

Curso 2005/06
CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS/4
I.S.B.N.: 84-7756-684-4

RAQUEL VIÑOLY ABREU

**Inmunohistoquímica de las células GS
y lectina positivas durante la ontogenia
del sistema visual de *Gallotia galloti***

Directoras

**CARMEN MAGDA YANES MÉNDEZ
MAXIMINA MONZÓN MAYOR**



SOPORTES AUDIOVISUALES E INFORMÁTICOS
Serie Tesis Doctorales

A MIS FAMILIAS

Lo que sabemos es una gota de agua lo que ignoramos es el océano.

Isaac Newton.

Una gota horada la piedra no por su fuerza sino por su constancia.

Ovidio.

AGRADECIMIENTOS:

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a mis directoras de tesis, la Dra. Carmen Magda Yanes Mendez y la Dra. Maximina Monzón-Mayor por haber aceptado dirigir esta tesis Doctoral, pero sobre todo por su comprensión y sus palabras de ánimo.

He de agradecer a todos los componentes del Departamento de Biología Celular su ayuda y colaboración, especialmente a Antonia, Maritina, Miriam, Anita, Eduardo y Manane. Su ayuda, durante todo el proceso de elaboración y en la revisión del texto fue clave. También quiero agradecer a Mary Mar y a Juanfra por su ayuda en la parte experimental.

En especial quiero dar las gracias de todo corazón a Marita y a Elena, por su gran ayuda, apoyo incondicional, por sus palabras de aliento, y como no por los buenos momentos compartidos en el departamento, cuando las horas nos parecían interminables.

A mis amigos, por su comprensión, por aguantar mis charlas sobre *G.galloti* (¡aunque no entendieran nada!), porque han estado ahí cuando más los necesitaba, por todo esto y por la fiestorra que nos vamos a dar; gracias a Carmen, Joaquín, Isa, Laura y también como no a “Papa Oso” y a “Mama Osa”.

Por último y no por ello menos importante, he de darle las gracias a mi familia. A mis padres y mis hermanos: Yaqui, Richard, Carlos y Edu, a mis otros hermanos (los piojitos pegados) Ricardo, Emma, Jesús y Katy, a mis sobrinos: Ana, Alejandro Ricardo, (prometo ir a verlos más a menudo ahora), Caleibi y en especial a Dany y a “mi” María (gracias por quedarte). Por supuesto a mi segunda familia, a Ani y a Fernando por esas comiditas tan ricas, por la atención y cariño que siempre me han demostrado y especialmente, a Auxi por estar pendiente de mí, cuidarme y apoyarme incondicionalmente además de soportar mis “No Puedorrrrrr” “estoy agobiá” día tras día.

Espero que no se me haya quedado nadie en el tintero, si es así perdonen. De todo corazón gracias a todos.

INDICE

INTRODUCCIÓN

1. ESTUDIO TOPOGRAFICO DEL DESARROLLO DE LA RETINA, NERVIO ÓPTICO Y CONUS PAPILLARIS.....	2
1. 1. DESARROLLO Y ESTRUCTURA DE LA RETINA	2
1. 2. DESARROLLO Y ESTRUCTURA DEL NERVIO ÓPTICO.....	5
1.3. DESARROLLO Y ESTRUCTURA DEL CONUS PAPILLARIS	6
2. CÉLULAS MACROGLIALES EN SNC	7
2.1. CÉLULAS MACROGLIALES DE LA RETINA	9
2.1.1. CÉLULAS DE MÜLLER	10
2.1.2. ASTROCITOS	11
2.1.3. OLIGODENDROCITOS	11
2.2. CÉLULAS GLIALES DEL CONUS PAPILLARIS	12
2.3. CÉLULAS GLIALES DEL NERVIO ÓPTICO	12
2.3.1. CABEZA DEL NERVIO ÓPTICO (CNO).....	12
2.3.2. ZONA EXTRAOCULAR DEL NERVIO	14
2.4. QUIASMA Y TRACTO ÓPTICO	15
3. MICROGLÍA.....	15
4. INMUNOHISTOQUÍMICA: PROTEÍNA GLUTAMINA SINTETASA (GS) .	19
5. INMUNOHISTOQUÍMICA: PROTEÍNA PCNA/CICLINA	20
6. INMUNOHISTOQUÍMICA: PROTEÍNA GLIOFIBRILAR ÁCIDA (GFAP). 	21
7. HISTOQUÍMICA CON LA LECTINA DE TOMATE (Lycopersicon esculentum)	22
8. JUSTIFICACIÓN	23
9. OBJETIVOS	24

