvo, J.; Carbonell, A.L. y García-Mauriño, E. (1986).** Nature of macrophages in rat brain. *Acta anat.* **127**:142-145.

Boya, J.; Carbonell, A. L.; Calvo, J. y Borregón, A. (1987): Ultrastructural study on the origin of rat microglia cells. *Acta anat.***130:** 329-335.

Boya, J.; Carbonell, A.L.; Calvo, J. y Borregón, A. (1991). Microglial cells in the central nervous system of the rabbit and rat: cytochemical identification using different lectins. *Acta anat.* **140:**250-253.

Boycott, B.B. y Hopkins, J.M. (1981). Microglia in the retina of monkey and other mammals; its distinction from other types of glia and horizontal cells. *Neuroscience.* **6:** 679-688.

Braekevelt, C.R. (1989). Fine structure of the conus papillaris in the bobtail goanna (*Tiliquet rugosa*). *Histol Histopathol.* **4(3):**287-93.

Braekevelt, C.R. y Richardson, K.C. (1996). Fine structure of the pecten oculi in the Australian galah (*Eolophus roseicapillus*) (Aves). *Histol Histopathol.* **11(3):**565- 71.

Brecha, N. C. (1983). Retinal neurotransmitters: histochemical and biochemical studies. *Chemical Neuroanatomy* (Emson PC, ed), pp.85-**129**. New York: Raven.

Bunge, R.P. (1968). Glial cells and the central myelin sheath. *Physiol Rev* 48:197-251.

Bunt, S.M. (1982). Retinotopic and temporal organization of the optic nerve and tracts in the adult goldfish. *J Comp Neurol.* **206:** 209-26.

Bunt-Milam, A.H. y Saari, J.C. (1983). Immunocytochemical localization of two retinoid-binding proteins in vertebrate retina. *J. Cell. Biol.* **97:**703-712.

C

Cammer, W. (1990). Glutamine synthetase in the central nervous system is not confined to astrocytes. *Journal of Neuroimmunology.* **26:**173-178. Elsevier.

Campbell, K. y Gotz, M. (2002). Radial glia: multi-purpose cells for vertebrate brain development. *Trends Neurosci.* **25:** 235-8.

Cardoso, B.N.; Buijs, R. y Van der Want, J. (1991). Glutamate-like immunoreactivity in retinal terminals in the nucleus of the optic tract in rabbits. *J. Comp. Neurol.* **309:** 261-270.

Casañas, N. (2005). Proliferación y Diversidad de las células astrogiales durante la ontogenia del Sistema Visual de *Gallotia galloti*. *Tesis doctoral. Universidad de la Laguna*.

Chabot, P. y Vincent, M. (1990). Transient expression of an intermediate filament-associated protein (IFAPa-400) during in vivo and in vitro differentiation of chick embryonic cells derived from neuroectoderm. *Dev. Brain. Res.* **54**:195-204.

Chader, G.J. (1971). Hormonal effects on the neural retina. *Arch. Biochem Biophys.* **144**: 657- 662.

Chan-Ling, T. y Stone, J. (1991). Factor determining the migration of astrocytes into the developing retina: Migration does not depend on intact axons or patent vessels. *J. Comp. Neurol.* **303**:375-386.

Chao, T.I.; Grosche, K.J.; Friedrich, K.J.; Biedermann, B.; Francke, M.; Pannicke, T.; Reichlet, W.; Wulst, M.; Muhle, C.; Pritz-Hohmeier, S.; Kuhrt, H.; Faude, F.; Drommer, W.; Kasoer, M.; Buse, E. y Reichenbach, A. (1997). Comparative studies on mammalian Muller (retinal glial) cells. *J. Neurocytology.* **26**:439-454.

Chen, Y. y Swanson, R.A. (2003). Astrocytes and brain injury. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **23**:137-149.

Chow, R.L. y Lang, R.A. (2001). Early eye development in vertebrates. *Annu Rev Cell Dev Biol.* **17**: 255-96.

Cohen, J. L. y Dowling, J. E. (1983). The role of the retinal interplexiform cell: effects of 6-hydroxydopamine on the spatial properties of carp horizontal cells. *Brain Res.* **264**:307-301.

Colonnier, A.J. (1964). The tangential organization of the visual cortex. *J. Anat. Lond.* **98**: 327.

Compston, A.; Zajicek, J.; Sussman, J.; Webb, A.; Hall, G. y Muir, D. (1997): Glial lineages and myelination in the central-nervous-system. *J Anat.* **190**: 161-200.

Connor, J. R. y Menzies, S. L. (1996): Relationship of iron to oligodendrocytes and myelination. *Glia.* **17**: 83-93.

Couve, E. Cabello, J. F.; Krsulovic, J. y Roncagliolo, M. (1997): Binding of microtubules to transitional elements in oligodendrocytes of the myelin mutant taieprat. *J. Neurosci Res.* **47**: 573-81.

Crooks, J, y Kolb, H. (1992). Localization of GABA, glycine, glutamate and tiroxina hydroxylase in the human retina. *J. Comp. Neurol.* **315**: 287- 302.

Cuadros, M.A. y Navascués, J. (1998). The origin and differentiation of microglial cells during development. *Prog. Neurobiol.* **56**:173-189.

Cuadros, M.A. y Navascués, J. (2001). Early origin and colonization of the developing central nervous system by microglial precursors. *Elsevier Science B.* **132**: 51-56.

Cuadros, M.A.; Rodriguez-Ruiz, J.; Cálvente, R.; Almendros, A.; Marin-Teva, J.L. y Navascués, J. (1997). Microglia development in the quail cerebellum. *J Comp Neurol.* **389(3)**:390-401.

D

Dahl, D. (1981). The vimentin-GFA protein transition in rat neuroglia cytoskeleton occurs at the time of myelination. *J Neurosci Res.* **6**: 741-8.

Dahl, D. y Bignami, O. (1982). Immunohistological localization of desmin, the muscle-type 100 A filament protein, in rat astrocytes and Müller glia. *J. Histochem. Cytochem.* **30**:207-213.

Dahl, D.; Crosby, C.J.; Sethi, J.S.; Bignami, A. (1985). Glial fibrillary acidic (GFA) protein in vertebrates: immunofluorescence and immunoblotting study with monoclonal and polyclonal antibodies. *J Comp Neurol.* **239**: 75-88.

Dalmau, I.; Vela, J.M.; González, B.; Finsen, B.; y Castellano, B. (2003). Dynamics of Microglia in the Developing Rat Brain. *J Comp Neurol.* **458**:144-157.

D'Amelio, F.; Eng, L.F. y Gibbs, M.A. (1990). Glutamine synthetase immunoreactivity is present in oligodendroglia of various regions of the central nervous system. *Glia.* **3**: 335-341.

- Davila, J.C.; Guirado, S.; de la Calle, A. y Marín-Girón, F. (1987).** The intra-ocular portion of the optic nerve in the turtle *Mauremys caspica*. *J Anat.* **151**:189-198.
- De Castro, F. y Bribián, A. (2005).** The molecular orchestra of the migration of oligodendrocyte precursors during development. *Brain Res Rev.* **49**:227-241.
- De Guevara, R.; Pairault, C. y Pinganaud, G. (1994).** Expression de la vimentine et de la GFAP et développement de la rétine chez la truite. *Sciences de la Vie.* **317**:737-741.
- De la Rosa, E.J.; Arribas, A.; Frade, J.M. y Rodríguez-Tebar, A. (1994).** Role of neurotrophins in the control of neural development: Neurotrophin-3 promotes both neuron differentiation and survival of cultured chick retinal cells. *Neuroscience* Vol. **58**, No. 2:347-352.
- De Vellis, J.; Wu, D.K. y Kumar, S. (1986a).** Enzyme induction and regulation of protein synthesis. In: S. Fedoroff and A. Vernadakis (Eds.). *Astrocytes Biochemistry, Physiology and Pharmacology of Astrocytes*. Vol.2. Academic Press, New York, pp.209-237.
- De Vellis, J.; Wu, D. y Kumar, S. (1986 b).** Enzyme induction and regulation of protein synthesis. *Astrocytes: Biochemistry, Physiology and Pharmacology of Astrocytes*. Vol.2 (Fedoroff, S. And Vernadakis, A., eds.), pp209-228. Academic Press, New York.
- Di, W., Osamu, M.; Sei S.; Satoshi, M.; Hiromichi, N.; Najma, A. J.; Toshifumi, I. (2005).** Co-expression of radial glial marker in macrophages/microglia in rat spinal cord contusion injury model. *Brain Research.* **105**:183–188.
- Didier, M.; Harandi, M.; Aguera, M.; Bancel, B.; Tardy, M.; Fages, C.; Calas, A.; Stagaard, M.; Mollgard, K., Belin, M.F. (1986).** Differential immunocytochemical staining for glial fibrillary acidic (GFA) protein, S-100 protein and glutamine synthetase in the rat subcommissural organ, nonspecialized ventricular ependyma and adjacent neuropil. *Cell Tissue Res.* **245**: 343-51.
- Distler, C.; Weigel, H. y Hoffmann, K.P. (1993).** Glia cells of the monkey retina. I. Astrocytes. *J. Comp. Neurol.* **333**:134-147.
- Dong, Y. y Benveniste, E.N. (2001).** Immune function of astrocytes. *Glia.* **36**:180-190

Dowling, J. E. (1987). *The Retina: An Approachable part of the Brain*. Cambridge, MA: Belknap-Harvard.

