

INSTITUTO DE BIOLOGÍA DEL DESARROLLO

**DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA
Y EMBRIOLOGÍA HUMANA**

**FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DE SEVILLA**



***ORGANIZACIÓN ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DE
LA RETINA DEL BÚHO. ESTUDIO COMPARADO
ENTRE LAS AVES DE HÁBITO NOCTURNO Y DIURNO***

Trabajo que para optar al Grado de Doctor por la

Universidad de Sevilla presenta la Licenciada Dña. M^a Leticia

Lledó de Villar

**ORGANIZACIÓN ESTRUCTURAL DE LA RETINA
DEL BÚHO. ESTUDIO COMPARADO ENTRE LAS
AVES DE HÁBITO NOCTURNO Y DIURNO**



**Trabajo presentado por la Licenciada Dña. M^a Leticia Lledó de
Villar para optar al grado de Doctor por la Universidad de Sevilla**

Fdo.: M^a Leticia Lledó de Villar

**Fdo.: Francisco A. Prada Elena
Director del Dpto. de Anatomía y Embriología Humana
Universidad de Sevilla**

**Dña. ADELA QUESADA RUÍZ, Dña. CAROLA
CHMIELEWSKI ÁLVAREZ Y D. FRANCISCO A.
PRADA ELENA, PROFESORAS TITULARES DE
UNIVERSIDAD Y CATEDRÁTICO DE UNIVERSIDAD
DEL DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA Y
EMBRIOLOGÍA HUMANA DE LA UNIVERSIDAD DE
SEVILLA**



CERTIFICAN: Que, el trabajo titulado
***“ORGANIZACIÓN ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DE LA
RETINA DEL BÚHO. ESTUDIO COMPARADO ENTRE
LAS AVES DE HÁBITO NOCTURNO Y DIURNO”***, ha sido
realizado en el Instituto de Biología del Desarrollo y en el Dpto.
de Anatomía y Embriología Humana bajo nuestra dirección.

Y para que conste y surta los efectos oportunos lo firmamos en
Sevilla a 11 de mayo de 2010.

Fdo.:A.Quesada Ruíz Fdo.:C.Chmielewski Álvarez Fdo.:F.A.Prada Elena

A Verena, hermana y amiga, quien desde el cielo vela cada día por mí y los míos.

A Carlos, Alegría, Carlete e Irene, el gran regalo que Dios me ha hecho.

Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que han contribuido al proceso de gestación de esta tesis. Especialmente al Dr. D. Juan José Negro Balmaseda, Vicedirector Científico de la Estación Biológica de Doñana CSIC y a sus colaboradores por habernos cedido un material tan valorable para nuestro estudio como es el búho, a la Dra. Dña. Adela Quesada Ruíz, a la Dra. Dña. Carola Chmielewski Álvarez y al Dr. D. Francisco A. Prada Elena por su tutela y ayuda inestimable en la dirección este trabajo: sin su tenacidad esta tesis no hubiera sido posible.

Mi gratitud a todos y cada uno de los miembros de la “familia” del Instituto de Biología del Desarrollo y del Departamento de Anatomía y Embriología Humana.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	10
1.1.- LAS RAPACES NOCTURNAS: CARACTERÍSTICAS Y CLASIFICACIÓN.....	11
1.2.- EL BÚHO REAL (<i>Bubo bubo</i>)	15
1.2.1.- Descripción.....	15
1.2.2.- Hábitat y distribución	16
1.2.3.- Comportamiento	16
1.2.4.- Alimentación	16
1.2.5.- Reproducción.....	17
1.3.- EL OJO DE LAS AVES	17
1.3.1.- Rasgos generales que caracterizan el ojo de las aves.....	17
1.3.2.- Anatomía del ojo de las aves	19
1.3.2.1.- Córnea, cristalino e iris	20
1.3.2.2.- Pecten	21
1.3.2.3.-La retina de las aves	21
1.3.2.3.A.- Neuronas de transmisión vertical	29
1.3.2.3.A1.- Fotorreceptores	30
1.3.2.3.A2.- Células bipolares.....	34
1.3.2.3.A3- Células ganglionares	36
1.3.2.3.B.- Neuronas de asociación o interneuronas	37
1.3.2.3.B1.- Células horizontales	37
1.3.2.3.B2.- Células amacrinas	38
1.3.2.3.B3.- Células interplexiformes.....	39
1.3.2.3.C.- Glía retiniana	41
1.3.2.3.C1.- La microglía.....	42
1.3.2.3.C2.- La macroglía	43
1.3.2.3.C3.- Las células de Müller	46
1.3.3.- La retina en las aves nocturnas	48
1.3.4.- La visión en las aves	49
1.3.4.1.- Campo de visión.....	49
1.3.4.2.- Visión cromática	51
1.4.- MARCADORES NEURONALES Y GLIALES	55
1.4.1.- Expresión del anticuerpo policlonal que reconoce Opsina azul	55
1.4.2.- Expresión del anticuerpo policlonal que reconoce GABA.....	57

1.4.3.- Expresión del anticuerpo monoclonal que reconoce 3BA8.....	59
1.4.4.- Expresión del anticuerpo monoclonal que reconoce GS.....	59
1.4.5.- Expresión del anticuerpo monoclonal 3CB2.....	62
1.4.6.- Expresión del anticuerpo monoclonal que reconoce MOSP.....	62
1.4.7.- Expresión del anticuerpo monoclonal que reconoce His-C7.....	64
2.-PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACIÓN.....	65
3.- MATERIAL Y MÉTODOS.....	70
3.1.- ANIMALES.....	71
3.2.- PREPARACIÓN DEL MATERIAL PARA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA.....	72
3.2.1. Estudio de Semifinos.....	72
3.2.2. Estudio de Ultrafinos.....	73
3.3.- PREPARACIÓN DEL MATERIAL EN FRESCO PARA EL ESTUDIO DE GOTAS DE GRASA.....	74
3.4.- PREPARACION DEL MATERIAL PARA INMUNOHISTOQUÍMICA.....	74
4.- RESULTADOS.....	82
4.1.- DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA DE LA RETINA DEL BÚHO REAL (BUBO BUBO).....	83
4.1.1- Fotorreceptores y células de transmisión vertical.....	83
4.1.1.1- Fotorreceptores.....	83
4.1.1.2.- Células bipolares.....	86
4.1.1.3.- Células ganglionares.....	87
4.1.2.- Neuronas de asociación.....	88
4.1.2.1.- Células horizontales.....	88
4.1.2.2.- Células amacrinas.....	89
4.1.3.- Células gliales.....	90
4.1.3.1.- Células de Müller.....	90
4.1.3.2.- Microglía.....	91

4.2.- DESCRIPCIÓN DE LA EXPRESIÓN ANTIGÉNICA DE LA RETINA DEL BÚHO REAL EN RELACIÓN A LA RETINA DEL POLLO	91
4.2.1.- Expresión del anticuerpo policlonal que reconoce opsina azul	92
4.2.2.- Expresión del anticuerpo que reconoce GABA	92
4.2.3.- Expresión del anticuerpo monoclonal que reconoce 3BA8.....	93
4.2.4.- Expresión del anticuerpo monoclonal que reconoce GS	94
4.2.5.- Expresión del anticuerpo monoclonal que reconoce 3CB2.....	95
4.2.6.- Expresión del anticuerpo monoclonal que reconoce MOSP	95
4.2.7.- Expresión del anticuerpo monoclonal que reconoce His-C7.....	96
5.- DISCUSIÓN.....	114
5.1.- DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA DE LA RETINA DEL BÚHO REAL (BÚBO BUBO)	115
5.2.- VISIÓN CROMÁTICA DEL BÚHO REAL	121
5.3.- EXPRESIÓN ANTIGÉNICA DE LAS NEURONAS DE LA RETINA DEL BÚHO REAL	124
5.3.1.- Células horizontales	124
5.3.2.- Células amacrinas	126
5.4.- EXPRESIÓN ANTIGÉNICA DE LAS CÉLULAS GLIALES	127
5.4.1.- Expresión antigénica de las células de Müller	127
5.4.2.- Expresión antigénica de las células microgliales	128
6.- CONCLUSIONES	130
7.- BIBLIOGRAFIA	134

1.- INTRODUCCIÓN

1.1.- LAS RAPACES NOCTURNAS: CARACTERÍSTICAS Y CLASIFICACIÓN

El término rapaz se aplica a aquellas aves dotadas de fuertes garras y pico afilado; unas herramientas necesarias para cazar. El adjetivo nocturno señala una actividad fundamental durante las horas crepusculares o de la noche. Así podríamos definir a este grupo como aves depredadoras que desarrollan su actividad durante la noche.

Las rapaces nocturnas, también llamadas coloquialmente “búhos”, poseen unas características muy peculiares que nos van a permitir diferenciarlas de otras aves. Muchas de ellas están íntimamente relacionadas con su carácter depredador y nocturno.

La cabeza de forma redondeada y grande es típica de los búhos. Estas formas “rechonchas” no se corresponden con la realidad pues es el plumaje el responsable de darles esta apariencia.

Los hábitos de la mayoría de los búhos son nocturnos o crepusculares, aunque algunas especies son semi-diurnas.

La visión se encuentra especialmente desarrollada y adaptada a condiciones de baja luminosidad. Así, presentan unos grandes ojos provistos de pupilas con una extraordinaria capacidad para dilatarse (y dejar entrar por tanto la máxima cantidad de luz en el

ojo) y una retina con gran cantidad de bastones (células capaces de captar pequeñas cantidades de luz).

Los ojos están situados, al igual que en la especie humana, en un plano frontal. De este modo obtienen una visión estereoscópica que le permite un perfecto cálculo de la profundidad. El campo de visión queda reducido tan solo a 110°, pero a cambio, casi la mitad de ellos es binocular.

La rotación de la cabeza, o la capacidad que tienen para girarla, es de 270° aproximadamente. Así suplen la pérdida de campo de visión que les supone la frontalización de los ojos y el hecho de que éstos no sean esféricos y no puedan, por tanto, girar dentro de las órbitas.

Estas aves son auténticas estrategias del camuflaje. Así, para pasar desapercibidos durante el día, los búhos poseen colores en su plumaje muy similares al medio en el que suelen vivir. Algunas especies cuentan además con unos penachos de plumas u “orejas” situados en la parte superior de la cabeza que les sirven para romper su figura redondeada, haciéndoles parecer una rama tronchada.

El oído está altamente desarrollado y adaptado a la localización de presas. El disco facial, una estructura en forma de corazón situada alrededor de los ojos, actúa como una antena parabólica dirigiendo los

sonidos hacia los oídos. En algunas especies existe además una asimetría bilateral del oído externo, estando situado un oído más alto que otro, lo cual les permite localizar con asombrosa exactitud los sonidos que emite la presa en ausencia absoluta de luz. Esta habilidad para localizar sonidos es conocida como “escucha direccional”.

La especial estructura de su plumaje les confiere un vuelo absolutamente silencioso que les permite oír a sus presas mientras vuelan. La superficie de las plumas es suave y acolchada, de modo que amortigua la fricción que se produce entre ellas al batir. Unos bordes deflecados en las plumas elimina además el silbido que produce el aire al ser “cortado” durante el vuelo.

El dedo más externo es reversible, de modo que al cerrar la garra éste lo hace desde atrás, tornándose entonces la garra en una trampa perfecta. La comunicación entre congéneres es casi completamente vocal, está basada en sonidos. Poseen por ello una membrana vocal bien desarrollada que da cuenta de la amplia variedad de sonidos que estas aves nocturnas emiten.

No poseen buche, el órgano que hace las funciones de almacén de alimento en las aves. Por esta razón deben alimentarse con menores cantidades de alimento consumidas a intervalos más regulares.

La reproducción está muy adaptada a la disponibilidad de alimento. Años de abundancia provocan un número grande de huevos, e incluso más de una puesta al año. Si, por el contrario, el alimento escasea, pueden no criar. Cuentan además con una estrategia que les permite sacar adelante al mayor número posible de pollos, los huevos son puestos con una diferencia de 2-3 días entre ellos, pero la incubación comienza desde el día en que se pone el primero. De este modo, los pollos van naciendo con 2-3 días de diferencia. Si el alimento escasea, el más pequeño quedará debilitado por la falta de comida y acabará siendo comido por los pollos mayores o por los propios padres, y así sucesivamente.

Los primeros intentos de clasificación del siglo XIX consideraron a las rapaces nocturnas cercanas a las diurnas (buitres, águilas, etc.). Estudios posteriores demostraron la lejanía evolutiva que existe entre ambos grupos.

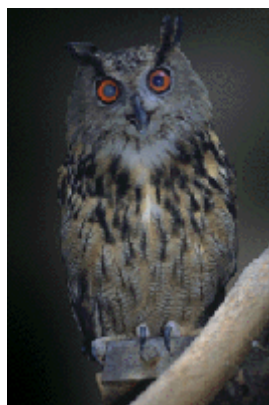
La actual clasificación agrupa a las rapaces nocturnas dentro del orden de las Estrigiformes. El orden se divide a su vez en dos familias: Strigidae, formada por los búhos típicos (siete especies en España) y Tytonidae, formada por las lechuzas (una sola especie en España). Las diferencias entre ambas familias son claras y están basadas en diferentes caracteres anatómicos.

1.2.- EL BÚHO REAL (*Bubo bubo*)

1.2.1.- Descripción

Es la mayor de las rapaces nocturnas ibéricas, con una altura de 60-70 cm y 1,5-2,5 Kg. de peso, posee una envergadura de 180 cm. Presentan cierto dimorfismo sexual, siendo las hembras algo más grandes que los machos. Destacan sus ojos naranjas y la presencia de grandes penachos. Plumaje de tonos marrones.

Poseen tarsos y dedos emplumados, y tanto el pico como las uñas son de color negro. El plumón que recubre a los pollos es blancuzco en una primera etapa, pasando luego a gris-pardo.



Se han descrito dos subespecies en Europa:

- *Bubo bubo*: en toda Europa hasta los Pirineos.
- *Bubo bubo hispanicus*: en la Península Ibérica.

1.2.2.- Hábitat y distribución

Su hábitat típico se encuentra en roquedos, riscos, barrancos, cortados fluviales, etc. en los que busca una pequeña oquedad para realizar la puesta, aunque frecuentemente cría en lugares mucho más accesibles como en el suelo, al pie de un árbol.

En la península ibérica habita el búho real *Bubo bubo hispanicus*, de menor tamaño que la subespecie típica, repartida por el resto de Europa. Se distribuye por la práctica totalidad de la península Ibérica, haciéndose más escaso en la franja norte y faltando en las islas.

1.2.3.- Comportamiento

El búho real es fuertemente territorial. El tamaño medio del territorio es muy variable, con seguridad relacionado con la densidad de presas, aunque siempre abarca varios kilómetros. El marcaje del territorio lo realizan emitiendo su canto desde los posaderos que lo delimitan.

Suelen formar parejas estables que se mantienen unidas durante todo el año.

1.2.4.- Alimentación

Es un superpredador, capturando gran variedad de presas, dependiendo de la abundancia y accesibilidad de éstas. En la

Península, esta rapaz está muy asociada al conejo aunque allí donde éste falte, puede ser sustituido por otros mamíferos más abundantes como topillos o ratas. También captura aves de mediano tamaño (incluidas otras rapaces): serpientes, lagartos, ranas, peces, cangrejos y escarabajos.

1.2.5.- Reproducción

El cortejo y marcaje del territorio comienza aproximadamente en noviembre-diciembre, prolongándose los cantos hasta poco entrado el año. No construyen un nido propiamente dicho, poniendo en febrero-abril normalmente 3 huevos con diferencias de 2 a 4 días entre ellos. Los pollos abandonan el nido a los 28-35 días, sin poder volar aún, y los progenitores continúan alimentándolos durante algún tiempo. A los 60 días ya vuelan.

1.3.- EL OJO DE LAS AVES

1.3.1.- Rasgos generales que caracterizan el ojo de las aves

La visión es la vía sensorial primaria y la más desarrollada en las aves. El tamaño de los ojos es proporcionalmente muy grande con respecto al cuerpo. El globo ocular ocupa la cavidad óptica casi en su totalidad, por lo que el movimiento del ojo es limitado o, como en el caso de los búhos, nulo. Esta falta de movilidad queda compensada por

una gran flexibilidad del cuello, un búho gira la cabeza casi en círculo completo.

El globo ocular está protegido por dos párpados (superior e inferior) y por la membrana nictitante, que es el tercer párpado, transparente que limpia y protege el ojo y del que carecen la mayoría de los mamíferos. El ave parpadea desplazando lateralmente esta membrana sobre el ojo; como es transparente no pierde nunca la visión, excepto durante el sueño.

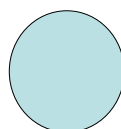


El ojo de las aves tiene tres formas características:

a) plana: “flan”, representa a la mayoría de las aves, su eje horizontal es menor que el vertical.



b) globular: común en la mayoría de las falconiformes, los dos ejes son similares en longitud.



c) tubular: propia de los búhos y algunas águilas (Accipitidae) (Walls, 1942), el eje horizontal es mayor que el eje vertical.

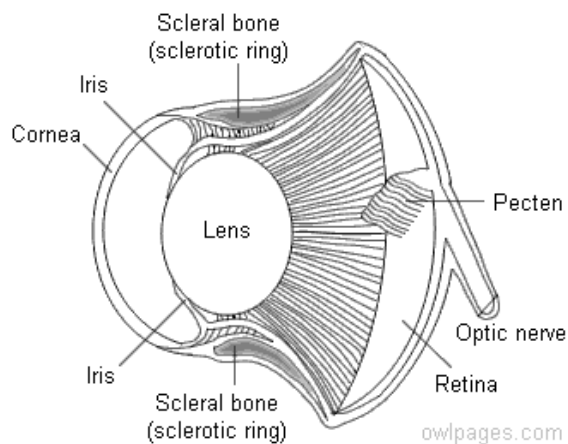


Las especies que tienen una gran necesidad de agudeza visual (algunas paseriformes y la mayoría de las falconiformes) tienen ojos en los que la relación de la longitud del eje vertical y horizontal es próxima a la unidad; así se produce en la forma globular. El efecto de este hecho es que la imagen que llegue a la retina será mayor mientras mayor sea el eje ocular (incrementando la agudeza visual). Walls (1942) comprobó que los animales que viajan a gran velocidad (falconiformes) tienen incrementada la agudeza visual para detectar pequeños movimientos y evitar colisiones; en contraste, los búhos, que tienen actividad nocturna o crepuscular, dependen no tanto de la agudeza visual como del incremento de la sensibilidad óptica.

1.3.2.- Anatomía del ojo de las aves

En términos generales se puede dividir el ojo en la parte anterior, formada por la córnea y cristalino, y la parte posterior o cuerpo restante. Las dos partes están englobadas por un anillo óseo

(anillo esclerótico). Adherido a este anillo se disponen los músculos de Crampton y Brucke que ayudan en el enfoque del ojo.



1.3.2.1.- Córnea, cristalino e iris

En las aves, tanto la córnea como el cristalino cambian su curvatura para enfocar. Cuando los músculos de Crampton se contraen aumenta la curvatura de la córnea y, por ende su poder refractivo, de hecho la córnea es la estructura de mayor poder de refracción en el ojo de las aves (Blackwell, 2002).

El cristalino, aunque juega un papel en la refracción, actúa como un ajuste fino durante la acomodación controlando por los músculos de Brucke.

En el interior de la cámara anterior se encuentra el humor acuoso, un líquido claro de baja presión osmótica.

La forma de la pupila es redondeada en casi todas las aves. En los búhos en el estroma del iris se encuentran células pigmentadas con

gotas de grasa de pigmento amarillo que le confiere a éstos un color característico amarillo (Lynn, 1981).



1.3.2.2.- Pecten

El pecten consiste en una placa con 8 a 10 prolongaciones que adoptan la forma de un peine, cerca del nervio óptico. Cada prolongación tiene numerosos vasos capilares, nutrientes, vesículas de desecho y numerosos melanocitos pleomórficos. La teoría más aceptada sobre la función del pecten es que provee de nutrientes y oxígeno al ojo, así como recoger desperdicios metabólicos (Smith y col., 1996). A diferencia de los mamíferos, la retina de las aves es avascular y se cree que el pecten interfiere menos con las funciones visuales que una red de capilares en la retina.

1.3.2.3.- La retina de las aves

La retina de las aves es una fina lámina de tejido nervioso que tapiza el interior 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 sistema nervioso central (SNC), que se desarrolla a partir de una porción del prosencéfalo y que posteriormente se diferencia en el diencéfalo 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 externo permanece con una sola capa de células y va a constituir el epitelio pigmentario de la retina. Éste 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.

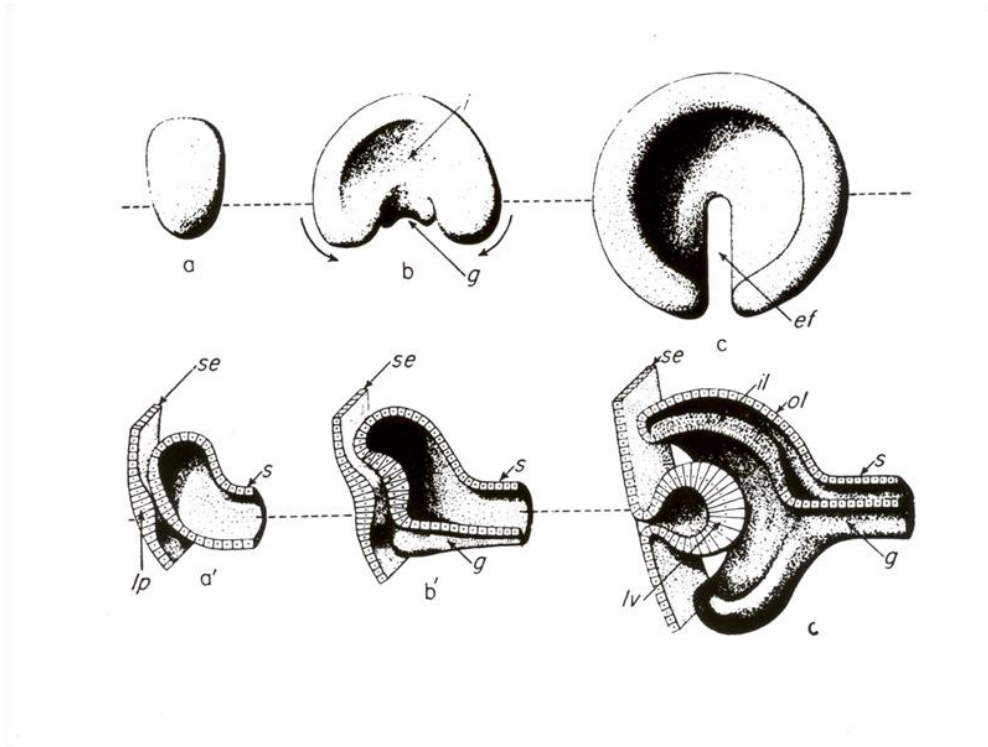


Figura 1: Formación de la cúpula óptica (a, b, c). Sección transversal de una reconstrucción tridimensional de la copa óptica (a', b', c') mostrando la capa interna (il) que formará la retina neural, y la externa (ol) que formará la retina pigmentaria. El espacio ventricular (v), situado entre ambas capas, se convertirá en un espacio virtual, el espacio subretinial; lv: vesícula del cristalino; s: tallo óptico; se: superficie del ectodermo. (Adaptado por Rodeck, 1973, de Walls, 1942).

El epitelio interno de la copa 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 gliales (Figura 2).

La superficie interna de la retina linda con la membrana hialoidea del cuerpo vítreo. Por detrás, se continúa con el nervio óptico que sale desde el disco óptico hacia el encéfalo. La retina disminuye gradualmente su grosor desde el disco óptico hasta llegar a su extremo más fino, el cuerpo ciliar, cuyo borde presenta la ora serrata.

La complejidad neural de la retina y la organización sináptica que alcanzan sus células hacen que a esta estructura se la pueda considerar como un modelo especializado de la corteza cerebral que está dedicado a la detección, análisis y procesamiento de la información visual. La estructura anatómica del globo ocular permite que los estímulos visuales puedan ser recepcionados por las células fotorreceptoras de la retina de una manera óptima.

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. La retina está formada por diferentes tejidos. Uno de ellos está

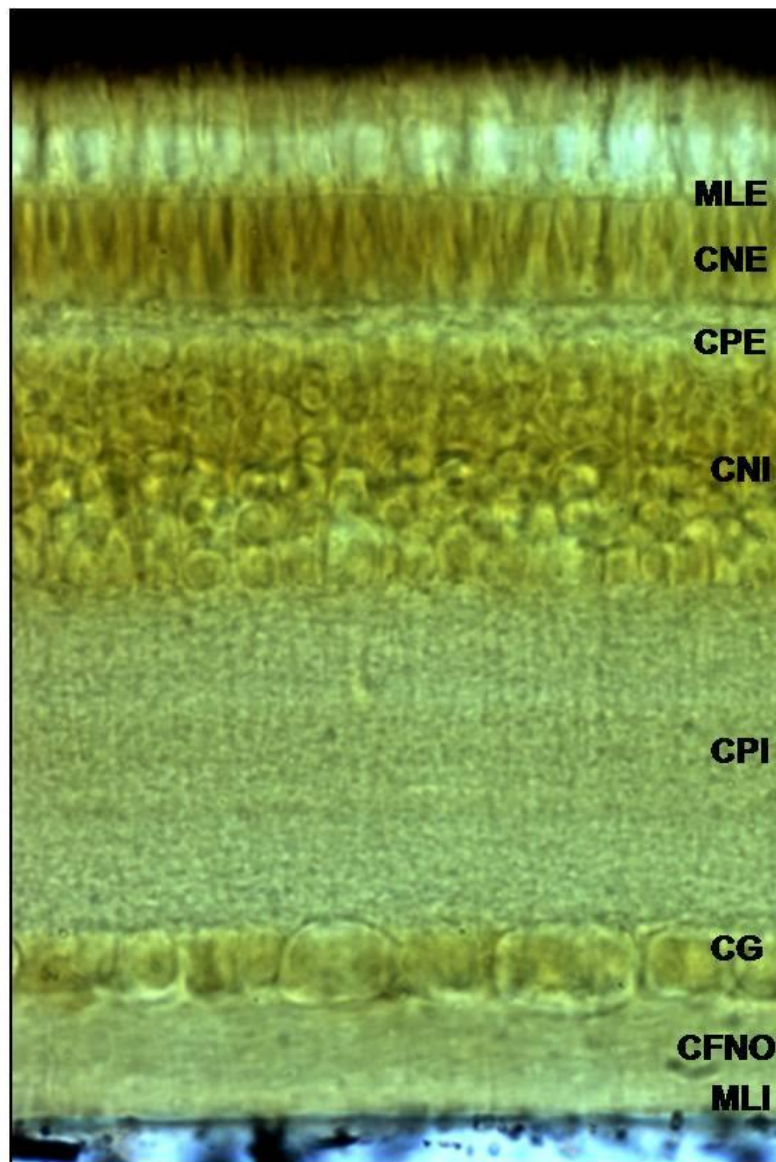


Figura 2: Sección vertical de retina central de pollo postnatal observada con técnica de Nomarski. **MLE:** Membrana limitante externa. **CNE:** Capa nuclear externa. **CPE:** Capa plexiforme externa. **CNI:** Capa nuclear interna. **CPI:** Capa plexiforme interna. **CG:** Capa ganglionar. **CFNO:** Capa de fibras del nervio óptico. **MLI:** Membrana limitante interna.

constituido por células neuroepiteliales de forma columnar que se disponen en monocapa, denominada “retina pigmentaria”, y el otro, constituido por neuronas y células gliales que se denomina “retina

neural”. La característica principal de la retina neural es su organización en capas que cubren aproximadamente los dos tercios interiores del globo ocular (Figura 2).

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

En la retina neural se distinguen seis capas, 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 sinápticas denominadas capas plexiformes, y por último, la capa de fibras del nervio óptico. Estas seis capas clásicamente descritas son:

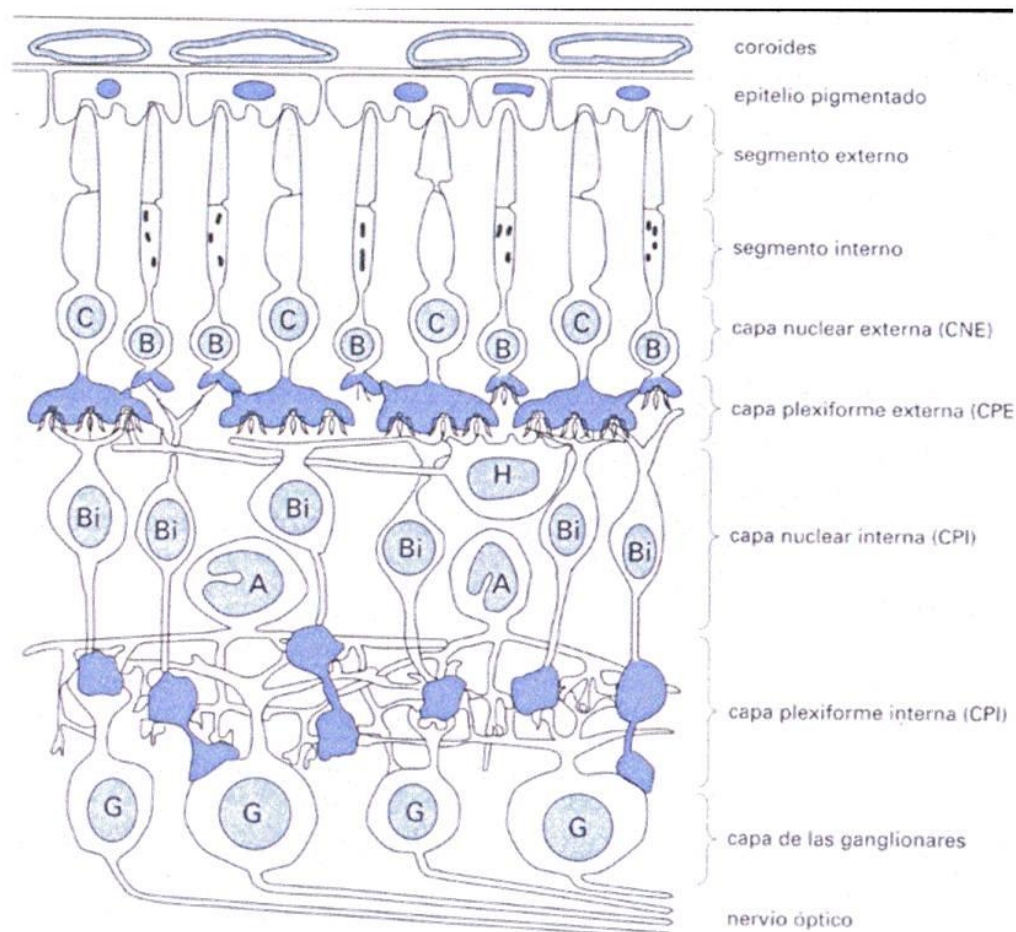


Figura 3: Esquema de la retina del macaco. **C:** conos, **B:** bastones, **Bi:** células bipolares, **H:** células horizontales, **A:** células amacrinas, **G:** células ganglionares. (Modificado de Dowling, J. E. y Boycott, B.B., 1966).