MATERIAL Y MÉTODOS

1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN:	27
2. PROCESAMIENTO DE EMBRIONES, EJEMPLARES POSTNATALES Y ADULTOS.	27
2.1. FIJACIÓN.....	27
2.2 INCLUSIÓN	28
2.2.1. TÉCNICAS INMUNOHISTOQUÍMICAS E HISTOQUÍMICAS	28
2.2.2. TÉCNICAS DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA.....	28
2.3. OBTENCIÓN DE SECCIONES Y MONTAJE	29
3. TINCIONES HISTOQUÍMICAS.....	29
3.1. KLÜVER BARRERA.....	29
3.2. LECTINA DE TOMATE (<i>Lycopersicon esculentum</i>)	30
4. TINCIONES INMUNOHISTOQUÍMICAS.	31
4.1. INMUNOTINCIÓN CON ANTI-GLUTAMINA SINTETASA	31
4.2. DOBLE INMUNOTINCIÓN: ANTI-GS/ANTI-GFAP.....	32
4.3. DOBLE INMUNOTINCIÓN: ANTI-PCNA/LECTINA DE TOMATE	34
5. CONTROLES DE LOS MARCAJES ANTI-GS, ANTI-PCNA, ANTI-GFAP ..	35
6. ESTUDIO DE LAS SECCIONES: MICROSCOPIA ÓPTICA Y ELECTRÓNICA.....	35

RESULTADOS

1. LA VÍA ÓPTICA ANTERIOR. RETINA Y NERVIO ÓPTICO EN <i>G. galloti</i> .	37
2. ESTUDIO TOPOGRÁFICO CON LA TÉCNICA DE KLÜVER BARRERA.	40
2.1. RETINA	40
2.2 NERVIO ÓPTICO.....	41
2.3. CONUS PAPPILLARIS	42

3. INMUNOHISTOQUÍMICA DE LAS CÉLULAS GLUTAMINA SINTETASA	54
3.1. PARED VENTRICULAR HIPÓTALÁMICA	54
3.2. TRACTO ÓPTICO	54
3.3. QUIASMA ÓPTICO	54
3.4. NERVIO ÓPTICO.....	55
3.5. CONUS PAPILLARIS	55
3.6. RETINA	56
4. INMUNOHISTOQUÍMICA DE DOBLES MARCAJES GS/GFAP	67
5. CÉLULAS LECTINA POSITIVAS (<i>Lycopersicon esculentum</i>) EN LA VÍA ÓPTICA	81
5.1. CONUS PAPILLARIS	81
5.2. RETINA	81
5.3. NERVIO ÓPTICO	82
5.4. QUIASMA ÓPTICO	83
5.5. TRACTO ÓPTICO	83
5.6. PARED VENTRICULAR HIPOTALÁMICA	83
6. ULTRAESTRUCTURA DE LAS CÉLULAS MICROGLIALES.....	101
7. DOBLE INMUNOHISTOQUÍMICA CON PCNA/LECTINA.....	104
7.1. NERVIO ÓPTICO.....	104
7.2. RETINA	105
7.3. CONUS PAPILLARIS	105
 <u>DISCUSIÓN</u>	
1. TOPOGRAFÍA	109
1.1. CONUS PAPILLARIS	109