Dowling, J. E. (1979). Information processing by local circuits: the vertebrate retina as a model system. In: FO Schmitt, FG Worden (eds.) *The Neurosciences: Fourth Study Program*, pp. 163-181. Cambridge, MA: MIT Press.

Dowding, A. J.; Maggs, A. y Scholes, J. (1991). Diversity amongst the microglia in growing and regenerating fish CNS: immunohistochemical characterization using FL.1, an antimacrophage monoclonal antibody. *Glia* **4**, 345-364.

Dowding, J.E.; Ronw, J.E. y Major D. (1996). Synapses of horizontal cells in rabbit and cat retinas. *Science*. **188**: 270-273.

Dräger, U.C.; Edwards, D.L. y Barnstable, C. J. (1984). Antibodies against filamentous components in discrete cell types of the mouse retina. *J. Neurosci.* **4**:2025-2042.

Dreher, Z.; Robinson, S.R. y Distler, C. (1992). Müller cells in vascular and avascular retinae: a survey of seven mammals. *J. Comp. Neurol.* **323**:59-80.

Dubois, A. (1934). Les formes neurogliales normales de la rétine du lapin. *Bull. Soc. Ophthal. Paris.* **7**: 429-437.

Dyer, M.A. y Cepko, C.L. (2000). Control of Muller glial cells proliferation and activation following retinal injury. *Nature Neuroscience.* **3 (9)**:873-880.

Dyer, C.A.; Hickey, W.F. y Geisert, E.E. (1991). Myelin/oligodendrocyte-specific protein: a novel surface membrane protein that associates with microtubules. *J Neurosci Res.* **28**:607-613.

E

Easter, S.S.; Bratton, B. y Scherer, S.S. (1984). Growth-related order of the retinal fiber layer in goldfish. *J Neurosci.* **4**:2173-2190.

Ehinger, B. (1977). Glial and neuronal uptake of GABA, glutamic acid, glutamine and glutathione in the rabbit retina. *Esp. Eye Res.* **25**: 221-234.

Ehinger, B. (1989). Glutamate as a retinal neurotransmitter. Pages 1-14, in Weiler, R. and Osborne, N. (Eds.). *Neurobiology of the Inner Retina*. Vol. **H31**, Springer-Verlag, Berlin.

Ehinger, B.; Ottersen, O.P.; Storm-Mathisen, J. y Dowling, J.E. (1988). Bipolar cells in the turtle retina are strongly immunoreactive for glutamate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **85**: 8321-8325.

Ehinger, B.; Zucker, C.L.; Bruun, A. y Adolph, A. (1994). In vivo staining of oligodendroglia in the rabbit retina. *Glia*. **10**:40-48.

Ekstrom, P.; Sauvai, S.; Narfstrom, K.; Chader, J. y Van Veen, T. (1988). Accumulation of glial fibrillary acidic protein in Muller radial glia during retinal degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. **29**:1363-1371.

Eng LF (1980). The glial fibrillary acidic (GFA) protein. In R. Bradshaw and D. Schneider (eds): *Proteins of the Nervous System*. New York: Raven Press, pp 85-17.

Eng, L.F.; Ghirnikar, R.S. y Lee, Y.L. (2000). Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirtyone years (1969-2000). *Neurochem Res*. **25(9-10)**: 1439-51.

F

Federoff, S. (1995). Development of microglia. In: Kettenmann H.& RANSOM br, editors. *Neuroglia* New York: Oxford University Press, pp 162-181.

Fedoroff, S.; Zliair, R. y Novak, J. P. (1997). Microglia and astroglia have a common progenitor cell. *J Neurosci Res*. **50**: 477-486.

Ferrer, I.; Bernet, E.; Soriano, E.; del Rio, T. y Fonseca, M. (1990): Naturally occurring cell death in the cerebral cortex of the rat and removal of dead cells by transitory phagocytes. *Neuroscience*. **39**: 451-58.

Fine, B.S. y Zimmerman, L.E. (1962). Müller's cells and the "middle limiting membrane" of the human retina. *Invest. Ophthalmol*. **1**:304-326.

Friedenwald, J.S. y Chan, E. (1932). Pathogenesis of retinitis pigmentosa with a note on the phagocytic activity of Muller fibers. *Arch. Ophthalmol*. **81**: 73-181.

Fujita, Y.; Imagawa, T.; Uehara, M. (2000). Comparative study of the lamina cribrosa and the pial septa in the vertebrate optic nerve and their relationship to the myelinated axons. *Tissue Cell*. **32**: 293-301.

Fujita Y, Imagawa T, y Uehara M (2001). Fine structure of the retino-optic nerve junction in the chicken. *Tissue Cell*. **33**:129-134.

G

Gallego, A. (1976): La microglia de la retina. *An. R. Acad. Nac. Med.* **93**: 2-7. Madrid.

García-Porrero, J.A. y Hurlé. J.M. (2005). Anatomía Humana. Ed. McGraw-Hill Interamericana. Madrid. ISBN: 84-486-0522-5. pp. 862.

Gaur, V. P.; Eldred, W. y Sarthy, P. V. (1988): Distribution of Müller cells in the turtle retina: an immunocytochemical study. *J. Neurocytol.* **17**: 683-692.

Gerhardt, H.; Schuck, J. y Wolburg, H. (1999). Differentiation of a unique macroglial cell type in the pecten oculi of the chicken. *Glia*. **28**: 201-214.

Gerhardt H, Rascher G, Schuck J, Weigold U, Redies C, Wolburg H. (2000). R- and B-cadherin expression defines subpopulations of glial cells involved in axonal guidance in the optic nerve head of the chicken. *Glia* **31**:131–143.

Ghandour, M.S.; Langley, O.K. y Clos J (1983) Immunohistochemical and biochemical approaches to the development of neuroglia in the CNS, with special reference to cerebellum. *Int J Dev Neurosci.* **1**:411-425.

Ghandourm, M. S.; Vincendon, G. Y Gombos, G. (1980): Astrocyte and oligodendrocyte distribution in adult rat cerebellum: A immunohistological study. *J. Neurocytol.* **9**: 637-46.

Giaume, C; Tabemero, A. y Medina, J.M. (1997). Metabolic trafficking through astrocytic gap junctions. *Glia*. **21**:114-123.

Giulian, D. y Baker, T.J. (1985a). Peptides released by amoeboid microglia regulate astroglial proliferation. *J Cell Biol.* **101(6)**:2411-5.

Giulian, D. y Lachman, L.B. (1985b). Interleukin-1 stimulation of astroglial proliferation after brain injury. *Science*. **228(4598)**:497-9.

Giulian, D.; Tomozawa, Y.; Hindman, H. y Allen, R.L. (1985c). Peptides from regenerating central nervous system promote specific populations of macroglia. *Proc Natl Acad Sci USA*. **82(12)**:4287-90.

Goldman, J.E. (1996). Developmental origins of astrocytes. In: Glial cell development (Jessen KR, Richardson WD, eds), pp 31. Oxford: BIOS Scientific.

Goodbrand, I. A. y Gaze, R. M. (1991). Microglia in tadpoles of *Xenopus laevis*: normal distribution and the response to optic nerve injury. *Anat. Embryol*. **184**, 71-82.

Götz, A.; Buffo, A. y Hack, M. (2005). The neurogenic roles of radial glia and astroglia a new view on gliosis. *VII European meeting on Glial Cell Function in Health and Disease. Amsterdam*.

Goureau, O.; Hicks, D.; Courtois, Y. y De Kozak, Y. (1994). Induction and regulation of nitric oxide synthase in retinal Müller glial cells. *J. Neurochem*. **63**: 310-317.

Grosche, J.; Härtig, W. y Reichenbach, A. (1995). Expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP), glutamine synthetase (GS), and Bcl-2 protooncogene protein by Müller (glial) cells in retinal light damage of rats. *Neurosci. Lett*. **185**:119-122.

H

Hamberger, A.C.; Chiang, G.H.; Nylen, G.S.; Scheff, S.W. y Cotman, C.W. (1979). Glutamate as a CNS transmitter. I. Evaluation of glucose and glutamine as precursors for the synthesis of preferentially released glutamate. *Brain Res*. **168**:513-530.

Hamburger, V. y Hamilton, H. (1951). A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J Morphol*. **88**:49-92.

Hayashi, M.; Hayashi, R.; Tanii, H.; Hashimoto, K. y Patel, A.J. (1988). The influence of neuronal cells on the development of glutamine synthetase in astrocytes in vitro. *Developmental Brain Research*. **41**:37-42.

Holländer, H.; Makarow, F.; Dreher, Z.; Van Driel, D.; Chan-Ling, T. y Stone, J. (1991). Structure of the macroglia of the retina: sharing and division of labour between astrocytes and Müller cells. *J. Comp. Neurol.* **313**:587-603.

Hoffer, D. y Drenkhahn, D. (1993). Molecular heterogeneity of actin filament cytoskeleton associated with microvilli of photoreceptors, Müller's glial cells and pigment epithelial cells of the retina. *Histochemistry.* **99**: 29-35.

Hozumi, I.; Chiu, F.C.; Norton, W.T. (1990). Biochemical and immunocytochemical changes in glial fibrillary acidic protein after stab wounds. *Brain Res.* **524**: 64-71.

Huber, L. A.; Madison, D. L.; Simons, K. y Pfeiffer, S. E. (1994): Myelin membrane biogenesis by oligodendrocytes. Developmental regulation of low molecular weight GTP-binding proteins. *FEBS Lett.* **347**: 273-8.

Hughes, W.F. y La Velle, A. (1974). On the synaptogenic sequence in the chick retina. *Anat Rec.* **179**:297-301.

