

INSTITUTO DE BIOLOGIA DEL DESARROLLO

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS MORFOLOGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

UNIVERSIDAD DE SEVILLA.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Deposito en esta Biblioteca Doctoral
 el día 30 de mes 13 del año
 correspondiente.

Sevilla, 13-12-96

El Jefe del Departamento de Investigación
Alvaro Loff

EXPRESION DE LA ACTIVIDAD GLUTAMINA SINTETASA DURANTE EL DESARROLLO DE LA RETINA DEL POLLO.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Deposito en Ciencias Morfológicas
 de la Fac. Medicina
 de esta Universidad desde el día 13/12/96
 hasta el día 30/12/97
 Sevilla 10 de Enero de 1997

EL DIRECTOR DE
Fu p. 2 Cey

Trabajo que para optar al grado de Doctor en Medicina y Cirugía presenta la
 Licenciada Dña. M^a Auxiliadora Gonzalez Gallego.



**“EXPRESION DE LA ACTIVIDAD GLUTAMINA SINTETASA
DURANTE EL DESARROLLO DE LA RETINA DEL POLLO”**



Trabajo presentado por la Licenciada Dña. M^a Auxiliadora Gonzalez Gallego para optar al grado de Doctor por el programa de doctorado “Nuevas Perspectivas en Morfología” del Departamento de Ciencias Morfológicas de la Universidad de Sevilla.

A handwritten signature in black ink, appearing to read "M. Auxiliadora Gonzalez Gallego".

Fdo: M^a Auxiliadora Gonzalez Gallego

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Francisco A. Prada Elena".

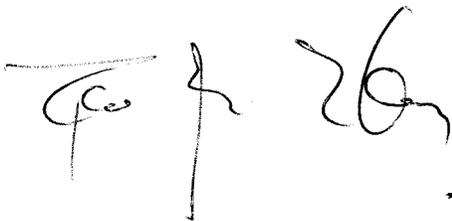


Fdo: Francisco A. Prada Elena
Profesor Titular y Director del
Departamento de Ciencias Morfológicas
Universidad de Sevilla

**D. FRANCISCO A. PRADA ELENA Y DÑA. ADELA QUESADA
RUIZ, PROFESORES DEL DEPARTAMENTO DE CIENCIAS
MORFOLOGICAS DE LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA.**

CERTIFICAN: Que, el trabajo titulado “Expresión de la actividad glutamina sintetasa durante el desarrollo de la retina del pollo” ha sido realizado en el Instituto de Biología del Desarrollo y en el Departamento de Ciencias Morfológicas bajo nuestra dirección.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos se firma en Sevilla a tres de Diciembre de mil novecientos noventa y seis.

Handwritten signature in black ink, consisting of two distinct parts: a stylized signature on the left and a more legible signature on the right.

Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a todos los compañeros del Instituto de Biología del Desarrollo y del Departamento de Ciencias Morfológicas por la colaboración que siempre me han ofrecido, y en particular a Dña. Ana Mosquero Soriano por su inestimable ayuda en la realización de las fotografías.

Mención especial, merece la labor de mis directores, Prof. Dr. F.A. Prada Elena y Profa. Dra. A. Quesada Ruiz sin cuya orientación y asesoramiento esta tesis no hubiera sido posible.

A mis padres, por su apoyo.

A Javier, por la confianza que siempre ha tenido en mí.

INDICE

1. RESUMEN.....	10
2. INTRODUCCION.....	13
2.1. ORGANIZACION ESTRUCTURAL DE LA RETINA	14
2.2. LA GLIA DE LA RETINA	20
2.3. LA CELULA DE MÜLLER ADULTA	25
2.3.1. Distribución	25
2.3.2. Morfología	26
2.3.3. Citología	34
2.3.3.1. La membrana plasmática	34
2.3.3.2. Los orgánulos intracelulares	36
2.3.3.3. El citoesqueleto	37
2.3.3.4. Marcadores de la célula de Müller	40
2.3.4. Función	44
2.3.4.1. Función de soporte y aislamiento	44
2.3.4.2. Función nutritiva y metabólica	45
2.3.4.3. Mantenimiento de la homeostasia neuronal	46
2.3.4.4. Papel en la migración celular durante el desarrollo de la retina	48
2.3.4.5. Mecanismos de comunicación con las neuronas	49
2.4. LA DIFERENCIACION DE LA CELULA DE MÜLLER.....	53
2.4.1. Proliferación: el neuroepitelio de la retina	53
2.4.2. Neurogénesis y Gliogénesis de la retina	58
2.4.3. Morfogénesis de la célula de Müller	65
2.5. AGENTES QUIMICOS QUE POSIBILITAN LA TRANSMISION SINAPTICA: LOS NEUROTRANSMISORES	71
2.6. LOS SISTEMAS DE NEUROTRANSMISORES AMINOACIDOS	75
2.7. SISTEMA GABAERGICO	75
2.7.1. Metabolismo	76
2.7.2. Receptores	77
2.8. SISTEMA GLUTAMATERGICO	80
2.8.1. Síntesis y almacenamiento	

de glutamato y aspartato	81
2.8.2. Receptores	82
2.9. LA GLUTAMINA SINTETASA: ENZIMA CATALITICA DEL SISTEMA GLUTAMATERGICO	83
2. 10. PAPEL NEUROTOXICO DE ALGUNOS NEUROTRANSMISORES Y SUSTANCIAS HOMOLOGAS	88
3. PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACION	91
4. MATERIAL Y METODOS	94
4.1. MATERIAL	95
4.1.1. Material biológico	95
4.2. METODOS	96
4.2.1. PREPARACION DEL MATERIAL PARA MICROSCOPIA LUMINICA	96
4.2.1.1. Método de Golgi Stensaas	96
4.2.1.2. Método de Golgi Colonnier	97
4.2.2. PREPARACION DEL MATERIAL PARA MICROSCOPIA ELECTRONICA	98
4.2.3. PREPARACION DEL MATERIAL PARA LA DISOCIACION CELULAR	99
4.2.4. PREPARACION DEL MATERIAL PARA INMUNOHISTOQUIMICA	101
4.2.5. PREPARACION DEL MATERIAL PARA TINCION CON HEMATOXILINA-EOSINA	103
4.2.6. PREPARACION DEL MATERIAL PARA DETECTAR LA ACTIVIDAD DE LA GLUTAMINA SINTETASA	105
5. RESULTADOS.....	106
5.1. CRITERIO DE IDENTIFICACION CELULAR Y DIFERENCIACION INICIAL DE LA CELULA DE MÜLLER EN LA RETINA CENTRAL.....	107
5.2. DIFERENCIACION DE LA CELULA DE MÜLLER EN LA RETINA CENTRAL.....	109
5.3. ESTADIOS FINALES EN LA DIFERENCIACION DE LA CELULA DE MÜLLER.....	110

5.4. MORFOLOGIA ADULTA DE LAS CELULAS DE MÜLLER.....	111
5.5. CELULAS GLIALES A NIVEL DE LA CAPA DE CÉLULAS GANGLIONARES.....	115
5.6. ACTIVIDAD DE LA GLUTAMINO SINTETASA DURANTE EL DESARROLLO RETINIANO.....	116
5.7. DESARROLLO DE LA EXPRESION DE INMUNORREACTIVIDAD DELA GLUTAMINO SINTETASA.....	118
5.8. INDUCCION POR HIDROCORTISONA DE LA INMUNORREACTIVIDAD GLUTAMINA SINTETASA.....	120
6. ICONOGRAFIA.....	121
7. DISCUSION	143
7.1. DIFRENCIACION DE LA CELULA DE MULLER	144
7.2. ACTIVIDAD DE LA GLUTAMINO SINTETASA DURANTE EL DESARROLLO DE LA CELULA DE MULLER	149
8. CONCLUSIONES	155
9. BIBLIOGRAFIA	160



1. RESUMEN

La enzima glutamina sintetasa juega un importante papel como intermediario metabólico catalizando la conversión de glutamato en glutamina y como regulador de los neurotransmisores glutamato y γ -aminobutírico (GABA) (Hertz y Schousboe, 1980; Cooper y col., 1983; McGeer y col., 1983).

La GS se encuentra presente en la glia del SNC, astrocitos (Hamburger y col., 1987; Norenburg, 1979) y oligodendrocitos (D'Amelio y col., 1990), En la retina se localiza en la célula de Müller (Pow y col., 1993), y su actividad enzimática parece ser paralela al desarrollo de esta célula glial (Chader, 1971).

En el presente trabajo hemos intentado esclarecer y determinar:

- 1) Si la diferenciación morfológica de la célula de Müller es la causante de la inducción de la actividad GS.
- 2) Si la enzima GS se localiza exclusivamente en la célula de Müller.

Para lo cual hemos estudiado:

- 1) La diferenciación morfológica de las células de Müller, así como la presencia de otras células gliales ubicadas en la capa de células ganglionares y en la capa de fibras del nervio óptico.
- 2) Los cambios temporales en los niveles de actividad GS durante el desarrollo.

3) La localización de la expresión de inmunorreactividad GS durante el desarrollo.

3) La sinaptogénesis retiniana.

2. INTRODUCCION

2.1. ORGANIZACION ESTRUCTURAL DE LA RETINA

La retina de los vertebrados es una fina lámina de tejido nervioso situada en el fondo del ojo. Su función consiste en recibir las señales luminosas y transformarlas en una serie de impulsos nerviosos que son enviados al cerebro a través del nervio óptico.

La retina es una parte del SNC, que se desarrolla a partir de una porción del prosencéfalo y que posteriormente se diferencia en el diencefalo embrionario. En la parte anterior ventral de esta porción del SNC y a cada lado de la línea media, se produce una evaginación que da origen a la vesícula óptica. A su vez, del neuroepitelio de la vesícula óptica surge una invaginación secundaria, con lo que la vesícula óptica se transforma en la copa óptica, que queda unida al resto del cerebro por el tallo óptico y posteriormente por el nervio óptico (Rodiek, 1973). Entre las dos paredes de la copa óptica queda el ventrículo, que es un espacio continuo con los ventrículos del cerebro. Posteriormente, este espacio se colapsa y se convierte en un espacio virtual (Figura 1).

El epitelio interno de la copa óptica constituye el neuroepitelio de la retina, del que se formará la retina neural adulta, auténtico tejido nervioso formado por seis clases de neuronas y por células de glía. El epitelio externo permanece con una sola capa de células y va a constituir el epitelio pigmentario

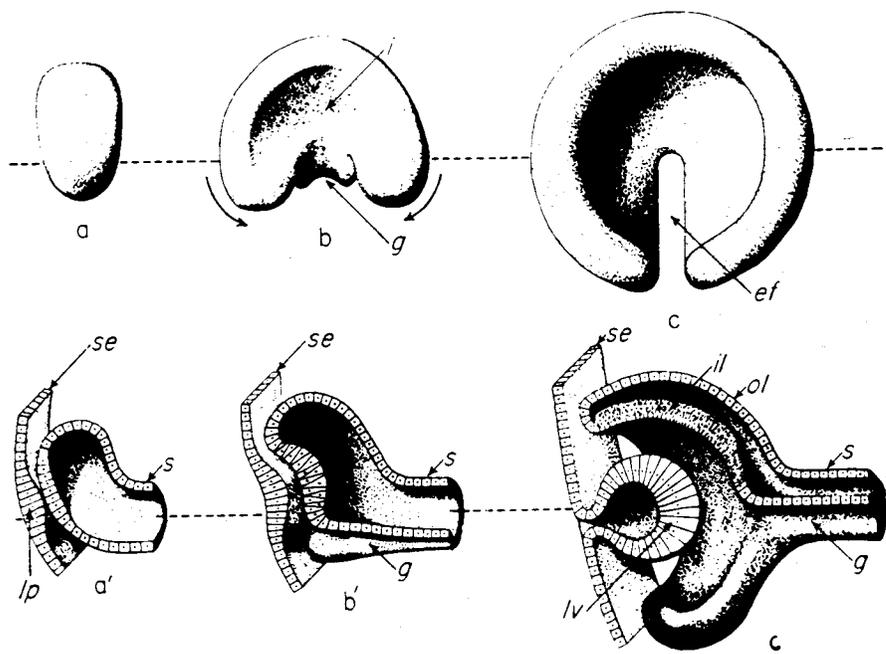


Figura 1. Formación de la cúpula óptica (a, b, c). Sección transversal de una reconstrucción tridimensional de la copa óptica (a', b', c'), mostrando la capa interna (il) que formará la retina neural, y la externa (ol) que formará la retina pigmentaria. El espacio ventricular (v), situado entre ambas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

de la retina, el cual no se diferencia como tejido nervioso, sino que queda como un epitelio de células de forma poligonal con abundantes invaginaciones en su cara externa y numerosas y largas prolongaciones en su cara interna, la cual contacta con la retina neural.

Gran parte de los conocimientos que hoy tenemos sobre la estructura de la retina lo debemos a los trabajos de Ramón y Cajal (1892), realizados en un buen número de especies de vertebrados. Ramón y Cajal describió y estudió todas las clases de neuronas de la retina menos las células interplexiformes, así como los dos tipos de células gliales, los astrocitos y las células de Müller (Figura 2). En la retina de algunas especies como el pollo, el único tipo de glía descrito es la célula de Müller.

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

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

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

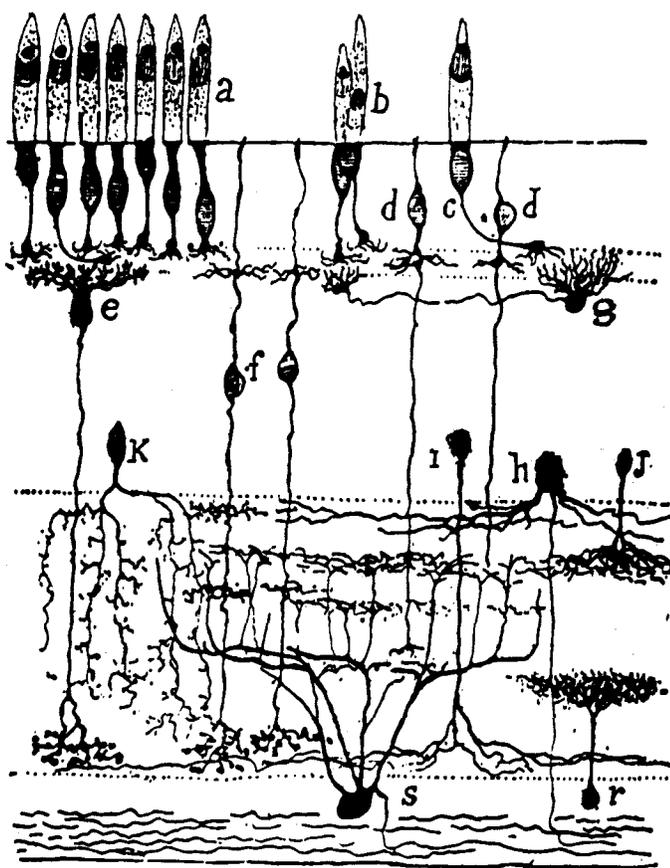


Figura 2. Dibujo semiesquemático de la retina de lagarto (*Lacerta viridis*) teñida con el método de Golgi. **a, b, y c:** conos. **d:** bipolar desplazada. **e y f:** bipolares. **g:** horizontal. **h:** ganglionar desplazada. **i, j, k:** amacrinas. **r:** amacrina desplazada. **s:** ganglionar. (Tomado de Ramón y Cajal, 1911).

(Figuras 2 y 3).

3.- **Capa nuclear interna (CNI)**. En ella se encuentran los somas de las células horizontales, bipolares, amacrinas, interplexiformes y ganglionares desplazadas, así como los de las células de Müller. Las células horizontales se sitúan formando la fila más externa de los somas. Los 2/3 más externos de esta capa los ocupan los somas de las células bipolares y de Müller, mientras que las células amacrinas, interplexiforme y ganglionares desplazadas se sitúan en el tercio más interno (Figuras 2 y 3).

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

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

6.- **Capa de fibras del nervio óptico (CFNO)**. Está formada por los axones de todas las células ganglionares y ganglionares desplazadas. Estos están orientados hacia la salida del nervio óptico (Figuras 2 y 3) y su grosor aumenta desde la retina periférica hacia la zona papilar.

En la retina neural se distinguen dos membranas limitantes, la externa y la interna. La **membrana limitante externa (MLE)** está formada por uniones especializadas o uniones adherentes, entre los segmentos internos



Figura 3. Sección vertical de retina de pollo M.L.E.: Membrana limitante externa. C.N.E.: Capa nuclear externa. C.P.E.: Capa plexiforme externa. C.N.I.: Capa nuclear interna. C.P.I.: Capa plexiforme interna. C.G.: Capa ganglionar. C.F.N.O.: Capa de fibras del nervio óptico. Técnica de Nomarski.

de los fotorreceptores, las mazas de Landolt de las células bipolares y las prolongaciones externas de las células de Müller. Entre la MLE y el epitelio pigmentario se observa una capa clara al microscopio óptico, la **capa de conos y bastones (CCB)**, también llamada **espacio subretinal (ES)**, formada por los segmentos internos y externo de los fotorreceptores, el *microvilli* de las células de Müller y las prolongaciones internas de las células pigmentarias cuyos somas forman el **epitelio pigmentario (EP)**. La **membrana limitante interna (MLI)**

está formada por la yuxtaposición, en uniones de tipo especializado, de los pies de conexión vítreos de las células de Müller, se encuentra separada del humor vítreo por una lámina basal.

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

2.2. LA GLIA DE LA RETINA

Clásicamente la glía del SNC se ha clasificado en dos grupos, la microglía y la macroglía (Figura 4). La **microglía**, descrita por vez primera 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 estas células

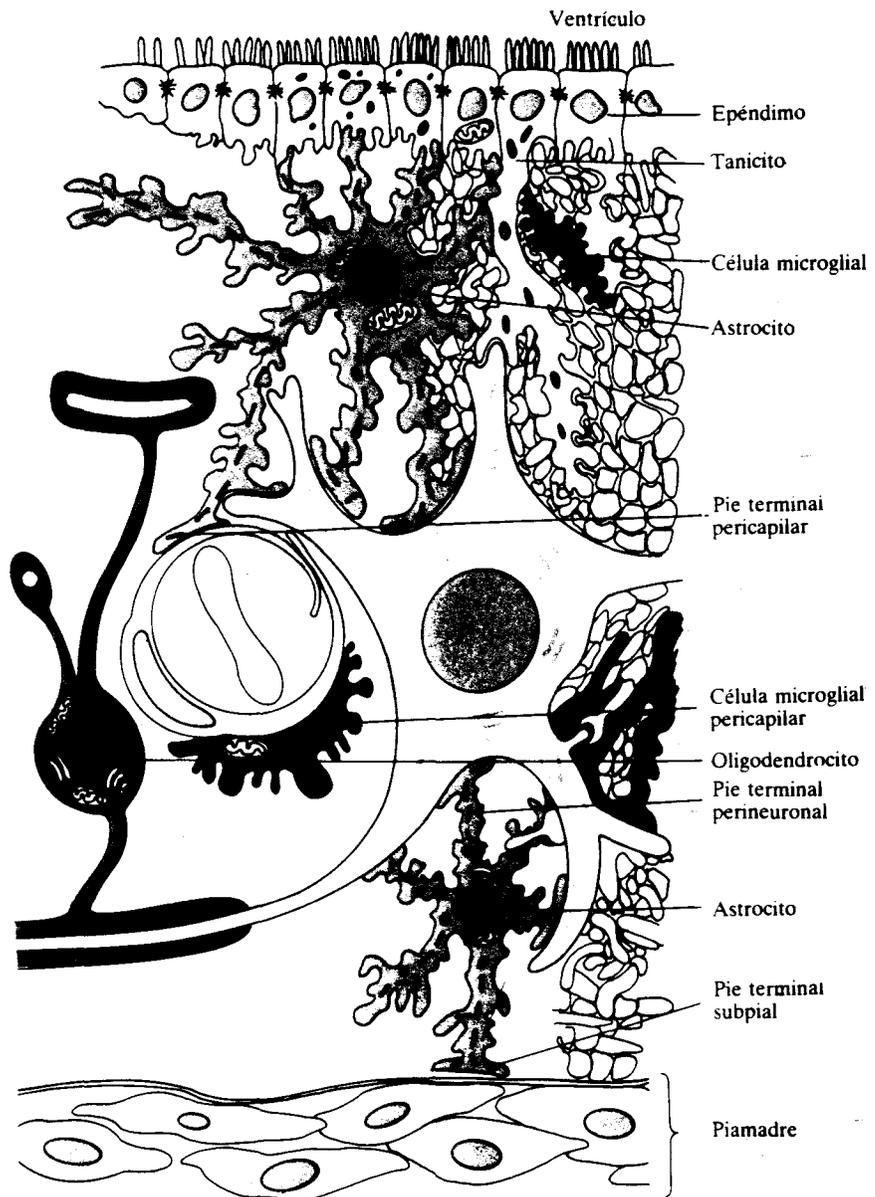


Figura 4. Tipos de células gliales en el S.N.C. (Tomado de Willians y Warwick, 1975. Dibujo efectuado por R.E.M. Moore).



podrían originarse de monocitos sanguíneos. En la actualidad se ha comprobado que las células microgliales derivan de precursores de la médula ósea que migran al SNC durante el desarrollo y en respuesta a diversas lesiones (Wolter, 1956; Boya y col., 1986; 1987; 1991; Hickey y Kimura, 1988; 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 en las que hay muerte celular (Thanos, 1992). La **macroglía** incluye a los astrocitos y a los oligodendrocitos, ambos de origen ectodérmico como el resto de las células del SNC. 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 **oligodendrocitos** son pequeñas células con menos prolongaciones que los astrocitos. Se encuentran en el SNC 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 el SNC existen varias poblaciones de células gliales, entre ellas destacamos a las células de Müller. La clasificación de las células de Müller como macroglía siempre ha sido motivo de controversia. Ya Ramón y Cajal (1892) hizo una distinción clara entre astrocitos y células de Müller

considerándolas diferentes tipos de glía. Sin embargo, son numerosos los autores que consideran a las células de Müller como astrocitos modificados (Polyak, 1941; Magalhães y Coimbra, 1973; y otros muchos) o “variantes regionales del mismo tipo de macroglía”, como afirman recientemente Holländer y col. (1991). Otros autores, han señalado que que ésto podría ser una simplificación puesto que presentan también características ultraestructurales de oligodendrocitos (Rhodes, 1984; Stefansson y col., 1984; Prada, F. y col., 1989) y endimocitos (Prada, F. y col., 1989).

En las retinas avasculares de algunas especies de vertebrados como es el caso del pollo, hay un sólo tipo de glía, la célula de Müller o glía radial de la retina. Estas células fueron descritas por vez primera en 1851 por Müller. Se extienden radialmente entre las dos limitantes de la retina. Su soma se encuentra en la CNI y las prolongaciones que parten desde sus dos polos, ventricular y vítreo, recubren buena parte de la superficie de las neuronas de la retina. En las retinas vasculares de otras especies, principalmente de mamíferos, se encuentran todos los otros tipos de células gliales: microglía, astrogía y oligodendrogía.

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

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

En la parte mielinizada de la retina de 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 la retina de otras especies. En la retina de pollo hay trabajos que señalan la existencia de un pequeño número de células gliales cuyos somas se sitúan en la CCG

(Ehrlich, 1981) y que son aproximadamente el 5% del total de células en esa capa. Esta población, estaría formada mayoritariamente por oligodendrocitos que se forman tras la salida del ciclo de todas las neuronas y de las células de Müller y cuyos precursores proliferan extraventricularmente.

2.3. LA CELULA DE MÜLLER ADULTA

Ramón y Cajal (1892) describió las células de Müller en todas las clases de vertebrados. Sin embargo, hasta la década de los sesenta no fueron objeto de una gran atención pues se entendía que su papel era meramente estructural. En los últimos 20 años, han aparecido numerosos trabajos que tratan de su distribución, morfología, fisiología y desarrollo.

2.3.1. Distribución

Las células de Müller se distribuyen por toda la retina, aunque su densidad no es la misma en toda ella (Tabla 1) (Reichenbach y Robinson 1995b). En la Figura 5 mostramos a modo de ejemplo un mapa con las áreas de isodensidad de células de Müller en retina de distintos animales vertebrados. Los resultados son parecidos en cuanto al patrón de distribución, aunque los valores absolutos varían. No hemos encontrado datos referentes a la distribución en la retina de pollo.

2.3.2. Morfología

Ramón y Cajal (1892) estudió la forma de las células de Müller en

Especies	Periferia	Centro	Término medio
Monodelphis			8500
Mouse			16,000
			11,000
Rat	8000	12,000	12,000
Gerbil			14,500
Guinea pig	7500	15,000	13,800
Rabbit	5500	13,000	11,000
	5000	12,000	
Gray squirrel			12,200
Tree shrew	11,000	23,000	16,000
Rhesus monkey	10,000	>30,000	
Human			8500
			11,000
Whale			11,300
Cat	7000	15,000	8000
Dog			13,000
Fox			14,800
Mink			11,500
Polecat			16,200
Horse			7000
Deer			9300
Pig			12,200
Goat			13,300
Barbary sheep			13,200

TABLA 1: Densidad de las células de Müller (mm^2) en distintas zonas de la retina de algunos animales vertebrados (tomado de Reichenbach y Robinson, 1995 b).

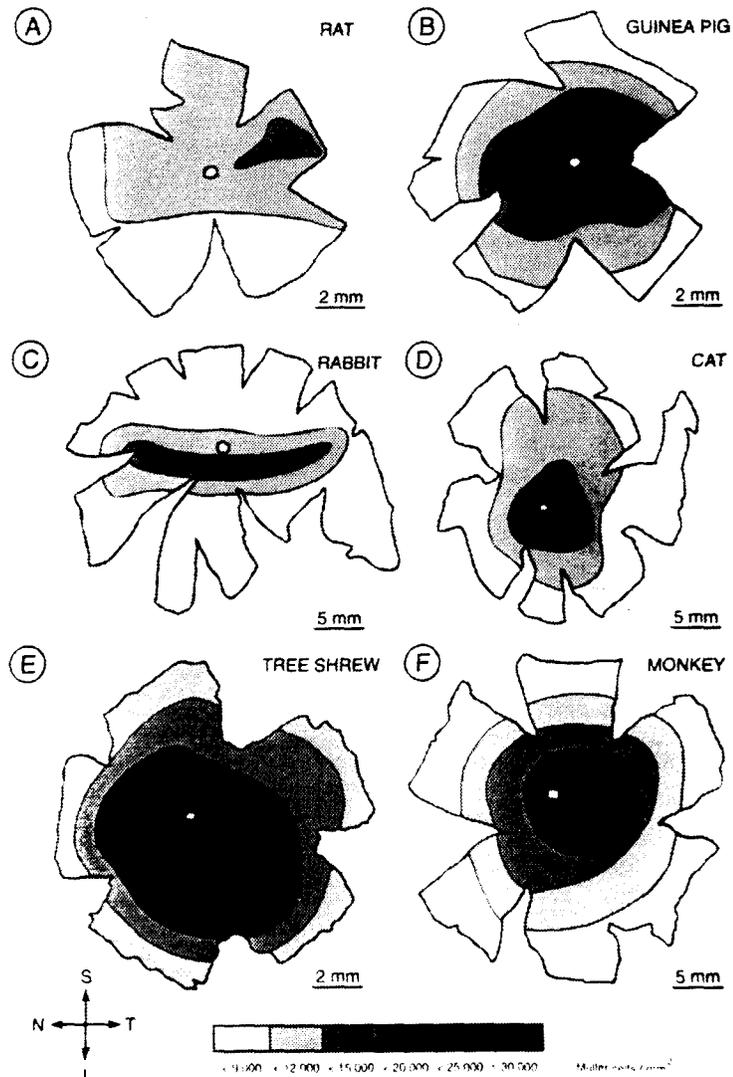


Figura 5. Mapa de la distribución de las células de Müller marcada con vimentina. Montajes en plano de retinas de mamíferos adultos. (A) rata (Dreher y col., 1992); (B) guinea pig (Dreher y col., 1992); (C) conejo (Reichenbach y col., 1991b); (D) gato (Reichenbach y col., 1991b); (E) musaraña (Reichenbach y col., 1995); (F) mono (Reichenbach y Robinson, 1995).

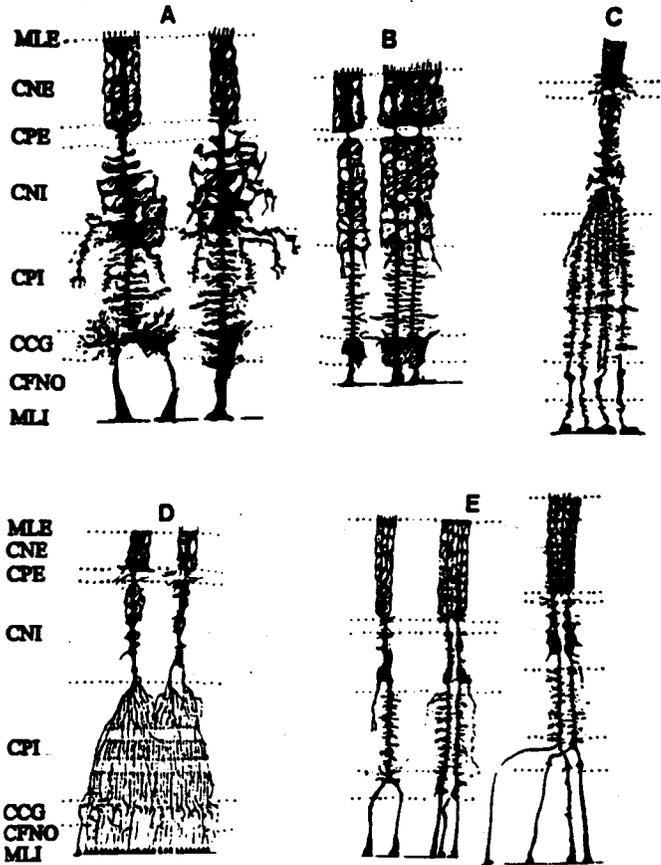


Figura 6. Dibujos de células de Müller de distintas especies de animales vertebrados. **A:** Pez teleósteo (*Cyprinus Carpio*); **B:** anfibio (*Rana esculenta*); **C:** réptil (*Lacerta viridis*); **D:** ave (*Gallus domesticus*); **E:** mamífero (*Bos taurus*). (Tomado de Ramón y Cajal, 1892).

todas las clases de vertebrados mediante el uso de la técnica de Golgi. En la Figura 6 puede observarse cómo, por una parte su estructura básica es similar en todas las clases, aunque en cada una de ellas existen características propias; por otra parte, la morfología de la célula varía en cada capa de la retina. Dentro de la complejidad que presentan estas células se aprecia que en peces, anfibios, y mamíferos, las células son relativamente simples; mientras que en reptiles y sobre todo en aves, son más complejas. Existe el caso particular de la célula de Müller de la retina del camaleón, estudiada en un principio por Ramón y Cajal (1892) (Figura 7) quien apuntó la existencia de una “prolongación accesoria”. Posteriormente ha sido estudiada por Prada, F. y col., (1979), quienes encuentran un gran nivel de complejidad estructural (Figura 8).

En general, y según las descripciones de Ramón y Cajal (1892), la célula ocupa todo el grosor de la retina y su soma se sitúa en la CNI. La **prolongación ventricular o externa** se extiende desde el soma hasta la MLE y tiene unas características similares en todas las especies. A nivel de la MLE muestra una placa de la que salen *microvilli* hacia el exterior, esto es una situación común en todas las células lo que justifica que Reichenbach y Robinson (1995a) incluyan a esta célula en el grupo de la ependimoglia. En la CNE la prolongación es ancha y forma una especie de red de expansiones laminares que parecen recubrir completamente los somas de los fotorreceptores. A nivel de la CPE la prolongación se estrecha. En esta capa

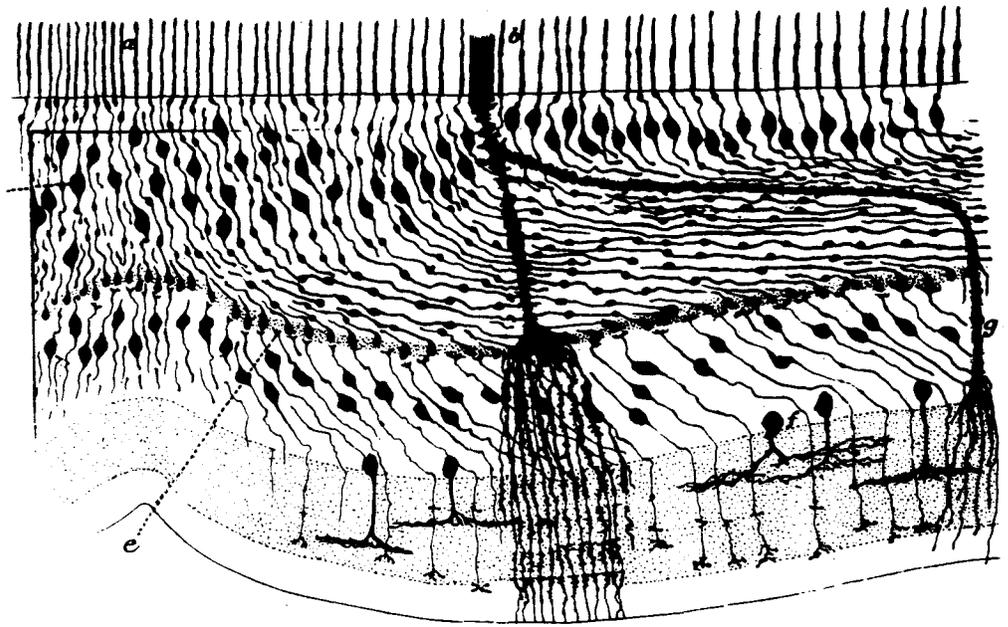


Figura 7. Célula de Müller de la fovea central de la retina del camaleón (*Chamaleo vulgaris*). (Tomado de Ramón y Cajal, 1892).