1.1.1. INTERRELACIÓN ENTRE LAS CÉLULAS PIGMENTARIAS Y LA VASCULARIZACIÓN	109
1.1.2. RELACIÓN ENTRE EL PATRÓN DE FORMACIÓN DEL CONUS PAPILLARIS Y EL DESARROLLO DE LA RETINA	110
1.1.3. ORIGEN DE LAS CÉLULAS PIGMENTADAS.	111
1.2. RETINA	111
1.3. NERVIO ÓPTICO	113
2. PATRÓN DE EXPRESIÓN DE LA GLUTAMINA SINTETASA DURANTE LA ONTOGENIA DE LA VÍA ÓPTICA	115
.....	115
2.1. CONUS PAPILLARIS	115
2.2. RETINA	116
2.3. NERVIO ÓPTICO.....	117
2.3.1. FUNCIÓN DE LA GLUTAMINA SINTETASA EN EL NERVIO ÓPTICO	119
3. HETEROGENEIDAD MORFOLÓGICA Y FUNCIONAL DE LAS SUBPOBLACIONES GLIALES.....	120
3.1. RETINA	120
3.2. NERVIO ÓPTICO.....	122
4.MICROGLÍA.....	126
4.1. CONUS PAPILLARIS	126
4.2. RETINA	126
4.2.1. FENOTIPOS MICROGLIALES DURANTE LA ONTOGENIA	126
4.2.2. VÍAS DE ENTRADA DE LA MICROGLÍA EN LA RETINA..	128
4.2.3. RELACIÓN ENTRE LAS CÉLULAS PICNÓTICAS Y LA MICROGLÍA DE LA RETINA.	129

4.3. NERVIO ÓPTICO.....	130
4.3.1. MORFOLOGÍA MICROGLIAL DURANTE LA ONTOGENIA	130
4.3.2. VÍAS DE ENTRADA DE LA MICROGLÍA EN EL NERVIO ÓPTICO.	130
4.3.3. ULTRAESTRUCTURA DE LAS CÉLULAS MICROGLIALES EN EL NERVIO ÓPTICO.	132
4.3.4. SIGNIFICADO FUNCIONAL DE LA MICROGLÍA DURANTE LA ONTOGENIA.	132
4.4. EXPRESIÓN FUNCIONAL DE LA LECTINA DE TOMATE EN LA POBLACIÓN MICROGLIAL.....	133
4.5. CÉLULAS PCNA/LECTINA POSITIVAS.....	133
4.5.1. CONUS PAPILLARIS.....	133
4.5.2. RETINA.	134
4.5.3. NERVIO ÓPTICO.	134
<u>CONCLUSIONES</u>.....	136
<u>ABREVIATURAS</u>	139
<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	141

INTRODUCCIÓN

1. ESTUDIO TOPOGRÁFICO DEL DESARROLLO DE LA RETINA, NERVIÓ ÓPTICO Y CONUS PAPILLARIS EN VERTEBRADOS

1.1. DESARROLLO Y ESTRUCTURA DE LA RETINA

Los ojos de los vertebrados se desarrollan a partir de evaginaciones laterales del prosencéfalo, que forman las vesículas ópticas, las cuales permanecen unidas al mismo mediante el pedúnculo o tallo óptico. Las vesículas contactan con el ectodermo superficial e inducen la formación del cristalino. Asimismo, dichas vesículas se invaginan y forman las copas ópticas o vesículas secundarias, formadas por las capas externa e interna, y están separadas por el espacio retiniano que conecta por el pedúnculo con el tercer ventrículo. Estas capas se diferencian, de manera que, la más externa, se reduce y dará lugar a la futura capa pigmentaria, y la más interna prolifera y se diferencia en la retina neural (Gilbert., 2000).

En la mayoría de los vertebrados, la secuencia de formación de las células de la retina, se realiza durante la primera fase de la neurogénesis según el siguiente orden: células ganglionares, conos, amacrinas y horizontales; y en la última fase: bastones, bipolares y células de Müller (Wetts & Fraser., 1988; Holt et al., 1988; Prada et al., 1991; Hu & Easter., 1999). Sin embargo, existen algunos autores que afirman que las células de Müller aparecen temprano en el desarrollo (Willbold & Layer., 1998; Peterson et al., 2001).