Hughes, W.F. y La Velle, A. (1975). The effects of early tectal lesions on development in the retinal ganglion cell layer of chick embryos. *J. Comp. Neurol.* **163**: 256-24.

Huxlin, K.R.; Dreher, Z.; Schulz, M. y Dreher, B. (1995). Glial reactivity in the retina of adult rats. *Glia* **15**:105-118.

Huxlin, K.R.; Stefon, A.J. y Furby, J.H. (1992). The origin and development of retinal astrocytes in the mouse. *J. Neurocytol.* **21**:530-544.

|

Inagaki, N.; Fukui, H. y Wada, H. (1991). Type-2 astrocytes show intracellular Ca²⁺ elevation in response to various neuroactive substances. *Neurosci. Lett.* **128**:257-260.

Inoue, Y.; Sugihara, Y.; Nishimura, Y. y Shimai, K. (1980). Atypical neural sheaths formed by Müller cells in chicken retina. *Okajimas Folia Anat Jpn* **57**:79-88.

J

Jasinski, A. (1977). Fine structure of capillaries in the conus papillaris of the limbless lizard. *Ophisaurus apodus* (anguidae. lacertilia). *Cell Tissue Res.* **182(3)**: 421-4.

Jeurissen, S.H.M.; Janse, E.M.; Ekino, S.; Nieuwenhuis, P.; Koch, G. y De Boer, G.F. (1988). Monoclonal antibodies as probes for defining cellular subsets in the bone marrow, thymus, bursa of fabricius, and spleen of the chicken. *Veterinary Immunology and Immunopathology.* **19**: 225-238.

Jimeno, D.; Velasco, A.; Lillo, C.; Lara, J.M. y Aijön, J. (1999). Response of microglial cells after a cryolesion in the peripheral proliferative retina of Tench. *Brain Research.* **816**:175-189.

Jones, P.S. y Schenckter, N. (1987). Distribution of specific intermediate-filament proteins in the goldfish retina. *J. Comp. Neurol.* **266**:112-121.

Jordan, F. L. y Thomas, W. E. (1988): Brain macrophages: questions of origin and interrelationship. *Brain Res. Rev.* **13**:165-178.

Juurlink, B.H.J.; Schousboe, A.; Jorgensen, O.S., y Hertz, L. (1981). Induction by hydrocortisone of glutamine synthetase in mouse primary astrocyte cultures. *J. Neurochem.* **36**:136-142.

K

Kageyama, G.H. y Meyer, R.L. (1989). Glutamate-immunoreactivity in the retina and optic tectum of goldfish. *Brain. Res.* **503**: 118- 127.

Kalwy, S. A. y Smith, R. (1994): Mechanisms of myelin basic protein and proteolipid protein targeting in oligodendrocytes. (Review). *Mol Memb Biol.* **11**: 67-78.

Kalloniatis, M. y Fletcher, E.L. (1993). Immunocytochemical localization of the amino acid neurotransmitters in the chick retina. *J. Comp. Neurol.* **336**:174-193.

Karim, M.M.; Fujisawa, K.; Kanomata, N. y Ito, H. (1996). Glial Fibrillary acidic protein expression in the developing human retina. *Kobe J Med Sei.* **42**:111-117.

Karwoski, C.J. y Proenza, L.M. (1977). Relationship between Muller cell responses, alocal transretinal potential, and potassium flux. *J. Neurophysiol.* **40**:244-259.

Kaur, C.; Ling, E.A. y Wong, W.C. (1990). Lectin labelling of amoeboid microglial cells in the brain of postnatal rats. *J Anat.* **173**:151-60.

Kirchhoff, F.; Dringen, R. y Giaume, C. (2001). Pathways of neuron-astrocyte interactions and their role in neuroprotection. *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* **251**:159-169.

Kivela, T.; Jaaskelainen, J.; Vaheri, A. y Carpen, O. (2000). Ezrin, a membrane organizing protein as a polarization marker of the retinal pigment epithelium in vertebrates. *Cell Tissue Res.* **301**:217-223.

Kohsaka, S.; Takamatsu, K.; Nishimura, Y.; Mikoshiba, K. y Tsukada, Y. (1980). Neurochemical characteristics of myelin-like structure in the chick retina. *J Neurochem.* **34**:662-668.

Kondo, H.; Iwanagaa, T. y Nakajima, T. (1983). An immunocytochemical study of the localization of S-100 protein in the retina of rats. *Cell Tissue Res.* **231**:527-532.

Koshibu, A. (1978). Ultrastuctural studies on absorption of experimentally produced subretinal hemorrhage. *Acta ophthalmol.Jpn.* **82**:471.

Kramer, R. M.; Koch, T.; Niehaus, A. A y Trotter, J. (1997): Oligodendrocytes direct glycosyl phosphatidyliinositol-anchored proteins to the myelin sheath in glycosphingolipid-rich complexes. *J Biol Chem.* **272**: 8937-45.

Kreutzberg, G.W. y Hussain, S.T. (1982). Cytochemical heterogeneity of the glial plasma membrane: 5' -nucleotidase in retinal Müller cells. *J. Neurocytol.* **11**:53-64.

L

Ladman, A.J. y Soper, E.H. (1962). Preliminary observations on the fine structure of Müller's cells of the avian retina. In S.S. Breese (ed): Proceedings of the Fifth International Congress of Electron Microscopy, Philadelphia. Vol.2. New York: Academic Press.

Latov, N., Nilaver, G., Zimmerman, E.A., Johnson, W.G., Silverman, A.J., Defendini, R., Cote, L. (1979). Fibrillary astrocytes proliferate in response to brain injury: a study combining immunoperoxidase technique for glial fibrillary acidic protein and radioautography of tritiated thymidine. *Dev Biol.* **72**, 381-4.

La Vail, M. y Reif-Lehrer, L. (1971). Glutamine synthetase in the normal and dystrophic mouse retina. *J. Cell Biol.* **51**: 348- 354.

Laywell, E.D.; Rakic, P.; Kukekov, V.G.; Holland, E.C. y Steindler, D.A. (2000). Identification of a multipotent astrocytic stem cell in the immature and adult mouse brain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**:13883-13888.

Lees, M.B. y Brostoff, S.W. (1984). Proteins of myelin. In: *Myelin*. Morell, P. (ed.). New York: Plenum Press, pp. 197-217.

Legrand, C.; Ferraz, C.; Clavel, M.C. y Rabie, A. (1991). Distribution of gelsolin in the retina of the developing rabbit. *Cell Tissue Res.* **264**:335-338.

Lemmon, V. (1986). Localization of a filamin-like protein in glia of the chick central nervous system. *J. Neurosci.* **6**:43-51.

Lemke, G., (1988). Unwrapping the genes of myelin. *Neuron.***1**: 535-543.

Leong, S.K. y Ling, E.A. (1992). Amoeboid and ramified microglia: their interrelationship and response to brain injury. *Glia* **6**:39-47.

Levine, R.L. (1989). Organization of astrocytes in the visual pathways of the goldfish: an immunohistochemical study. *J Comp Neurol.* **285**: 231-45.

Levitt, P. y Rakic, P. (1980). Immunoperoxidase localization of glial fibrillary acidic protein in radial glial cells and astrocytes of the developing rhesus monkey brain. *J Comp Neurol.* **193**(3):815-40.

Lewis, G.P.; Erickson, P.A.; Guérin, C.J.; Anderson, D.H. y Fisher, S.K. (1989). Changes in the expression of specific Müller cell proteins during long-term retinal detachment. *Exp. Eye Res.* **49**:93-111.

Lewis, G.P.; Erickson, P.A; Kaska, D.D. y Fisher, S.K. (1988). An immunocytochemical comparison of Muller cells and astrocytes in the cat retina. *Exp. Eye. Res.* **47** :839-853.

- Li, J.; Hertzberg, E. L y Nagy, J. L. (1997):** Connexin 32 in oligodendrocytes and association with myelinated fibers in mouse and rat-brain. *J Comp Neurol.* **379**: 571-91.
- Liebner, S.; Gerhardt, H. y Wolburg, H. (1997).** Maturation of the blood-retina barrier in the developing pecten oculi of the chicken. *Develop Brain Res.* **100**: 205-219.
- Liedtke, W.; Edelman, W.; Bieri, P.L.; Clliu, F.C.; Cowan, N.J.; Kucherlapati, R. y Raine, C.S. (1996).** GFAP is necessary for the integrity of CNS white matter architecture and long-term maintenance of myelination. *Neuron.* **17(4)**:607-15.
- Liepe, B.A.; Stone, C.; Koistinaho, J. y Copenhagen, D.R. (1994).** Nitric oxide synthase in Müller cells and neurons of salamander and fish retina. *J. Neurosci.* **14**:7641-7654.
- Lillo, C.; Velasco, A.; Jimeno, D.; Lara, J.M. y Aijon, J. (1998).** Ultrastructural organization of the optic nerve of the tench (Cyprinidae, teleostei). *J Neurocytol.* **27 (8)**: 593-604.
- Lillo, C.; Velasco, A.; Jimeno, D.; Cid, E.; Lara, J.M.; Aijón, J. (2002).** The glial design of a teleost optic nerve head supporting continuous growth. *J Histochem Cytochem.* **50**: 1289-302.
- Ling, E. A., Leblond, C. P. (1973):** Investigation of glial cells in semithin section. II. Variation with age in the numbers of the various glial cells types in rat cortex and corpus callosum. *J. comp Neurol*; **149**: 73-82.
- Ling, E.A. y Stone, J. (1988).** The development of astrocytes in the cat retina: Evidence of migration from the optic nerve. *Dev. Brain. Res.* **44**:73-85.
- Ling, E.A. y Wong, W.C. (1993).** The origin and nature of ramified and amoeboid microglia: a historical review and current concepts. *Glia.* **7**:9-18.
- Linington, C.; Webb, M. Yy Woodhams, P. L. (1984).** A novel myelin-associated glycoprotein defined by a mouse monoclonal antibody. *J. Neuroimmunol.***6**: 387-396.
- Linser, P.J. y Moscona, A.A. (1979).** Induction of glutamine synthetase in embryonic neural retina: localization in Müller fibers and dependence on cell interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **76**:6476-6480.