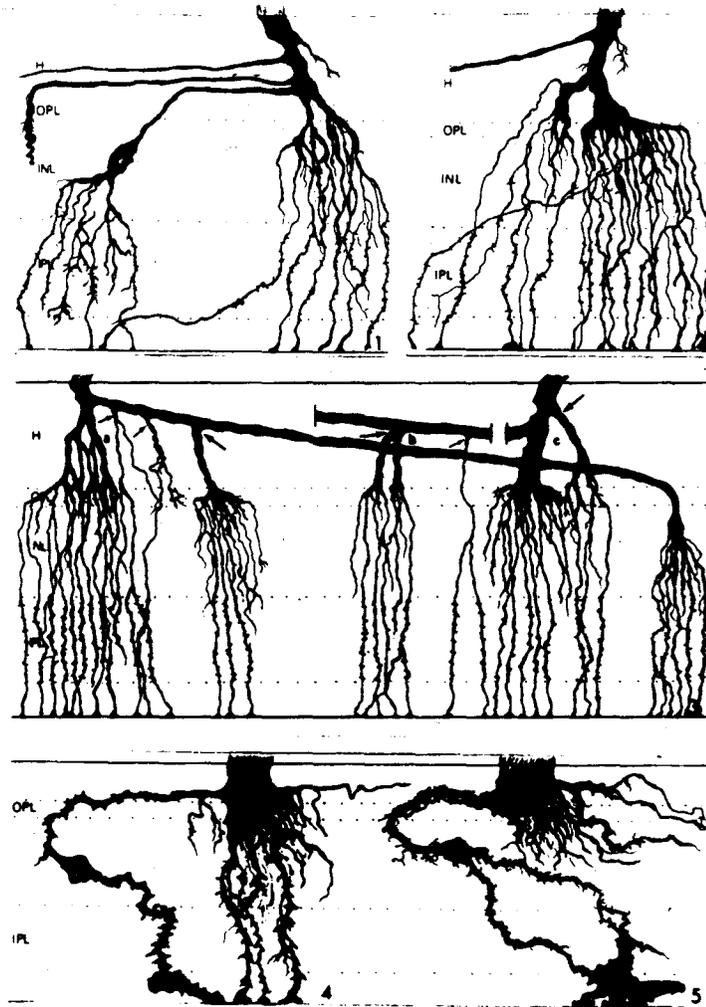


Figura 8. Dibujos de células de Müller en distintas regiones de la retina adulta del camaleón; 1: Fóvea; 2 y 3: Retina central; 4 y 5: Retina periférica; CH: Capa de Henle; **flecha** en a y b: ramificación en prolongación accesoria; **flecha** en c: ramificación en prolongación no accesoria. (Tomado de Prada, F. y col., 1979).

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

La prolongación que se extiende desde el soma hasta la MLI es la **prolongación vítrea o interna** puede ser simple, como en los casos de la carpa, rana y buey. En este caso emite tangencialmente numerosas prolongaciones pequeñas e irregulares, principalmente a nivel de la CPI. En reptiles y aves es más compleja, pues se descompone en varias prolongaciones desde el soma o cerca de él. A nivel de la MLI forma unos engrosamientos cónicos característicos denominados **pies terminales**.

Los estudios de Ramón y Cajal han sido completados por otros más recientes realizados en especies de varias clases de vertebrados y en los que se han utilizado otras técnicas además del método de Golgi. Ejemplos de tales estudios son: en el conejo (Figura 9) (Reichenbach y Wohlrath, 1986; Reichenbach, 1987; Reichenbach y col., 1989; Robinson y Dreher, 1990), gato (Stone y col, 1991), pollo (Prada F. y col., 1989).

Los estudios ultraestructurales sobre la célula de Müller muestran

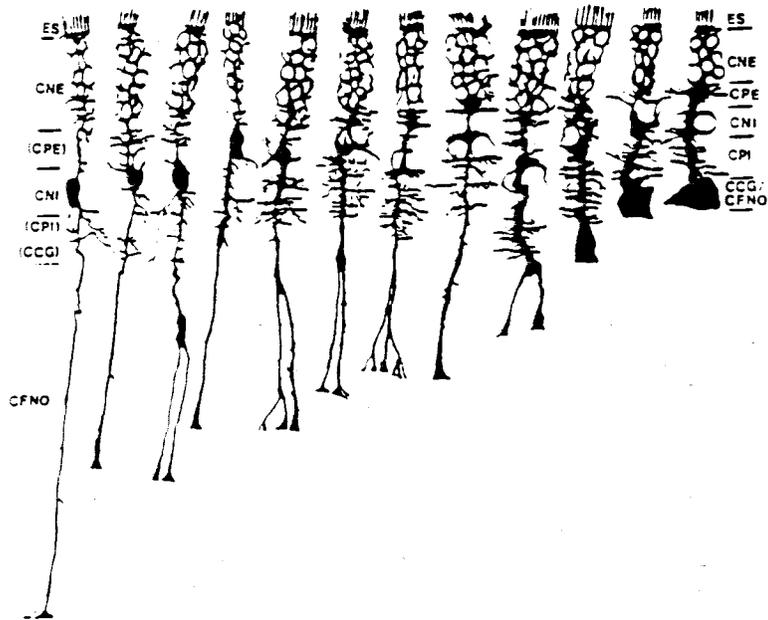


Figura 9. Células teñidas con el método de Golgi en distintas regiones de la retina de conejo. A la derecha está representada la zona más periférica y hacia la izquierdala parte más central. (Tomado de Reichenbach y col., 1989).

resultados bastante coincidentes en cuanto a la morfología general de la célula tanto en humano (Fine y Zimmerman, 1962), conejo (Magalhaes y Coimbra, 1972; Reichenbach y col., 1988a, b), rata (Rasmussen, 1972), tortuga (Sarthy y Bunt, 1982), tupaya (Reichenbach y col., 1995), anfibio (Miller y Dowling, 1970), pollo (Meller y Glees, 1965; Prada, F. y col., 1989), y en otras especies (Uga y Smelser, 1973a; Rasmussen, 1974).

Todos los autores coinciden en señalar que prácticamente todas las células de la retina se hallan recubiertas por prolongaciones o expansiones de la célula de Müller y que los contactos sinápticos de las capas plexiformes están también rodeados por prolongaciones de estas células. En la retina de mamíferos se ha descrito que la célula de Müller emite, a nivel interno, pequeñas prolongaciones que forman una especie de corona en torno a los axones de la CFNO con una estructura similar a la de los nódulos de Ranvier, a las que se les denomina “perinodales” (Reichenbach y col., 1988c).

2.3.3. Citología

La célula de Müller se caracteriza por la asimetría en la distribución de los orgánulos, de las proteínas de membrana y del citoesqueleto, variando la distribución de éstos en relación a las capas de la retina.

1.3.3.1. La membrana plasmática

La distribución de diferentes oligosacáridos de la membrana ha sido estudiada mediante unión de lectinas específicas, empleando células

disgregadas. Se detecta un gran número de sitios de unión en la región de los *microvilli* (Sarthy y col., 1981; Reichenbach y col., 1985). La bomba de Na^+/K^+ (Na^+/K^+ ATPasa) se encuentra también en mayor concentración en la región de los *microvilli* (Stirling y Sarthy, 1985), así como en las partes de la célula situadas en las capas plexiformes (Reichenbach y col., 1988a). La 5'-nucleotidasa, otra proteína de membrana también se distribuye asimétricamente encontrándose en la CNE y CPE (Kreutzberg y Hussain, 1982). En contraste, la glicoproteína asociada a la mielina (MAG) se encuentra distribuida por toda la célula desde el *microvilli* a la CFNO (Stefansson y col., 1984). Esta proteína es propia de oligodendrocitos y curiosamente su expresión se ha descrito en la retina humana, la cual no se mieliniza.

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

1992).

A nivel de la MLE las células de Müller tienen uniones entre sí y con los fotorreceptores. Las uniones más frecuentes observadas son del tipo *zónula adherens* o uniones adhesivas (Reichenbach y Robinson, 1995 b). En peces, sin embargo, son uniones estrechas y en anuros son tipo *gap* o comunicantes (Uga y Smelser, 1973b). Se ha descrito también la presencia de uniones tipo *gap* en las capas internas de la célula de Müller humanas (Reale y col., 1978). En conejo existen uniones tipo *gap* entre astrocitos, oligodendrocitos y células de Müller (Robinson y col., 1993) las cuales permiten el tráfico de moléculas desde los astrocitos y oligodendrocitos hacia las células de Müller, pero no en sentido inverso.

2.3.3.2. *Los orgánulos intracelulares*

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

Las mitocondrias se distribuyen de distintas formas dependiendo de la especie. En especie con retinas vascularizadas las mitocondrias se concentran en los pies vítreos. Cuando la retina está vascularizada

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

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

Las células de Müller son el principal almacén de glucógeno en la retina. Su distribución en el conejo es asimétrica, encontrándose el mayor número de gránulos de glucógeno en la parte interna y disminuyendo a medida que nos aproximamos a las capas externas (Magalhaes y Coimbra, 1970). El glucógeno es más abundante en las retinas avasculares (Uga y Smelser, 1973a).

2.3.3.3. *El citoesqueleto*

Aunque los estudios ultraestructurales han servido para describir el citoesqueleto, sobre todo la distribución de los gliofilamentos, la mayor información en este apartado ha sido obtenida mediante técnicas inmunohistoquímicas. Estos estudios han revelado la presencia de vimentina en las células de Müller de ratón (Schnitzer y col., 1981; Dräger, 1983; Dräger



y col., 1984), rata (Shaw y Weber, 1983), conejo (Schnitzer, 1985; 1988), pollo (Lemmon y Rieser, 1983), tortuga (Gaur y col., 1988) y camaleón (Prada, F. Y col., 1995). Esta proteína se expresa también en células neuroepiteliales y en las células que Reichenbach y Robinson (1995a) clasifican como epindimoglia. Otra proteína componente de filamentos intermedios, la desmina, también ha sido encontrada en las células de Müller (Dahl y Bignami, 1982). La proteína fibrilar ácida glial (GFAP) ha sido demostrada en las células de Müller de la retina de varias especies de peces (Bignami, 1984; Linser y col., 1985; Jones y Schechter, 1987; Nona y col., 1989) y anfibios (Szaro y Gainer, 1988). En la retina de pollo no se detectó en un primer estudio (Lemmon y Reiser, 1983) aunque posteriormente han confirmado su expresión (Torelli y col., 1989; Semple-Rowland, 1991). En la retina normal de mamífero hay datos contradictorios sobre la presencia de GFAP (Björklund y col., 1985) que parecen sugerir que esta proteína no se expresa en condiciones normales. Si hay un consenso sobre su presencia en retinas lesionadas o en degeneración (Bignami y Dahl, 1979; Shaw y Weber, 1983; Lewis y col., 1989; Reichenbach y col., 1992). Estos datos sobre expresión de vimentina y GFAP condujeron a Bignami (1984) a considerar la posibilidad de que los filamentos intermedios de la glia de Müller sean heteropolímeros de estas dos proteínas, variando las razones entre las dos proteínas según las especies y como respuesta a lesiones. La co-expresión de vimentina y otros filamentos

intermedios no es exclusiva de las células de Müller. Por ejemplo, los astrocitos inmaduros de retina de conejos coexpresan vimentina y GFAP (Schnitzer, 1988). Las células horizontales de la retina de ratón contienen vimentina y neurofilamentos (Drager, 1983) al igual que en varias especies de peces (Linser y col., 1985). En astrocitos cultivados de ratón se ha demostrado que la GFAP y la vimentina copolimerizan en los mismos filamentos (Abd-El-Basset y col., 1992). Por otra parte también algunas neuronas en estadios tempranos del desarrollo expresan vimentina (Bignami y col., 1982). En tinciones inmunohistoquímicas contra filamentos intermedios de las células de Müller, la máxima intensidad de marcaje se observan en la zona de la CFNO y disminuye en capas más externas.

Además de filamentos intermedios, también se han identificado algunas proteínas asociadas a citoesqueleto (filamina o una proteína relacionada: Lemon, 1986; gelsolina: Legrand y col., 1991 en conejo). La proteína S-100 se ha encontrado en las células de Müller de mamíferos (Cocchia y col., 1983; Kondo y col., 1983) pero no en la de pollo (Linser y Moscona, 1981 a).

Por último se han obtenido varios anticuerpos que marcan componentes fibrilares de las células de Müller y que por tanto, es presumible que sean proteínas de citoesqueleto y cuyo patrón de expresión es distinto al de la vimentina, aunque no han sido totalmente caracterizados desde el punto

de vista molecular (Drager y col., 1984 en ratón; Lemmon, 1985 en pollo; Robinson y Dreher, 1990 en conejo; Dreher y col., 1992 en varias especies de mamíferos). Uno de estos anticuerpos es el monoclonal 3CB2 (Prada, F. y col., 1995) el cual marca intensamente toda la célula de Müller en varias especies de vertebrados, al igual que los axones de las células horizontales de la retina de pollo. Esta proteína tiene un peso molecular próximo al de varios filamentos intermedios, aunque su patrón de marcaje en secciones la distingue de los filamentos intermedios y de las proteínas reconocidas por otros monoclonales descritos. Los autores sugieren que podría tratarse de una proteína asociada a filamentos intermedios.

También se ha estudiado la distribución de moléculas del citoesqueleto a nivel de la MLE. Williams y col., (1990) en un estudio realizado en pollo encontraron a este nivel actina, miosina, α -actinina, y vinculina.

2.3.3.4. *Marcadores de la célula de Müller*

La localización histoquímica y el estudio de las propiedades de la célula glial aislada o cultivada han suministrado información sobre una serie de parámetros bioquímicos que son componentes específicos posibles o demostrados de las células gliales.

Algunos de los anticuerpos que hemos mencionado en los apartados anteriores, sobre todo la vimentina, se usan como marcadores de células de

Müller tanto en secciones como en células disgregadas o en cultivos. Además de éstos, se han descrito varias enzimas específicas de la célula de Müller, detectables por reacciones histoquímicas (reacciones de enzimas oxidativas: Berkow y Patz, 1964; actividad esterásica inespecífica: Bhattacharjee y Sanyal, 1975; NADH-diforasa: Reichenbach y Wohlrab, 1983) o por anticuerpos monoclonales (glutamina sintetasa: Riepe y Noremburg, 1977; Linser y Moscona 1979; Norenberg y Martínez-Hernández, 1979; anhidrasa carbónica: Linser y Moscona, 1981 a).

La **glutamina sintetasa** es fundamentalmente una enzima glial (Bito y col., 1977; Norenberg y Martínez-Hernández, 1979; Patel y col., 1982). Su función es la de convertir el glutamato que se absorbe continuamente desde el espacio extracelular en glutamina que se difunde fácilmente desde la glía al espacio circundante. La glutamina, al contrario que el glutamato es fisiológicamente inactiva y puede acumularse en el líquido intersticial hasta concentraciones relativamente altas ($500\mu\text{M}$) en comparación con el glutamato ($10\mu\text{M}$). Al mismo tiempo que la glutamina se forma en las células gliales, se extrae amoníaco (Benjamin y Quastel, 1975). Así pues el metabolismo del amoníaco en el tejido nervioso resulta controlado de forma particular por esta enzima.



De esta forma, las células gliales se encuentran involucradas en sistemas importantes de homeostásis del amoniaco y los intercambios intercelulares de glutamato y glutamina (Figura 10).

También es posible usar como marcadores proteínas específicas como la S-100 o la proteína ácido fibrilar glial (GFAP), aisladas en las áreas cerebrales tanto en los astrocitos fibrosos como en la glía radial (Bignami y col., 1980), o la proteína celular ácida ligante de retinal (CRALDP) identificada inmunohistoquímicamente en mamíferos (Bunt-Milam y Saari, 1983). Además se han producido anticuerpos monoclonales que marcan proteínas algunas de ellas no caracterizadas molecularmente que se expresan en células de glía del SNC y que en la retina sólo se expresan en células de Müller (proteínas reconocidas por los anticuerpos Ret-G1, Ret-G2 y Ret-G3: Barnstable, 1980 en rata; dos anticuerpos contra antígenos de membrana: Chan y col., 1984; Proteína EAP-300: McCabe y Cole, 1992 en pollo). Especialmente interesante nos parece el monoclonal 2M6 (Schlosshauer y col., 1991), cuya expresión estudiada en pollo está restringida exclusivamente a las células de Müller.

Una característica común a muchos de los marcadores de las células de Müller, tanto histoquímicos como inmunohistoquímicos, es que reconocen moléculas que durante el desarrollo comienzan a expresarse en todo el

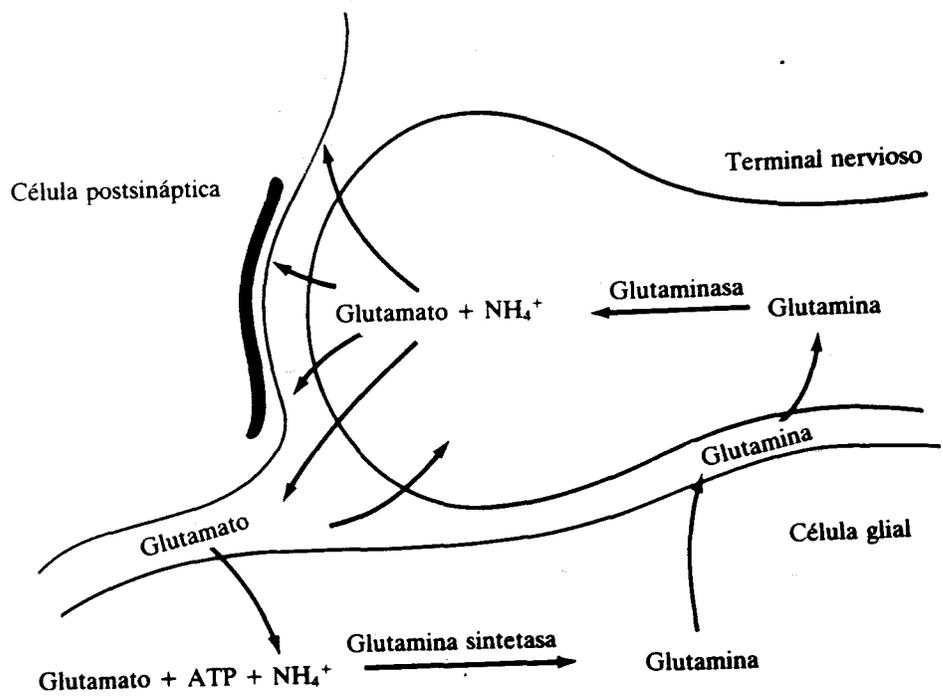


Figura 10. Propuesta de reciclado de glutamato entre las neuronas, la glia y el espacio extracelular en el tejido cerebral. No se descarta la recaptación del glutamato por el terminal nervioso. (Tomado de Bradford, 1988).

neuroepitelio y que a veces, antes de restringirse su expresión a las células de Müller, se expresan transitoriamente en neuroblastos y en el caso de retinas vascularizadas, en astrocitos inmaduros.

2. 3. 4. Función

Las funciones que clásicamente se le han adjudicado a las células de Müller son las de soporte y aislamiento de las neuronas así como de nutrición. Hoy en día sabemos que tienen también importancia en el mantenimiento de la homeostasia tisular, pues mantienen el pH, eliminan el exceso de K⁺ y retiran los neurotransmisores liberados por las neuronas. También son importantes para el establecimiento y mantenimiento de la barrera hemato-retinal y la respuesta ante lesiones. También se piensa que la célula de Müller como glía radial que es, puede jugar algún papel en la migración de ciertos neuroblastos de la retina. Por último se ha descrito la existencia en las células de Müller de un cierto número de receptores, canales y otros sistemas que sugieren una interacción entre las células de Müller y las neuronas y viceversa, por lo que una parte contribuiría a integrar las funciones de la célula de Müller para adecuar su funcionamiento al entorno y por otra podría modificar la excitabilidad neuronal y/u otros procesos Newman y Reichenbach, 1996).

2.3.4.1. Función de soporte y aislamiento

La primera función que se asignó a la célula de Muller fue la meramente estructural, proveer a la retina de una especie de trama interna que

soporta su compleja arquitectura. También se hizo especial énfasis en su función de aislamiento de las neuronas y los contactos sinápticos entre ellas. Sin duda las prolongaciones de la célula de Müller rodean de modo casi total los somas de algunas neuronas (Ramón y Cajal, 1892); aíslan los contactos sinápticos en las capas plexiformes (Ramón y Cajal, 1892; Meller y Glees, 1965) y también bordean los vasos sanguíneos (Kondo y col., 1983; Hollander y col., 1991). En la CFNO las vainas de mielina que se observan alrededor de algunos axones en las porciones más próximas al nervio óptico se originan a partir de las prolongaciones internas de las células de Müller (Ladman y Soper, 1962; Hudges y LaVelle, 1975; Prada F. y col., 1989).

2.3.4.2. *Función nutritiva y metabólica*

Clásicamente se le ha adjudicado a las células de Müller un importante papel nutricional, por el hecho de poseer abundantes *microvilli* (Uga y Smelser, 1973 a, b), por ser el principal almacén de glucógeno de la retina (Magalhes y Coimbra, 1970) y por haberse descrito la existencia de vesículas picnóticas en su superficie (Prada, F. y col., 1989). También se ha demostrado la presencia de la glucógeno fosforilasa, esencial en la movilización de las reservas de glucógeno, por medios histoquímicos (Ohanian, 1972) e inmunohistoquímicos (Pfeiffer y col., 1994). Además se ha descrito la existencia de las proteínas GLUT1 (Mantych y col., 1993) y GLUT2 (Watanabe y col., 1994), transportadoras de glucosa por difusión

facilitada en células de Müller de retinas humanas y de rata respectivamente. Puede también desempeñar una importante función en el metabolismo de la vitamina A, pues es la única célula de la retina neural en la que se localiza la proteína ácida ligante de retina (Bunt-Milam y Saari y col., 1983) y la proteína celular ligante de retinol (Bok y col., 1984).

2.3.4.3. *Mantenimiento de la homeostasia retinal*

La célula de Müller juega un papel preponderante en la homeostasia de la retina por la eliminación del exceso de K^+ en el espacio extracelular. Newman (1984;1985a b) demostró en retina de salamandra que la célula de Müller es exclusivamente permeable al K^+ y que el mayor número de canales para este ion se concentra en el pie vítreo. Basándose en estos hallazgos, Newman y col., (1984) propusieron que las células de Müller toman del espacio extracelular el exceso de K^+ , generado por la actividad neuronal y lo eliminan al vítreo (Karwoski y col., 1989), resultados similares se obtuvieron en células de Müller de tortuga (Conner y col., 1985), de rana (Skatchkov y col., 1995) y de mamíferos (Reichenbach y Eberhardt, 1986).

La célula de Müller interviene también en la retirada de los neurotransmisores liberados por la transmisión sináptica, proceso éste importante para eliminar la excitabilidad neuronal. Las células de Müller poseen sistemas de captación de varios neurotransmisores y/o neuromoduladores, estos mecanismos han sido descritos para el glutamato (Ehinger, 1977; Casper

y col., 1982; Brandon y Lam, 1983; Brew y Attwell, 1987; Barbour y col., 1988, 1991; Bouvier y col., 1992; Amato y col., 1994), para el GABA (Ehinger, 1977) y para la taurina (Ehinger, 1973; Lake y col., 1978; Schulze y Neuhoff, 1983). También se han encontrado sistemas enzimáticos para la inactivación y/o degradación de glutámico (Riepe y Norenburg, 1977; Sarthy y Lam, 1978; Linser y Moscona, 1979; Trachtenberg y Packey, 1983; Linser y col., 1984), GABA (Hyde y Robinson, 1974; Moore y Gruberg, 1974; Sarthy y Lam, 1978) y acetilcolina (Sarthy y Lam, 1978).

Otro factor importante para el mantenimiento de la homeostasia es el mantenimiento del pH. Linser y Moscona (1981a) demostraron inmunohistoquímicamente que la expresión de anhidrasa carbónica está restringida en retina de pollo a la célula de Müller, lo que indica la importancia de esta célula en el equilibrio ácido-base de la retina. Como es sabido esta enzima cataliza la reacción de hidratación del CO_2 para formar ácido carbónico, que se disocia en H^+ y HCO_3^- , eliminándose así el exceso de CO_2 generado en el metabolismo de las células de la retina.

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

inducción.

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

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

Diversos autores (Bhattacharjee y Sanyal, 1975; Meller y Tetzlaff, 1976; Prada, F. y col., 1989; Reichenbach y col., 1992, 1994) sugieren que las células de Müller pueden jugar durante el desarrollo de la retina un papel similar al adjudicado a la glía radial en el desarrollo del SNC, especie de raíles a los que se adhieren determinados neuroblastos para emigrar (Rakic, 1972). Es notoria la semejanza entre los glioblastos de Müller en sus primeros estadios y la glía radial de otras zonas del SNC en desarrollo. En la retina de pollo, la mayoría de las células de Müller comienzan a salir del ciclo celular después que han comenzado a salir las células horizontales y amacrinas (Kahn, 1974; Prada, C. y col., 1991) que son las células que realizan una emigración

libre en la retina. De hecho, la mayoría de las células de Müller abandonan el ciclo después de E-6 (Prada, C. y col., 1991) cuando ya han emigrado y alcanzado las posiciones definitivas la mayoría de las células amacrinas (Prada, C., y col., 1987). Por lo tanto no está claro que en la retina las células de Müller juegan algún papel en la emigración de los neuroblastos. Juegan o no un papel en la migración, éstas células sí pueden interactuar con los otros tipos celulares de la retina a lo largo del desarrollo. Así, en cultivos heterotípicos de retina de rata los bastones tienen una marcada preferencia a emitir neuritas sobre las células de Müller y no sobre otros tipos celulares (Kljavin y Rech, 1991).

2.3.4.5. *Mecanismos de comunicación con las neuronas*

En la célula de Müller se han descrito varios tipos de canales y receptores que podrían servir como mecanismos de comunicación entre neuronas y glía o como sensores de actividad neuronal. El glutámico es captado por medio de un intercambiador electrogénico e implica movimientos de grupos OH⁻, lo que hace aumentar el pH extracelular y disminuir el intracelular. Este cambio de pH según Bouvier y col., (1992) podría ser una señal para las neuronas y/o las células de Müller. En células disociadas de salamandra (Schwarz, 1993) y en células cultivadas de pollo (López-Colomé y col., 1993) existen, además de mecanismos de transportes, receptores para el glutámico de tipo metabotrópico, que promueven la activación de la proteino

quinasa C, la hidrólisis de fosfoinosítidos y la entrada de Ca^{++} . Uno de los efectos de entrada de Ca^{++} es el aumento de permeabilidad de la célula al K^+ . Así pues, la propia actividad neuronal podría modular la permeabilidad de la célula de Müller a este ión. En un elasmobranquio, la raya, se ha demostrado la existencia de receptores para GABA, posiblemente del tipo GABA-A que abren canales Cl^- (Malchow y col., 1989). En mamíferos, Biedermann y col. (1995) han encontrado receptores para dopamina (D_2). Los autores señalan que la adición de agonistas de estos receptores hacen disminuir la permeabilidad al K^+ , lo que a su vez podría modificar la excitabilidad de las neuronas vecinas, al modificarse el mecanismo de taponamiento del K^+ . En células de pollo cultivadas, varios neuropéptidos que se encuentran en la retina (glucagón y péptido intestinal vasoactivo) hacen aumentar la concentración de AMP cíclico (Koh y col., 1984). En salamandra se ha descrito que las catecolaminas estimulan una corriente eléctrica hacia dentro (Henshel y Miller, 1992) aunque se desconoce si se produce por un mecanismo de transporte electrogénico, como el que existe para el glutamato o por activación de canales iónicos. En células de Müller humanas cultivadas se han encontrado, por vez primera en glía, receptores NMDA, cuya activación por glutamato promueve la proliferación de las células en cultivo (Uchihori y Puro, 1993). No se ha descrito proliferación de células de Müller adultas por lo que se desconoce el significado de estos receptores en condiciones fisiológicas. Señalaremos que

otras sustancias como el factor básico de crecimiento de fibroblastos, la interleukina 2 y el factor de crecimiento nervioso (Small y col., 1991; Ikeda y Puro, 1994) tienen este mismo efecto *in vitro*.

La concentración intercelular de Ca^{++} en la célula de Müller puede variar, bien por su entrada a través de los canales de Ca^{++} sensibles a voltaje descritos por Newman (1985b) que se abren en caso de alta concentración extracelular de K^+ , o bien por liberación de Ca^{++} de los almacenes intracelulares por acción de ciertas drogas como cafeína y rianodina (Keirstead y Miller, 1995). Esto podría servir para potenciar la expulsión de K^+ al vítreo por canales dependientes de Ca^{++} (Newman, 1985b) o para inducir determinados cambios en la célula, dada la importancia del Ca^{++} como mensajero intracelular. Cuando la liberación es de almacenes intracelulares en medio libre de Ca^{++} , el incremento de concentración intracelular comienza en el extremo ventricular y continúa propagándose como una onda hasta el polo vítreo. En células de Müller humanas cultivadas se han encontrado canales para Ca^{++} y otros cationes mono y divalentes activados por estiramiento (Puro, 1991). No se han descrito en células disgregadas ni *in situ*, pero se postula que en caso de aumento de volumen de la célula, el ingreso de Ca^{++} podría activar canales K^+ dependientes de este catión, con lo que se expulsaría K^+ acompañado por agua. En algunas células de Müller de mamíferos como gato y perro, aunque no en otras como conejo y cobaya, se han descrito la

existencia de canales de Na^+ dependientes de voltaje, similares a los neuronales (Chao y col., 1993). Hay indicios de que podrían estar localizados en las prolongaciones perinodales (Chao y col., 1994). Estos canales podrían funcionar como sensores de la actividad neuronal.

Las células de Müller liberan sustancias neuroactivas en determinadas situaciones. Así, despolarizaciones causadas por elevación de la concentración del K^+ extracelular o por efecto de veratridina promueven liberación de GABA mediada por aumento de la concentración intracelular de Ca^{++} , lo que podría modular la actividad de células cercanas. Faff-Michalak y col. (1994) han descrito liberación de taurina por la célula de Müller en respuesta a varios tóxicos. Apuntan la existencia de un mecanismo protector que podría limitar aumentos de volumen más allá de los límites fisiológicos, quizá influyendo la actividad de las neuronas de los alrededores. Se sabe que el volumen de la célula de Müller aumenta en respuesta a alta concentración de K^+ y a perfusión con glutamato (Van Harreveld, 1982). En células de Müller de pollo se ha encontrado expresión de la enzima óxido nítrico sintetasa (Goureau y col., 1994; Liepe y col., 1994). El NO puede funcionar como molécula citotóxica o citostática en procesos de defensa, o bien como mensajero extra o intracelular.

En retinas vascularizadas puede haber comunicación entre la célula de Müller y otros tipos de glía de la retina, como se sugiere por la presencia de

uniones tipo *gap* entre astrocitos y células de Müller (Robinson y col., 1993).

Un claro ejemplo de interacción entre neuronas y células de Müller es la expresión de la **glutamina sintetasa**. Esta enzima no se expresa cuando se impiden estas interacciones (Linser y Moscona, 1979; Linser y Perkins, 1987; Grosche y col., 1995). Se ha visto también que células de Müller cultivadas en ausencia de neuronas, o *in situ* tras la eliminación de células ganglionares, expresan Thy-1 (Dabin y Barnstable, 1995), lo que sugiere que las células ganglionares podrían inhibir la expresión de esta molécula en condiciones normales.

2.4. LA DIFERENCIACION DE LA CELULA DE MULLER

El desarrollo de la retina ocurre, al igual que en el resto del SNC, en varias etapas sucesivas en el tiempo aunque solapantes: 1) proliferación de las células neuroepiteliales, 2) producción de los distintos tipos de neuronas y glía (neurogénesis y gliogénesis), 3) emigración de los neuroblastos hacia sus capas definitivas, 4) desarrollo de las formas definitivas, 5) sinaptogénesis, 6) muerte celular y 7) síntesis y liberación de neurotransmisores. El estudio en profundidad de la morfogénesis de la célula de Müller requiere una revisión detallada de las etapas de proliferación, neurogénesis y gliogénesis.

2.4.1. Proliferación: el neuroepitelio de la retina

El neuroepitelio de la retina es un epitelio de tipo columnar

pseudoestratificado en el cual las células realizan ciclos de división durante los primeros estadios embrionarios. En cada ciclo, duplican su material genético en las proximidades del vítreo y realizan la mitosis en posiciones adyacente al ventrículo. Así, en cada ciclo celular el núcleo se mueve entre las dos limitantes del neuroepitelio hasta que las células hijas se transforman en neuroblastos o glioblastos (Sauer, 1935; Sauer y Walker, 1959; Sidman y col., 1959; Fujita, 1963).