A medida que se generan los diferentes tipos celulares, van migrando y formando las distintas capas retinales: nuclear externa (CNE), interna (CNI) y de células ganglionares (CG). La determinación y diferenciación de los tipos celulares es un proceso complejo y depende de factores difusibles e interacciones celulares (Harris., 1997). Por otro lado, las capas plexiformes se forman por crecimiento de neuritas y ramificaciones dendríticas de las células de las distintas capas retinales (Mey & Thanos., 2000). Así, los procesos de las células amacrinas y bipolares dan lugar a la capa plexiforme interna (CPI), y los de las células horizontales, bipolares y fotorreceptores forman la capa plexiforme externa (CPE). Asimismo, las primeras

sinapsis se observan en la capa plexiforme interna y luego en la capa plexiforme externa (Hughes & LaVelle., 1974; Hering & Kröger., 1996).

Con técnicas autorradiográficas se aprecian distintos gradientes durante la neurogénesis en la retina. Así, se observan cuatro gradientes de formación en la retina de vertebrados: central-periférico en mamíferos (La Vail et al., 1991; Reese et al., 1996; Rapaport et al., 2004), en aves (Prada et al., 1991), en peces (Negishi & Wagner., 1995) y anfibios (Holt et al., 1988), dorso-ventral en aves (Prada et al., 1991) y anfibios (Holt et al., 1988), nasal-temporal en teleósteos (Kwan et al., 1996; Julian et al., 1998) y temporal-nasal solo en aves (Prada et al., 1991).

En relación al crecimiento de la retina en los distintos vertebrados se observa que, en **peces y anfibios**, la retina crece durante toda la vida, la parte central se genera durante la embriogénesis, y el resto se produce en periodos larvarios posteriores o en animales sexualmente maduros. La mayor parte de las células retinales se forman por adición de células nuevas producidas en la zona marginal ciliar (ZMC), situada en la periferia de la retina. En anfibios, esta zona contiene células madre que generan todos los tipos de neuronas, que se añaden en anillos concéntricos a las regiones periféricas de la retina (Reh & Fischer., 2001). En peces, se generan todas las neuronas excepto los bastones que proceden de células progenitoras situadas en la CNI (Hagedorn & Fernald., 1992; Kwan et al. , 1996; Julian et al., 1998; Ottenson et al., 2001; Ottenson & Hitchcock., 2003).

En relación a la regeneración retinal en peces y anfibios, se observa un incremento en la actividad proliferativa de las células de la ZMC (Raymond & Hitchcock., 2000). Además, en peces, los precursores de los bastones distribuidos por la retina madura, forman todos los tipos neuronales cuando ésta se lesiona, reconstruyéndola como ocurre durante el desarrollo (Raymond., 1991; Raymond & Hitchcock., 1997, 2000; Ottenson & Hitchcock., 2003). En anfibios, la retina se regenera a partir de células del epitelio pigmentario, las cuales se transdiferencian en células madres (Reh & Levine., 1998).

En **reptiles**, los trabajos sobre la ZMC durante el desarrollo sólo se han realizado en *Gallotia galloti*, observándose que la retina crece según dos mecanismos. Desde el E-32

al estadio de eclosión, se añaden distintos tipos celulares desde la zona marginal a la central, creciendo la retina por dicho margen. Y desde postnatales a ejemplares adultos la retina crecerá por alargamiento asociado al crecimiento de la órbita, ya que no se observan células proliferativas (Casañas., 2005). En adultos sanos, o después de transecciones completas del nervio óptico, la ZMC no prolifera (Lang et al., 2002). Sin embargo, lesiones realizadas directamente en la retina muestran escasa proliferación en dicha zona, pero la CNE es altamente PCNA-positiva (Romero et al., resultados no publicados).

En aves, la mayoría de las células de la retina se generan en los 10 primeros días del desarrollo (Prada et al., 1991). En pollos, también existe la ZMC similar a la de peces y anfibios, que añade células nuevas al menos durante tres semanas después de la eclosión. Sin embargo, estas células no generan todo tipo de neuronas como ocurre en anfibios y peces, solo amacrinas y bipolares (Fischer & Reh., 2000, 2001). Así mismo, el crecimiento postnatal en el ojo se debe a un alargamiento de la retina por crecimiento de la órbita, aumentando el espacio celular (Teakle et al., 1993), pero no a nuevas células procedentes del margen periférico, como ocurre en peces y anfibios.

