

**INSTITUTO DE BIOLOGÍA DEL DESARROLLO
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS MORFOLÓGICAS
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DE SEVILLA**

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
SECRETARÍA GENERAL

Quedan inscrita esta tesis Doctoral
al folio 146 número 237 del libro
correspondiente. 30 NOV. 1999
Sevilla,

El Jefe del Negociado de Teles,

Jesús Peñas de Bustillo



**Caraterización Morfobioquímica
de las Células Gliales de la Papila
en la retina de los vertebrados.**

Trabajo que para optar al Grado de Doctor en Medicina y Cirugía
presentado por D. Jesús Peñas de Bustillo.

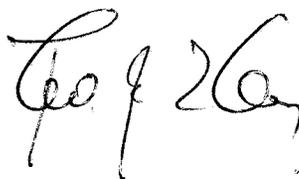
Sevilla 1999

“Caraterización Morfobioquímica de las Células Gliales de la Papila en la retina de los vertebrados”

Trabajo presentado por el Licenciado D. Jesús Peñas de Bustillo para optar al grado de Doctor por el Programa de Doctorado “Perspectivas en Morfología, del Departamento de Ciencias Morfológicas de la Universidad de Sevilla.



Fdo: D. Jesús Peñas de Bustillo

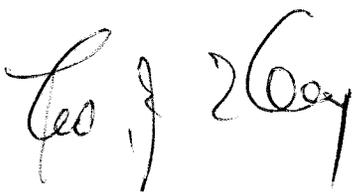


Fdo: D. Francisco A. Prada Elena

**Catedrático de Universidad y Director del
Departamento de Ciencias Morfológicas.
Universidad de Sevilla**

**D. FRANCISCO A. PRADA ELENA Y DÑA. ADELA QUESADA RUÍZ.
PROFESORES DEL DEPARTAMENTO DE CIENCIAS
MORFOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA.**

CERTIFICA: Que, el trabajo titulado “**Caraterización Morfobioquímica de las Células Gliales de la Papila en la retina de los vertebrados**”, ha sido realizado en el Instituto de Biología del Desarrollo y en el Departamento de Ciencias Morfológicas bajo nuestra dirección.



Y para que así conste y surta los efectos oportunos se firma en Sevilla a veintiséis de Noviembre de mil novecientos noventa u nueve.

INDICE

	Páginas
1.- INTRODUCCIÓN.....	6
1.1.- La Glia del Sistema Nervioso Central.....	9
1.2.- Estructura de la Retina de los Vertebrados.....	13
1.3.- La Célula de Müller Adulta.....	17
2.- MATERIAL Y MÉTODOS.....	36
2.1.- Material.....	37
2.2.- Método.....	37
3.- RESULTADOS.....	46
4.- DISCUSIÓN.....	56
5.- CONCLUSIONES.....	64
6.- RESUMEN.....	67
7.- BIBLIOGRAFÍA.....	69

1.- INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas se está trabajando intensamente para conocer las características estructurales y las funciones de las células gliales del sistema nervioso. El hecho a tener en cuenta es que las células gliales juegan un papel muy importante durante el desarrollo y formación del sistema nervioso y en el adulto. Además, no sólo se pueden considerar como células de soporte y nutrición para las neuronas; ellas son responsables de funciones específicas sin las cuales las neuronas no pueden realizar su trabajo.

Desde la segunda mitad del siglo pasado, en que se describen los primeros hallazgos sobre algunas de las células gliales del sistema nervioso central, se han

tratado de clasificar y organizar los distintos tipos de células gliales, para estudiarlas y conocerlas mejor. Hoy se admite que la glia del sistema nervioso central contiene dos tipos distintos de células según su origen embriológico: las células microgliales de origen mesodermico y las células macrogliales de origen ectodermico. La macroglia ha acaparado el 99% de la actividad de la investigación glial. Dentro de esta investigación el estudio de los astrocitos y oligodendrocitos ha copado al menos un 95% del interes de los investigadores. Por ello, solo menos del 5% de la actividad de la investigación glial ha prestado algo de interes al resto de los tipos de células macrogliales (que se han denominado a veces como especiales), tales como la Glia Radial y la Glia Ependimal del Cerebro y la Medula Espinal; las células como Tanacítos de los Órganos Circunventriculares; las Células de Soporte de la Glandula Pineal; las Células de Müller de la Retina, las Células Epiteliales de los Plexos Coroideos; las Células Epiteliales Pigmentadas de la Retina; las Células de Soporte del Organo de Corti y Organo Vestibular; las Celulas de Soporte del Epitelio Olfatorio. Dentro de ese 5% que acabamos de citar, quedan incluidas aunque no las hemos citado porque todavía han despertado menos interés, las Células Gliales de la Papila Optica y /o las Células Gliales de las Placas del Suelo Troncoencefálico y Medular.

El conocimiento profundo de todos estos tipos de células gliales es lo que permitirá conocer mejor la glia del S.N.C. y sus funciones específicas. Esta inquietud es la que justifica este trabajo de nuestra tesis doctoral, cuyo objetivo

general es conocer la estructura y función de las células gliales de la Papila Optica de los vertebrados durante el desarrollo y en el adulto. Por lo tanto, planteamos la introducción de éste tema, desde el conocimiento general de la glia del S.N.C., la estructura de la retina de los vertebrados y el conocimiento específico de la la glia de la retina , representado en esa célula singular que es la célula de Müller. Al final planteamos los datos que consideramos como más significativos para estudiar la Papila Optica.

1.1.- LA GLIA DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

Clásicamente se han descrito dos tipos de glía: micro y macroglía.

De la **microglía** (Rio Hortega, 1919) sólo menciona que deriva de precursores de la médula ósea que migran al SNC y que tienen función fagocítica en respuesta a lesiones del SNC. (Boya y col. 1986; 1987; 1987; 1991; Hickey y Kimura, 1988; Jodan y Thomas, 1988; Leong y Ling, 1992; Ling y Wong ,1993; Sievers y col. 1991).

Centrándonos en la **macroglía** podemos diferenciar:

A) Astrocitos:

Células de aspecto estrellado con somas pequeños e irregulares y numerosas prolongaciones.

Atendiendo a su morfología podemos distinguir dos tipos de astrocitos los *fibrosos* y los *protoplasmáticos*; que también se diferencian en su ubicación sustancia blanca y sustancia gris respectivamente.

Centrándonos en la retina, la astrogliá fue descrita por Ramón y Cajal (1892). En las retinas sólo parcialmente vascularizadas los astrocitos se encuentran en las zonas donde hay vasos sanguíneos y no en las zonas avasculares (Stone y Dreher, 1987). Se sitúan entre las prolongaciones de las neuronas, principalmente en la CFNO, adoptando peculiaridades morfológicas dependiendo de su localización (Stone y Dreher 1987; Distler y col., 1993; Ramirez y col., 1994). Esta morfología al igual que la distribución puede variar en respuesta a lesiones de la CFNO(Karshin y col. ,1986).

En algunas retinas, la misma población de astrocitos esta asociada tanto a axones como a vasos sanguíneos(Karshin, 1986; Stone y Dreher , 1987 ; Ramirez y col. 1994). Sin embargo en la retina del conejo se aprecian dos poblaciones separadas , una asociada a axones y otra a los vasos sanguíneos (Schnitzer y Karshin , 1986). A su vez los astrocitos perivasculares pueden presentar distintos tipos de morfología (Triviño y col ,1992).

Existen evidencias de que los astrocitos pueden ser de origen extrarretinal , y que penetren en la retina desde el nervio óptico (Batanaba y Raff. 1.998).

Esto ocurre antes de que se establezca la vascularización de la retina, de hecho pueden llegar a inducirla (Diang y Col, 1.) ya que promueven la diferenciación de los precursores endoteliales preexistentes.

B) Oligodendrocitos:

Los oligodendrocitos son pequeñas células con menos prolongaciones que los astrocitos.

Se localizan en el SNC con la función de mielinizar los axones de las neuronas.

Dentro de los oligodendrocitos se incluyen a las células satélites que rodean los somas de algunas neuronas (Río-Hortega, 1919).

En la parte mielinizada de la *retina del conejo* se ha descrito la existencia de oligodendroglía (Berliner, 1931; Schnitzer, 1988; Robinson y col. , 1993 Schnitzer,1988) lo cual llama la atención puesto que este hecho no se ha observado en otras especies. En la *retina del pollo* hay trabajos que señalan la existencia de un pequeño número de células gliales cuyos somas de sitúan en la capa de células ganglionares (Ehrlich, 1981) y que son aproximadamente el 5 % del total de células en esa capa. Esta población, estaría formada mayoritariamente por oligodendrocitos que se unen tras la salida del ciclo de todas las neuronas y de las células de Müller, y cuyos precursores proliferan extraventricularmente.

Además de los astrocitos y los oligodendrocitos, en el SNC existen como ya señalamos al inicio de esta introducción, **varias poblaciones de células gliales**. Entre ellas destacamos a la **Célula de Müller**.

La clasificación de la célula de Müller como macroglía siempre ha sido motivo de controversia, ya Ramón y Cajal (1.892) hizo una clara distinción entre astrocitos y células de Müller considerándolas diferentes tipos de glía. Sin embargo, son numerosos los autores que consideran a las células de Müller como astrocitos modificados (Polyak 1.941; Magalhães y Coimbra, 1.973) o “variantes regionales del mismo tipo macroglía “, como afirman Hollander y col.(1.991). Otros autores han señalado que esto podría ser una simplificación puesto que presentan también características ultraestructurales de oligodendrocitos (Rhodes, 1.984 ; Stefansson y col. , 1.984 ; Prada y col. , 1.989) y ependimocitos (Prada y col ;1989).

En las retinas avasculares de algunas especies de vertebrados como es el caso del pollo, hay un sólo tipo de glía, la célula de Müller o glía radial de la retina.

Creemos que por sus singularidades la célula de Müller requiere una exposición más extensa que justifica su inclusión como un apartado especial dentro de la estructura de la retina de los vertebrados.

1.2.- ESTRUCTURA DE LA RETINA DE LOS VERTEBRADOS

La retina de los vertebrados es una fina lámina de tejido nervioso situada en el fondo del ojo. Su función consiste en recibir las señales luminosas y transformarlas en una serie de impulsos nerviosos que son enviados al cerebro a través del nervio óptico. La retina es una parte del SNC, que se desarrolla a partir de una porción del prosencéfalo y que posteriormente se diferencia en el diencefalo embrionario. En la parte anterior ventral de esta porción del SNC y a cada lado de la línea media, se produce una evaginación que da origen a la vesícula óptica. A su vez, del neuroepitelio de la vesícula óptica surge una invaginación secundaria, con lo que la vesícula óptica se transforma en la copa óptica, que queda unida al resto del cerebro por el tallo óptico y posteriormente por el nervio óptico (Rodiek, 1973). Entre las dos paredes de la copa óptica queda el ventrículo, que es un espacio continuo con los ventrículos del cerebro. Posteriormente, este espacio se colapsa y se convierte en un espacio virtual (Figura 1).

El epitelio interno de la copa óptica constituye el neuroepitelio de la retina, del que se formará la retina neural adulta, auténtico tejido nervioso formado por seis clases de neuronas y por células de glía. El epitelio externo permanece con una sola capa de células y va a constituir el epitelio pigmentario de la retina, el cual no se diferencia como tejido nervioso, sino que queda como un

epitelio de células de forma poligonal con abundantes invaginaciones en su cara externa y numerosas y largas prolongaciones en su cara interna, la cual contacta con la retina neural.

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 describió y estudió todas las clases de neuronas de la retina menos las células interplexiformes, así como los dos tipos de células gliales, los astrocitos y las células de Müller (Figura 2). En la retina de algunas especies como el pollo, el único tipo de glía descrito es la célula de Müller.

En la retina neural se distinguen seis capas, formadas éstas por los somas de las células y sus prolongaciones (Figura 3). Los somas celulares están dispuestos en tres capas nucleares, mientras que las prolongaciones forman las dos capas plexiformes y la capa de fibras del nervio óptico. Estas seis capas clásicamente descritas son:

- 1.- **Capa nuclear externa (CNE).** En ella se sitúan, los somas de los fotorreceptores (Figuras 2 y 3).
- 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 (Figuras 2 y 3).

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 2/3 más externos de esta capa los ocupan los somas de las células bipolares y de Müller, mientras que las células amacrinas, interplexiforme y ganglionares desplazadas se sitúan en el tercio más interno (Figuras 2 y 3).

4.- **Capa plexiforme interna (CPI)**. En ella sinaptan las células bipolares, amacrinas, ganglionares desplazadas e interplexiformes por un lado y las células ganglionares y amacrinas invertidas por otro (Figuras 2 y 3).

5.- **Capa de células ganglionares (CCG)**. Está formada por los somas de las células ganglionares y los de las células amacrinas invertidas (Figuras 2 y 3).

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 (Figuras 2 y 3) y su grosor aumenta desde la retina periférica hacia la zona papilar.