1.- **Capa nuclear externa (CNE).** En ellas se sitúan los somas de los fotorreceptores, conos y bastones (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 dos tercios más externos de esta capa los ocupan los somas de las células bipolares y de Müller, mientras que las células amacrinas, interplexiformes, y ganglionares desplazadas se sitúan en el tercio más interno (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. Éstos están orientados hacia la salida del nervio óptico

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

Esta citoarquitectura se complementa con 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 externos de los fotorreceptores, el microvilli de las células de Müller y las prolongaciones externas 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 y se encuentra separada del humor vítreo por una lámina basal. La célula de Müller es la única célula retiniana que ocupa todas las capas de la retina, desde la MLE hasta la MLI.

1.3.2.3.A.- Neuronas de transmisión vertical

En las aves el número de los fotorreceptores es muy superior al de las neuronas de transmisión (las células bipolares y las células

ganglionares). Se estima que, en mamíferos, existen alrededor de ciento treinta millones de fotorreceptores y alrededor de un millón de células ganglionares por retina, cuyos axones forman el nervio óptico.

1.3.2.3.A1.- Fotorreceptores

Las células fotorreceptoras de la retina constan de un cuerpo celular, una prolongación fotosensible externa y un axón que conecta con las neuronas de la retina (Figura 4).

En un principio fueron estudiadas por Ramón y Cajal (1892) quién las dividió en dos tipos morfológicos distintos: los conos y los bastones.

Los bastones localizan su núcleo en el estrato más interno de la capa nuclear externa. Sus procesos ascendente y descendente, parten de cada uno de los polos del pericario, siendo ambos bastante gruesos. El proceso ascendente se remonta hasta la limitante externa, encima de la cual se engruesa para formar el bastoncito, y el proceso descendente baja hasta la capa plexiforme externa y finaliza en una superficie aplanada, de la que emergen de sus bordes, finos filamentos

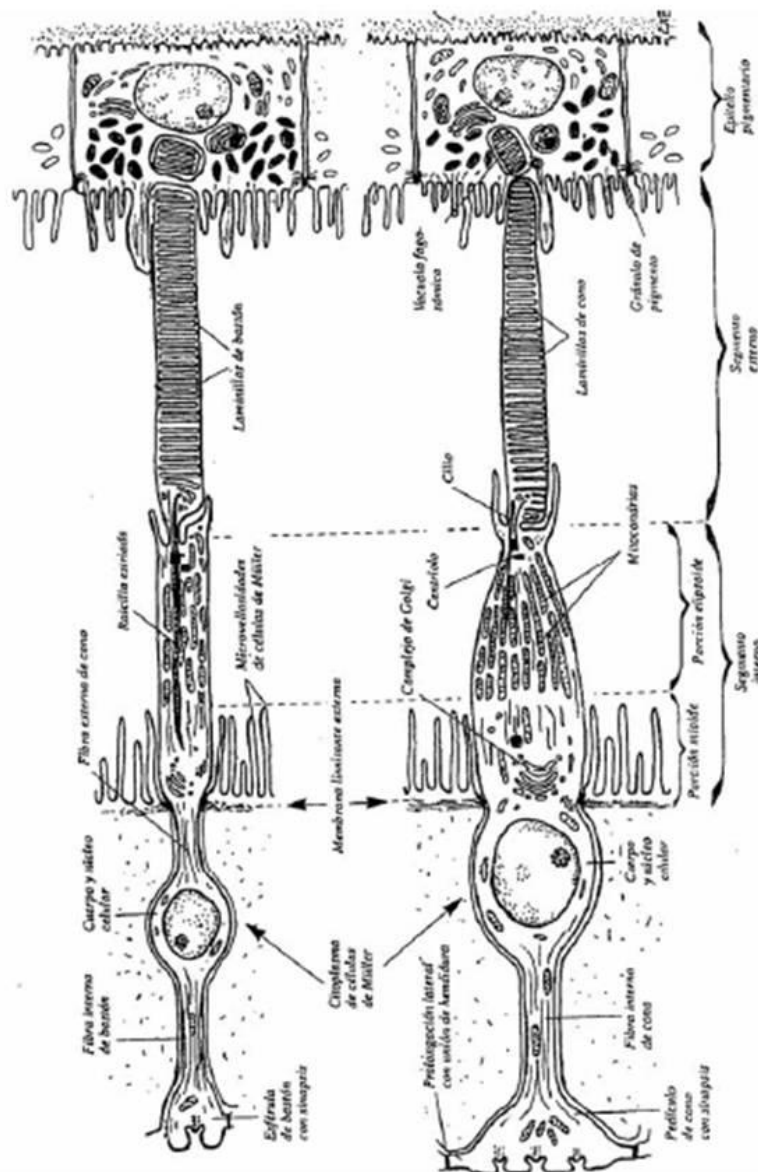


Figura 4: Esquema que representa los principales rasgos de (A) un bastón de la retina, y (B) un cono. Obsérvese que el tamaño relativo de las células epiteliales pigmentarias ha sido exagerado con fines descriptivos. (Esquema tomado de Gray).

laterales, que se distribuyen por el estrato más externo de la capa plexiforme externa.

Los conos están diferenciados en tres tipos morfológicos:

- Conos rectos: se localizan, en las aves, inmediatamente por debajo de la membrana limitante externa. Tienen forma ovoidea y poseen un apéndice descendente que termina en el estrato medio de la capa plexiforme externa, en un engrosamiento cuya base se adorna con filamentos horizontales que ocasionalmente regresan hacia arriba.
- Conos oblicuos: se caracterizan porque su apéndice descendente se inclina más y más durante su trayecto, de tal manera, que al alcanzar la capa plexiforme externa están casi siempre en posición horizontal y vienen a terminar en el estrato más interno de esta capa, en un engrosamiento del que surgen numerosas ramas que terminan en forma de pequeños botones. Ramón y Cajal (1892) describe también otros conos cuyos engrosamientos termina en el otro estrato de la capa plexiforme externa y es curioso el hecho de que los filamentos basilares de estos conos asciendan y se distribuyan en el mismo estrato que los procedentes de otros conos.
- Conos dobles: son, a pesar de estar unidos, dos células individuales. El mayor presenta una indentación en la que el más pequeño está parcialmente alojado; sus apéndices descendentes son de distinta longitud, llegando el procedente

del cono más grande a alcanzar el estrato inferior de la capa plexiforme externa, y el procedente del menor, solo alcanza el estrato superior o medio de esta capa; ambos terminan en un engrosamiento del que parten cortas y finas prolongaciones que se distribuyen en los correspondientes estratos de la capa plexiforme externa.

Como acabamos de referir, los conos y bastones se diferencian estructuralmente por su forma, y funcionalmente por su sensibilidad a distintos tipos de luz.

Los bastones predominan en animales de hábito nocturno: son más sensibles a bajas intensidades de luz. En el hombre y en animales de actividad diurna, aseguran la visión nocturna y ayudan a la orientación visual, mientras que los conos son más predominantes.

Los conos son responsables de la visión en detalle, así como de la percepción del color. En general los conos dominan sobre los bastones en cuanto a concentración por unidad de retina. A mayor número de conos, más detallada es la imagen generada. Los conos se concentran en dos sitios especialmente: primero, en la fovea, con ausencia total de bastones, y segundo, en la mácula lútea que está situada alrededor de la fovea, zona denominada como parafovea.

En ambos tipos de fotorreceptores se pueden distinguir tres partes morfológicas:

- segmento externo, localizado en la superficie más externa o distal de la retina y especializado en la fotoconversión
- segmento interno, localizado en la zona más proximal de la retina y en el que se encuentra el núcleo de la célula y la mayor parte de su maquinaria de biosíntesis y
- terminal sináptico, que establece contacto con la célula objeto de la acción de los fotorreceptores y donde se encuentran los pedículos y las esférulas.

Los fotorreceptores establecen conexiones sinápticas en la capa plexiforme externa de la retina con las células bipolares y horizontales (Figura 5).

1.3.2.3.A2.- Células bipolares

Las células bipolares se disponen al igual que los fotorreceptores, de manera radial. Tienen forma bipolar y en ella se distinguen a partir de los cuerpos de las células, dos prolongaciones: una externa, que alcanza la capa plexiforme externa, donde se ramifica en distintas dendritas que sinaptan con los fotorreceptores y con las células horizontales. La prolongación interna representa el axón de la célula, se origina del cuerpo y se dirige hasta la capa plexiforme

interna donde se ramifica en numerosas expansiones tangenciales que sinaptan con las células ganglionares y amacrinas (Figura 5).

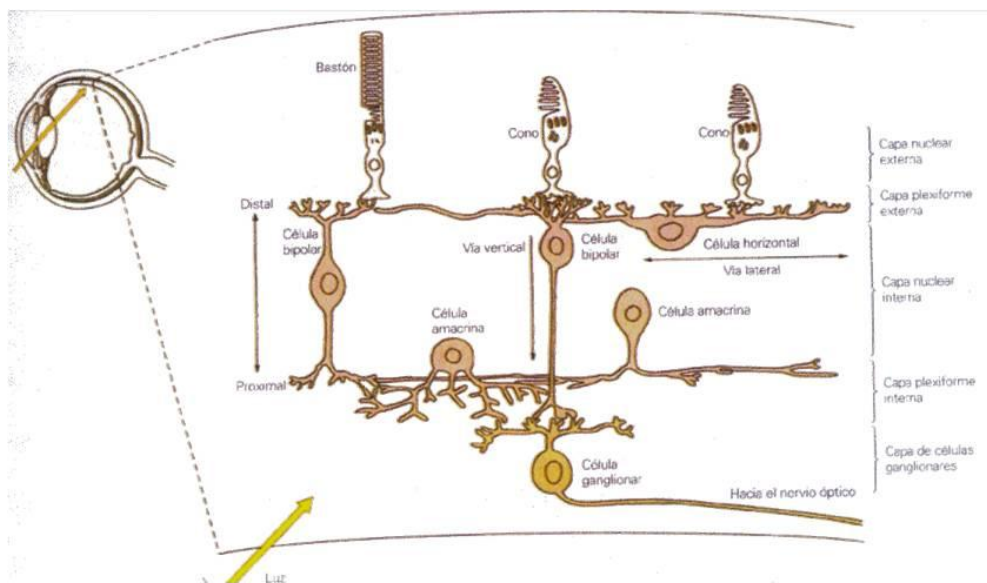


Figura 5: Los fotorreceptores, las células bipolares y las células horizontales establecen conexiones sinápticas entre sí en la capa plexiforme externa, mientras que las células bipolares, amacrinas y ganglionares lo hacen en la capa plexiforme interna. La información fluye verticalmente desde los fotorreceptores a las células bipolares y desde éstas a las células ganglionares, y lateralmente a través de las células horizontales en la capa plexiforme externa y de las células amacrinas en la capa plexiforme interna. (Adaptado de Dowling, 1979)

Los estudios morfológicos de las células bipolares se iniciaron con los trabajos de Dogiel (1888) que fueron seguidos de los de Ramón y Cajal (1892) quien clasifica en dos tipos: las células

bipolares gigantes o externas, localizadas bajo la capa plexiforme externa y las células bipolares pequeñas o internas que vienen a ocupar la parte más interna de la capa nuclear interna. En la mayoría de los vertebrados, existen de ocho a diez tipos de células bipolares según su morfología (Boycott y Dowling, 1969; Dowling, 1970; Quesada y Génis- Gávez, 1981, 1985; Quesada y col., 1988a, b). Como ocurre en el resto de células nerviosas en la retina (horizontales, amacrinas, interplexiformes y ganglionares), no se ha podido establecer una relación morfofuncional completa para cada tipo. Por ello, se suelen estudiar agrupándolas según su conectividad con los fotorreceptores en dos puntos: células bipolares para cono y células bipolares para bastones. La mayoría de las células bipolares son excitadoras y utilizan el glutamato como neurotransmisor (Kalloniatis y Fletcher, 1993).

1.3.2.3.A3.- Células ganglionares

Las células ganglionares representan la vía de salida de la retina: reciben la información de las células bipolares y amacrinas, convierten estas señales en potenciales de acción y las transmiten a través del nervio óptico (Figura 5), que se constituye por los axones de las células ganglionares, al núcleo geniculado lateral del tálamo como estación intermedial del procesamiento de la información visual y de allí, a la corteza visual occipital con proyecciones de axones al área

pretectal, al tubérculo cuadrigémino superior del mesencéfalo, al núcleo pulvinar del tálamo y al sistema óptico accesorio.

A diferencia de las células fotorreceptoras, que responden a la luz de una manera graduada en los cambios de los potenciales de membrana, las células ganglionares traducen la información en series de potenciales de acción.

Morfológicamente, Ramón y Cajal (1892) estableció dos tipos, según sus ramificaciones dendríticas, las células ganglionares difusas y células ganglionares estratificadas. Además de estos dos tipos clásicamente descritos, en la mayoría de los vertebrados, existe un tipo de célula ganglionar que posiciona su pericario en los niveles más internos de la capa nuclear interna; por lo que se llamó célula ganglionar desplazada o de Dogiel (Dogiel, 1988; Ramón y Cajal 1892; Prada y col., 1989).

1.3.2.3.B.- Neuronas de asociación o interneuronas

Las neuronas de asociación, también llamadas interneuronas, son, en la retina, las células horizontales, amacrinas e interplexiformes.

1.3.2.3.B1.- Células horizontales

Las células horizontales reciben información de los fotorreceptores de ambos tipos, y a su vez contactan con las células bipolares (Figura 5). Se trata de células inhibitorias que utilizan el

ácido γ -aminobutírico (GABA) como neurotransmisor. Estas células parecen estar involucradas funcionalmente en la percepción del contraste, incrementando la resolución visual. Los pericarios se sitúan en la capa nuclear interna, en la línea más externa, cerca de la capa plexiforme externa. Las prolongaciones llegan a dicha capa plexiforme externa donde sinaptan con las esférulas de los bastones y con los pedículos de los conos. Ramón y Cajal (1892) describió dos tipos morfológicamente distintos: la célula horizontal en brocha y la célula horizontal estrellada. Gallego (1971; 1975; 1976) las clasifica como tipo I, siendo ésta el único tipo de célula horizontal que tiene axón y que coincide con la célula en brocha de Ramón y Cajal (1892) y Mariani y Leure du Preé (1977) y tipo II. Posteriormente Génis-Gálves y col., (1979) describe un nuevo tipo de célula horizontal a la que denomina “en candelabro”. Prada y col., (1984) señala la existencia de una célula horizontal desplazada que se localiza a nivel interno de la capa nuclear interna, extendiendo sus ramificaciones hacia la capa plexiforme interna.

1.3.2.3.B2.- Células amacrinas

Las células amacrinas están dispuestas en el tercio interno de la capa nuclear interna y emiten prolongaciones en dirección de la capa plexiforme interna, donde contactan con las células bipolares y/o las

prolongaciones de otras células amacrinas. Establecen contactos exclusivamente en la capa plexiforme interna (Figura 5)

Estas neuronas fueron llamadas “amacrinas” porque carecen de un axón. Sus prolongaciones parecen dendritas, aunque aparentemente presentan características citoplasmáticas tanto de axones como de dendritas: dependiendo de las sinapsis activas, la propagación de la conducción va en una dirección o en otra. Sus prolongaciones contienen grandes cantidades de vesículas sinápticas que constituyen puntos de contactos sinápticos con los axones de las células bipolares y las dendritas de las células ganglionares.

Las células amacrinas se dividen en varios subtipos que se distinguen, fundamentalmente, según criterios morfológicos y funcionales (se han encontrado cinco neurotransmisores y ocho neuropéptidos distintos). La mayoría de las células amacrinas son inhibitorias y usan el GABA o glicina como neurotransmisor, mientras que las células amacrinas excitadoras utilizan acetilcolina. Ramón y Cajal (1892) diferenció en ellas tres tipos morfológicamente distintos.

1.3.2.3.B3.- Células interplexiformes

Como indica su nombre, conectan las dos capas plexiformes externa e interna. Igual que las células amacrinas, se disponen a lo largo del borde interno de la capa nuclear interna. Emiten

prolongaciones hacia la capa plexiforme interna donde reciben la información desde las células amacrinas. La mayoría de la información de salida la reciben de las células horizontales y células bipolares de la capa plexiforme externa (Dowling y Ehinger, 1978). Además, envían prolongaciones en dirección a la capa de los fotorreceptores donde sinaptan con las esférulas y los pedículos de las células fotorreceptoras. Se trata de células dopaminérgicas (Negishi y Drujan, 1978; Gerschenfeld y col., 1982; Cohen y Dowling, 1983; Teranishi y col., 1985; O'Connor y col., 1987), y se ha demostrado en varias especies, incluido en la carpa, que la dopamina reduce la sensibilidad de la luz de las células horizontales (Hedden y Dowling, 1978) disminuyendo la inhibición periférica mediada por las células horizontales (Neyton y col., 1982; Lasater y Dowling, 1985); Teranishi y col., 1985). Las células interplexiformes en el camaleón han sido clasificadas en dos tipos diferentes, tipo I y tipo II (Quesada y Génis-Gálvez, 1983). El tipo I se encuentra principalmente en la parte central de la retina, mientras que el tipo II está localizado solamente en la parte periférica de la retina.

1.3.2.3.C.- Glía retiniana

En la retina de la mayoría de las aves se encuentran todos los tipos de células gliales que también están presentes en el resto del sistema nervioso central.

Las células gliales tienen características morfológicas, funcionales y metabólicas que las distinguen claramente de las neuronas:

- no generan ni conducen potenciales de acción, y aunque tengan prolongaciones, no son ni axones ni dendritas;
- no forman sinapsis químicas ni con ellas mismas, ni con neuronas ni con ninguna otra célula;
- mantienen la capacidad de división celular.

Clásicamente se divide la glía del sistema nervioso central en dos grupos: la microglía y la macroglía. La microglía fue descrita por primera vez por Río-Hortega (1919), y deriva de precursores de la médula ósea que migran al sistema nervioso central durante el desarrollo, con lo cual tienen un origen mesodermico. La macroglía es de origen ectodérmico, al igual que el resto de las células del sistema nervioso central, e incluye a los astrocitos, oligodendrocitos y a la glía radial (Figura 6).

1.3.2.3.C1.- La microglía

La microglía, descrita por primera vez por Río-Hortega (1919), está formada por varias poblaciones celulares con diferentes morfologías que tienen función fagocítica, por lo que se las considera parte del sistema retículo-endotelial. Aunque su origen ha sido muy discutido (Theele y Streit, 1993), Río-Hortega ya apuntó que las células podrían originarse de monocitos sanguíneos. En la actualidad se ha comprobado que las células microgliares derivan de precursores de la médula ósea que migran al sistema nervioso central durante el desarrollo y en respuesta a diversas lesiones (Wolter, 1956; Boya y col., 1986; 1987; 1991; Jordan y Thomas, 1988; Leong y Ling, 1992; Ling y Wong, 1993; Sievers y col., 1994). Se establecen en la retina durante el desarrollo (Hume y col., 1983; Ashwell, 1989) y son capaces de migrar hacia zonas lesionadas donde hay muerte celular (Thanos, 1992).

Las células de la microglía fagocitan los cuerpos apoptóticos y por lo tanto tienen como función limpiar el tejido de células muertas durante el desarrollo embrionario. Si bien esta función está claramente demostrada en la retina de las aves (Marín-Teva y col., 1998), su papel en el crecimiento de las neuritas es sólo una hipótesis que no ha sido totalmente demostrada.

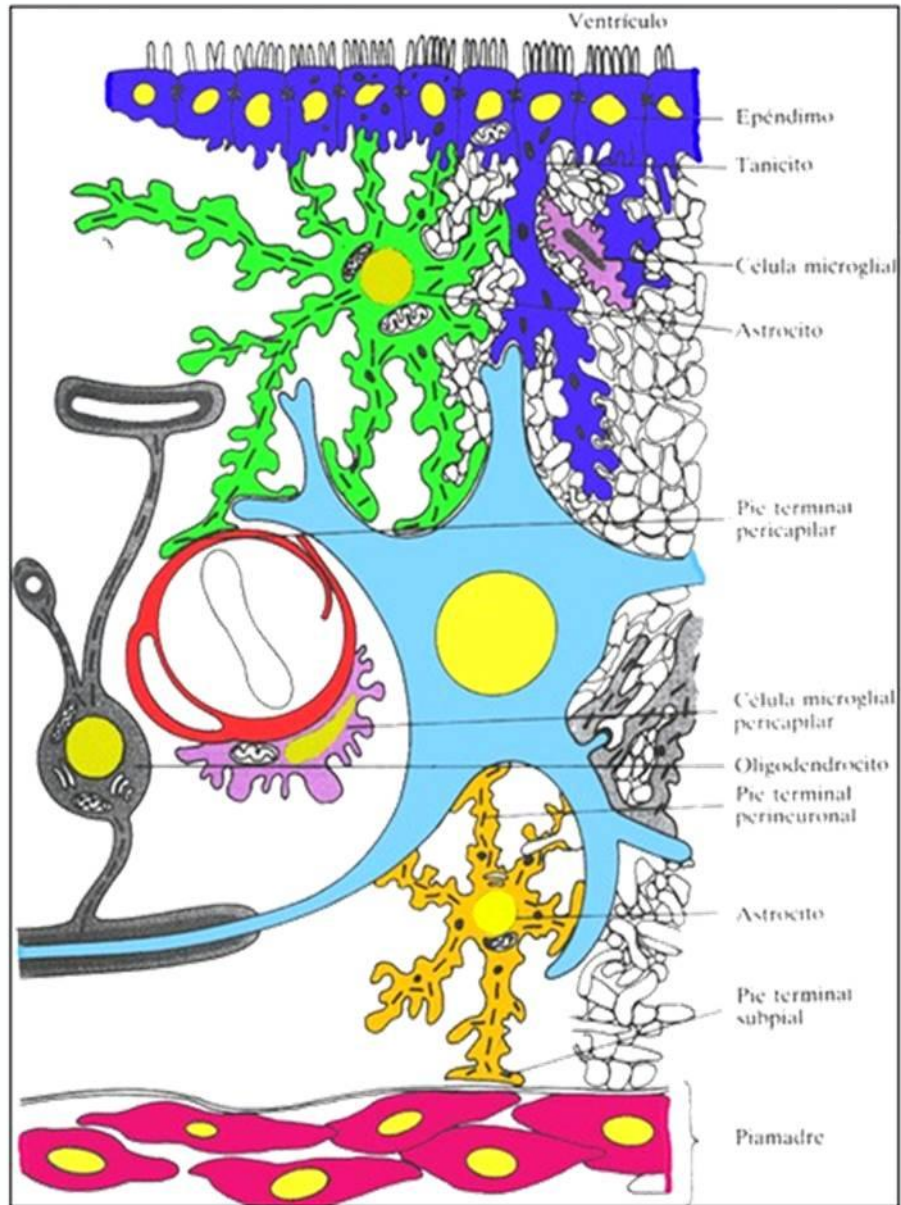


Figura 6: Tipos de células gliales en el S.N.C. (Tomado de Willians y Warwick, 1975. Dibujo efectuado por R.E.M. Moore).

1.3.2.3.C2.- La macroglía

La macroglía incluye a los astrocitos y a los oligodendrocitos, ambos de origen ectodérmico como el resto de las

células del sistema nervioso central. Los astrocitos son células de aspecto estrellado con somas pequeños e irregulares y numerosas prolongaciones. En base a su morfología se dividen en fibrosos, que se sitúan en la sustancia blanca, y protoplásmicos, que se encuentran en la sustancia gris.

Los astrocitos retinianos no derivan del epitelio germinal de la retina, sino que invaden ésta desde el disco óptico junto con los vasos que entran en la retina, para después emigrar y extenderse por las capas más internas (Watanabe y Raff, 1988).

La astrogliá de la retina fue descrita por Ramón y Cajal (1892). En las retinas 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 capa de fibras del nervio óptico 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 pueden variar en respuesta a distintas lesiones de la capa de fibras del nervio óptico (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).

Los oligodendrocitos son pequeñas células con menos prolongaciones que los astrocitos. Se encuentran en el sistema nervioso central mielinizando los axones de las neuronas. También se incluyen dentro de la clasificación de oligodendrocitos a las células satélites que rodean a los somas de algunas neuronas (Río-Hortega, 1919).

En la parte mielinizada de la retina del conejo se ha descrito además la existencia de oligodendroglía (Berliner, 1931; Schnitzer, 1988; Robinson y col., 1993; Ehinger y col., 1994), hecho que no ha sido señalado en las retinas de otras especies. En la retina del pollo hay trabajos que señalan la existencia de un pequeño número de células gliales cuyos somas se sitúan en la capa de células ganglionares (Ehrlich, 1981) y que son aproximadamente el cinco por ciento del total de células en esa capa. Esta población estaría formada mayoritariamente por oligodendrocitos que se forman tras la salida del ciclo celular de todas las neuronas y de las células de Müller y cuyos precursores proliferan extraventricularmente.

1.3.2.3.C3.- Las células de Müller

Las retinas de los vertebrados tienen un tipo especial de glía radial denominada Célula de Müller (Müller, 1851; Ramón y Cajal, 1892). Se extiende a lo largo de toda la retina, desde la membrana limitante externa a la membrana limitante interna, disponiéndose más o menos paralelamente unas a otras (Fig. 7).

Estas células se distribuyen por toda la retina, aunque no siempre con la misma densidad (Reinchenbach y col., 1995). Se trata de una célula glial especial capaz de desarrollar las funciones y comportarse como astrocitos (Polyak, 1941, Magalhães y Coimbra 1973; Holländer y col., 1991), oligodendrocitos (Rhodes, 1984; Steffenson y col., 1984; Prada y col., 1989a), ependimocitos y también puede desempeñar las funciones de microglía (Prada y col., 1989a). Durante el desarrollo embrionario se comporta como una célula glial radial que dirige la migración neuronal y facilita su laminación (Prada y col., 1989a, b; 1998).

Las células de Müller mantienen la estabilidad del entorno extracelular neuronal mediante el transporte iónico, intervienen en la recaptación de neurotransmisores en el espacio intercelular, eliminan residuos, almacenan glucógeno y, finalmente, son responsables del aislamiento eléctrico (Reinchenbach y col., 1992).

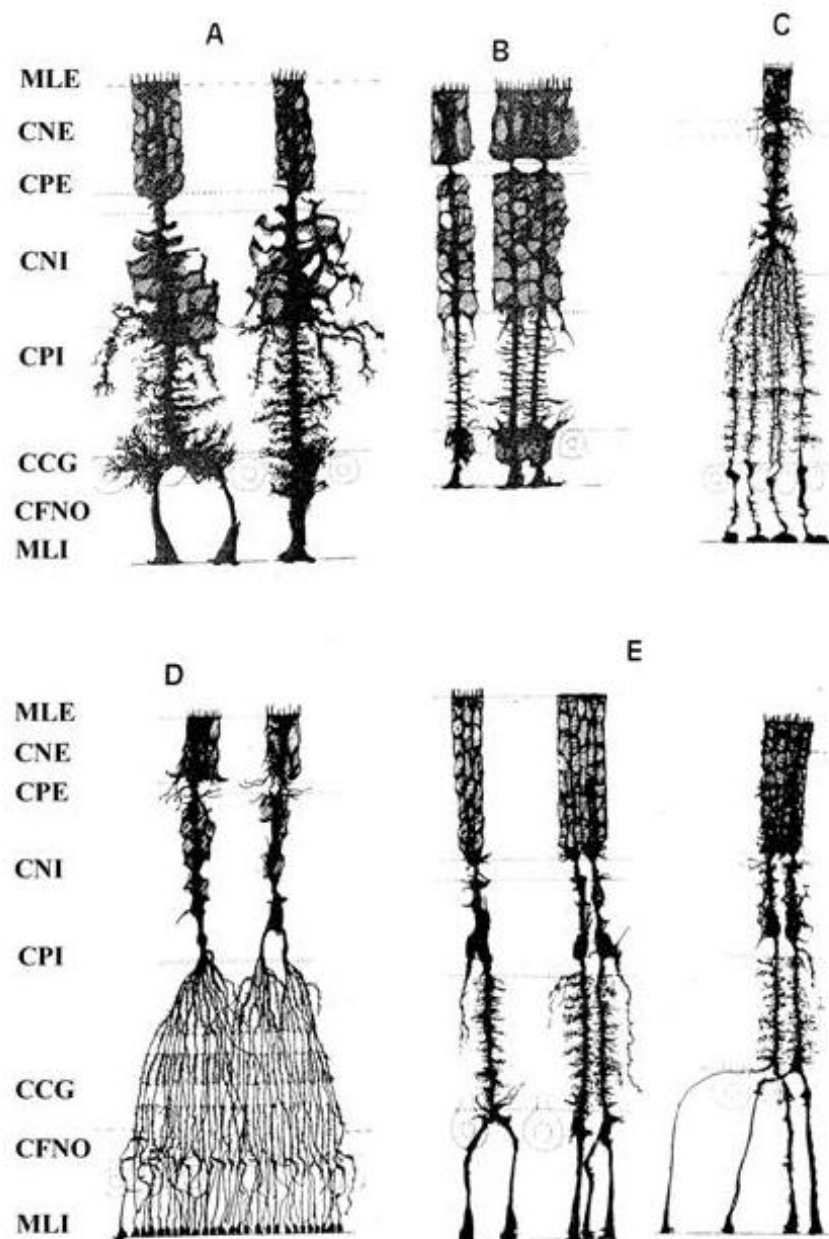


Figura 7. Dibujos de células de Müller de distintas especies de animales vertebrados. **A:** Pez teleosteo (*Cyprinus Carpio*); **B:** anfibio (*Rana esculenta*); **C:** réptil (*Lacerta viridis*); **D:** ave (*Gallus domesticus*); **E:** mamífero (*Bos taurus*). (Tomado de Ramón y Cajal 1892)

1.3.3.- La retina en las aves nocturnas

La retina de las aves nocturnas, presentan la estructura general que hemos comentado anteriormente para las aves en general, sin embargo, presentan algunas características que las diferencian de éstas.