Linser, P.J. y Moscona, A.A. (1981). Induction of glutamine synthetase in embryonic neural retina: its suppression by the gliatoxic agent alfa-aminoadipic acid. *Developmental Brain Research*. **1**:103-119.

Linser, P.J. y Moscona, A.A. (1983). Hormonal induction of glutamine synthetase in cultures of embryonic retina cells: Requirements for neuron-glia contact interactions. *Dev. Biol.* **96**:529-534.

Linser, P.J. y Perkins, M.S. (1987). Regulatory aspects of the *in vitro* development of retinal Müller glia cells. *Cell Diff.* **20**:189-196.

Linser, P.J.; Smith, K. y Angelides, K. (1985). A comparative analysis of glial and neuronal markers in the retina of fish: variable character of horizontal cells. *J Comp Neurol.* **237**:264-272.

Linser, P.J.; Sorrentino, M. y Moscona, A.A. (1984). Cellular compartmentalization of carbonic anhydrase-C and glutamine synthetase in developing and mature mouse neural retina. *Dev. Brain Res.* **13**:65-71.

López-Enrique, M. (1926). Existencia de células de Hortega "microglia" en la retina y vias ópticas. *Boletín de la Real sociedad española de Historia Natural*. **Mayo** 295-301.

Lucian, V.D.; Aaron, L.; Song, T.; William, W. y Wat, W. (1987). Fluorescence light microscopy of F-actin in retinal rods and glial cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **28**:633-639.

Luskin, M.B.; Pearlman, A.L. y Sanes, J.R. (1988). Cell lineage in the cerebral cortex of the mouse studied *in vivo* and *in vitro* with a recombinant retrovirus. *Neuron.* **1**:635-647.

M

Madeperla, S.A.; Geiger, G.L.; Funata, M.; De la Cruz, Z. y Green, W.R. (1994). Clinicopathological correlation of a macular hole treated by cortical vitreous peeling and gas tamponade. *Ophthalmology.* **101**:682-686.

Magalhaes, M.M. y Coimbra, A. (1970). Electron microscope radioautographic study of glycogen synthesis in the rabbit retina. *J. Cell Biol.* **47**:263-275.

Magalhaes, M.M. y Coimbra, A. (1972). The rabbit retina Müller cell. A fine structural and cytochemical study. *J. Ultrastruct. Res.* **39**:310- 326.

Magalhaes, M.M. y Coimbra, A. (1973). Electron microscope autoradiographic detection of sites of protein synthesis in the rabbit retina Müller cells. *J. Cell Biol.* **57**:77-87.

Maggs, A.; Scholes, J. (1986). Glial domains and nerve fiber patterns in the fish retinotectal pathway. *J Neurosci.* **6**: 424-38.

Maggs, A.; Scholes, J. (1990). Reticular astrocytes in the fish optic nerve: microglia with epithelial characteristics form an axially repeated lacework pattern, to which nodes of Ranvier are apposed. *J Neurosci.* **10**: 1600-14.

Magistretti, P.J. y Pellerin, L. (1996). Cellular bases of brain energy metabolism and their relevance to functional brain imaging. *Cereb Cortex.* **6**:50-61.

Mallat, M.; Houlgatte, R.; Brachet, P. y Prochiantz, A. (1989) Lipopolysaccharidestimulated rat brain macrophages release NGF in vitro. *Dev Biol.* **133(1)** :3-09-1 1.

Malatesta, P.; Hart fuss, E. y Gótz, M. (2000). Isolation of radial glial cells by fluorescent-activated cell sorting reveals a neuronal lineage. *Development.* **127(24)**: 5253-63.

Maher, F.; Vannucci, S.J. y Simpson, I.A. (1994). Glucose transporter proteins brain. *FASEB J.* **8**:1003-1011.

Mannoji, H.; Yeger, H. y Becker, L.E. (1986). A specific histochemical marker (lectin *Ricinus communis* agglutinin-1) for normal human microglia, and application to routine histopathology. *Acta Neuropathol.* **71(3-4)**:341-3.

Mano, T. y Puro, D.G. (1990). Phagocytosis by human retinal glial cells in culture. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **31**:1047-1055.

Manthorpe, M.; Rudge, J. S. y Varon, S. (1986): Astroglial cell contributions of non-neuronal survival and neuritic growth. In Federoff, S; Vernadakis, A eds. *Astrocytes*. New York: academic press; p 315-76.

Marc, R.E.; Liu, W.L.; Kalloniatis, M.; Raiguél, S.F. y Van Haesendonck, E. (1990). Patterns of glutamate immunoreactivity in goldfish retina. *J. Neurosci.* **10**: 4006-4034.

Marchesani, O. (1926). Die morphologie der Glia Nervous opticus und in der retina, dargestellt nach den neuesten Untersuchungsmethoden und Untersuchungsergebnissen. *I. Mitteilung. Graefes Arch. Ophthalmol.* **117**: 575-605.

Martinez-Hernández, A.; Bell, K.P. y Norenberg, M.D. (1977). Glutamine synthetase: glial localization in brain. *Science.* **195**:1356-1358.

Marín-Teva, J. L.; Almendros, A.; Calvente, R.; Cuadros, M. A. y Navascués, J. (1998). Tangential migration of ameboid microglia in the developing quail retina: mechanism of migration and migratory behavior. *Glia.* **22**, 31-52.

Marin-Teva, J.L.; Calvente, R.; Cuadros, M.A.; Almendros, A. y Navascués, J. (1999). Circumferential Migration of Ameboid Microglia in the Margin of the Developing Quail Retina. *Glia* **27**:226-238.

Martini, R. y Schachner, M. (1997): Molecular-bases of myelin formation as revealed by investigations on mice deficient in glial-cell surface molecules. *Glia.* **19**:298-310.

Massey, S.C. (1990). Cell types using glutamate as a neurotransmitter in the vertebrate retina. In: *Progress in Retinal Research*. Osborne, N.N.; Chader, G.J. (eds.). **Vol.9**. Pergamon Press. Oxford, 399-425.

Massey, S.C. y Redburn, D.A. (1987). Transmitters circuits in the vertebrate retina. *Prog. Neurobiol.* **28**: 55-96.

Maturana, H. R. (1960): The fine anatomy of the optic nerve of anurans. *J Biophys Biochem Cytol.* **7**: 107-20.

Mayer-Proschel, M.; Kalyani, A.J.; Mujtaba, T. y Rao M.S. (1997). Isolation of lineage-restricted neuronal precursors from multipotent neuroepithelial stem cells. *Neuron.* **19**:773-785.

McKinnon, P.J. y Margolskee, R.F. (1996). SC1: a marker for astrocytes in the adult rodent brain is upregulated during reactive astrocytosis. *Brain Res.* **709**:27-36.

Mearow, K.M.; Mill, J.F., y Freese, E. (1990). Neuron-glia interactions involved in the regulation of glutamine synthetase. *Glia.* **3**: 385-392.

Mearow, K.M.; Mill, J.F., y Vitkovic, L. (1989). The ontogeny and localization of glutamine synthetase gene expression in rat brain. *Mol. Brain. Res.* **6**: 223-232.

Meller, K. y Gless, P. (1965). The differentiation of neuroglia -Müller- cells in the retina of chick. *Z. Zellforsch.* **66**:321-332.

Meller, K. y Tetzlaff, W. (1976). Scanning electron microscopic studies on the development of the chick retina. *Cell Tiss. Res.* **170**:145- 159.

Merkle, F.T.; Tramontin, A.D.; Garcia-Verdugo, J.M. y Alvarez-Buy, A. (2004). Radial glia give rise to adult neural stem cells in the subventricular zone. *Proc Natl Acad Sci. USA.* **14**;101(50): 17528-32.

Meyer, D.B. (1977). The avian eye and its adaptations: The visual system in vertebrates. Crecitelli, F, editor. Berling: Springer-Verlag. 549-611.

Mikol, D.D.; Gulcher, J.R. y Stefansson, K. (1990). The oligodendrocyte-myelin glycoprotein belongs to a distinct family of proteins and contains the HNK-1 carbohydrate. *J.Cell. Biol.* **110**: 471-479.

Miller, R.H. (2002). Regulation of oligodendrocyte development in the vertebrate CNS. *Prog Neurobiol.* **67**:451-467.

Miller, R.F. y Dowling, J.E. (1970). Intracellular responses of the Müller (glial) cells of the mudpuppy retina: Their relation to b-wave of the electroretinogram. *J. Neurophysiol.* **33**:323-341.

Monzón-Mayor, M., Yanes, C., Ghandour, M.S., de Barry, J. y Gombos, G. (1990). Glial fibrillary acidic protein and vimentin immunohistochemistry in the developing and adult midbrain of the lizard *Gallotia galloti*. *J Comp Neurol.* **295**: 569-79.

Monzón-Mayor, M.; Yanes, C.; De Barry, J.; Capdevilla-Carbonell, C.; Renau-Piqueras, J.; Tholey, G. y Gombos, G. (1998). Heterogeneous immunoreactivity of glial cells in

the mesencephalon of a lizard: a double labeling immunohistochemical study. *J Morphol.* **235**: 109-19.