Por otro lado, cuando se lesiona la retina de aves con inyección intraocular de N-metil-D-aspartato, las células de Müller reinician el ciclo celular, expresan factores de transcripción de progenitores y dan lugar a neuronas retinales y células de Müller (Fischer & Reh., 2001, 2003b).

Adyacente a la ZMC se encuentra el cuerpo ciliar (CC), formado por dos capas: pigmentada o cuerpo ciliar pigmentado, que se continúa con el epitelio pigmentario de la retina, y no pigmentada que se continúa con la retina neural. El cuerpo ciliar se subdivide en dos zonas: la *pars plana*, contigua a la zona marginal de la retina y la *pars plicata*, entre la *pars plana* y el cristalino. En postnatales de peces, anfibios y aves se han observado en la *pars plana*, células que expresan genes comunes a las células progenitoras de la retina (Fischer & Reh., 2003a). En el lagarto *G. Galloti* se ha observado que, la mayor parte de la proliferación celular, en estadios avanzados del desarrollo, permanece en la zona marginal de la retina y en la *pars plana* del cuerpo ciliar (Casañas., 2005).

En **mamíferos**, el crecimiento postnatal del ojo se debe a un alargamiento de la retina asociada al crecimiento de la órbita, (Teakle et al., 1993), no a la adición de nuevas células desde el margen periférico a la región central, como sucede en peces y anfibios. Las células pigmentadas del CC generan *in vitro* distintos tipos de células retinales, incluyendo neuronas y células de Müller (Tropepe et al., 2000) en respuesta a factores de crecimiento (Ahmad et al., 2000).

1.2. DESARROLLO Y ESTRUCTURA DEL NERVIÓ ÓPTICO EN VERTEBRADOS.

El nervio óptico (NO) de vertebrados, en general, está formado por los axones de las células ganglionares, células gliales y vasos sanguíneos. En estadios iniciales del desarrollo, el tallo óptico presenta características neuroepiteliales y se producen cambios estructurales como son: la llegada de fibras ópticas, la muerte celular, la proliferación y la diferenciación glial.

Al respecto, en pollos, se observa proliferación celular en la superficie de la pared ventral del tallo óptico, hecho que coincide con la penetración de las primeras fibras ópticas. Estas células proliferativas dan lugar a glioblastos que se dividen radialmente y penetran a zonas más internas del tallo. La muerte celular en la pared ventral del tallo óptico y los espacios celulares creados por ella, producen una pérdida de consistencia en el tejido, hecho que favorece la invasión de fibras ópticas y la adición de nuevos glioblastos (Navascués et al., 1985).

El nervio óptico de vertebrados se ha dividido en varias regiones. En mamíferos, concretamente en humanos, se divide en 4 regiones: intraocular, intraorbital, intracanalular e intracraneal. La cabeza del nervio óptico (CNO) está compuesta por la región intraocular y parte anterior de la región intraorbital (Hayreh., 1974; Jonas & Naumann., 1993). A su vez, la CNO se divide en las siguientes capas: superficial de fibras del nervio, prelaminar, laminar y retrolaminar (Hogan et al.,1971). En aves, se distinguen una parte intraocular y el nervio óptico propiamente dicho, la parte intraocular (CNO) se subdivide en: parte retinal, coroidal, esclerótica y periférica (Fujita

et al., 2001). En reptiles, el NO se divide en dos regiones: intraocular y extraocular en *Mauremys caspica* (Dávila et al., 1987) y zona intraocular o CNO, zona medial (ZMN) y zona caudal del nervio (ZCN) en *G. galloti* (Casañas., 2005). En teleósteos se describen cuatro segmentos: intraocular, intraorbital, quiasma óptico y tracto óptico (Easter et al., 1981; Lara et al., 1998), dividiéndose la intraocular en disco óptico y CNO (Lillo et al., 1998; 2002).

1. 3. DESARROLLO Y ESTRUCTURA DEL CONUS PAPILLARIS

La vía óptica presenta una estructura vascular denominada pecten oculi en aves (Yew., 1978; Braekevelt., 1994; Braekevelt & Richardson., 1996; Gerhardt et al., 1996, 1999; Liebner et al., 1997; Wolburg., 1999; Schuck et al., 2000) y conus papillaris en reptiles (Nguyen-H-Anh., 1974; Dieterich & Dieterich., 1975; Dieterich et al., 1976; Jasinski., 1977; Nguyen-Legros., 1978; Braekevelt., 1989, Casañas., 2005), las cuáles se consideran homólogas y se proyectan hacia el humor vítreo desde la cabeza del nervio óptico (Jasinski., 1977; Braekevelt., 1989; Braekevelt & Richardson., 1996).