Los fotorreceptores de las aves nocturnas consisten en bastones, conos simples y conos dobles, de manera que la relación en el búho real americano (*Bubo bubo virginianus*) es de 30:1:2 (Braekevelt, 1993), por lo tanto predominan los bastones en relación a los conos, hecho contrario a las aves de hábito diurno dónde los fotorreceptores predominantes son los conos (Morris, 1970; Meyer, 1977). A nivel ultraestructural, el cuerpo paraboloidal rico en glucógeno encontrado en el segmento interno de algunas aves, peces, anfibios y reptiles (Cohen, 1972; Braekevelt, 1989) no está presente en estas aves; el segmento interno de los conos de estas especies es rico en glucógeno pero está ampliamente disperso por el mismo y está totalmente ausente en los bastones (Braekevelt, 1993). Presentan ausencia de contactos eléctricos entre fotorreceptores adyacentes (Steven, 1985). Como en el caso de otros vertebrados, la membrana limitante externa está compuesta por una serie de zónulas adherentes entre las células de Müller y los tres tipos de fotorreceptores presentes (Uga y Smelser, 1973). También en algunas especies las células de Müller proyectan

procesos vellosos a través de la membrana limitante externa y alrededor de la base de los segmentos externos de los fotorreceptores (Braekevelt, 1990, 1992a, b), en esta misma región los fotorreceptores de muchas aves muestran un número de vellosidades laterales que interdigitan con los procesos de las células de Müller (Crescitellim 1972; Braekevelt, 1990, 1992a, b). Estos procesos laterales están ausentes en las aves de hábito nocturno (Steven, 1985; Braekevelt, 1993).

Presentan dos tipos de células horizontales: células horizontales sin axón, similares a las tipo II de las aves de hábito diurno y, células horizontales de axón corto cuya diferencia principal con la de las aves diurnas es la longitud del axón (Tarrés y col., 1986).

Las células ganglionares tienen mielinización de su axón a nivel de la capa de fibras del nervio óptico (Steven, 1985).

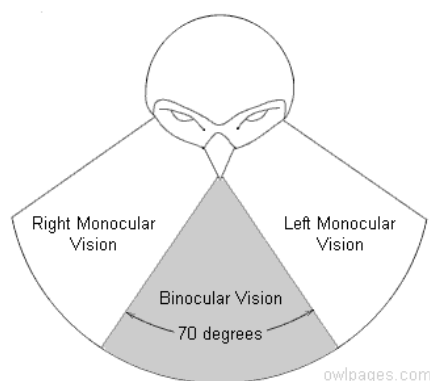
1.3.4.- La visión en las aves

1.3.4.1.-Campo de visión

Los ojos de las aves son capaces de tomar una “instantánea” de gran angular en un campo visual que el hombre necesitaría recorrer lentamente con los suyos. Necesitan esta capacidad por la velocidad con que puede aparecer un peligro o huir una víctima; también desempeña un papel importante en la migración, ya que seguramente

las aves se orientan juzgando la velocidad con que el sol o las estrellas se desplazan por el firmamento. El ángulo visual que regula la extensión del horizonte, que el ave es capaz de percibir de un vistazo, depende de la posición que ocupan los ojos en la cabeza y de la estructura ocular. En las aves de presa, los ojos se localizan hacia la parte anterior, que es la mejor posición para no perder de vista una supuesta víctima. Las especies que se alimentan de granos y semillas, necesitan el mayor campo visual posible y sus ojos se encuentran a los lados de la cabeza. La posición frontal de los ojos amplía el ángulo de visión binocular, formada por la superposición de los campos visuales de ambos ojos. Cada ojo envía al cerebro una imagen ligeramente distinta del mismo objeto y estas se combinan para formar una imagen tridimensional, imprescindible para poder apreciar distancias.

La visión binocular esta mejor desarrollada en los búhos, cuyos ojos dirigidos hacia delante, posee un campo visual total de 110° , pero con una superposición de 70° .



Las aves, con solo un pequeño campo visual binocular, aprecian las distancias moviendo la cabeza para obtener diferentes vistas del objeto. Seguramente esto explica los movimientos de la cabeza de aves como las gallinas o palomas, o la subida y bajada de la cabeza que se observa en muchas limícolas. Sin embargo, resulta más fácil detectar objetos en movimiento con la cabeza quieta y muchas aves son capaces de mantener la cabeza en posición fija a pesar del movimiento del cuerpo.

Los ojos suelen tener muy poca movilidad dentro de sus órbitas, o ninguno en absoluto, como les ocurre a los búhos. Esta falta de movilidad queda compensada por una gran flexibilidad del cuello. Un búho puede girar la cabeza casi en un círculo completo.



1.3.4.2.- Visión cromática

Como hemos comentado en el estudio de la retina los bastones predominan en animales de hábito nocturno: son más sensibles a bajas

intensidades de luz. En el hombre y en animales de actividad diurna, aseguran la visión nocturna y ayudan a la orientación visual, mientras que los conos son más predominantes. Los conos son responsables de la visión en detalle, así como de la percepción del color. En general los conos dominan sobre los bastones en cuanto a concentración por unidad de retina.

En la década de los 70, Huth y Burkhardt (1972), Wriht (1972) y Diez (1972) mostraron que algunas aves y sapos podían ver luz ultravioleta (UV). Desde entonces son muchas las evidencias acumuladas sobre la visión UV en las aves y otros vertebrados (Goldsmith, 1990; Jacobs, 1992; Bennet y Chthill, 1994; Tovee, 1995, Cuthill y col., 2000). Robinson (1994) sugirió que la visión tetracromática, incluyendo el espectro luminoso de la luz UV, es un tipo de visión en color original en los vertebrados terrestres. Tanto es así que al menos 60 especies de aves estudiadas pueden ver la luz UV (Koivula y col., 1999; Cuthill y col., 2000; Probst y col., 2002; Siitari y col., 2002; Ödeen y Hastad, 2003; Hart y Vorobyuev, 2005). Esto significa que la retina contiene al menos cuatro tipos de conos, cada uno con sensibilidad a un pico diferente de longitud de onda. Además, la visión tetracromática en animales vertebrados, también incluye gotas de grasa conectadas a los conos. Estas gotas de grasa filtran la

luz de ciertas longitudes de ondas, las cuales incrementando la saturación del color incrementarán la discriminación y constancia del mismo (Bowmaker, 1980; Jave y Bowmaker, 1988; Vorobyev y col., 1988). Han sido aislados numerosos tipos de gotas de grasa con absorción en distintas partes del rango espectral de 300 a 700 nm (Bowmaker, 1977, Bowmaker y Knowles, 1977; Lythgoe, 1979; Jane y Bowmaker, 1988; Partridge, 1989; Bowmaker y col., 1993). Las gotas de grasa filtran la luz que llega a los conos, su función exacta es desconocida, pero pueden mejorar la longitud de onda y matizar la discriminación afinando los picos de absorción del espectro (Lythgoe, 1979; Jane y Bowmaker, 1988; Prtridge, 1989; Goldsmith, 1991).

Cada tipo particular de cono está asociado con un tipo de gota de grasa (Bowmaker, 1991) y, mediante estudios microespectrofotométricos, se han identificado los conos con sensibilidad a la luz UV. Estos conos siempre poseen gotas de grasa transparentes con una absorción de luz por debajo de 300 nm (Goldmith y col., 1984; Maier, 1994a).

En los búhos, Fite (1973) mediante medidas de la actividad visual, sugirió que el ftopigmento que contienen los conos de estas aves podrian ser idénticos al encontrado en los bastones. Sin embargo, Bowmaker y Martin (1976) mediante estudios microfotométricos

detectaron la presencia de tres pigmentos en los conos del *Strix aluco*, conteniendo la mayoría de sus conos gotas de grasa amarillo claro, y postulan que posiblemente estos conos los posean para poder distinguir los colores cuando vuelan con la luz crepuscular. Este hecho es corroborado por Jacobs y col., (1987) en los estudios realizados en el búho real americano. Por otra parte, Bowmaker y Martin (1978) concluyen que los búhos, en general, carecen de conos para la visión UV.

El hecho de que un ave posea gotas de grasa, test microfotométricos positivos y sea positivo a los estudios con opsina, es decir todas las características ópticas para la visión UV no prueba que la pueda ver (Cuthill y col., 2000, Hart, 2001), son necesarios estudios de conducta. Así, mediante este tipo de estudios ha sido demostrado que muchas aves de hábito diurno tienen la capacidad de ver la luz UV (Emmerton y Remy, 1983; Viitala y col., 1995; Koivula y Viitala., 1999). En contraste, los estudios realizados en *Tengmalm's (Aegolius funereus)*, muestran que éstos no tienen preferencia por arena que emite luz UV sobre la que carecen de esta iluminación (Koivula y col., 1997).

1.4.- MARCADORES NEURONALES Y GLIALES

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

1.4.1.- Expresión del anticuerpo policlonal que reconoce Opsina azul

Como hemos descrito anteriormente en la morfología de la retina de las aves, existen dos tipos básicos de fotorreceptores: bastones y conos.

Los bastones contienen el pigmento visual rodopsina y son sensitivos a la luz azul-verde con un pico de sensibilidad de 500nm de longitud de onda de la luz. Estos fotorreceptores son muy sensitivos y se usan para la visión en condiciones de nocturnidad (baja intensidad de luz).

Los conos contienen opsinas como su pigmento visual y, dependiendo de la estructura exacta de la molécula de opsina, pueden ser: de máxima sensibilidad a altas longitudes de ondas (569,8 nm)

(luz roja); sensibles a longitudes de ondas medias (507,8 nm) (luz verde); sensibles a bajas longitudes de ondas (455,2 nm) (luz azul); y por último sensibles muy bajas longitudes de ondas (418 nm) (luz violeta).

La mayoría de los peces, aves y reptiles con cuatro tipos de conos, unos con sensibilidad máxima en el UV, tienen visión tetracromática. Este es el sistema más evolucionado para tratar el color. Además de los colores que vemos, la luz UV surge como color suplementario. La detección de UV ayuda a la supervivencia. Tanto en el reconocimiento entre individuos de una misma especie como en la parada nupcial; en la alimentación, frutas, plantas y flores que reflejan UV crean formas atractivas de identificar. En la orientación, las radiaciones UV, altamente polarizadas, guían la migración de aves y peces en la naturaleza; y en el camuflaje, dónde el color de la piel o del plumaje se confunden con el entorno natural también lo hacen (Blackwell, 2002).

Conos específicos parecen estar asociado a particulares gotas de grasa (Bowmaker, 1991), y en aquellas especies en las que se han identificado con microfotoespectrometría conos con sensibilidad a la luz UV, estos conos siempre poseen gotas de grasa “transparentes” con un absorción de luz por debajo de 300 nm (Goldsmith y col., 1984;

Maier, 1994a, b). Además los estudios positivos con opsina es una de las características ópticas que se consideran fundamentales para la visión UV (Cuthill y col., 2000, Hart, 2001).

1.4.2.- Expresión del anticuerpo policlonal que reconoce GABA

El ácido γ -aminobutírico (GABA) es un neurotransmisor inhibitorio que fue descrito por primera vez en preparación de tejido cerebral mediante técnicas cromatográficas (Roberts y Frankel, 1950). El GABA se localiza en concentraciones elevadas en amplias zonas del SNC. Recientemente, se ha determinado su acción como modulador neuronal mediante su liberación desde las interneuronas (Roberts, 1986). El GABA se almacena en los terminales nerviosos donde puede estar libre o unido a vesículas sinápticas, pero también puede hallarse en células gliales y durante un tiempo en el espacio extracelular. Puede ser liberado tanto desde las neuronas y desde las glías. En las células gliales no existe evidencia de liberación vesicular, mientras que en las neuronas ésta ocurre desde depósitos localizados en los terminales presinápticos. El GABA es posteriormente recaptado por las mismas terminaciones nerviosas, desde el espacio sináptico o espacios intersticiales, mediante un sistema de transporte específico o

inespecífico. Tras ser captado por las células nerviosas o gliales, el GABA es degradado por las mitocondrias de ambos tipos celulares.

En la última década, numerosos estudios revelan la localización de determinados neurotransmisores para poblaciones y subpoblaciones específicas de neuronas retinianas. De este modo, los fotorreceptores, bipolares, y células ganglionares utilizan el glutamato como neurotransmisor, mientras que las interneuronas como son las células horizontales y amacrinas, utilizan principalmente la glicina y el GABA (Yazulla, 1986; Ehinger y col., 1988; Ehinger, 1989; Marc 1989a, b; Massey, 1990; Davanger y col., 1991).

La localización morfológica de las células GABA-érgicas es muy importante para el análisis de los circuitos inhibidores de las diferentes funciones retinianas. Su localización ha sido en los últimos años bien documentada en la retina de los vertebrados, principalmente en aves, peces y mamíferos (Mosinger y col., 1986; Marc, 1989 b; Pourcho y Owczarzak, 1989; Grunert y Wässle, 1990; Müller y Marc, 1990; Davanger y col., 1991; Kalloniatis y Fletcher, 1993; Quesada y col., 1996).

En el caso de las células horizontales de las retinas de mamíferos éstas no muestran inmunorreactividad para el GABA (Mosinger y col., 1986; Kalloniatis y Fletcher, 1993), con la excepción del gato (Bolz y

Mcguirre, 1985); mientras que en las células horizontales de la retina de los no mamíferos, dichas células sí muestran inmunorreactividad GABA (Mosinger y col., 1986; Kalloniatis y Fletcher, 1993).

1.4.3.- Expresión del anticuerpo monoclonal que reconoce 3BA8

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

1.4.4.- Expresión del anticuerpo monoclonal que reconoce GS

La principal vía para la propagación de la señal visual es la glutamatérgica (Ehinger, 1989; Massey, 1990; Barnstable, 1993). Por lo tanto, el glutamato es el mayor neurotransmisor excitador del SNC.

La localización inmunohistoquímica de las células glutamatérgicas se ha realizado en numerosas estructuras neuronales tales como el hipocampo (Storm-Mathisen y col., 1986), cerebelo (Somogyi y col., 1986) y retina (Ehinger, 1977; Ehinger y col., 1988). Entre la retina de los animales vertebrados es, al igual que en otras estructuras del SNC, el glutamato el neurotransmisor excitador más

utilizado (Miller y Slaughter, 1985; Massey, 1990; Barnstable, 1993).

Estudios inmunohistoquímicos revelan la presencia de glutamato en los fotorreceptores, células bipolares y ganglionares (Brecha, 1983; Massey y Redburn, 1987; Bonventure y col., 1989; Kageyama y Meyer, 1989; Marc y col., 1990; Massey, 1990; Van Haesendonck y Missotten, 1991; Cardoso y col., 1991; Davanger y col., 1991; Crooks y Kolb, 1992; Sherry y Ulshafer, 1992; De Vries y col., 1993, Kalloniatis y Fletcher, 1993).

El glutamato es biosintetizado por transaminación de su cetoácidos correspondientes. Otra fuente importante para la obtención del glutamato es mediante su reciclado; una vez liberado por las neuronas, el glutamato es captado por las células gliales y amidatado a glutamina mediante la acción de la enzima glutamina sintetasa (GS). Esta enzima no sólo actúa como un intermediario metabólico en la transformación de glutamato a glutamina sino que también cumple una importante misión como regulador en el medio de los neurotransmisores glutamato y γ -aminobutírico (GABA). Se sabe que existe una correlación entre la actividad GS y la síntesis del ácido glutámico decarboxilasa (GAD) (Hertz y Schousboe, 1980; Cooper y col., 1983; McGeer y col., 1983), enzima necesaria para la formación de neurotransmisor inhibitor GABA a partir de la glutamina. La

glutamina sintetasa es una enzima que está presente en todos los organismos desde las bacterias hasta el hombre.

La GS se encuentra en el interior de las células gliales y en un principio su presencia pareció estar restringida a los astrocitos del SNC tanto in vivo (Martínez-Hernández y col., 1977; Norenberg, 1979; Norenberg y Martínez-Hernández, 1979; Roots, 1981; Pately col., 1982; Norenberg, 1983; De Vellis et al., 1986 a, b; Mearow y col., 1989) como in vitro (Juurlink y col., 1981). Posteriormente se observó que también existía inmunoreactividad GS en los oligodendrocitos de cultivos de cerebros de rata (Warring y col., 1988), así como en las distintas partes del SNC, tales como cerebro, cerebelo, tronco del encéfalo y médula (D'Amelio y col., 1990; Cammer, 1990).

En la retina la GS se expresa en las células de Müller (Riepe y Norenberg, 1977; Linser y Moscona, 1979; Moscona y col., 1980; Norenberg y col., 1980; Linser y Moscona, 1983; Pow y col., 1993).

Prada y col. (1998) estudia la actividad de la GS durante el desarrollo de las células de Müller en la retina de pollo, analizando los patrones de inmunorreacción del anticuerpo específico contra la GS. En este estudio, se observa inmunotinción GS no sólo en la célula de Müller, sino también en células posiblemente gliales ubicadas en la capa de células ganglionares y en la capa de fibras del nervio óptico.

1.4.5.- Expresión del anticuerpo monoclonal 3CB2

Una investigación básica realizada en los años 90 (Prada y col., 1995), dio a conocer la existencia de un antígeno reconocido por el anticuerpo monoclonal 3CB2, el cual se expresa exclusivamente en células en ciclo, astrocitos y glía radial en todo el SNC y en distintas especies de vertebrados. Por añadidura, dicho antígeno no se expresa en neuronas, ni en células de la microglía ni de la oligodendroglía. Su expresión en neuronas es negativa excepto en los axones de células horizontales.

El anticuerpo monoclonal 3CB2 se aisló de la fusión de células de mieloma y linfocitos de ratón inmunizados con extractos de cerebro completo de pollo recién nacido. Una vez obtenido el anticuerpo, se caracterizaron los patrones de tinción durante el desarrollo de pollo (Prada y col., 1995). Dicho anticuerpo reconoce una proteína del citoesqueleto de 55kDa, cuyo patrón de tinción, asociado a estructuras citoesqueléticas, sugería que podría ser un filamento intermedio.

1.4.6.- Expresión del anticuerpo monoclonal que reconoce MOSP

La mielina producida por los oligodendrocitos en el SNC y por las células de Schwann en el sistema nervioso periférico (SNP) altera

las propiedades eléctricas del axón incrementado la velocidad de conducción de su potencial de acción. Tanto la mielina del SNC como la del SNP tiene en común que comparte una variedad única de lípidos y proteínas (Lees y Brostoff, 1984; Lemke, 1988) ambos tipos de mielina se diferencian en que la mielina del SNC es la única que expresa específica y selectivamente unas proteínas determinadas (Lee y Brostoff, 1984; Lemke, 1988; Mikol y col., 1990; Linington y col., 1984). Este hecho fue estudiado por Dyer y col., (1991) quienes describieron una nueva proteína de superficie de membrana, con un peso molecular de 48 kDa, que se expresa solamente en la mielina del SNC y en los oligodendrocitos de los vertebrados superiores: la proteína específica de mielina y oligodendrocitos (MOSP). Prada y col., (2001) mostraron que las células de Müller también expresan MOSP.

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

1.4.7.- Expresión del anticuerpo monoclonal que reconoce His-C7

La mayoría de los estudios sobre las células microgliales han sido publicados en relación con diferentes áreas del SNC de los vertebrados y con la retina de los mamíferos. Sólo unos pocos estudios han sido publicados en relación con las retinas de los vertebrados no mamíferos (Goodbrand y Gace, 1991; Dowding y col., 1996). En los últimos años la retina de la codorniz ha sido usada como modelo para estudiar y arrojar luz sobre la histología y el desarrollo de las células microgliales (Navascués y col., 1994; 1995; Marín-Teva y col., 1998; Cuadros y col., 1998). El anticuerpo QH1 que reconoce específicamente la microglía en la retina de la codorniz no es eficaz en la retina del pollo. Estudios recientes en la retina del pollo (Prada y col., trabajo en vías de publicación) han demostrado que el anticuerpo monoclonal His-C7 que reconoce un determinante antigénico presente en leucocitos de pollo (Jeurissen y col., 1988), identifica con seguridad a las células microgliales de la retina.

2.-PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACIÓN

Mientras que el SNC, y en concreto la retina de las aves de visión diurna, ha sido ampliamente estudiada a lo largo de los años, existe muy poca información sobre la retina de las aves de visión nocturna. Sabemos que se han realizado algunos trabajos sobre la morfología de la retina del cárabo (*Strix aluco*) o del búho real americano (*Bubo bubo virginianus*) como representantes de estas aves, sin embargo, la morfología del búho real que habita en la Península Ibérica, el *Bubo bubo hispanicus*, no ha sido estudiada con anterioridad.

En este trabajo realizamos, con técnicas de microscopía óptica, electrónica, y técnicas de inmunotinción un estudio de la retina del búho real (*Bubo bubo hispanicus*) con objeto de obtener conocimientos morfológicos e inmunocitoquímicos sobre la retina de esta ave nocturna autóctona de nuestro país.

A la vez que ampliamos los conocimientos sobre la visión de los animales de hábito nocturno, compararemos su retina con la del pollo como representante de las aves de visión diurna. Para ello utilizaremos los conocimientos adquiridos y, los trabajos científicos realizados sobre el pollo que se han llevado a cabo en el Instituto de Biología del Desarrollo.

Nos centramos en el estudio de la retina debido a que su complejidad neural, así como la organización sináptica que alcanzan sus células, hacen que a esta estructura se la pueda considerar como un modelo especializado de la corteza cerebral dedicado a la detección, análisis y procesamiento de la información visual.

En primer lugar realizaremos con técnicas de microscopía óptica y electrónica el estudio sobre las capas retinianas de la retina del búho real, así como de las neuronas y células gliales que componen dichas capas. Determinaremos si la estructura retiniana del búho es similar, o presenta cambios significativos respecto a la organización neuronal y glial en las aves de visión diurna.

En segundo lugar, utilizaremos anticuerpos monoclonales como marcadores neuronales y gliales. Su uso a lo largo de los últimos años ha permitido la caracterización molecular y la determinación de los patrones de distribución de diferentes clases de neuronas y glías del SNC adulto y en desarrollo. Para el estudio de la retina del búho y del pollo emplearemos los siguientes anticuerpos monoclonales:

- Anti-GABA. Las células horizontales de la retina utilizan el ácido γ -aminobutírico (GABA) como neurotransmisor.

Estas células parecen estar involucradas funcionalmente en

la percepción del contraste, incrementando la resolución visual.

- 3BA8, como anticuerpo monoclonal que se expresa principalmente en células amacrinas y amacrinas desplazadas.
- Anti-glutamina sintetasa (GS), para la localización inmunohistoquímica de las células glutamatérgicas y como marcador de células de Müller y astrocitos.
- 3CB2, como anticuerpo monoclonal que reconoce una proteína asociada a filamentos intermedios la cual se expresa en el sistema nervioso central, en astrocitos y glía radial.
- Anti-MOSP. La proteína específica de mielina y oligodendrocitos (MOSP) es una proteína de superficie de membrana que se expresa sólo en la mielina del SNC y en los oligodendrocitos de los vertebrados superiores.
- HIS-C7. Anticuerpo monoclonal que se utilizará como marcador de células de la microglía debido a la afinidad que presenta la lectina, obtenida del tomate, por determinados residuos glucosilados que se encuentran en la membrana citoplásmica de las células microgliales.

- Anti-opsina. Los conos contienen opsinas como pigmento visual y, dependiendo de la estructura exacta de la molécula de opsina, pueden ser sensibles a distintas longitudes de ondas.

En tercer lugar, al ser el búho un ave nocturna/crepuscular, pensamos que sus fotorreceptores son más sensibles a bajas intensidades de luz, por ello realizaremos un estudio de las gotas de grasa presente en la retina del búho real, para aportar nuevos conocimientos sobre la visión de estos animales.

3.- MATERIAL Y MÉTODOS

3.1.- ANIMALES

Hemos utilizamos cuatro búhos reales (*Bubo bubo*) los cuales fueron cedidos por el Dr. D. Juan José Negro Balmaseda, Vicedirector Científico de la Estación Biológica de Doñana CSIC, Sevilla. Los búhos se encontraban en el Centro de recuperación de especies amenazadas (CREA) dependiente de la Consejería de Medio Ambiente de la Junta de Andalucía, en la localidad de San Jerónimo (Sevilla). Los búhos empleados eran ejemplares de procedencia silvestre pero con traumatismos graves y lesiones irrecuperables que impedían su retorno a la naturaleza, sobre los que se decide someter a eutanasia.

También se utilizaron cinco pollos (Leghorn blanca), procedentes de granjas especializadas o del animalario de nuestra Universidad. Los protocolos del cuidado animal en nuestros laboratorios y en el animalario de la universidad fueron conforme a la legislación nacional (decretos 223/1998, BOE nº 67) y a las pautas de la Comunidad Europea (directiva del Consejo 86/609/EEC).

A los animales se les realizó una sedación profunda para la extracción de los globos oculares. Una vez obtenido el material necesario para su utilización en las distintas técnicas planificadas en esta Tesis, se eutanasiaron de inmediato. Los pollos fueron sedados

con vapor del éter y los búhos con una inyección del equithesir (2 ml/Kg) antes de la perfusión con el fijador.

3.2.- PREPARACIÓN DEL MATERIAL PARA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

3.2.1.- Estudio de Semifinos

Las retinas de búhos y pollos, fueron extraídas estando inmerso el globo ocular en solución fijadora a 4° C y en un recipiente rodeado de hielo para mantener la temperatura constante durante la disección.

Una vez extraídas las retinas, éstas fueron fijadas según el proceder propuesto por Palay y Chan Palay (1974) para el estudio del SNC. Según este método se fijaron las piezas durante 24 horas y a 4° C en 2,5% paraformaldehído, 25% glutaraldehído, tampón fosfato 0,4M, 0,5% cloruro cálcico y agua destilada. Posteriormente se pasaron a una solución de lavado mediante tres pasos de 10 minutos cada uno a 4° C, en solución de lavado con tampón fosfato 0,12 M, 8 % sacarosa y cloruro cálcico 0,02 mM. A continuación, fueron postfijadas, preservándolas de la luz durante 2 horas a 4° C, en una solución de 1% tetróxido de osmio, y deshidratadas en una serie creciente de alcohol. Tras la deshidratación, las piezas de retinas de diferentes tamaños,

entre 1 a 3 mm, 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) compuesta por: 10 gr. VCD (dióxido de vinilciclohexano), 6 gr. DER-76, 26 gr. NSA (anhídrido nonenilsuccínico), 0,4 gr. dimetilaminoetanol. Como moldes para la realización de los bloques se utilizó Easy-molds LKB 2208-180, siendo el tiempo de polimerización de la resina 24 horas a 70° C.

Para el estudio al microscopio óptico se realizaron secciones semifinas de 1-2 μ de espesor con cuchilla de vidrio. 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.

3.2.2. Estudio de Ultrafinos

Los cortes ultrafinos, fueron efectuados con cuchilla de diamante a 600-800 Å de grosor. A continuación se tiñeron con acetato de uranilo y citrato de plomo (Reynolds, 1963; Venable y Coggeshall, 1965), observándose con un microscopio electrónico de transmisión Jeol-100C a 80 kV.

3.3- PREPARACIÓN DEL MATERIAL EN FRESCO PARA EL ESTUDIO DE GOTAS DE GRASA

Las órbitas de un búho y de dos pollos fueron sumergidas en una solución de cloruro sódico al 0,9%. Los ojos fueron rápidamente disecados en la misma solución; la cornea, el cristalino y el vítreo fueron sacados y posteriormente, la esclera y la coroides fueron separados de la retina. A las retinas se le hicieron unas incisiones radiales con el fin de conseguir un mejor estiramiento. A continuación, fueron montadas en portas y, sin deshidratar, se cubrieron con una disolución de 1/9 glicerol. Las observaciones se realizaron en un microscopio óptico Zeiss Axioplan.

3.4.- PREPARACION DEL MATERIAL PARA INMUNOHISTOQUÍMICA

Los búhos y pollos fueron perfundidos a través del ventrículo izquierdo con solución salina seguido por una solución del paraformaldehído del 4% en buffer fosfato de sodio 0,1M (PBS), a pH 7.6. Una vez perfundidos se les enuclearon los globos oculares tanto a unos como a otros sumergiéndolos en el fijador. En dicho fijador fueron extraídas las retinas, y fijadas por inmersión, en el mismo fijador, durante 12-48 horas, a 4° C. Después los tejidos fueron

lavados tres veces con PBS, crioprotectados en pasos sucesivos de sacarosa al 15% y 30% durante 24 horas cada paso, para posteriormente ser incluidos 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 y en dos planos para cada muestra. El plano transversal, útil para el estudio de los gradientes central a periférico y dorsal a ventral y el plano perpendicular a éste, para el estudio de los gradientes central a periférica y temporal a nasal. Secciones pasando por diferentes áreas retinales. Se montaron sobre portas cubiertos de gelatina y se almacenaron a -40° C hasta el momento de la inmunorreacción.

Para los estudios inmunohistoquímicos, se utilizaron siete grupos según los primeros anticuerpos utilizados.

1.- En el primer grupo, se utilizó como primer anticuerpo policlonal anti-opsina-azúl (referencia: AB5407) (Chemicon) y como segundo anticuerpo un anti-conejo IgG conjugado con isocianato de fluoresceína (FITC) (referencia: F9262) (Sigma). Este anticuerpo es utilizado para el reconocimiento de los pigmentos visuales en los fotorreceptores.

2.- En el segundo grupo, se utilizó como primer anticuerpo un anti-GABA policlonal (referencia: A2052) (Sigma) y como segundo

anticuerpo un anti-conejo IgG conjugado con isocianato de fluoresceína (FITC) (referencia: F9262) (Sigma). El ácido γ -aminobutírico (GABA) es un neurotransmisor inhibitor que se localiza en concentraciones elevadas en amplias zonas del SNC. A nivel retiniano se localiza en las interneuronas de la mayoría de los vertebrados.