En la retina neural se distinguen dos membranas limitantes, la externa y la interna. La **membrana limitante externa (MLE)** está formada por uniones especializadas o uniones adherentes, entre los segmentos internos de los fotorreceptores, las mazas de Landolt de las células bipolares y las prolongaciones externas de las células de Müller. 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, en 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 es la única célula de la retina que ocupa todas las capas de la misma, desde la MLE hasta la MLI.

En las retinas avasculares de algunas especies de vertebrados como es el caso del pollo, hay un solo tipo de glía, la célula de Müller. Estas células se extienden radialmente entre las dos membranas limitantes de la retina. Su soma se encuentra en la CNI y las prolongaciones que parten desde sus dos polos, ventricular y vítreo, recubren buena parte de la superficie de las neuronas de la retina. En las retinas vasculares de otras especies, principalmente de mamíferos, se encuentran todos los otros tipos de células gliales: microglía, astrogía y oligodendroglía.

La astrogía de la retina fue descrita por Ramón y Cajal (1892). En las retinas sólo parcialmente vascularizadas, los astrocitos se encuentran en las zonas donde hay vasos sanguíneos y no en las zonas avasculares (Stone y Dreher, 1987). Se sitúan entre las prolongaciones de las neuronas, principalmente en la CFNO y

adoptan distintas morfologías según su localización (Stone y Dreher, 1987; Distler y col., 1993; Ramírez y col., 1994), aunque tanto su morfología como su distribución puede variar en respuesta a distintas lesiones de la CFNO (Karschin y col., 1986). En algunas retinas, la misma población de astrocitos puede estar asociada a los axones y a los vasos sanguíneos (Karschin y col., 1986; Stone y Dreher, 1987; Distler y col., 1993; Rungger-Brändle y col., 1993; Ramírez y col., 1994). En la retina de conejo, sin embargo, hay dos poblaciones separadas, una que se asocia con los axones y otra que se asocia con los vasos sanguíneos (Schnitzer, 1988). Estos astrocitos que forman la glía perivascular a su vez presentan varios tipos en base a su morfología (Triviño y col., 1992). Hay evidencias que demuestran que los astrocitos pueden ser de origen extrarretinal y que penetran en la retina desde el nervio óptico (Watanabe y Raff, 1988), la entrada ocurre antes del establecimiento de la vascularización cuya formación parece inducir (Jiang y col., 1995) puesto que los astrocitos promueven la diferenciación de precursores endoteliales preexistentes.

1.3.- LA CÉLULA DE MÜLLER ADULTA

Estas células fueron descritas por vez primera en 1.851 por Müller. Ramón y Cajal (1892) las describió en todas las clases de vertebrados, posteriormente no fueron objeto de gran atención, pues se entendía que su papel era meramente estructural. Sin embargo en los últimos 20 años han aparecido numerosos trabajos que tratan de su distribución, morfología, citología, fisiología y desarrollo.

a) Distribución:

Las células de Müller se distribuyen por toda la retina variando su densidad desde 16.650 células/mm² hasta 5.600 células/mm². A modo de ejemplo mostramos un mapa con las áreas de isodensidad de células de Müller en retina de distintos animales vertebrados, obteniéndose un patrón de distribución parecido, variando sólo los valores absolutos (Dräger y col. 1.984; Newman y col. , 1.984; Gaur y col., 1.988).

b) Morfología:

Mediante la técnica de Golgi , Ramón y Cajal estudió la morfología de las células de Müller en la retina de diversa especies de toda clase de vertebrados y comprobó que la estructura básica es similar en todas las clases, aunque cada una poseen características propias.

Esto lo comprobamos observando la Fig. en la que apreciamos que la morfología de la célula varía en cada capa de la retina.

Continuando con los estudios de Ramón y Cajal y los dibujos que éste realizó, se aprecia que la célula de Müller se extiende radialmente entre las dos limitantes de la retina. 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 vítrea o interna respectivamente.

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, lo cual es común a todas las células que Reichenbach y Robinson (1.995) incluyen dentro del grupo de la endimoglia.

En la CNE, la prolongación es ancha y forma 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 confluyendo, en algunas de las especies, pequeñas prolongaciones que parten de la célula a nivel del borde interno de la CNE y del borde externo de la CNI. En la CNI encontramos de nuevo expansiones que recubren los somas de las neuronas, aunque sólo ocupan toda la CNI en la *rana*, ya que en el resto de las especies dibujadas por Ramón y Cajal quedan restringidas a la parte comprendida entre el borde externo de la CNI y el núcleo, mientras que en *el buey* están apenas desarrolladas.

La propagación vítrea puede ser simple como en *la carpa, la rana y 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. A nivel de la MLI forman los llamados “pies terminales” que son unos engrosamientos cónicos.

Estos estudios de Ramón y Cajal han sido completados por otros más recientes realizados en especies de varias clases de vertebrados y en los que se han utilizado otras técnicas además del método de Golgi. Ejemplos de tales estudios son : en *el conejo* (Reichenbach y Wohlrad, 1.986 ; Reichenbach, 1.987; Reichenbach y col. , 1.989; Robinson y Dreher, 1.990) en *el gato* (Stone y col. 1.992), en *el pollo* (Prada F. Y col. , 1.989). 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, 1.962 ; Magalhaes y Coimbra , 1972 ; Reichenbach y col. , 1.988, 1.995 ; Rasmussen 1.972, 1.974 ; Sarthy y Bunt 1.982 ; Miller y Dowling 1.979 ; Meller y Gless, 1.965 ; Prada F. y col,1.989 ; Uga y Smelser, 1.973). 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 capa plexiforme.

En la retina de mamíferos se ha descrito que la célula de Müller emite a nivel interno pequeñas prolongaciones, denominadas perinodales, que forman una especie de corona en torno a los axones de la CFNO con una estructura similar a la de los nódulos de Rainvier.(Reichenbach y col. 1.988).

c) Citología

La célula de Müller presenta una distribución no homogénea de ciertas moléculas y orgánulos que varía en relación a las capas de la retina.

c1) La Membrana plasmática.

Empleando células disgregadas, se ha estudiado la distribución de diferentes oligosacáridos mediante unión de lecitinas específicas. Se detecta un gran número de sitios de unión en la región de los microvilli (Sharty y col., 1.981; Reichenbach y col., 1.985).

Las **bombas Na⁺/ K⁺** se encuentran en mayor cantidad en la región de los microvilli (Stirling y Sharty, 1.985) y en las partes de la célula de Müller que se encuentran en las capas plexiformes (Reichnbach y col. , 1.988 a).

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, 1.982).

Pero no todo es asimétrico en la célula de Müller , así la **glicoproteína asociada a la mielina (MAG)**, la encontramos desde la microvilli hasta la CFNO (Stefansson y col, 1.984). Esta proteína es propia de oligodendrocitos y curiosamente su expresión se ha descrito en la retina humana que no se mieliza.

Mediante estudios de microscopia electrónica de réplicas de criofractura se ha estudiado la distribución de partículas intramembranas en las células de glía. En determinadas zonas de la membrana de los astrocitos, estas partículas adoptan ordenaciones regulares octogonales (Landis y Reese, 1974). Este tipo de ordenación también se ha encontrado en la superficie de los pies vítreo de la célula de Müller de *mamíferos* y, en las retinas vascularizadas, en los puntos donde las prolongaciones contactan con los vasos (Raviola, 1977; Wolburg y Berg 1987, 1988; Gotow y Hashimoto, 1989; Richter y col. 1990) También se encuentran en las células de Müller de *peces* (Berg y Wolburg, 1.989) y en las de *urodelus* pero no en las de anuros (Wolburg y col. 1992).

Las uniones entre las células de Müller y de éstas con los fotorreceptores a nivel de la MLE son con mayor frecuencia del tipo zónula adherens o uniones adhesivas (Reichnbach y Robinson, 1.995) En *peces* , sin embargo, son uniones estrechas y en anuros son tipo gap o comunicantes (Uga y Smelser 1.973 b). También se han descrito uniones comunicantes en las capas internas en las células de Müller *humanas* (Reale y col. 1.978). En *conejo* existen uniones comunicantes entre astrocitos, oligodendrocitos y células de Müller (Robinson y

col., 1.993), las cuales permiten el paso de moléculas desde astrocitos y oligodendrocitos hacia las células de Müller , pero no en sentido inverso.

c2) Organos Intracelulares

El **núcleo** se sitúa en la parte media de la célula, dentro de la CNI, pero distintos niveles dentro de ésta .Su forma general es aproximadamente elíptica, con el eje mayor paralelo al longitudinal de la célula (Rasmussen 1.972, 1.974).

Parece que las neuronas que rodean a las células de Müller la impresionaran, siendo responsable de la forma algo irregular que tiene el núcleo (Reichenbach y col. 1.988).

Las **mitocondrias** se distribuyen de distinta forma según la especie. En las especies con retina vascularizada superficialmente se encuentran por toda la célula, pero con mayor concentración en la mitad interna, y cuando la retina es avascularizada, se encuentran en la parte ventricular, cerca de los microvilli (Uga y Smelser 1.973 a ; Rasmussen, 1.974, 1.975)

El **retículo endoplasmático liso** se concentra en las capas más interna y mientras que el **retículo endoplasmático rugoso**, los **ribosomas** y el **Aparato de Golgi** se encuentran en la zona de la CNI, en torno al núcleo (Magalhaes y Coimbra 1.972, 1.973 ; Uga y Smelser, 1.973 a ; Reichembach y col., 1.988 a, b). Los **cuerpos multivesiculares** se encuentran en la porción externa de la célula de Müller (Reichenbach y col. , 1.988).

El glucógeno que se puede encontrar en las retinas, principalmente en las avascularizadas, (Uga y Smelser, 1.973) 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 externa (Magalhaes y Coimbra , 1.970)

d) Citoesqueleto.

Con el uso de técnicas inmunohistoquímicas, la información obtenida a cerca del citoesqueleto de las células de Müller , se ha visto ampliada considerablemente.

Estos estudios han revelado la presencia de :

VIMENTINA : En las células de Müller de *ratón* (Schnitzer y col., 1.981 ; Dräger, 1.983 ; Dräger y col., 1.984), *rata* (Schaw y Weber, 1.983), *conejo* (Schitzer 1.985, 1.988), *pollo* (Lemmon y Rieser , 1.983), *tortuga* (Gavr y col., 1.988) y *camaleón* (Prada F. y col., 1.995).

La Vimentina se expresa en células neuroepiteliales y en células clasificadas como endimoglia por Reichembach y Robinson, 1.995.

DESMINA : Proteína componente de los filamentos intermedios (Dahl y Bignami, 1.982).

PROTEÍNA FIBRILAR ÁCIDA GLIAR (GFAP): En las células de Müller de varias especies de *peces* (Bignami, 1.984; Linser y col., 1.985; Jones Schechter,

1.987; Nona y col., 1.989), *anfibios* (Szaro y Gainer 1.988) y *pollo* (Torelli y col., 1.989; Semple y Rowland , 1.991)

En la retina normal de los *mamíferos* hay datos contradictorios sobre la presencia de GFAP (Björklund y col. 1.985) sí hay concenso sobre su presencia en retinas lesionadas o en degeneración (Bigmani y Dalh, 1.970; Shaw y Weber, 1.983; Lewis y col, 1.989; Reichembach y col., 1992), lo que sugiere que esta proteína no se expresa en condiciones normales.

Bigmani (1.984) considera la posibilidad de que los filamentos intermedios de la glía de Müller sean **HETEROPOLÍMEROS** de Vimentina y GFAP, variando las razones entre las dos proteínas según las especies y como respuesta a las lesiones.

La coexpresión de Vimentina y otros filamentos intermedios no es exclusiva de las células de Müller así:

Vimentina y GFAP en astrocitos inmaduros de retina de *conejo* (Schnitzer, 1988).

Vimentina y neurofilamentos en células horizontales de la retina del *ratón* (Drager, 1.983) y algunas *especies de peces* (Linser y col.,1.985).

Además de filamentos intermedios, también se han identificado algunas proteínas asociadas al citoesqueleto: Filamina (Lemmon, 1.986) y Gelsolina (Legrand y col. 1.991) en *conejos*. Proteína S-100: En las células de Müller de los *mamíferos* (Cocchia y col. , 1.983; Kondo y col. , 1.983) pero no en la de *pollo* (Linser y Moscona, 1.981).

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.

Existen anticuerpos que marcan componentes fibrilares de las células de Müller, por tanto, es presumible que sean proteínas del citoesqueleto. Estos anticuerpos poseen un patrón de expresión distinto al de la Vimentina.