Moo, H.; Tae, C. K. y Sa, S.C. (2000). Glial cells in the bird retina: Immunochemical detection. *Microscopy Research and Technique.* **50**:151-160.

Morcos, Y. y Chan-Ling, T. (2000). Concentration of astrocytic filaments at the retinal optic nerve junction is coincident with the absence of intra-retinal myelination: comparative and developmental evidence. *J Neurocytol.* **29**:665-678.

Moscona, A.A. (1972). Induction of glutamine synthetase in embryonic neural retina: a model for the regulation of specific gene expression in embryonic cells. In A. Monroy and R. Tsanev (Eds.), *Biochemistry of Cell Differentiation*, FEBS Symp. **Vol. 24**. Academic Press, London. pp. 1-23.

Moscona, A.A.; Mayerson, P.; Linser, P. y Moscona, M. (1980). Induction of glutamine synthetase in the neural retina of the chick embryo: localization of the enzyme in Müller fibers and effects of BrdU and cell separation. In E. Giacobini, A. Vernadakis y A. Shahar (Eds.), *Tissue Culture in Neurobiology*. (Proc. Bat-Sheva Symposium, August, 1979). Raven Press, New York. pp. 111-127.

Müller, H. (1851). Zur histologie der Netzhaut. *Z. Wiss. Zool.* **3**:234- 237.

Musser, G.L. y Rosen, S. (1973). Localization of carbonic anhydrase activity in the vertebrate retina. *Exp. Eye Res.* **15**:105-109.

N

Nagai, A.; Mishima, S.; Ishida, Y.; Isliikura, H.; Hatada, T.; Kobayashi, S. y Kim, Su. (2005). Immortalized human microglial cell Line: Phenotypic expression. *J Neurosci Res.*

Nakazawa, T.; Tachi, S.; Aikawa, E. y Ihnuma, M. (1993). Formation of the myelinated nerve fiber layer in the chicken retina. *Glia.* **8**:114-121.

Nathaniel, E.J. y Nathaniel, D.R. (1977). Astroglial response to degeneration of dorsal root fibers in adult rat spinal cord. *Exp Neurol.* **54(1)**:60-76.

Navascués, J.; Moujahid, A.; Quesada, A. y Cuadros, M. A. (1994). Microglia in the avian retina: immunocytochemical demonstration in the adult quail. *J. Comp. Neurol.* **350**: 171-186.

Navascués, J.; Moujahid, A.; Almendros, A., Marín-teva, J.L. y Cuadros, M. A. (1995). origin of microglia in the quail retina: central-to-peripheral and vitreal-to-scleral migration of microglial precursors during development. *J. Comp. Neurol.* **354**: 209-228.

Navascues, J.; Cuadros, M. A. y Almendros, A (1996). Development of microglia: Evidence from studies in the avian central nervous system. In: *Topical issues in microglia Research*, pp. 43-64. Eds. E. A. Ling. C. K. tan and C. B. C. Tan. Singapore Neuroscience Association, Singapore.

Navascués, J.; Cálvente, R.; Marín-Teva, J.L. y Cuadros MA (2000). Entry. Dispersión and Differentiation of Microglia in the Developing Central Nervous System. *An Acad Bras Cienc.* **72(J)**:91-102.

Negishi, K. y Drujan, B.O. (1978). Effects of catecholamines on the horizontal cell membrane potential in the fish retina. *Sensory Proc.* **2**:388-395.

Ness, J.K.; Valentino, M.; McIver, S.R. y Goldberg, M.P. (2005). Identification of oligodendrocytes in experimental disease models. *Glia.* **50**: 321-328.

Newman, E.A. (1984). Regional specialization of retinal glial cell membrane. *Nature.* **309**:155-157.

Newman, E.A. (1985). Membrane physiology of retinal glial (müller) cells. *J. Neurosci.* **5**:2225-2239.

Newman, E. y Reichenbach, A. (1996). The Müller cell: a functional element of the retina. *Trends Neurosc.* **19**:307-312.

Noctor, S.C.; Flint, A.C.; Weissman, T.A.; Dammerman, R.S. y Kriegstein, A.R. (2001). Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex. *Nature.* **409**: 714-20.

Nona, S.N.; Shehab, S.A.S.; Stafford, C.A. y Cronly-Dillon, J.R. (1989). Glial fibrillary acidic protein (GFAP) from goldfish: Its localisation in visual pathway. *Glia.* **2**:189-263.

Norenberg, M.D. (1979). The distribution of glutamine synthetase in the rat central nervous system. *J. Histochem. Cytochem.* **27**: 756-762.

Norenberg, M.D. (1983). Immunohistochemistry of glutamine synthetase. Glutamine, Glutamate and GABA in the Central Nervous System. L. Hertz, E.; Kvamme, E.G.; McGeer, and Cellular location of glutamine synthetase and lactate dehydrogenase in oligodendrocyte-enriched cultures from rat brain. *J. Neurochem.* **50**:1461-1468.

Norenberg, M.D.; Dutt, K. y Reif-Lehrer, L. (1980). Glutamine synthetase localization in cortisol induced chick embryo retinas. *J. Cell. Biol.* **84**:803-807.

Norenberg, M.D. y Martínez-Hernández, A. (1979). Fine structural localization of glutamine synthetase in astrocytes of rat brain. *Brain. Res.* **161**:303-310.

O

O'Connor, P.M., Zucker, Ch. L. y Dowling, J.E. (1987). Regulation of dopamine release from interplexiform cell processes in the outer plexiform layer of the carp retina. *J. Neurochem.* **49**:916-920.

Ogden, T.E. (1978). Nerve fiber astrocytes of the primate retina: Morphology, distribution and density. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **17**:499-510.

Ohanian, C. (1972). Histochemical studies on phosphorylase activity in the tissues of the albino rat under normal and experimental conditions. *Acta Histochem.* **44**:244-263.

Olney, J.W. (1968). An electron microscopic study of synapse formation, receptor outer segment development, and other aspects of developing mouse retina. *Invest. Ophthalmol.* **7**: 250-268.

Ono, K.; Yasui, Y.; Rutishauser, U. y Miller, R.H. (1997). Focal ventricular origin and migration of oligodendrocyte precursors into the chick optic nerve. *Neuron.* **19**: 283-92.

P

Palatroni, P.; Gabrielli, M.G. y Taborro, R. (1990). Carbonic anhydrase activity in mammalian retina. Developmental aspects in altricial and precocial species. *Acta Histochem.* **88**:187-198.

Palay, S.L. y Chan-Palay, V. (1974). Cerebellar cortex: cytology and organization. *Springer-verlag. Berlin. Heideberg, New York.*

Paniagua, R.; Nistal, M.; Sesma, P.; Alvarez-Uría, M.; Fraile, B.; Anadón, R. y Sáez, F.J. (2002). Citología e histología vegetal y animal. Biología de las células y tejidos animales y vegetales. *Me Graw- Hill- interamericana de España.* **3º edición.**

Park, K.W.; Lee, D.Y.; Joe, F.H.; Kim, S.U. y Jin, B.K. (2005). Neuroprotective role of microglia expressing interleukin-4. *J Neurosci Res.* **81(3)**: 397-402

Parrilla, M.; Lillo, C.; Herrero-Turrión, M.J.; Arévalo, R.; Lara, J.M.; Aijón, J. y Velasco, A. (2009). Pax2 in the optic nerve of the goldfish, a model of continuous growth. *Brain Res.* **1255**: 75-88.

Patel, A.J.; Hunt, A., Gordon, R.D. y Balazs, R. (1982). The activities in different neuronal cell types of certain enzymes associated with the metabolic compartmentation of glutamate. *Dev. Brain Res.* **4**:3-11.

Pedler, C. (1963). The Fine Structure of the Radial Fibres in the Reptile Retina. *Exp Eye Res.* **2**:296-303.

Pekny, M.; Stanness, K.A.; Eliasson, C.; Betsholtz, C. y Janigro, D. (1998). Impaired induction of blood-brain barrier properties in aortic endothelial cells by astrocytes from FAP-deficient mice. *Glia* **22(4)**:390-400.

Perry, V.H.y Lund, R.D. (1990). Evidence that the lamina cribrosa prevents intraretinal myelination of retinal ganglion cell axons. *J Neurocytol.* **19**: 265-72.

Peters, A. (1960): The formation and structure of myelin sheaths in the central nervous system. *J Biophys Biochem Cytol.* **8**: 431-46.

Peters, A., Palay, S.L., y Webster, H. (1991). The Fine Structure of the Nervous System. Neurons and Their Supporting Cells. *Oxford University Press*.

Peterson, R.E.; Fadool, J.M.; McIntock, J. y Linser, P.J. (2001). Muller cell differentiation in the Zebrafish neural retina: Evidence of distinct early and late stages in cell maturation. *J.Comp. Neurol.* **429**:530-540.

Pfeiffer, B.; Grosche, J.; Reichenbach, A. y Hamprecht, B. (1994). Immunocytochemical demonstration of glycogen phosphorylase in Müller (glial) cells of the mammalian retina. *Glia* **12**:62-67.

Polyak, S.L. (1941). The retina. Chicago: University of Chicago Press, 345- 365.

Pow, D.V.; Robinson, S.R. y Noone, D. (1993). Compartmentation of amino acids in the retina: interrelationships between glia and neurones. *Proc. Aust. Neurosci. Soc.* **4**:118.