3.- En el tercer grupo, se utilizó como primer anticuerpo 3BA8 y como segundo anticuerpo un anti-ratón IgG conjugado con isocianato de fluoresceína (FICT) (referencia: F9259) (Sigma). 3BA8 es un anticuerpo monoclonal que reconoce una proteína de membrana de aproximadamente 50KD. Este anticuerpo fue catalogado por el Dr. Enrique De la Rosa (CSIC, Madrid).

4.- En el cuarto grupo se utilizó como primer anticuerpo un monoclonal anti-glutamina sintetasa (GS), copia 6, de BD Laboratorios Transducción (referencia: 610518) (Sigma), y como segundo anticuerpo se utilizó bien, un anti-ratón IgG conjugado con isocianato de fluoresceína (FITC) (referencia: F 8521), o bien un anti-ratón IgG conjugado con isocianato de tetrametil rodamina (TRICT) (referencia T7782) (Sigma). El glutamato es el mayor neurotransmisor excitador del SNC el glutamato es captado por las células gliales y

amidatado a glutamina mediante la acción de la enzima glutamina sintetasa (GS).

5.- En el quinto grupo, se utilizó como primer anticuerpo 3CB2 y como segundo un anti-ratón IgM conjugado con isocianato de tetrametil rodamina (TRICT) (referencia T7782) (Sigma). 3CB2 es un anticuerpo monoclonal que reconoce una proteína asociada a filamentos intermedios, la cual se expresa en células derivadas del ectodermo y mesodermo en el SNC (Prada y col., 1991). Este anticuerpo fue aportado por el Dr. Enrique De la Rosa (CSIC, Madrid).

6.- En el sexto grupo, se utilizó como primer anticuerpo un monoclonal anti-MOSP, clon CE1, de Millipore (referencia: MAB328), y como segundo anticuerpo un anti-ratón IgM conjugado con isocianato de fluoresceína (FITC) (referencia: F9259) (Sigma), o en las preparaciones con doble marcaje un anticuerpo secundario anti-ratón IgM conjugado con isocianato de tetrametil rodamina (TRICT) (referencia: T 7782) (Sigma). MOSP es una proteína de superficie de membrana que se expresa solo en la mielina del sistema nervioso central y en oligodendrocitos de los vertebrados superiores (Dyer et al. 1991).

7.- En el séptimo grupo, se utilizó como primer anticuerpo un monoclonal contra His-C7 de Cedi Diagnostics B.U. (Mab a ch/CD45.

His-C7 Pan-leucocytes. Ref: 7500970). El segundo anticuerpo fue un anti-ratón IgG, conjugado con isocianato de fluoresceína (FITC) (Chemicon AP-132F) (Sigma F-6257). Esta técnica utiliza la tinción histoquímica con *Lycopersicon esculentum* (LEA-Lectina de tomate) como marcaje específico de células microgliales, y está basada en la afinidad que presenta la lectina obtenida del tomate por determinados residuos glucosilados que se encuentran en la membrana citoplásmica de las células microgliales.

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

Los portas con los cortes de tejido se preincubaron primero en suero del pollo al 10% en PBS, a pH 7.4, conteniendo 0.25% Tritón X-100, durante 30 minutos, para bloquear la impregnación y la coloración no específica.

Posteriormente fueron incubadas con el primer anticuerpo a una dilución 1/200 en PBS con el 0.1% Tritón X-100 y suero de pollo al 1%, a temperatura ambiente, durante 12h. Después de lavar 3 veces durante 15 minutos en PBS con Tritón X-100 al 0.1%, las secciones fueron incubadas con el segundo anticuerpo conjugado con isocianato de fluoresceína (FITC) (Sigma) a una dilución 1/100 en PBS con el

0.1% Tritón X-100 durante 2h a temperatura ambiente en oscuridad. Después de tres lavados durante 10 minutos en PBS con 0.1% Tritón X-100 y aclarados en PBS, los portas fueron cubiertos con una disolución de PBS-glicerol 1/9.

Las diluciones de trabajo de los anticuerpos fueron las recomendadas por los fabricantes.

Las secciones que fueron procesadas para doble marcaje de GS y MOSP, fueron tratadas como una inmunotinción simple, incubadas primero con el anticuerpo primario contra GS y posteriormente con un anticuerpo secundario conjugado con isocianato de fluoresceína (FITC). Posteriormente fueron lavadas y nuevamente incubadas con el anticuerpo primario contra MOSP, lavadas e incubadas con un anticuerpo secundario conjugado con isocianato de rodamina (TRICT), y terminadas de procesar como una inmunotinción simple.

Las secciones que fueron procesadas para el marcaje con el anticuerpo Opsina-azúl, siguieron la misma pauta que para el procesado inmunohistoquímico descrito, con la salvedad de que se montaron con el medio de montaje Vectashield (referencia: H1000) (Vector Laboratories), al que se le añadió 1µl de una solución stock de 4´6-diamidino-2 phenylindole (DAPI) (referencia: D9542)

(Chemicon), siendo la solución stock de DAPI: 2µg/ml DAPI en agua destilada. El DAPI se utiliza como marcador nuclear mediante inmunofluorescencia debido a que tiene una alta afinidad por DNA por lo que se une fuertemente a los núcleos celulares.

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

Las observaciones se realizaron con un microscopio de epifluorescencia Zeiss Axioplan con equipo informático incorporado.

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

Las retinas de los búhos y pollos destinados a este estudio fueron fijadas en solución de Zamboni's (paraformaldehído 2% en fosfato 0,1 M buffer a pH 7.6, ácido pícrico a saturación), durante 3 a 5 h, para después tratarlas con agua oxigenada al 1% en metanol durante 15 minutos para bloquear la peroxidasa endógena. Posteriormente, se

crioprotegieron para realizar cortes de 10 y 20 μm en el criostato, siguiendo la metodología expuesta en el apartado anterior.

Con portas gelatinizados que contenían los cortes de retina se procedió de la siguiente manera. Después de ser lavados con PBS a pH 7.6 durante 5 minutos y PBS más Triton X-100 (Merck) al 1% durante 10 minutos, los portas se incubaron con Lectina biotinizada, *Lycopersicon esculentum* (LEA L0651) (Sigma) a una concentración de 5 $\mu\text{g/ml}$, en PBS durante 12h a temperatura ambiente. A continuación se incubaron con el complejo avidina-peroxidasa (Extra Avidin Po E2886) (Sigma) a una dilución 1:100 en PBS con 0,7% de lambda carrageenan (Sigma) y 0,5% de Triton X-100 (Merck) durante 1-2 horas a temperatura ambiente. A continuación se lavaron en PBS y fueron sumergidos en una solución de 40 mg/ml de 3'3 diaminobencidina (Sigma) en PBS, al que se añadieron 50 μl de H_2O_2 al 30% durante 10 minutos y a temperatura ambiente. Después de sucesivos lavados fueron deshidratados, aclarados y montados en una disolución de PBS-glicerol 1/9 para su observación.

4.- RESULTADOS

4.1.- DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA DE LA RETINA DEL BÚHO REAL (BUBO BUBO)

La disposición de las células de la retina del búho real es similar a la del resto de los vertebrados. Así encontramos de externo a interno tres capas celulares: capa nuclear externa (fig. 1, CNE), capa nuclear interna (fig. 1, CNI) y capa de células ganglionares (fig. 1, CCG), dos capas sinápticas capa plexiforme externa (fig. 1 CPE) y capa plexiforme interna (fig. 1, CPI) e internamente una capa de fibras del nervio óptico (fig. 1, CFNO). Estas capas quedan limitadas por las capas limitantes externa e interna respectivamente (fig. 1, MLE, MLI).

En estas capas se sitúan las neuronas de transmisión: fotorreceptores en la CNE (fig. 1, c¹, b¹ y b²), células bipolares en la CNI (fig. 1, cb) y células ganglionares en la CCG (fig. 1, g) y las neuronas de asociación: células horizontales (fig. 1, h¹) y células amacrinas (fig. 1, a¹, a²). Además de neuronas, entre estas capas se sitúan las células gliales formadas por las células de Müller (fig. 1, m) y la microglía (fig. 9a, mg).

4.1.1- Fotorreceptores y células de transmisión vertical

4.1.1.1- Fotorreceptores

Los fotorreceptores se sitúan en la CNE. Distinguimos tanto bastones (figs. 1, 2, 3, 4 y 5 b¹ y b²) como conos (figs. 1, 2, 3, 4 y

5, c¹ y c²). El número de bastones es muy superior al número conos (figs. 1, 2 y 3), sin embargo, como podemos observar en las figs. 1, 2 y 3 donde se exponen cortes semifinos de retina central (fig. 1), retina de transición (fig. 2) y retina periférica (fig. 3), la relación entre la población de conos y bastones disminuye conforme nos aproximamos hacia la retina periférica (fig. 3), este cambio en la relación, es debida a la disminución en la retina periférica del número de bastones mientras que permanece inalterable el número de conos.

Entre la población de conos distinguimos dos tipos según la posición de su pericario y la electrondensidad que presenta:

- Conos cuyos pericarios se sitúan en la parte más externa de la CNE, de morfología redondeada, cuya electrondensidad es homogénea y clara (figs. 1, 2, 3, 4, 7 y 8, c¹). Estos conos además presentan un citoplasma claro con numerosas vesículas (fig. 4c, v).
- Conos cuyos pericarios se sitúan en la parte interna de la CNE y cuya electrondensidad es mayor (figs. 1, 2, 3 y 4, c²).

Dentro de la población de bastones diferenciamos también dos tipos de células según su electrondensidad:

- Una población electrondensa, más abundante y que se observa tanto en retina central (fig. 1, 4a y 5, b¹) como en la retina periférica (figs. 3, 7, 8, b¹).
- Una población electronlúcida que presenta un pericario claro con heterocromatina densa (figs. 1, 2, 3, 4a y 5, b²). Esta población de bastones es mucho menor que la electrondensa, y además como podemos apreciar en las microfotografías de retina periféricas (figs. 7 y 8a), en éstas son prácticamente inexistentes.

Las prolongaciones internas de los fotorreceptores se distribuyen por dos estratos en la CPE, (fig. 2, CPE), uno externo donde principalmente se sitúan los segmentos internos de los bastones y posiblemente de los conos electronlúcidos situados en la parte más externa de la CNE (figs. 1 y 2 b¹, b² y c¹); y otro interno, donde fundamentalmente se sitúan los segmentos internos de los conos electrondensos (fig. 2, c²). En esta capa, CPE, no hemos encontrado sinápsis de tipo eléctrico. Sin embargo, son muy abundantes grandes barras sinápticas como quedan recogidos en la fig. 5 (flechas), observándose éstas tanto en el pedículo de los conos como en el de los bastones.

En el segmento externo de los fotorreceptores de retinas montadas en plano y en fresco, hemos comprobado que la retina del búho real presenta gotas de grasa únicamente de dos colores: rojo/marrón (fig. 10a, flecha) y amarillas pálidas (fig. 10a, flechas curvas). En la figura 10b, mostramos una retina de pollo con la misma técnica que la empleada en la retina del búho real (fig. 10a), donde se observan que las gotas de grasa del pollo son rojas (fig. 10b, flechas), amarillas (fig. 10b, flechas curvas), naranjas (fig. 10b, flechas huecas) y transparentes (fig. 10b, flechas curvas huecas).

4.1.1.2.- Células bipolares

Hemos encontrado que las células bipolares en la retina del búho real no presentan diferencias con las del resto de las aves. Así sitúan su pericario en la zona media de la CNI (figs. 1, 2, 3, 6a y 8b, cb) y presentan dos prolongaciones, una externa hacia la CPE y otra interna hacia la CPI. El número de células bipolares, al igual que el resto de neuronas retinianas disminuye conforme nos acercamos a la retina periférica (compárese la densidad de células en la zona media de la CNI de la fig. 1 (CNI) retina central con la fig. 3 (CNI) que corresponde con una retina periférica).

4.1.1.3.- Células ganglionares

Las células ganglionares en la retina del búho real disponen su pericario en la capa de células ganglionares (figs. 1, 2, 3, 6, 7 y 9b, g) de manera que presentan sólo una hilera de cuerpos neuronales, éstas células disminuyen en número al llegar a la retina periférica (figs. 3, 7 y 9b, g), de forma que en ella se observa alguna célula ganglionar aislada. Las células ganglionares distribuyen sus dendritas por la CPI donde realizan sinápsis con los axones de las células bipolares o con las dendritas de las células amadrinas; sus axones forman la CFNO. En dicha capa encontramos que éstos pueden ser de gran tamaño y mielínicos (fig. 6b, flechas) o de pequeño tamaño y amielínicos (fig. 6b, flechas curvas). El número de axones mielínicos es considerablemente mayor en la CFNO (fig. 6b, CFNO) del búho real que en la CFNO del pollo.

En la retina periférica la CFNO presenta muy pocos axones y está formada fundamentalmente por las prolongaciones internas de las células de Müller (figs. 3, 7 y 9 b, CFNO).

4.1.2.- Neuronas de asociación

4.1.2.1.- Células horizontales

Las células horizontales situadas en la parte más externa de la CNI (figs. 1, 2 y 3, CNI) se diferencian en dos poblaciones según su electrondensidad:

- Células horizontales electronlúcidas: estas células muestran una morfología clara tanto en los cortes semifinos (figs. 1, 2 y 3, h¹) como en los de microscopía electrónica (figs. 4b, h¹). Presentan un pericario redondeado y un núcleo de cromatina homogénea, y su citoplasma es electronlúcido con numerosas vesículas (fig. 4b, v), sus prolongaciones dendríticas las extiende hacia la CPE (fig. 4b, flecha). Este tipo de células horizontales, es muy abundante en la retina central (fig. 1, h¹) y disminuye progresivamente en número (fig. 2, h¹) hacia la retina periférica donde prácticamente son casi inexistentes (fig. 3, h¹). Obsérvese que en las figs. 7 y 8, que corresponden a microfotografías electrónicas de retina periférica, este tipo celular no se aprecia.
- Células horizontales electrodensas. Esta población de células horizontales presentan un pericario de mayor electrondensidad y de menor tamaño que las anteriores (figs. 1,

2, 3, 4b, 7 y 8, h²). En proporción a las de pericario electrondenso, son menos abundantes en la retina central (figs. 1 y 4b, h²) que en la periférica (figs. 3, y 7, h²) debido a que en la retina periférica disminuyen notablemente las células horizontales claras.

4.1.2.2.- Células amacrinas

La población de células amacrinas en la retina del búho real (figs. 1, 2 y 3, a¹ y a²) situadas en el tercio interno de la CNI no difiere de las células amacrinas del pollo. Con respecto a la electrondensidad, encontramos en el búho real, al igual que en el resto de las poblaciones neuronales, dos poblaciones:

- Unas células amacrinas electronlúcidas ((fig. 6, a¹) que sitúan su pericario en la parte más interna de la CNI. Su cuerpo neuronal es grande y su citoplasma presenta grandes vesículas (fig. 6a, v).
- Unas células amacrinas electrondensas (fig. 6a y 7, a²), cuyo pericario es de menor tamaño que las anteriores. Se sitúan la mayoría en las hileras más externas dentro del tercio interno de la CNI, y son más numerosas en la retina periférica que las células amacrinas electronlúcidas (fig. 7, a²).

Llama la atención el hecho de que en la capa de células amacrinas no hemos observado ninguna célula ganglionar desplazada (célula de Dogiel) ni en la retina central ni en la periférica.

4.1.3.- Células gliales

4.1.3.1.- Células de Müller

Las células de Müller, constituyen la glía radial y principal en la retina del búho real, sitúan su pericario en la zona media de la CNI (figs. 1, 2, 3, 6a y 9b, m).

Las prolongaciones externas de las células de Müller son muy gruesas (fig. 1, flecha) y, concluyen formando en el límite externo de la CNE, la membrana limitante externa (figs. 1, 2, 3 y 4a, MLE) de la que parten los microvillis perpendicular a ella (fig. 4c, flecha).

Las prolongaciones internas atraviesan la CPI (fig. 6a, flechas), la capa de células ganglionares (fig. 6b, asteriscos) y en la CFNO. En la retina central forma por una parte el empaquetamiento de los axones amielínicos (fig. 6b, flechas curvas) y la envoltura mielínica de los axones de gran tamaño (fig. 6b, flechas). En la retina periférica estas prolongaciones internas cubren los espacios interneuronales de gran tamaño en la CNI (fig. 9a, asterisco) y constituyen prácticamente la totalidad de la CFNO, donde son casi inexistente los axones de las

células ganglionares tanto amielínicos como mielínicos (figs. 7 y 9b, CFNO).

Las prolongaciones internas de estas células concluyen en los pies de la célula de Müller formando la membrana limitante interna (fig. 1, MLI).

4.1.3.2.- Microglía

Además de las células de Müller, en la retina del búho real hemos observado la existencia de células microgliales, estas células se ubican en las CNI, CPI (fig. 9a, mg) y CFNO, y poseen un pericario de pequeño tamaño y en su núcleo la heterocromatina está dispersa y es densa (fig. 9a, flecha).

4.2.- DESCRIPCIÓN DE LA EXPRESIÓN ANTIGÉNICA DE LA RETINA DEL BÚHO REAL EN RELACIÓN A LA RETINA DEL POLLO

Hemos realizado un estudio de la expresión antigénica que reconoce los anticuerpos GABA, GS, Opsina azul, 3BA8, 3CB2, y His-C7, en la retina del búho y, la hemos comparado con la expresión antigénica para los mismos anticuerpos en la retina del pollo como representante de las aves diurnas.

4.2.1.- Expresión del anticuerpo policlonal que reconoce opsina azul

Hemos empleado un anticuerpo que reconoce la opsina azul que se encuentra en los conos que son sensibles a una corta longitud de onda (420nm, azul).

Como resultado de nuestro trabajo observamos en la fig. 11a la expresión del anticuerpo para la opsina azul en el búho real. En esta figura podemos constatar que la expresión en la retina del búho para dicho anticuerpo es negativa. En comparación con esta imagen la fig. 11b corresponde a la expresión del mismo anticuerpo en la retina del pollo, donde observamos la expresión de la opsina azul en color rojo en la parte más externa de la retina, donde se sitúan los fotorreceptores (fig, 11b, flechas). En esta fig. 11b, los cuerpos neuronales de la retina se observan en azul (fig. 11b, flechas curvas) resaltado por una doble tinción con DAPI (sustancia que tiñe de azul exclusivamente los cuerpos de las neuronas).

4.2.2.- Expresión del anticuerpo que reconoce GABA

La expresión del anticuerpo monoclonal que reconoce el GABA, determina si una estirpe neuronal utiliza este neurotransmisor. Observamos en la fig. 12b la expresión de este anticuerpo monoclonal en la retina del pollo, ésta se localiza en la parte más externa de la

CNI, donde se encuentran situadas las células horizontales (fig. 12b, flechas) y en la parte más interna de la misma capa donde se marcan las células amacrinas (fig. 12b, flechas curvas). En la fig. 12a observamos el marcaje con el mismo anticuerpo monoclonal en la retina del búho, en ella podemos ver que al igual que en la retina del pollo las células amacrinas y la CPI se han marcado con dicho anticuerpo (fig. 12a, flechas curvas), mientras que la región más externa de la CNI (fig. 12a, CNI) donde se sitúan los cuerpos de las células horizontales no expresan GABA.

4.2.3.- Expresión del anticuerpo monoclonal que reconoce 3BA8

La expresión del anticuerpo monoclonal que reconoce 3BA8 en la retina del búho real (fig. 13a) es igual a la expresión observada en la retina del pollo (fig. 13b). Así apreciamos que se marcan intensamente las CPI tanto en la retina del búho (fig. 13a, CPI) como en la retina del pollo (fig. 13 b, CPI). Además obtenemos un marcaje algo más débil de los pericarios de las células amacrinas, tanto en la retina del búho real (fig. 13a, flechas) como en la retina del pollo (fig. 13b, flechas). Así como de las células amacrinas desplazadas, ubicadas en la capa de células ganglionares (figs. 13a y 13b, flechas curvas).

4.2.4.- Expresión del anticuerpo monoclonal que reconoce GS

La glutamina sintetasa (GS) es una enzima que se encuentra en el interior de las células gliales, expresándose en la retina en las células de Müller en toda su extensión. En la figura 14a mostramos la expresión del anticuerpo monoclonal que reconoce GS en la retina del búho real. En ella podemos observar la expresión (en verde) de este anticuerpo monoclonal en toda la longitud de las células de Müller (fig. 14a, flechas).

En la fig. 14b se muestra una imagen de la retina del pollo realizada con un doble marcaje. En amarillo (resultado de la superposición del doble marcaje con rodamina-rojo e isocianato de fluoresceína-verde) observamos la expresión del anticuerpo monoclonal que reconoce GS, mientras que en verde queda recogida la expresión del anticuerpo monoclonal que reconoce 3CB2. En ella observamos que la GS (fig. 14b, amarillo) reconoce en el pollo, al igual que en el búho, las células de Müller desde la CNE hasta la región más interna de éstas células de Müller (fig. 14b, flechas).

4.2.5.- Expresión del anticuerpo monoclonal que reconoce 3CB2

La expresión del anticuerpo monoclonal que reconoce 3CB2 en la retina del búho real queda recogida en la fig. 15, y en el pollo en la fig. 14b (doble marcaje con 3CB2, verde, y GS amarillo). Podemos observar tanto en la retina del búho real como en la del pollo, que este anticuerpo se expresa en dos partes de la retina. Por un lado, en las células de Müller (figs. 14b, flechas huecas y 15, flechas curvas), y por otro en los axones de las células horizontales (fig. 14b, flechas curvas; 15 flechas).

4.2.6.- Expresión del anticuerpo monoclonal que reconoce MOSP

El anticuerpo MOSP reconoce una proteína específica de la mielina y oligodendrocitos en los vertebrados superiores y en las aves también se expresa en las células de Müller y en los axones de las células horizontales. En la retina del búho (fig. 16a) el MOSP se expresa en las prolongaciones internas de las células de Müller a nivel de la CFNO (fig. 16a, flechas curvas), y en los axones de las células horizontales en la CPE (fig. 16a, flechas). Si comparamos esta fotografía con la fig. 16b que corresponde a la expresión de MOSP en el pollo, observamos que esta expresión es muy similar. En el pollo el

MOSP se expresa a nivel de las prolongaciones internas de la célula de Müller (fig. 16b, flechas curvas) y en los axones de las células horizontales a nivel de la CPE (fig. 16b, flechas).

4.2.7.- Expresión del anticuerpo monoclonal que reconoce His-C7

El anticuerpo monoclonal que reconoce His-C7 reconoce un determinante antigénico presente en leucocitos de pollo que identifica con seguridad las células microgliales de la retina. En la retina del pollo (fig. 17d), este anticuerpo marca, en la retina del pollo, las células microgliales a nivel de las CPE, CNI, CPI y CFNO (fig. 17d, flechas). En la retina del búho (figs. 17a, 17b y 17c) el anticuerpo que reconoce His-C7 marca los pericarios de las células microgliales en las CNI (fig. 17a, flecha), CPI (fig. 17 b, flecha) y en la CFNO (fig. 17c, flecha).

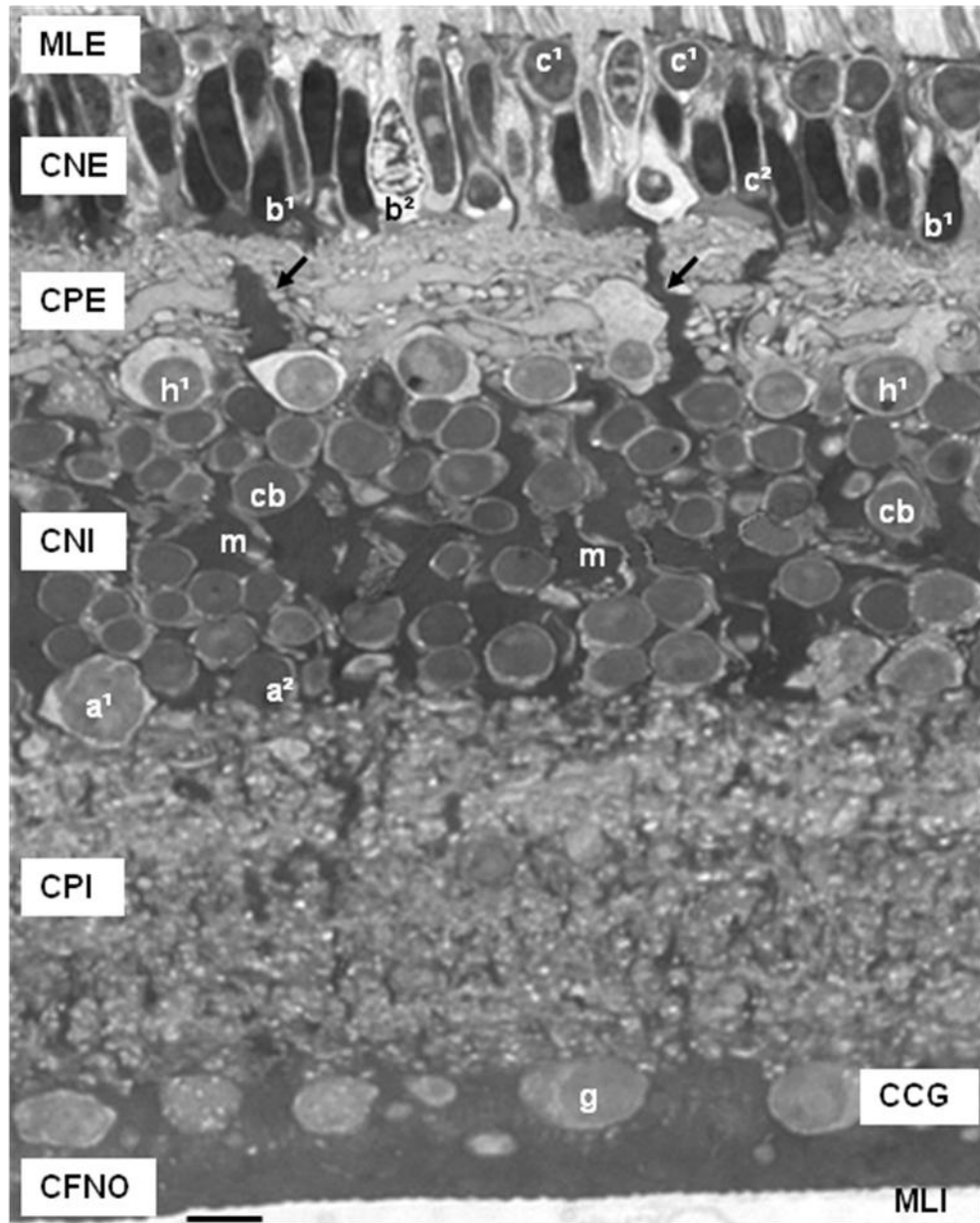


Figura 1.

Semifino de la retina central del búho real. **MLE**: membrana limitante externa. **CNE**: capa nuclear externa. **CPE**: capa plexiforme externa. **CNI**: capa nuclear interna. **CPI**: capa plexiforme interna. **CCG**: capa de células ganglionares. **CFNO**: capa de fibras del nervio óptico. **MLI**: membrana limitante interna. **c¹**: conos electronlúcidos. **c²**: conos electrondensos. **b¹**: bastones electronlúcidos. **b²**: bastones electrondensos. **Flecha**: prolongación externa de las células de Müller. **h¹**: células horizontales claras. **cb**: células bipolares. **m**: células de Müller. **a¹**: amacrinas claras. **a²**: amacrinas oscuras. **g**: células ganglionares. La barra representa 10 μ .

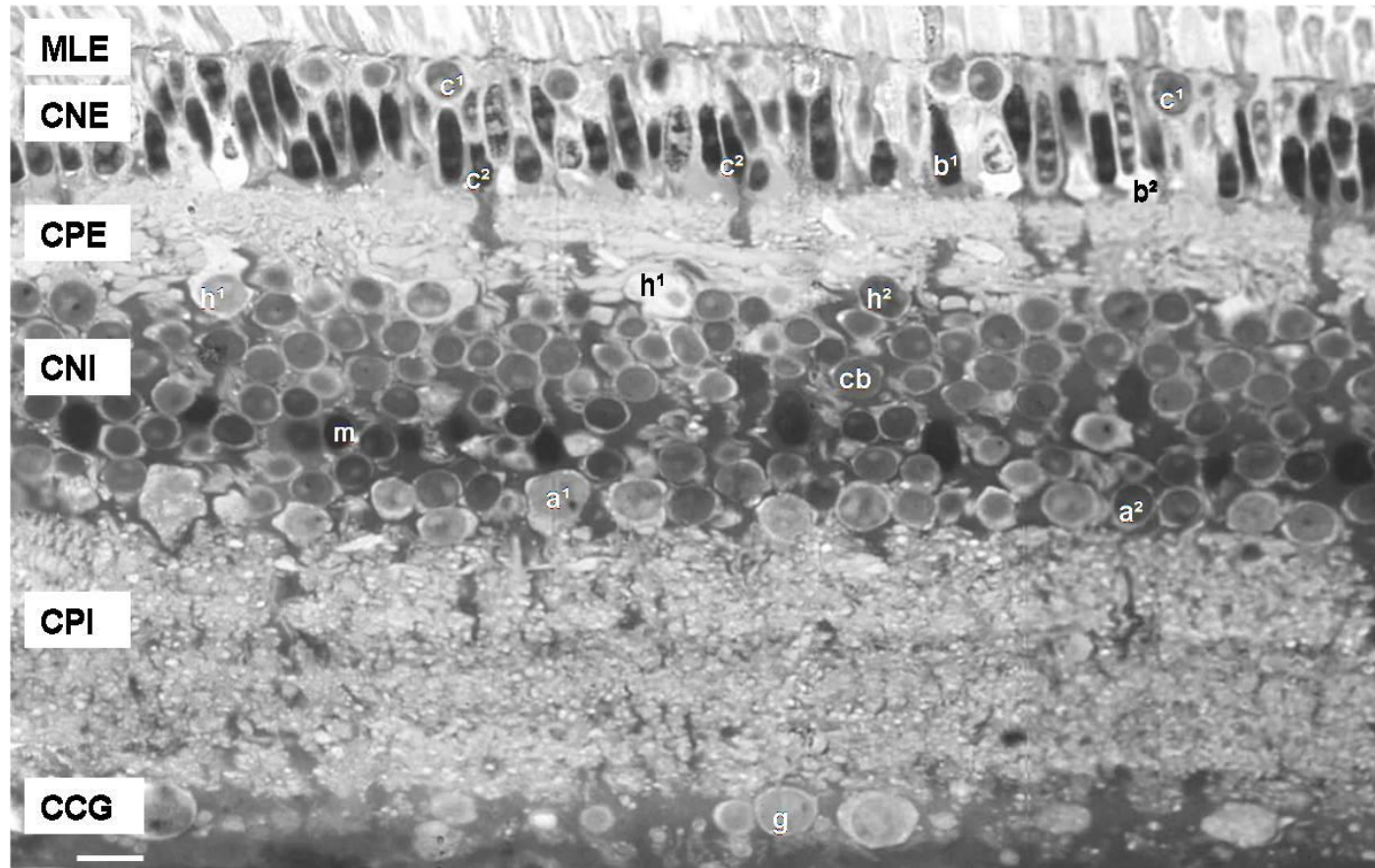


Figura 2.