El **pecten oculi** está formado principalmente por dos tipos de células: pigmentadas y endoteliales. Las células pigmentadas son de origen neuroectodermal y se definen como células gliales (Yew., 1978; Uehara et al., 1990; Liebner et al., 1997; Wolburg et al., 1999; Gerhardt et al., 1999). La formación del pecten oculi en aves, comienza en el E-6, donde las células pigmentadas del epitelio pigmentario migran y proliferan formando el primordio del pecten. En el E-7, los vasos derivados del perineuro invaden la zona basal del primordio, en el E-11 comienza la pigmentación y en el E-16 concluye, adquiriendo la estructura de adultos, aunque la vascularización acabará en postnatales (Liebner et al., 1997; Wolburg et al., 1999).

El pecten oculi presenta numerosas funciones como son: la nutrición de la retina (Pettigrew et al., 1990), la regulación del pH intraocular (Kauth & Sommer., 1953; Brach., 1975), la regulación de la presión ocular (Seaman & Store., 1963), la estabilización y detoxificación del amonio del vítreo (Tucker., 1975; Gerhardt et al., 1999) y la formación de la barrera hematoencefálica (Liebner et al., 1997; Wolburg et al., 1999).

El **conus papillaris** presenta diferente morfología en reptiles, dependiendo de la especie, siendo cónico en la familia Lacertidae (Nguyen-H-Anh., 1974; Dieterich & Dieterich., 1975; Dieterich et al., 1976; Casañas., 2005). Está formado principalmente por células endoteliales y pigmentadas o melanocitos (Braekevelt & Richardson., 1996; Braekevelt., 1989, Casañas., 2005).

Estudios ultraestructurales recientes en *G. galloti* confirman la existencia de dos tipos principales de células en el conus papillaris: gliales pigmentadas y endoteliales. Estas presentan uniones estrechas y están rodeadas por las células gliales pigmentadas, lo que sugiere la existencia de una barrera hematoencefálica (Alfayate et al., 2005). Además, se trata de una estructura inervada en algunos lacértidos (Nguyen-Legros., 1978; Braekevelt., 1989), a diferencia del pecten oculi en aves, dicha inervación podría estar relacionada con la actividad vasomotora (Nguyen-Legros., 1978).

2. CÉLULAS MACROGLIALES EN EL SNC

En el SNC se distinguen principalmente dos tipos de células macrogliales, los astrocitos y los oligodendrocitos. Se ha demostrado que las subpoblaciones gliales son heterogéneas y que cada célula expresa un conjunto de moléculas, resultado de su determinación celular y del microambiente (Anderson et al., 1999; Gensert et al., 2001).

Los **astrocitos** se clasifican en: protoplásmicos, localizados preferentemente en la sustancia gris, con pies terminales en contacto con vasos sanguíneos y sinapsis, y fibrosos, localizados en la sustancia blanca y contactando con nódulos de Ranvier y vasos sanguíneos. Los astrocitos expresan glutamina sintetasa (GS) (Norenberg & Martínez-Hernández., 1979; Didier et al., 1986; Patel., 1986; Tholey et al., 1987; Mearow et al., 1989; Khelil et al., 1990; Monzón-Mayor et al., 1990e, 1998; Derouiche & Frostscher., 1991; Domercq et al., 1999; Hernández et al., 1999; Suárez & Suárez., 2000; Suárez et al., 2002; Muscoli et al., 2005; Struzynska et al., 2005) y la proteína gliofibrilar ácida (GFAP) (Monzón-Mayor et al., 1990a, 1998; Yanes et al., 1990; Korzhevskii et al., 2004; Alunni et al., 2005).