Uno de estos anticuerpos es el monoclonal 3CB2 (Prada F. y col., 1.995), el cual marca intensamente, desde el día embrionario 7'5 – 8 , toda la célula de Müller en varias de especies de *vertebrados*. En la retina de *pollo* marca también los axones de las células horizontales.

e) Funciones de la celula de Müller

Las células de Müller constituyen el unico tipo de glía en la retina de muchas especies, por lo que se debe asumir funciones propias de aquellas células de la neuroglía presentes en otros territorios del SNC pero que se adolecen en la

retina. De este modo realiza las clásicas funciones de **soporte y aislamiento** de las neuronas , así como de **nutrición** a las que se suma las de mantenimiento de la **homeostasia tisular** y la de la **barrera hematorretinal.**, junto con la **respuesta ante lesiones**. Más recientemente se le adjudicaron **funciones en la migración de ciertos neuroblastos** de la retina y en la **relación con el entorno**, de este modo la célula de Müller adecuaría su funcionamiento dependiendo del entorno en el que se encontrara pudiendo llegar a modificar entre otros procesos la excitabilidad neuronal. También se le asocia capacidad para la **formación de mielina**.

e1) Función de Soporte y Aislamiento.

Como buena célula glial, la primera función que se asignó a la célula de Müller fue la de proveer a la retina de una especie de trama interna que soportara su compleja arquitectura.

Paralelamente se hizo especial hincapié en su función de aislamiento; las prolongaciones las células de Müller rodean casi totalmente los somas de algunas neuronas (Ramón y Cajal , 1982) , al igual que los contactos sinápticos en las capas plexiformes (Ramón y Cajal, 1982 ; Meller y Gless, 1965). También rodean los vasos sanguíneos (Konde y col. , 1983 ; Hollander y col. , 1991).

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 se observan

alrededor de algunos axones en las porciones más próximas al nervio óptico. (Ladman y Soper , 1962 ; Hughes y la Velle , 1975; Prada F. y col, 1989).

e2) Función Nutritiva y Metabólica.

Tres evidencias han hecho que a la célula de Müller clásicamente se le adjudique un importante papel nutricional :

- Poseer abundante microvilli (Uga y Smelser , 1973).
- Ser el principal almacén de glucógeno de la retina (Magalhaes y Coimbra, 1970)
- Tener vesículas pinocíticas en su superficie (Prada F. y col., 1989).

Relacionado con el *metabolismo de la glucosa* se ha demostrado la existencia de proteínas transportadoras por difusión facilitada de glucosa en las células de Müller de retinas humanas : GLUT 1 (Mantich y col. , 1993) y de rata GLUT 2 (Watanabe y col. , 1994).

Así mismo también se ha demostrado la presencia de glucógeno fosforilasa esencial para la movilización de las reservas de glucógeno (Ohainian, 1972 ; Pfeiffer y col., 1994).

También la célula de Müller desempeña una importante función en el *metabolismo de la Vit A* ya que es la única célula de la retina neural en la que se

encuentra la proteína celular ácida ligante de retinol (Bunt- Milan y Saani , 1983; Saani y col., 1984) y la proteína celular ligante de retinol (Bok y col. , 1984).

e3) Mantenimiento de la Homeostasia

La célula de Müller juega un papel preponderante en la homeostasia de la retina, por la *eliminación del exceso de K⁺ del espacio extracelular* . Newman (1984, 1985 a y b) demostró en retina de *salamandra* que la célula de Müller es casi exclusivamente permeable al K⁺, y que el mayor número de canales para este ion se concentran en el pie vítreo. Basándose en estos hallazgos , Newman y col. (1984) propusieron que las células de Müller toman del espacio extracelular el exceso de K⁺ generado por la actividad neuronal y lo eliminan al vítreo . A este mecanismo lo denominaron *spatial siphoning*, ya que el exceso de K⁺ es expulsado del tejido (Karwoski y col. , 1989). Los canales de K⁺ que se encontraron en *salamandra* son del tipo inward rectifiers (Brew y col. , 1986 ; Newman , 1993), especialmente adecuados para la función propuesta , aunque también existen canales de K⁺ tipo A (rápidamente inactivantes) y canales dependientes de Ca²⁺ (Newman , 1985 b). Resultados similares se han obtenido en células de Müller de *tortuga* (Conner y col. , 1985) y *de rana* (Skatchkov y col. , 1995) Este mecanismo también se ha estudiado en *mamíferos* (Reichenbach y Eberhardt , 1986) donde es similar, aunque la situación es más compleja. Por una parte se detectan diferencias entre retinas vasculares y avasculares (Newman , 1987 ; Reichelt y Panicke , 1993) y, por otra , se ha identificado un mayor número de tipos de canales de K⁺, no homogéneamente

distribuidos en la célula (Nilius y reichenbach , 1988 ; Reichelt y Panicke, 1993). Los grupos de partículas ordenados ortogonalmente que mencionamos en el apartado 1.3.3.1 han sido relacionados con el control de la concentración de K⁺ extracelular y se piensa que pueden representar canales de K⁺ (Hatton y Ellisman, 1982 ; Wolburg y Berg , 1987), ya que se concentran en pie vítreo. Otros autores, sin embargo, señalan que la relación entre estas partículas y el taponamiento del K⁺ no es tan evidente (Berg y Wolburg , 1989 ; Wolburg y col., 1992), y que estos grupos de partículas podrían cumplir otras funciones, quizás proporcionando cierta estabilidad a la membrana (Gotow y Hashimoto , 1989).

La célula de Müller interviene en la *retirada de los neurotransmisores* liberados por la transmisión sináptica , proceso importante para limitar la excitabilidad neuronal. A este respecto, recuérdese que las prolongaciones de la célula de Müller rodean los contactos sinápticos en las capas plexiformes (Meller y Glees, 1965). Las células de Müller poseen sistemas de captación de varios neurotransmisores y/o neuromoduladores. Se han descrito estos mecanismos para el *glutamato* (Ehinger , 1977 ; Casper y co. , 1982 ; Brandon y Lam , 1983 ; Brew y Attwell, 1987 ; Barbour y col. , 1988 , 1991 ; Bouvier y col. , 1992 ; Amato y co. , 1994) , para el *GABA* (Ehinger, 1977 ; Sharty , 1982, 1983) y para la *taurina* (Ehinger , 1973 ; Lake y col. , 1978 ; Schulze y Neuhoff , 1983) . También se han encontrado sistemas enzimáticos para la *inactivación y/o degradación del glutámico* (Riepe y Noremburg , 1977 ; Sarthy y lam , 1978 ; Linser y Moscona , 1971 ; Trachtenberg y Packey , 1983 ; Linser y col. , 1984),

GABA (Hyde y Robinson, 1974 ; Moore y Gruberg , 1974 ; Sharty y Lam, 1978) y *acetilcolina* (Sharty y Lam , 1978).

Otro factor importante en la homeostasia de un tejido es el *mantenimiento del pH*. Linser y Moscona (1981) demostraron inmunohistoquímicamente que la expresión de anhidrasa carbónica está restringida en retina de *pollo* a la célula de Müller , 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 del CO₂ para formar ácido carbónico ($\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{CO}_3\text{H}_2$), que se disocia en H⁺ y HCO₃⁻ , eliminándose así el exceso de CO₂ generado en el metabolismo de las células de la retina . El funcionamiento de esta enzima fue comprobado por Newman (1994) en células de Müller de *salamandra* recién disgregadas . Dado que la célula posee en el pie vítreo un cotransportador de Na⁺ / HCO₃⁻ (Newman , 1991), el ion bicarbonato sale al humor vítreo , de modo similar a lo que ocurre con el K⁺. Se postula también la existencia de un intercambiador de Na⁺ / H⁺ , que sacaría el H⁺ al humor vítreo, consiguiéndose así el mantenimiento del equilibrio ácido – base 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 ; estudio realizado en conejo), las células de Müller pueden inducir la formación de la barrera , aunque otros autores (Small y col. , 1993 ; estudio realizado en cobaya) no han observado tal inducción.

Hay indicios de que la célula de Müller puede estar implicada en **procesos de respuesta a lesiones** en la retina , puesto que tras una lesión hay cambios en la expresión de moléculas de citoesqueleto (Bignami , 1984 ; Humphrey y col. , 1993 ; Dabin y Barnstable , 1995 ; Huxlin y col. , 1995) así como la enzima glutamina sintetasa y de la proteína del protooncogén Bcl – 2 (Grosche y col. , 1995) , ésta con presunto papel antioxidante en casos de daño tisular. Además la célula de Müller puede producir NO (Goureau y col. , 1994 ; Liepe y col. , 1994), una de cuyas posibles funciones es la participación en procesos de defensa o de respuesta a lesiones.

Datos a tener en cuenta para el estudio de la glia de la Papila.

En las últimas décadas, numerosos estudios han tenido como objetivo conocer el papel estructural y funcional que tienen las células “*no neuronas*” durante el desarrollo del S.N.C. y en el adulto.

Las modernas técnicas de morfología y fisiología, han permitido conocer nuevas características y funciones sobre las células gliales durante el desarrollo. Entre estas funciones destacamos el papel de guía para la migración y desarrollo neuronal, y la participación en la síntesis de neurotransmisores.

Actualmente, conocemos que las células gliales regulan el balance de los principales iones; aportan las sustancias tróficas a las neuronas; y renuevan los principales elementos para el metabolismo neuronal. Además las células gliales

son responsables de que las neuronas no puedan regenerarse (ver la revisión de Willbold y Layer, 1998). Por otro lado también sabemos que las células gliales tienen moléculas de reconocimiento, uniones Gap y receptores específicos que incluyen receptores para determinados neurotransmisores; todos estos datos parecen indicar que las células gliales participan en la modulación de los procesos de información neuronal y en las vías de señalización extraneuronal (Müller, 1992; Newman y Zahs, 1997).

La mayoría de las características estructurales y funcionales anteriormente comentadas han sido encontradas en las células gliales de la retina de los vertebrados, y por lo tanto la retina es un buen modelo donde en muchas especies todos los tipos de células gliales del del S.N.C. pueden ser hallados. Sin embargo en retinas no vascularizadas como las de las aves o algunos mamíferos como el conejo; las células de Müller representan el único tipo de célula glial presente en la retina (Willbold y Layer 1998). Numerosos trabajos (ver la revisión de Willbold y Layer 1998) y los estudios de Prada y cols. (1989 a y b; 1995; 1997), parecen sugerir que en algunos casos como en la retina del pollo, las células de Muller representan un tipo especial de célula glial donde las células gliales radiales, ependimocitos, astrocitos y oligodendrocitos están presentes. Quizas el especial atractivo que muestran las células de Müller aglutinando las características estructurales y funcionales de la macroglia en el S.N.C. han determinado que en los últimos años, numerosos trabajos se han dedicado a estudiar la composición molecular de las células de Müller, utilizando anticuerpos monoclonales. Así, las

células de Müller han sido marcadas con anticuerpos que reconocen antígenos gliales específicos tales como: proteínas asociadas a filamentos intermedios como la proteína ácido fibrilar glial (GFAP) (Erickson y cols. 1987; Eng y Shiurba, 1988; Distler y cols. 1993), la vimentina (Schnitzer y cols.1981; Bignami y cols.1982); o el anticuerpo 3CB2 (Prada y cols., 1995). Anticuerpos contra proteínas de células gliales radiales como la glutamína sintetasa (Linser y Moscona,1979; 1981; Prada y Cols. 1997), anhidrasa carbónica II (Linser y cols. 1984; Palatroni y cols. 1990), proteínas ligadas al ácido retinoico (CRALBP) (Sheedlo y cols.,1995); anticuerpos que reconocen los antígenos 3 A7 (Lemnon, 1985), 3F11, 4F3, 3F8 (Dreher y cols., 1992,1994), 2M6 (Schlosshaver y cols., 1991) o RC1 (Edwards y cols., 1990), entre otros.

El conocimiento completo del papel que juegan las células gliales en el S.N.C. se obtiene estudiando también otras zonas como la placa del suelo de la médula espinal donde axones de neuronas de asociación cruzan la línea media, la glia del rafe troncoencefálico o las células de la papila optica. Esta última región ha sido escasamente estudiada y sin embargo sus células muestran características especiales no bien conocidas que determinan la estructura del disco optico y mantienen estrechas relaciones con los axones del nervio optico. Por otro lado, las células del margen del disco óptico constituyen una importante barrera que determina el límite estructural y funcional entre la retina y la cabeza del nervio óptico (Prada y cols., 1989-b). Esta barrera es como una “Lamina Cribosa”, y parece ser que tiene la capacidad de regular en algunas especies animales, el paso

de células gliales (astrocitos y oligodendrocitos) así como células microgliales hacia el interior de la retina.

En la presente tesis, usando técnicas de microscopia optica (Golgi Colonnier 1964 y Stensaas 1967) y microscopia electrónica, analizamos la morfología de estas células y utilizando anticuerpos específicos frente a antígenos gliales y neuronales, valoramos durante el desarrollo la naturaleza de las mismas así como algunas de sus posibles relaciones funcionales.

2.- MATERIAL Y METODOS

2.1.- MATERIAL

2.1.1.-Material biológico

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 37,51 C y en atmósfera húmeda, siendo éste el día cero del desarrollo. Además, en el momento de la extracción, los embriones fueron estadiados utilizando las tablas de Hamburger y Hamilton (1951). 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 31 día de incubación hasta el momento de la eclosión. 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.