Semifino de la retina de transición del búho real. MLE: membrana limitante externa. CNE: capa nuclear externa. CPE: capa plexiforme externa. CNI: capa nuclear interna. CPI: capa plexiforme interna. CCG: capa de células ganglionares. c¹: conos electronúcidos. c²: conos electrondensos. b¹: bastones electrondensos. b²: bastones electronúcidos. h¹: células horizontales claras. h²: células horizontales oscuras. Cb: células bipolares. m: células de Müller. a¹: amacrinas claras. a²: amacrinas oscuras. g: células ganglionares. La barra representa 10 μ .

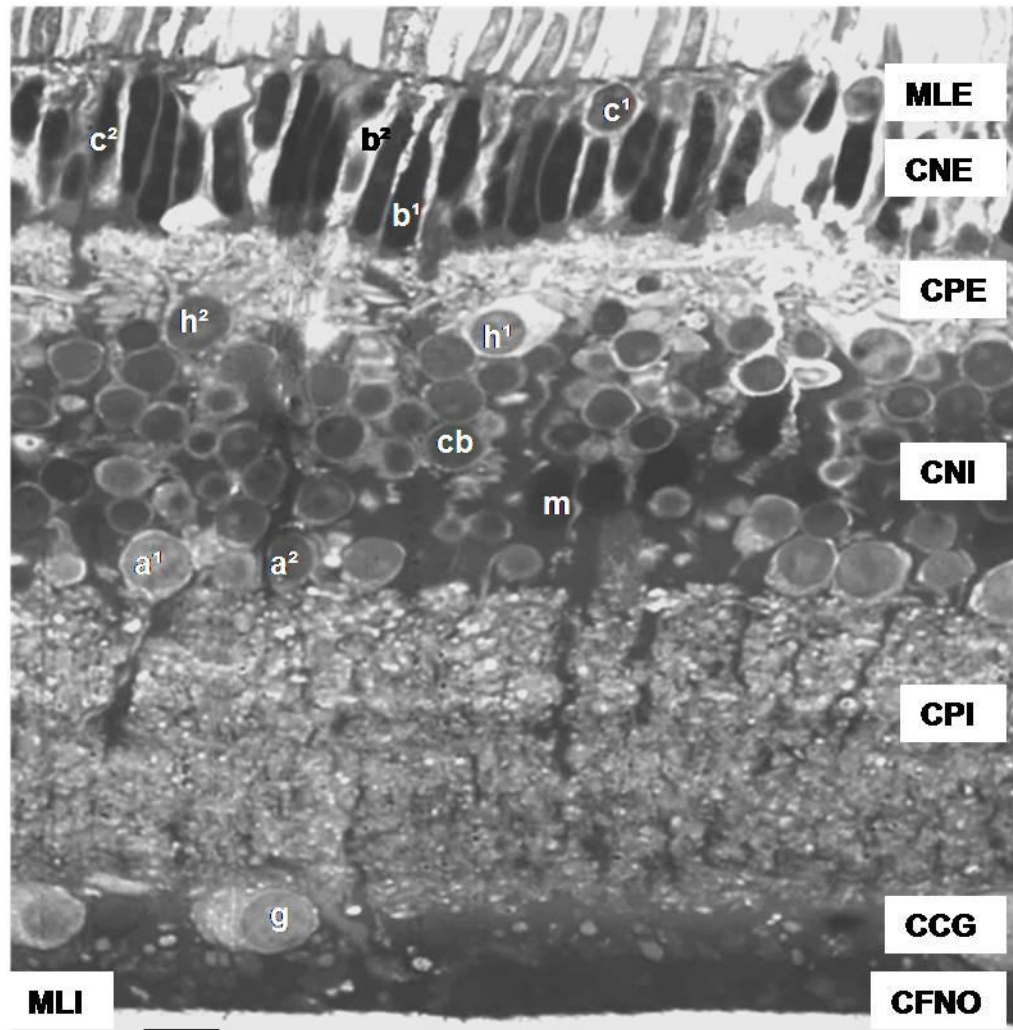


Figura 3.

Semifino de la retina periférica del búho real. **MLE:** membrana limitante externa. **CNE:** capa nuclear externa. **CPE:** capa plexiforme externa. **CNI:** capa nuclear interna. **CPI:** capa plexiforme interna. **CCG:** capa de células ganglionares. **MLI:** membrana limitante interna. **c¹:** conos electronúcidos. **c²:** conos electrodensos. **b¹:** bastones electrodensos. **b²:** bastones electronúcidos. **h¹:** células horizontales claras. **h²:** células horizontales oscuras. **cb:** células bipolares. **m:** células de Müller. **a¹:** amacinas claras. **a²:** amacinas oscuras. **g:** células ganglionares. La barra representa 10 μ .

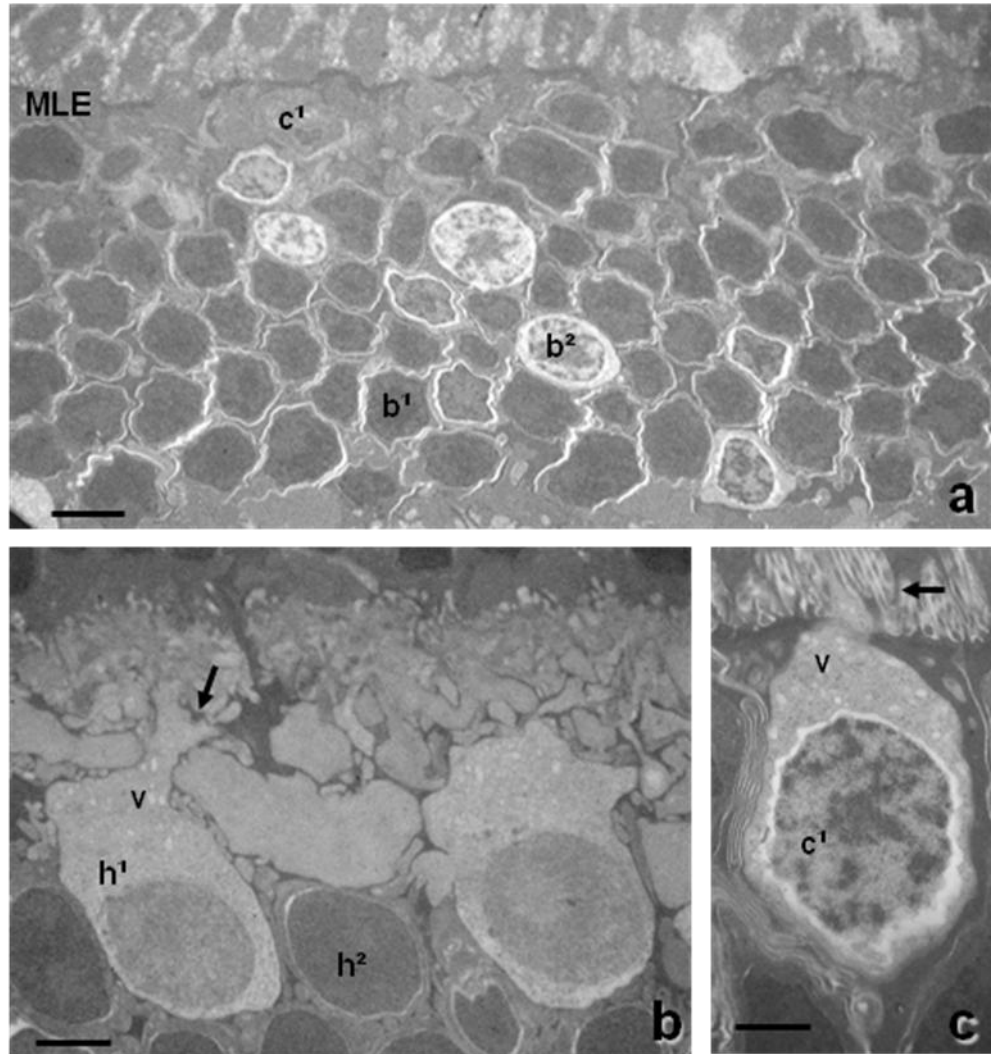


Figura 4.

a. Sección tangencial al microscopio electrónico de retina central de búho. **MLE:** membrana limitante externa. **c¹:** conos electronlúcidos. **b¹:** bastones electrondensos. **b²:** bastones electronlúcidos. La barra representa 6 μ . **b.** Sección vertical al microscopio electrónico de retina central de búho. **h¹:** célula horizontal electronlúcida. **h²:** célula horizontal electrondensa. **v:** vesículas. **Flecha:** prolongación hacia la capa plexiforme de una célula horizontal. La barra representa 3 μ . **c.** Sección vertical al microscopio electrónico de retina central de búho. **c¹:** conos electronlúcidos. **v:** vesículas. **Flecha:** microvillitis de las células de Müller. La barra representa 2 μ .

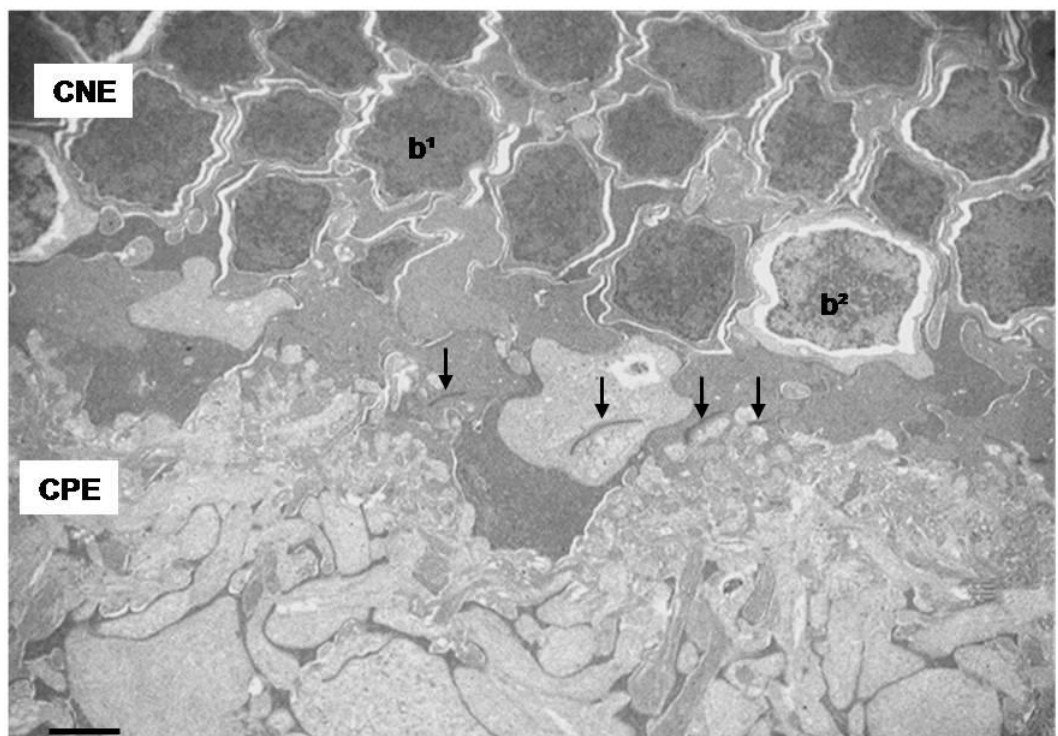


Figura 5.

Sección vertical al microscopio electrónico de retina central de búho. **CNE:** capa nuclear externa. **CPE:** capa plexiforme externa. **b¹:** bastones electrondensos. **b²:** bastones electronlúcidos. **Flechas:** barras sinápticas. La barra representa 3 μ .

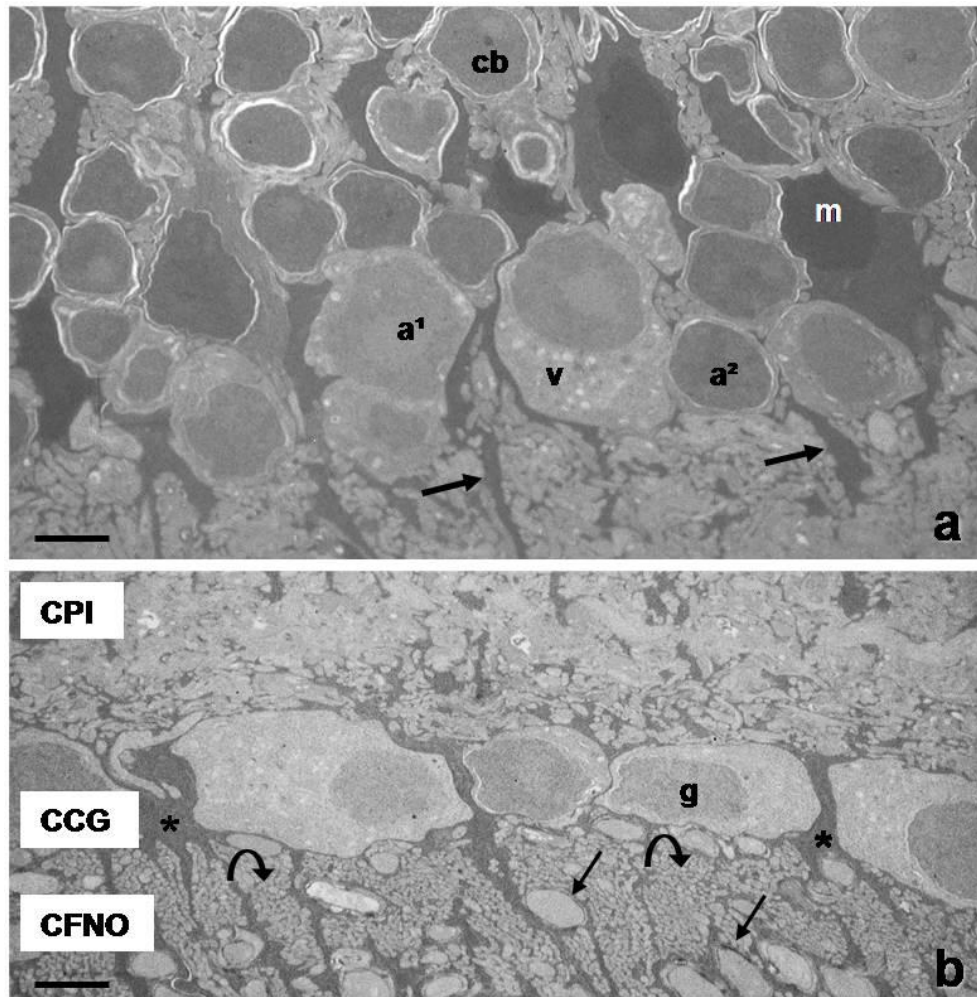


Figura 6.

a. Sección vertical al microscopio electrónico de la capa nuclear interna de retina central de búho. **a¹**: célula amacrina electrólucida. **a²**: célula amacrina electrodensa. **v**: vesículas., **cb**: célula bipolar. **M**: célula de Müller. **Flechas**: prolongaciones internas de las células de Müller. La barra representa 3 μ . **b.** Sección vertical al microscopio electrónico de retina central de búho. **CPI**: capa plexiforme interna. **CCG**: capa de células ganglionares. **CFNO**: capa de fibras del nervio óptico. **g**: célula ganglionar. **Asteriscos**: prolongaciones internas de las células de Müller en la capa de células ganglionares. **Flechas**: axones mielínicos. **Flechas curvas**: axones amielínicos. La barra representa 3 μ .

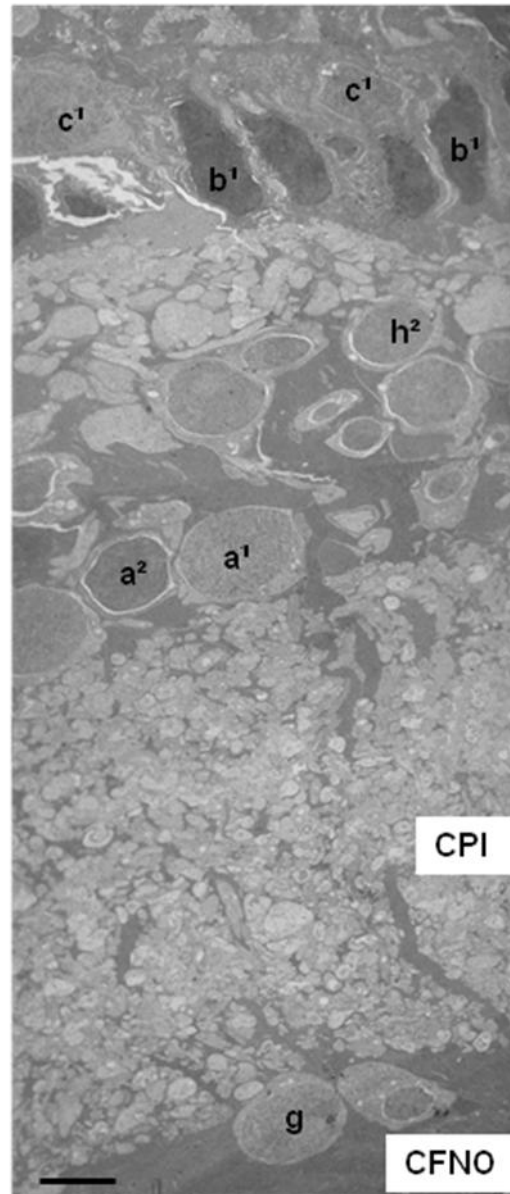


Figura 7.

Sección vertical al microscopio electrónico de la capa nuclear interna de retina periférica. **CPI**: capa plexiforme interna. **CFNO**: capa de fibras del nervio óptico. **c¹**: conos electrolúcidos. **b¹**: bastones electrondensos. **h²**: células horizontales electrondensas. **a¹**: célula amacrina electrólúcida. **a²**: célula amacrina electrólúcida. **g**: célula ganglionar. La barra representa 6 μ .

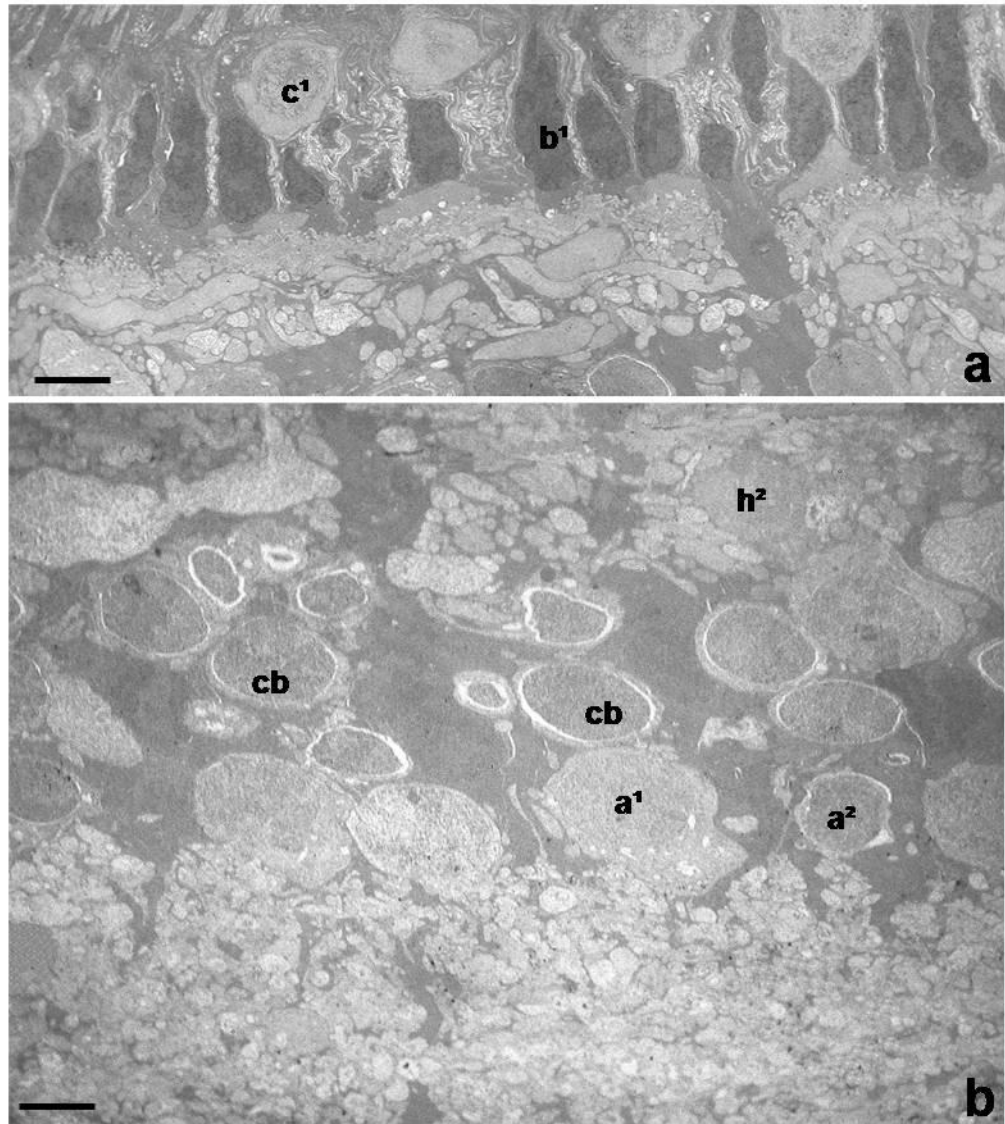


Figura 8.

a. Sección vertical de las capas nuclear externa y plexiforme externa de retina periférica de búho al microscopio electrónico. **c¹**: cono electrondenso. **b¹**: baston electrondenso. La barra representa 6µ. **b.** Sección vertical de las capas nuclear interna y plexiforme interna de retina periférica de búho al microscopio electrónico. **h²**: célula horizontal electrondensa. **a¹**: célula amacrina electrolúcida. **a²**: célula amacrina electrondensa. La barra representa 6µ.

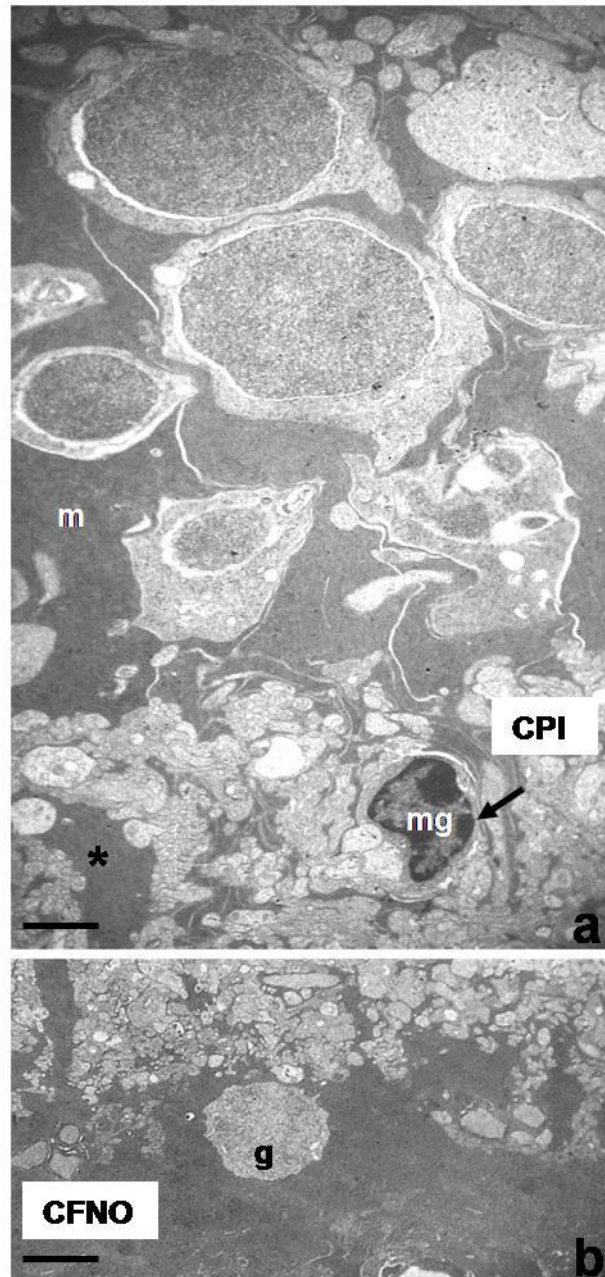


Figura 9.

a. Sección vertical de las capas nuclear interna y plexiforme interna de la retina periférica de búho al microscopio electrónico. **CPI:** capa plexiforme interna. **m:** célula de Müller. **Asterisco:** prolongación interna de la célula de Müller. **mg:** microglia. La barra representa 2 μ . **b.** Sección vertical de las capas ganglionar y de fibras del nervio óptico de la retina periférica de búho. **CFNO:** capa de fibras del nervio óptico. **g:** célula ganglionar. La barra representa 6 μ .

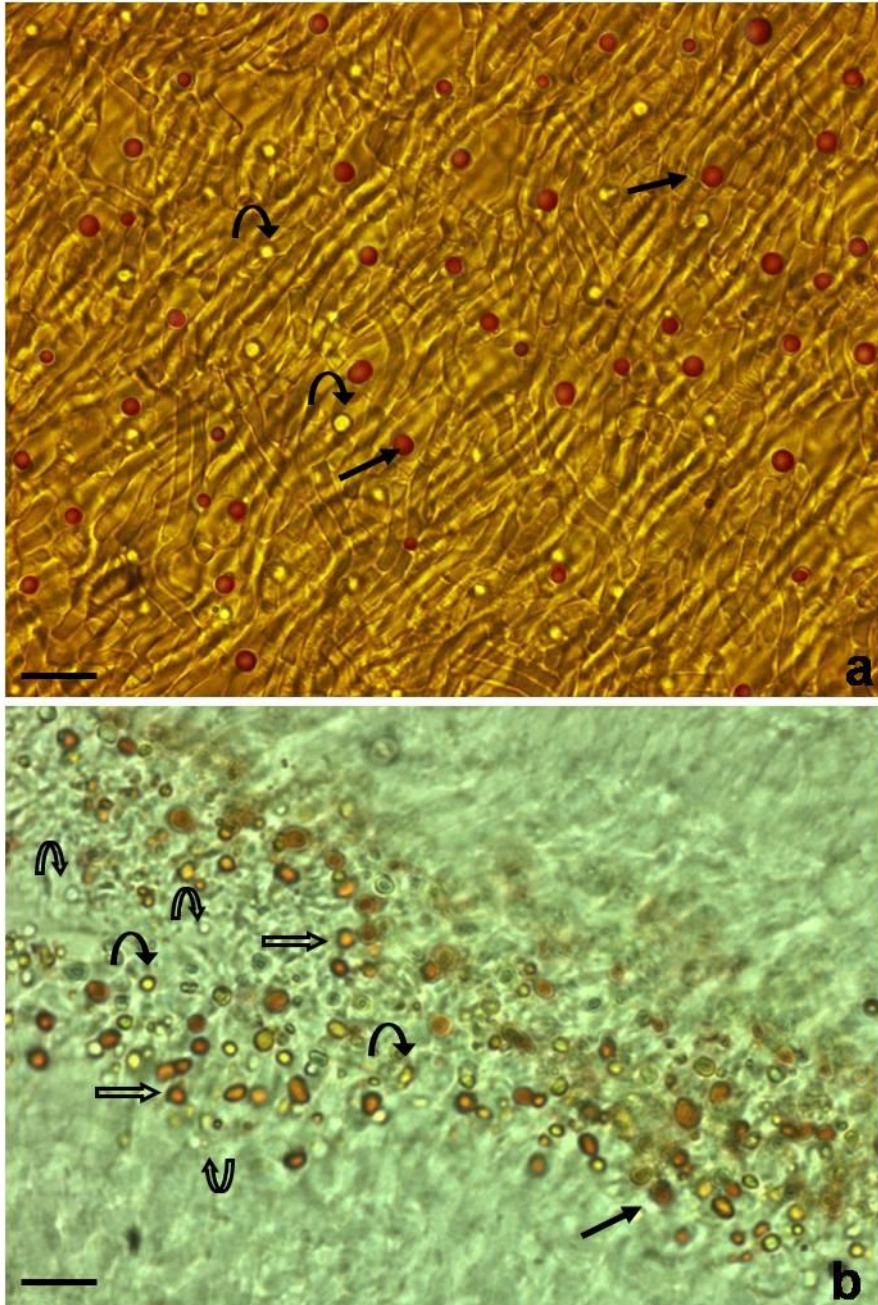


Figura 10.

Retinas en fresco montadas en plano de búho (a.) y de pollo (b.). Flechas: gotas de grasa rojas, Flechas curvas: gotas de grasa amarillas pálidas. Flechas huecas: gotas de grasa naranjas. Flechas curvas huecas: gotas de grasa transparentes. Las barras representan 16 μ .