Prada, C.; Puga, J.; Pérez-Méndez, L.; López, R. y Ramírez, G. (1991). Spatial and Temporal Patterns of Neurogenesis in the Chick Retina. *Eur J Neurosci* **3**:559-569

Prada, F.A.; Caparrós, R. y Quesada, A. (2011). Histological and inmunohistochemical study of microglial cells during development and adult chick retina. (en preparación).

Prada, F.A.; Dorado, M.E.; Quesada, A; Prada, C.; Schwarz, U. y De La Rosa. E.J. (1995). Early expression of a novel radial glia antigen in the chick embryo. *Glia.* **15**:389-400.

Prada, F.A.; Espinar, A; Chmielewski, C.E.; Dorado, M.E. y Génis-Gálvez, J.M. (1989a). Regional adaptation of Müller cells in the chick retina. A Golgi and electron microscopical study. *Histol. and Histopath.* **4**:309-315.

Prada, F.A.; Magalhaes, M.M.; Coimbra, A. y Génis-Gálvez, J.M. (1989b). Morphological differentiation of Müller cell: Golgi and electron microscopy study in the chick retina. *J. Morphol.* **201**:11-22.

Prada, F.A.; Quesada, A.; Dorado, M.E.; Chmielewski, C. y Prada, C. (1998). Glutamine synthetase (GS) activity and spatial and temporal patterns of GS expression in the

developing chick retina: relationship with synaptogenesis in the outer plexiform layer. *Glia*. **22**:221-236.

Privat, A. y Rataboul, P. (1986). Fibrous and protoplasmic astrocytes. In: Astrocytes: development, morphology, and regional specialization of astrocytes, (*Fedoroff S, Vernadakis A, eds*), Orlando: Academic. **Vol 1**. pp 105–129.

Purpura, D. P. y González-Monteagudo, O. (1960): Acute effects of methoxypyridoxine on hippocampal end blade neuroms; an experimental study of “special pathocllisis” in the cerebral cortex. *J. Neuropathol Exp Neurol*. **19**: 421-32.

Q

Quesada, A.; Prada, F.A.; Aguilera, Y.; Espinar, A.; Carmona, A. y Prada, C. (2004). Peripapillary glial cells in the chick retina: A special glial cell type expressing astrocyte, radial glia, neuron, and oligodendrocyte markers throughout development. *Glia*. **46**:346-355.

Quesada, A.; Aguilera, A.; Caparrós, R.; Prada, F. A.; Santano, C.; Lopez, R. y Prada, C. (2011). Myelin Oligodendrocyte-Specific Protein Is Expressed in Müller Cells of myelinated vertebrate retinas. *Journal of Neuroscience Research*. **Vol 89, Nº 5**: 674-688.

R

Raff, M. C.; Mirski, R.; Fields, K. L.; Lisak, R. P.; Dorfman, SH. y Silberberg, D. E. (1978): Galactocerebroside is a specific cell-surface antigenic marker for oligodendrocytes in culture. *Nature*. **274**: 813-6.

Raff, M.C.; Miller, R.H. y Noble, M. (1983). A glial progenitor cell that develops in vitro into an astrocyte or an oligodendrocyte depending on culture medium. *Nature*. **303**: 390-396.

Raine, C. S. (1998): Neurocelular anatomy. In Agranoff BWA, Albers RW, Molinoff PB, eds. Basic neurochenistry. *New York: Raven Press*; p. 21-61.

- Raivich, G.; Bohatschek, M.; Kloss, C.U.A.; Werner, A.; Jones, L.L y Kreutzberg, G.W. (1999).** Neuroglial activation repertoire in the injured brain: graded response, molecular mechanisms and cues to physiological function. *Brain Res. Rev.* **30**:77-105.
- Ramírez, J.M.; Triviño, A.; Ramírez, A.I.; Salazar, J.J. y García Sánchez, J. (1994).** Immunohistochemical study of human retinal astroglia. *Vision Res.* **34**:1935-1946.
- Ramírez, J.M.; Triviño, A.; Ramírez, A.I.; Salazar, J.J. y García Sánchez, J. (1996).** Structural specializations of human retinal glial cells. *Vision Res.* **36**:2029-2036.
- Ramírez-Expósito, M. J.; Martínez, J. M. (1998a):** Bases moleculares de los procesos neurodegenerativos en el sistema nervioso central. *Rev. Neurol.*; 26: 91-100.
- Ramírez-Expósito, M.J. y Martínez-Martos, J.M. (1998b).** Estructura y funciones de la macroglía en el sistema nervioso central. Respuesta a los procesos degenerativos. *Rev. Neurol.* **26**: 600-611.
- Ramón y Cajal, S. (1892).** La retina des vertebres. *La Cellule* **9**:119-225.
- Rao, M.S.; Noble, M. y Mayer-Proschel, M. (1998).** A tripotential glial precursor cell is present in the developing spinal cord. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**:3996-4001.
- Rasmussen, K.E. (1972).** A morphometric study of the Müller cell cytoplasm in the rat retina. *J. Ultrastruct. Res.* **44**:96-112.
- Rasmussen, K.E. (1974).** The Müller cell: A comparative study of rod and cone retinas with and without retinal vessel. *Exp. Eye Res.* **20**:151-166.
- Rasmussen, K.E. (1975).** A morphometric study of the Müller cell in rod and cone retinas with and without retinal vessels. *Exp. Eye Res.* **20**:151-166.
- Rakic, P. (1972).** Mode of cell migration to the superficial layer of fetal monkey neocortex. *J. Comp. Neurol.* **145**:61- 84.
- Reh, T.A. y Fischer, A.J. (2001).** Stem cells in the vertebrate retina. *Brain Behav. Evol.* **58**:296–305.
- Reichenbach, A. (1987).** Quantitative and qualitative morphology of rabbit retinal glia. A light microscopical study on cells both in situ and isolated by papaine. *J. Hirnforsch.* **28**:213-220.

Reichenbach, A.; Baar, U.; Petter, H.; Schaff, P.; Osborne, N.N. y Buse, E. (1992). Neuronal ectopia in tiger retina. *J. Hirnforsch.* **33**:585-593.

Reichenbach, A.; Frömter, C.; Engelmann, R.; Wolburg, H.; Kasper, M. y Schnitzer, J. (1995). Müller glial cells of the tree shrew retina. *J. Comp. Neurol.* **360**:257-270.

Reichenbach, A.; Hagen, E.; Schippel, K.; Brückner, G.; Reichelt, W. y Leibnitz, L. (1988a). Cytotopographical specialization of enzymatically isolated rabbit retinal Müller cells: structure, ultrastructure, and 3H-ouabain binding sites. *Z. Mikrosk.-anat. Forsch., Leipzig.* **6.S**:897-912.

Reichenbach, A.; Hagen, E.; Schippel, K.; y Eberhardt, W. (1988b). Quantitative electron microscopy of rabbit Müller (glial) cells in dependence on retinal topography. *Z. Mikrosk.-anat. Forsch.* **102**:721-755.

Reichenbach, A. y Robinson, S.R. (1995a). Ependymoglia and ependymoglia-like cells. In *Neuroglia* (Kettenman, H. y Ransom, B. Eds.), Oxford University Press.

Reichenbach, A. y Robinson, S.R. (1995b). Phylogenetic constraints on retinal organization and Development Progress in retinal and eye. *Research.* **Vol. 15, nº1**: 139-171.

Reichenbach, A.; Schippel, K.; Schumann, R. y Hagen, E. (1988c) Ultrastructure of rabbit retinal nerve fibre layer--neuro-glial relationships, myelination, and nerve fibre spectrum. *J. Hirnforsch.* **29**:481-491.

Reichenbach, A.; Schneider, H.; Leibnitz, L.; Reichelt, W.; Schaaf, P. y Schümann, R. (1989). The structure of rabbit retinal Müller cells is adapted to the surrounding retinal layers. *Anat. And Embryol.* **180**:71-79.

Reichenbach, A.; Stolzenburg, J.U., Eberhardt, W.; Chao, I.; Dettmer, D. y Hertz, L. (1993). What do retinal Müller (glial) cells do for their neuronal "small siblings"? *J. Chem. Neuroanat.* **6**: 01-213.

Reichenbach, A. y Wohlrab, F. (1986). Morphometric parameters of Müller (glial) cells dependent of their topographic localization in the nonmyelinated part of the rabbit retina. A consideration of functional aspects of radial glia. *J. Neurocytol.* **15**:451-459.

Reichenbach, A.; Zeigert, M.; Schnitzer, J.; Pritz-Hohmeier, S.; Schaaf, P.; Schober, W y Schneider, H. (1994). Development of the rabbit retina. V. The question of "columnar units". *Dev. Brain Res.* **79**:72-84.

Reynolds, E.S. (1963). The use of lead citrate at high pH as electron opaque stain in electron microscopic. *J. Cell Biol.* **17**: 208.

Rhodes, R.H. (1984). Ultrastructure of Müller cells in the developing human retina. *Graefes Arch. Ophthalmol.* **221**:171-178.

Richardson, A.; Hao, C. y Fedoroff, S. (1993). Microglia progenitor cells: a subpopulation in cultures of mouse neopallial astroglia. *Glia.* **7**:25-33.

Riepe, R.E. y Noremburg, M.D. (1977). Müller cell localization of glutamine synthetase in rat retina. *Nature.* **268**:654-655.

Río-Hortega, P. del. (1919). El tercer elemento de los centros nerviosos. I. La microglía normal. II. Intervención de la microglía en los procesos patológicos. III. Naturaleza probable de la microglía. *Bol. Soc. Esp. Biol.* **9**:69-129.