En relación a las funciones de los astrocitos, intervienen en la regulación del medio extracelular (Robert et al., 2000), la formación de vasos retinales, inducción de la barrera hematoencefálica (Janzer & Raff., 1987), y en la formación y eficacia de las conexiones sinápticas (Ullian et al., 2001). Además, se cree que participan en el proceso de mielinización al interactuar con los oligodendrocitos, e incluso pueden transformarse en éstos (Müller., 1992). También constituyen una guía para el crecimiento de los axones (Reier & Webster., 1974), y participan activamente ante lesiones y procesos patológicos, formando la cicatriz glial (Reier & Webster., 1983). Asimismo, intervienen en la detoxificación del amonio y producción de glutamina para neoformación de los neurotransmisores como el glutamato y GABA (Weil- Malherbe., 1962).

En relación a su origen, los astrocitos proceden de células progenitoras multipotenciales de la zona ventricular (Levinson & Goldman., 1993; Zerlin et al., 1993) y subventricular (Álvarez-Buylla et al., 2000; Levinson et al., 2003; Marschall et al., 2003), o de la glía radial (Goldman., 1996, Merkle et al., 2004). Por otro lado, los astrocitos pueden actuar como células madre multipotenciales dando lugar a neuronas y glía (Steindler et al., 2003; Götz et al., 2005).

Los **oligodendrocitos** en el SNC de rata se han clasificado según su densidad electrónica como claros, medios y oscuros (Mori & Leblond., 1970), hecho también descrito en telencéfalo y mesencéfalo de *G. galloti* (Monzón-Mayor et al., 1990c; Yanes et al., 1998). Esta densidad electrónica se relaciona con el tamaño, diferenciación y la función de los mismos, siendo los más claros grandes y más inmaduros que los más oscuros pequeños y maduros (Blakemore., 1982; Monzón-Mayor et al., 1990c).

Los oligodendrocitos se originan del neuroepitelio del tubo neural a lo largo del eje rostro-caudal (Ono et al., 1997; Spassky et al., 1998). La proliferación temprana de precursores tiene lugar en la zona ventricular (ZV) (Levinson & Goldman., 1993) y subventricular (ZSV) (Álvarez-Buylla et al., 2000; Levinson et al., 2003; Marschall et al., 2003), sin embargo, la mayor parte de la proliferación se observa en la futura sustancia blanca (Miller et al., 1996). También parecen generarse de la glía radial (Goldman., 1996, Merkle et al., 2004).

Los oligodendrocitos son responsables de la mielinización de los axones, imprescindible para la conducción del impulso nervioso (Bunge., 1968). Contienen anhidrasa carbónica II, enzima que cataliza la hidratación del CO₂ hacia ácido carbónico eliminando el CO₂ del tejido (Ghandour et al., 1980; Kumpulainen et al., 1983; Cammer et al., 1985), además de glutamina sintetasa (Warringa et al., 1988; Cammer., 1990; D'Amelio et al., 1990; Fressinaud et al., 1991; Tansey et al., 1991; Miyake & Kitamura., 1992; Monzón-Mayor et al., 1998; Domerq et al., 1999; Jennings et al., 2002; Romero-Alemán et al., 2003.)

Existen subpoblaciones de oligodendrocitos S-100-positivos en mamíferos (Dyck et al., 1993; Rickmann & Wolf., 1995), en aves (Linser., 1985; Linser & Perkins., 1987) y en reptiles (Romero-Alemán et al., 2003; Casañas., 2005) y en teleósteos (Velasco et al., 1997). Estos oligodendrocitos, al secretar dicha proteína al medio, podrían intervenir en la proliferación y diferenciación de células gliales (Selinfreund et al., 1991), y en el crecimiento de neuritas (Winningham-Major et al., 1989), ya que es un potente extensor neurítico (Marshak et al., 1999). Por otro lado, los oligodendrocitos tras lesiones en el SNC expresan moléculas inhibitoras del crecimiento axonal como el IN-1 (Lang et al., 1998; Schwab., 1993), Nogo-A (Buss et al., 2004; Schwab., 2004) y Tenascina-R (TN-R) (Pesheva & Probstmeier., 2000; Monzón-Mayor et al., 2005).