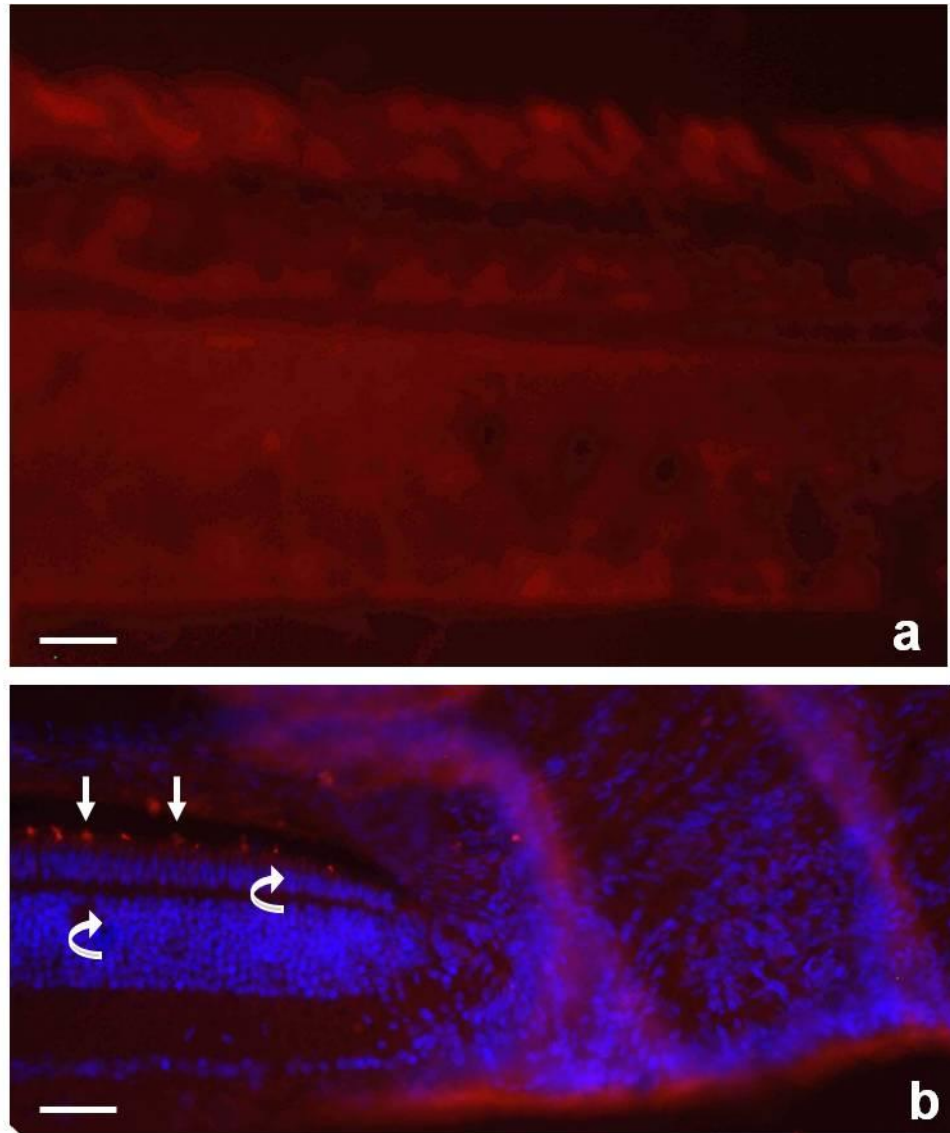


Figura 11.

a. Sección vertical de retina de búho marcada con el anticuerpo que reconoce opsina azul, como se puede apreciar el marcaje es negativo. La barra representa 20 μ . **b.** Sección vertical de retina de pollo con doble marcaje, DAPI y el anticuerpo que reconoce opsina azul. **Flechas:** gotas de grasa. **Flechas curvas:** cuerpos neuronales. La barra representa 25 μ .

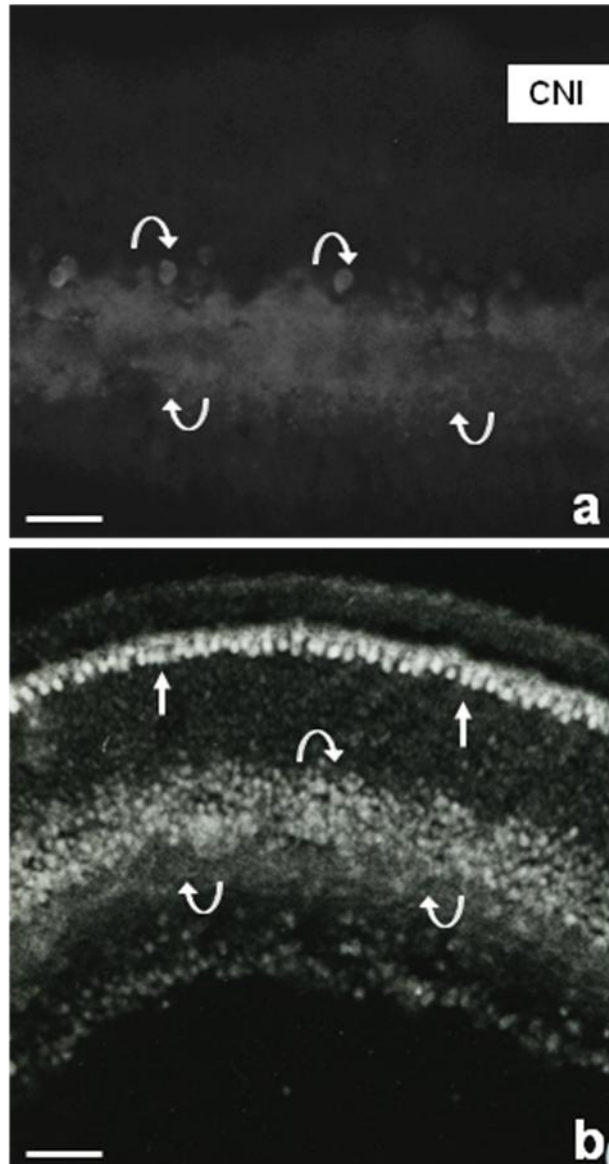


Figura 12.

a. Sección vertical de retina de búho marcada con anticuerpo que reconoce GABA. **CNI:** capa nuclear interna. **Flechas curvas:** marcaje de células amacrinas y capa plexiforme interna. La barra representa 20 μ . **b.** Sección vertical de retina de pollo con anticuerpo que reconoce GABA. **Flechas:** células horizontales en la capa nuclear interna. **Flechas curvas:** marcaje de células amacrinas y capa plexiforme interna. La barra representa 25 μ .

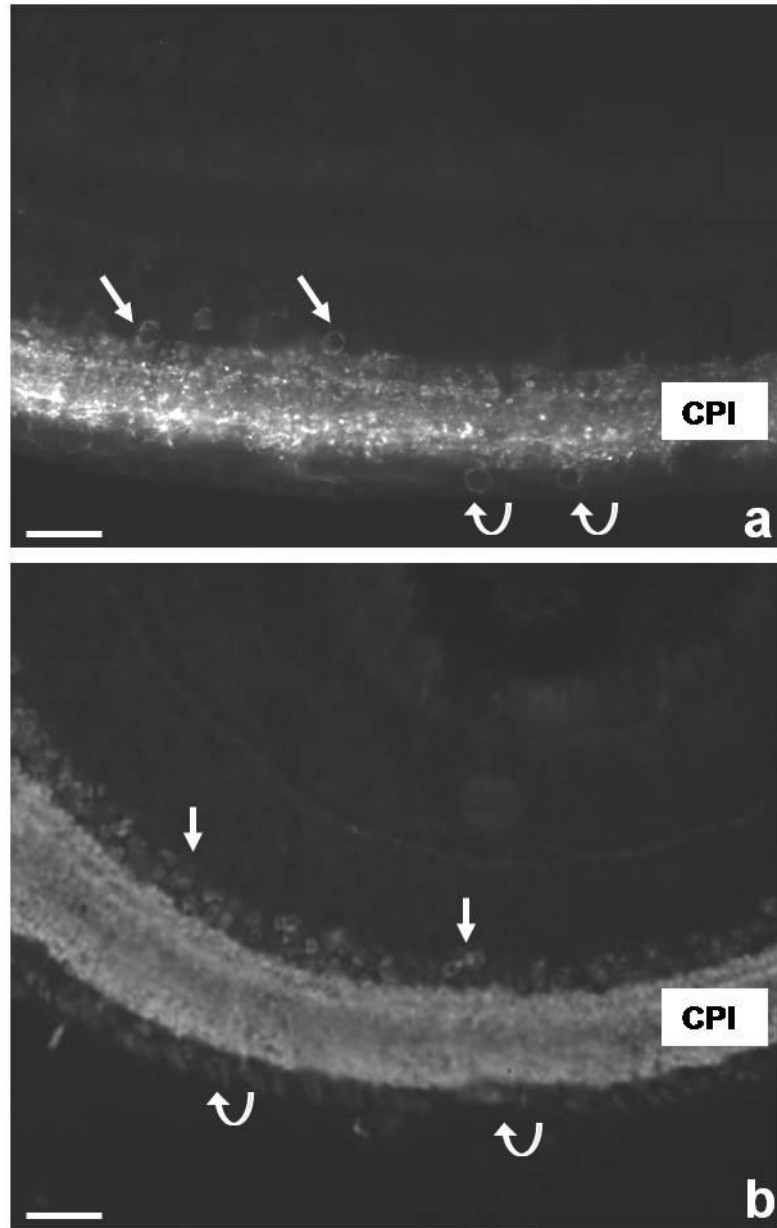


Figura 13.

Secciones verticales de retinas de búho (a.) y de pollo (b.) marcadas con el anticuerpo que reconoce 3BA8. CPI: capa plexiforme interna. Flechas: somas de células amacrinas. Flechas curvas: somas de células amacrinas desplazadas. Las barras representan 25 μ .

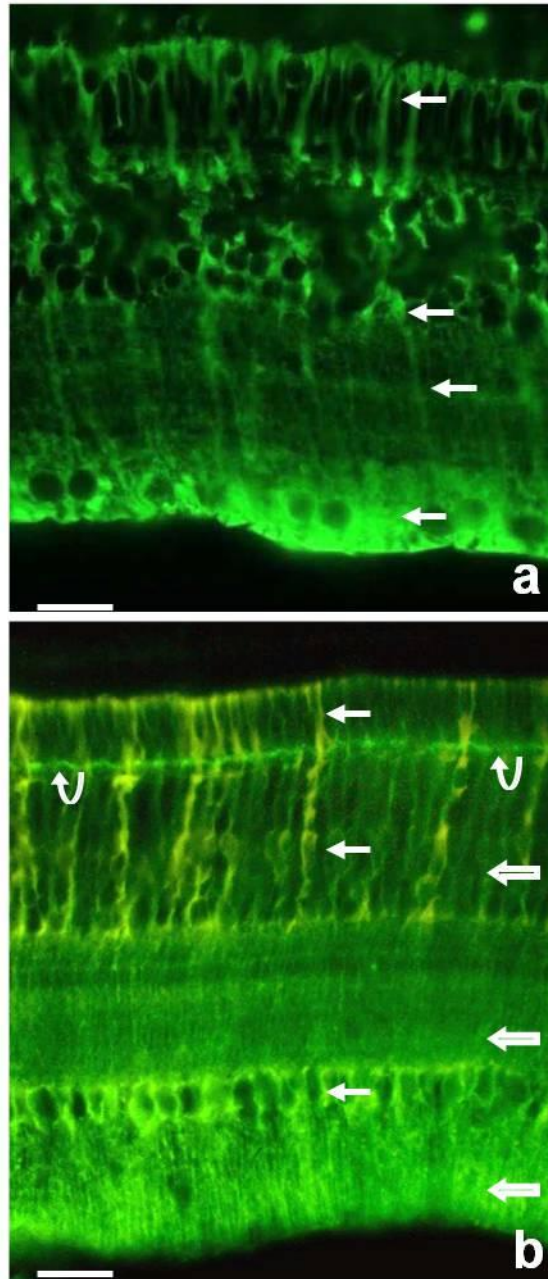


Figura 14.

a. Sección vertical de retina de búho marcada con el anticuerpo que reconoce la glutamina sintetasa. Flechas: célula de Müller. La barra representa 20 μ . **b.** Sección vertical de retina de pollo con doble marcaje, amarillo: anticuerpo que reconoce la glutamina sintetasa, verde: anticuerpo que reconoce 3CB2. Flechas y Flechas huecas: células de Müller. Flechas curvas: axones de células horizontales en la capa plexiforme externa. La barra representa 20 μ .

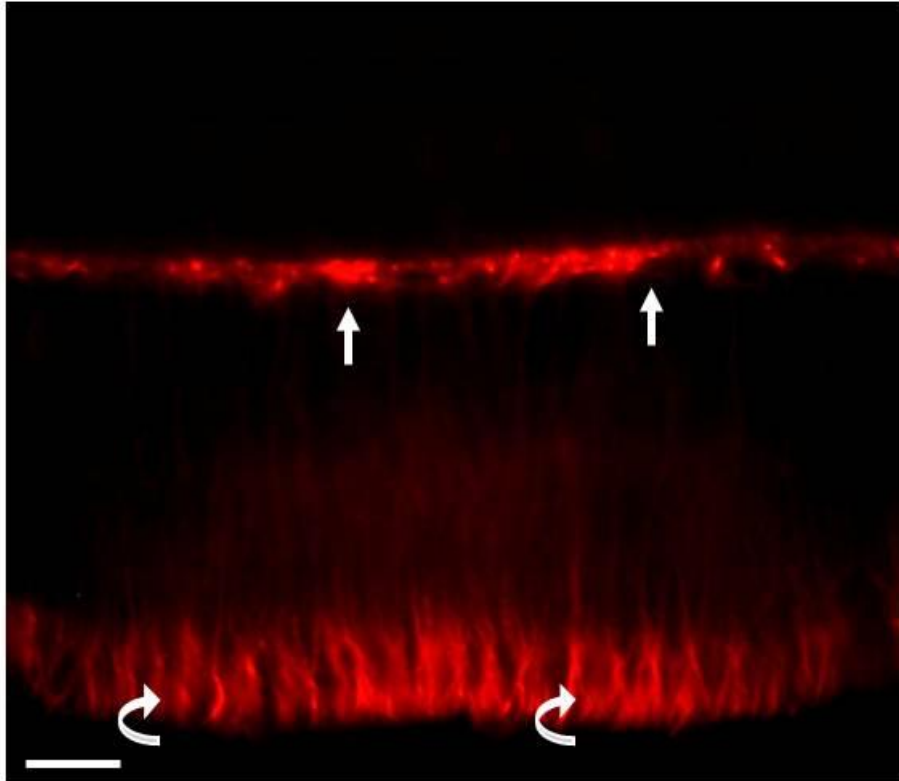


Figura 15.

Sección vertical de retina de búho real marcada con anticuerpo que reconoce el 3CB2. **Flechas curvas:** células de Müller. **Flechas:** capa plexiforme externa donde se ubican los axones de las células horizontales. La barra representa 25 μ .

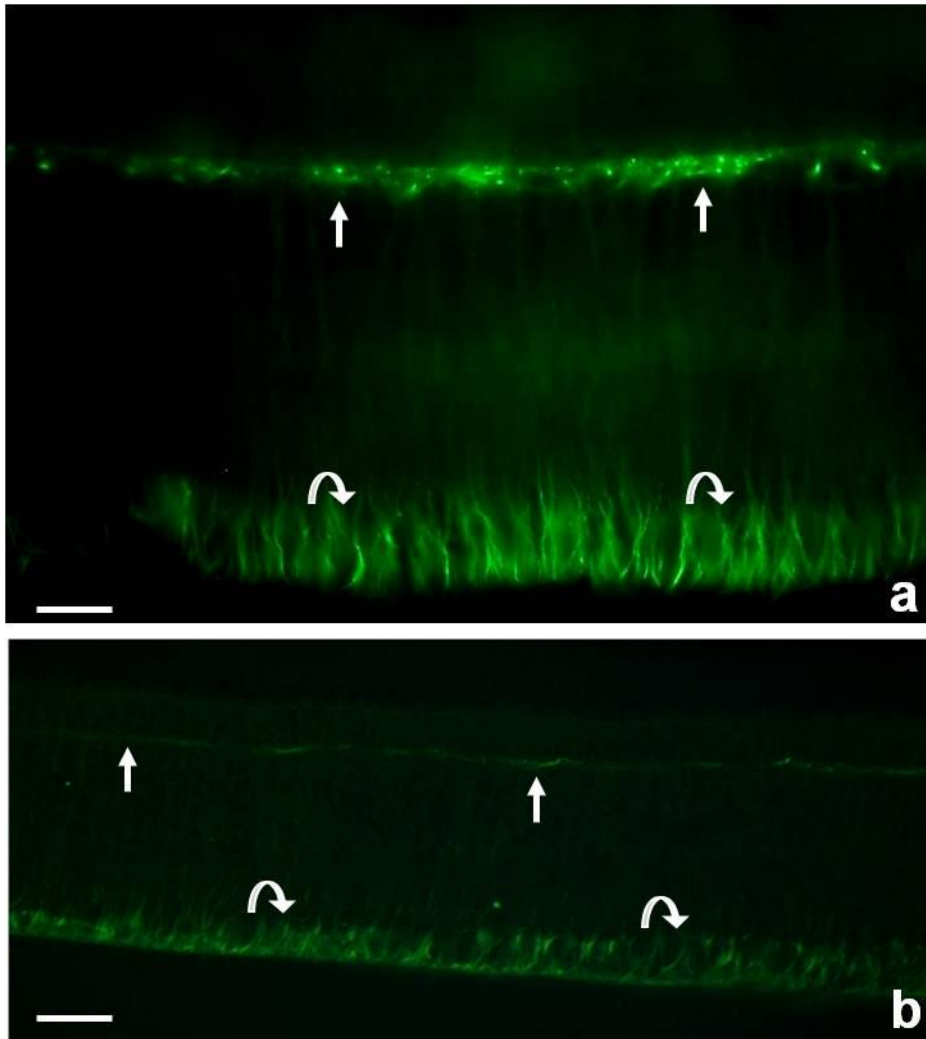


Figura 16.

Secciones verticales de retina, a. de búho y b. de pollo, marcadas con el anticuerpo que reconoce MOSP. Flechas: axones de las células horizontales en la capa plexiforme externa. Flechas curvas: prolongaciones internas de las células de Müller en la capa de fibras del nervio óptico. Las barras representan 25 μ .

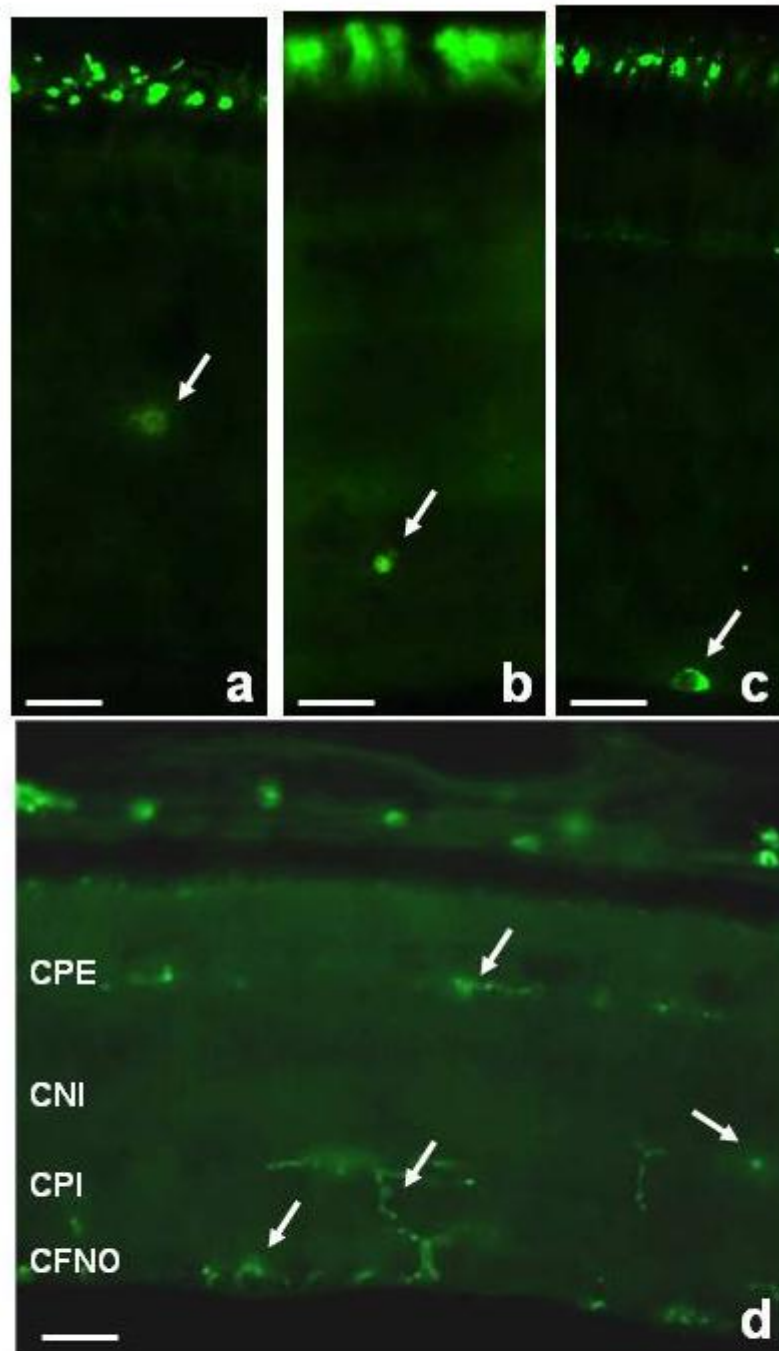


Figura 17.

a.b.c. Secciones verticales de retina de búho marcadas con el Anticuerpo que reconoce His-C7. Flechas: célula microglial en las capa nuclear interna (**a**), plexiforme interna (**b**) y de fibras del nervio óptico (**c**). Las barras representan 20 μ . **d.** Sección vertical de la retina del pollo marcada con el anticuerpo que reconoce His-C7. **CPE**: capa plexiforme externa. **CNI**: capa nuclear interna. **CPI**: capa plexiforme interna. **CFNO**: capa de fibras del nervio óptico. **Flechas**: células microgliales. La barra representa 25 μ .

5.- DISCUSIÓN

Dividiremos esta sección en tres apartados, por una parte la descripción morfológica de la retina del búho real, en segundo lugar estudiaremos el papel funcional de las distintas células retinianas según su expresión antigénica, y por último realizaremos un estudio de la visión cromática en esta misma ave.

5.1.- DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA DE LA RETINA DEL BÚHO REAL (BUBO BUBO)

La mayoría de las especies de aves son animales con una alta actividad diurna y, sus retinas tienen un número de conos que en la mayoría de los casos superan a los bastones (Walls, 1942; Crescitelli, 1972; Meyer y May, 1973; Braekevelt, 1990, 1992a, b). Esta relación refleja la importancia de los conos en la actividad diurna de estas aves. Estudios del número de conos y bastones en el búho real americano (*Búho virginianus*) han demostrado que la retina de éste posee preponderancia de bastones sobre los conos (Braekevelt, 1993; Steven, 1985), preponderancia que podría deberse a los hábitos crepusculares y nocturnos de estas aves. En el búho real estudiado por nosotros, encontramos la misma relación en cuanto al número de bastones y conos (figs. 1, 2, 3, CNE), que en el búho real americano lo que avalaría el hecho de que la relación numérica entre conos y bastones

estaría relacionada con los hábitos crepuscular/nocturno de las especies.

Con respecto a la clasificación de los fotorreceptores en otras especies de búhos han sido descritos bastones, conos simples y conos dobles en la CNE (Steven, 1985; Braekevelt, 1993; Braekevelt y col., 1996). En el Búho real hemos encontrado, según su ubicación y electrondensidad dos tipos de conos y dos tipos de bastones, unos electronlúcidos y (fig. 1, b² y c¹) y otros electrondensos (fig. 1, b¹, c²). Llama la atención que los bastones electronlúcidos son menos abundantes que los electrondensos en la retina central (fig. 1 b²) y disminuyen hasta casi desaparecer en la retina periférica (figs. 7, 8), mientras que los conos electronlúcidos son más abundantes en proporción que los conos electrondensos en la retina central y aunque disminuyen en número en la retina periférica donde siguen persistiendo en mayor proporción a los oscuros (figs. 7, 8, c¹). Posiblemente esta doble morfología electronlúcida/electrondensa que observamos tanto en conos como en bastones, podría ser debida a la existencia de dos vías funcionales distintas. Esta misma clasificación basada en la electrondensidad neuronal la encontramos en otras neuronas retinianas del búho real estudiadas por nosotros. Así observamos células horizontales electronlúcidas (fig. 1, h¹) y

electrondensas (fig. 1, h²), que al igual que los bastones electrólucidos disminuyen hasta casi desaparecer en la retina periférica, así como las células amacrinas claras (fig. 1, a¹) y oscuras (fig.1, a²) de manera que, en este caso, al igual que los conos electrólucidos (fig. 1, c¹) las células amacrinas electrólucidas, aunque disminuyan en la periferia, se mantienen en igual proporción con las electrondensas que en la retina central. La distinta electrondensidad que muestran algunas células ya fue descrita mediante microscopía de contraste de fase por Yew y col. (1977) al estudiar otras especies de búhos; pero ni estos estudios ni los nuestros han podido establecer su papel funcional por lo que serán necesarios nuevos y más amplios estudios funcionales en la retina del búho para aclarar estas hipótesis.

En el búho real, como en todos los vertebrados, la membrana limitante externa está compuesta por una serie de zónulas adherentes entre las células de Müller y los fotorreceptores adyacentes (Uga y Smeler, 1973) (fig. 4a, MLE), y también hemos encontrado, como en otras especies, que las células de Müller proyectan microvillis a través de la MLE y rodean la base de los segmentos internos de los fotorreceptores (Braekvelt, 1989, 1990, 1992a, b) (fig. 4c, flecha). Además, en algunas regiones de los fotorreceptores de algunas aves, se

observan finos procesos laterales que se interdigitan con estos microvillis de las células de Müller (Crescitelli, 1972; Braekevelt 1990, 1992a, b). En el búho real, al igual que en el búho real americano, estos finos procesos laterales de los fotorreceptores parecen estar ausentes. Como estos procesos laterales están envueltos en funciones de transporte, su ausencia parece indicar una menor actividad metabólica de los fotorreceptores en estas aves nocturnas.

Mientras que en la CPI, no encontramos diferencias entre el búho real y el resto de las aves (fig. 6, b, CPI), en la CPE, si existen diferencias; de modo que, tanto en el búho real como en el búho real americano, se observa una ausencia de contactos eléctricos entre las prolongaciones laterales de los segmentos internos de los fotorreceptores, aunque sí son visibles grandes barras sinápticas entre ellos (fig. 5, flechas).

La capa de células ganglionares de la retina del búho real está formada por una sola hilera de células ganglionares (fig. 1a, 3 y 6, CCG) al igual que ocurre en algunas especies de vertebrados como en el camaleón, en contraste con las de otras aves como el pollo que tienen las células ganglionares dispuestas en dos hileras. Además, llama la atención que el número de células ganglionares en el búho es mucho menor que en el pollo. Sin embargo encontramos que, al igual

que en la retina del búho real americano, en la CFNO existen axones mielinizados (Steven, 1985). Llama la atención el hecho de que los axones mielinizados (fig. 6b, flechas) son en el búho real de gran diámetro y en mayor número, que los axones mielinizados de las células ganglionares en la retina del pollo (imágenes no mostradas). Tanto en el búho real como en el pollo, los axones amielínicos de las células ganglionares quedan empaquetados por las prolongaciones internas de las células de Müller (fig. 6b, flechas curvas). Tanto el número de células ganglionares como el de sus axones en la CFNO, disminuyen y llegan a desaparecer conforme nos aproximamos a la retina periférica (fig. 9, g, CFNO) quedando su espacio ocupado por la expansión de las prolongaciones internas de las células de Müller (fig. 9b, CFNO).

La mayoría de los estudios de las células microgliales han sido realizados en distintas áreas del SNC de vertebrados y en las retinas de los mamíferos. Sólo unos pocos estudios han sido publicados en la retina de los vertebrados no mamíferos (Goodbrand y Gaze, 1991; Dowding y col., 1996). En las retinas de las aves las células microgliales fueron descritas por vez primera por Rio-Hortega (1919). Hasta el presente, en los estudios realizados en aves nocturnas, no se ha evidenciado la presencia de este tipo de células gliales.

Nosotros describimos con técnicas de microscopía electrónica, células microgliales (fig. 9a, Mg) en el espesor de la CPI de la retina del búho real. Estas células tienen un papel reconocido de fagocitosis de cuerpos apoptóticos (Marín-Teva y col., 1998), y, por lo tanto, tienen como función limpiar el tejido de células lesionadas o muertas.

La glía radial presente en la retina del búho real está representada por las células de Müller. Tanto en este búho como en otros vertebrados, las células de Müller se extienden a lo largo de toda la retina, desde la membrana limitante externa (fig. 1, MLE) hasta la membrana limitante interna (fig. 1, MLI), disponiéndose más o menos paralelamente unas a otras. Llama la atención el hecho de que las prolongaciones externas son de gran grosor (fig. 1, flechas), y tanto éstas como las prolongaciones internas se expanden y ocupan todos los espacios retinianos que dejan libres las neuronas. Como hemos comentado anteriormente, a medida que nos acercamos a la retina periférica el número de neuronas disminuyen o desaparecen (fig. 9a, m, asteriscos), al igual que las prolongaciones axónicas de las células ganglionares (fig. 9b, CFNO), por lo que las prolongaciones de las células de Müller ocupan un mayor espacio retiniano.

En la CFNO las prolongaciones internas de las células de Müller adoptan funcionalmente un papel de oligodendrocitos. Este

hecho se ha demostrado en la retina del pollo (Prada, y col., 1989b) donde, al igual que en búho real, podemos observar que las prolongaciones internas de estas células proporcionan la envoltura mielínica a los axones mielínicos de las células ganglionares (fig. 6b, flechas).

5.2.-VISIÓN CROMÁTICA DEL BÚHO REAL

Los estudios respecto a la visión cromática en las aves nocturnas tienen grandes discrepancias e incluso contradicciones en la literatura consultada. Estos estudios han sido realizados mediante tres tipos de técnicas:

A.- Técnicas microscopía óptica, sobre el color de las gotas de grasa de los fotorreceptores.