Robenson, S.R. y Dreher, Z. (1990). Müller cells in adult rabbit retinae: Morphology, distribution and implications for function and development. *J. Comp. Neurol.* **292**:178-192.

Robinson, S.R.; Hampson, E.C.G.M.; Munro, M.N. y Vaney, D.I.(1993). Unidirectional coupling of gap junctions between neuroglia. *Science*, **262**:1072-1074.

Rodiek, R.W. (1973). The vertebrate retina. Principles of structure and function. Ed. W. H. Freeman and Company. San Francisco.

Romero-Alemán, M.M.; Monzón-Mayor, M.; Vanes, C. y Lang, D. (2004). Radial glial cells, proliferating periventricular cells, and microglia might contribute to successful structural repair in the cerebral cortex, of the lizard *Galloria gallon*. *Exp Neurol.* **188(I)**:74-85.

Roots, B.I. (1981). Comparative studies on glial markers. *J. Exp. Biol.* **95**: 67-1180.

Rosenthal, A.R. y Appleton, B. (1975). Histochemical localization of intraocular copper foreign bodies. *Am. J. Ophthalmol.* **79**:613-625.

Rothstein, J. D.; Dykeshoberg, M.; Pardo, C. A.; Bristol, L. A.; Jim, L; Kuncl, R. W. (1996): Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neurol.* **16:** 675-86.

Rubio, M.; Suárez, I.; Bodega, G.; Fernández, B. (1992). Glial fibrillary acidic protein and vimentin immunohistochemistry in the posterior rhombencephalon of the Iberian barb (*Barbus comiza*). *Neurosci Lett.* **134:** 203-6.

Rungger-Brändle, E.; Dosso, A.A. y Leuenberger, P.M. (2000). Glial reactivity, an early feature of diabetic retinopathy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **41:**971–1980.

S

Salazar, J. J.; Ramírez, A.I.; Ramírez, J.M.; Andrés, M.V.; De Hoz, R. y Triviño, A. (1998). Papel funcional de los astrocitos del nervio óptico en la fasciculación axonal. *Archivos de Sociedad Española de Oftalmología, N° 2.*

Santos, E.; Yanes, C.M.; Monzón-Mayor, M. y Romero-Alemán, M.M. (2006). Peculiar and typical oligodendrocytes are involved in an uneven myelination pattern during the ontogeny of the lizard visual pathway. *J Neurobiol.* **66:**1115-1124.

Sarthy, P.V.; Bridges, C.D.; Kretzer, F.L. y Lam, D.M.K. (1981). Lectin receptors on cells isolated from the turtle retina. *J. Comp. Neurol.* **202:**561-569.

Sarthy, P.V. y Bunt, A.H. (1982). The ultrastructure of isolated glial (Müller) cells from the turtle retina. *Anat. Rec.* **202:**275-283.

Sarthy, P.V. y Lam, D.K. (1978). Biochemical studies of isolated glial (Müller) cells from the turtle retina. *J. Cell Biol.* **78:**675-684.

Sassoé, P.M.; Panzanelli, P.; Artero, C.; Fasolo, A. y Cantino, D. (1992). Comparative study of glial fibrillary acidic protein (GFAP)-like immunoreactivity in the retina of some representative vertebrates. *Eur. J. Histochem.* **36:**467-477.

Schnitzer, J. (1987). Retinal astrocytes: Their restriction to vascularized parts of the mammalian retina. *Neurosci. Lett.* **78:**29-34.

- Schnitzer, J. (1988).** Immunocytochemical studies on the development of astrocytes, Müller (glial) cells, and oligodendrocytes in the rabbit retina. *Dev. Brain Res.* **44**:59-72.
- Schuck, J.; Gerhardt, H.; Wolburg, H. (2000).** The peripapillary glia of the optic nerve head in the chicken retina. *Anat Rec.* **259**: 263-75.
- Scolding, N.J.; Rayner, P.J.; Sussman, J.; Shaw, C. y Compston, D.A. (1995).** A proliferative adult human oligodendrocyte progenitor. *Neuroreport.* **6**:441-5.
- Seidman, K.J.N., Teng, A.L., Rosenkopf, R., Spilotro, P., Weyhenmeyer, J.A. (1997).** Isolation, cloning and characterization of a putative type-1 astrocyte cell-line. *Brain Res.* **753**:18-26.
- Semple-Rowland, S.L. (1991).** Expression of glial fibrillary acidic protein by Müller cells in rd chick retina. *J. Comp. Neurol.* **305**:582-590.
- Seo, J.H.; Haam, Y.G.; Park, S.W.; Kim, D.W.; Jeon, G.S.; Lee, C.; Hwang, D.H.; Kim, Y.S. y Cho, S.S. (2001).** Oligodendroglia in the avian retina: immunocytochemical demonstration in the adult bird. *J Neurosci Res.* **65**:173-183.
- Shaw, G. y Weber, K. (1983).** The structure and development of the rat retina: An immunofluorescence microscopical study using antibodies specific for intermediate filament proteins. *Eur. J. Cell Biol.* **30**:219-232.
- Shi, J.; Marinovick, A. y Barres, B.A. (1998).** Purification and characterization of adult oligodendrocyte precursor cells from the rat optic nerve. *J Neurosci.* **18**: 4627-4636.
- Shimada, M.; Akagi, N.; Goto, H.; Watanabe, H.; Nakanishi, M.; y Hirose, Y. (1992):** Microvesel and astroglial cell densities in the mouse hippocampus. *J. Anat.* **180**: 89-95.
- Shimojo, M.; Nakajima, K.; Takei, N.; Hamanoue, M. y Kolisaka, S. (1991).** Production of basic fibroblast growth factor in cultured rat brain microglia. *Neurosci Lett.* **123(2)**:229-31.
- Sievers, J.; Parwaresch, R. y Wottge, H.U. (1994).** Blood monocytes and spleen macrophages differentiate into microglia-like cells on monolayers of astrocytes. Morphology. *Glia.* **12**:245-258.

Slavin, A. J. y Bernard, C. C. A. (1994): Appearance and accumulation patterns of myelin oligodendrocyte glycoprotein during development. *J Neurochem.* **63:** S43.

Slavin, A. J.; Johns, T. G.; Orian, J. M. y Bernard, C. C. A. (1997): Regulation of myelin oligodendrocyte glycoprotein in different species throughout development. *Dev Neurosci.* **19:**69-78.

Small, R.K.; Watkins, B.A.; Munro, P.M. y Liu, D. (1993). Functional properties of retinal Müller cells following transplantation to the anterior eye chamber. *Glia* **7:**158-169.

Smith, R.L. (1982). Retinal myelination in birds. In J.G. Hollyfield (ed):The Structure of the Eye. IV Symposium. North Holland: Elsevier, pp. 191- 204.

Solly, S. K.; Daubas, P.; Monge, M.; Dautigny, A. y Zalc, B. (1997): Functional-analysis of the mouse myelin/oligodendrocyte glycoprotein gene promoter in the oligodendroglial cg4 cell-line. *J Neurochem.* **68:** 1705-11.

Somogyi, P.; Halasky, K.; Somogy, J.; Storm-Mathisen, J. y Ottersen, O.P. (1986). Quantification of immunogold labeling reveals enrichment of glutamate in mossy and parallel fiber terminals in cat cerebellum. *Neuroscience.***19:**1045-1050.

Spassky, N.; Goujet-Zalc, C.; Parmantier, E.; Olivier, C.; Martínez, S.; Ivanova, A., Ikenaka, K.,; Macklin, W.; Cerruti, I.; Zalc, B. y Thomas, J.L. (1998). Multiple restricted origin of oligodendrocytes. *J Neurosci.* **18:** 8331-43.

Spurr, A.R. (1960). A low viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J. Ultrastruct. Res.* **26:** 31-43.

Stefansson, K.; Molnar, M.L.; Marton, L.S.; Molnar, G.K.; Mihovilovic, M.; Tripathi, R.C. y Richman, D.P. (1984). Myelin-associated glycoprotein in human retina. *Nature.* **307:**548-550.

Steinberg, R.H.; Oakley, B. y Neimeyer, G. (1980). Light-evoked changes in [K⁺]_e in retina of intact cat eye. *J. Neurophysiol.* **44:**897-921.

Steindler, D.A. y Laywell, E.D. (2003). Astrocytes as stem cells: nomenclature, phenotype and translation. *Glia.* **43:**62-69.

- Stensaas, L.C. (1967).** The development of hippocampal and dorsolateral pallial regions of the cerebral hemisphere in fetal rabbits. *J. Comp. Neurol.* **129**: 159.
- Sternberger, N. H.; del Cerro, C.; Kies, M. W. y Herndon, R. M. (1985):** Immunocytochemistry of myelin basic proteins in adult rat oligodendroglia. *J. Neuroimmunol.* **7**: 355-63.
- Stirling, C.E. y Sarthy, P.V. (1985).** Localization of the Na-K pump in turtle retina. *J. Neurocytol.* **14**:33-47.
- Stone, J. y Dreher, Z. (1987).** Relationship between astrocytes, ganglion cells and the vasculature of the retina. *J. Comp. Neurol.* **255**:35-49.
- Stone, J.; Holländer, H. y Dreher, Z. (1991).** "Sunbursts" in the inner plexiform layer: a spectacular feature of Müller cells in the retina of the cat. *J. Comp. Neurol.* **303**:400-411.
- Storm-Mathisen, J.; Ottersen, O.P. y Fu-Long, T. (1986).** Antibodies for the localization of the excitatory amino acids. In: *Excitatory amino acids* (Roberts, P.J., Storm-Mathisen P.J., H.F. (eds.)101-116. London: McMillan.
- Streit, W.J. (1990).** An improved staining method for rat microglial cells using the lectin from Griffonia simplicifolia (GSA I-B4). *J Histochem Cytochem.* **38(11)**: 1683-6.
- Streit, W.J. (2001).** Microglia and macrophages in the developing CNS. *Neurotoxicology.* **22(5)**: 619-624.
- Streit, W.J. (2002).** Microglia as neuroprotective, immunocompetent cells of the CNS. *Glia.* **40**:133-139.
- Streit, W.J.; y Kreutzberg, G.W. (1987).** Lectin binding by resting and reactive microglia. *J Neurocytol* **16(2)**: 249-60.
- Streit, W.J.; Walter, S.A. y Pennell, N.A. (1999).** Reactive microgliosis. *Prog. Neurobiol.* **57**:563-581.
- Sturrock R. R. (1983):** Problems of glial identification and qualifications in the aging. *Neuropathology and Neuropharmacology. New York: Raven Press;* p. 179-209.