Ramón y Cajal (1892) describió las células neuroepiteliales de la retina como células fusiformes cuyas prolongaciones alcanzan las dos limitantes. No obtuvo más información por la falta de éxito en la tinción de embriones jóvenes. A partir de 1970 se realizaron estudios que pretendían relacionar las formas de las células neuroepiteliales con la fase del ciclo en que se hallan, empleando la técnica de tinción de Golgi y la reconstrucción de cortes seriados para el microscopio electrónico. (Hinds y Ruffert (1971) y Hinds y Hinds (1974) fueron los primeros en realizar un estudio morfológico y ultraestructural de las células neuroepiteliales en el ciclo de división celular. Como material emplearon vesícula cerebral y retina de ratón de 13 días de gestación. Concluyeron que la forma de las células neuroepiteliales es característica de la fase del ciclo celular en la que se hallan, proponiendo un esquema que muestra la forma de las células neuroepiteliales en las distintas fases del ciclo celular (Figura 11).

Prada, C. y col., (1981), en retinas embrionarias de pollo impregnadas con el método de Golgi, encontraron células con formas monopolares conectadas al ventrículo y con el núcleo en posiciones variables dentro del neuroepitelio. Estas formas, que no habían sido encontradas en los anteriores estudios, se asignaron a la fase G_2 , en contraposición a las formas bipolares anteriormente asignadas a esa fase. La figura 12 muestra los resultados obtenidos por Prada C. y col. (1981) y Prada C. y Ramirez (1983) en retina de embrión de pollo entre E-2,5 y E-8,5. En cada dibujo de los distintos estadios figuran en la parte izquierda las células neuroepiteliales con la forma que adoptan en cada fase del ciclo celular (mitosis, G_1 , S y G_2), y en la parte derecha los neuroblastos y glioblastos con las morfologías que adoptan al salir del ciclo celular.

Desde E-2,5 hasta E-4,5 se observan células de todas las fases del ciclo junto con una población de células que han dejado el ciclo proliferativo para diferenciarse en neuroblastos de células ganglionares. Las células que realizan las mitosis están situadas en el borde ventricular del neuroepitelio y tienen forma redondeada y regular. Las células en G_1 emiten una prolongación con un cono de crecimiento que llega a alcanzar la limitante vítrea. El núcleo, se desplaza así mismo hacia la limitante vítrea y al llegar a ésta, entraría en la fase S duplicando así su material genético. Finalmente, durante G_2 las células adoptan formas monopolar, conectándose sólo al ventrículo y volviendo a la

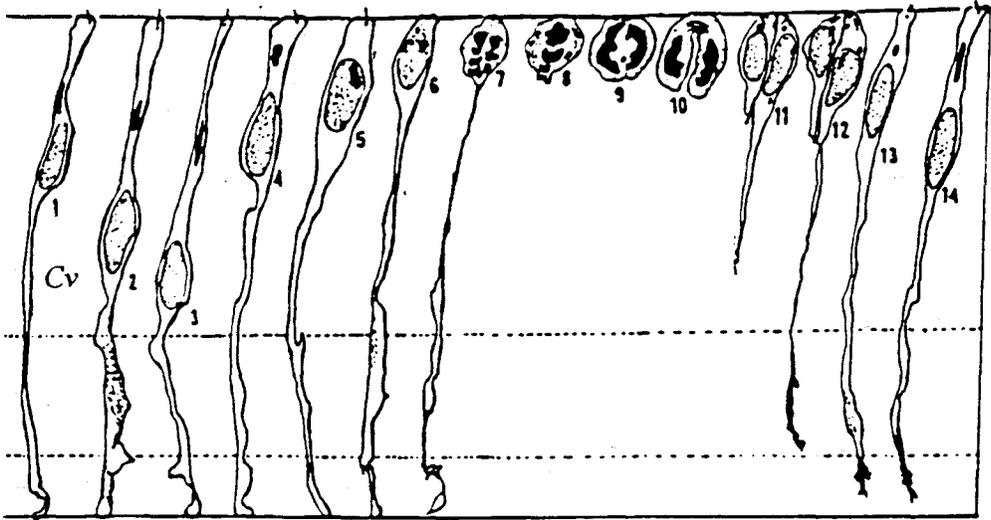


Figura 11. Reconstrucciones de una muestra representativa de la variedad de células neuroepiteliales de la retina de ratón en E-13. CV: capa ventricular. 1 y 2: células en interfase. 3, 4, 5, 6: células en profase. 7: célula en prometafase. 8: célula en metafase. 9: célula en anafase. 10: telofase temprana. 11 y 12: interfase temprana. 13 y 14: células en interfase. (Tomado de Hinds y Ruffet, 1971).

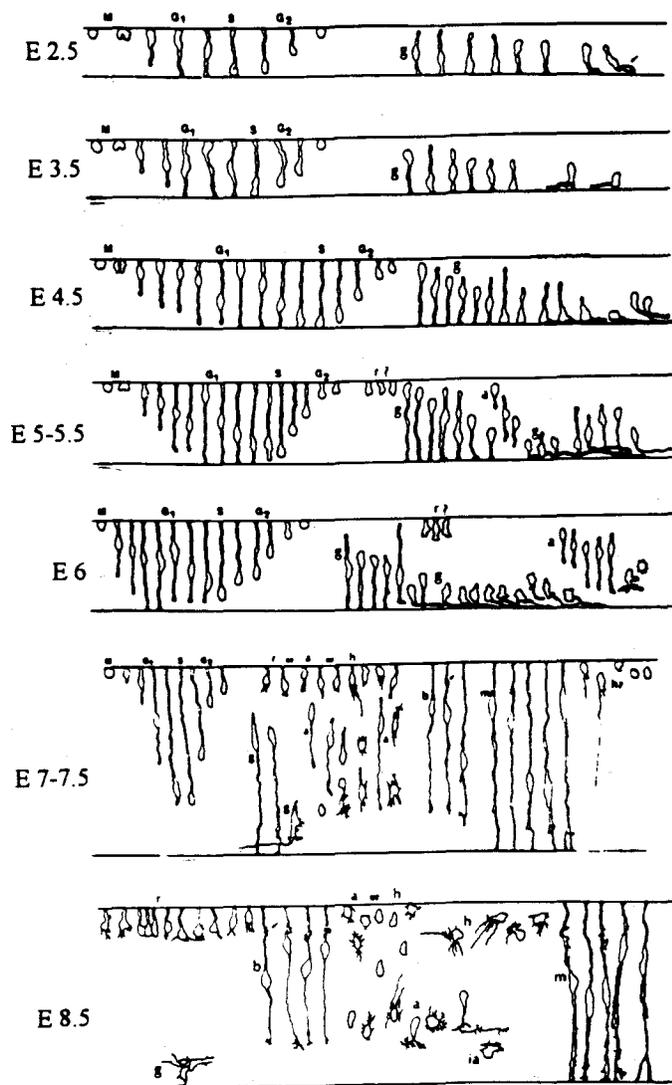


Figura 12. Dibujos a cámara lúcida de los tipos celulares encontrados en la retina de pollo entre E-2,5 y E-8. La línea superior indica la superficie ventricular y la inferior la vítrea. **M**, **G1**, **S** y **G2** indican las fases del ciclo celular. **g**: neuroblasto de célula ganglionar. **r**: presunto neuroblasto de fotorreceptor. **a**: neuroblasto de amacrina. **h**: neuroblasto de horizontal. **b**: neuroblasto de bipolar. **m**: glioblasto de célula de Müller. **ia**: neuroblasto de amacrina invertida. **flecha** en **A**: axon creciendo de un neuroblasto de célula ganglionar. **fechas** en **F** y **G**: zona de emisión de dendritas de neuroblasto de célula bipolar. (Tomado de Prada, C. y Ramírez, 1983).

superficie ventricular para realizar de nuevo la división.

A partir de E-6, la zona de síntesis de DNA se aleja de la limitante vítrea (Fujita, 1963), de la cual queda separada por la capa de axones emitidos por los neuroblastos de las células ganglionares. Este alejamiento de la zona de síntesis aumenta a medida que avanza el desarrollo. Por otra parte, mientras que entre E-2,5 y E-4,5 sólo se observan células neuroepiteliales y neuroblastos de células ganglionares, en días posteriores aumentan los tipos de neuroblastos identificables y en E-6,5 se identifican morfológicamente los primeros precursores de las células de Müller.

A partir de E-8,5 apenas se observan formas de células en ciclo en retina central, la mayoría de los neuroblastos ocupan su lugar definitivo, se distinguen bien las distintas clases de neuronas en cada capa nuclear y pueden observarse las prospectivas capas plexiformes.

2.4.2. Neurogénesis y gliogénesis en la retina

Como hemos visto en el apartado anterior, en la retina de pollo hay una secuencia de aparición de neuroblastos y glioblastos, de modo que se podría obtener un calendario aproximado de estos hechos. En base a los datos mostrados en la figura 12 podríamos decir que algunos precursores de las células de Müller dejan el ciclo celular antes de E-7. Esto es sin embargo, una aproximación, pues transcurre un tiempo desde que los glioblastos dejan el ciclo celular hasta que pueden ser identificados morfológicamente. Berkow y

Patzs (1964), mediante técnicas histoquímicas y Morest (1970) mediante el método rápido de Golgi, concluyeron que en el conejo las células de Müller abandonan el ciclo después que los precursores de todas las neuronas de la retina. Por otra parte, los trabajos de microscopía electrónica de Uga y Smelser (1973 b) en la retina de conejo y de Kuwabara y Weidman (1974) en la rata, junto con los de histoquímica de Bhattacharjee y Sanyal (1975) en ratón indicaron, por el contrario, que son las primeras células que aparecen en la retina. Fue Kahn (1974) quien marcó radiactivamente el ADN de las células en ciclo y estudió las autorradiografías de secciones de 10 μm de grosor de retinas de los distintos estadios, esta técnica es la única que permite obtener resultados fiables. Sin embargo Kahn no llegó a una conclusión definitiva sobre la fecha de nacimiento de las células de Müller, debido a que en estas secciones no se pueden distinguir qué núcleos de la CNI corresponden a las células de Müller y cuales a las células bipolares, aunque sí determinó que ambas eran las últimas en salir del ciclo mitótico. Prada C. y col. (1991), usando la técnica de autorradiografía en secciones seriadas de retina y en extensiones de células disgregadas de diferentes estadios de desarrollo, y mediante un estudio sistemático del número de núcleos no marcados por sectores y áreas de la retina obtuvieron resultados muy diferentes. De esta manera determinaron el momento en que deja el ciclo cada tipo celular, que no es el mismo en toda la retina, ya que unas áreas van más adelantadas que otras

y dentro de la misma área no todas las células de un tipo dejan el ciclo celular simultáneamente. El área donde comienza la neurogénesis es una región situada dorsalmente con respecto a la cabeza del nervio óptico y por tanto, ligeramente temporal (Figura 13A). Partiendo de esta área de referencia se observan tres gradientes espaciales de mayor a menor grado de neurogénesis: de dorsal a ventral, de temporal a nasal y de central a periférico. En la figura 13 B mostramos una gráfica con los resultados obtenidos por estos autores en la región temporal-central-dorsal de la retina (aproximadamente la zona sombreada en A). Demostraron en retina de pollo que las células de Müller no son las últimas células de la retina en salir del ciclo celular, sino que comienzan a abandonarlo muy pronto en E-5 y terminan en E-11 en toda la retina (figura 13 C). Las últimas células en generarse son las células bipolares que dejan el ciclo en E-12. Por lo tanto, las células de Müller del pollo tienen un periodo de gliogénesis muy largo, 6 días, y aunque no son las primeras en comenzar a generarse, sí lo hacen pronto en el desarrollo.

Los estudios de marcaje de líneas celulares con retrovirus, realizados por Turner y Cepko (1987) y Turner y col. (1990) en retinas de roedores, así como los de Wetts y Fraser (1988), Wetts y col. (1989) y Holt y col. (1988) en retinas de anfibios, indican que las células de la retina derivan de precursores ultrapotentes y que las células se comprometen en el último ciclo de división o en el momento de la separación de las dos células hijas. Estos estudios de

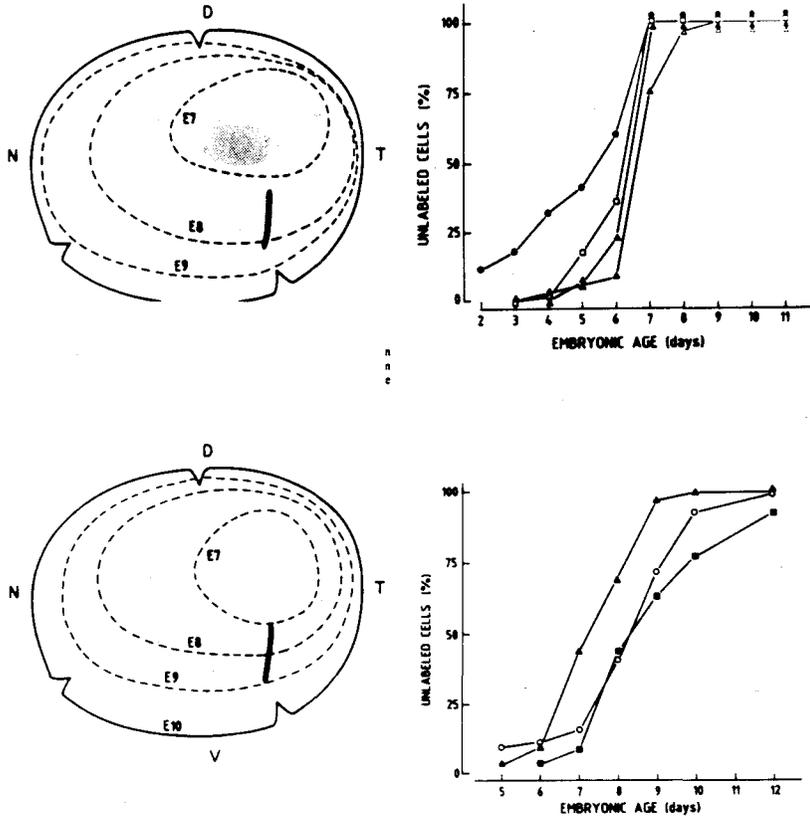


Figura 13. Patrones espacial y temporal de neurogénesis de retina de pollo. **A:** esquema de una retina en plano mostrando la progresión de la neurogénesis de los fotorreceptores (inferior) y células ganglionares (superior). La zona rayada indica el nacimiento del nervio óptico. **D, V, T y N** marcan los cuadrantes dorsal, ventral, temporal y nasal, respectivamente. Las líneas discontinuas rodean las zonas en las que se alcanza el 100% de neurogénesis para el estadio indicado en su interior. **B:** Patrón temporal de neurogénesis de células ganglionares (**circulo**), amacrinas (**triángulo abierto**), horizontales (**cuadrado**) y fotorreceptores (**triángulo relleno**), averiguado en autorradiografías de secciones, aproximadamente a nivel del área sombreada en **A**. **C:** Patrón espacial de salida de ciclo de fotorreceptores (**triángulo**), células bipolares (**cuadrado**) y células de Müller (**círculo**), determinado en autorradiografías de disgregaciones celulares de la retina completa. Compárese el patrón que se obtiene para los fotorreceptores con estos dos métodos. (Tomado de Prada, C. y col., 1991).

linaje celular estaban encaminados a averiguar las relaciones ontogénicas entre los distintos tipos de células, es decir el árbol genealógico de las células de la retina y han intentado responder a la pregunta de si todos los tipos de células de la retina neuronas y glia incluidas, se generarían a lo largo de todo el desarrollo a partir de una población homogénea de células neuroepiteliales multipotentes, o por el contrario, si las células neuroepiteliales de los estadios iniciales se comprometerían formando líneas celulares con capacidad proliferativa para cada tipo de células de la retina. Esto último implicaría la existencia de poblaciones diferentes de células neuroepiteliales, de modo similar a como ocurre en la médula ósea con la diferenciación de las células sanguíneas (Alberts y col. 1992). Los trabajos de Barnstable y col. (1985) en retina de rata y McLoon y Barnes (1989) en retina de pollo, mediante anticuerpos monoclonales, muestran que la expresión de marcadores de células diferenciadas comienzan en la célula neuroepitelial en posiciones adyacentes al ventrículo, lo que indica que, al menos para algunos tipos celulares, la determinación ocurre durante la mitosis del último ciclo de división o inmediatamente después, pero antes de que los neuroblastos comiencen a emigrar a sus posiciones definitivas.

Experimentos realizados en retina de peces (Negishi y col., 1982) y anfibios (Reh y Tully, 1986; Reh, 1987), especies en las cuales hay producción de células a lo largo de toda la vida, evidencian una influencia ambiental en el

proceso de neurogénesis. En estos experimentos se muestra que la destrucción selectiva de determinados tipos celulares estimula su producción. Entre los factores ambientales que podrían intervenir en este proceso estarían señales mediadas por interacciones celulares (Harris y Messermith, 1992), por interacciones de las células con la matriz extracelular (Hunter y col., 1992) o por unión de factores solubles a sus receptores, que pueden actuar como potenciadores de la capacidad proliferativa del neuroepitelio de la retina (Anchan y col., 1991) o como inductores de la producción de determinados tipos celulares (Parck y Hollenberg, 1989; Pittack y col., 1991; Guillemot y Cepki, 1992; Kelley y col., 1994). Se desconoce si la gliogénesis está influenciada por factores ambientales.

Sin embargo, recientemente han aparecido trabajos que cuestionan la idea de que las células neuroepiteliales son una población homogénea de células multipotentes a lo largo de todo el desarrollo, capaces de diferenciarse en cualquier tipo de célula de la retina. Prada y col. (1991) han demostrado en el pollo que al principio de la neurogénesis sólo se producen células ganglionares y al final sólo células bipolares, lo cual cuestiona la multipotencialidad de las células neuroepiteliales en estos momentos del desarrollo. Otros trabajos proponen la posibilidad de la existencia de sublinajes, es decir, precursores cuya potencialidad se restringe a uno o varios tipos celulares (McLoon y Barnes, 1989). Según este modelo, la población

inicial de células epiteliales daría lugar a precursores comprometidos a dar uno o varios tipos celulares. Este punto de vista se ve apoyado por resultados de Watanabe y Raff (1992), quienes demuestran que células neuroepiteliales de diferentes estadios de desarrollo se comportan de diferente manera en las mismas condiciones de cultivo, lo que indica que las células van cambiando a lo largo del desarrollo, es decir, su potencial se iría restringiendo. También Lillien y Cepko (1992) observaron cambio en la respuesta de células neuroepiteliales a determinados factores de crecimiento. Hernandez-Sanchez y col. (1994) descubrieron un antígeno denominado PM1, cuya expresión está restringida a una subpoblación de células neuroepiteliales, lo que indica que éstas células no son una población homogénea. En la retina de los mamíferos, los últimos estudios de Hagedorn y Fernald (1992) dan a conocer el siguiente orden de generación celular: 1º Conos y células ganglionares, 2º Amacrinas y células bipolares, seguidas por las células horizontales y las células de Müller y 3º Bastones. Todas estas células son generadas en una primera fase de proliferación celular, excepto los bastones que son producidos en una segunda fase u oleada (Schols, 1976). En la retina de mamíferos, Reichenbach y col. (1994), basándose en cálculos de la abundancia relativa de distintos tipos celulares retinianos así como en los calendarios de neurogénesis averiguados por autorradiografía y en los hallazgos de trazado de linaje por retrovirus, proponen dos fases de producción de tipos celulares, al igual que lo

hizo Allodi y col. (1992), y por lo tanto la existencia de diferentes linajes para distintos tipos celulares. Habría uno o varios linajes que darían lugar a las células ganglionares, las horizontales, parte de las amacrinas y los conos, y otro linaje que daría origen, más tardíamente a los bastones, las células bipolares, parte de las amacrinas y las células de Müller (Fig.14). Estos autores apuntan la hipótesis de que una célula precursora del segundo linaje daría lugar a una sólo célula de Müller y cantidades fijas para cada especie de los otros tipos celulares. La misma secuencia de citogénesis ha sido demostrada en ratón (Sidman, 1961; Carter-Dawson y LaVail, 1979), gato (Zimmerman y col., 1988), mono (LaVail y col., 1991), conejo (Reichenbach y col., 1994) y rata (Reh, 1992). En la retina de marsupiales la existencia de dos fases de neurogénesis ha sido claramente demostrada en dos especies distintas (Harman y Beazly, 1987; 1989; Harman y col., 1992; Allodi y col., 1992; Harman y Ferguson, 1994).

Las células de Müller constituyen una gran proporción de células respecto al total de población celular (Tabla2). Esta proporción es mayor en las retinas dominantes para conos y en las que existen muy pocos bastones y es menor en los mamíferos nocturnos que tienen la mayor densidad de bastones (Galifret, 1968; Reichenbach y El Belghti, 1983; Dreher y col., 1994).

2.4.3. Morfogénesis de la célula de Müller

El desarrollo de las células de Müller fue estudiado por Ramón y

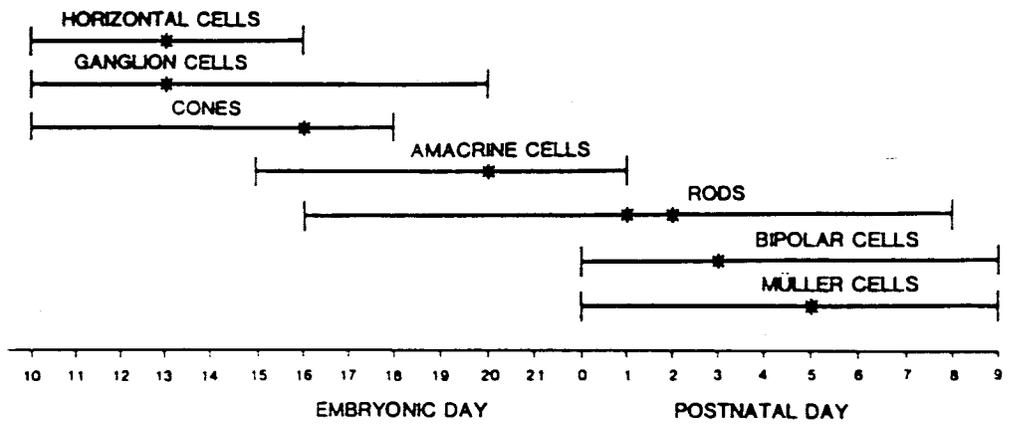


Figura 14. Períodos de generación celular de los distintos tipos de células en la retina de rata. (Tomado de Reh, 1992).

Cajal (1892) (Figura 15) quien describe en los primeros estadios los glioblastos de Müller como células elongadas y fusiformes con somas ovales. Las prolongaciones alcanzan las dos limitantes y se unen a ellas por engrosamientos. En este primer estadio los somas están dispersos por toda la retina excepto la CCG y la CFNO (Figura 15 A); sin embargo, cuando progresa el desarrollo, los somas se desplazan hacia el centro de la CNI (Figura 15 C). Los contornos se van haciendo más irregulares y su final vítreo aparece bifurcado en algunas células (Figura 15B). Por último, las células crecen en grosor y emiten expansiones laminares. El extremo de la prolongación ventricular se transforma en un disco del que salen finas prolongaciones que penetran entre los precursores de los fotorreceptores. En la CNE hay unas expansiones laminares cuya aparición es precedida por la presencia de una masa protoplásmica redondeada u oval, de la que Ramón y Cajal afirma que es una reserva de la que se desarrollan las posteriores expansiones laterales (Figura 15 C). Por último, afirma que el haz de prolongaciones vítreas presentes en las células de réptiles y aves se origina por fisura longitudinal de la prolongación vítrea desde la CCG.

El desarrollo postnatal de la célula de Müller del conejo ha sido estudiado a nivel morfológico por Reichenbach y Reichelt, (1986) mediante el uso de una técnica de disgregación celular que preserva la morfología de la célula de Müller, de él destacamos que a partir de P-10 se observa cómo se

Especies	Neuronas	ONL/MC	INL/MC	GCL/MC
Cat	35.73	30.16	5.25	0.32
Mouse	35.61	27.60	7.01	1.00
Fox	34.89	27.27	6.98	0.64
Dog	32.62	26.12	5.95	0.55
Polecat	31.50	25.58	5.26	0.67
Rat	31.21	24.90	5.80	0.51
Mink	29.10	22.68	5.88	0.54
Whale	26.38	23.00	2.80	0.58
Deer	16.60	12.13	2.88	0.90
Rabbit	16.45	12.49	3.10	0.23
Monkey	16.32	11.70	4.24	0.38
Zebra	16.28	12.59	3.50	0.26
Barbary sheep	16.25	12.97	3.25	0.30
Pig	15.82	12.15	3.24	0.43
Horse	15.81	13.44	2.22	0.15
Guinea pig	15.72	11.60	3.45	0.67
Human (periphery)	14.37	10.87	3.20	0.30
Mongolian gerbil	10.69	7.03	3.09	0.57
Gray squirrel	8.19	2.82	4.64	0.73
Tree shrew	6.80	1.70	4.60	0.50

TABLA 2: Relación del número de neuronas por células de Müller en retinas de distintos animales vertebrados (tomado de Reichenbarch y Rolinsa, 1996 b)

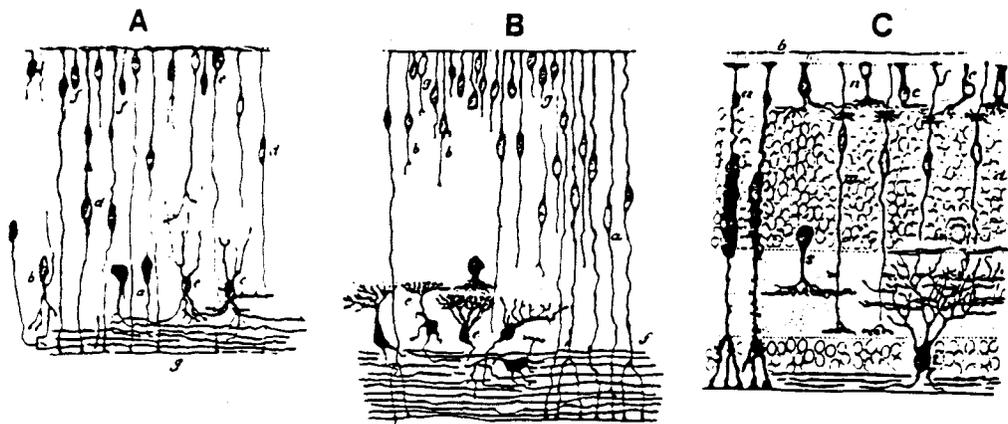


Figura 15. Dibujos de cortes de retina embrionarias de distintos vertebrados. **A:** embrión de ratón en el estadio de 15mm. Los glioblastos están marcados con **d**. **B:** embrión de perro en el estadio de 9cm. Glioblastos marcados con **f**. **C:** embrión de pollo en E-14. Glioblastos marcados con **a**. (Tomado de Ramón y Cajal, 1892).



desarrollan pequeñas ramificaciones en la parte de la célula que está dentro de las capas plexiformes y la prolongación ventricular se dividen en ramificaciones que presumiblemente formarán la red de expansiones laminares que envuelven los somas de los fotorreceptores en la retina adulta. El hecho de que sea a partir de P-10 cuando se empiezan a emitir ramificaciones es relacionado por los autores con la aparición de actividad eléctrica en la retina y el subsiguiente aumento en la concentración de K^+ , especialmente en las capas plexiformes. Este aumento en la concentración de K^+ induciría la emisión de prolongaciones por diversos mecanismos que llevarían al aislamiento de los contactos sinápticos por medio de las prolongaciones gliales.

Meller y Glees (1965) estudiaron el desarrollo de la célula de Müller del pollo mediante microscopía electrónica de transmisión. Encontraron que en E-6 gran parte de las células son neuroepiteliales sin diferenciar. En E-9 ya se pueden distinguir los glioblastos de la célula de Müller. Su porción externa se une con la de las células adyacentes mediante uniones especializadas de membrana. En este estadio aún hay pocas mitocondrias en la porción externa. Estas se concentran sobre todo a nivel de la CPI, aunque hacia el E-18 se sitúan definitivamente en la porción externa. Al mismo tiempo, de esta región externa surgen los *microvilli* que se hacen más numerosos con el tiempo. En E-15 se observan numerosas prolongaciones de las células de Müller dentro de

la CPE que penetran entre las prolongaciones externas de las células bipolares y de otras células que participan en la formación de esta capa; sin embargo, todavía no se observan prolongaciones entre los contactos sinápticos entre fotorreceptores y células bipolares. En E-17 se observa un aumento de la cantidad del material fibrilar, aparecen varios complejos de Golgi y retículo endoplásmico rugoso. Además la célula de Müller aísla los complejos formados por los contactos sinápticos entre los fotorreceptores y las células bipolares. En E-19 los somas de los fotorreceptores están totalmente aislados por las prolongaciones de las células de Müller. Este aislamiento de las células nerviosas y sus contactos sinápticos por las prolongaciones de las células de Müller se observan también parcialmente en la CNI, CPI y CCG.

2.5. AGENTES QUIMICOS QUE POSIBILITAN LA TRANSMISION SINAPTICA: LOS NEUROTRANSMISORES

A principio de este siglo comenzó la búsqueda de agentes químicos que pudieran transmitir la actividad de los nervios periféricos a los órganos. Tras una larga serie de trabajos científicos, la **acetilcolina** fue propuesta como mediador de la influencia parasimpática inhibitoria que el nervio vago ejerce sobre el corazón de la rana. Fue éste el primer neurotransmisor químico aislado y caracterizado tanto en su estructura como en su función, observandose que actuaba en los terminales nerviosos motores voluntarios para iniciar la

contracción muscular (Hall, y col.1971). Hacia la mitad de la década de los años cuarenta, la **noradrenalina** resultó ser el agente que posibilitaba la transmisión postganglionar (Von Euler, 1956). La **dopamina**, que es el precursor biosintético inmediato de la noradrenalina, fue aceptada como neurotransmisor en la década de los cincuenta (Carlsson, 1959). Otra amina neuroactiva la **serotonina**, se aisló al final de los cuarenta, localizándose después en muchos órganos y especialmente en el cerebro.

A principios de la década de los cincuenta, estos cuatro compuestos mencionados, junto con algún que otro candidato menos probable, integraban toda la gama de agentes que actuaban en las sinápsis químicas. Estos potentes compuestos fueron localizados en las neuronas y en sus terminales a partir de los cuales se liberaban. Parecía entonces razonable asumir que estas sustancias suponían los medios principales para posibilitar la acción sináptica a todo lo largo del sistema nervioso. Se tenía la impresión de que en el diseño del cerebro cuadraban bien las características de poseer mensajes “excitadores” o “inhibidores” posibilitados por un reducido número de sistemas potentes que existían en pequeñas cantidades y que se localizaban en los terminales nerviosos. Sin embargo, durante la década de los cincuenta, cinco aminoácidos: **glutamato**, **aspartato**, **γ -aminobutirato (GABA)**, **glicina** y **taurina** fueron nuevos e importantes candidatos para el desarrollo de la función neurotransmisora. Estos existen en todas las células u órganos en

concentraciones elevadas, siendo también utilizados en una amplia serie de vías metabólicas y en la biosíntesis de sustancias tanto en neuronas como en células gliales.

En la década de los setenta fueron caracterizadas otras sustancias, los **péptidos nerviosos**, que tienen actividades más especializadas que los aminoácidos y están presentes en cantidades muy pequeñas en regiones localizadas del sistema nervioso.

Recientemente se ha identificado una nueva categoría funcional de sustancias, totalmente distintas, que ejercen tras su liberación un efecto modulador sobre las acciones postsinápticas de los neurotransmisores convencionales. Estos neuromoduladores se liberan también de las neuronas o terminales nerviosos y pueden actuar localmente o a distancia. Los neuromoduladores pueden liberarse de los mismos terminales nerviosos junto al neurotransmisor primario. Hace pocos años se halló que unos treinta potentes compuestos hidrosolubles, cargados eléctricamente y casi todos ellos aminos y péptidos, pero incluyendo también algunos agentes como la adenosina y ATP, actuaban independientemente o en conjunto para controlar la comunicación entre las neuronas a través de sus puntos de contactos íntimos que son las sinápsis químicas y en las uniones de las neuronas con diversos órganos inervados por ellas.

Una vez que los neurotransmisores han sido liberados, se unen a sus

receptores específicos situados en la célula postsináptica, comunicando un mensaje inhibitor o excitador. Esta señal es transmitida a través de la membrana como un mensaje eléctrico en forma de cambio de potencial de membrana que tiene lugar como consecuencia de la activación de “puertas” o “canales” iónicos selectivos, que aparentemente existen en asociación física íntima con el receptor. En ocasiones se envía un mensaje químico al interior de la célula postsináptica en lugar de un cambio de potencial eléctrico. En este caso se activa un sistema enzimático después de que el neurotransmisor se una a su receptor y el producto de esta actividad enzimática es el mensaje. Hasta el momento actual conocemos dos sistemas de este tipo en los que están involucrados los nucleótidos cíclicos, adenil ciclasa y guanilato ciclasa, que producen 3',5'-AMP cíclicos y 3',5'-GMP cíclico, como segundos mensajeros respectivamente.

Las acciones de estos segundos mensajeros son múltiples. Además de regular la fosforilación protéica, cambiando así la permeabilidad de las membranas con respecto a iones específicos y controlar los niveles intracelulares de calcio, pueden también influir en las velocidades de síntesis del neurotransmisor, alterar la expresión genética a nivel transcripcional, regular la función de los microtúbulos y acelerar el metabolismo de los carbohidratos y de los lípidos que ofrecen la energía celular necesaria para la respuesta fisiológica.