2.2.- METODOS

2.2.1.- PREPARACION DEL MATERIAL PARA MICROSCOPIA LUMINICA

Los embriones más jóvenes, desde E-3 hasta E-12 fueron procesados según el método de tinción argéntica de Golgi Stensaas (1967). A partir de E-12 y hasta la eclosión se utilizó el método de Golgi Colonnier (1964).

a) Método de Golgi Stensaas

Las preparaciones histológicas de los embriones de pollo de 3 a 12 días de incubación se realizaron siguiendo el método de Golgi Stensaas (1967) consistente en: 100 ml. de agua destilada, 5gr. 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 sumergen 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 m, recogándose éstos en tolueno para su ulterior montaje bajo cubreobjetos en un medio neutro DPX.

b) Método de Golgi Colonnier

Los embriones mayores de 12 días de incubación fueron enucleados, y una vez estadiados, inmersos en una solución fijadores de Golgi Colonnier (1964), consistente en: 80ml. 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 microscópio ZEISS marca AF EOAR 65-19 con cámara fotográfica incorporada y un microscópio NIKON con cámara lúcida accesoria. Como película se utilizó Ilford-Pam 50.

Fueron observadas un total de 78 retinas satisfactoriamente teñidas. Cada una de ellas fue observada seriadamente y en su totalidad con objeto de ver los diferentes detalles morfológicos de las células en todo su grosor y las diferencias existentes entre la retina central y la periférica. Dado que el grosor de los cortes, 80-90 μm , incluye varias capas de células, las observaciones siempre se hicieron asegurándonos que la célula estudiada se hallara en un plano medio en el grosor del corte.

2.2.2.- PREPARACION DEL MATERIAL PARA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

Los embriones de pollo destinados al estudio ultraestructural fueron sacrificados en estadios sucesivos desde E- 14 a E-18.

La técnica empleada para el procesado de microscopía electrónica es la descrita por Palay y Chan Palay (1974) para el sistema nervioso central: se disecaron las retinas a 4°C en fijador con 2,5% paraformaldehído, 25% glutaraldehído, tampón fosfato, 0,4M, 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.

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. Las secciones para el estudio de semifinos fueron realizadas a 1 µm con cuchilla de diamante. Estos cortes fueron teñidos según la técnica de Richardson y col., (1960): Azur 1%-Azul de metileno 1% a partes iguales, durante 2 minutos a 60°C y fotografiadas con un microscopio ZEISS Axioplan con cámara fotográfica incorporada.

Los cortes ultrafinos, efectuados con cuchilla de diamante a 600-800Å, se realizaron con ultramicrotomo ULTRACUT y se tiñeron con acetato de uranilo

y citrato de plomo (Reynolds, 1963; Venable y Coggeshall, 1965), examinándose con un microscopio electrónico de transmisión JEOL 100C a 80 Kv.

2.2.3.- PREPARACION DEL MATERIAL PARA LA DISOCIACION CELULAR

El método de disociación celular de retina de pollo fue descrita por Prada C. y col., (1991). Consiste básicamente en una disgregación mixta: enzimática y mecánica. Las retinas se extrajeron del globo ocular y se trocearon finamente con tijeras en 200 ml de sacarosa al 6%. Inmediatamente antes de comenzar cada disociación, se preparaba una solución stock de proteasa en sacarosa al 6%, con una concentración de 0,4 mg. proteasa/ml.

La proteasa utilizada no está comercializada y fue extraída de *Streptomyces* y facilitada por el Departamento de Investigación de Fermentaciones y Síntesis Española S.A.. Se trata de una preparación cruda con un amplio espectro de actividad proteolítica. Es parcialmente inhibida por inhibidores de la tripsina, y fuertemente inhibida por bajas concentraciones de diisopropilfluorofosfato, un inhibidor específico de serín proteasas. Técnicamente es descrita como un complejo de serín-proteasas y queratinasas. La preparación no contiene lipasas, nucleasas, amilasas ni glicosidasas.

Las retinas bien troceada se incubaban en una solución de sacarosa al 6% que contenía entre 0,035 y 0,1 mg/ml de proteasa, tomados en alícuotas de la solución stock. La concentración de proteasa utilizada varió según el estadio del desarrollo del embrión. El volumen del medio de disociación variaba de 300 a 800 μ l por retina, también según el estadio del desarrollo. La disociación enzimática se realizó a 34 °C y fue completada con una disociación mecánica. Esta consistió en pipetear 10 veces, muy suavemente, el medio de incubación al comienzo de la disociación y cada 10 minutos. El proceso era seguido visualmente por observación de pequeñas alícuotas en un fotomicroscopio Zeiss equipado con contraste de fases. La disociación era detenida entre los 30 y los 60 minutos, cuando obteníamos una concentración idónea de las células que nos interesaban bien preservadas morfológicamente. En los días más tempranos del desarrollo (E-6 a E-10), la disociación se realizó en sacarosa al 10,26%, por encontrarse los mejores resultados. La suspensión celular obtenida podía utilizarse para estudiar la morfología de las células directamente, por contraste de fases, o bien podía extenderse en cubres o portas y fijarse. Para el estudio de la forma de las células *in vivo* se disponían de alícuotas de la suspensión celular sobre portaobjetos y se cubrían con cubreobjetos. La suspensión también se extendió sobre portas o cubres gelatinizado para ser posteriormente fijada. Como fijador para observar la morfología celular a lo largo del desarrollo empleamos, etanol, formol y ácido acético en proporción 18:1:1 durante 45 minutos. Las células destinadas a ser procesadas para inmunohistoquímica siguieron un protocolo diferente: los

cubreobjetos con la suspensión celular se centrifugaron a 2.000 rpm durante 2 minutos, para adherir fuertemente las células.

2.2.4.- PREPARACION DEL MATERIAL PARA INMUNOHISTOQUIMICA

Una vez tabulados según las tablas de Hamburger y Hamilton (1951), a los embriones jóvenes se les seccionó las cabezas, y a los embriones mayores de E-12 se les enuclearon los ojos, tanto a unos como a otros se les sumergió en paraformaldehído 4% en fosfato 0,1M buffer a pH 7,6.

Los especímenes permanecieron inmersos en fijador durante 1 día a temperatura ambiente. Una vez fijados se procedió a realizar el proceso de crioprotección en pasos sucesivos de sacarosa al 15% y 30% durante 24 horas cada paso, para posteriormente, ser incluidas las muestras en un medio de inclusión para criostato Tissue-tex y congelados mediante inmersión en nitrógeno líquido.

Las secciones en criostato se realizaron a un grosor entre 10 y 20 μ en dos planos para cada estadio. 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. Secciones

pasando por diferentes áreas retinales se montaron sobre portas cubiertos de gelatina y se almacenaron a 60°C hasta el momento de la inmunorreacción.

Para la técnica inmunohistoquímica, se utilizaron dos grupos de embriones. En un de ellos se utilizó como primer anticuerpo un anti glutamina sintetasa (Transduction Laboratories ref. G45020) y como segundo un anti mouse IgG marcado con isocianato de fluoresceina (Sigma). En el segundo grupo se utilizó como primer anticuerpo 3CB2 y como segundo un anti mouse IgM conjugado con isocianato de fluoresceina (Sigma).

3CB2 es un anticuerpo monoclonal que se expresa en células derivadas del ectodermo y mesodermo. Estudios bioquímicos e inmunocitoquímicos indican que el antígeno reconocido por el anticuerpo es una proteína citoplásmica de 55KDa que podría ser una proteína asociada a filamentos intermedios.

Los portas con los cortes de tejido se preincubaron en suero de pollo al 10% en PBS con triton X-100 al 0,25% durante 30 minutos y posteriormente se incubaron en el primer anticuerpo, a una dilución 1/200 en PBS con 0,1% de triton X-100 y 1% suero de pollo, durante 3 horas a temperatura ambiente. Después de tres lavados de 15 minutos cada uno en PBS con triton X-100 al 0,1% y suero de pollo al 1%, las secciones fueron incubadas con el segundo anticuerpo marcado con fluoresceina a una dilución de 1/100 en PBS con 0,1% de triton X-100, durante 2 horas a temperatura ambiente.

Después de tres lavados de 10 minutos en PBS con triton X-100 al 1% se procedió a cubrir los portas con una disolución de PBS-glicerol 1/9.

Se procesaron secciones de control tanto para los experimentos de marcaje simple como doble. La solución utilizada para bloquear la tinción no específica sustituyó tanto los anticuerpo primarios como los secundarios.

Las observaciones se realizaron en un microscopio Zeiss Axioplan con equipo de epifluorescencia y con cámara fotográfica incorporada. Las fotografías de fluorescencia se realizaron con unapelícula de 400 ASA TMAX de Kodak.

3.- RESULTADOS

La papila optica del pollo se desarrolla entre E-4 y E-17 y en este periodo de tiempo distinguimos 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 la células ganglionares que se proyectan desde al 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 de la papila forman una barrera que separan ambos epitelios neural y pigmentario de la retina, 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 de la Papila Óptica se diferencian completamente hasta adquirir las características que tienen en el 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 constituida por una población especial de células gliales las cuales delimitan 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.

Características microscópicas y submicroscópicas de las células de la papila.

Las células gliales de la papila óptica, observadas en preparaciones de Golgi, muestran importantes modificaciones morfológicas respecto a las células de Müller de la retina. 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. 2 a, flechas). A partir del soma surgen numerosas prolongaciones con formas arqueadas, las cuales llegan hasta la membrana limitante de la retina. En conjunto, muestran un entramado de ojales a través de los cuales pasan los axones de las células ganglionares hacia el nervio óptico. La zona donde se sitúan estas células araña,

constituye el límite entre la retina y la papila /fig. 2b, flechas). En el interior de la papila se observan células con morfología más próxima a la de los astrocitos (fig2b, cabezas de flecha). En esta zona existe una relación muy estrecha entre las células gliales y los vasos sanguíneos (fig.2d, v). Con el microscopio electrónico, hemos podido comprobar que estas células constituyen una verdadera barrera celular entre la retina y la capa de fibras de las células ganglionares las cuales discurren hacia la papila y nervio óptico (fig.2, flechas). A este nivel, existen abundantes axones de gran tamaño que muestran un revestimiento mielínico denso (fig. 2 c,d, cabezas de flecha). Este dato es específico de esta zona de la retina, pues en el resto de la capa de fibras del nervio óptico, la mielina que reviste a los axones de gran tamaño, es una mielina de tipo laxo (fig.2 e, flechas). A este nivel, la mielina laxa, es producida por las prolongaciones de las células de Müller (fig.2 e, -m).

Expresión de antígenos neuronales y gliales en las células gliales de la papila durante el desarrollo.

Hemos estudiado la expresión de diferentes antígenos gliales y no gliales durante el desarrollo de la retina, papila y cabeza del nervio óptico en el pollo. A continuación describimos los patrones de inmunotinción que muestran cada anticuerpo.

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 y se encuentra mayoritariamente en células gliales pero no en oligodendrocitos en el S.N.C., y células del mesodermo embrionario (Prada y cols., 1995). Hemos estudiado la expresión del antígeno 3CB2 en la retina de diferentes vertebrados y el patrón de inmunotinción marca las células de Müller. La fig. 3-a muestra la expresión de 3CB2 en una sección de retina dorso-central de pollo en E-16. La expresión de 3CB2 es más intensa a nivel de la capa de células ganglionares (gc), capa de fibras del nervio óptico (ofl) y en los pies de las células de Müller a nivel de la membrana limitante interna (MLI) (fig. 3-a flechas).

Desde los primeros estadios del desarrollo es posible observar expresión de 3CB2 en la zona prospectiva de la copa óptica a partir de la cual se formará el pecten y en las células ectodérmicas del epitelio pigmentario que limita con el tallo óptico (fig. 3-c, flechas). La inmunorreactividad es más evidente en este nivel y en los siguientes estadios aumenta de intensidad.

Entre E-5 y E-14 las células gliales de la papila 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-13 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 de la papila, en la raíz del pecten y en la cabeza del nervio óptico (fig. 3 d,e). Las cabezas de flecha indican el límite de la retina neural y la papila y las flechas muestran una intensa inmunorreactividad en la zona de unión entre el epitelio pigmentario, la papila y la retina neural. La figura 3 e muestra una zona ampliada del corte siguiente al mostrado en la figura d. Esta zona representa el margen externo de la papila. La papila adulta del pollo muestra un patrón de expresión de 3CB2, similar al de los estadios finales del desarrollo, pero con mayor intensidad de inmunorreactividad para 3CB2; sobre todo en el límite de la papila con la retina neural (fig.3f, flechas). 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 (fig. 3 b flechas).

Expresión del antígeno que reconoce el anticuerpo monoclonal 3BA8.

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 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). 3BA8 se expresa al inicio del desarrollo del S.N.C. en la membrana limitante ventricular (fig. 4-a flechas). En los estadios iniciales del desarrollo de la retina 3BA8 también se localiza en el límite externo de la capa

ventricular (fig. 4-b flechas). Esta zona es la homóloga de la anteriormente descrita en el S.N.C. Entre E-8 y E-10 desaparece la expresión de 3BA8 en el límite externo de la zona ventricular de la retina. Durante estos estadios y de manera transitoria la expresión del antígeno 3BA8 se localiza a nivel de las capas plexiforme externa e interna de la retina (fig. 4-c opl, ipl).