B.- Técnicas de electroretinogramas (ERG) y

C.- Estudios conductuales

Muchas especies de aves diurnas, al menos 35, al igual que muchos reptiles y anfibios estudiados parecen tener visión tetracromática, incluyendo la luz ultravioleta (Fleishman y col., 1993, Harosi, 1994; Loew, 1994; Deutchlander y Phillips, 1995; Ellingson y col., 1995; Loew y col., 1996, Cutchill y col., 2000; Honkavaara y col., 2002). Esta visión es posible debido a que la retina de estas especies

contiene cuatro tipos de conos con diferentes picos de sensibilidad a distintas longitudes de onda (ultravioleta, azul, verde y rojo). No obstante, la visión tetracromática en los vertebrados terrestres también es debida a gotas de grasa incluidas en los conos, los cuales filtran la luz en ciertas longitudes de ondas (Bowmaker, 1980; Jane y Bowmaker, 1988; Vorodyev y col., 1988). Los humanos tienen solo tres tipos de conos (azul, verde y rojo) y la mayoría de los mamíferos parecen tener solo dos (azul y verde). La visión UV parece estar ausente en la mayoría de las especies de los mamíferos aunque algunos roedores tienen receptores sensibles a la luz UV (Jacobs y col., 1991; Szel y col., 1992). Según Bowmaker (1991) es posible que tipos específicos de conos puedan estar asociados a un determinado tipo de gotas de grasa. De este modo, en algunas especies han sido identificados los conos sensibles a la luz UV; estos conos siempre poseen gotas de grasa “transparentes” los cuales absorben la luz por debajo de los 300nm (Goldsmith y col., 1984; Maier, 1994a, b).

Braekvelt (1993) describe en el búho real americano gotas de grasa localizadas en el segmento interno de los conos y de los conos dobles pero no en los bastones ni en los conos accesorios. Estas gotas de grasa han sido descritas en la mayoría de las aves diurnas con un rango de color desde el naranja al rojo, y en las especies nocturnas

como transparentes (Meyer, 1977), así como en otros búhos (Yew y col., 1977).

Bowmaker y Martin (1978) en un estudio sobre las gotas de grasa de un depredador nocturno, el cárabo (*Strix aluco*), distingue los tipos de fotorreceptores según su absorción de longitud de onda mediante ERG, y reconocen en la retina de estos animales tres tipos de gotas de grasa: rojas/marrón con un pigmento de máxima absorción en 555nm, amarillas oscuras con una absorción máxima en 503 nm y amarillas pálidas con absorción máxima en 555nm y 463 nm; llegando a la conclusión de que el cárabo posee conos con tres pigmentos visuales con absorción máxima en amarillo, verde y azul, y, por lo tanto, tiene un sistema fotópico tricromático. Jacobs y col., (1987) describen un solo pigmento en la retina del búho real americano mediante técnicas de test fotópicos.

En nuestro estudio en el búho real hemos utilizado por una parte el estudio en fresco de las gotas de grasa de los fotorreceptores y las hemos comparado con la del pollo, y por otra parte, hemos realizado un estudio con la opsina-azul comparándola con la retina del pollo, la cual se muestra positiva (Bowmaker, 1977).

Con respecto al color de las gotas de grasa, hemos encontrado en el búho real que éstas son de dos colores: amarillas

claras y rojas/marrón; las cuales, según los estudios de Bowmaker y Martin (1977), su pigmento visual tiene una máxima absorción de 555nm, si bien las amarillas pálidas pueden ser de 555nm o 463 nm. Hay que resaltar que no hemos encontrado gotas de grasa transparentes asociadas a la visión UV; lo que coincide con los estudios conductuales en depredadores nocturnos (Koivula y col., 1997) y con los de Bowmaker y Martin, (1978) quienes indican que los depredadores nocturnos no tienen visión UV. Este hecho, unido a que la retina del búho real es negativa a la opsina-azul (fig. 11a) en comparación con la del pollo que es positiva (fig. 11b, flechas), nos hace pensar que la visión cromática del búho real es dicromática. Lo que corrobora la hipótesis de que la retina del búho real podría acercarse más a la visión de los mamíferos que a la del resto de las aves.

5.3.- EXPRESIÓN ANTIGÉNICA DE LAS NEURONAS DE LA RETINA DEL BÚHO REAL

5.3.1.-Células horizontales

Las células horizontales de la retina de las aves, peces y algunos

mamíferos son células inhibitoras que emplean como neurotransmisor el GABA. (Mosiger y col., 1986; Marrc, 1989b; Pourcho y Owczarsak, 1989; Grunert y Wässle, 1990; Müller y Mark, 1990; Davanger y col., 1991; Kalloniatis y Fletcher, 1993; Quesada y col., 1996). Algunos estudios establecen que las células horizontales de las retinas de los mamíferos no muestran inmunorreactividad para el GABA (Mosinger y col., 1986); Kalloniatis y Fletcher, 1993) con excepción del gato (Bolz y Mcguirre, 1985).

Las células horizontales que expresan GABA en la retina del pollo se pueden apreciar en la fig. 12b (flechas). Existen estudios que establecen que estas células horizontales gabaérgicas están relacionadas con aquellas que poseen axón (Quesada y col., 1996).

Las células horizontales en la retina del búho real no expresan inmunorreactividad GABA. Obsérvese la fig. 12a, que corresponde a una sección vertical de la retina del búho tratada con el anticuerpo que reconoce GABA, que en la parte más externa de la CNI (fig. 12a, CNI) no se observa ninguna célula marcada con este anticuerpo. Este dato nos lleva a formular la hipótesis de la proximidad de la retina de esta ave nocturna más a la de los mamíferos que a la de otras aves.

Podríamos suponer que el búho real no posee, por tanto, células horizontales con axón. Sin embargo, observamos con dos anticuerpos que reconocen 3CB2 y MOSP respectivamente y que marcan los axones de las células horizontales como, al igual que en la retina del pollo (fig. 14b, flechas curvas para 3CB2 y 16b, flechas para MOSP), en la retina del búho real tanto el anticuerpo que reconoce MOSP como 3CB2 marcan intensamente los axones de las células horizontales (fig. 15, flechas para 3CB2 y 16a, flechas para MOSP). Este hecho indica que las células horizontales con axón en la retina del búho no son gabaérgicas, por lo que habría que ampliar el estudio con marcadores que reconocen otros neurotransmisores para saber cuál es el que emplean dichas células horizontales en el búho.

5.3.2.- Células amacrinas

El anticuerpo 3BA8 se expresa en el pollo en una población selectiva de células amacrinas y sus expansiones en la CPI (De la Rosa y col., 1994). Así podemos observar, tanto en la retina del búho (fig. 13a) como en la retina del pollo (fig. 13b), que éste anticuerpo marca selectivamente los pericarios de algunas células amacrinas en la CNI (fig. 13a, flechas y fig. 13b, flechas), y en la capa de células ganglionares marca los pericarios de las células amacrinas desplazadas (fig. 13a, flechas curvas y fig. 13b flechas curvas); así

como sus expresiones dendríticas en la capa plexiforme interna (fig. 13a y 13b CPI). El número de células amacrinas marcadas por este anticuerpo en la retina del pollo es mayor que en la retina del búho real y, sin embargo, el marcaje de las células amacrinas desplazadas es muy semejante en las dos aves. Este hecho podría explicarse por la menor densidad neuronal que presenta la retina del búho con respecto a la del pollo.

5.4.- EXPRESIÓN ANTIGÉNICA DE LAS CÉLULAS GLIALES

5.4.1.- Expresión antigénica de las células de Müller

La expresión antigénica de la célula de Müller en la retina del búho real es igual a la de la retina del pollo. Así encontramos que la célula de Müller expresa inmunorreactividad para la GS en toda su extensión (fig. 14a, flechas), hecho éste demostrado en otras especies (Riepe y Noremborg , 1977; Linser y Moscona, 1979; Moscona y col., 1980; Noremborg y col., 1980; Linser y Moscona, 1983 y Pow y col., 1993), y en la retina del pollo (Prada y col., 1998) (fig. 14b, flecha), actuando por lo tanto como el principal reservorio de GS en la retina del búho real.

Por otra parte hemos estudiado el marcaje de la retina del búho real (fig. 15) con el anticuerpo que reconoce 3CB2, el cual se expresa únicamente en células en ciclo, astrocitos y glía radial del SNC (Prada y col., 1995), y el anticuerpo que reconoce MOSP (fig. 16a) que es una proteína específica de mielina, oligodendrocitos y células de Müller (Prada y col., 2001). En ambos casos hemos comprobado que las células de Müller de la retina del búho real, al igual que las de la retina del pollo (figs. 14b y 16b), expresan dichos anticuerpos fundamentalmente en sus prolongaciones internas (figs. 15, 16a, y 16b, flechas curvas). Este hecho, unido a que no hemos encontrado ni astrocitos ni oligodendrocitos en la retina del búho real, nos hace pensar que, al igual que en la retina del pollo (Prada y col., 2001), en la retina del búho real las células de Müller tienen un papel multipotencial adoptando distintas funciones: tales como de citoesqueleto retiniano, de reservorio de GS, de astrocitos, y de oligodendrocitos al mielinizar los axones de las células ganglionares.

5.4.2.- Expresión antigénica de las células microgliales

Hemos comentado anteriormente con estudios de microscopía electrónica la presencia de microglía en la CPI de la retina del búho real (fig. 9a, mg). Sin embargo, al emplear el anticuerpo que reconoce His-C7 (específico de células microgliales) en la retina del

búho real, observamos la presencia de éstas células también en la CNI (fig. 17a, flecha), CPI (fig. 17b, flecha) y CFNO (fig. 17c, flecha), y no las hemos encontrado a nivel de la CPE a diferencia de la retina del pollo donde sí están presentes (fig. 17d, CPE flecha). Nos podríamos plantear que en el búho real a niveles externos de la retina la función de limpieza que realizan estas células microgliales, quizás sea realizada por las células de Müller, hipótesis que tendrá que ser corroborada con estudios funcionales más amplios de la retina de este depredador nocturno.

6.- CONCLUSIONES

1.- Hemos comprobado tanto al microscopio óptico como al microscopio electrónico que la retina del búho real tiene menos densidad neuronal que la retina del pollo.

2.- Coincidimos con otros estudios sobre aves de hábito nocturno que la retina del búho real presenta un número de bastones muy superior al de conos.

3.- Los fotorreceptores y las interneuronas de la retina del búho real, muestran al microscopio electrónico dos tipologías celulares distintas: unas son electrolúcidas y otras electrondensas

4.- La población de bastones electrolúcidos es menos numerosa que los electrondensos y presentan un gradiente desde la retina central a la retina periférica, donde prácticamente llegan a desaparecer.

5.- Por el contrario, los conos electrolúcidos son más abundantes que los electrondensos, y su número a penas disminuye en la retina periférica.

6.- La retina del búho real carece de contactos eléctricos a nivel de la CPE y muestra unas barras sinápticas dos o tres veces mayores que las de la retina del pollo.

7.- Las células ganglionares de la retina del búho real son poco numerosas y se disponen en una sola hilera en la CCG, al contrario que en el pollo que se disponen en dos hileras.

8.- La retina del búho real posee mayor número de axones mielínicos que la retina del pollo.

9.- La retina del búho real tiene menos células microgliales que la retina del pollo y se localizan exclusivamente en las capas internas de la retina.

10.- Las células de Müller de la retina del búho real expresan unos patrones de inmunorreactividad para GS , 3CB2 y MOSP similares a los de las células de Müller de la retina del pollo.

11.- Las células horizontales de la retina del búho real, a diferencia de las de la retina del pollo, no expresan GABA.

12.- Al igual que sucede en la retina del pollo, los axones de las células horizontales de la retina del búho real expresan los antígenos 3CB2 y MOSP.

13.- Las células amacrinas y amacrinas desplazadas de la retina del búho real, muestran un patrón de inmunorreactividad para el anticuerpo monoclonal 3BA8 idéntico al de la retina del pollo.

14.- Las gotas de grasa que poseen los fotorreceptores de la retina del búho real son de dos colores: amarillo claro y rojo/marrón. Estos fotorreceptores expresan inmunorreactividad negativa para la opsina-azul al contrario que lo observado en los fotorreceptores de la retina del pollo que expresan inmunorreactividad positiva para dicho anticuerpo

7.- BIBLIOGRAFÍA

- **Aizenman, Y. y De Vellis, J. (1987).** Synergistic action of thyroid hormone, insulin and hydrocortisone on astrocyte differentiation. *Brain Res.* **414**: 301-308.

- **Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K. y Watson, J.D. (1992).** *Biología molecular de la célula*. Ediciones Omega, S.A., Barcelona.

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

- **Anderson, D.H.; Neitz, J. ; Kaska, D.; Fenwick, J.; Jacobs, G.H y Fisher, S.K. (1986).** Retinoid binding proteins in cone-dominant retinas. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **27**: 1015-26.

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

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

- **Ashwell, K. (1989).** Development of microglia in the albino rabbit retina. *J. Comp. Neurol.* **287**: 286-301.

- **Ball, A.K. y Dickson, A.H. (1983).** Displaced amacrine and ganglion cells in the newt retina. *Exp. Eye Res.* **36**: 199-213.

- **Barnes, S.; Merchant, V. y Mahmud, F. (1993).** Modulation of transmission gain by protons at photoreceptor output synapse. *Proc Natl Acad Sci. U.S.A.* **90**: 10081-10085.

- **Barnett, N.L; Pow, D.V. y Robinson, S.R. (2000).** Inhibition of Muller cell glutamine synthetase rapidly impairs the retinal response to light. *Glía*. **30**: 64-73.

- **Barnstable, C.J. (1993).** Glutamate and GABA in retinal circuitry. *Curr. Opin. Neurobiol.* **3**:520-525.

- **Barres, A.B. y Barde, Y.A. (2000).** Neuronal and glial cell biology. *Current Opinion in Neurobiology.* **10**: 642-648.

- **Bennet, A.T.D. y Cuthill,I.C. (1994).** Ultraviolet vision in birds: what is its function? *Vision Res.* Vol. **34** No.11, pp.1471-1478.

- **Berliner, M.L. (1931).** Citologyc studies on the retina; I. Normal coexistence of oligodendroglia and myelinated nerve fibers. *Arch. Ophthalmol.* **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. y Dahl, D. (1979).** The radial glia of Müller in the rat retina and their response to injury. An immunofluorescence study with antibodies to the glial fibrillary acidic (GFA) protein. *Exp. Eye Res.* **28**: 63-69.

- **Bito, L.Z.; Davson, H. y Fenstermacher, J.D. (1977).** The ocular and cerebrospinal fluids. Eds. Fenstermacher, J.D. and Davson, *H Academic Press*, New York.

- **Blackwell, B.F. (2002).** Understanding avian vision: The key to using Light in bird management. *Proc. 20th Vertebr. Pest. Conf.*

(R.M. Timm and R.H. Schmidt, Eds.) Published at Univ. Of Calif., Davis. 146-152.

- **Blackwell, B.F. (2002).** Understanding avian vision: The key to using light in bird management. *USDA APHIS Wildlife Services, National Wildlife Research Center, Staff publications*. Ohio Field Station, Sandusky. Ohio. University of Nebraska.

- **Bok, D., Ong, D.E. y Chytil, F. (1984).** Immunocytochemical localization of cellular retinol binding protein in the rat retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **25**: 877-883.

- **Bolz, J. y Mcguirre, B.A. (1985).** GABA-like immunoreactivity in horizontal cells of the cat retina. *Soc. Neurosci. Abst.* **11**: 1215.

- **Bonventure, N; Jardon, B.; Sahel, J. y Wioland, N. (1989).** Neurotransmission in the frog retina: posible physiological and histological correlations. *Doc. Ophthalmol.* **72**: 71-82.

- **Bowmaker, J.K. (1977).** The visual pigments, oil droplets and spectral sensitivity of the pigeon. *Vision Res.* **17**: 1129-1138.

- **Bowmaker J.K., (1980).** Birds see ultraviolet light. *Nature.* **284**: 306.

- **Bowmaker, J.K. (1991).** Visual pigments, oil droplets and photoreceptors. *In Vision and Visual Dysfunction.* Vol **6** (ed. P. Gouras), pp. 108-127. Boston: CRS Press Inc.

- **Bowmaker, J.K. y Knowles, A. (1977).** The visual pigments and oil droplets of the chicken retina. *Vision Res.* **17**: 755-764.

- **Bowmaker J.K., Kovach, J.K., Whitmore, A.V. y Loew, E.R. (1993).** Visual pigments and oil droplets in genetically manipulated and carotenoid deprived quail: A microspectrophotometric study. *Vision Research*. **33**: 571-578.

- **Bowmaker, J.K. y Martin, G.R. (1978).** Visual pigments and colour vision in nocturnal bird, *Strix aluco* (Tawny owl). *Vision Res.* **18(9)**: 1125-1130.

-**Boya, J.; Calvo, J.; Carbonell, A.L. y García-Mauriño, E. (1986).** Nature of macrophages in rat brain. *Acta Anat.* **127**: 142-145.

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

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

- **Boycott, B.B. y Dowling, J.E. (1969).** Organization of the primate retina: Light microscopy. *Phil. Tras. Roy. Soc. B.* **255**: 109-184.

- **Bradford, H.F. (1988).** *Fundamentos de Neuroquímica.* Editorial Labor, S.A. Barcelona.

- **Braekevelt, C.R. (1989).** Photoreceptor fine structure in the bobtail goanna (*Tiliqua rugosa*). *Histol. Histopath.* **4**: 281-286.

- **Braekevelt, C.R. (1990).** Retinal photoreceptor fine structure in the mallard duck (*Anas platyrhynchos*). *Histol. Histopath.* **5**: 123-131.

- **Braekevelt, C.R. (1992 a).** Retinal photoreceptor fine structure in the red-tailed hawk (*Buteo jamaicensis*). *Anat. Histol. Embryol.*

- **Braekevelt, C.R. (1992 b).** Retinal photoreceptor fine structure in the great blue heron (*Ardea Herodias*). *Anat. Histol. Embryol.*

- **Braekevelt, C.R. (1993).** Fine structure of the retinal photoreceptors of the great horned owl (*Bubo virginianus*). *Histol Histopath.* **8**: 25-34.

- **Braekevelt, C.R.; Smith, S.A. y Smith, B.J. (1996).** The fine structure of the retinal photoreceptors of the barred owl (*Strix varia*). *Histol. Histopathol.* **11** (1): 79-88.

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

- **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.

- **Bunt, A.H. y Minckler, D.S. (1977).** Displaced ganglion cells in the retina of the monkey. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **16**: 95-98.

- **Bunt, A.H. (1978).** Fine structure and radioautography of rabbit photoreceptor cells. *Invest. Ophthalmol.* **17**: 90-104.

-
- **Bunt, A.H.; Lund, R.D. y Lind, J.S. (1974).** Retrograde axonal transport of horseradish peroxidase by ganglion cells of the albino rat retina. *J. Comp. Neurol.* **73**: 215-228.
- **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.
- **Cammer, W. (1990).** Glutamine synthetase in the central nervous system is not confined to astrocytes. *Journal of Neuroimmunology.* **26**: 173-178. Elsevier.
- **Cardoso, B.N.; Buijs, R. y Van der Want, J. (1991).** Glutamate-like immunoreactivity in retinal terminals in the nucleus of the optic tract in rabbits. *J. Comp. Neurol.* **309**: 261-270.
- **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.
- **Caspi, R.R. y Roberge, F.C. (1989).** Glial cells as suppressor cells : Characterization of the inhibitory function. *J. Autoimmun.* **2**: 709-722.
- **Chabot, P. y Vincent, M. (1990).** Transient expression of an intermediate filament-associated protein (IFAPa-400) during in vivo and in vitro differentiation of chick embryonic cells derived from neuroectoderm. *Dev. Brain. Res.* **54**: 195-204.
- **Chader, G.J. (1971).** Hormonal effects on the neural retina. *Arch. Biochem Biophys.* **144**: 657- 662.

- **Chader, G.J. y Reif-Lerher, L. (1972).** Hormonal effects on the neural retina: corticoid uptake, specific binding and structural requirements for the induction of glutamine synthetase. *Biochim. Biophys. Acta.* **264**: 186-196.

- **Chan, C. CC.; Rozenszajn, L.A.; Nusenblatt, R.B.; Muellenberg-Coulombre, C.; Hsu, S.M.; Palestine, A.G.; Lando, Z. y BenEzra, D. (1984).** Monoclonal antibodies to Müller's cells of the retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **25**: 1007-1012.

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

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

- **Cohen A. I., (1972).** Rods and cones. In: *Handbook of sensory physiology.* Vol. VII/2. *Physiology of photoreceptor organs.* Fuortes M.(ed). Springer-Verlag. Berlín. pp 63-110.

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

- **Coopers, A.J.L.; Vergara, F. y Duffy, T.E. (1983).** Cerebral glutamine synthetase. *Glutamine, Glutamate and GABA in the Central Nervous System.* L. Hertz; E. Kvamme; E.G. McGeer and A. Schusboe. Eds. Alan R. Liss, New York, pp. 77-93.

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

- **Crescitelli, F. (1972).** The visual cells and visual pigments of the vertebrate eye. In: *Handbook of sensory physiology*. Vol. VII/1. Photochemistry of vision. Dartnell H.S.A. (ed). Springer-Verlag. Berlín. pp 245-363.

- **Cuadros, M.A. y Navascués, J. (1998).** The origin and differentiation of microglial cells during development. *Prog Neurobiol.* **56**:173-186.

- **Cuthill, I.C.; Partridge, J.C.; Bennett, A.T.D.; Church, S.C.; Hart, N.S. y Hunt, S. (2000).** Ultraviolet vision in birds. *Adv. Study Bahav.* **29**: 159-214.

- **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-typoe 100 A filament prortein, in rat astrocytes and Müller glia. *J. Histochem. Cytochem.* **30**: 207-213.

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

- **Davanger, S.; Ottersen, O.P. y Storm-Mathisen, J. (1991).** Glutamate , GABA and glycine in the human retina: An immunocytochemical investigation. *J. Comp. Neurol.* **311**: 483-494.

- **De la Rosa, E.J.; Arribas, A.; Frade, J.M. y Rodríguez-Tebar, A. (1994).** Role of neurotrophins in the control of neural development: Neurotrophin-3 promotes both neuron differentiation and survival of cultured chick retinal cells. *Neuroscience* Vol. **58**, No. 2: 347-352.

- **De Guevara, R.; Pairault, C. y Pinganaud, G. (1994).** Expression de la vimentine et de la GFAP et développement de la rétine chez la truite. *Sciences de la vie*. **317**: 737-741.

- **De Vellis, J.; Wu, D.K. y Kumar, S. (1986a).** Enzyme induction and regulation of protein synthesis. In: S. Fedoroff and A. Vernadakis (Eds.). *Astrocytes Biochemistry, Physiology and Pharmacology of Astrocytes*. Vol.2. *Academic Press*, New York, pp.209-237.

- **De Vellis, J.; Wu, D. y Kumar, S. (1986 b).** Enzyme induction and regulation of protein synthesis. *Astrocytes: Biochemistry, Physiology and Pharmacology of Astrocytes*. Vol.2 (Fedoroff, S. And Vernadakis, A., eds.), pp 209-228. *Academic Press*, New York.

- **De Vries, M.J.; Nunes Cardoso, B.; Van der Want, J.; De Wolf, A. y Meier, J.H. (1993).** Glutamate immunoreactivity in the terminals of the retinohypothalamic tract of the brown Norwegian rat. *Brain. Res.* **612**: 231-237.

- **Deutschlander, M.E. y Phillips, J.B. (1995).** Characterization of an ultraviolet photoreception mechanism in the retina of an amphibian, the axolotl (*Ambystoma mexicanum*). *Neurosci. Lett.* **197**: 93-96.

- **Diez, M. (1972).** Erdkröten können UV-Light sehen. *Naturwissenschaften*. **59**: 316.

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

- **Dogiel, A. (1888).** Uber das verhalten der nervösen element in der retina der ganoiden reptilium, vógel und sáugetiere. *Anat. Anz.* **3**: 133-143.

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

- **Dowling J.E., (1970).** Organization of vertebrate retina. *Invest. Ophthalm.* **9**: 655-680.

- **Dowling, J. E. y Ehinger, B. (1978).** The interplexiform cell system. I. Synapses of the dopaminergic neurons of the goldfish retina. *Proc. R. Soc. Lond. (Biol.)* **201**: 7-26.

- **Dowling, J. E.; Ehringer, B. y Hedden, W.L. (1976).** The interplexiform cell: a new type of retinal neuron. *Invest. Ophthalmol.* **15**: 916-926.

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

- **Duque, J.E.; Morales, G. y Moscoso, O.H. (2000).** La Neuroglía. *Revista Médica de Risaralda.* **6(2)**: 29-35.

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

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

- **Dreher, Z.; Distler, C. y Dreher, C.J. (1994).** Vitread proliferation of filamentous processes in avian Muller cells and its putative functional correlates. *J. Comp. Neurol.* **350**: 96-108.

- **Drejer, J.; Meier, E. y Schousboe, A. (1980).** Novel neuron-related regulatory mechanisms for astrocytic glutamate and GABA high affinity uptake. *Neurosci. Lett.* **37**: 301-306.

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

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

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

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

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

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

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

- 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.

- Ellingson, J.M.; Fleishman, L.J. y Low, E.R. (1995). Visual pigments and spectral sensitivity of the diurnal gecko *Gonatodes albogularis*. *J. Comp. Physiol. A*. **177**: 559-567.

- Emmerton, J. y Remy, M. (1983). The pigeon's sensitivity to ultraviolet and visible light. *Experientia*. **39**: 1161-1163.

- Fite, K.V. (1973). Anatomical and behavioural correlates of visual acuity in the Great Horned Owl. *Vision Res.* **13**: 219-230.

- Fleishman, L.J.; Loew, E.R. y Leal, M. (1993). UV vision in lizards. *Nature*. 365-387.

- Foroutan, A.; Behbehan, M.M. y Anderson, D.K. (1996). Effects of methylprednisolone on the GABA- and glutamate-induced currents: Relevance to glucocorticoid-induced neurotoxicity and brain aging. *Elsevier Science Inc.* **61**:354-366.

- Friedenwald, J. S. y Chan, E. (1932). Pathogenesis of retinitis pigmentosa with a note on the phagocytic activity of Muller fibers. *Arch. Ophthalmol.* **81**: 173-181.

- **Gallego, A. (1971).** Horizontal and amacrine cells in the mammal's retina. *Vision. Res. Supplement* n°3: 33-50.

- **Gallego, A. (1975).** Las células horizontales de la retina de los vertebrados. *An. Real Acad. Nac. Med.* Instituto de España, Madrid.

- **Gallego, A. (1976).** Comparative study of the horizontal cells in the vertebrate retina: mammals and birds. In: *Neural Principles in Vision* (F. Zettler and R. Weiler, eds.) pp. 26 - 62. Springer-Verlag, Berlin.

- **Génis-Gálvez, J. M., Prada, F. A. y Armengol, J. A. (1979).** Evidence of three types of horizontal cells in the chick retina. *Jap. J. Ophthal.* **23**: 378 - 387.

- **Génis-Gálvez, J.M.; Puelles, L. y Prada, C. (1977).** Inverted (displaced) retinal amacrine cells and their embryonic development in the chick. *Exp. Neurology.* **56**: 151-157.

- **Gerschenfeld, H.M.; Neyton, J.; Piccolino, M. y Witkovsky, P. (1982).** L- horizontal cells of the turtle: network organization and coupling modulation. *Biomed. Res. (Suppl.)* **3**: 21-32.

- **Gery, I.; Mochizuki, M. y Nussenblatt, R.B. (1986).** Retinal specific - antigens and immunipathogenic processes they provoke. *Prog. Ret. Res.* **5**: 75-109.

- **Goldsmith, T.H. (1990).** Optimizacion, constraint, and history in the revolution of eyes. *Q. Rev. Biol.* **65**: 281-322.

- **Goldsmith, T.H. (1991).** Optimization, constraint and history in the evolution of eyes. *Quarterly Review of Biology*. **65**: 281-322.

- **Goldsmith, T.H.; Collins, J.S. y Licht, S. (1984).** The cone oil droplets of avian retinas. *Vision Res.* **24**: 1661-1670.

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

- **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.

- **Goureau, O.; Reigner, R.F. y Coutrois, Y. (1999).** Requirement for nitric oxide in retinal neuronal cell death induced by activated Muller glial cells. *J. Neurochem.* **72**: 2506-2515.

- **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.

- **Grunert, U. y Wässle, H. (1990).** GABA-like immunoreactivity in the Macaque monkey retina: a light and electron microscopy study. *J. Comp. Neurol.* **297**: 509-524.

- **Grünet, U. y Wässle, H. (1990).** GABA-like immunoreactivity in the Macaque monkey retina: a light end electron microscop study. *J. Comp. Neurol.* **297**: 509-524.

- **Hallermayer, K.; Harmening, C. y Hamprecht, B. (1981).** Cellular localization and regulation of glutamine synthetase in primary cultures of brain cells from newborn mice. *J. Neurochem.* **37**: 43-52.

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

- **Hamburger, V. y Hamilton, H.L. (1951).** A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morphol.* **88**: 48-50.

- **Harosi, F.I. (1994).** An analysis of two spectral properties of vertebrate visual pigments. *Vision Res.* **34**:1359-1367.

- **Hart, N.S. (2001).** Variations in the cone photoreceptor abundance and the visual ecology of birds. *J. Comp. Physiol. A.* **187**: 685-697.

- **Hart, N.S. y Vorobyuev, M. (2005).**Modelling oil droplet absorption spectra and spectral sensitivities of bird cone photoreceptors. *J. Comp. Physiol. A.* **191**: 381-192.

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

- **Hedden, W. y Dowling, J. E., (1978).** The interplexiform cell. II. Effects of dopamine on goldfish retinal neurons. *Proc. R. Soc. Lond. (Biol.)* **201**: 7-6.

- **Hertz, L. y Schusboe, A., (1980).** Interactions between neurons and astrocytes in the turnover of GABA and glutamate. *Brain Res. Bull.* **5** (Suppl.2): 398-395.

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

- **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.

- **Holländer, H.; Makarow, F.; Stefani, F.H. y Stone, J. (1995).** Evidence of constriction of optic nerve axons at the lamina cribosa in the normotensive eye in humans and other mammals. *Ophthalm Res.* **27**: 296-309.

- **Honkavaara, J.; Koivula, M.; Korpimäki, E.; Siitari, H. Y Viitala, J. (2002).** Ultraviolet vision and foraging in terrestrial vertebrates. *Oikos.* **98**: 505-511.