2.6. LOS SISTEMAS DE NEUROTRANSMISORES AMINOACIDOS

Hasta el momento actual han sido considerados cinco aminoácidos comunes como poseedores de funciones de neurotransmisores. El glutamato y el aspartato actuarían de forma excitadora y el GABA y la glicina funcionarían como transmisores inhibidores. La taurina posee propiedades inhibitoras, aunque no se está seguro de su finalidad fisiológica.

La diferencia más destacada entre los neurotransmisores aminoácidos y otros neurotransmisores es su alto contenido en tejido nervioso y su ubicuidad y participación múltiple en procesos bioquímicos generales, tales como la biosíntesis proteica y el metabolismo intermediario. Su amplio uso en las sinápsis periféricas y centrales del SN de muchas especies indican que deben poseer propiedades especiales que les confieren un valor altamente competitivo en la selección evolutiva.

2.7. SISTEMA GABAERGICO

El neurotransmisor inhibitor GABA fue descrito por vez primera en preparaciones de tejido cerebral mediante técnicas de cromatografía (Roberts y Frankel, 1950). El GABA se localiza en concentraciones elevadas y en amplias zonas del SNC. Más recientemente, se ha determinado su acción como modulador neuronal mediante su liberación desde las interneuronas (Roberts, 1986).

2.7.1. Metabolismo

El sustrato metabólico para la formación de GABA lo forman la glucosa, el piruvato y otros aminoácidos a través del ciclo de Krebs. Procedente de este ciclo, el ácido alfa-cetoglutarato pasa a ácido glutámico mediante el enzima glutámico deshidrogenasa (GDH). Este es decarboxilado mediante el enzima ácido glutámico decarboxilasa (GAD), piridoxal fosfato dependiente, produciendo el GABA. El proceso de producción del GABA parece localizarse sólo en terminaciones nerviosas gabaérgicas, ya que es donde se ha demostrado inmunohistoquímicamente una concentración elevada de GAD.

El GABA se **almacena** en las terminaciones nerviosas, donde puede estar libre o unido a vesículas sinápticas, pero también se puede hallar en las células gliales

y durante un tiempo en el espacio extracelular (Figura 16). Puede ser **liberado** tanto desde la glia como desde las células neuronales. En las células gliales no hay evidencia de liberación vesicular, mientras que en las neuronas ésta ocurre desde depósitos localizados en las terminaciones presinápticas. Este proceso es dependiente de sodio y calcio y estimulado por potasio.

El GABA es posteriormente **recaptado** por la misma terminación nerviosa, desde el espacio sináptico o espacios intersticiales, mediante un sistema de transporte específico o inespecífico. Esta recaptación también se lleva a cabo en la glia (Figura 16).

Tras ser captado por las células nerviosas o gliales, el GABA es **degradado** en las mitocondrias de ambas. En primer lugar, sufre una transaminación mediante el gaba-alfa-cetoglutarato-transaminasa, pasando a semialdehído succínico. La transaminación ocurre con la aceptación simultánea del grupo amino por parte del ácido alfa-cetoglutarato, transformándolo en ácido glutámico, precursor a su vez del GABA. El semialdehído succínico es posteriormente oxidado mediante la semialdehido succínico deshidrogenasa (SSADH), pasando a ácido succínico el cual se reincorpora al ciclo de krebs (Bradford, 1988).

2.7.2. Receptores

Se han descrito tres tipos de receptores GABA en la retina de los vertebrados. **Receptor GABA-A**, media los efectos sinápticos rápidos del

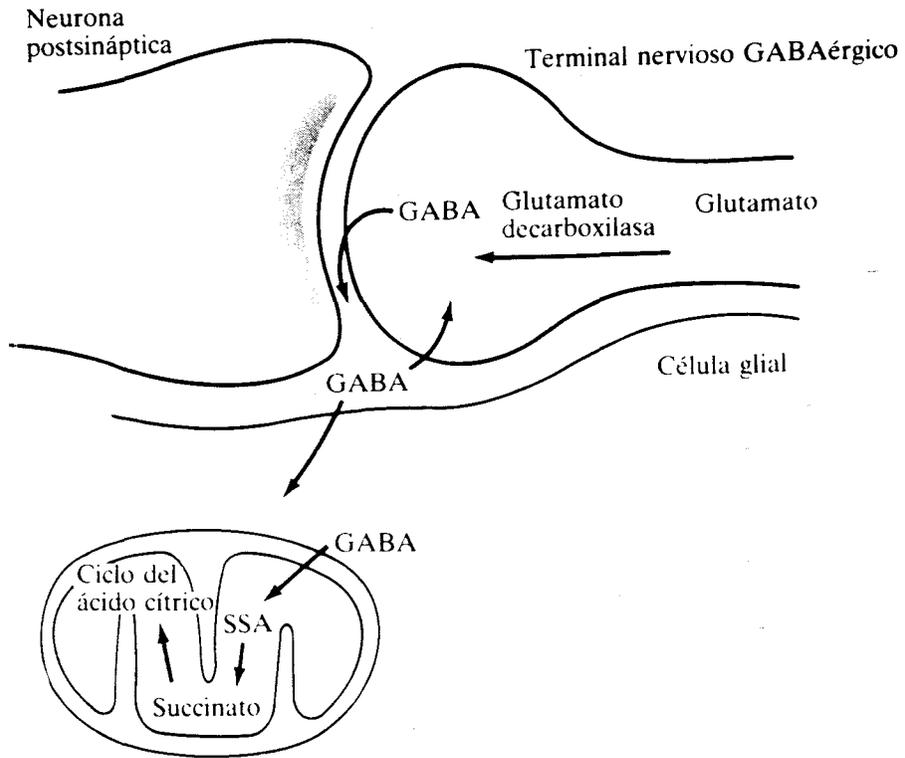


Figura 16. Compartimentación de la vía del cortocircuito GABA entre las neuronas y las células gliales. (Tomado de Bradford, 1988).

neurotransmisor inhibitor GABA en el SNC. Actualmente se piensa que éste receptor es una glicoproteína heteropentamérica de aproximadamente 275 kDa, compuesta por cinco subunidades polipeptídicas. La activación del receptor A por un agonista produce un incremento en la conductancia del cloro a través del canal iónico que regula el receptor. Como resultado se produce una hiperpolarización con disminución en la excitabilidad de la membrana neuronal que se traduce en una inhibición presináptica. Para estudiar la distribución de los receptores GABA en la retina se utilizaron anticuerpos monoclonales específicos contra el receptor A en retinas de peces y aves (Yazulla, y col., 1989), encontrándose positividad para el GABA en los conos y en las células amacrinas, así como en ambas capas plexiformes. En mamíferos, existe inmunorreactividad en las células bipolares, amacrinas y ganglionares (Mariani y col., 1987; Brecha y Weigmann, 1991; Vardi y col., 1992). Recientemente, se han descrito nueve subunidades diferentes del receptor GABA- A en la retina de la rata (Greferath y col., 1995).

Receptor GABA-B, es un receptor metabotrópico que actúa a través de un sistema de segundos mensajeros unidos a la proteína G, para alterar indirectamente la permeabilidad iónica de la membrana y la excitabilidad neuronal. Es insensible a muchos agonistas del receptor A y a la bicuculina. Este receptor media una inhibición postsináptica mediante una hiperpolarización producida por un aumento en la conductancia a potasio,

sobre terminaciones postsinápticas no gabaérgicas. Varios agonistas y antagonistas del receptor GABA-B actúan sólo en algunos lugares donde el baclofen muestra eficacia, por lo que se piensa que existen al menos dos subtipos de receptor B (Dutar y Nicoll, 1988). Los estudios sobre los receptores GABA-B en la retina han sido recopilados por Slaughter (1995), en ellos se pone de manifiesto que éstos modulan el balance entre las señales obtenidas y transitorias de la retina.

Receptor GABA-C, este tercer receptor es el menos estudiado y parece ser insensible al bloqueo por la bicuculina y el phaclofen.

2.8. SISTEMA GLUTAMATERGICO

La principal vía para la propagación de la señal visual es la glutamatérgica (Ehinger, 1989; Massey, 1990; Barnstable, 1993), siendo el glutamato 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, 1988). Entre la retina de los animales vertebrados es, al igual que en otras estructuras del SNC, 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; Bonaventure 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).

2.8.1. Síntesis y almacenamiento de glutamato y aspartato

Los aminoácidos **glutamato** y **aspartato** son dicarboxílicos. Ambos aminoácidos excitadores pueden ser biosintetizados por transaminación de su cetoácidos correspondientes, que son producidos en el ciclo de Krebs y en el interior de la matriz mitocondrial. El **glutamato** es producido por la transaminación de 2-oxoglutarato mediante la enzima aspartato amino transferasa y del 2-oxoglutarato e iones amonio a través de la acción de la glutamato deshidrogenasa (Bradford, 1988; Hall, 1992). También tiene lugar la interconversión rápida de glutamato y aspartato a través de la actividad de la enzima aspartato amino transferasa, localizada tanto en el citoplasma como en la mitocondria.

La liberación por parte de las neuronas del neurotransmisor glutamato es, al igual que el aspartato, dependiente del Ca^{2+} (Bradford y col., 1978a).

Otra fuente de obtención del glutamato es mediante su reciclado. Después de ser liberado por las neuronas, el glutamato es captado por las

células gliales y amidatado a glutamina (Shank y Aprison, 1981; Bradford, 1988; Hall, 1992; Herzt y col., 1992). Esta transformación es catalizada por la enzima **glutamina sintetasa (GS)** (Hamberger y col., 1979) (Figura 10).

La GS está presente sólo en las células gliales (Hamberger y col., 1978), incluyendo la glia radial como es la célula de Müller de la retina (Pow y col., 1993).

Una vez convertido el glutamato en glutamina ésta es liberada por las células gliales y captada de nuevo por las neuronas para convertirla en glutamato(Figura 10) (Bradford y col., 1978 b; Hamberger y col., 1979; Shank y Aprison, 1981; Ross y col., 1987; Herzt y col., 1992; Kaneko y Mizumo, 1992; Ishikawa y col., 1996).

2.8.2. Receptores

La acción del glutamato es mediada por receptores para el glutamato (**GluRs**), que se dividen en dos tipos. La familia de los **receptores ionotrópicos (iGluRs)**, ligados a canales permeable a los iones sodio y calcio (Monaghan y col., 1989; Nakanishi, 1994; Seeburg, 1993; Hollman y Heinemann, 1994; Peng y col., 1995) y la familia de los **receptores metabotrópicos (mGluRs)**, que actúa mediante un sistema de segundos mensajeros unidos a la proteína G (Sladeczek y col., 1985; Sugiyama y col., 1987; Nakashi, 1994; Gabellini y col., 1994; Peng y col., 1995 Pin y Duvoisin,

1995; Brandstätter, y col. 1996).

Las sinápsis que utilizan glutamato, o al menos que poseen receptores para el glutamato, están distribuidas muy ampliamente en las distintas poblaciones neuronales y gliales (Rogers y col., 1991; Blackstone y col., 1992; Martin y col., 1992; Craig y col., 1993; Huntley y col., 1993; Peng y col., 1995)

Estudios electrofisiológicos muestran que los GluRs están presentes en las células bipolares, horizontales, amacrinas y ganglionares de la retina (Müller y col., 1992; Shigemoto y col., 1992; Hamassaki- Brito y col., 1993; Peng y col., 1995). En el cerebelo, los receptores para el glutamato aumentan en número durante la segunda y tercera semana del desarrollo cuando tiene lugar la sinaptogénesis de las fibras paralelas glutamatérgicas.

2.9. LA GLUTAMINA SINTETASA: ENZIMA CATALITICA DEL SISTEMA GLUTAMATERGICO.

El estudio de la regulación del metabolismo del glutamato en el SNC ha sido objeto de numerosos estudios, especialmente la **enzima glutamina sintetasa(GS)** que metaboliza el glutamato a glutamina (Van der Berg, 1970). Esta enzima juega un importante papel no sólo como intermediario metabólico, sino también como regulador de los neurotransmisores glutamato (Kalloniatis y col., 1994; Pow y col., 1994) y GABA (Van der Berg, 1970; Bradford y col.,

1978; Voader y col., 1978; Herzt y Shousbe, 1980; Herzt, 1981; Mc Greer y col., 1983;). Recientemente, Patel y col., (1985) establecen una correlación entre la actividad de la GS y la síntesis del ácido glutámico decarboxilasa (GAD), enzima necesaria para la formación del neurotransmisor GABA a partir de la glutamina. Otra de las funciones de la GS es actuar como detoxificador en el SNC, al eliminar el exceso de amonio manteniéndolo a niveles bajos de concentración (Berls, 1971; Cooper y col., 1983).

La GS se encuentra en el interior de las células gliales y en un principio pareció estar restringida a los astrocitos del SNC tanto *in vivo* (Martínez-Hernandez y col., 1977; Norenberg 1979; Norenberg y Martinez-Hernandez, 1979; Roots, 1981; Patel y col., 1982; Norenberg, 1983; De Vellis y col., 1986a,b; Mearow y col., 1989) como *in vitro* (Juurlink y col., 1981). Posteriormente se observó que también existía inmunorreactividad 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 exclusivamente en las células de Muller (Riepe y Norenberg, 1977; Linser y Moscona, 1979; Moscona y col., 1980; Norenberg y col., 1980; Linser y Moscona, 1983). La localización de esta enzima catalítica en el interior de la célula de Müller, le confiere un papel importante en el ciclo GABA-glutamato- glutamina propuesto para la retina

por Starr (1975).

Durante el desarrollo retiniano el incremento en la actividad de la GS en células en cultivos está principalmente asociada con la diferenciación y proliferación de los astrocitos (Patel y col., 1982; Weir y col., 1984; Hayashi y col., 1988). En el caso de la retina en desarrollo la GS muestra un incremento de actividad paralelo al desarrollo morfológico de la célula de Müller (Olney, 1968; La Vail, y Reif-Lehrer, 1971; Chader, 1971; Moscona, 1972).

En el embrión de pollo los niveles de GS son muy bajos durante los estadios tempranos del desarrollo, estos niveles suben sobre E-15 (Van der Berg, 1970; Vardimon y col., 1988) coincidiendo con la maduración de las glándulas suprarrenales del pollo, permaneciendo la actividad GS alta durante toda la maduración retiniana. Estudios *in vivo* en las retinas de ratas, en las primeras semanas postnatales, indican que existe un incremento en la actividad GS dependiendo igualmente de la maduración de las células gliales (Ishikawa y col., 1995). Según estos hallazgos la GS se podría considerar un buen marcador bioquímico de la diferenciación de la retina de los vertebrados (Moscona 1972; Moscona y col., 1979; Moscona y Moscona, 1979). También es sabido que los corticoesteroides juegan un importante papel en la inducción de enzimas en las células animales (Vento y col., 1987). Durante el desarrollo normal del SNC la actividad de la GS tiene un incremento de actividad en el día 16 del desarrollo (Moscona 1972) que coincide con una elevación en los

niveles de corticoesteroides debido al crecimiento y maduración de las glándulas suprarrenales (Piddington, 1970). Distintos estudios en cultivos de astrocitos demuestran claramente que la actividad de la GS está regulada por varias hormonas y factores (De Vellis y col., 1986 a, b), tales como la hidrocortisona (Hallermeyer y col., 1981; Juurlink y col., 1981), ácido dibutilil cíclico AMP Juurlink y col., 1981), insulina (Tholey y col., 1986; Aizenman y De Vellis, 1987), y la hormona tiroidea (Aizenman y De Vellis, 1987). En la retina del embrión de pollo la GS puede ser previamente inducida alrededor de E-8 al añadir 11- β -hidroxicorticoides tanto si se añade al medio de cultivo (Moscona y Piddington, 1966; Piddington y Moscona, 1967; Moscona y Moscona , 1979; Chader y Reif-Lehrer, 1972) o mediante su administración *in vivo* (Reif-Lehrer y Amos, 1968; Vento y col.,1987). Esta hormona estimula la acumulación de GS mRNA, incrementando la síntesis de GS en las células gliales. La inducción de GS por hidrocortisona puede ser además modulada dependiendo de si los astrocitos crecen en suero o en algún medio químico determinado (Morrison y De Vellis, 1983) o si los cultivos están preparados por disociación mecánica o por un método de tripsinización (Tholey y col., 1983; 1985). Unnos niveles determinados de corticoides en el medio no son, sin embargo, el único requerimiento para la inducción de la GS, ésta requiere además una interacción específica neurona-glia mediada a través de contactos celulares (Linser y Moscona, 1979; Vardimon y col., 1988; Wu y De Vellis,

1988; Hayashi y col., 1988; Wu y col., 1988 ; Mearow y col., 1990). De hecho, la inducción de GS en astrocitos por neuronas fue independiente de la inducción por hidrocortisona y dependiente del tiempo de cultivo y del número de neuronas presentes en él, de modo que se puede suponer que la inducción de GS en astrocitos. Es mediado por una interacción específica neurona-glia. Los contactos celulares son esenciales para la organización celular y la diferenciación durante el desarrollo embrionario (Moscona y Moscona, 1979), por añadidura, los cambios en la adhesión celular pueden afectar a la diferenciación y alterar las características fenotípicas (Linser y Moscona, 1983), variar el crecimiento celular y modificar la expresión genética (Vardimon y col., 1988).

En el embrión de pollo también se ha demostrado que el contacto entre las neuronas y las células de Müller es un importante regulador de la GS (Linser y Moscona, 1983; Vardimon y col., 1988) además esta necesidad parece estar restringida al periodo crítico de la diferenciación y el crecimiento. En estudios *in vitro* ésta influencia ha sido igualmente observada, ya que tanto la proliferación como la maduración de los astrocitos están influenciadas por la presencia de células nerviosas (Drejer y col., 1980; Linser y Moscona, 1983; Thangnipon y col., 1983; Hatten, 1985; Hansson, 1986 a, b; Nagata y col., 1986; Hayashi y col., 1987).

2.10. PAPEL NEUROTOXICO DE ALGUNOS NEUROTRANSMISORES Y SUSTANCIAS HOMOLOGAS

Si no existe inducción de GS, el glutamato no puede ser catabolizado a glutamina, por lo que produce un efecto tóxico sobre el SNC (Mackinnon y col., 1982; Sapolsky 1985; 1994; Foroutan y col., 1996). El glutamato y el cainato en exceso, destruyen a las dendritas y a los cuerpos celulares, dejando los axones que degeneran después, causando muerte celular (Jogersen y Diemer, 1982; Rothman, 1984; Ikonomidou y col., 1989; Choi y Rothman, 1990; Frandsen y Schousboe, 1990). Una mezcla compleja de excitación neuronal y depresión difusa inhibitoria causada por el glutamato, intervienen probablemente en la enfermedad humana del “síndrome del restaurante chino”, la cual está asociada con la ingesta de grandes cantidades de glutamato monosódico que se añade a los alimentos para proporcionarles sabor. Los síntomas de este síndrome comprende un amplio rango de respuestas del SNC y simpático periférico.

El glutamato produce degeneración celular en la retina, si es administrado sistemáticamente en el periodo que existe entre la maduración de las neuronas glutamatérgicas y el establecimiento de los contactos con las células de Müller (Lucas y Newhouse, 1957; Kanno y col., 1991). Por otro lado, la inhibición del sistema GABAérgico, juega un importante papel en la toxicidad del SNC (Erdo y col., 1991; Samochocki y Strosznajder, 1994).

La inducción de la GS puede igualmente suprimirse por otros agentes neurotóxicos como es el ácido α -aminoadipico (AAA) (Linser y Moscona, 1981, b). El AAA es un ácido análogo al glutamato (Olney y col., 1971; Meister, 1974; Pederson y Karlsen, 1979) que produce importantes efectos sobre las neuronas retinianas, aunque preferentemente destruye a las células de Müller tanto en la retina de rata, como de pollo donde esta susceptibilidad se incrementa con la diferenciación y el desarrollo (Linser y Moscona, 1981, a). Debido al daño que sobre la célula de Müller produce el AAA, éste reduce la respuesta para la inducción de la GS en un 60-90% (Linser y Moscona, 1981, b). Además de cambios en la citología de la célula de Müller y una marcada reducción e incluso ausencia de contenido de GS en la célula de Müller, el AAA también produce una bajada de la enzima anhidrasa carbónica (CAH), enzima marcadora confinada también en la célula de Müller (Musser y Roser, 1973) y en la glia en general (Ghandour y col., 1979). El AAA no afecta, si embargo, los niveles de GABA-T (γ -aminobutírico ácido transaminasa) ni a la CAT (colin-acetil- transferasa) enzimas neuronales (Sarthý y Lam, 1978).

3. PLANTEAMIENTO

Y

JUSTIFICACION



El neurotransmisor excitador más utilizado por las neuronas en el SNC es el glutamato (Ehinger, 1989; Massey, 1990; Barnstable, 1993). Este es biosintetizado por la transaminación de su cetoácido correspondiente.

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 del neurotransmisor inhibitor GABA a partir de la glutamina.

La GS sólo se encuentra presente en los astrocitos (Hamburger y col., 1987; Noremborg, 1979) y oligodendrocitos (D'Amelio y col., 1990) del SNC. En el caso de la retina, se ha detectado su presencia en la glia radial representada por la célula de Müller (Pow y col., 1993).

En el SNC, la actividad GS durante el desarrollo parece estar relacionada con la diferenciación morfológica de los astrocitos (Patel y col., 1983; Weir y col., 1984; Vernadakis y col., 1986; Wernicke y Volpe, 1986).

En la retina el incremento de la actividad GS parece ser paralelo al desarrollo de la célula de Müller (Olney, 1968; Chader, 1971; La Vail y Reif-Lehrer, 1971; Chader y Reif-Lehrer, 1972; Moscona, 1972). Con objeto de comprobar *in vivo* la evolución de la actividad GS y su relación con la morfogénesis y diferenciación de la célula de Müller en la retina embrionaria del pollo, se estudió el desarrollo morfológico de ésta célula a lo largo de todo el periodo embrionario y hasta después del nacimiento con las técnicas clásicas de microscopía óptica y electrónica. Durante esos mismos estadios se midió la actividad específica GS, con el fin de detectar los cambios temporales en los niveles de dicha actividad durante el desarrollo.

Con objeto de comprobar si realmente la GS sólo se localizaba en las células de Müller de la retina de pollo, incubamos éstas con un anticuerpo monoclonal anti-glutamina sintetasa para detectar la localización de la expresión de inmunorreactividad GS. A su vez, se incubaron retinas de los mismos estadios, con el anticuerpo monoclonal 3CB2 como marcador específico glial.

Por último, nos planteamos comprobar si realmente la actividad GS puede ser inducida previamente al elevar en el medio los niveles de 11β -hidroxicorticoesteroides, tal y como se ha propuesto en cultivos (Moscona y Piddington, 1966) o mediante su administración *in ovo* (Reif-Lehrer y Amos, 1968).

4. MATERIAL Y METODOS

4.1. MATERIAL

4.1. Material biológico

Hemos utilizado embriones de pollo de la raza White Leghorn. Los huevos fecundados se obtuvieron de diferentes granjas especializadas. Se registraba el día en que se ponían a incubar a 37,5° C y en atmósfera húmeda, siendo éste el día cero del desarrollo. Además, en el momento de la extracción, los embriones fueron estadiados utilizando las tablas de Hamburger y Hamilton (1951). Aquéllos cuyo estadio del desarrollo no coincidía con el día de incubación eran desechados. Algunos embriones se incubaron hasta eclosionar y los pollos recién nacidos se mantuvieron en el animalario hasta alcanzar la edad deseada.

Los embriones fueron sacrificados desde el 3° día de incubación hasta el momento de la eclosión. Las fechas del sacrificio fueron elegidas muy próximas unas de otras, cada 24 horas, con objeto de detectar acontecimientos que tienen lugar en períodos breves de tiempo.

4.2. METODOS

4.2.1. PREPARACION DEL MATERIAL PARA MICROSCOPIA LUMINICA

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

4.2.1.1. Método de Golgi Stensaas

Las preparaciones histológicas de los embriones de pollo de 3 a 12 días de incubación se realizaron siguiendo el método de Golgi Stensaas (1967) consistente en: 100 ml. de agua destilada, 5gr. de dicromato potásico, 5 gr. de hidrato de cloral, 5 ml. de glutaraldehído 25%, 5 ml. de formaldehído 40%, 5 gotas de dimetilsulfósido. La duración de la fijación oscila entre 24 y 48 horas según el tamaño de la pieza. A continuación tras un breve lavado en agua destilada, las piezas se pasaron a una solución de nitrato de plata 0,75% donde permanecieron de 2 a 3 días. Una vez finalizada la impregnación se realizó una deshidratación en la serie de los alcoholes para pasarlo a través de una mezcla de alcohol-eter 50%, a las soluciones de nitrocelulosa de baja viscosidad al 5%, 10% y 20% donde finalmente se incluyeron.

Los bloques permanecieron conservados en cloroformo a 4°C hasta el momento de seccionarlos, en el que se sumergen en aceite de cedro para aclarar el tejido. Después, el bloque se colocó en un microtomo de

deslizamiento, orientándolo para cortar la retina según un plano frontal. Los cortes se realizaron seriadamente a 80μ , recogiéndose éstos en tolueno para su ulterior montaje bajo cubreobjetos en un medio neutro DPX.

4.2.1.2. Método de Golgi Colonnier

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

Las observaciones se hicieron en un microscópio ZEISS marca AF EOAR 65-19 con cámara fotográfica incorporada y un microscópio NIKON con cámara lúcida accesoria. Como película se utilizó Ilford-Pam 50.

Fueron observadas un total de 78 retinas satisfactoriamente teñidas. Cada una de ellas fue observada seriadamente y en su totalidad con objeto de ver los diferentes detalles morfológicos de las células en todo su grosor y las diferencias existentes entre la retina central y la periférica.

Dado que el grosor de los cortes, $80-90\mu$, incluye varias capas de

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

4.2.2. PREPARACION DEL MATERIAL PARA MICROSCOPIA ELECTRONICA

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

La técnica empleada para el procesado de microscopía electrónica es la descrita por Palay y Chan Palay (1974) para el sistema nervioso central: se disecaron las retinas a 4°C en fijador con 2,5% paraformaldehído, 25% glutaraldehído, tampón fosfato, 0,4M, 0,5% cloruro cálcico y agua destilada, donde permanecieron durante 24 horas.

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

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

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

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

4.2.3. PREPARACION DEL MATERIAL PARA LA DISOCIACION CELULAR

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

La proteasa utilizada no está comercializada y fue extraída de *Streptomyces* y facilitada por el Departamento de Investigación de

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

Las retinas bien troceada se incubaban en una solución de sacarosa al 6% que contenía entre 0,035 y 0,1 mg/ml de proteasa, tomados en alícuotas de la solución stock. La concentración de proteasa utilizada varió según el estadio del desarrollo del embrión. El volumen del medio de disociación variaba de 300 a 800 μ l por retina, también según el estadio del desarrollo. La disociación enzimática se realizó a 34°C y fue completada con una disociación mecánica. Esta consistió en pipetear 10 veces, muy suavemente, el medio de incubación al comienzo de la disociación y cada 10 minutos. El proceso era seguido visualmente por observación de pequeñas alícuotas en un fotomicroscópio Zeiss equipado con contraste de fases. La disociación era detenida entre los 30 y los 60 minutos, cuando obteníamos una concentración idónea de las células que nos interesaban bien preservadas morfológicamente. En los días más tempranos del desarrollo (E-6 a E-10), la disociación se realizó en sacarosa al 10,26%, por encontrarse los mejores resultados.

La suspensión celular obtenida podía utilizarse para estudiar la

morfología de las células directamente, por contraste de fases, o bien podía extenderse en cubres o portas y fijarse. Para el estudio de la forma de las células *in vivo* se disponían de alícuotas de la suspensión celular sobre portaobjetos y se cubrían con cubreobjetos. La suspensión también se extendió sobre portas o cubres gelatinizado para ser posteriormente fijada. Como fijador para observar la morfología celular a lo largo del desarrollo empleamos, etanol, formol y ácido acético en proporción 18:1:1 durante 45 minutos. Las células destinadas a ser procesadas para inmunohistoquímica siguieron un protocolo diferente: los cubreobjetos con la suspensión celular se centrifugaron a 2.000 rpm durante 2 minutos, para adherir fuertemente las células.

4.2.4. PREPARACION DEL MATERIAL PARA INMUNOHISTOQUIMICA

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

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

inclusión para criostato Tissue-tex y congelados mediante inmersión en nitrógeno líquido.

Las secciones en criostato se realizaron a un grosor entre 10 y 20 μ en dos planos para cada estadio. El plano transversal, útil para el estudio de los gradientes central a periférico y dorsal a ventral y el plano perpendicular a éste para el estudio de los gradientes central a periférica y temporal a nasal. Secciones pasando por diferentes áreas retinales se montaron sobre portas cubiertos de gelatina y se almacenaron a 60°C hasta el momento de la inmunorreacción.

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

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

Los portas con los cortes de tejido se preincubaron en suero de pollo

al 10% en PBS con triton X-100 al 0,25% durante 30 minutos y posteriormente se incubaron en el primer anticuerpo, a una dilución 1/200 en PBS con 0,1% de triton X-100 y 1% suero de pollo, durante 3 horas a temperatura ambiente. Después de tres lavados de 15 minutos cada uno en PBS con triton X-100 al 0,1% y suero de pollo al 1%, las secciones fueron incubadas con el segundo anticuerpo marcado con fluoresceína a una dilución de 1/100 en PBS con 0,1% de triton X-100, durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de tres lavados de 10 minutos en PBS con triton X-100 al 1% se procedió a cubrir los portas con una disolución de PBS-glicerol 1/9.

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

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

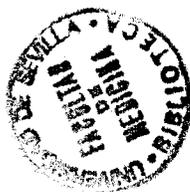
4.2.5. PREPARACION DEL MATERIAL PARA TINCION CON HEMATOXILINA-EOSINA

Las preparaciones tratadas para el estudio de inmunohistoquímica fueron teñidas posteriormente según la técnica de Hematoxilina-eosina para

cortes en congelación.

Tras lavado con agua destilada, se colorearon las preparaciones con solución de hematoxilina de Harris (Carlo Erba, Ref. 446461) durante 7 minutos, seguido de lavado con agua destilada, un paso por alcohol-ácido al 1% (alcohol etílico 70%-ácido clorhídrico 35%) y tratamiento con solución de hidróxido amónico 28% hasta azulear. Posteriormente, después de lavar con agua destilada, se hizo contratinción con eosina Y de Putt (5gr. de eosina Y, 2,5gr. de dicromato potásico, 50ml. de solución saturada de ácido pícrico, 50ml. de alcohol etílico absoluto y 400ml. de agua destilada) durante 5 minutos, lavados en agua destilada, deshidratación con alcohol absoluto en tres pasos de 2 minutos de duración cada uno, un paso de 2 minutos de alcohol-xilol al 50% y aclarado con xilol en tres pasos de 2 minutos cada uno. Las preparaciones se montaron en medio histológico Entellan neu (Merck, Ref. 7961).

Las observaciones se realizaron en un microscopio óptico Zeiss Axioplan con cámara fotográfica incorporada. Las fotografías se realizaron con película TMAX 400ASA de Kodak.



4.2.6. PREPARACION DEL MATERIAL PARA DETECTAR LA ACTIVIDAD DE LA GLUTAMINA SINTETASA

La determinación de la actividad de glutamino sintetasa en las retinas de embriones desde E-3 hasta la eclosión y edad adulta, se realizó siguiendo el procedimiento propuesto por W.H. Elliot (1951).

Las muestras se incubaron a 37°C durante 15 minutos en tubos de centrífuga. Cada tubo contenía: 0,5ml. de buffer-imidazol-CLH 0,5M; 5ml. de ATP sódico 0,005M; 0,5ml. de glutamato monosódico 0,5M; 0,1ml. de sulfato de magnesio 1M; 0,1ml. de hidroxilamina 1M; 0,1ml. de cisteína 1M, 0,45ml. de la muestra diluida en H₂O.

Tras la incubación, se añadió a cada tubo 0,75ml. de reactivo de cloruro ferríco. Los tubos con las muestras se centrifugaron a 3.500 rpm durante 5 minutos. Los sobrenadantes se midieron en un espectrofotómetro a 480nm. Como standar se usó ácido gamma glutamilhidroxámico (GHA).

La actividad específica de glutamina sintetasa se expresa en unidades por miligramo de proteínas. Una unidad de glutamino sintetasa es la cantidad de enzima que cataliza la síntesis de 1 μ m de ácido gamma glutamilhidroxámico. La concentración de proteínas totales se determinó por el procedimiento de Lowry y col., (1951).

5. RESULTADOS

5.1. CRITERIO DE IDENTIFICACION CELULAR Y DIFERENCIACION INICIAL DE LA CELULA DE MÜLLER EN LA RETINA CENTRAL.

Las células de Müller de la retina de pollo abandonan el ciclo mitótico entre E-5 y E-12 (Prada, C. y col., 1991). Alrededor de E-8, aproximadamente el 50% de todas las células de Müller son postmitóticas.

AL 6º día de incubación, las células de Müller son difíciles de distinguir de las células ventriculares debido a que ambas tipologías son morfológicamente muy similares (Fig. 53 v). La distinción de las jóvenes neuronas retinianas es mucho más fácil, ya que éstas se encuentran desconectadas de una o de ambas membranas limitantes de la retina (Fig. 53 i, b, g, a).