A partir de E-11, 3BA8 está localizado exclusivamente en las células amacrinas y amacrinas desplazadas de la retina (fig. 4d flechas). En la retina adulta 3BA8 se localiza exclusivamente en células amacrinas y la mayor inmunorreactividad aparece localizada en la capa plexiforme interna (fig 4 e, ipl)

Desde los estadios iniciales del desarrollo del disco óptico, observamos inmunorreactividad para 3BA8, la cual se encuentra principalmente en las células del margen externo de la incipiente papila (fig. 4f, flechas) y en la superficie externa de la capa ventricular (fig. 4f, cabezas de flecha). A partir de E-9/E-10 la inmunorreactividad para 3BA8 es más intensa y está circunscrita solo a las células de la papila (fig. 4g, flechas). Entre E-12 y E-16, las células gliales de la papila muestran el patrón definitivo de inmunorreactividad para 3BA8. Durante estos estadios, la expresión del antígeno es cada vez más intensa en las células de la papila (fig. 4h, i flechas curvas y j- estrellas) y en el nervio óptico (fig. 4j, cabezas de flecha). A partir de E-17 el patrón de inmunorreactividad para 3BA8 es similar al que muestra el animal adulto.

Las células de la papila de otras especies animales como el galapago o el camaleón (fig. 4 k,l respectivamente), no contienen el antígeno que reconoce 3BA8.

Expresión de MOSP.

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 los oligodendrocitos del S.N.C 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. 5 a-e y fig. 6 a-m) y en las terminaciones axónicas (figs. 5 a, c, d, flechas y fig.6 a-m) de las células horizontales (fig.6-a). Las figuras 5 b y e corresponden a una célula de Müller aislada, próxima a la papila, mostrando la expresión de MOSP y G.S. respectivamente. Durante el desarrollo de la retina del pollo, MOSP comienza su expresión entre E-11 y E-12 a nivel del nervio óptico y de la papila óptica (datos no mostrados). Un día más tarde E-13, MOSP también aparece 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 similar al observado para 3BA8. Las figuras 6 a y 6 c muestran la colocalización de MOSP y 3BA8 en un mismo corte de retina y papila óptica de un embrión de pollo en E-16. Las células gliales de la papila muestran un patrón similar para ambos antígenos. La mayor intensidad de la inmunoreactividad está localizada en la porción interna

de las células gliales de la papila, mostrando una banda de inmunotinción que delimita las capas internas de la retina (fig. 6-a, flechas). A partir de E-16/E-17, el patron de expresión de MOSP es similar al del animal adulto. Nosotros también hemos comprobado que las células gliales de la papila también expresan durante el desarrollo otros antígenos típicos de oligodendrocitos como el reconocido por el anticuerpo monoclonal A2B5 (datos no mostrados). Este antígeno de preoligodendrocitos es expresado por estas células desde E-7.

Expresión de Glutamina Sintetasa (GS).

La G.S. ha sido considerada como un típico marcador de astrocitos y células gliales de Müller. En un trabajo reciente (Prada y cols., 1997) han estudiado la actividad de G.S. durante el desarrollo normal de las células de Müller y en condiciones experimentales. Durante el desarrollo y en la retina adulta, la inmunorreactividad para la G.S. se localiza sólo donde las células de Müller se encuentran. Así, la ausencia de G.S. es evidente a nivel de la papila óptica y en la cabeza del nervio óptico (fig. 6-d). Las cabezas de flecha en esta figura indican el límite de las capas de la retina, el cual coincide con la expresión de G.S. La inducción de G.S. por inyección de hidrocortisona en el huevo en E-10, sólo determina la síntesis de G.S. por parte de las células de Müller (fig. 6e-m); mientras que las células gliales de la papila no muestran inmunorreactividad para la G.S. (fig. 6-e). Por lo tanto la expresión de G.S. sólo se encuentra en las zonas de la retina, es decir, donde existen capas sinápticas.

La figura 7 recoge una panorámica de la papila de un pollo adulto, cuyo corte tangencial muestra el origen del pecten en toda su extensión (fig. 7 a). Las figuras 7b y c muestran una ampliación de las zonas señaladas con un asterisco y estrella respectivamente. Se puede apreciar que sólo la parte externa de las células de Müller contienen G.S. La expresión de G.S. en estas células, se extiende a su prolongación interna, en la medida en que las prolongaciones de las células de Müller están en contacto con las zonas donde existen neuronas en la retina. Este hecho determina que exista un gradiente en el patrón de expresión de la G.S. en esta zona (fig 7 b, c – GS).

4.- 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 gliales de la papila tengan características especiales respecto a las típicas células neuróglías del S.N.C. 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 de la papila 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. Como necesidad de los hechos anteriormente comentados, las células de la papila 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 lamina 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 S.N.C. 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 fue 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 gliales de la papila es diferente al de la mayoría de las células macrogliales del S.N.C.

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, β -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; Vlodavsky 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 gliales de la papila 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 gliales de la papila óptica durante el desarrollo, cuando toda vía no se ha forma 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 gliales de la papila pueden ser las responsables de la mielinización de los axones que pasan por esta zona. La presencia de MOSP en las células gliales de la papila (células araña) representa un dato muy importante, pues es una aportación más para sugerir que en el S.N.C. 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 S.N.C 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 en el resto del S.N.C.

El hecho que las células de la papila óptica no expresen inmunorreactividad para la G.S., es importante para interpretar los mecanismos que inducen la síntesis de esta enzima. En un trabajo reciente (Prada y cols. 1997), se sugirió que durante el desarrollo, las células de Müller de la retina comenzaban a sintetizar G.S. cuando eran estimuladas por los fotorreceptores; y este hecho coincidía con el periodo de sinaptogénesis de la capa plexiforme externa. Los datos que aportamos en este trabajo, demuestran que las células de la papila no contienen G.S., y que en las zonas peripapilares, las células de Müller expresan G.S. según un gradiente, el cual es dependiente de la posición de la célula y la relación que mantiene con las capas de la retina. Es decir, si la célula de Müller no está en contacto con neuronas o capas sinápticas, no sintetiza G.S. Por lo tanto, una vez más la célula glial adapta su función a los requerimientos de las neuronas que se encuentran en su proximidad.

Las células gliales de la papila óptica, representan un tipo especial de neuroglia capaz de realizar funciones normalmente asignadas por separado a astrocitos y oligodendrocitos. Pero con excepciones, pues se admite que la G.S. es

un marcador de astrocitos en el S.N.C. 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 S.N.C.

5.- CONCLUSIONES

1ª Las células gliales de la papila no son astrocitos modificados. Constituyen un tipo especial de células neurogliales que adaptan su morfología y composición molecular a los requerimientos estructurales y funcionales de la zona.

2ª Las células de la papila forman un entramado glial que a modo de lamina cribosa, separan la retina de la cabeza del nervio óptico y protegen a los axones durante los movimientos del globo ocular.

3ª La presencia de los antígenos 3CB2 y 3BA8 en las células gliales de la papila desde los primeros estadios del desarrollo de la misma, sugiere que estas proteínas podrían estar relacionadas con algún mecanismo del desarrollo.

4ª El hecho que las células gliales de la papila del pollo contengan un antígeno específico de neuronas de asociación relacionado durante el desarrollo con las capas sinápticas de la retina, demuestra la naturaleza tan especial de estas células gliales. Relacionado con este hecho, subyace un papel funcional desconocido pero seguramente trascendente para conocer el desarrollo de los axones a su paso por la papila. Este antígeno neuronal no se encuentra en ninguna otra célula glial del S.N.C.

5ª 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 S.N.C.

6ª La presencia de proteínas relacionadas con la mielina, como MOSP, MAG, o con el desarrollo de los oligodendrocitos como A2B5, en las células gliales de la papila, demuestra que funcionalmente estas células tienen propiedades de oligodendrocitos.

7ª La ausencia de G.S. en las células de la papila óptica y la existencia de un gradiente de expresión de G.S. en las zonas peripapilares, dependiente de la presencia o no de neuronas, demuestra que las células gliales necesitan los contactos neuronales y/o la influencia sináptica para sintetizar G.S.

8ª Las células gliales de la papila óptica, representan un tipo especial de neuroglia capaz de realizar las funciones normalmente asignadas por separado a los astrocitos y a los oligodendrocitos.

6.- RESUMEN

En el presente trabajo, realizamos un estudio morfológico de las células de la papila óptica de la retina del pollo y otros vertebrados usando técnicas de microscopía óptica y electrónica. Además estudiamos la expresión de diferentes antígenos gliales (3CB2) y neuronales (3BA8), los cuales se localizan en las células gliales de la papila durante todo el desarrollo y persisten en el adulto. En los resultados se demuestran los patrones de expresión de inmunorreactividad de estos antígenos y se comparan con los que muestran las papilas ópticas de otros vertebrados como el galápago y el camaleón.

Los datos aportados en este trabajo concluyen que las células gliales de la papila, son células pluripotentes capaces de realizar las funciones típicas de los astrocitos y los oligodendrocitos en el sistema nervioso central.

7.-BIBLIOGRAFIA

Amato, A.; Barbour, B.; Szatkowski, M. y Attwell, D. (1994). Counter-transport of potassium by the glutamate uptake carrier in glial cells isolated from the tiger salamander retina. *J. Physiol.* **479**:371-380.

Barbour, B.; Brew, H. y Attwell, D. (1988). Electrogenic glutamate uptake in glial cells is activate by intracellular potassium. *Nature* **335**:433-435.

Barbour, B.; Brew, H. y Attwell, D. (1991). Electrogenic uptake of glutamate and aspartate into glial cells isolated from the salamander (*Ambystoma*) retina. *J. Physiol.* **436**:169-193.

Berg, K. y Wolburg, H. (1989). Müller (glial) cells but not astrocytes in the retina of the goldfish posses orthogonal arrays of particles. *Glia* **2**:458-469.

Berliner, M.L. (1931). Citologic studies on the retina: I. Normal coexistence of oligodendroglia and myelinated nerve fibers. *Arch. Ophtalmol.* **6**:740-751.

Bignami, A. (1984). Glial fibrillary acidic (GFA) protein in Müller glia. Immunofluorescence study of the goldfish retina. *Brain Res.* **300**:175-178.

Bignami, A.; Raju, T. y Dalh, D. (1982). Localization of vimentin, the nonspecific intermediate filament protein, in embryonal glia in early differentiating neurons. *In vivo* and *in vitro* immunofluorescence study of the rat embryo with vimentin and neurofilament antisera. *Dev. Biol.* **91**: 286-295.

Björklund, H., Bignami, A. y Dahl, D. (1985). Immunohistochemical demonstration of glial fibrillary acidic protein in normal rat Müller glia and retinal astrocytes. *Neurosci. Lett.* **54**: 363-368.

Bouvier, M.; Szatkowskii, M.; Amato A. y Attwell, D. (1992). The glial cell glutamate uptake carier countertransports pH-changing anions. *Nature* **306**: 471-474.

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 orrigin 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.

Brandon, C. y Lam, D.M.K. (1983). L-glutamic acid: A neurotransmitter candidate for cone photoreceptors in human and rat retinas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **80**: 5117-5121.

Brew, H.; Gray, P.T.A.; Mobbs, P. y Attwell, D. (1986). Endfeet of retinal glial cells have higher densities of ion channels that mediate K⁺ buffering. *Nature* **324**: 466-468.

Brew, H. y Attwell, D. (1987). Electrogenic glutamate uptake is a major current carrier in the membrane of axolotl retina glial cells. *Nature* **327**: 707-709.

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.

Casper, D.S.; Trelstad, R.L. y Reif-Lehrer, L. (1982). Glutamate-induced cellular damage in isolated chick embryo retina: Müller cell localization of initial effects. *J. Comp. Neurol.* **209**: 79-90.

Cocchia, D.; Polak, J.M.; Terenghi, G.; Battaglia, F.; Stolfi, V.; Gangitano, C. y Michetti, F. (1983). Localization of S-100 protein in Müller cells of the retina-2. Electron Microscopical Immunocytochemistry. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **24**: 980-984.

Conner, J.D.; Detwiler, P.B. y Sarthy, P.V. (1985). Ionic and electrophysiological properties of retinal Müller (glial) cells of the turtle. *J. Physiol.* **362**: 79-92.

Dabin, I. y Barnstable, C.J. (1995). Rat retinal cells express Thy-1 following neuronal cell death. *Glia* **3**: 23-32.

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.

Distler, C.; Weigel, H. y Hoffmann, K.P. (1993). Glia cells of the monkey retina. I. Astrocytes. *J. Comp. Neurol.* **333**: 134-147.

Dräger, U.C. (1983). Coexistence of neurofilaments and vimentin in a neurone of adult mouse retina. *Nature* **303**: 169-172.