- **Hughes, A. y Wieniawa-Narkiewicz, E. (1980).** A newly identified population of presumptive microneurons in the cat retinal GC layer. *Nature.* **284**: 468-470.

- **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.

- **Hume, D.A.; Perry, V.H. y Gordon, S. (1983).** Immunohistochemical localization of a macrophage-specific antigen in developing mouse retina: Phagocytosis of dying neurons and

differentiation of microglial cells to form a regular array in the plexiform layers. *J. Cell Biol.* **97**: 253-257.

- **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.

- **Huth, H.H. y Burkhardt, D. (1972).** Der spektrale sehbereich eines Violettöhr-kolibris. *Naturwiss.* **59**: 650.

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

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

- **Ishikawa, S.; Nakazawa, M.; Ishikawa, A.; Ishiguro, S. y Tamai, M. (1995).** Alteration of glutamine concentration in the vitreous humor in patients with proliferative vitreoretinopathy. *Curr. Eye Res.* **14**: 191-197.

- **Jacobs, G.H. (1992).** Ultraviolet Vision in vertebrates. *Am. Zool.* **32**: 544-554.

- **Jacobs, G.H.; Crognale, M. y Fenwick, L. (1987).** Cone pigment of the Great Horned Owl. Short communications. The Cooper Ornithological Society. *The Condor.* **89**: 436-439.

- **Jacobs, G.H.; Neitz, J. y Deegan, J.F. (1991).** Retinal receptors in rodents maximally sensitive to ultraviolet light. *Nature.* **353**: 655-656.

- **Jacobs, G.H.; Neitz, M. y Neitz, J. (1996).** Mutation in S-cone pigmente genes and the absence of colour vision in two species of nocturnal primate. *Proc. R. Soc. B. Biol. Sci.* **263 (1371)**: 705-10.

- **Jane, S.D. y Bowmaker, J.K. (1988).** Tetrachromatic colour vision in the duck (*Anas platyrhynchos* L.): Microspectrophotometry of visual pigments and oil droplets. *Journal of Comparative Physiology. A.* **162**: 225-235.

- **Jeon, C.J. y Masland, R.H. (1993).** Selective accumulation of diamidino yellow and chromomycin A3 by retinal glial cells. *J. Histochem. Cytochem.* **41**: 1651-1658.

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

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

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

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

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

- **Kahn, A.J. (1974).** An autoradiographic analysis of the time and appearance of neurons in the developing chick neural retina. *Dev. Biol.* **38**: 30-40.

- **Kahn, M.A.; Ellison, J.A.; Speight, J. y De Vellis, J. (1995).** CNTF regulation of astrogliosis and the activation of microglia in the developing rat central nervous system. *Brain Res.* **685**: 55-67.

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

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

- **Koivula, M.; Korpimäki, E. y Viitala, J. (1997).** Do Tengmalm's owls see vole scent marks visible in ultraviolet light? *Anim. Behav.* **54**: 873-877.

- **Koivula, M. y Viitala, J. (1999).** Rough-legged buzzards use vole scent mark to asses hunting areas. *J. Avian Biol.* **30**: 329-332.

- **Kim, M.K.; Chan, C.C.; Belfort, R.; Farah, M.; Burnier, M.P.; Nussenblatt, R.B.; Kuwabara, T. y Palestine, A.G. (1987).**

Histopathologic and immunopathologic features of subretinal fibrosis and uveitis syndrome. *Am. J. Ophthalmol.* **104**: 15-23.

- **Kimelberg, H.K.; Biddlecome, S. y Bourke, R.S. (1979).** STS-inhibitable CL- transport and Na⁺ dependent H⁺ production in primary astroglial culture. *Brain. Res.* **173**: 111-124.

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

- **Kljavin, I.J. y Reh, T.A. (1991).** Müller cells are a preferred substrate for *in vitro* neurite extension by rod photoreceptor cells. *J. Neurosci.* **11**: 2985-2994.

- **Kolb, H. y West, R.W. (1977).** Synaptic connections of the interplexiform cell in the retina of the cat. *J. Neurocytol.* **6**:155-170.

- **Kolliker, R.A. (1854).** Mikrosk. *Anat. Gewebelehre Mensch.* **2**, part 2, p. 605.

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

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

- **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.

- **Lasater, E., y Dowling, J. E. (1985)**. Dopamine decreases conductance of electrical junctions between cultured retinal horizontal cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **82**: 3025 - 3029.

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

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

- **Legrand, C.; 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.

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

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

- **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.

- **Lewis, G.P.; Erickson, P.A.; Guérin, C.J.; Anderson, D.H. y Fisher, S.K. (1992)**. Basic fibroblast growth factor: A potential

regulator of proliferation and intermediate filament expression in the retina. *J. Neurosci.* **12**: 3968-3978.

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

- **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 Stone, J. (1988).** The development of astrocytes in the cat retina: Evidence of migration from the optic nerve. *Dev. Brain. Res.* **44**: 73-85.

- **Ling, E.A. y Wong, W.C. (1993).** The origin and nature of ramified and amoeboid microglia: a historical review and current concepts. *Glia.* **7**: 9-18.

- **Linington, C.; Webb, M. Yy Woodhams, P. L. (1984).** A novel myelin-associated glycoprotein defined by a mouse monoclonal antibody. *J. Neuroimmunol.* **6**: 387-396.

- **Linser, P.J. y Moscona, A.A. (1979).** Induction of glutamine synthetase in embryonic neural retina: localization in Müller fibers and dependence on cell interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **76**: 6476-6480.

- **Linser, P. J. y Moscona, A.A. (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 gliotoxic

agent alfa-aminoadipic acid. *Developmental Brain Research*. **1**:103-119.

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

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

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

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

- **Loew, E.R. (1994)**. A third, ultraviolet-sensitive, visual pigments in the Tokay gecko (*Gekko gekko*). *Vision Res.* **34**: 1427-1431.

- **Loew, E.R.; Govardovskii, V.I.; Rolhlich, P, y Szel, A. (1996)**. Microspectrophotometric and immunocytochemical identification of ultraviolet photoreceptors in geckos. *Visual Neurosci.* **13**: 247-256.

- **López, R; López-Gallardo, M.; Medina, J.I.; Ramos, M.; Ramírez, G. y Prada, C. (1997)**. A streptomycetes fradiae protease dissociate structurally preserved neurons and glial cells from the embryonic and adult central nervous system of vertebrates. *J. Neurosci. Methods.* **73**: 9-16.

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

- **Lynn, W.O. (1981).** Crystalline pteridines in the stromal pigment cells of the iris of the great horned owl. *Cell Tissue Res.* **217**: 387-395.

- **Lythgoe, J.N. (1979).** The Ecology of vision. *Oxford University Press*, Oxford.

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

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

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

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

- **Maier, E. J. (1994a).** Ultraviolet-vision in a passeriform bird: From receptor spectral sensitivity to overall spectral sensitivity in *Leiothrix lutea*. *Vision Research.* **34**: 1415-1418.

- **Maier, E. J. (1994b).** To deal with the “invisible” on the biological significance of UV sensitivity in birds. *Naturwissenschaften.* **80**: 476-478.

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

- **Marc, R.E. (1989a)**. The role of glycine in the mammalian retina. In: *Progress in Retinal Research*. Osborne, N.N.; Chader, G.J., (eds.) Vol. **8**. Pergamon Press. Oxford, 67-107.

- **Marc, R.E. (1989b)**. The anatomy of multiple GABAergic and glycinergic pathways in the inner plexiform layer of the goldfish retina. In: *Neurobiology of the Inner Retina*. Weiler, R.; Osborne, N.N. (eds.) Springer-Verlag. Berlin, 3-64.

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

- **Mariani, A. P. y Leure du Préé, A. E. (1977)**. Horizontal cells of the pigeon retina. *J. Comp. Neurol.* **175**: 13 -26.

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

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

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

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

- **McCabe, C.F. y Cole, G.J. (1992).** Expression of the barrier-associated proteins EAP-300 and claustrin in the developing central nervous system. *Dev. Brain Res.* **70**: 9-24.

- **McGeer, E.G.; McGeer, P.L. y Thomson, S. (1983).** GABA and glutamate enzymes. *Glutamine, Glutamate and GABA in the Central Nervous System.* L. Hertz; E, Kvamme; E.G. McGeer and Schousboe, eds. Alan R. Liss. New York, pp3-17.

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

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

- **Medina, J.I. (1996).** Diferenciación de las células de Muller (glía) de la retina. Estudio en el embrión de pollo. *Ediciones Universidad Complutense. Tesis Doctoral.* 1996.

- **Meller, D.B. y May, H.C. (1973).** The potographical distribution of rods and cones in the adult chicken retina. *Exp. Eye Res.* **17**: 347-355.

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

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

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

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

- **Miller, R.F. y Slaughter, M., (1985).** Excitatory aminoacid receptors in the vertebrate retina: In: *Retinal transmitters and modulators: models for the brain*. Vol. **II** (Morgan W.W., ed) 123-160. Boca Raton: CRC

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

- **Morris, V.B. (1970).** Symmetry in a receptor mosaic demonstrated in the chick from the frequencies, spacing and arrangement of the types the retinal receptor. *J. Comp. Neurol.* **140**, 359-398.

- **Morrison, R. y De Vellis, J. (1983).** Differentiation of purified astrocytes in a chemically defined medium. *Dev. Brain Res.* **9**: 337-345.

- **Moscona, A.A. (1972).** Induction of glutamine synthetase in embryonic neural retina: a model for the regulation of specific gene expression in embryonic cells. In *A. Monroy and R. Tsanev (Eds.)*,

Biochemistry of Cell Differentiation, FEBS Symp. Vol. **24**. Academic Press, London. pp. 1-23.

- **Moscona, A.A. (1986)**. Hormonal regulation of glutamine synthetase in the retina: role of cell interactions. *Cellular Endocrinology: Hormonal of Embryonic and Cellular Differentiation*, pp. 297-306.

- **Moscona, A.A.; Linser, P.; Mayerson, P. y Moscona, M. (1979)**. Regulatory aspects of the induction of glutamine synthetase in embryonic neural retina. In *Glutamine Synthetase Symposium*. University of Mexico, in press.

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

- **Moscona, M. y Moscona, A.A. (1979)**. The development of inducibility for glutamine synthetase in embryonic neural retina: inhibition by BrdU. *Differentiation*. **13**: 165-172.

- **Moscona, A.A. y Piddington, R. (1966)**. Stimulation by hydrocortisone of premature changes in the developmental pattern of glutamine synthetase in embryonic retina. *Biochem. Biophys. Acta*. **121**: 409-411.

- **Mosinger, J.L.; Yazula, S. Y Studholme, K.M. (1986)**. Gaba-like immunoreactivity in the vertebrate retina: a species comparison. *Exp. Eye Res.* **42**: 631-644.

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

- Müller, B.; Peichl, L.; De Grip, W.J. y Korf, H.W. (1989). Opsin and S-antigen-like immunoreactions in photoreceptors of the tree shrew retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **30**: 530-535.

- Müller, J.F. y Marc, R.E. (1990). GABAergic and glycinergic pathways in the inner plexiform layers of the goldfish retina. *J. Comp. Neurol.* **291**: 281-304.

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

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

- Navascués, J.; Moujahid, A.; Quesada, A. y Cuadros, M.A. (1994). Microglia in the avian retina: immunocytochemical demonstration in the adult Quail. *J.Neurosci.* **18**: 2506-2506.

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

- Neyton, J., Piccolino, M. Y Gerschenfeld, H. M., (1982). Dopamine and drugs that increase intracellular cyclic AMP decrease junctional communication between L-horizontal cells. (Abstr.) *Soc. Neurosci. Abstr.* **8**: 37-46.

-
- **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. (1991).** Sodium-bicarbonate cotransport in retinal müller (glial) cells of the salamander. *J. Neurosci.* **11**: 3972-2983.

 - **Newman, E.A. (1993).** Inward-rectifying potassium channels in retinal glial (Müller) cells. *J. Neurosci.* **13**: 3333-3345.

 - **Newman, E.A.; Frambach, D.A. y Odette, L.L. (1984).** Control of extra cellular potassium levels by retinal glial cells K⁺ siphoning. *Science.* **225**: 1174-1175.

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

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

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

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

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

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

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

- **Ödeen, A. y Hastad, O. (2003).** Complex distribution of avian color vision systems revealed by sequencing the SWS1 opsin from total DNA. *Mol. Biol. Evol.* **20**: 885-861.

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

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

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

- **Ono, K.; Tsmuri, T.; Kishi, T.; Yokota, S. y Yasni, Y. (1998).** Developmental appearance of oligodendrocytes in the embryonic chick retina. *J. Comp. Neurol.* **398**: 309-388.

-
- **Palatroni, P.; Gabrielli, M.G. y Taborro, R. (1990).** Carbonic anhydrase activity in mammalian retina. Developmental aspects in altricial and precocial species. *Acta Histochem.* **88**: 187-198.
- **Palay, S.L. y Chan-Palay, V. (1974).** Cerebellar cortex: Cytology and organization. Springer-Verlag. Berlin. Heideberg, New York.
- **Patel, A.J.; Hunt, A., Gordon, R.D. y Balazs, R. (1982).** The activities in different neuronal cell types of certain enzymes associated with the metabolic compartmentation of glutamate. *Dev. Brain Res.* **4**: 3-11.
- **Paton, M.C.; Blum, A.S.; Otero, R.M. y Barnstable, C.J. (1986).** Acell surface molecule distribution dorsoventral gradient in the perinatal rat retina. *Nature.* **324**: 459-462.
- **Peterson, R.E.; Fadool, J.M.; Mclintock, J. y Linser, P.J. (2001).** Muller cell differentiation in the Zebrafish neural retina: Evidence of distinct early and late stages in cell maturation. *J.Comp. Neurol.* **429**: 530-540.
- **Partridge, J.C. (1989).** The visual ecology of avian cone oil droplets. *J. Comp. Physiol. A.***165**: 415-426.
- **Petry, H.M.; Erichsen, J.T. y Szél, A. (1993).** Immunocytochemical identification of photoreceptor populations in the tree shrew retina. *Brain Res.* **616**: 344-350.
- **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.

- **Piddington, R. (1970).** Steroid control of the normal development of glutamine synthetase in the embryonic chick retina. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **23**: 729-737.

- **Piddington, R. y Moscona, A.A. (1967).** Precocious induction of retinal glutamine synthetase by hidrocortisone in the embryo and in the culture. Age-dependent differences in tissue response. *Biochim. Biophys. Acta.* **141**: 429-432.

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

- **Pourcho, R. G. y Owczarzak, H.T. (1989).** Distribution of GABA immunoreactivity in the cat retina: a light and electron microscopic study. *Vis. Neurosci.* **2**: 425-436.

- **Pow, D.V.; Crook, D.K. y Wong, R.O.L. (1994).** Early appearance and transient expression of putative amino acid neurotransmitters and related molecules in the developing rabbit retina: An immunocytochemical study. *Vis. Neurosci.* **11**:1115-1134.

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

- **Prada, C.; Medina, J.I.; López, R.; Génis-Gálvez, J.M. y Prada, F.A. (1992).** Development of displaced ganglion cells in the chick: neurogenesis and morphogenesis. *J. Neurosci.* **12**: 3781-3788.

- **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.; Armengol, J.A. y Génis-Gálvez, J.M. (1979). La célula de Müller de la retina del camaleón (Chamaleo Chamaleo). *Morfología normal y patológica Sec. A.* **3**: 129-144.

- Prada, F.A.; Armengol, J.A. y Génis-Gálvez, J.M. (1982). Morphological aspects of the differentiation of glial cells in the chick optic nerve. *Mor. Nor. Patol.* **6 (3)**: 305-309.

- Prada, F.A.; Armengol, J.A., y Génis-Gálvez, J.M. (1984). Displaced Horizontal Cells in the Chick Retina". *J. of Morphol.* **128**: 221-225.

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

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

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

- Prada, F.A.; Quesada, A.; Dorado, M.E.; Chmielewski, C. y Prada, C. (1998). Glutamine Synthetasa (GS) activity and spatial and temporal patterns of GS expression in the developing chick retina: relationship with synaptogenesis in the outer plexiform layer. *Glia.* **22**: 1-16.

- Prada, F.A.; Quesada, A.; Aguilera, Y.; Santano, C. y Prada, C. (2001). The Müller cell express myelin oligodendrocyte specific protein (MOSP). *Ophthal. Res.* **33**: 246.

- **Probst, R.; Pavlicev, M. y Vitala, J. (2002).** UV reflecting vole scent marks attract a passerine, the great grey shrike *lanius excubitor*. *J. Avian Biol.* **33**: 437-440.

- **Quesada, A.; Chmielewski, C.; Espinar, A.; Ambrosiani, J. y Prada, F.A. (1988b)** Pale and Dark Bipolar Cells in the Chick Retina". *Acta Anat.* **132**: 256-259.

- **Quesada, A.; Chmielewski, C.; Génis-Gálvez, J.M. y Prada, F.A. (1996).** Immunohistochemical localization of GABA in chameleon retina (Chamaleo chamaleo). *Cell Biol.* Vol. 20, **6**: 395-400.

- **Quesada, A. y Génis-Galves, J.M. (1981).** Morphological Study of the Bipolar Cells in the Retina of the Chameleon (Chamaleo chamaleo). *Morf. Nor. y Patol.* **5**: 55-68.

- **Quesada, A. y Génis-Galves. J.M. (1983).** The Interplexiform Cell in the Chameleo Retina *Zbl. Vet. Med. C Anat. Histol. Embryol.* **12**: 70-76.

- **Quesada, A. y Génis-Galves. J.M. (1985).** Morphological and Structural Study of Landolt's club in the Chick Retina". *J. of Morphol.* **184(2)**: 205-214.

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

- **Quesada, A.; Prada, F.A. y Génis-Gálvez, J.M. (1988a).** Bipolar Cell in the Chicken Retina. *J. of Morphol.* **197**: 337-351.

- **Rakic, P. (1972).** Mode of cell migration to the superficial layer of fetal monkey neocortex. *J. Comp. Neurol.* **145**: 61- 84.

- **Ramírez, J.M.; Triviño, A.; Ramírez, A.I.; Salazar, J.J. y García Sánchez, J. (1994).** Immunohistochemical study of human retinal astroglia. *Vision Res.* **34**: 1935-1946.

- **Ramírez, J.M.; Triviño, A.; Ramírez, A.I.; Salazar, J.J. and García Sánchez, J. (1996).** Structural specializations of human retinal glial cells. *Vision Res.* **36**: 2029-2036.

- **Ramón y Cajal, S. (1892).** La retina des vertebres. *La Cellule.* **9**:119-225.

- **Reichenbach, A. (1987).** Quantitative and qualitative morphology of rabbit retinal glia. A light microscopical study on cells both in situ and isolated by papaine. *J. Hirnforsch.* **28**: 213-220.

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

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

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

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

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

- **Reichenbach, A.; Stolzenburg, J.U., Eberhardt, W.; Chao, I.; Dettmer, D. and Hertz, L. (1993).** What do retinal Müller (glial) cells do for their neuronal "small siblings". *J. Chem. Neuroanat.* **6**: 201-213.

- **Reichenbach, A. y Wohlrab, F. (1983).** Quantitative properties of Müller cells in rabbit retina as revealed by histochemical demonstration of NADH-diaphorase activity. *Albrecht von Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* **220**: 81-83.

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

- **Reif-Lehrer, L. y Amos, H. (1968).** Hydrocortisone requirement for the induction of glutamine synthetase in chick embryo retinas. *Biochem. J.* **106**: 425-430.

- **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.

- **Ridet, J.L.; Malhotra, S.K.; Privat, A. y Gage, F.H. (1997).** Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. *Trends Neurosci.* **20**: 570-577.

- **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.

- **Riepe, R.E. y Noremborg, 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.

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

- **Roberts, E. (1986).** GABA: the road to neurotransmitter status. In: Olsen, R.W. and Venter, C.J. (Eds). *Benzodiazepine/GABA receptors and chloride channels: structural and functional properties.* New York: Alan R. Liss, p. 1-39.

- **Roberts, E. y Frankel, S. (1950).** Gamma-aminobutyric acid in brain: its formation from glutamic acid. *J. Biol. Chem.* **187**: 55-527.

- **Robinson, S. R. (1994).** Early vertebrate colour vision. *Nature.* **367**: 121.

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

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

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

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

- **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.

- **Sarthy, P.V. (1995).** Localization of α -tubulin and carbonic anhydrase II mRNAs in isolated Müller cells. *Exp. Eye. Res.* **60**: 103-105.

- **Sarthy, P.V.; Brodjian, S.J. y Smith, S. (1997).** Ciliary neurotrophic factor (CNTF) induces reactive gliosis and GFAP gene expression in Müller cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **38**: S590.

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

- **Sassoé, P.M.; Panzanelli, P.; Artero, C.; Fasolo, A. y Cantino, D. (1992).** Comparative study of glial fibrillary acidic protein

(GFAP)-like immunoreactivity in the retina of some representative vertebrates. *Eur. J. Histochem.* **36**: 467-477.

- **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.

- **Schmilt, E.A. y Dowlin, J.E. (1996)**. Comparison of topographical patterns of ganglion and photoreceptor cell differentiation in the retina of the Zebrafish *Danio Rerio*. *J. Comp. Neurol.* **371**: 222-234.

- **Schnitzer, J. (1985)**. Distribution and immunoreactivity of glia in the retina of the rabbit. *J. Comp. Neurol.* **240**: 128-142.

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

- **Schnitzer, J. (1988)**. Immunocytochemical studies on the development of astrocytes, Müller (glial) cells, and oligodendrocytes in the rabbit retina. *Dev. Brain Res.* **44**: 59-72.

- **Schnitzer, J. y Karschin, A. (1986)**. The shape and distribution of astrocytes in the retina of the adult rabbit. *Cell Tissue Res.* **246**: 91-102.

- **Schulze, M. (1866)**. Zur Anatomie und physiologie der retina. *Arch. F. Mikrosk. Anat.* **2**: 165-175. (Citado por Polyak, 1941).

- **Semple-Rowland, S.L. (1991)**. Expression of glial fibrillary acidic protein by Müller cells in rd chick retina. *J. Comp. Neurol.* **305**: 582-590.

- **Seo, J.H.; Heam, Y.G.; Park, S.W.; Kim, D.W.; Jeon, G.S.; Lee, C.; Hwang, D.H.; Kim, Y.S. y Cho, S.S. (2001).** Oligodendroglia in the avian retina: immunocytochemical demonstration in the adult bird. *J. Neuro. Res.* **65**: 173-183.

- **Shaw, G. y Weber, K. (1983).** The structure and development of the rat retina: An immunofluorescence microscopical study using antibodies specific for intermediate filament proteins. *Eur. J. Cell Biol.* **30**: 219-232.

- **Shenny, D.M. y Ulshafer, R.J. (1992).** Neurotransmitter-specific identification and characterization of neurons in the all-cone retina of *Anolis Carolinensis*. *Vis. Neurosci.* **9**: 313-323.

- **Sievers, J.; Parwaresch, R. y Wottge, H.U. (1994).** Blood monocytes and splenic macrophages differentiate into microglia-like cells on monolayers of astrocytes. *Morphology. Glia.* **12**: 245-258.

- **Siitari, H.; Vitala, J. y Hovi, M. (2002).** Behavioural evidence for ultraviolet vision in a tetraonid species- foraging experimente with black grouse *treatrix*. *J. Avian Biol.* **33**: 199-202.

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

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

- **Starr, M.S. (1975).** A comparative study of the utilization of glucose, acetate, glutamine and GABA as precursors of amino acids by

retinae of the rat, frog, rabbit and pigeon. *Biochem. Pharmacol.* **24**: 1193- 1197.

- **Storm-Mathisen, J.; Ottersen, O.P. y Fu-Long, T. (1986).** Antibodies for the localization of the excitatory amino acids. In: *Excitatory amino acids* (Roberts, P.J., Storm-Mathisen P.J., H.F. (eds.) 101-116. London: McMillan.

- **Smith, C.R.; Smith, S.A. y Braekvelt, C.R. (1996).** Fine structure of the pecten oculi of the barret owl (*Strix varia*). *Histol Histopathol.* **11** (1): 89-96.

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

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

- **Sterling, P. (1983).** Microcircuitry of the cat retina. *Annu. Rev. Neurosci.* **6**: 149-185.

- **Steven, J. (1985).** Electroretinographic responses and retinal ultrastructure of the great horner owl, *Bubo Virginatus*. *Dissertation Abstracts International.* Vol **46**. No. 07.

- **Stone, J. y Dreher, Z. (1987).** Relationship between astrocytes, ganglion cells and the vasculature of the retina. *J. Comp. Neurol.* **255**: 35-49.

- **Stone, J.; Holländer, H. y Dreher, Z. (1991).** "Sunbursts" in the inner plexiform layer: a spectacular feature of Müller cells in the retina of the cat. *J. Comp. Neurol.* **303**: 400-411.

- **Storm-Mathisen, J.; Ottersen, O.P. y Fu-Long, T. (1986).** Antibodies for the localization of excitatory amino acids. In: Excitatory amino acids (Roberts PJ, Storm-Mathisen P.J., Bradford, H.F.(eds) 101-116. London: Macmillan.

- **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.

- **Szel, A. y Röhlich, P. (1992).** Two cones types of rat retina detected by anti-visual pigment antibodies. *Exp. Eye. Res.* **55**: 47-52.

- **Szel, A.; Röhlich, P.; Caffé, A.R.; Juliusson, B.; Aguirre, G. y van Veen, T. (1992).** Unique topographic separation of two spectral classes of cones in the Mouse retina. *Journal of Comparative Neurology.* **325**: 327-342.

- **Tarrés, M.A.; Baron, M. y Gallego, A. (1986).** The horizontal cells in the retina of the owl, *Tyto alba*, and owllet, *Carinae noctua*. *Exp. Eye Res.* **42(4)**: 315-21.

- **Tenarishi, T. (1983).** Lateral spread of light-induced responses of the cell body and axon terminal levels of external horizontal cells in the carp retina. *Jnp. J. Physiol.* **33**: 417-428.

- **Thanos, S. (1992).** Sick photoreceptors attract activated microglia from the ganglion cell layer: a model to study the inflammatory cascades in rats with inherited retinal dystrophy. *Brain Res.* **588**: 21-28.

- **Theele, D.P. y Streit, W.J. (1993).** A chronicle of microglial ontogeny. *Glia*. **7**: 5-8.

- **Tholey, G.; Ledig, M.; Bloch, S. y Mandel, P. (1983).** Trypsinization of chick glial cells before seeding: effects on energy metabolism enzymes and glutamine synthetase. *Neurochem. Res.* **8**: 1233-1243.

- **Tholey, G.; Ledig, M.; Bloch, S. y Mandel, P. (1985).** Glutamine synthetase and energy metabolism enzymes in cultured chick glial cells: modulation by dibutyryl cyclic AMP, hydrocortisone and trypsinization. *Neurochem. Res.* **10**: 191-200.

- **Tholey, G.; Sena, A. y Ledig, M. (1986).** Specific insulin-mediated regulation of glutamine synthetase in cultured chick astroglial cells. *J. Neurochem.* **47**: 1490-1492.

- **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.

- **Tovee, M.J. (1995).** Ultraviolet photoreceptors in the animal kingdom: their distribution and function. *Trends Evol. Ecol.* **10**: 455-460.

- **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.

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

- **Turner, D.L. y Cepko, C.L. (1987)**. A common progenitor for neurons and glia persists in rat retina late in development. *Nature* **328**: 131-136.

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

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

- **Van den Berg, C.J. (1970)**. Handbook of Neurochemistry, ed. Lajtha, A. (Plenum, New York), Vol. **3**: 355-379.

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

- **Vaney, D.I.; Oung, H.M. y Gynther, I.C. (1991)**. The rod circuit in the rabbit retina. *Vis. Neurosci.* **7**: 141-154.

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

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

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

- Vento, R.; D'Acona, G.; Giuliano, G.; Taibi, G. y Tesoriere, G. (1987). Influence of hydrocortisone on chick embryo retina development. *J. Neurochemistry*. **48** (6): 1693- 1698.

- Viitala, J.; Korplmaki, E.; Palokangas, P. y Koivula, M. (1995). Attraction of kestrels to vole scent mark visible in ultraviolet light. *Nature*. **373**: 425-427

- Vorobyev, M.; Osorio, D.; Bennett, A.T.D.; Marshall, N.J. y Cuthill, I.C. (1988). Tetrachromacy, oil droplets and bird plumage colours. *J. Comp. Physiol. A*. **183**: 621-633.

- Walls, G.L.(1942). The vertebrate eye. *Cranbrook Institute of Science Bulletin*, Vol. **19**. Bloomfield Hills, Michigan.

- Warring, R.A.J.; Van Berlo, M.F.; Klein, W. y López-Cardoso, M. (1988). Cellular localization of glutamine synthetase and lactate dehydrogenase in oligodendrocyte-enriched cultures from rat brain. *J. Neurochem*. **50**: 1461-1468.

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

- Weir, M.D.; Patel, A.J.; Hunt, A. y Thomas, D.G.T. (1984). Developmental changes in the amount of glial fibrillary acidic protein in three regions of the rat brain. *Dev. Brain Res*. **15**:147-154.

- Willbod, E. y Layer, P.G. (1998). Müller glia cells and their possible roles during retina differentiation in vivo and in vitro. *Histol. Histopathol*. **13**: 531-552.

- Willbod, E.; Rothermel, A. y Layer, P.G. (2001). Retinal tissue polarity is determined by Müller cells. *Ophthalm. Res.* **33**: 349.

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

- Winter, C.G.; Saotome, Y.; Levinson, S.W. and Hirsh, D. (1995). A role for CNTF as an inducer of reactive gliosis, the glial response to central nervous system injury. *Proc. Natl. Sci.* **92**: 5865-5869.

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

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

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

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

- Yazulla, S. (1986). Gabaergic mechanisms in the retina. In: *Progress in Retinal Research* Osborne, N.N.; Chader, G.L. (eds.). Vol.5. Pergamon Press. New York, 1-51.

- **Yew, D.T.; Woo, H.H. y Poon, M.L. (1977).** The differenttypes of neuronal cells in the retina of the owl as revealed by phase contrast microscopy. *Anat. Anz.* **141(1)**: 78-83.

- **Yvette, M. y Tailoi, C. (1997).** Identification of oligodendrocyte precursors in the myelinated streak of the adult rabbit retina in vivo. *Glia.* **21**: 163-182.