Al 7º día de incubación, las jóvenes células de Müller presentan las siguientes características: -1) poseen un cuerpo celular fusiforme localizado a distintos niveles de la capa nuclear interna (CNI) (Fig. 1); -2) desde el cuerpo celular parten gruesas prolongaciones que se dirigen en dirección vítrea y escleral hasta alcanzar las membranas limitantes interna (MLI) y externa (MLE); -3) el citoplasma celular es más denso que el de las neuronas, especialmente en las zonas próximas a las MLE y MLI, donde su citoplasma se expande formando los pies de la célula de Müller (Figs. 1, 2 cabezas de flecha). -4) aparecen las primeras espiculaciones a nivel de la prolongación

interna y las primeras divisiones de la prolongación interna a nivel de la capa de células ganglionares y de la capa de fibras del nervio óptico (Fig. 1 flecha).

A partir de E-8 y hasta E-13 (Fig. 53), los acontecimientos morfológicos que en estos primeros estadios de diferenciación muestran las células de Müller son los siguientes:

- En E-8 la célula de Müller se extiende a través de la retina desde la MLE a la MLI, mostrando una morfología muy sencilla (Fig. 3). El cuerpo celular se localiza en el tercio medio de la CNI desde el 9^a día de incubación (Fig. 4) y hasta el final del desarrollo. A partir de E-8, la célula de Müller adquiere mayor grosor tal y como se observa en las Figs. 4 y 5.

- Aparecen nuevas prolongaciones que se localizan a nivel de la capa de células ganglionares (CG) y en la capa de fibras del nervio óptico (CFNO) (Figs, 7, 9, 13, flechas). Poco después, surgen numerosas espículas en la porción de la prolongación interna que atraviesa la CPI (Figs.1-5, 8).

- La diferenciación morfológica de la prolongación externa comienza entre E-8 y E-9, poniéndose de manifiesto por la aparición, a nivel de la incipiente CPE de inflexiones, pequeños engrosamientos, espículas y expansiones laterales que delimitan al citado estrato sináptico (Figs. 3, 4, 10, 11 y 12 cabezas de flechas).

- La porción celular que forma la MLI sufre importantes cambios morfológicos a partir de E-10. Estos se inician con el ensanchamiento

horizontal del citoplasma celular para formar el pie de fijación de la célula de Müller a la MLE (Fig. 11 flecha fina). En estadios posteriores, del citado ensanchamiento surgen procesos verticales que se dirigen hacia la CPE (Fig. 19 flechas finas), alcanzándola en estadios más tardíos del desarrollo.

- Entre E-12 y E-13 (Figs. 6, 19, 20) se observa que del polo inferior del cuerpo celular parten numerosas prolongaciones en dirección vítrea, éstas formarán el ramillete de prolongaciones internas de la célula de Müller.

Desde los primeros estadios del desarrollo, se aprecia una prolongación en la célula glial que se separa de la verticalidad de dicha célula para describir un trayecto oblicuo a través de las capas retinianas y terminar a nivel de la MLI. A esta expansión la denominamos “prolongación accesoria” (fig. 6 flecha).

5.2. DIFERENCIACION DE LA CELULA DE MÜLLER EN LA RETINA PERIFÉRICA.

En la retina periférica las células de Müller presentan un proceso de diferenciación morfológica similar a las células gliales localizadas en la retina central. Sin embargo presentan algunas características diferenciales, estas son:

- La diferenciación de la célula de Müller comienza de 2 a 4 días más tarde que las células localizadas en la retina central. La Fig. 14 muestra una célula rectangular localizada en la porción más periférica de la retina, en ella se

observa un gran grosor retiniano que va progresivamente desapareciendo a medida que nos dirigimos hacia la retina central en donde estas células son cada vez más delgadas (Fig. 54).

- Muchas de las células de Müller ubicadas en la retina periférica presentan prolongaciones accesorias que se originan a diferentes niveles de la prolongación interna. La figura 18 muestra una prolongación accesoria cuyo recorrido presenta un curso horizontal siguiendo las fibras del nervio óptico, durante su trayecto emiten expansiones verticales que terminan de igual manera que la prolongación principal, formando pies de fijación a nivel de la MLI (Fig. 18 flecha).

5.3. ESTADIOS FINALES EN LA DIFERENCIACIÓN DE LA CÉLULA DE MÜLLER

Durante E-13 hasta E-17, la célula de Müller experimenta los últimos cambios en su diferenciación morfológica. Estos cambios son cronológicamente los siguientes:

- A partir de E 13-14 se diferencian definitivamente los ramilletes internos de las células de Müller (Figs. 19, 20). Al final de E-16 éstas poseen una morfología similar a la que ofrecen las células adultas (Fig. 24).

- Durante estos estadios el citoplasma de la mitad externa de la célula de Müller aumenta su grosor, así como el número de expansiones radiales que

se interponen entre los pericarios de las neuronas (Fig. 19 cabeza de flecha).

- Hacia los 13 días de incubación (Fig. 19 flechas) el crecimiento y fusión de los procesos verticales que las células de Müller poseen a nivel de la CNE determina que éstas adquieran, a este nivel, una forma prismática rectangular (Fig. 20).

- A partir de E-15 la célula de Müller muestra a nivel de la MLE, imágenes entrecortadas que se continúan con la proyección externa de los *microvilli* gliales (Fig. 21 flecha).

- Durante E-16 y E-17 en la mitad externa de la célula de Müller se observa la formación de prolongaciones accesorias que se originan a nivel medio y externo de la célula (Figs. 22 y 23 flechas).

La mayoría de las células de Müller concluyen su diferenciación morfológica hacia los 17 y 18 días de incubación. Después de estos estadios, la morfología es similar a las que presentan las células de Müller en el animal adulto (Figs. 24, 25).

5.4. MORFOLOGÍA ADULTA DE LAS CÉLULAS DE MÜLLER

Las figuras 25 a 39 muestran las características morfológicas de la célula de Müller adulta en la retina central y periférica de pollos de un mes de vida después del nacimiento. Las células de Müller en la retina central presentan un pericario que es ligeramente más grueso que la prolongación

externa, su forma es poligonal y se encuentra en el tercio medio de la CNI (Fig. 27, 34 INL). En el pericario se distinguen dos polos. Uno es apical y da lugar a la prolongación externa que sigue un curso en dirección escleral. El otro polo es interno y de él parten un ramillete de prolongaciones que se dirigen en dirección vítrea hasta alcanzar la membrana limitante interna.

En general, la prolongación externa de la célula de Müller de la retina central muestra unos patrones morfológicos constantes en comparación con la morfología que presenta la prolongación vítrea. Esta última es de un grosor considerable, al pasar a través de la CNI muestra inflexiones para adaptarse a los cuerpos neuronales allí situados. De estas inflexiones salen cortas expansiones de distribución radial que le dan al citoplasma glial una apariencia en panal de abeja (Fig. 27 cabeza de flecha).

A nivel de la CPE el citoplasma glial es escaso (Fig. 34 cabeza de flecha) y da lugar a ramas irregulares de crecimiento radial (Figs. 27 cabeza de flecha, 31). En otras ocasiones, estas ramas se originan a nivel de la CNE y se extienden hacia la CPE (Fig. 26 cabezas de flechas). Al pasar a través de la CNE, la célula de Müller aumenta de anchura y muestra cortas expansiones lamelares (Fig. 26 flechas blancas). A nivel de la MLE, la célula de Müller muestra una densa banda de citoplasma que se incrementa lateralmente (Fig. 28-30). Desde este sector prtoplásmico un grupo de delicadas fibrillas se extienden en dirección escleral, son los *microvilli* (Fig. 26 flecha fina).

El tronco vítreo de las células de Müller presentan un número variable de prolongaciones descendentes que siguen distintos patrones morfológicos. Algunas células de Müller presentan numerosas prolongaciones descendentes que a nivel de la CPI y de la CG se dividen en otras ramificaciones secundarias (Figs. 27, 32). Otras células de Müller, sin embargo, tienen una arborización descendente con gruesas y escasas prolongaciones (Figs. 34-36) que se dividen a nivel de la CG.

Según lo anteriormente expuesto y teniendo en cuenta la forma de las ramificaciones descendentes podemos clasificar a las células de Müller en dos tipos morfológicos distintos: El tipo I muestra numerosas y finas prolongaciones internas, mientras que en el tipo II son escasas y gruesas. Ambos tipos morfológicos presentan, en ocasiones, una prolongación accesoria que se origina a diferentes niveles del citoplasma celular (Figs. 25, 34, 36 flechas).

Las distintas variedades morfológicas de la célula de Müller de la retina central y periférica del pollo adulto se muestran en las figuras 33, 37, 38 y 39. En la retina periférica la morfología de la célula de Müller se adapta al reducido grosor de las capas retinianas en esa zona. Ellas muestran un grueso citoplasma con prolongaciones más gruesas y cortas que en la retina central.

En nuestras preparaciones con el método de Golgi, se observa que en la retina central la célula de Müller tipo I son muy numerosas, mientras que

en la retina periférica son más abundantes las del tipo II, al mismo tiempo que se observa con una mayor frecuencia la existencia de prolongaciones accesorias (Figs. 37, 38 flechas).

Las observaciones al microscopio electrónico muestran que en la MLE aparece una densa línea formada por las uniones de las células de Müller con las mazas de Landol't de las células bipolares y con los segmentos internos de los fotorreceptores (Figs. 40, 41). Externamente a la MLE, las células de Müller muestran una serie de *microvilli* que se extienden entre los correspondientes segmentos de los fotorreceptores y de las mazas de Landol't. (Fig. 41 v).

Las prolongaciones descendentes de la célula de Müller (Fig. 50 M) se extiende hasta alcanzar la MLI (Figs. 44, 50 ILM). En estas zonas, las prolongaciones gliales son marcadamente electrodensas. La MLI se forma con los pies de dichas prolongaciones. A este nivel los pies presentan uniones especializadas de membrana y pequeños orificios que permanecen abiertos hacia la membrana basal (Fig. 44 flechas). Las prolongaciones internas y las prolongaciones accesorias dividen a los axones de las células ganglionares en distintos grupos (Fig. 50). A nivel de la CFNO se pueden distinguir dos tipos de axones. El primer tipo es el más numeroso y en él incluimos axones de pequeño y mediano calibre desprovisto de mielina (Fig. 50 a). El segundo tipo incluye axones de calibre mediano y grande que están rodeados por bandas de

mielina, bien de disposición compacta (Figs. 50, 52 asterisco) o más o menos laxa (Figs, 44, 50, 51 A).

Las secciones seriadas de microscopía electrónica nos han permitido identificar el origen de la mielina que recubre el axon. La figura 48 muestra la prolongación interna de una célula de Müller (M) en la capa de células ganglionares (GC), observese que de ésta prolongación sale una expansión lateral (flechas) que envuelve el axon de la célula ganglionar. La flecha de la figura 49 marca el punto en el que la membrana de la célula de Müller desarrolla la mielinización axonal.

Tanto durante el desarrollo (Fig. 43 cp, cv) como en el adulto (Figs. 42, 45, 46, 47 cp, cv) se visualizaron invaginaciones picnóticas de la membrana celular en forma de *coated pits* y *coated vesicles*. La mayoría de estas vesículas picnóticas fueron localizadas a nivel de las membranas limitantes externa e interna.

5.5. CELULAS GLIALES A NIVEL DE LA CAPA DE CELULAS GANGLIONARES.

Con los métodos clásicos de tinción para microscopía óptica y electrónica, hemos podido observar una importante población de células gliales ubicadas en la capa de células ganglionares (Fig. 64-68). En esta capa, la proporción de células gliales con respecto al número de neuronas (células

ganglionares y células amacrinas desplazadas), en la retina de pollo de 18 días de incubación, es de 1:10. Este hecho ha podido ser observado tanto en cortes semifinos verticales de retinas de 18 días de incubación (Fig. 64 flechas), como en cortes tangenciales del mismo estadio del desarrollo (Fig. 67, 68 flechas). Dicha proporción es similar a la encontrada en la capa de células ganglionares de la retina de paloma (Bingelli y Paule, 1969).

Las células gliales localizadas en la capa de células ganglionares tienen un cuerpo celular pequeño e irregular (Fig. 68, flechas) muy electrodenso (Fig. 66, flecha curva). De él parten algunas prolongaciones que se extienden desde los polo escleral y vítreo de la célula hasta alcanzar bien la capa plexiforme interna o bien la membrana limitante interna (fig. 66, flechas). Con el método de Golgi, nosotros observamos la existencia de estas células gliales desde E-11 (Fig. 65, flechas curvas) en adelante.

5.6. ACTIVIDAD DE LA GLUTAMINA SINTETASA DURANTE EL DESARROLLO RETINIANO.

Durante la diferenciación inicial de las células de Müller, desde E-7 a E-11, se detecta la existencia de actividad glutamina sintetasa, aunque dicha actividad es aún baja, entre 0,10 y 0,11 U/mg. proteína (Fig. 69). Posteriormente, entre E-12 y E-13 la retina de pollo muestra un incremento de actividad glutamina sintetasa de aproximadamente el doble de unidades si se compara

con estadios previos del desarrollo alcanzando las 0,22 U/mg.proteína (Fig. 69); sin embargo, la actividad GS continua siendo muy baja. Posteriormente, entre E-14 y E-16 la actividad GS sufre una pequeña depleción y los valores encontrados se sitúan entre 0,17; 0,16 y 0,20 U/mg.proteína (Fig.69). Es importante recordar, que como hemos mencionado anteriormente, entre E-12 y E-16 las células de Müller muestran progresivamente un avance en la diferenciación morfológica e incrementan aproximadamente un 90% su área citoplásmica (comparar Fig. 55 y 56 con 57 y 58), a pesar de lo cual esta diferenciación celular no va acompañada de un progresivo incremento de actividad GS como sería lo esperado.

En E-17, la actividad de la GS de nuevo se incrementa detectándose 0,55 U/mg.proteína, el doble del valor que presentaba en E-16 (Fig. 69). Este incremento es significativo y representa el comienzo del desarrollo de la actividad GS. A partir de este momento, y en todos los estadios posteriores del desarrollo embrionario, se observó un notable incremento en la actividad específica de la GS. Según los datos mostrados en la Fig. 69, en E-18, el valor de la actividad GS es de 4,90 U/mg.proteína. Después del nacimiento, la retina muestra una actividad GS que casi dobla el valor que alcanzó a los 18 días de desarrollo, 12,7 U/mg.proteína.

Según los datos obtenidos podemos afirmar que el mayor incremento de la actividad GS en la retina del embrión de pollo está localizado y

restringido a los estadios finales de la diferenciación glial y neuronal. Este hecho nos pone de manifiesto que la evolución de la actividad GS muestra una concordancia temporal con la sinaptogénesis de la capa plexiforme externa. De hecho, sabemos que los pedículos sinápticos de los fotorreceptores comienzan a diferenciarse entre E-13 y E-15, y es entre E-16 y hasta E-21, cuando las bases sinápticas de los fotorreceptores se alargan y expanden en forma de pedículos cónicos para formar las características barras sinápticas. Por lo tanto, la fecha en que se alcanza la maduración sináptica con el inicio, entre E-17 y E-20 del mayor incremento en la actividad GS en la retina (Fig. 69). Observese que desde E-18, el número de barras sinápticas existentes tanto en la capa plexiforme externa (OPL) (Fig. 71, flechas) como en la capa plexiforme interna (IPL) (Fig. 72, flechas) es similar al encontrado en la retina de pollo adulto.

Los tres tipos neuronales implicados en los circuitos gabaérgicos y glutamatergicos de la capa plexiforme externa, y que están relacionados con la actividad GS se muestran durante E-18 en la Fig. 70 y en la Fig. 73.

5.7. DESARROLLO DE LA EXPRESION DE INMUNORREACTIVIDAD DE LA GLUTAMINA SINTETASA.

Durante los primeros estadios de diferenciación (E-7 a E-12) la inmunorreactividad GS es negativa (Fig. 76). A pesar de lo cual, la

inmunorreactividad para el GABA es positiva desde los estadios iniciales de la diferenciación de la retina del pollo (Fig. 63, flechas). En E-14, la retina dorsal y central comienza a manifestar una debil inmunorreactividad GS (datos no mostrados). En estadios posteriores, esta incipiente inmunorreactividad se extiende hacia las áreas ventral y periférica de la retina. En E-17 la retina dorsal del pollo muestra una intensa inmunorreactividad GS, y en E-18 el patrón de inmunorreactividad es completado en las áreas dorso-temporal y central de la retina (Fig. 60). Solamente algunas áreas de la retina ventro-nasal muestran, en este estadio una debil inmunorreactividad GS (Fig.62). A partir de E 19-20 los patrones de inmunorreactividad GS son similares a los observados en el pollo adulto.

La inmunorreactividad para GS fue principalmente localizada en las células de Müller de la retina (Fig. 60, 61, flechas), aunque también se encontró en los gliocitos (astrocitos y oligodendrocitos) ubicados en la capa de células ganglionares (Fig. 60 gcl) y en la capa de fibras del nervio óptico (onl). En estas dos capas, la inmunorreactividad observada fue muy intensa (Fig. 60 asterisco). En la figura 59, usando el anticuerpo 3CB2 como marcador específico de las células gliales (Prada y col. 1996), se observa el patron morfológico de inmunotinción de las células de Müller, en los que se aprecia como sus prolongaciones radiales se encuentran atravesando las capas nuclear interna y plexiforme interna (Fig. 59 flechas). A nivel de la capa plexiforme

interna estas prolongaciones muestran una morfología y disposición similar para los patrones de inmunorreactividad GS (Fig. 60, ipl). También se detecta una intensa inmunorreactividad para 3CB2 en la capa de células ganglionares y capa de fibras del nervio óptico, donde se encuentra el mayor número de células gliales (Fig. 59 gcl, onl asterisco). Estos datos están en concordancia con el hecho de que la mayoría de las células gliales que se encuentran en esta capa contienen la proteína reconocida por 3CB2 y la enzima GS.

5.8. INDUCCION POR HIDROCORTISONA DE LA INMUNORREACTIVIDAD GLUTAMINA SINTETASA

Nuestros resultados confirman que entre E-7 hasta E-13 la GS muestra una inmunorreactividad negativa. Sin embargo, el tratamiento *in ovo* de retinas embrionarias con hidrocortisona, induce la síntesis de la enzima GS por parte de las células de Müller. De esta manera, las células de Müller en E-11 que han sido tratadas en E-10 muestran una intensa inmunorreactividad GS (Fig. 74, 77, 79, 80, flechas). La mayor inmunorreactividad fue localizada en el tercio medio de la capa nuclear interna (inl), capa plexiforme interna (ipl), capa de células ganglionares (gcl) y capa de fibras del nervio óptico (onl) (comparese las figuras inmunoteñidas con las figuras contrastadas; Fig. 74 con la Fig. 75, o la Fig. 77 con la Fig. 78). La figura 76 muestra una sección vertical de retina de pollo control de 11 días de incubación, la cual no presenta

inmunorreactividad. En las retinas experimentales tratadas previamente con hidrocortisona se observan además de las células de Müller otras células marcadas con la anti-GS (Fig. 74, 77, 79, 80, flechas grandes). La localización de algunos de estos cuerpo celulares parecen sugerir una naturaleza neuronal y no glial.

6. ICONOGRAFIA

Figuras 1-6. Morfología de las células de Müller durante E-7 (Figs. 1, 2), E-8(Fig. 3), E-9 (Fig. 4), E-10 (Fig. 5) y E 11-12 (Fig. 6). Las cabezas de flechas en las Figs. 1 y 2 muestran los pies que éstas forman en la ELM y en la ILM. La flecha de la Fig. 1 señala una prolongación lateral a nivel de la GL. Las cabezas de flechas en las Figs. 3 y 4 muestran inflexiones a nivel de la OPL. La flecha de la Fig. 6 señala una prolongación accesoria. Sección vertical de retina. Método de Golgi. X 400.

Figuras 7-9, 13. Aparición de las primeras espículas (Fig. 8) y prolongaciones (flechas) que se dirigen desde la célula de Müller a la GL y a la ONFL durante E-7, E-8 y E-10. Sección vertical de retina. Método de Golgi. X 400.

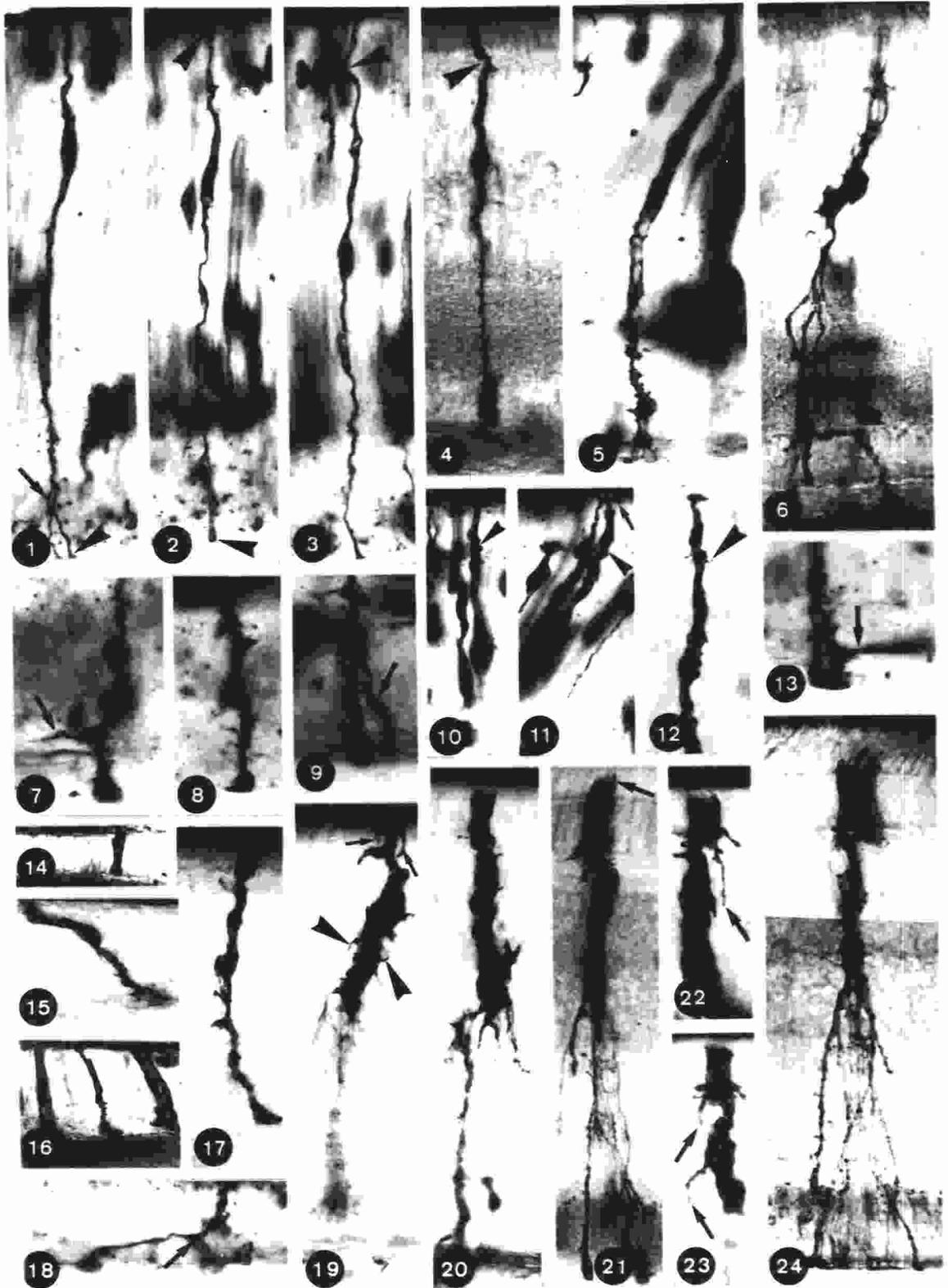
Figuras 10-12. Primeras modificaciones morfológicas de la porción más externa de la célula de Müller (E-9). Espículas laterales (cabezas de flechas); expansiones laterales del citoplasma en la ELM (flechas finas). Sección vertical de retina. Método de Golgi. X 400.

Figuras 14-18. Células de Müller situadas en la retina periférica en E- 13 y en E-14. La Fig. 18 muestra una prolongación accesoria a nivel de la ONFL (flecha). Sección vertical de retina. Método de Golgi. X 400.

Figuras 19-23. En ellas se muestran los últimos cambios en la diferenciación morfológica de la célula de Müller durante E- 13 (fig. 19), E 14-15 (fig. 20) y E 16-17 (figs. 21-23). En la fig. 19 la flecha fina señala los procesos verticales a nivel de la ONL; las cabezas de flechas muestran las expansiones radiales a nivel de la INL; la flecha de la fig. 21 muestra los *microvilli*; mientras que las flechas de las figs. 22 y 23 localizan una prolongación accesoria. Sección vertical de retina. Método de Golgi. X 400.

Figura 24. Célula de Müller de retina central de un mes de vida después del nacimiento. Sección vertical. Método de Golgi. X 400.



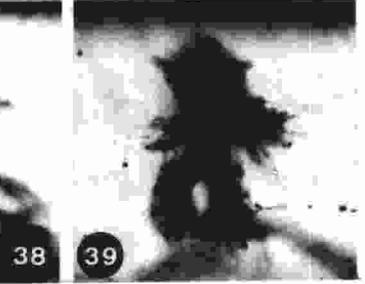
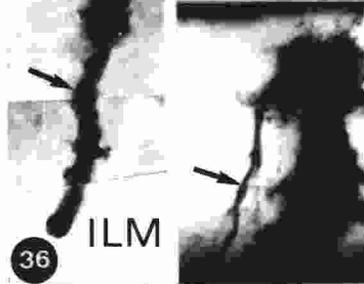
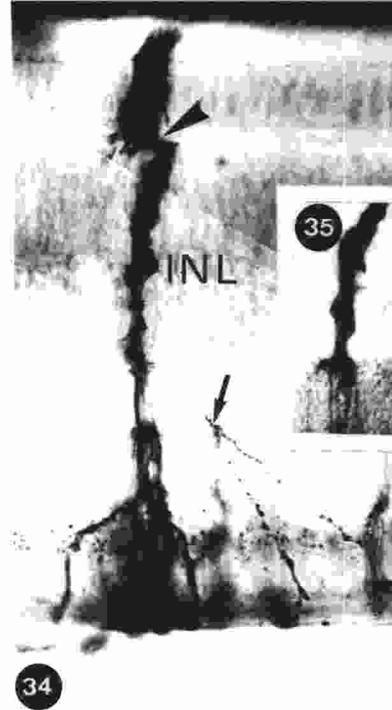
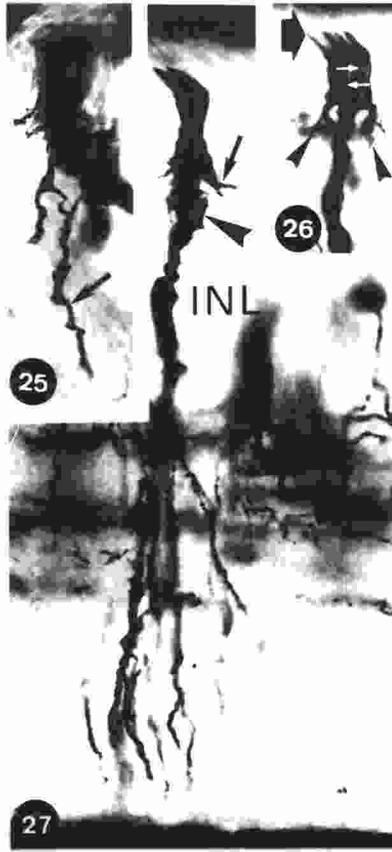


Figuras 25-27, 34, 35. Retina de pollo de un mes de vida después del nacimiento. Diferentes aspectos morfológicos de células de Müller de secciones verticales de retina central. Fig. 25 la flecha señala una prolongación accesoria. La Fig. 26 muestra prolongaciones radiales en la OPL (cabezas de flechas); expansiones lamelares en la ONL (flechas blancas); *microvilli* (flecha fina). Fig. 27 expansiones radiales en la INL (cabezas de flechas); prolongación radial en la OPL (flecha). Fig. 34 inflexión citoplásmica a nivel de la OPL (cabeza de flecha); prolongación accesoria (flecha). Método de Golgi. X 400.

Figuras 28-31. Retina de pollo de un mes de vida después del nacimiento. Aspecto parcial de la prolongación externa de la célula de Müller a nivel de la ELM (figs. 28-30) y de la OPL (fig. 31). Las figuras 28, 29 y 30 son preparaciones en plano en las que se enfoca la ELM, las flechas señalan las mazas de Landolt. Método de Golgi. X 400.

Figuras 32, 36. Retina de pollo de un mes de vida después del nacimiento. Ramillete interno del tipo I (fig. 32) y del tipo II (fig. 36) de células de Müller. (IPL) capa plexiforme interna; (ILM) membrana limitante interna; (flecha) prolongación accesoria. Preparaciones en plano enfocadas a nivel vítreo. X 900.

Figuras 33, 37-39. Células de Müller de un mes de vida postnatal localizadas en distintas zonas de la retina periférica; prolongación accesoria (flechas). X 400.



Figuras 40, 41. Retina de pollo de un mes de vida postnatal. Aspecto parcial de la célula de Müller (M) a nivel de la membrana limitante externa (ELM). N, núcleo de fotorreceptor. IS, segmento interno del fotorreceptor. L, maza de Lndol't. v, *microvilli* de la célula de Müller. X 600.

Figura 42. Retina de pollo de un mes de vida postnatal. Límite entre la capa de células ganglionares y la capa de fibras del nervio óptico. GA, axón de la célula ganglionar. cv, vesícula picnótica totalmente formada en el interior de la célula de Müller. X 30.000.

Figura 43. Retina de pollo en E-12. Formación de vesículas picnóticas a nivel de la membrana limitante externa (cp y cv). X 15.000.

Figura 44. Retina de pollo de un mes de vida postnatal. ILM, membrana limitante interna. M, célula de Müller. A, axón de célula ganglionar. A nivel de la membrana limitante interna los pies de las células de Müller presentan orificios que se abren hacia la membrana basal (flechas). X 8.300.

Figuras 45-47. Retina de pollo de un mes de vida postnatal. Las figuras muestran la formación de vesículas picnóticas (cv) a nivel de la membrana limitante interna. En los estadios iniciales, la vesícula cubierta está rellena de material electrodenso originado a partir de la membrana basal. X 40.000.