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.; Distler, C. y Dreher, B. (1994). Vitreal filamentation of avian Müller cells and its putative functional correlates. An immunocytochemical study. *J. comp. Neurol.* **350**: 96- 108.

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.

- Ehinger, B. (1973). Glial uptake of taurine in the rabbit retina. *Brain Res.* **60**: 512-516.
- Ehinger, B. (1977). Glial and neuronal uptake of GABA, glutamic acid, glutamine and glutathione in the rabbit retina. *Esp. Eye Res.* **25**: 221-234.
- Ehrlich, D. (1981). Regional specialization of the chick retina as revealed by the size and density of neurons in the ganglion cell layer. *J. Comp. Neurol.* **195**: 643-657.
- 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.
- 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.
- Gotow, T. y Hashimoto, P.H. (1989). Orthogonal arrays of particles in plasma membranes of Müller cells in the guinea pig retina. *Glia* **2**: 273-285.
- 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.
- Hamburger, V. y Hamilton, H.L. (1951). A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morphol.* **88**: 48-50.
- Palay, S.L. y Chan-Palay, V. (1974). Cerebellar cortex: Cytology and organization. Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg, New York.
- Hansson, E. (1986a). Co-cultivation of astroglial enriched cultures from striatum and neuronal containing cultures from substantia nigra. *Life Sci.* **39**:269-277.
- Hidkey, W.F. y Kimura, H. (1988). Perivascular microglial cells of the CNS are bone marrow-derived and present antigen *in vivo*. *Science* **239**:290-292.
- 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.
- 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**:256-284.

-
- Humphrey, M.F.; Constable, I.J.; Chu, Y. y Wiffen, S. (1993). A quantitative study of the lateral spread of Müller cell responses to retinal lesions in the rabbit. *J. Comp. Neurol.* **334**:545-558.
- Huxlin, K.R.; Dreher, Z.; Schulz, M. y Dreher, B. (1995). Glial reactivity in the retina of adult rats. *Glia* **15**:105-118.
- Hyde, J.C. y Robinson, N. (1974). Localization of sites of GABA catabolism in the rat retina. *Nature (London)* **248**:432-433.
- Jiang, B. Bezhadian, M.A. y Caldwell, R.B. (1995). Astrocytes modulate retinal vasculogenesis: Effects on endothelial cell differentiation. *Glia* **15**:1-10.
- 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.
- Karschin, A.; Wässle, H. y Scnitzer, J. (1986). Immunocytochemical studies on astroglia of the cat retina under normal and pathological conditions. *J. Comp. Neurol.* **249**:564-576.
- Karwoski, C.J.; Lu, H.K. y Newman, E.A. (1989). Spatial buffering of light-evoked potassium increases by retinal (glial) cells. *Science* **244**:578-580.
- Kondo, H.; Iwanaga, 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.
- 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.
- 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, pp. R-6.
- Lake, N.; Marshall, J. y Voaden, M.J. (1978). High affinity uptake sites for taurine in the retina. *Exp. Eye Res.* **27**:713-718.
- Landis, D.M.D. y Reese, T.S. (1974). Arrays of particles in freeze-fractured astrocytic membranes. *J. Cell Biol.* **60**:316-320.

-
- Legrand, C.; Ferranz, C.; Clavel, M.C. y Rabié, A. (1991). Distribution of gelsolin in the retina of the developing rabbit. *Cell Tissue Res.* **264**:335-338.
- Lemmon, V. (1985). Monoclonal antibodies specific for glia in the chick nervous system. *Dev. Brain Res.* **23**:111-120.
- Lemmon, V. (1986). Localization of a filamin-like protein in glia of the chick central nervous system. *J. Neurosci.* **6**:43-51.
- Lemmon, V. y Rieser, G. (1983). The developmental distribution of vimentin in the chick retina. *Dev. Brain Res.* **11**:191-197.
- Leong, S.K. y Ling, E.A. (1992). Amoeboid and ramified microglia: their interrelationship and response to brain injury. *Glia* **6**:39-47.
- 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.
- 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.
- 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.
- Linser, P. 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. y Moscona, A.A. (1981a). Carbonic anhydrase C in the neural retina: Transition from generalized to glia-specific cell localization during embryonic development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **78**:7190-7194.
- Linser, P.J. y Moscona, A.A. (1981b). Induction of glutamine synthetase in embryonic neural retina: its suppression by the gliatoxic agent alpha-aminoadipic acid. *Developmental Brain Research.* **1**:103-119.
- 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.

-
- 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.
- Mantych, G.J.; Hageman, G.S. y Devaskar, S.U. (1993). Characterization of glucose transporter isoforms in the adult and developing human eye. *Endocrinology* **133**: 600-607.
- Meller, K. y Gless, P. (1965). The differentiation of neuroglia -Müller- cells in the retina of chick. *Z. Zellforsch.* **66**:321-332.
- Moore, C.L. y Gruberg, E.R. (1974). The distribution of succinic semialdehyde dehydrogenase in the brain and retina of the tiger salamander (*Ambystoma tigrinum*). *Brain Res.* **67**:467-478.
- Müller, F.; Greferath, U.; Wässle, H.; Wisden, W. y Seeburg, P. (1992). Glutamate receptor expression in the rat retina. *Neurosci. Lett.* **138**:179-182.
- Newman, E.A. (1984). Regional specialization of retinal glial cell membrane. *Nature* **309**: 155-157.
- Newman, E.A. (1985a). Membrane physiology of retinal glial (müller) cells. *J. Neurosci.* **5**: 2225-2239.
- Newman, E.A. (1985b). Voltage dependent calcium and potassium channels in retinal glial cells, *Nature* **317**:809-811.
- Newman, E.A. (1987). Distribution of potassium conductance in mammalian Müller (glial) cells: a comparative study. *J. Neurosci.* **7**: 2423-2432.
- Newman, E.A. (1991). Sodium-bicarbonate cotransport in retinal müller (glial) cells of the salamander. *J. Neurosci.* **11**:3972-2983.
- Newman, E.A. (1994). A physiological measure of carbonic anhydrase in Müller cells. *Glia* **11**:291-299.

- 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.
- 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.
- 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.
- Prada, C.; Puga, J.; Perez-Méndez, L.; López, R. y Ramírez, G. (1991). Spatial and temporal patterns of neurogenesis in the chick retina. *Europ. J. Neurosci.* 3:559-569.
- 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-Galvez, J.M. (1989). Regional adaptation of Müller cells in the chick retina. A Golgi and electron microscopical study. *Histol. and Histopath.* 4:309-315.
- 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.
- Ramón y Cajal, S. (1892). La retina des vertebres. *La Cellule* 9:119-225.
- 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.
- Raviola, G. (1977). The structural basis of the blood-ocular barriers. *Exp. Eye Res.* 25:27-63.
- Reale, E.; Luciano, L. y Spitznas, M. (1978). Communicating junctions of the human sensory retina. *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 192:73-87.

- 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.
97: 816- 822.
- 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.; Dettmer, D.; Brückner, G.; Neumann, N. y Birkenmeyer, G. (1985). Morphological variability, lectin binding and Na⁺, K⁺-activated adenosine triphosphatase activity of isolated Müller (glial) cells from the rabbit retina. *Neurosci. Lett.* **55**:29-34.
- Reichenbach, A. y Eberhardt, (1986). Intracellular recordings from isolated rabbit retinal Müller (glial) cells. *Pflügers Arch.* **407**: 348- 353.
- 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, n°1:139-171.
- Reichenbach, A.; Schippel, K.; Schümann, 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. 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.

- 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. *Graefe's Arch. Ophthalmol.* **221**:171-178.
- Richardson, K.C.; Jarett, L. y E.H. Finke, E.H. (1960). Embedding in epoxy resins for ultrathin sectioning in electron microscopy. *Stain Technol.* **35**: 313-323.
- Richter, W.; Reichenbach, A. y Reichelt, W. (1990). Orthogonal arrays of intramembranous particles in the Müller cell and astrocyte endfoot membrane of rabbit retina. Postnatal development and adulthood. *J. Neurocytol.* **19**:127-139.
- Riepe, R.E. y Noremburg, M.D. (1977). Müller cell localization of glutamine synthetase in rat retina. *Nature.* **268**:654-655.
- Rio-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.
- Robinson, 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.
- Rodieck, R.W. (1973). The vertebrate retina. Principles of structure and function. Ed. *W.H. Freeman and Company*. San Francisco.
- Rungger-Brändle, E.; Messerli, J.M.; Niemeyer, G. y Eppenberger, J.M. (1993). Confocal microscopy and computer assisted image reconstruction of astrocytes in the mammalian retina. *Eur. J. Neurosci.* **5**:1093-1106.
- Saari, J.C.; Bunt-Milam, A.-H.; Bredberg, D.L. y Garwin, G.G. (1984). Properties and immunocytochemical localization of three retinoid-binding proteins from bovine retina. *Vision Res.* **24**:1595-1603.
- 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.
- Schlosshauer, B.; Grauer, D.; Dotting, D. y Vanselow, J. (1991). Expression of a novel Müller glia specific antigen during development and after optic nerve lesion. *Development* **111**:789-799
- Schnitzer, J. (1985). Distribution and immunoreactivity of glia in the retina of the rabbit. *J. Comp. Neurol.* **240**:128-142.
- Schnitzer, J.; Franke, W.W. y Schachner, M. (1981). Immunocytochemical demonstration of vimentin in astrocytes and ependymal cells of the developing and adult mouse nervous system. *J. Cell Biol.* **90**:435-447.
- 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.
- Schulze, E. y Neuhoff, V. (1983). Uptake, autoradiography and release of taurine and homotaurine from retinal tissue. *Int. J. Neurosci.* **18**:253-268.
- Semple-Rowland, S.L. (1991). Expression of glial fibrillary acidic protein by Müller cells in rd chick retina. *J. Comp. Neurol.* **305**:582-590.
- 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.
- 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.
- Skatchkov, S.N.; Vyklícký, L. y Orkand, R.K. (1995). Potassium currents in endfeet of isolated Müller cells from the frog retina. *Glia* **15**:54-65.
- 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.
- 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.
- Stensaas, L.C. (1967). The development of hippocampal and dorsolateral pallial regions of the cerebral hemisphere in fetal rabbits. *J. Comp. Neurol.* **129**: 159.

-
- 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.
- 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.
- 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.
- Trachtenberg, M.C. y Packey, D.J. (1983). Rapid isolation of mammalian Müller cells. *Brain Res.* **261**:43-52.
- Triviño, A.; Ramírez, J.M.; Ramírez, A.I.; Salazar, J.J. y García-Sánchez, J. (1992). Retinal perivascular astroglia: an immunoperoxidase study. *Vision Res.* **32**:1601-1607.
- 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.
- Venable, J.H. y Coggeshall, R. (1965). A simplified lead citrate stain for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.* **25**: 407.
- Watanabe, T.; Mio, Y.; Hoshino, F.B.; Nagaatsu, S.; Hirosawa, K. y Nakahara, K. (1994). GLUT2 expression in the rat retina: localization at the apical ends of Müller cells. *Brain Res.* **655**:128-134.
- Watanabe, T. y Raff, M.C. (1988). Retinal astrocytes are immigrants from the optic nerve. *Nature* **332**:834-837.
- Wolburg, H. y Berg, K. (1988). Distribution of orthogonal arrays of particles in the Müller cell membrane of the mouse retina. *Glia* **1**:246-252.

Wolburg, H.; Berg, K. y Naujoks-Manteuffel, C. (1992) Müller (glial) cells in the retina of urodeles and anurans reveal different morphology by means of freeze-fracturing. *Neurosci. Lett.* **138**: 89- 92.