Sun, D.; Lye-Barthel, M.; Masland, R.H.; Jakobs, T.C. (2009). The morphology and spatial arrangement of astrocytes in the optic nerve head of the mouse. *J Comp Neurol.* **516**: 1-19.

Suzuki, H.; Franz, H.; Yamamoto, T.; Iwasaki, Y. y Konno, H. (1988). Identification of the nonnal microglial population in human and rodent nervous tissue using lectin histochemistry. *Neuropathol Appl Neurobiol.* **14(3)**:221-7.

Szaro, B.G. y Gainer, H. (1988). Immunocytochemical identification of non-neuronal intermediate filament proteins in the developing *Xenopus laevis* nervous system. *Dev. Brain. Res.* **43**:207-224.

T

Takuma, K.; Baba, A. y Matsuda, T. (2004). Astrocytes apoptosis: implications for neuroprotection. *Prog. Neurobiol.* **72**:111-127.

Tapp, R.L. (1973). The structure of the optic nerve of the teleost: *Eugerres plumieri*. *J Comp Neurol.* **150**: 239-52.

Tardy, M. (1991): Astrocyte et homéostasie. *Medicine/Sciences*; **7/8**: 799-804.

Teranishi, T.; Negishi, K. y Kato, S. (1985). Dopamine modulates S-potential amplitude and dye coupling between external horizontal cells in carp retina. *Nature.* **301**:243-246.

Torrelli, S.; Sogos, V.; Marzilli, M.A.; D`Atri, M. y Gremo, F. (1989). Developmental expression of intermediate filament proteins in the chick embryo retina: *in vivo* and *in vitro* comparison. *Exp. Biol.* **48**:187-196.

Tout, S.; Chan-Ling, T.; Holländer, H. y Stone, J. (1993). The role of the Müller cells in the formation of the blood-retinal barrier. *Neurosci.* **55**:291-301.

Triviño, A.; Ramírez, J.M.; Salazar, J.J.; Ramírez, A.I.; García-Sánchez, J. (1996). Immunohistochemical study of human optic nerve head astroglia. *Vision Res.* **36**: 2015-28.

Triviño, A.; Ramírez, J.M.; Ramírez, A.I.; Salazar, J.J. y García-Sánchez, J. (1997). Comparative study of astrocytes in human and rabbit retina. *Vision. Res.* **37**:1707-1711.

U

Uehara, M.; Oomori, S.; Kitagawa, H. y Ueshima, T. (1990). The development of the pecten oculi in the chick. *Nippon Juigaku Zasshi.* **52(3)**:503-12.

Uga, S. y Smelser, G.K. (1973a). Comparative study of the fine structure of retinal Müller cells in various vertebrates. *Invest. Ophthalmol.* **12**:295-307.

Uga, S. y Smelser, G.K. (1973b). Electron microscopic study of the development of retinal Müllerian cells. *Invest. Ophthalmol.* **12**:295-307.

Ullian, E.M.; Sapperstein, S.K.; Christopherson, K.S. y Barres, B.A. (2001). Control of synapse number by glia. *Science.* **291**: 657-661.

V

Valentino K.L.; Winter, J. Y Reichardt, L.F. (1985). Applications of monoclonal antibodies to neuroscience research. *Annu. Rev Neurosci.* **286**: 456-471.

Van Haesendonck, E. y Missotten, L. (1991). Patterns of glutamate-like immunoreactive bipolar cells axons in the retina of the marine teleost, the dragonet. *Vision Res.* **31**: 451-462.

Vardimon, L.; Fox, L.E.; Degenstein, L., y Moscona, A.A. (1988). Cell contacts are required for induction by cortisol of glutamine synthetase gene transcription in the retina. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**: 5981-5985.

Vaughan, D.K. y Fisher, S.K. (1987). The distribution of F-actin in cells isolated from vertebrate retinas. *Exp. Eye. Res.* **44**:393-404.

Velasco, A. (1994). Glía en procesos degenerativos/regenerativos en la vía visual de tenca (*Tinca tinca*): Estudio histoquímica e inmunohistoquímica. *Tesis doctoral. Universidad de Salamanca.*

Velasco, A.; Caminos, E.; Vecino, E.; Lara, J.M. y Aijón, J. (1995). Microglia in normal and regenerating visual pathways of the tench (*Tinca tinca* L., 1758; Teleost): a study with tomato lectin. *Brain Res.* **705**, 315-24.

Venable, J.H. y Coggeshall, R. (1965). A simplified lead citrate stain for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.* **25**: 407.

Vicent, S. L.; Peters, A.; Tigges, J. (1989): Effects of aging on the neurons within área 17 of Rhesus monkey cerebral-cortex. *Anat Rec*; **223**: 329-41.

Villegas, G.M. (1960). Electron microscopic study of the vertebrate retina. *J. Gen. Physiol.* **43-II**:15-43.

Vos, J. P.; Dehaas, C. G. M. y Vangolde L. M. G. (1997): Relationships between phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine, and sphingomyelin metabolism in cultured oligodendrocytes. *J Neurochem.* **68**: 1252-60.

Vrabec, F. (1968). La microglie de la retine, des voies optiques, du corps genouillé latéral, de l'aire striée, ainsi que du toit optique du Macaque. *Arch. Ophthalmol. (Paris)*. **28**:417-426.

W

Watanabe, T. y Raff, M.C. (1988). Retinal astrocytes are immigrants from the optic nerve. *Nature.* **332**:834-837.

Wiesinger, H.; Hamprecht, B. y Dringen, R. (1997). Metabolic pathways for glucose in astrocytes. *Glia.* **21**:22-34.

Williams, D.S.; Arikawa, K. y Paalysaho, T. (1990). Cytoskeletal component of the adherens junctions between the photoreceptors and the supportive Müller cells. *J. Comp. Neurol.* **295**:155-164.

Wolburg, H. (1981). Axonal transport, degeneration, and regeneration in the visual system of the goldfish. *Adv Anat Embryol Cell Biol.* **67**: 1-94.

Wolburg, H. (1980). Myelinated axons of ganglion cells in the retinae of teleosts. *Cell Tissue Res.* **210**:517-520.

Wolburg ,H.; Liebner, S.; Reichenbach, A. y Gerhardt, H. (1999). The pecten oculi of the chicken: a model system for vascular differentiation and barrier maturation. *Int Rev Cytol.* **187**:111-59.

Wolter, J.R. (1956). Die struktur der papille des menschlichen auges. *Graefes Archiv. fr Ophthalmologie, Bd.* **158**: 268- 276.

Wolter, J.R. (1957). Perivascular glia of the blood vessels of the human retina. *Am. J. Ophthalmol.* **44**:766-773.

Woodford, B.J. y Blanks, J.C. (1989). Localization of actin and tubulin in developing and adult mammalian photoreceptors. *Cell. Tissue. Res.* **256**:495-505.

Wu, D.K.; Scully, S. y De Vellis, J. (1988). Induction of glutamine synthetase in the rat astrocytes by co-cultivation with embryonic chick neurons. *Journal of Neurochemistry.* **50**: 929-935.

Y

Yanes C. Monzon-Mayor M. Ghandour MS, de Barry J A Gombos G (J990). Radial glia and astrocytes in developing and adult telencephalon of the lizard *Gallolia galloti* as revealed by immunohistochemisny with Anti-GFAP and Anti-Vimentin antibodies. *J Comp Neurol.* **295**: 559-56*.

Yamada, E. (1989). Myelinated perikarya of the ganglion cells in the avian retina. *Okajimas Folia Anat Jpn.* **66**:211-221.

Ye, H. y Hernandez, M.R. (J995). Heterogeneity of astrocytes in human optic nerve head. *J Comp Neurol.* **362(4)**:441-52.

Yew, D.T. (1978). The origin and initial development of the pec ten oculi. *Anat Anz.* **143**: 383-387.

Yokoyama, A.; Yang, L.; Itoh, S.; Mori, K. y Tanaka, J. (2004). Microglia, a potential source of neurons, astrocytes, and oligodendrocytes. *Glia.* **1; 45(1)**:96-104.

Yoshida, A.; Ishiguro, S.; y Tamai, M. (1993). Expression of glial fibrillary acidic protein in rabbit Muller cells after lensectomy-vitreectomy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **34(11):**3154-60.

Z

Zerlin, M.; Levison, S.W. y Goldman, J.E. (1995). Early patterns of migration, morphogenesis, and intermediate filament expression of subventricular zone cells in the postnatal rat fore brain. *J Neurosci.* **15(11):**7235-49.