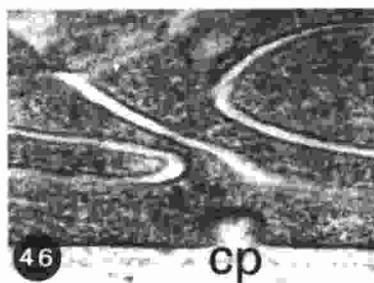
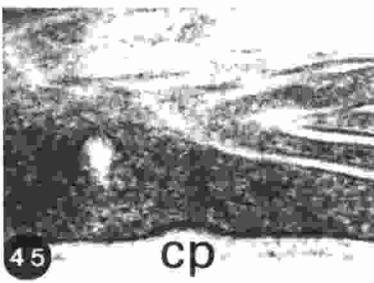
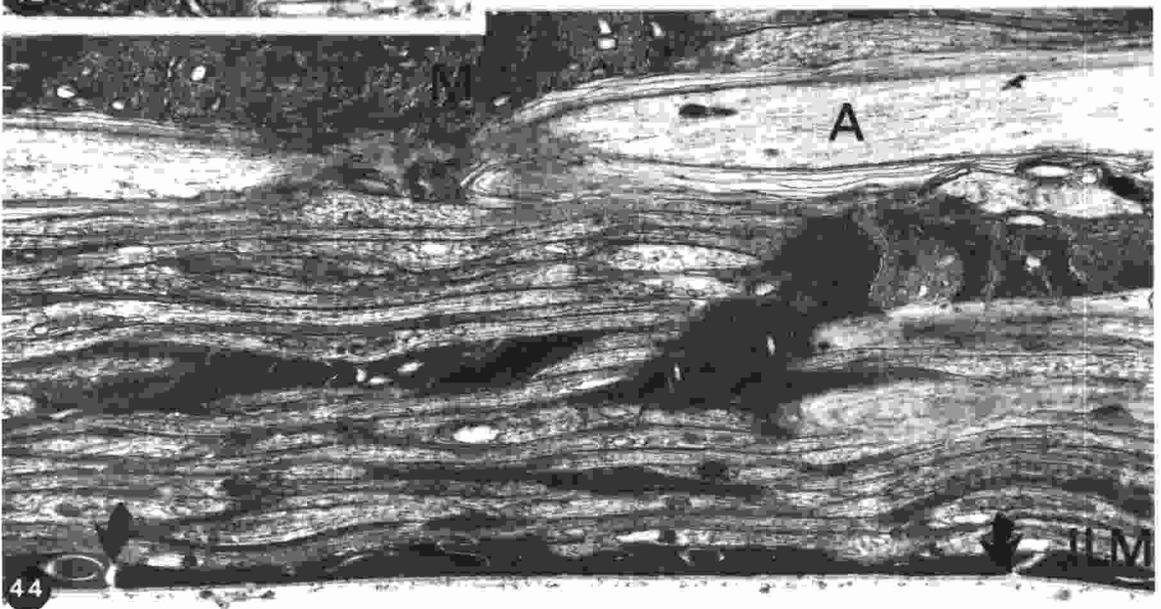
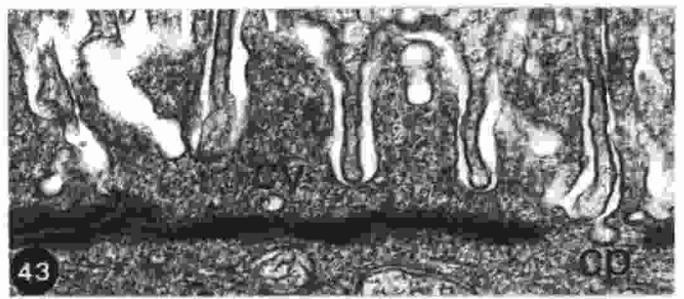
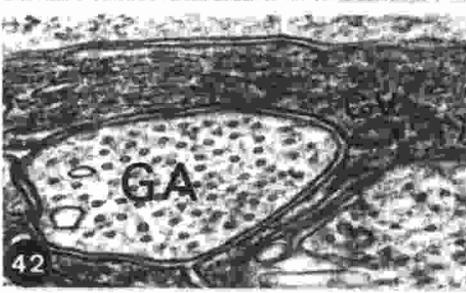
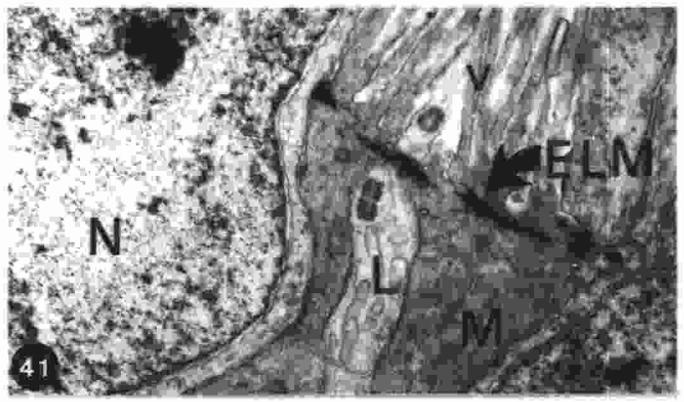
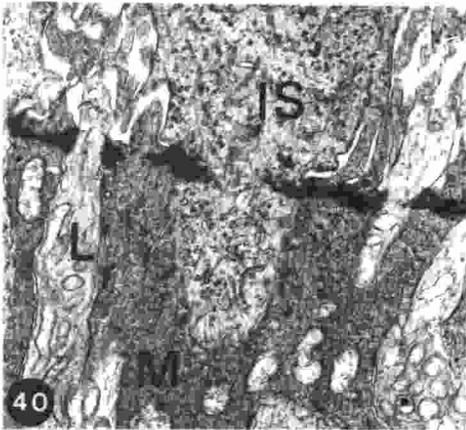


Figura 48, 49. Retina de pollo de un mes de vida postnatal. Las flechas muestran la continuidad entre los procesos internos de las células de Müller y la envoltura que rodea el axon de la célula ganglionar. M, célula de Müller; CG, célula ganglionar. Fig. 48, X 5.000 Fig. 49, X 13.000.

Figuras 50- 52. Retina de pollo de un mes de vida postnatal. ILM, membrana limitante interna. Las prolongaciones internas de las células de Müller (M) separan los paquetes axonales que transcurren por la capa de fibras del nervio óptico (Fig. 50). A, axon amielínico. A, axon recubierto con bandas de mielina. *, axon recubierto con densas bandas de mielina. Fig. 50, X 6. 600; Figs. 51 y 52, X 8.300.

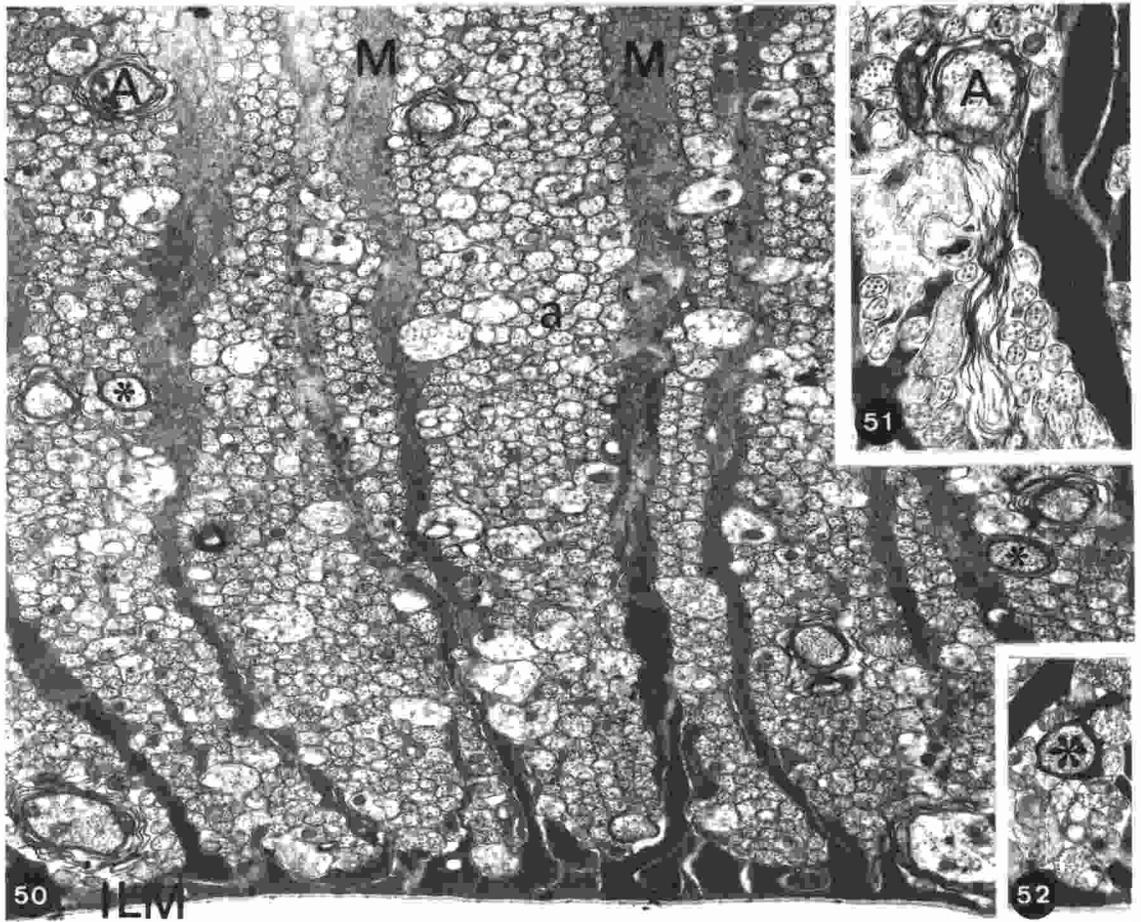
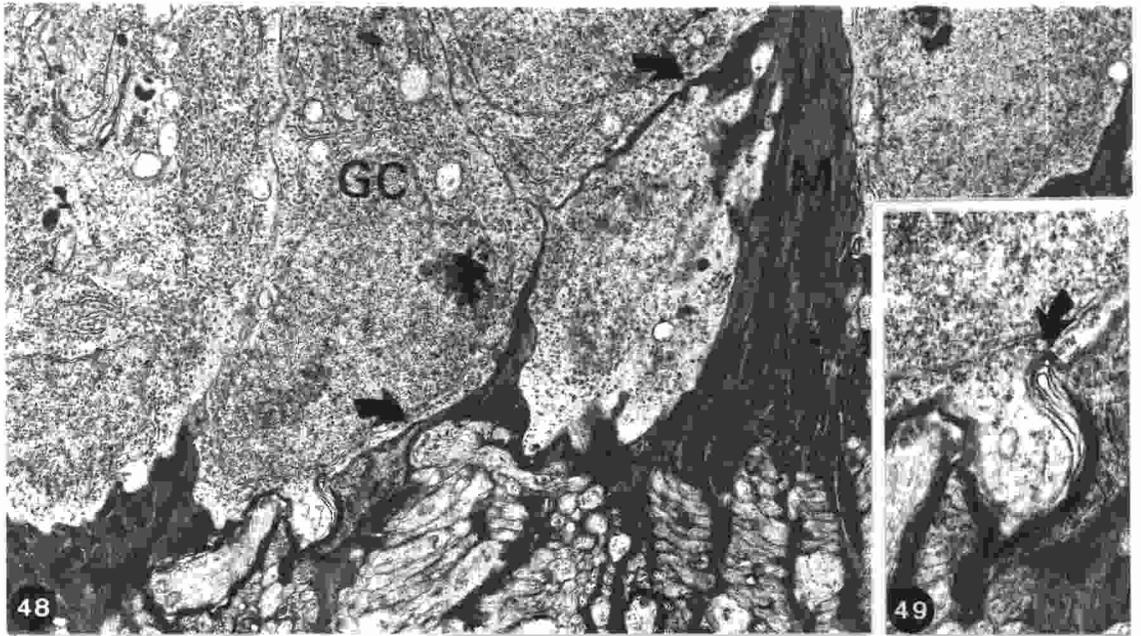
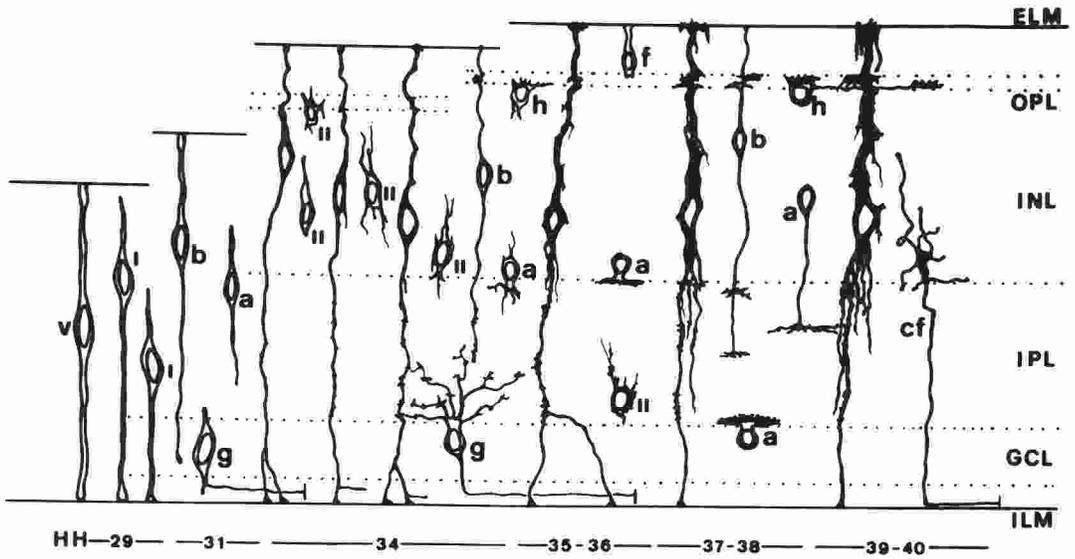
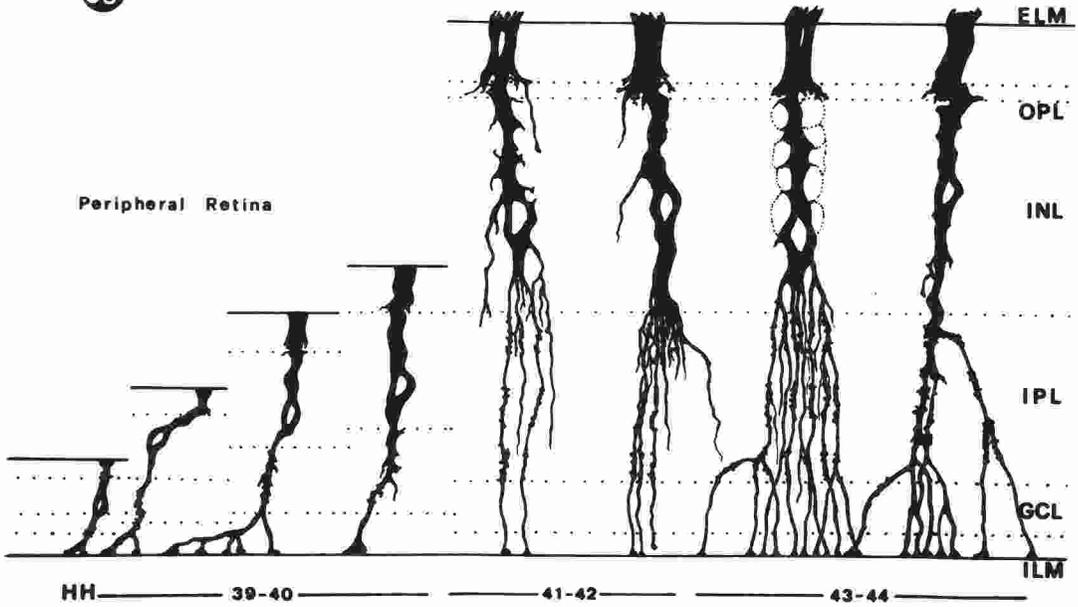


Figura 53. Dibujos a cámara lúcida de los primeros estadios del desarrollo (E 6-14) en los que se muestra la diferenciación morfológica de la célula de Müller en relación con las neuronas retinianas. V, célula en ciclo mitótico; I, joven neuroblasto ganglionar migrando hacia su ubicación definitiva en la capa de células ganglionares; II presuntiva célula amacrina emigrando libremente; a, célula amacrina; b, célula bipolar; h, célula horizontal; f, fotorreceptor; g, célula ganglionar; cf, fibras centrífugas.

Figura 54. Dibujos a cámara lúcida de los últimos estadios de diferenciación de las células de Müller (E 15-17). Observese la adaptación que realizan a nivel de la retina periférica (E 13-14).



53



54

Figuras 55-58. Sección vertical de retina de 10 (Fig. 55), 12 (Fig. 56), 16 (Fig. 57), y 18 días de incubación (Fig. 58). Método de Golgi. X 400.

Figura 59. Retina central dorsal de 18 días de incubación tratada con el anticuerpo monoclonal 3CB2. X 250.

Figura 60. Retina central dorsal de 18 días de incubación tratada con el anticuerpo monoclonal antiglutamina sintetasa. X 250.

Figura 61. Agregado celular de células de Müller tratadas con el anticuerpo monoclonal anti glutamina sintetasa. X 250.

Figura 62. Retina central ventral de 18 días de incubación tratada con el anticuerpo monoclonal anti-glutamina sintetasa. X 250.

Figura 63. Retina central ventral de 8 días de incubación tratada con el anticuerpo monoclonal anti-GABA. X 250.



55



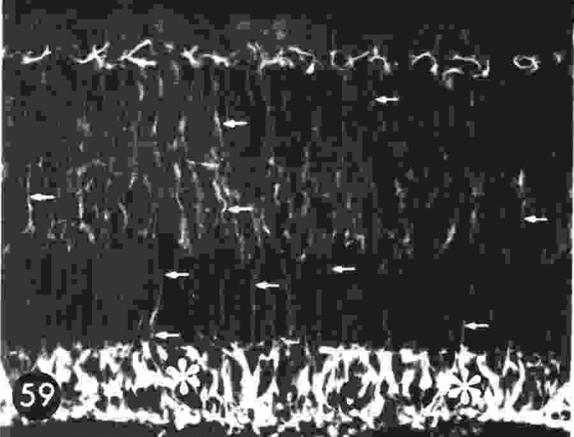
56



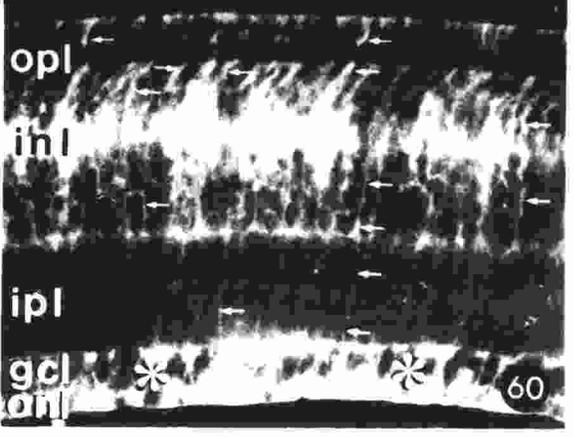
57



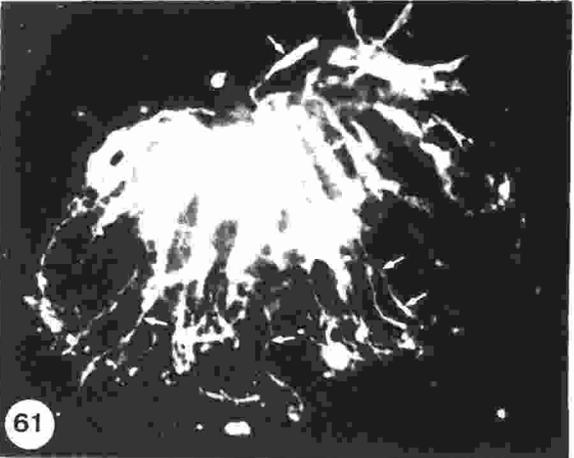
58



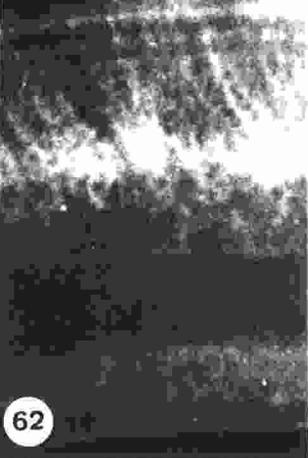
59



60



61



62



63

Figura 64. Sección semifina vertical de retina central de embrión de pollo de 18 días de incubación. Se observan células gliales en la capa de células ganglionares (flechas). X 400.

Figura 65. Retina de 10-11 días de incubación. Las cabezas de flechas señalan el relieve de las células amacrinas desplazadas en el espesor de la capa plexiforme interna. Las flechas curvas indican la presencia de astrocitos en la capa de células ganglionares. X 250.

Figura 66. Sección ultrafina de retina de embrión de pollo de 18 días de incubación. Se aprecia la presencia de astrocitos en la capa de células ganglionares (flecha curva). X 8300.

Figuras 67 y 68. Sección semifina tangencial de la capa de células ganglionares de un embrión de pollo de 18 días. Las flechas señalan los astrocitos.

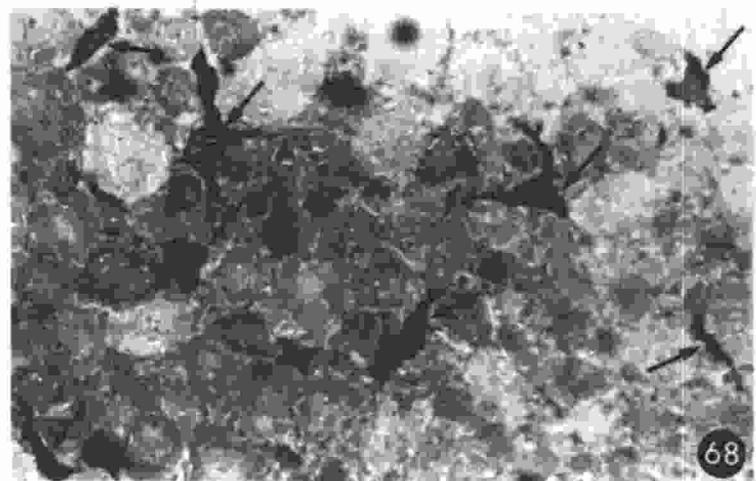
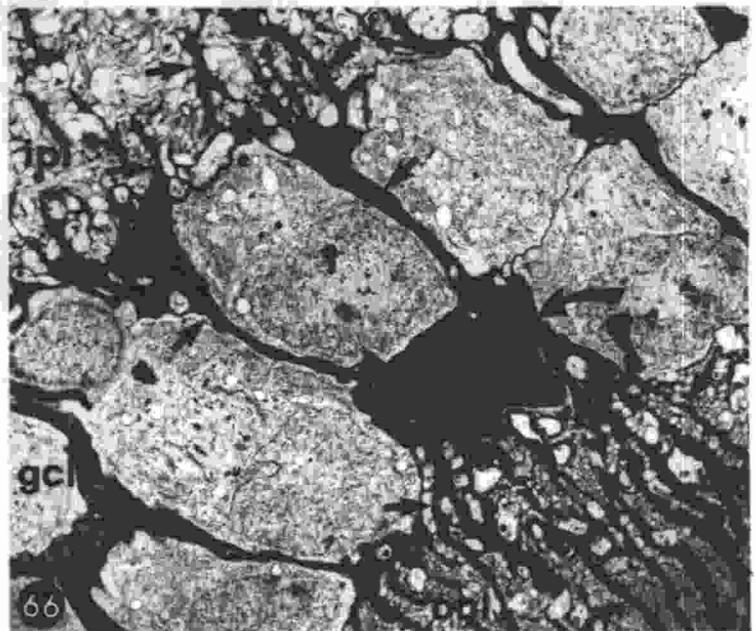
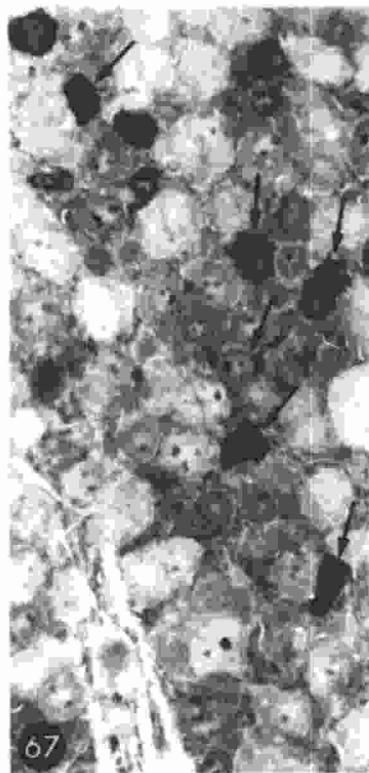
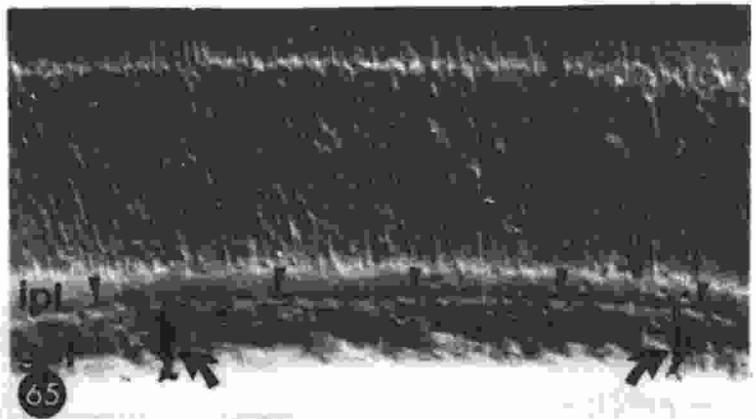
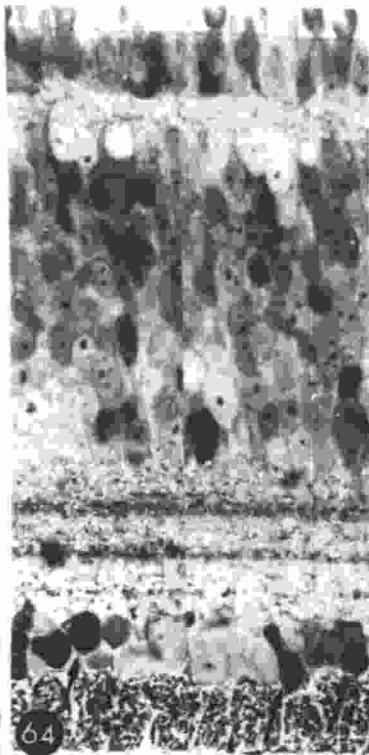
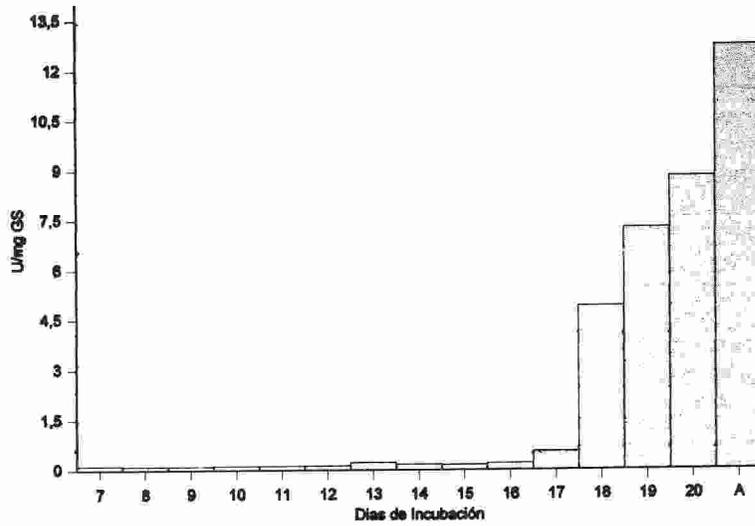


Figura 69. Gráfico y tabla de la actividad de la enzima glutaminosintetasa durante el desarrollo embrionario del pollo.



E	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	A
U/mg GS	0.11	0.10	0.10	0.11	0.11	0.13	0.22	0.17	0.16	0.20	0.55	4.90	7.25	8.78	12.7

FIGURA 69

Figura 70 y 73. Sección vertical de retina de 20 días de incubación en las que se aprecian las células horizontales (h), fotorreceptores (ph) y bipolares (b). Método de Golgi-Colonier. X 400.

Figura 71. Sección ultrafina de retina de pollo adulto a nivel de la capa plexiforme externa. Las flechas señalan las barras sinápticas. X13000.

Figura 72. Sección ultrafina de retina de pollo adulto a nivel de la capa plexiforme interna. Las flechas señalan las barras sinápticas. X 13000.

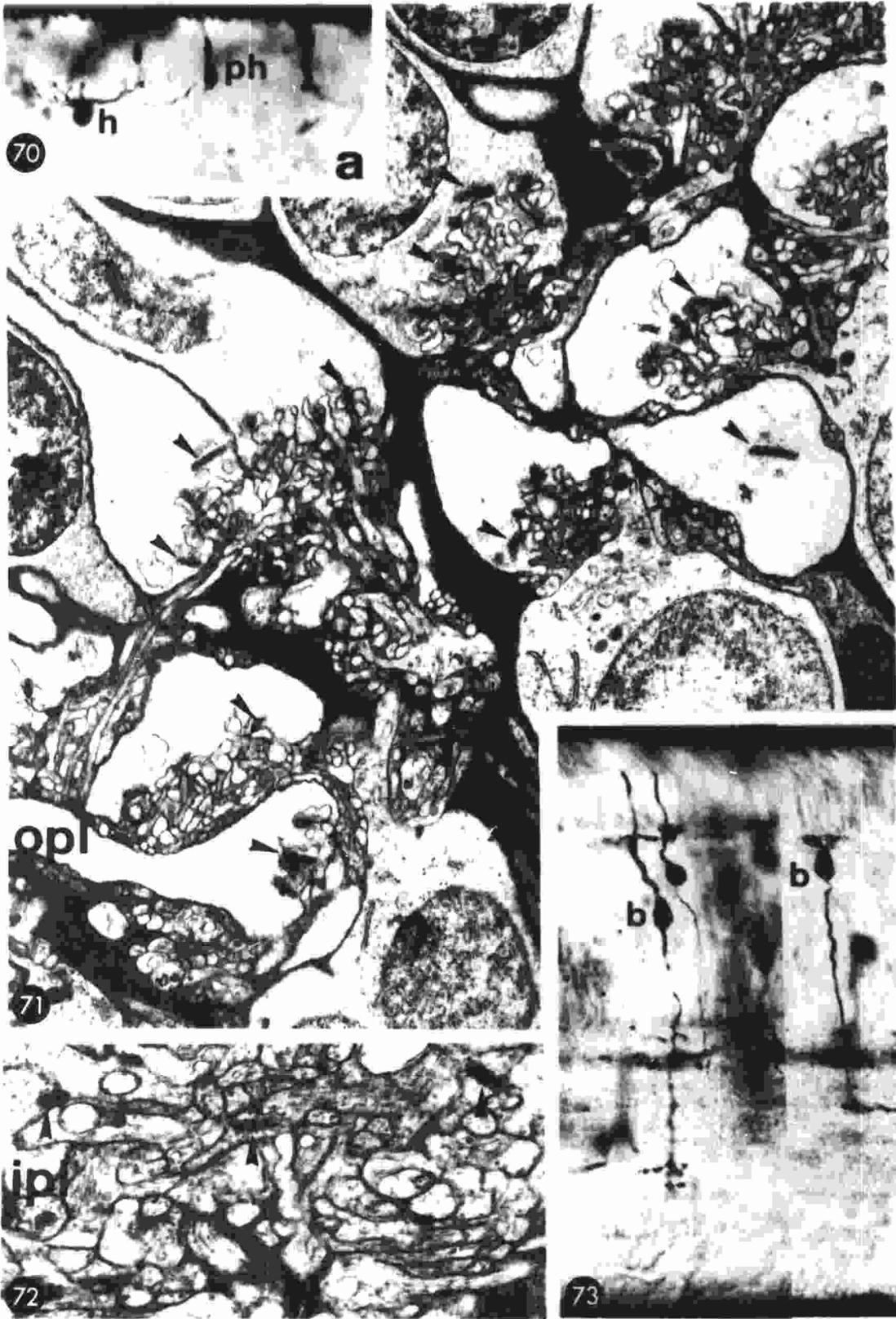


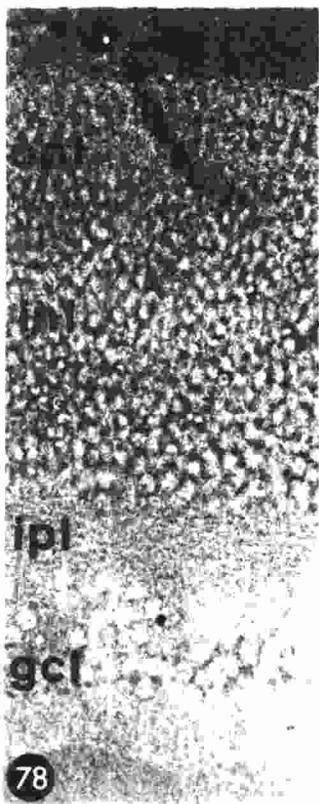
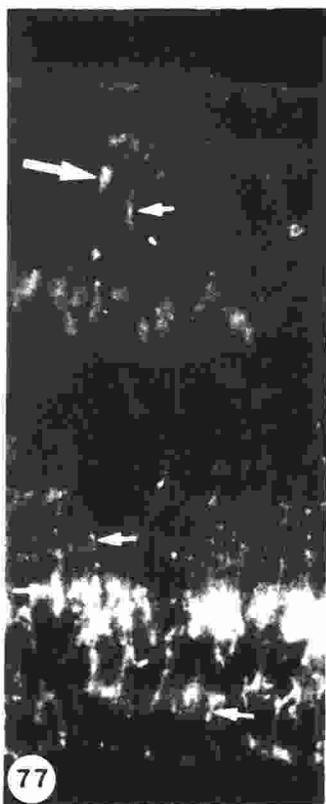
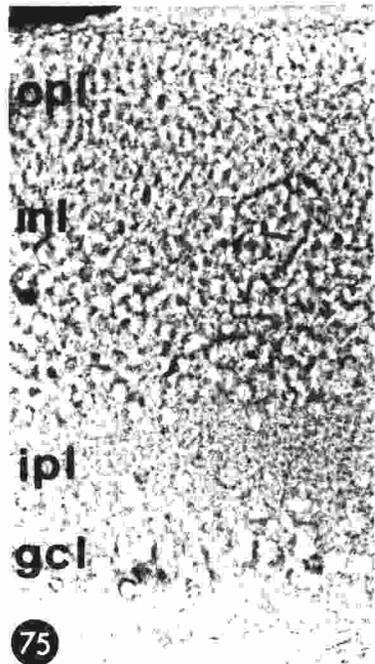
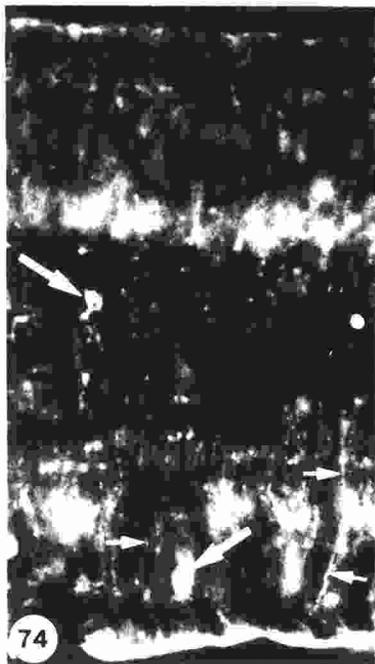
Figura 74. Sección vertical de retina de pollo de 11 días de incubación tratada con hidrocortisona en E-10. Se observa la inmunorreactividad para la anti-glutaminasintetasa. X 400.

Figura 75. Igual que la fotografía anterior, con contraste de Nomarski.

Figura 76. Sección vertical de retina de pollo de 11 días de incubación control. X 400.