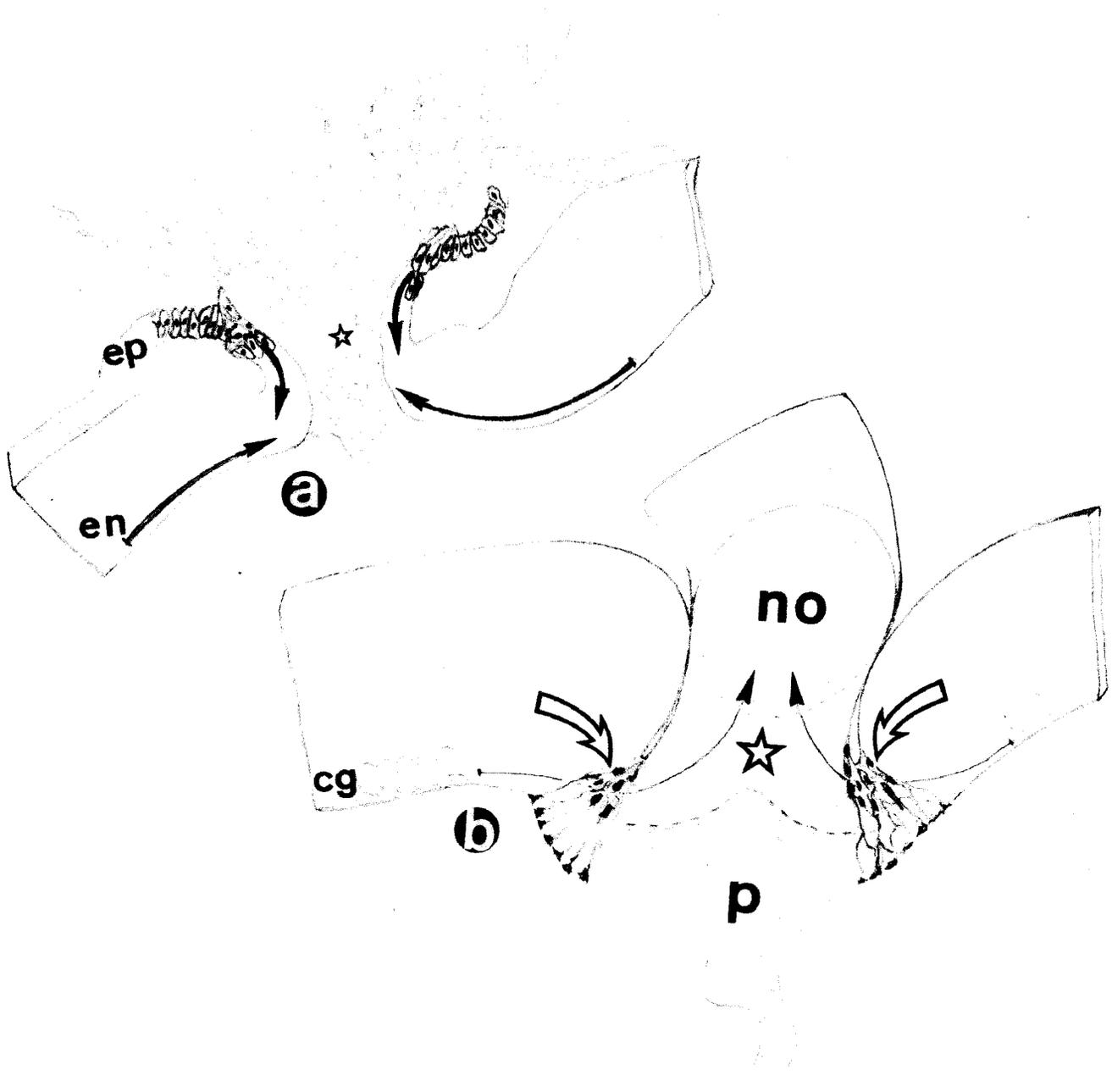


Figura 1

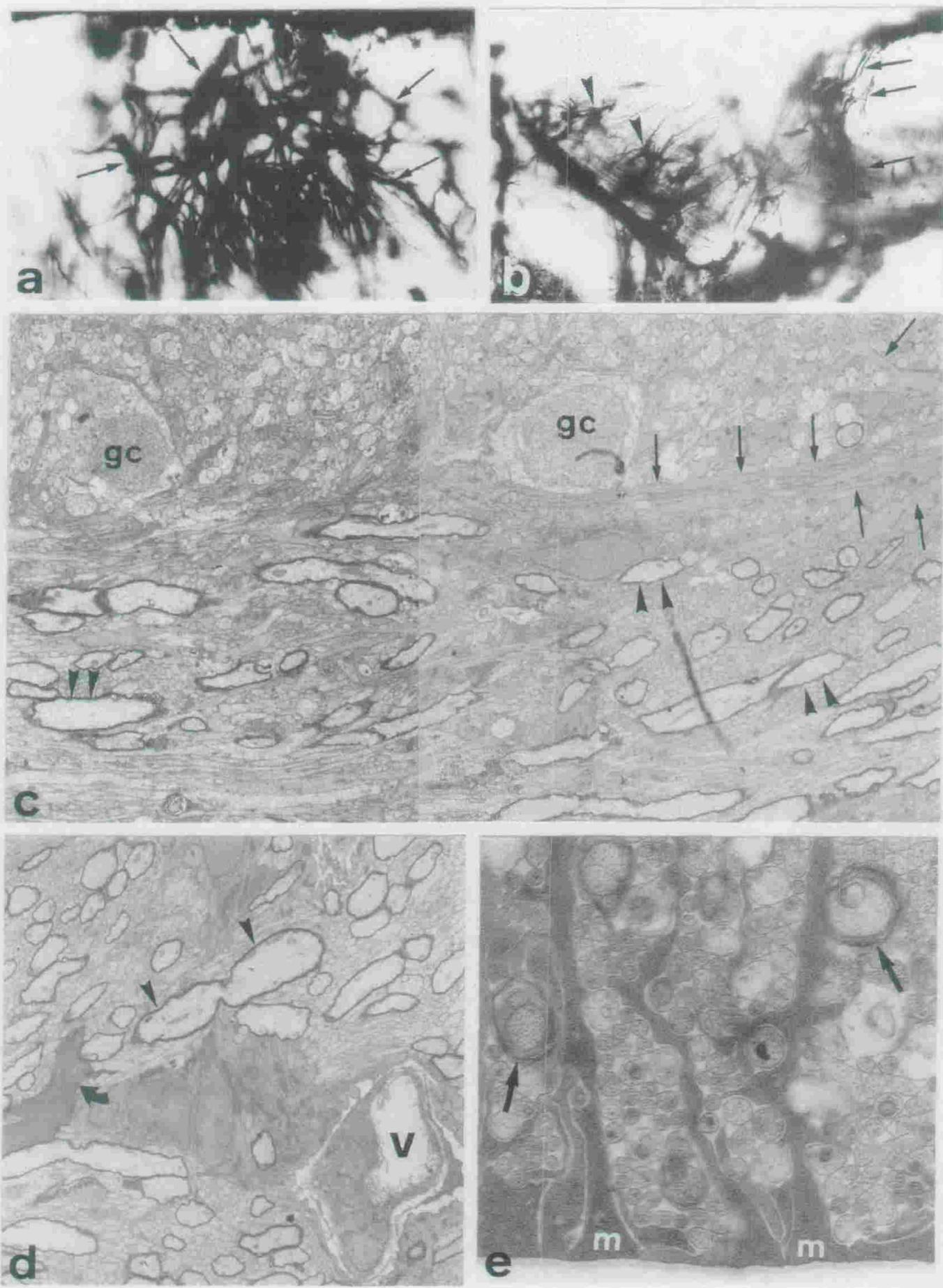


Figura 2

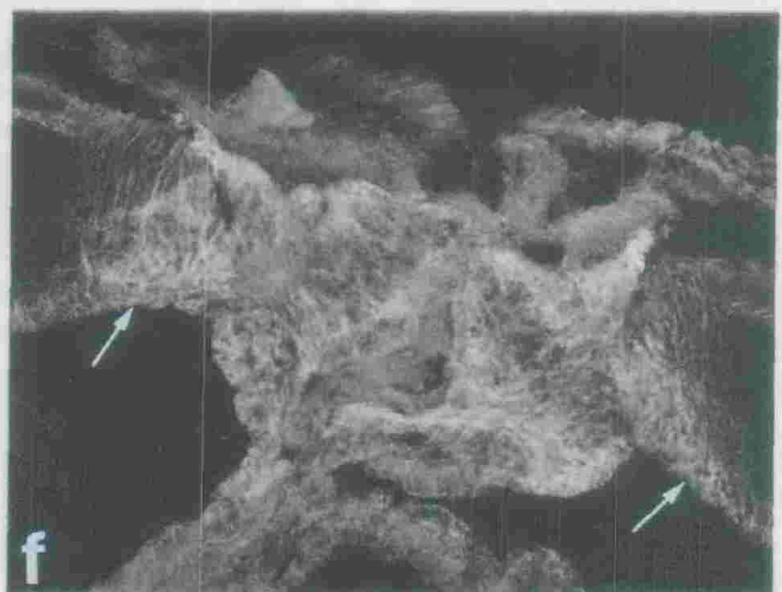
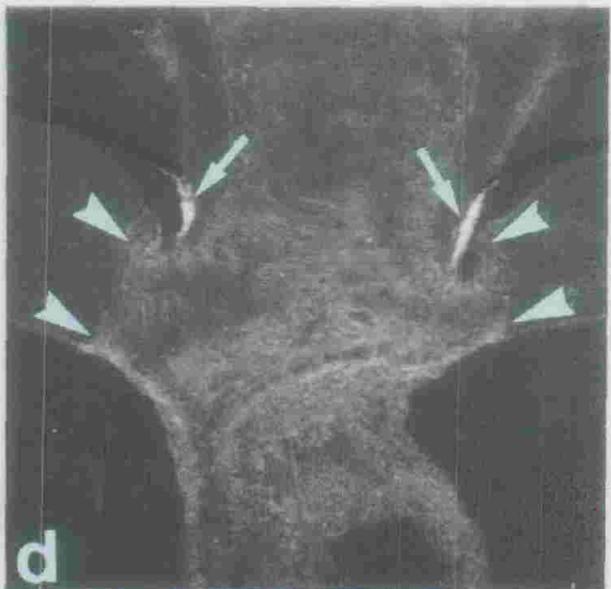
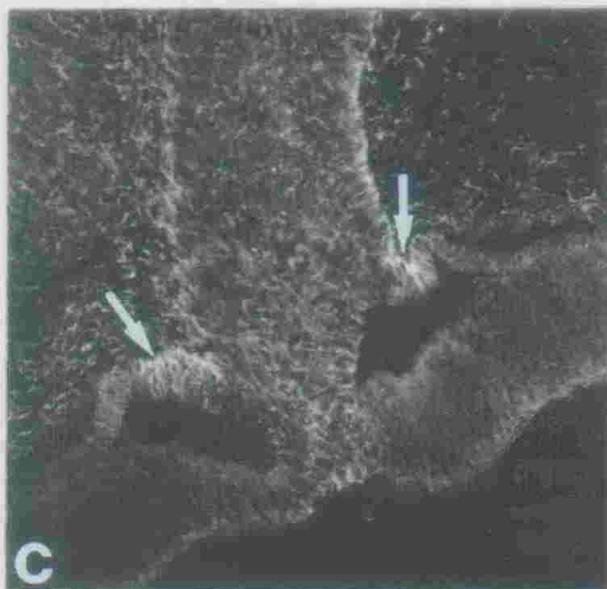
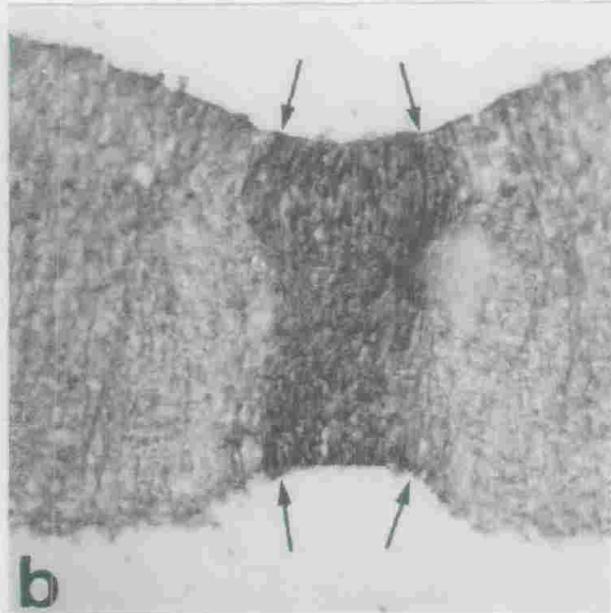
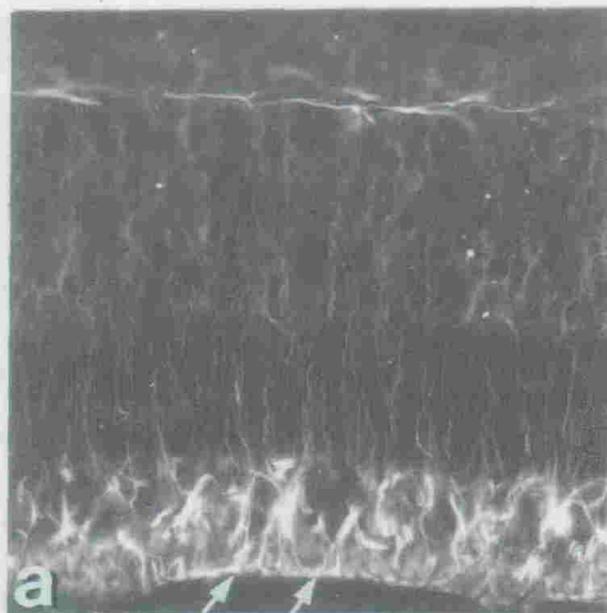