Figura 77 y 78. Sección vertical de retina de pollo de 11 días de incubación tratada con hidrocortisona en E-10. Compárese la figura 77 con la figura 78 en la que la misma sección se observa con contraste de Nomarski (78). X 400.

Figuras 79 y 80. Secciones verticales de retina de pollo de 11 días de incubación tratadas con hidrocortisona en E-10. Las células de Müller expresan Glutamina sintetasa (flechas cortas), así como probablemente otras neuronas (flechas largas). X 400.



7. DISCUSSION

7.1. DIFERENCIACION DE LA CÉLULA DE MÜLLER.

En la actualidad existen numerosos trabajos sobre diferenciación retiniana que intentan esclarecer si la diferenciación de las neuronas ocurre antes o después que la diferenciación de las células de Müller (Meller y Glee, 1965; Uga y Smelser, 1973a; Kuwabara y Weidman, 1974; Quesada y col., 1981). Los estudios de Coulombre (1955), Bhattacharjee y Sanyal (1975) y el presente trabajo indica que las células de Müller llegan a diferenciarse antes que la mayoría de las neuronas retinianas. Sin embargo, recientemente Sharma y Ungar (1980) y Hagendorn y Fernald (1992) dan a conocer en vertebrados no mamíferos que son las células ganglionares las primeras en generarse y los bastones las últimas. Hagendorn y Fernald (1992) establecen el siguiente orden de génesis: 1° Las células ganglionares y los conos; 2° las células amacrinas y bipolares junto con las células horizontales y las células de Müller; 3° los bastones. Por añadidura, todas las células son generadas en una primera fase de proliferación, excepto los bastones que son producidas en una segunda fase. En vertebrados mamíferos, también existen dos fases de generación celular. En la primera se producen las células ganglionares (Allodi y col., 1992), seguidas de las células amacrinas, horizontales y conos. En la segunda, las células bipolares, células de Müller y los bastones (Harman y col., 1992).

El inicio de la actividad enzimática en los primeros estadios del desarrollo así como los estudios sobre la diferenciación ultraestructural de las

células, indican el importante papel que juegan las células de Müller en la migración y diferenciación de las neuronas retinianas. De este modo, Bhattacharjee y Sanyal (1975), Meller y Tetzlaff (1976) son de la opinión que los procesos citoplasmáticos de las células de Müller pueden actuar como soportes para la migración de las neuronas retinianas como ocurre con las fibras gliales de Bergman en el cerebelo (Rakic, 1972).

Al utilizar un tóxico glial como es el ácido D,L- α aminoadipídico, Pedersen y Karlsen (1979) muestra que éste retrasa la diferenciación de la célula de Müller, al tiempo que impide la llegada a la capa de células ganglionares de las células amacrinas desplazadas. Este hecho parece indicar que las células de Müller intervienen activamente en la migración de las células amacrinas. A pesar de lo cual es preciso aclarar este punto con más precisión.

La histogénesis de la célula de Müller en el embrión de pollo fue analizada en parte por Ramón y Cajal (1892) y Martin (1890). Estos autores encuentran que entre E-10 y E-13, los núcleos de las células de Müller se localizan en el estrato medio de la retina y que estas células poseen dos expansiones uniformes que terminan en un pie a nivel de ambas membranas limitantes. Ellos también dan a conocer que entre los 13 y los 14 días de incubación aparecen las primeras expansiones laterales (Martin, 1980; Ramón y Cajal, 1892). En nuestras observaciones hemos encontrado que estas

expansiones son ya visibles con el método de Golgi a los 8 días de incubación.

Un aspecto importante en la diferenciación de la célula de Müller es la aparición de la “prolongación accesoria”. Esta ha sido previamente descrita en las células de Müller (Ramón y Cajal, 1892; Colonnier, 1964; Prada y col., 1979) y en las células bipolares de la retina del camaleón (Quesada y col., 1981) y del pollo (Quesada y col., 1986), se cree que ellas sirven de soporte y aislante de los axones de los fotorreceptores a su paso por la capa de Henle. En la retina del camaleón la prolongación accesoria parece ser la prolongación principal de la célula.

Los movimientos celulares y la subsecuente diferenciación celular de la retina induce un desplazamiento del citoplasma glial que da lugar al penacho de ramificaciones internas. Como hemos descrito en la diferenciación glial del pollo, la prolongación accesoria de las células de Müller surge como un apéndice secundario del citoplasma lateral, posiblemente como resultado de la interposición de los pericarios neuronales en crecimiento, que causan los cambios direccionales en estas prolongaciones. Ramón y Cajal (1892) en la retina de buey dibuja pero no describe las prolongaciones accesorias saliendo de la parte interna de la célula de Müller, éstas son muy similares a las descritas por nosotros en la retina de pollo.

En nuestras preparaciones, hemos observado dos tipos de células de Müller en la retina de pollo, que se encuentran presentes tanto en la retina

central como en la retina periférica. El primer tipo, con abundantes y difusas ramificaciones descendentes, es idéntico a la célula de Müller descrita por Ramón y Cajal (1892) en la retina de pollo. El otro tipo de célula de Müller no ha sido anteriormente descrito en el pollo por ningún autor, este tipo presenta uno, dos o tres procesos descendentes que se ramifican a nivel de la capa de células ganglionares en cortas y diversas ramificaciones arqueadas. Los pies de las células de Müller tipo II es similar al descrito por Ramón y Cajal (1892) en la retina de buey.

Las diferencias morfológicas encontradas en las células de Müller de la retina central y periférica parecen ser debidas a la adaptación de éstas al distinto grosor retiniano. Esta adaptación podría explicar la formación de la “prolongación accesoria” en las células de Müller de la retina periférica.

Las observaciones realizadas mediante microscopía electrónica coinciden la mayoría de ellas con las previamente descritas en retinas de otros animales vertebrados (Meller y Glees, 1965; Uga y Smelser, 1973a; Kuwabara y Weidman, 1974). Sin embargo, nosotros podemos destacar dos aspectos significativos de la organización ultraestructural de la célula de Müller. Uno es el gran número de vesículas picnóticas que aparecen muy tempranamente durante el desarrollo a nivel de ambas membranas limitantes. La mayoría de los investigadores consideran que estas vesículas se originan desde invaginaciones de la membrana plasmática (Cohen, 1961; Kanaseki y Kadota,

1969; Anderson y col., 1977; Goldstein y col., 1979) y que la actividad picnótica predomina en la zona más interna de la retina.

Junto a las vesículas pueden observarse partículas difusas de ferritina que pasan desde el medio extracelular hacia el citoplasma glial (Smelser y col., 1965). Según nuestras observaciones, la secuencia de formación vesicular se puede detectar a nivel de toda la superficie celular, aunque con predominancia en el borde escleral. La constante formación de vesículas puede representar una explicación parcial al metabolismo y nutrición de las retinas avasculares. Hipótesis esta que está en concordancia con los trabajos previos de Uga y Smelser (1973) y D'Este y col. (1983).

Nuestras observaciones al microscopio electrónico corroboran la información sobre el origen de la mielina en la capa de fibras del nervio óptico. Ladman y Soper (1962) y Hughes y LaVelle (1974) fueron los primeros en sugerir que las células de Müller son las células mielinizadoras de los axones retinales. Smith (1982) y el presente trabajo soportan la idea de que la espiral membranosa que envuelve a los axones de la capa de fibras del nervio óptico se origina desde las células de Müller. Las prolongaciones descendentes internas de las células de Müller emiten expansiones laminares hacia las células ganglionares y hacia la capa de fibras del nervio óptico que forman el tipo de mielina suelto característico de esta zona.

El aspecto de la porción interna de la célula de Müller durante el



proceso de mielinización soportan la idea de que ellas pueden actuar funcionalmente como oligodendrocitos (Ikeda y col., 1980), sin embargo, las características ultraestructurales de la porción externa de la célula de Müller también permiten poder considerarla funcionalmente como células endodiales (Meller y Glees, 1965). El resto de la célula, dependiendo del tipo de ramillete interno, podría actuar como astrocito fibroso o protoplásmico. Por lo tanto, la célula de Müller embrionaria parece poder abarcar funcionalmente los diferentes tipos de células gliales existentes en el SNC.

7.2. ACTIVIDAD DE LA GLUTAMINA SINTETASA DURANTE EL DESARROLLO DE LA CÉLULA DE MÜLLER.

En la retina, la GS es detectable únicamente en las células de Müller (Riepe y Norenburg, 1977; Linser y Moscona, 1979,1983); este hecho parecer ser exclusivo de la retina, ya que en el Sistema Nervioso Central la GS está concentrada predominantemente en los astrocitos (Norenburg, 1979; Norenburg y Martinez-Hernández, 1979) y, es inducible en neuronas libres, cultivos de astrocitos del cerebro (Hallermayer y col., 1981; Juurlink y col., 1981; Horrison y DeVellis, 1983) y oligodendrocitos localizados en corteza cerebral, cerebelo, mesencefalo (D'Amelio y col., 1990) y médula espinal (Cammer, 1990; D'Amelio y col., 1990). No obstante, nosotros demostramos que en la retina del pollo, la capa de células ganglionares muestra una

importante población de astrocitos que expresan GS , además en la capa de fibras del nervio óptico se localizan oligodendrocitos que probablemente muestran inmunotinción de GS. De la misma forma, encontramos que en la microfotografías de retina de rata y pollo mostradas respectivamente por Riepe y Norenburg (1977) y Linser y Moscona (1981), hay áreas muy densas de inmunoreactividad para GS en la capa de células ganglionares y en la capa de fibras del nervio óptico. Este hecho está en concordancia con Cammer (1990) y da consistencia a la hipótesis de que los astrocitos y los oligodendrocitos en el nervio óptico del pollo tienen un precursor común (Prada y col., 1982) y que ambos tipo celulares surgen en la médula espinal de la rata a partir de células de glía radial. Por otra parte, la célula de Müller de la retina muestra diferentes características ultraestructurales en la mitad externa de la retina respecto a la mitad interna; mientras que la mitad externa tiene características de astrocito, en la mitad interna actúa como oligodendrocito formando la envoltura mielínica para los axones del nervio óptico (Prada y col., 1989).

Se ha propuesto que en la retina el incremento de la actividad de la GS es paralelo al desarrollo de las células de Müller (Chader, 1971; Onley, 1968); mientras que en el cerebro de rata el desarrollo de la actividad de la GS es asociado con la diferenciación de los astrocitos (Mearrow y col., 1989; Patel y col., 1983; Weir y col., 1984; Vernadakis y col., 1986; Wernicke y Volpe, 1986). Nuestros resultados muestran que cuando la actividad de la GS se

incrementa (E-17), las características morfológicas de las células de Müller son ya similares a las células de Müller adultas. Por lo tanto, la regulación de la actividad de la GS no está influenciada por la diferenciación de las células de Müller.

La gliogénesis y diferenciación morfológica glial sucede antes que la síntesis de la enzima GS. Sin embargo, nuestros resultados experimentales, usando hidrocortisona, han demostrado que desde el 9º día de incubación las jóvenes células de Müller tienen capacidad para sintetizar esta enzima.

La GS se encuentra implicada en el metabolismo del neurotransmisor inhibidor ácido γ -aminobutírico (GABA) (Hertz, 1981; Hert y Schousboe, 1980; McGeer y col., 1983). Además, se ha establecido una importante relación entre la actividad de la GS y el ácido glutámico decarboxilasa (GAD) (Patel y col., 1985). Nuestros resultados demuestran que durante los primeros estadios de diferenciación (E-8 a E-12) las neuronas gabaérgicas (células horizontales y amacrinas) muestran una intensa inmunorreactividad GABA, a pesar de que la actividad de GS es muy baja. En estos estadios, en la retina de pollo la inmunorreactividad para el GAD (Hokoc y col., 1990) y para la GS son negativas. Por lo tanto, la síntesis de GABA debe producirse por caminos diferentes en los estadios iniciales de diferenciación y en la retina adulta. En este sentido, estamos de acuerdo con el hecho de que la síntesis de GABA durante el inicio del desarrollo podría ser a partir de la putrescina (Hokoc y

col., 1990). Esta hipótesis está reforzada por el hecho de que el GABA puede ser sintetizado desde la putrescina en muchas áreas del sistema nervioso central (Seiler y Al-Therib, 1974). En estadios posteriores del desarrollo el nivel de glutamina se incrementa (Ishikawa y col., 1996), porque de acuerdo con nuestros resultados se incrementa la actividad de la GS, lo que implicaría que la glutamina es un precursor del GABA en la retina (Starr, 1975; Voaden y col., 1978). Estos hallazgos sugieren que la síntesis del GABA en la retina adulta podría depender de la utilización de la glutamina como sustrato.

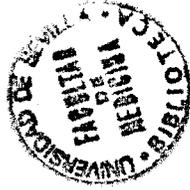
Una gran pregunta basada en estudios previos así como en el nuestro, es ¿qué factor o factores controlan la síntesis de GS durante desarrollo?. Los experimentos con cultivos y tejidos de retina y cocultivos de astrocitos y neuronas embrionarias sugieren dos factores principales responsables de la inducción de la GS durante el desarrollo: el primero, es el papel de los glucocorticoides en la regulación de la GS (Vento y col., 1987); el segundo, muestra que la inducción de la actividad de la GS también requiere contactos celulares (Vardimon y col., 1988). No obstante, estos factores no son constatados completamente en el modelo *in vivo*. Sabemos que las células de la corteza adrenal están presentes en el embrión de pollo a las 18-19 horas de incubación (Romanoff., 1966), y que la producción de corticosteroides en embriones de pollo ocurre en E-12 (Piddington, 1970); en esta fase los glucocorticoides son responsables de una inhibición general de la proliferación

celular coincidiendo con altos niveles de receptores de glucocorticoides en la células de la retina (Vento y col., 1987). Por otra parte, los contactos celulares están presentes en el desarrollo de la retina del pollo (E-11), porque después de dos días en un medio de cortisol (Linser y Moscona, 1981) o hidrocortisona (nuestros resultados) la actividad de la GS se incrementa (Linser y Moscona, 1981). En células disociadas de la retina el cortisol no produce un aumento de los niveles de glutamina sintetasa, pero cuando las células son reagrupadas, la inductibilidad de la GS se recupera (Linser y Moscona, 1979; Linser y Moscona, 1983). Entonces ¿por qué la actividad de la GS en la retina del pollo sólo se incrementa a partir del día 17 de incubación?. Nuestros resultados sugieren, que durante el final del proceso de sinaptogénesis en la capa plexiforme externa (E-16-17) (Meller, 1964; 1968), los contactos celulares directos entre fotorreceptores-células horizontales-células bipolares deben generar señales en las células de Müller que capacite inmediatamente el gen inductor de la GS. De esta forma, la GS está incriminada en la maduración funcional de los circuitos neuronales glutamatérgicos y gabaérgicos de la retina. A favor de esta hipótesis se encuentra el hecho mostrado en nuestros resultados, de que durante E-18 la inmunoreactividad para GS en la retina periférica y ventral es insignificante mientras que la retina central y dorsal es muy intensa. Este criterio está en concordancia con el patrón temporal y espacial de sinaptogénesis y en general con el patrón de neurogénesis y

diferenciación de la retina del pollo (Shen y col., 1956; Prada y col., 1991). Así, nuestro estudio apoya el criterio de que la inducción de la actividad específica de la GS en los astrocitos por las neuronas es independiente de la inducción de ésta por la hidrocortisona (Wu y col., 1988).

En resumen, aunque se ha propuesto una importante relación entre la diferenciación morfológica de la célula de Müller y la actividad específica de la GS; nuestros resultados sugieren que la actividad de la GS es sólo dependiente de la diferenciación y sinaptogénesis neuronal de las células glutamatérgicas y gabaérgicas, ya que la diferenciación de las células de Müller ocurre antes que la explosión de actividad GS. Estos datos nos hacen pensar que la GS sólo debe ser considerada como un marcador de la maduración funcional de la retina.

8. CONCLUSIONES



1.- A partir de E-7 en la retina central de pollo se puede diferenciar morfológicamente a las células de Müller de las distintas neuronas retinianas.

2.- Durante E-8 a E-10 aparecen, en la prolongación interna de la célula de Müller y a nivel de la capa de células ganglionares y capa de fibras del nervio óptico, las primeras variaciones morfológicas que darán origen a las prolongaciones secundarias. A nivel más interno, el citoplasma se expande para formar los pies que configuran la membrana limitante interna.

3.- A partir de E-9 y E-10 la prolongación externa, a nivel de la incipiente capa plexiforme externa muestra inflexiones, engrosamientos o pequeñas y numerosas espiculaciones.

4.- Las células de Müller localizadas en la retina dorsal y ventral completan su diferenciación morfológica entre E-13 y E-17. Durante este periodo se forma el ramillete interno de la célula de Müller a partir del polo interno del cuerpo celular.

5.- En E-18 la célula de Müller completa y finaliza su diferenciación, presentando una morfología similar a la que muestra en el animal adulto. Esto

nos permite clasificar a la célula de Müller en dos tipos según su ramillete interno. El tipo I muestra abundantes y difusas ramificaciones descendentes, correspondiéndose con el descrito por Ramón y Cajal (1892) en la retina de pollo. El tipo II posee dos o tres procesos descendentes que se ramifican a nivel de la capa de células ganglionares en cortas y diversas ramificaciones arqueadas.

6.- Las observaciones realizadas mediante microscopía electrónica coinciden con las previamente descritas por diversos autores en retinas de otros animales vertebrados. Es preciso destacar la presencia de gran número de vesículas picnóticas de aparición temprana a nivel de ambas membranas limitantes.

7.- La mitad externa de la célula de Müller muestra características ultraestructurales de astrocitos, mientras que la mitad interna las presenta de oligodendrocitos al formar la envoltura mielínica para los axones del nervio óptico.

8.- Con los métodos clásicos de tinción hemos observado la existencia de células gliales ubicadas en la capa de células ganglionares que muestran características de oligodendrocitos.

9.- Durante los estadios iniciales de la diferenciación de la célula de Müller, la inmunorreactividad GS es muy baja. Por el contrario, las neuronas gabaérgicas si ofrecen una intensa inmunorreactividad GABA. El hecho de que la inmunorreactividad para la GS y para el GAD sea negativa implica que la síntesis de GABA procede de una via metabólica diferente en los estadios iniciales de diferenciación y en la retina adulta.

10.- A partir de E-14 aparece una débil inmunorreactividad en las áreas central y dorsal de la retina que se extiende en estadios posteriores a las zonas periféricas y ventrales, estando el patrón de inmunorreactividad GS en concordancia temporal y espacial con la neurogénesis y sinaptogénesis retiniana.

11.- En E-18 se completa el patrón de inmunorreactividad GS en toda la retina y desde E-19 dicho patrón es similar al observado en el pollo adulto.

12.- La inmunorreactividad para GS fue principalmente localizada en las células de Müller, aunque también fue localizada en gliocitos localizados a nivel de la capa de células ganglionares y en la capa de fibras del nervio óptico. Estos datos podrían confirmar la hipótesis de que astrocitos y oligodendrocitos tienen un precursor celular común.

13.- La actividad glutamina sintetasa es baja durante los primeros días del desarrollo. Durante E 12-13 la retina muestra un incremento de actividad GS, aunque ésta continúa siendo muy baja. Posteriormente, desde E-14 a E-16 sufre una ligera depleción recuperándose en E-17. En E-18 la actividad GS se incrementa notablemente y de manera progresiva de modo que en el pollo recién nacido el valor para la actividad GS es más del doble que el encontrado a los 18 días de incubación.

14.- La regulación de la actividad GS no es dependiente de la diferenciación de la célula de Müller ya que ésta se diferencia antes de que tenga lugar la explosión de la actividad GS. Dicha actividad parece estar determinada por el final de la diferenciación y sinaptogénesis de las neuronas glutamatérgicas y gabaérgicas.

15.- Los embriones previamente tratados con hidrocortisona muestran una inducción de la enzima GS por parte de la célula de Müller.

16.- En células disociadas de retina el aumento de hidrocortisona no provoca un aumento en los niveles de actividad GS, por lo que se demuestra que es necesario además la existencia de contactos celulares para que esta se lleve a cabo.

9. BIBLIOGRAFIA

Abd-El-Basset, E.M.; Ahmed, I.; Kalnins, V.I. y Fedoroff, S. (1992). Immunoelectron microscopical localization of vimentin and glial fibrillary acidic protein in mouse astrocytes and their precursor cells in culture. *Glia* **6**:149-153.

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.

Allodi, S., Cavalcante, L.A., Hokoc, J.N. y Bernardes, R.F. (1992) Genesis of neurons in the retinal ganglion cell layer in opossum. *Anat. Embryol.* **185**: 489-499.

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

Anchan, R.M.; Reh, T.A.; Angelo, J.; Balliet, A. y Walker, M. (1991). EGF and TGF- α stimulate retinal neuroepithelial cell proliferation in vitro. *Neuron.* **6**:923-936.

Anderson, R.G.W.; Brown, H.S. y Goldstein, J.L. (1977) Role of the coated endocytic vesicle in the uptake of receptor-bound low density lipoprotein in human fibroblast. *Cell.* **10**: 351- 368.

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

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

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

Barnstable, C.J. (1980). Monoclonal antibodies which recognize different cell types in the rat retina. *Nature* **286**:231-235.

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

Barnstable, C.J.; Hofstein, R. y Akagawa, K. (1985). A marker of early amacrine cell development in rat retina. *Dev. Brain Res.* **20**:286-290.

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

Berkow, J.W. y Patz, A. (1964). Developmental histochemistry of the rat eye. *Invest. Ophthalmol.* **3**:22-33.

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

Berls, S. (1971). Cerebral acid metabolism in hepatic coma. *Exp. Biol. Med.* **4**:71-84.

Bhattacharjee, J. y Sanyal (1975) Developmental origin and early differentiation of retinal Müller cells in mice. *J. Anat.* **120**: 367- 372.

Biedermann, B.; Fröhlich, E.; Grosche, J.; Wargner, H.J. y Reichenbach, A. (1995). Mammalian Müller cells express functional D2 dopamine receptors. *Neuroreport* **6**:609-612.

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.

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

Bingelli, R.L. y Paule, W.J. (1969). The pigeon retina: quantitative aspects of the optic nerve and ganglion cell layer. *J. Comp. Neurol.* **137**: 1- 18.

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

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

Blackstone, C.D.; Levey, A.I.; Martin, L.J.; Price, D.L. y Huganir, R.L. (1992). Immunological detection of glutamate receptor subtypes in human central nervous system. *Ann. Neurol.* **31**:680-683.

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.

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

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

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

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

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

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

Bradford, H.F.; Ward, H.K. y Thomas, A.J. (1978a). Glutamate as a substrate for a nerve endings. *J. Neurochem.* **30**:1453-1459.

Bradford, H.F.; Ward, H.K. y Thomas, A.J. (1978b). Glutamine-A major



substrate for nerve endings. *J. Neurochem.* **30**:1453-1459.

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

Brandstätter, J.H., Koulen, P., Kuhn, R., Van der Putten, H. y Wässle, H. (1996). Compartmental localization of a metabotropic glutamate receptor (mGluR7): Two different active sites at a retinal synapse. *The Journal of Neuroscience.* **16 (15)**:4749-4756.

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

Brecha, N.C. y Weigman, C. (1991). GABA-A receptor subunit immunoreactivities in the rabbit retina. *Invest. Ophthalmol. Vis Sci.* (Suppl.) **32**:1189.

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

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

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

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.

Carlsson, A. (1959). *Pharmacol. Rev.* **11**. 300- 304.

Carter-Dawson, L.D. y La Vail, M.W. (1979) Rods and cones in the mouse retina. II. Autoradiographic analysis of cell generation using tritiated

thymidine. *J. Comp. Neurol.* **188**: 263- 272.

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

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

Cohen, A.I. (1961) Electron microscopic observations of the internal limiting membrane and optic fiber layer of the retina of the Rhesus Monkey (M. Mulatta). *Am. J. Anat.* **108**: 179- 198.

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

Coloumbre, A.J. (1955) Correlation of structural and biochemical changes in the developing retina of the chick. *Am. J. Anat.* **96**: 153- 189.

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

Cooper, 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. Schousboe, eds. Alan R. Liss, New York, pp.77-93.

Craig, A.M.; Blackstone, C.D.; Huganir, R.L. y Banker, G. (1993). The distribution of glutamate receptors in cultured rat hippocampal neurons: postsynaptic clustering of AMPA-selective subunits. *Neuron.* **10**:1055-1068.

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

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. C.C.; 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.

Chao, T.I.; Panicke, T.; Reichelt, W. y Reichenbach, A. (1993). NA⁺ channels are expressed by mammalian retinal glial (Müller) cells. *Neuroreport* **4**: 575-578.

Chao, T.I.; Skachkov, S.N.; Ebarhardt, W. y Reichenbach, A. (1994). Na⁺ channels of Müller (glial) cells isolated from retinae of various mammalian species including man. *Glia* **10**: 173-185.

Choi, D.W. y Rothman, S.N. (1990). The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. *Annu. Rev. Neurosci.* **12**:171-182.

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

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

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

De Vellis, J.; Wu, D. y Kumar, S. (1986 b). Enzyme induction and regulation of protein synthesis. *Astrocytes: Biochemistry, Physiology and Pharmacology of Astrocytes*. Vol.2 (Fedoroff, S. And Vernadakis, A., eds.), pp209-228. Academic Press, New York.

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.
- Distler, C.; Weigel, H. y Hoffmann, K.P. (1993). Glia cells of the monkey retina. I. Astrocytes. *J. Comp. Neurol.* **333**: 134-147.
- Dräger, U.C. (1983). Coexistence of neurofilaments and vimentin in a neurone of adult mouse retina. *Nature* **303**: 169-172.
- Dräger, U.C.; Edwards, D.L. y Barnstable, C. J. (1984). Antibodies against filamentous components in discrete cell types of the mouse retina. *J. Neurosci.* **4**: 2025-2042.
- Dreher, Z.; Distler, C. y Dreher, B. (1994). Vitreal filamentation of avian Müller cells and its putative functional correlates. An immunocytochemical study. *J. comp. Neurol.* **350**: 96-108.
- Dreher, Z.; Robinson, S.R. y Distler, C. (1992). Müller cells in vascular and avascular retinæ: a survey of seven mammals. *J. Comp. Neurol.* **323**: 59-80.
- 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.
- Dutar, P. y Nicoll, R.A. (1988). Pre- and postsynaptic GABA-B receptors in the hippocampus have different pharmacological properties. *Neuron*, **1**:585-591.
- Duvoisin, R.M., Zhang, C. y Ramonell, K. (1995). A novel metabotropic glutamate receptor expressed in the retina and olfactory bulb. *J. Neurosci.* **15**:3075-3083.
- D'Amelio, F.; Eng, L.F. y Gibbs, M.A. (1990). Glutamine synthetase immunoreactivity is present in oligodendroglia of various regions of the central nervous system. *Glia.* **3**:335-341.
- D'Este, L.; Campo, S.; Arizzi, M.; Negri, L.; Salvi, E.; Biancone, S.; Manelli, H.; Mechiorri, P. y Renda, T. (1983) Immunohistochemical evidence of a sauvaginelike immunoreactivity in frog retina Müller cells. *Biomed. Res.* **4**: 467-472.
- Ehinger, B. (1973). Glial uptake of taurine in the rabbit retina. *Brain Res.* **60**:

512-516.

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

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.

Erdo, S.; Michler, A. y Wolff, J.R. (1991). GABA accelerates excitotoxic cell death in cortical cultures: protection by blockers of GABA-gated chloride channels. *Brain Res.* **542**:254-258.

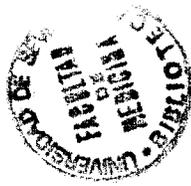
Erecinska, M. y Silver, I.A. (1990). Metabolism and role of glutamate in mammalian brain. *Prog. Neurobiol.* **35**:245-296.

Faff-Michalak, L.; Reichenbach, A.; Dettmer, D.; Kellner, K. y Albercht, J. (1994). K⁺, hypoosmolarity-, and NH₄⁺- induced taurine release from cultured rabbit Müller cells: role of Na⁺ and Cl⁻ ions and relation to cell volume changes. *Glia* **10**: 114-120.

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

Foroutan, A.; Behbehan, M.M.; 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.

Frandsen, A. y Schousboe, A. (1990). Development of excitatory amino acid induced cytotoxicity in cultured neurons. *In. J. Dev. Neurosci.* **8**:209-216.



Fujita, S. (1963). The matrix cell and cytogenesis in the developing central nervous system. *J. Comp. Neurol.* **120**:37-42.

Gabellini, N.; Manev, R.M. y Manev, H. (1994). Is the heterologous expression of metabotropic glutamate receptors (mGluRs) an appropriate method to study the mGluR Function?. Experience with human embryonic kidney 293 cells transfected with mGluR1. *Neurochem. Int.* **24**: (6), 533-539.

Galifret, Y. (1968). Les diverses aires fonctionnelles de la rétine du pigeon. *Z. Zellforsch.* **86**: 535- 545.

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

Ghandour, M.S.; Langley, O.K.; Vincendon, G. y Gombos, G. (1979). Double labelling immunohistochemical technique provides evidence of the specificity of glial cell markers. *J. Histochem. Cytochem.* **27**:1634-1637.

Goldstein, J.L.; Anderson, R.G.W. y Brown, M.S. (1979) Coated pits, coated vesicles and receptor-mediated endocytosis. *Nature* **279**: 679.

Gotow, T. y Hashimoto, P.H. (1989). Orthogonal arrays of particles in plasma membranes of Müller cells in the guinea pig retina. *Glia* **2**: 273-285.

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

Greferath, U., Grünert, U., Fritschy, J.M., Stephenson, A., Möhler, H. y Wässle, H. (1995). GABA-A receptor subunits have differential distributions in the rat retina: in situ hybridization and immunohistochemistry. *J. Comp. Neurol.*, **353**:553-571.

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.

Guillemot, F. y Cepki, C.L. (1992). Retinal fate and ganglion cell differentiation are potentiated by acidic FGF in an in vitro assay of early retinal development. *Development* **114**: 743-754.

Hagedorn, M. y Fernald, R.D. (1992) Retinal growth and cell addition during embryogenesis in the teleost, *Haplochromis burtoni*. *J. Comp. Neurol.* **321**: 193- 208.

Hall, L. W.; Hildebrand, J.G. y Kravitz, A.E. (1971) Chemistry of Synaptic Transmission: Essay and sources. Chiron Press, Portland, Oreg.

Hall, Z.W. (1992). An Introduction to Molecular Neurobiology. Sinauer, Sunderland MA.

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.

Hamassaki-Britto, D.E.; Hermans-Borgmeyer, I.; Heinemann, S. y Hughes, T.E. (1993). Expression of glutamate receptor genes in the mammalian retina: the localization of GluR1 though GluR7 mRNAs. *J. Neurosci.* **13**:1888-1898

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.

Hamberger, A.; Cotman, C.W.; Sellström, A. y Weiler, C.T. (1978). In *Dynamic Properties of Glial Cells*. (Eds. Schoffeneils, E.; Frank, G.; Hertz, L. y Tower, D.B.), pp. 173-172. Pergamon Press, Oxford.

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

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

Hansson, E. (1986a). Co-cultivation of astroglial enriched cultures from striatum and neuronal containing cultures from substratia nigra. *Life Sci.* **39**:269-277.

Hansson, E. (1986 b). Primary cultures from defined brain areas. III. Effects of seeding time on [3H]L-glutamate transport and glutamine synthetase activity. *Dev. Brain Res.* **24**:203-209.

Harman, A.M. y Beazley, L.D. (1987). Patterns of cytogenesis in the retina of

the wallaby, *Setonix brachyurus*. *Anat. Embryol.* **177**: 123-130.

Harman, A.M. y Beazley, L.D. (1989). Generation of retinal cells in the wallaby, *setonix brachyurus*. *Neurosci.* **28**: 219-232.

Harman, A.M. y Ferguson, J. (1994) Morphology and birth dates of horizontal cells in the retina of a marsupial. *J. Comp. Neurol.* **340**: 392- 404.

Harman, A.M.; Sanderson, K.J. y Beazley, L.D. (1992). Biphasic retinal neurogenesis in the brush-tailed possum, *Trichosurus vulpecula*: further evidence for the mechanisms involved in formation of ganglion cell density gradients. *J. Comp. Neurol.* **325**: 595-606.

Harris, W.A. y Messersmith, S.L. (1992). Two cellular inductions involved in photoreceptor determination in the *Xenopus* retina. *Neuron* **9**:357-372.

Hatten, M.E. (1985). Neuronal regulation of astroglial morphology and proliferation in vitro. *J. Cell. Biol.* **100**:384-396.

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.

Helliot, W.H. (1951). *Biochem. J.* **49**: 106.

Henshel, D.S. y Miller, R.F. (1992). Catecholamine effects on dissociated tiger salamander Müller (glial) cells. *Brain Res.* **575**:208-214.

Hernández-Sánchez, C.; Frade, J.M. y de la Rosa, E.J. (1994). Heterogeneity among neuroepithelial cells in the chick retina revealed by immunostaining with monoclonal antibody PM1. *Eur. J. Neurosci.* **6**:105-114.

Hertz, L. (1981). Functional interactions between astrocytes and neurons. *Glial and Neuronal Cell Biology*. E. Acosta Vidrio and S. Fedoroff, eds. Alan, R. Liss, New York, pp.45-58.

Hertz, L.; Peng, L.; Westergaard, N.; Yudkoff, M. y Schousboe, A. (1992). Neuronal-astrocyte interactions in metabolism of transmitter amino acids of the glutamate family. In *Drugs Research Related to Neuroactive Amino Acids*.

(Eds. Schousboe, A.; Diemer, N.H. y Kofod, H.), pp. 30-48. Munksgaard, Copenhagen.

Hertz, L. y Schousboe, A. (1980). Interactions between neurons and astrocytes in the turnover of GABA and glutamate. *Brain Res. Bull.*, **5** (Suppl.2):389-395.

Hidkey, W.F. y Kimura, H. (1988). Perivascular microglial cells of the CNS are bone marrow-derived and present antigen *in vivo*. *Science* **239**:290-292.

Hinds, J.W. y Hinds, P.L. (1974). Early ganglion cell differentiation in the mouse retina: an electron microscopic analysis utilizing serial sections. *Dev. Biol.* **37**: 381-416.

Hinds, J.W. and Ruffet, T.L. (1971). Cell proliferation in the neural tube: an electron microscopic and Golgi analysis in the mouse cerebral vesicle. *Z. Zellforsch.* **115**:226-264.

Hokoc, J. N.; Ventura, A.L.M.; Galindo, P.F. y De Mello, F. G. (1990). Developmental immunoreactivity for GABA and GAD in the avian retina: possible alternative pathway for GABA synthesis. *Brain Research.* **532**: 197-202.

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.

Hollmann, M. y Heinemann, S. (1994). Cloned glutamate receptors. *Annu Rev. Neurosci.* **17**:31-108.

Holt, C.E.; Bertsch, T.W.; Ellis, H.M. y Harris, W.A. (1988). Cellular determination in the *Xenopus* retina is independent of lineage and birth date. *Neuron.* **1**:15-26.

Hudges, W.F. y LaVelle, A. (1974) On the synaptogenic sequence in the chick retina. *Anat. Rec.* **179**: 297-302.

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.

Hunter, D.D.; Murphy, M.D.; Olsson, C.V. y Brunken, W.J. (1992). Slaminin expression in adult and developing retinæ: a potential cue for photoreceptor morphogenesis. *Neuron* **8**: 399-413.

Huntley G.W.; Rogers, S.W.; Moran, T.; Janssen, W.; Archin, N.; Vickers, J.C.; Cauley, K.; Heinemann, S.F. y Morrison, J.H. (1993). Selective distribution of kainate receptor subunit immunoreactivity in monkey neocortex revealed by a monoclonal antibody that recognizes glutamate receptor subunits GluR5/6/7. *Neurosci.* **13**:2965-2981.

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

Hyde, J.C. y Robinson, N. (1974). Localization of sites of GABA catabolism in the rat retina. *Nature (London)* **248**:432-433.

Ikeda, T. y Puro, D.G. (1994). Nerve growth factor: a mitogenic signal for retinal Müller glial cells. *Brain Res.* **649**:260-264.

Ikeda, A.; Yoshii, I. y Nishima (1980) An immunohistochemical study of the Müller cells of the chicken retina. *Arch. Histol. Jap.* **43**: 175- 183.

Ikonomidou, C.; Price, M.T.; Mosinger, J.L.; Friedrich, G.; Labruyere, J.; Salles, K.S. y Olney, J.W. (1989). Hypobaric-ischemic conditions produce glutamate-like cytopathology in infant rat brain. *J. Neurosci.* **9**:1693-1700.

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.

Ishikawa, A.; Shiono, T.; Ishiguro, S. y Tamai, M. (1996). Postnatal developmental expression of glutamine and related amino acids in the rat retinas. *Curr. Eye Res.* **2**:662-668.

- Jiang, B. Bezhadian, M.A. y Caldwell, R.B. (1995). Astrocytes modulate retinal vasculogenesis: Effects on endothelial cell differentiation. *Glia* **15**:1-10.
- Jones, P.S. y 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.
- Jorgensen, M.B. y Diemer, N.H. (1982). Selective neurons loss after cerebral ischemia in the rat: possible role of transmitter glutamate. *Acta Neurol. Scand.* **66**:536-546.
- Juurlink, B.H.J. (1987). Effects of medium glutamine, glutamate and ammonia on glutamine synthetase activity in cultured mouse astroglial cells. *Neurochem. Res.* **12**:1053-1058.
- Juurlink, B.H.J.; Schousboe, A.; Jorgensen, O.S., y Hertz, L. (1981). Induction by hydrocortisone of glutamine synthetase in mouse primary astrocyte cultures. *J. Neurochem.* **36**:136-142.
- 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.
- Kalloniatis, M. y Fletcher, E.L. (1993). Immunocytochemical localization of the amino acid neurotransmitters in the chick retina. *J. Comp. Neurol.* **336**:174-193.
- Kalloniatis, M.; Tomisich, G. y Marc, R.E. (1994). Neurochemical signatures revealed by glutamine labeling in the chicken retina. *Vis. Neurosci.* **11**:793-804.
- Kanasaki, T. y Kadota, K. (1969) The vesicles in a basket. *J. Cell. Biol.* **42**: 202-220.
- Kaneko, T. y Mizuno, N. (1992). Mosaic distribution of phosphate -activated glutaminase-like immunoreactivity in the rat striatum. *Neuroscience.* **49**:329-

345.

Kanno, C.; Ishiguro, S.; Shiono, T.; Kikuchi, M. y Tamai, M. (1991). Decrease of opsin content in developing rat photoreceptor cells by systemic administration of L-glutamate. *Cell Struct. Funct.* **16**:399-403.

Karschin, A.; Wässle, H. y Scnitzer, J. (1986). Immunocytochemical studies on astroglia of the cat retina under normal and pathological conditions. *J. Comp. Neurol.* **249**:564-576.

Karwoski, C.J.; Lu, H.K. y Newman, E.A. (1989). Spatial buffering of light-evoked potassium increases by retinal (glial) cells. *Science* **244**:578-580.

Keirstead, S.A. y Miller, R.F. (1995). Calcium waves in dissociated retinal glial (Müller) cells are evoked by release of calcium from intracellular stores. *Glia* **14**:14-22.

Kelley, M.V.V.; Turner, J.K. y Reh, T.A. (1994). Retinoic acid promotes differentiation of photoreceptors *in vitro*. *Development* **120**:2091-2092.

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.

Koh, S.W.M.; Kyritsis, A. y Chader, G.J. (1984). Interaction of neuropeptides and cultured glial (Müller) cells of the chick retina: Elevation of intracellular cyclic AMP by vasoactive intestinal peptide and glucagon. *J. Neurochem.* **43**:199-203.

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

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

Kuwabara, T. y Weidman, T. A. (1974) Development of the prenatal rat retina. *Invest. Ophthalmol.* **13**: 725- 739.

Ladman, A.J. y Soper, E.H. (1962) Preliminary observations on the fine structure of Müller's cells of the avian retina. In S.S. Breese (ed): Proceedings

of the Fifth International Congress of Electron Microscopy, Philadelphia. Vol. 2. New York: Academic Press, pp. R-6.

Lake, N.; Marshall, J. y Voaden, M.J. (1978). High affinity uptake sites for taurine in the retina. *Exp. Eye Res.* **27**:713-718.

Landis, D.M.D. y Reese, T.S. (1974). Arrays of particles in freeze-fractured astrocytic membranes. *J. Cell Biol.* **60**:316-320.

La Vail, M.; Rapaport, D.H. y Rakic, P. (1991). Cytogenesis in the monkey retina. *J. Comp. Neurol.* **309**: 86- 114.

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

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

Lemmon, V. (1985). Monoclonal antibodies specific for glia in the chick nervous system. *Dev. Brain Res.* **23**:111-120.

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

Lemmon, V. y Rieser, G. (1983). The developmental distribution of vimentin in the chick retina. *Dev. Brain Res.* **11**:191-197.

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

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

Liepe, B.A.; Stone, C.; Koistinaho, J. y Copenhagen, D.R. (1994). Nitric oxide synthase in Müller cells and neurons of salamander and fish retina. *J. Neurosci.* **14**:7641-7654.

Lillien, L. y Cepko, C. (1992). Control of proliferation in the retina: temporal changes in responsiveness to FGF and TGF α . *Development* **115**:253-266.

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

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

Linser, P. y Moscona, A.A. (1981a). Carbonic anhydrase C in the neural retina: Transition from generalized to glia-specific cell localization during embryonic development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 78:7190-7194.

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

Linser, P., 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.

López-Colomé, A.M.; Ortega, A. y Romo-de-Vivar, M. (1993). Excitatory amino acid-induced phosphoinositide hydrolysis in Müller glia. *Glia* 9: 127-135.

Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L. y Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265.

Lucas, D.R. y Newhouse, J.P. (1957). The toxic effect of sodium L-glutamate on the inner layer of the retina. *Arch. Ophthalmol.* 58:193-201.

Mackinnon, S.E.; Hudson, A.R.; Gentili, F.; Kline, D.G. y Hunter, R.T. (1982). Peripheral nerve injection injury with steroid agents. *Plast. Reconstr. Surg.* **69**:482-489.

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.

Malchow, P.M.; Qian, H. y Ripps, H. (1989). Gamma-aminobutyric acid (GABA)-induced currents of skate Müller (glial) cells mediated by neuronal-like GABA-A receptors. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **86**:4326-4330.

Mantych, G.J.; Hageman, G.S. y Devaskar, S.U. (1993). Characterization of glucose transporter isoforms in the adult and developing human eye. *Endocrinology* **133**: 600-607.

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

Mariani, A.P., Cosenza-Murphy, D. y Barker, J.L. (1987). GABAergic synapses and benzodiazepine receptors are not identically distributed in the primate retina. *Brain Res.* **415**:153-157.

Martin, D. (1890). Zur entwicklung der retina bei der katze. *Anat. Anzeiger*, Bd-V Cited by Ramón y Cajal, S. (1955) *Histologie du systeme nerveux de l'homme et des certébrés*. Madrid: Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Instituto Ramón y Cajal, 352.

Martin, L.J.; Blackstone, C.D.; Haganir, R.L. y Price, D. (1992). Cellular localization of a metabotropic glutamate receptor in rat brain. *Neuron.* **9**:259-270.

Martinez-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 vertebrates retina. *Prog. Retinal Res.* **9**: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 A. Schousboe, eds. Alan R. Liss, New York, pp. 3-17.

McLoon, S.C. y Barnes, R.B. (1989). Early diferrentiation of retinal ganglion cells: An axonal protein expressed by premigratory an migrating retinal ganglion cells. *J. Neurosci.* **9**: 1424-1432.

Mearow, K.M.; Mill, J.F., y Freese, E. (1990). Neuron-gial 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.

Meister, A. (1974). Glutamine synthetase of mammals. In P. Boyer (Ed.), *The enzymes, 3rd. End.. Academic Press, New York.* pp. 699-754.

Meller, K. (1964). Elektronmikroskopische befunde zur differenzierung der rezeptorzellen und bipolarzellen der retina und ihrer synaptischen verлиндungen. *Zeit. Zellforsch. Mikrosk. Anat.*, **64**: 733-750.

Meller, K. (1968). Histo-und Zytogenese der sich entwckelnden retina. Eine elektronenmikroskopische. Studie. *Veroff. Morph. Phat.* **77**, 1-77.

Meller, K. y Gless, P. (1965). The diferentiation 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.



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

Miller, R.F. y Slaughter, M. (1985) Excitatory amino acid 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.

Monaghan, D.T.; Bridges, R.J. y Cotman, C.W. (1989). The excitatory amino acid receptors: their classes, pharmacology, and distinct properties in the function of the central nervous system. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **29**: 365-402.

Moore, C.L. y Gruberg, E.R. (1974). The distribution of succinic semialdehyde dehydrogenase in the brain and retina of the tiger salamander (*Ambystoma tigrinum*). *Brain Res.* **67**:467-478.

Morest, D.K. (1970). The pattern of neurogenesis in the retina of the rat. *Z. Anat. Entwickl.-Gesch.* **131**:45-67.

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.; 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. Shahar (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 hidrocortisone of premature changes in the developmental pattern of glutamine synthetase in embrionic retina. *Biochem. Biophys. Acta*. **121**:409-411.

Müller, H. (1862) Ueber das auges des chamaleons mit verglerschenden bemerkungen. *Wurzb. Naturw. Zeitschr.* **3**: 10- 14.

Müller, H. (1951) Zur histologie der Netzhaut. *Z. Wiss. Zool.* **3**: 234- 237.

Müller, F.; Greferath, U.; Wässle, H.; Wisden, W. y Seeburg, P. (1992). Glutamate receptor expression in the rat retina. *Neurosci. Lett.* **138**:179-182.

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

Nagata, I.; Keilhauer, G. y Schachner, M; (1986). Neuronal influences on antigenic marker profile, cel shape and proliferation of cultured astrocytes obtanined by microdissection of distinct layers from the early postnatal mouse cerebellum. *Dev. Brain Res.* **24**:217-232.

Nakanishi, S. (1994). Metabotropic glutamate receptors: synaptic transmission, modulation and plasticity. *Neuron*. **13**:1031-1037.

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

Negishi, K.; Teranishi, T. y Kato, S. (1982). New dopaminergic and indoleamine-accumulating cells in the growth zone of goldfish retinas after neurotoxic destruction. *Science*. **216**:747-749.

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

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

Newman, E.A. (1985b). Voltage dependent calcium and potasium channels in retinal glial cells, *Nature* **317**:809-811.

- Newman, E.A. (1987). Distribution of potassium conductance in mammalian Müller (glial) cells: a comparative study. *J. Neurosci.* **7**: 2423-2432.
- Newman, E.A. (1991). Sodium-bicarbonate cotransport in retinal müller (glial) cells of the salamander. *J. Neurosci.* **11**:3972-2983.
- Newman, E.A. (1993). Inward-rectifying potassium channels in retinal glial (Müller) cells, *J. Neurosci.* **13**:3333-3345.
- Newman, E.A. (1994). A physiological measure of carbonic anhydrase in Müller cells. *Glia* **11**:291-299.
- 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 Martinez-Hernandez, A. (1979). Fine structural localization of glutamine synthetase in astrocytes of rat brain. *Brain. Res.* **161**:303-310.
- 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.

Olney, J.W.; Ho, O.L. y Rhee, V. (1971). Cytotoxic effects of acidic and sulphur containing amino acids on the infant mouse central nervous system. *Exp. Brain Res.* **14**:61-76.

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

Parck, C.M. y Hollenberg, M.J. (1989). Basic fibroblast growth factor induces retinal regeneration in vivo. *Dev. Biol.* **134**:201-205.

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.

Patel, A.J.; Hunt, A. Y Thaurdin, C.S.M. (1983). Regional development of glutamine synthetase activity in the rat brain and its association with the differentiation of astrocytes. *Dev. Brain Res.* **8**: 31- 37.

Patel, A.J.; Weir, M.D.; Hunt, A.; Thaurdin, C.S.M., y Thomas, D.G.T. (1985). Distribution of glutamine synthetase and glial fibrillary acidic protein and correlation of glutamine synthetase with glutamate decarboxylase in different regions of the rat central nervous system. *Brain Res.* **331**:1-9.

Pedersen, O.O. y Karlsen, R.L. (1979). Destruction of Müller cells in the adult rat by intravitreal injection of D,L- α -aminoadipic acid. An electron microscopic study. *Exp. Eye Res.* **28**:569-575.

Peng, Y.W.; Blackstone, C.D.; Haganir, R.L. y Yau, K.W. (1995). Distribution of glutamate receptor subtypes in the vertebrate retina. *Neuroscience*. **Vol.66**, N°2, pp,483-497.

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.

Pin, J.P. y Duvoisin, R. (1995). Neurotransmitter receptors I. The metabotropic glutamate receptors: structure and functions. *Neuropharmacology.* **34**:1-26.

Pittack, C.; Jones, M. y Reh, T.A. (1991). Basic fibroblast growth factor induces retinal pigment epithelium to generate neural retina *in vitro*. *Development* **113**:577-588.

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

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.; Puelles, L. y Génis-Galvez, J.M. (1981). A golgi study on the early sequence of differentiation of ganglion cells in the chick embryo retina. *Anat. and Embryol.* **161**:305-317.

Prada, C.; Puelles, L.; Génis-Gálvez, J.M. y Ramirez, G. (1987) Two modes of free migration of amacrine cell neuroblast in the chick retina, *Anat. Embryol.* **175**: 281- 287.

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, C. y Ramirez, G. (1983). A golgi study of the cell cycle and early neuron and glia differentiation in the chick retina. *Ramon y Cajal's contribution*

to the Neuroscience. Elsevier Science Publis, B.V.

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.; 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. (1989). Regional adaptation of Müller cells in the chick retina. A Golgi and electron microscopical study. *Histol. and Histopath.* **4**:309-315.

Puro, D.G. (1991). Stretch-activated channels in human retinal Müller cells. *Glia* **4**:456-460.

Quesada, A. Y Génis-Gálvez, J.M. (1981). Morphological study of the bipolar cells in the retina of the chamaleon (Chamaleo chamaleo). *Mor. Nor. Patol.* **5**: 55-68.

Quesada, A.; Prada, F.A.; Armengol, J.A. y Géni-Gálvez, J.M. (1981) Early morphological differentiation of the bipolar neurons in the chick retina. A Golgi analysis. *Zbl. Vet. Med. C Anat. Histol. Embryol.* **10**: 328- 341.

Quesada, A. Y Génis-Gálvez, J.M. (1986). New morphological aspects of the bipolar cell in the bipolar cell in the chick embryo. The accessory prolongations. *Anat. Histol. Embryol.* **15**: 155-163.

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.

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

- Ramón y Cajal, S. (1911). *Histologie du Système Nerveux de L'homme et des vertébrés*. Vol. II. *Maloine*. Paris. **2**: 80-106.
- Rasmussen, K.E. (1972). A morphometric study of the Müller cell cytoplasm in the rat retina. *J. Ultrastruct. Res.* **44**:96-112.
- Rasmussen, K.E. (1974). The Müller cell: A comparative study of rod and cone retinas with and without retinal vessel. *Exp. Eye Res.* **20**:151-166.
- Rasmussen, K.E. (1975). A morphometric study of the Müller cell in rod and cone retinas with and without retinal vessels. *Exp. Eye Res.* **20**:151-166.
- Raviola, G. (1977). The structural basis of the blood-ocular barriers. *Exp. Eye Res.* **25**:27-63.
- Reale, E.; Luciano, L. y Spitznas, M. (1978). Communicating junctions of the human sensory retina. *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* **192**:73-87.
- Reh, T.A. (1987). Cell-specific regulation of neuronal production in the larval frog retina. *J. Neurosci.* **7**:3317-3324.
- Reh, T.A. (1992). Cellular interactions determine neural phenotypes in rodent retinal cultures. *J. Neurobiol.* **23**: 1.067- 1.083.
- Reh, T.A. y Tully, T. (1986). Regulation of tyrosine hydroxylase-containing amacrine cell number in the larval frog retina. *Dev. Biol.* **114**:463-469.
- Reichenbach, A. (1987). Quantitative and qualitative morphology of rabbit retinal glia. A light microscopical study on cells both in situ and isolated by papaine. *J. Hirnforsch.* **28**:213-220.
97: 816- 822.
- Reichenbach, A.; Baar, U.; Petter, H.; Schaff, P.; Osborne, N.N. y Buse, E. (1992). Neuronal ectopia in tiger retina. *J. Hirnforsch.* **33**:585-593.
- Reichenbach, A.; Dettmer, D.; Brückner, G.; Neumann, N. y Birkenmeyer, G. (1985). Morphological variability, lectin binding and Na⁺, K⁺-activated adenosine triphosphatase activity of isolated Müller (glial) cells from the rabbit retina. *Neurosci. Lett.* **55**:29-34.
- Reichenbach, A. y Eberhardt, (1986). Intracellular recordings from isolated



reabbit retinal Müller (glial) cells. *Pflügers Arch.* **407**: 348- 353.

Reichenbach, A. y El Belghiti, H. (1983). Untersuchungen zur Topographie der Wachtelnetzhaus. *Z. Mikrosk. Anat. Forsch.*

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

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

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

Reichenbach, A. y Reichelt, W. (1986). Postnatal development of radial glial (Müller) cells of the rabbit retina. *Neurosci. Lett.* **7**:125-130.

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

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

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

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

Reichenbach, A.; Schnitzer, J.; Friedrich, A.; Knothe, A-K. y Henke, A. (1991). Development of the rabbit retina . II. Müller cells. *J. Comp. Neurol.* **311**:33-44

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

Reichenbach, A.; Wolburg, H.; Richter, W. y Eberhardt, W. (1990). Membrane ultrastructure preservation and membrane potentials after isolation of rabbit retinal glial (Müller) cells by papain. *J. Neurosci. Methods.* **32**:227-233.

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.

Richardson, K.C.; Jarett, L. y E.H. Finke, E.H. (1960). Embedding in epoxy resins for ultrathin sectioning in electron microscopy. *Stain Technol.* **35**: 313-323.

Richter, W.; Reichenbach, A. y Reichelt, W. (1990). Orthogonal arrays of intramembranous particles in the Müller cell and astrocyte endfoot membrane of rabbit retina. Postnatal development and adulthood. *J. Neurocytol.* **19**:127-139.

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

Riepe, R.E. y Norenberg, M.D. (1978) Glutamine synthetase in the developing

- rat retina. An immunohistochemical study. *Exp. Eye Res.* **27**: 435- 444.
- 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.
- 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. y Dreher, Z. (1990). Müller cells in adult rabbit retinae: Morphology, distribution and implications for function and development. *J. Comp. Neurol.* **292**:178-192.
- Robinson, S.R.; Hampson, E.C.G.M.; Munro, M.N. y Vaney, D.I. (1993). Unidirectional coupling of gap junctions between neuroglia. *Science*, **262**:1072-1074.
- Rodieck, R.W. (1973). The vertebrate retina. Principles of structure and function. *Ed. W.H. Freeman and Company.* San Francisco.
- Rogers, S.W.; Hughes, T.M.; Hollmann, M.; Gasic, G.P.; Deneris, E.S. y Heinemann, S. (1991). The characterization and localization of the glutamate receptor subunit GluR1 in the rat brain. *J. Neurosci.* **11**:2713-2724.
- Romanoff, A. L. (1966). The organs of special sense: the retina, in *The avian Embryo, Structural and Functional Development.* 389- 396. Macmillan, New York.
- Roots, B.I. (1981). Comparative studies on glial markers. *J. Exp. Biol.* **95**: 67-1180.
- Ross, C.D.; Bowers, M. y Godfrey, D.A. (1987). Distribution of glutaminase activity in retinal layers of rat and guinea pig. *Brain Res.* **401**:168-172.
- Rothman, S.M. (1984). Synaptic release of excitatory amino acid neurotransmitter mediates anoxic neuronal death. *Dev. Brain Res.* **63**:1-12.

Rungger-Brändle, E.; Messerli, J.M.; Niemeyer, G. y Eppenberger, J.M. (1993). Confocal microscopy and computer assisted image reconstruction of astrocytes in the mammalian retina. *Eur. J. Neurosci.* **5**:1093-1106.

Saari, J.C.; Bunt-Milam, A.-H.; Bredberg, D.L. y Garwin, G.G. (1984). Properties and immunocytochemical localization of three retinoid-binding proteins from bovine retina. *Vision Res.* **24**:1595-1603.

Samochocki M.y Strosznajder, J. (1994). Age-related changes of GABA-activated chloride channel properties in brain cortex synaptic plasma membrane: evidence for phospholipase involvement. *Neurochemistry.* **63**:1422-1528.

Sapolsky, R.M. (1985). Glucocorticoid toxicity in the hippocampus: Temporal aspects of neuronal vulnerability. *Brain Res.* **359**:300-305.

Sapolsky, R.M. (1994). The physiological relevance of glucocorticoid endangerment of the hippocampus. *Ann NY Acad Sci.* **746**:294-307.

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

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

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

Sauer, F.C. (1935). Mitosis in the neural tube. *J. Comp. Neurol.* **62**:377-405.

Sauer, F.C. y Walker, B.E. (1959). Radioautographic studies of interkinetic nuclear migration in the neural tube. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **101**:557-560.

Scholes, J. (1976) Neuronal connections and cellular arrangement in the fish retina. In: *Neural Principles vision* (F. Zettler and R. Weiler, eds)pp 63- 93. Springer, New York.

Schlosshauer, B.; Grauer, D.; Dotting, D. y Vanselow, J. (1991). Expression of a novel Müller glia specific antigen during development and after optic nerve lesion. *Development* **111**:789-799.

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

Schnitzer, J.; Franke, W.W. y Schachner, M. (1981). Immunocytochemical demonstration of vimentin in astrocytes and ependymal cells of the developing and adult mouse nervous system. *J. Cell Biol.* **90**:435-447.

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

Schulze, E. y Neuhoff, V. (1983). Uptake, autoradiography and release of taurine and homotaurine from retinal tissue. *Int. J. Neurosci.* **18**:253-268.

Schwartz, E.A. (1993). L-glutamate conditionally modulates the K⁺ current of Müller glial cells. *Neuron* **10**:1141-1149.

Seeburg, P.H. (1993). The molecular biology of mammalian glutamate receptor channel. *Trends Neurosci.* **16**:359-365.

Seiler, N. Y Al-Therib, M.J. (1974). Putrescine catabolism in mammalian brain, *Biochem. J.* **144**: 29- 35.

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

Shank, R.P. y Aprison, M.H. (1981). Present status and significances of the glutamine cycle in neural tissues. *Life Sci.* **28**:837-842.

Sharma, S.C. y Ungar, F. (1980) Histogenesis of the goldfish retina. *J. Comp. Neurol.* **191**: 373- 382.

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.

Shen, S.C.; Greenfield, P. Y Boell, E. (1956). Localization of acetylcholinesterase in chick retina during histogeneses. *Comp. Neur.* **106**: 433-463.

Sherry, D.M. y Ulshafer, R.J. (1992). Neurotransmitter-specific identification

and characterization of neurons in the all-cone retina of *Anolis carolinensis*. II. Glutamate and aspartate. *Vis. Neurosci.* **9**: 313- 323.

Shigemoto, R.; Nakanishi, S. y Mizuno, N. (1992). Distribution of the mRNA for a metabotropic glutamate receptor (mGluR1) in the central nervous system: an in situ hybridization study in adult and developing rat. *J. Comp. Neurol.* **322**:121-135.

Sidman, R.L. (1961). Histogenesis of mouse retina studied with thymidine- H³. *The Structure of the Eye*. (G.K. Smelser, ed.). pp.487-506. Academic Press. New York.

Sidman, R.L.; Miale, I.L. y Feder, N. (1959). Cell proliferation and migration in the primitive endymal zone: an autoradiographic study of histogenesis in the nervous system. *Exp. Neur.* **1**:322-333.

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

Skatchkov, S.N.; Vyklický, L. y Orkand, R.K. (1995). Potassium currents in endfeet of isolated Müller cells from the frog retina. *Glia* **15**:54-65.

Sladeczek, F., Pin, J.P., Recasens, M., Bockaert, J. y Weiss, S. (1985). Glutamate stimulates inositol phosphate formation in striatal neurones. *Nature.* **317**:717-719.

Slaughter, M.M. (1995). GABA_B receptors in the Vertebrate Retina. *Progress in Retinal and Eye Research*. Elsevier Science Ltd. (Eds.), Great Britain, **Vol.14 (1)**:293-312.

Small, R.K.; Patel, P. y Watkins, B.A. (1991). Response of Müller cells to growth factors alters with time in culture. *Glia* **4**:469-483.

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

Smelser, G.K.; Ishikawa, T. Y Pei, Y.F. (1965) Electron microscopic studies of intra-retinal spaces: Diffusion of particulate materials. In J.W. Rohen and F.K. Schattauer (eds): *The Structure of the Eye. II Symposium*. Stuttgart

Verlag: 109.

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

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.

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.

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

Stensaas, L.C. (1967). The development of hippocampal and dorsolateral pallial regions of the cerebral hemisphere in fetal rabbits. *J. Comp. Neurol.* **129**: 159.

Stirling, C.E. y Sarthy, P.V. (1985). Localization of the Na-K pump in turtle retina. *J. Neurocytol.* **14**:33-47.

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

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

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.

Sugiyama, H., Ito I, Hirono, C. (1987). A new type of glutamate receptor linked to inositol phospholipid metabolism. *Nature*. **325**: 531-533.

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.

Thangnipon, W.; Kingsbury, A.; Webb, M. y Balazs, R. (1983). Observation on rat cerebellar cells in vitro: influence of substratum, potassium concentration and relationship between neurons and astrocytes. *Dev. Brain Res.* **11**:177-189.

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.

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

Trachtenberg, M.C. y Packey, D.J. (1983). Rapid isolation of mammalian Müller cells. *Brain Res.* **261**:43-52.

Triviño, A.; Ramírez, J.M.; Ramírez, A.I.; Salazar, J.J. y García-Sánchez, J. (1992). Retinal perivascular astroglia: an immunoperoxidase study. *Vision Res.* **32**:1601-1607.

- 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.
- Turner, D.L.; Snyder, E.Y. y Cepko, C.L. (1990). Lineage-independent determination of cell type in the embryonic mouse retina. *Neuron* **4**:833-845.
- Uchihori, Y. y Puro, D.G. (1993). Glutamate as a neuron-to-glial signal for mitogenesis: role of glial N-methyl-D-aspartate receptors. *Brain Res.* **613**:212-220.
- Uga, S. y Smmelser, G.K. (1973a). Comparative study of the fine structure of retinal Müller cells in various vertebrates. *Invest. Ophthalmol.* **12**:295-307.
- Uga, S. y Smelser, G.K. (1973b). Electron microscopic study of the development of retinal Müllerian cells. *Invest. Ophthalmol.* **12**:295-307.
- Van den Berg, C.J. (1970) in 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 cell axons in the retina of the marine teleost, the dragonet. *Vision Res.* **31**: 451- 462.
- Van Harreveld, A. (1982). Swelling of the Müller fibers in the chicken retina. *J. Neurobiol.* **13**:519-536.
- Vardi, N., Masarchia, P. y Sterling, P. (1992). Immunoreactivity to GABA-A receptor in the outer plexiform layer of the cat retina. *J. Comp. Neurol.* **320**:394-397.
- 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.
- 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.

Vernadakis, A.; Davies, D.; Sakellaridis, N. y Mangorua, D. (1986). Growth patterns of glial cells dissociated from newborn and aged mouse brain with cell passage. *J. Neurosci. Res.* **15**: 79- 85.

Vigh, B.; Vigh-Teichmann, I.; Debreceni, K. y Takács, J. (1995). Similar fine structural localization of immunoreactive glutamate in the frog pineal complex and retina. *Arch. Histol. Cytol.*, **58**, (1): 37- 44.

Voaden, M.J.; Lake, N.; Marshall, J. y Morjaria, B. (1978). The utilization of glutamine by the retina: an autoradiographic and metabolic study. *J. Neurochem.* **31**:1069-1076.

Von Euler, U.S. (1956). Noradrenaline. Thomas, Springfield, III.

Walls, G.L. (1942). The vertebrate eye and its adaptative radiation. *Michigan. Cranbrook Press.*

Warringa, R.A.J.; van Berlo, M.F.; Klein, W., y Lópes-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.; Mio, Y.; Hoshino, F.B.; Nagaatsu, S.; Hirosawa, K. y Nakahara, K. (1994). GLUT2 expression in the rat retina: localization at the apical ends of Müller cells. *Brain Res.* **655**:128-134.

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

Watanabe, T. Y Raff, M.C. (1992). Rod photoreceptor development in vitro: intrinsic properties of proliferatin neuroepithelial cells change as development proceeds in the rat retina. *Neuron* **2**:461-467.

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.

Wernicke, J.F. y Volpe, J.J. (1986). Glial differentiation in dissociated cell cultures of neonatal rat brain: Non-coordinate and density-dependent regulation of oligodendroglial enzymes. *J. Neurosci. Res.* **15**: 79-85.

Wetts, R. y Fraser, S.E. (1988). Multipotent precursors can give rise to all major cell types of the frog retina. *Science* **239**:1142-1145.

Wetts, R.; Serbedzija, G.N. y Fraser, S.E. (1989). Cell lineage analysis reveals multipotent precursors in the ciliary margin of the frog retina. *Dev. Biol.* **136**:254-263.

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.

Williams, P.L. y Warwick, R. (1975). Functional Neuroanatomy of man. *Churchill Livingstone*, Edinburgh, London and New York.

Wolburg, H. y Berg, K. (1988). Distribution of orthogonal arrays of particles in the Müller cell membrane of the mouse retina. *Glia* **1**:246-252.

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

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

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., Studholme, K.M. Vitorica, J. y DeBlas, A.L. (1989). Immunocytochemical localization of GABA-A receptors in goldfish and chicken retinas. *J. Comp. Neurol.* **280**:15-26.

Zimmerman, R.P.; Polley, E.H. y Forthey, R.L. (1988). Cell birthdays and rate of differentiation of ganglion and horizontal cells of the developing cat's retina. *J. Comp. Neurol.* **274**: 77- 90.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Leído el Tesis de D. Auxiliadora González Gallego firmantes
en el día de la fecha, 25 de abril de 1997 el Excmo. Rector de
D. M.º Auxiliadora González Gallego
sobre Expresión de la actividad glutámina
sintetasa durante el desarrollo de
la retina del pollo
concedió el título de Apto "Cum Laude"

25

abril

97

[Signature]
El Rector

[Signature]
El Secretario

[Signature]
El Doctorado

[Signature]

Pablo Jalón

[Signature]