Figura 3

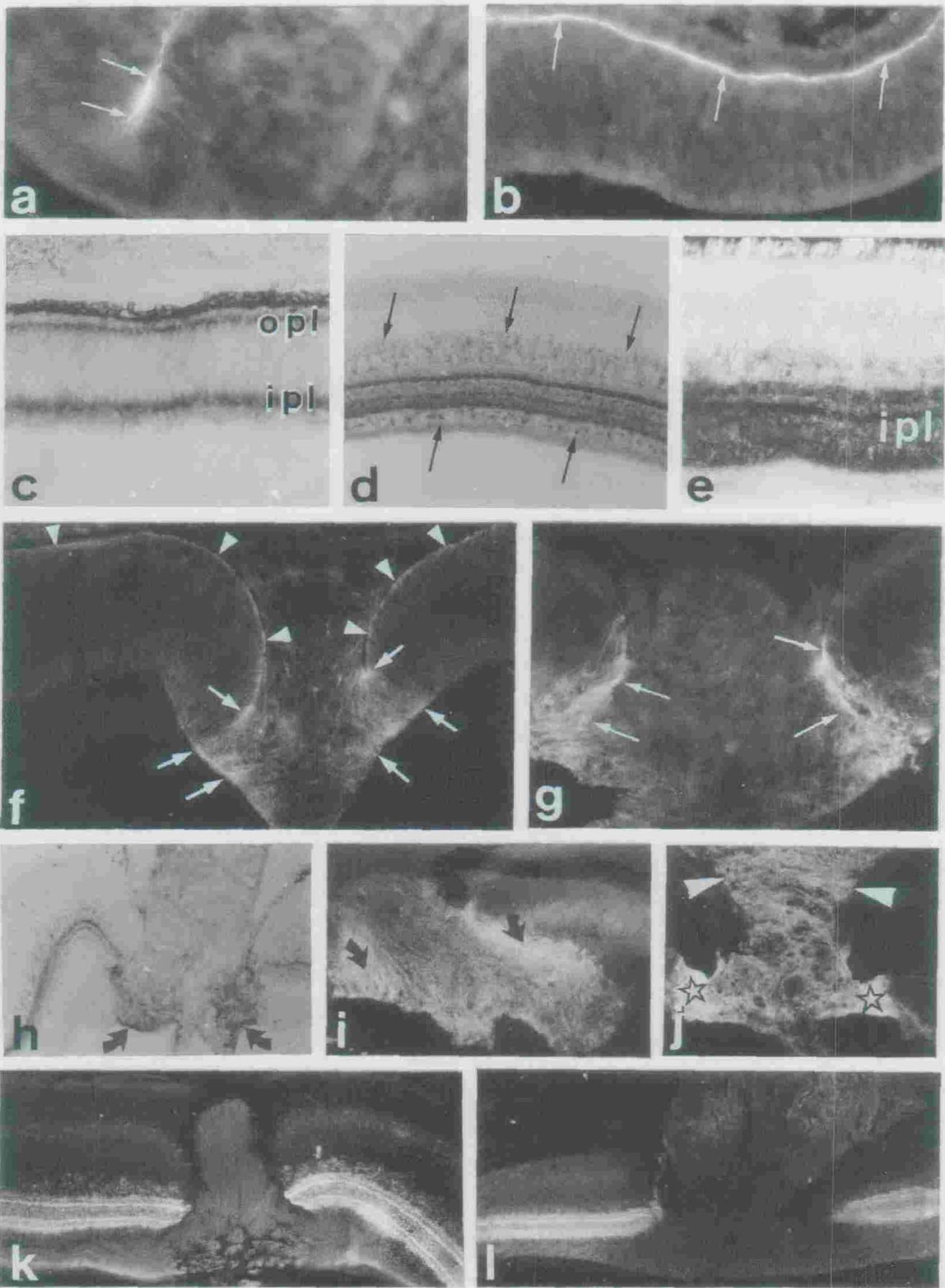


Figura 4

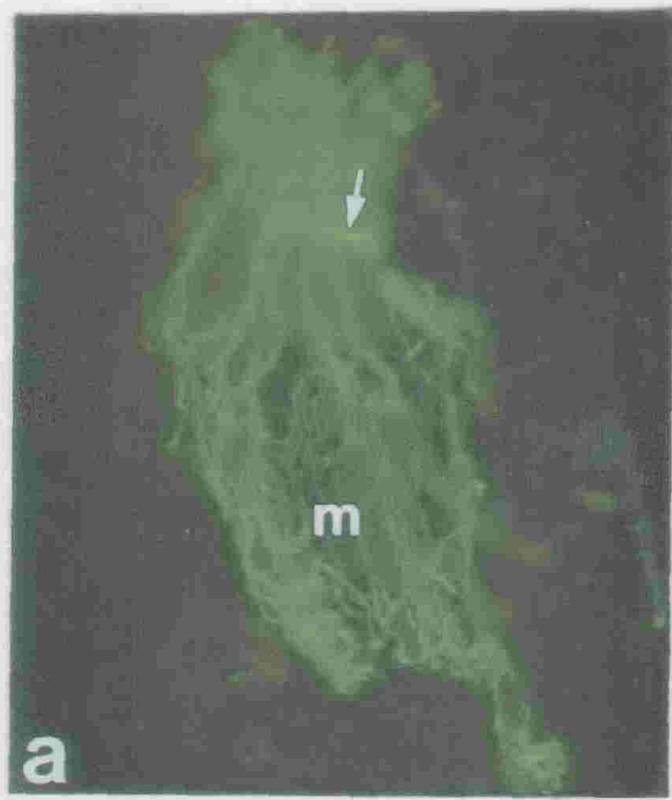


Figura 5

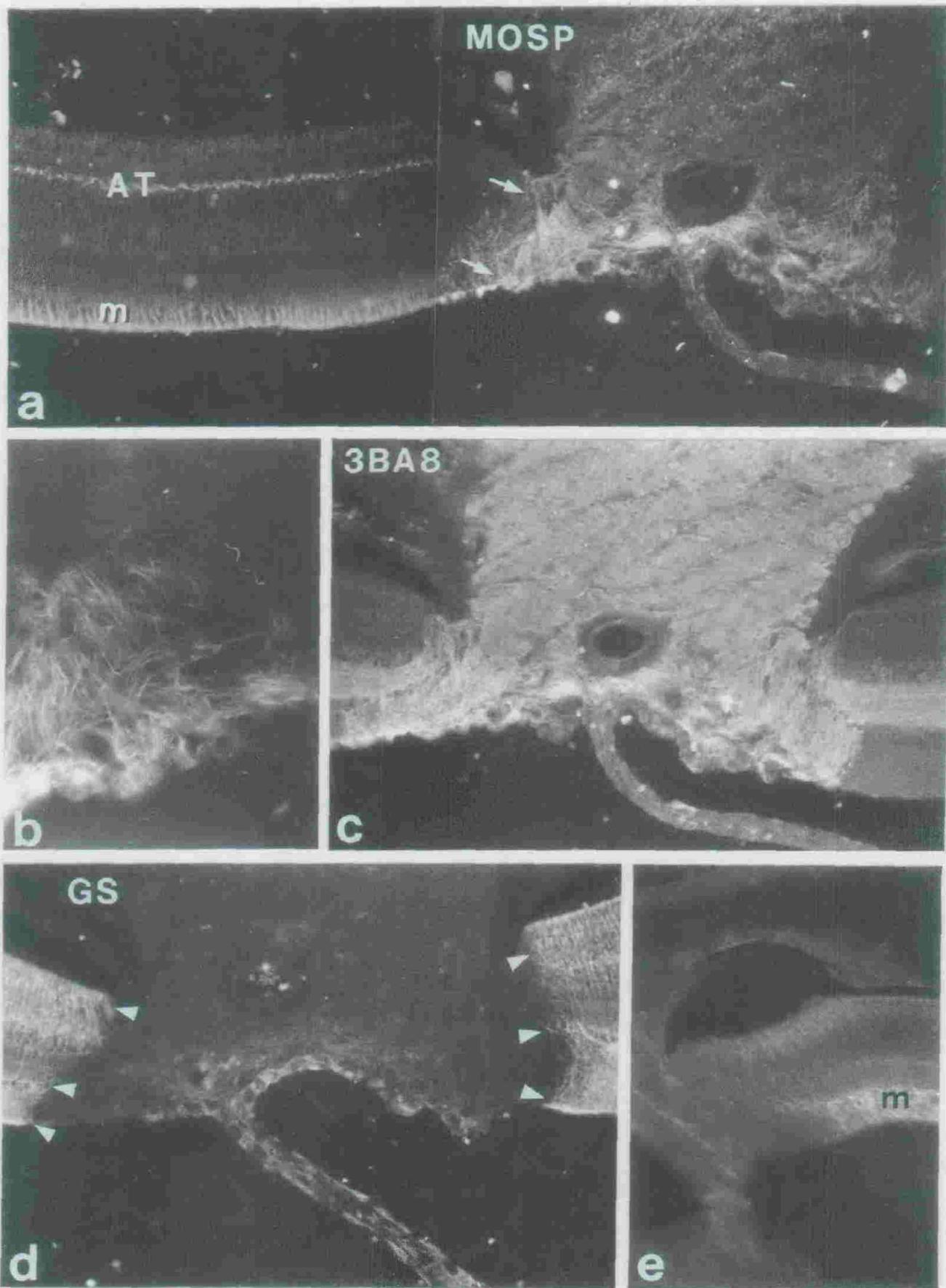


Figura 6

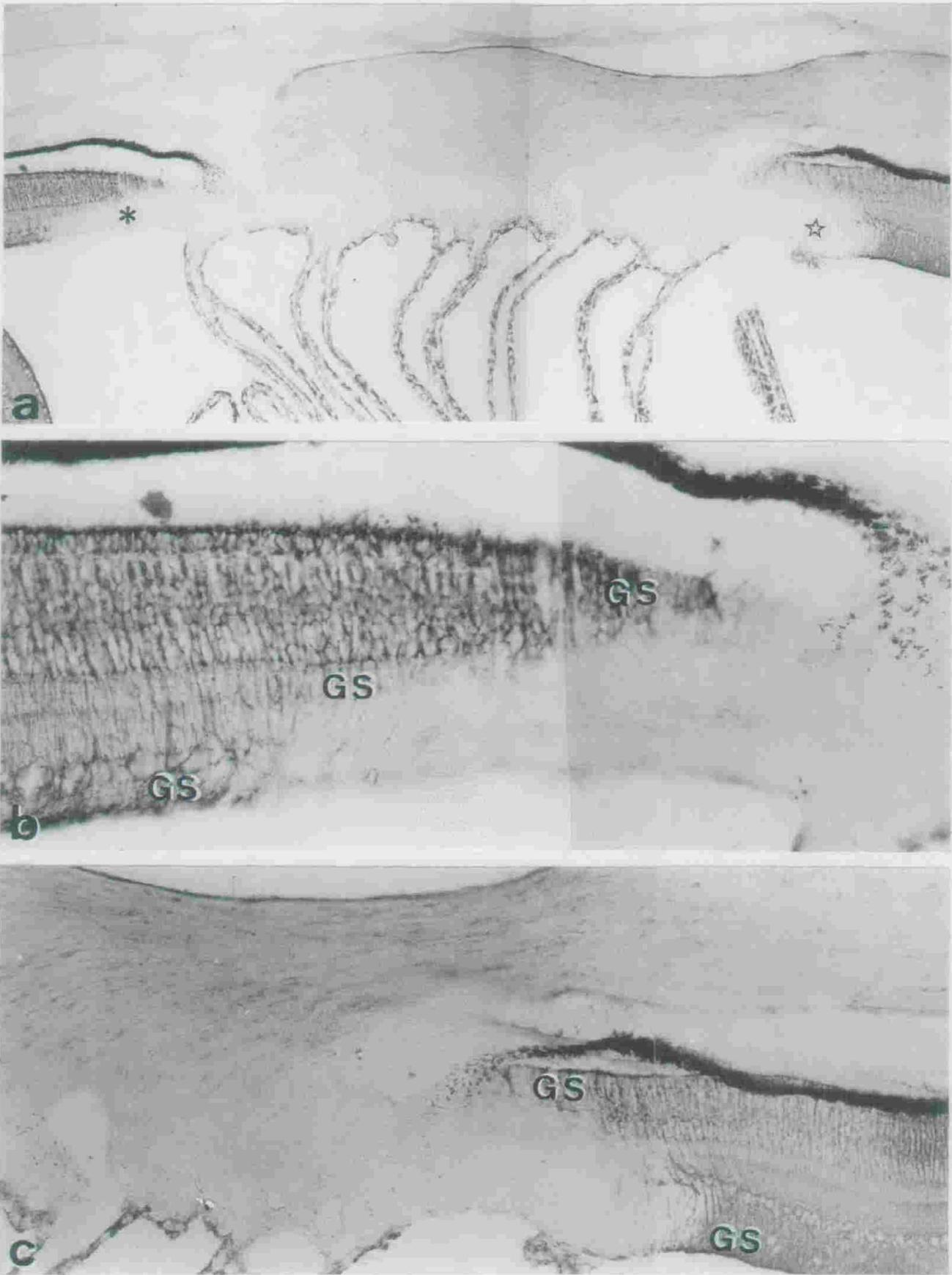


Figura 7

JESUS PEÑAS DEL CASTILLO

Caracterización morfoquímica de las células
giales de la papila en la retina de los vertebrados.

LAURE FOR UNANIMIDAD

SORRESALIENTE COM

14

GENERO

2000