2.1. CÉLULAS MACROGLIALES DE LA RETINA

En la retina de vertebrados se observan distintos tipos de células macrogliales: células de Müller, astrocitos y oligodendrocitos. Las células de Müller son ubiquestas en la retina de vertebrados (Ramón y Cajal., 1892), los astrocitos sólo se encuentran en retinas vascularizadas (Stone & Dreher., 1987; Schnitzer., 1988), y los oligodendrocitos solo han sido observados en la retina del conejo (Schnitzer., 1985; Hollander et al., 1995; Morcos & Chan-Ling., 1997), en aves (Nakazawa et al., 1993; Ono et al., 1998; Seo et al., 2001) y en el reptil *G. Galloti* (Santos., 2004).

2.1.1. CÉLULAS DE MÜLLER

Se consideran células de glía radial (Bignami & Dahl., 1979; Reichenbach & Reichelt., 1986; Willbold et al., 1997; Willbold & Layer., 1998), cuyos núcleos se localizan en la capa nuclear interna y los procesos se dirigen a las capas plexiformes y nucleares, rodeando somas, procesos neuronales y sinapsis respectivamente, además de extenderse por la capa de fibras del nervio (Reichenbach & Robinson., 1995).

Las células de Müller realizan funciones semejantes a los astrocitos, oligodendrocitos y células ependimales en otras áreas del SNC (Holländer et al., 1991; Newman & Reichenbach., 1996). Y como principales funciones se consideran: el control del microambiente neuronal, regulando los niveles extracelulares de potasio y CO₂, así como la recaptación de neurotransmisores como el glutamato y el GABA (Bringmann et al., 2000). Presentan el tripéptido glutatona en forma reducida, importante en la protección contra los radicales libres en el SNC (Bringmann et al., 2000). También expresan CRALBP “cellular retinal binding protein”, por lo que podrían estar envueltas en el ciclo visual de síntesis y renovación de pigmentos visuales (Bringmann et al., 2000). Y finalmente, constituyen el principal almacén de glucógeno en la retina expresando la enzima glucógeno fosforilasa (Bringmann et al., 2000).

En las retinas avasculares como es el caso de aves, la energía metabólica de las células de Müller está basada en la glicólisis, cuyo producto final es el lactato/piruvato, que es descargado en grandes cantidades, y recaptado por los fotorreceptores que lo utilizan como combustible en su metabolismo oxidativo (Poitry-Yamate et al., 1995; Bringmann et al., 2000). Metabolizan el amonio y el glutamato (producto del metabolismo del GABA) a través de la enzima GS (Bringmann et al., 2000; Poitry et al., 2000). Se cree que junto a los oligodendrocitos de la capa de fibras del nervio mielinizan los axones de las células ganglionares en aves (Won et al., 2000). Además participan en la regeneración de la retina en aves, dando lugar a todos los tipos neuronales de la misma (Fischer & Reh., 2001). En retinas amielínicas de mamíferos, aíslan y protegen a las células ganglionares (Holländer et al., 1991).

2.1.2. ASTROCITOS

Se observan en retinas vascularizadas, fundamentalmente en mamíferos (Stone & Dreher., 1987; Schnitzer., 1988), y migran a la retina desde el nervio óptico (Small et al., 1987; Stone & Dreher., 1987; Watanabe & Raff., 1988; Ling & Stone., 1988; Ling et al., 1989; Chan-Ling & Stone., 1991). Inducen la formación de vasos en la retina y mantienen su integridad (Janzer & Raff., 1987; Zhang & Stone., 1997).

Los astrocitos retinales expresan GFAP en retinas adultas parcialmente vascularizadas, como en conejo (Schnitzer., 1987; Vaughan et al., 1990; Haddad et al., 2001) y completamente vascularizadas, como en ratón (Sarthy et al., 1991; Sarthy & Egal., 1995), rata (Lam et al., 1995; Matsuda et al., 1997), gato (Lewis et al., 1988), musaraña (Knabe & Kuhn., 2000), cerdo (Ruíz-Ederra et al., 2003), mono (Distler et al., 2000; Provis., 2001) y humanos (Karim et al., 1996; Ramírez et al., 2001; Wang et al., 2002; Ruíz-Ederra et al., 2003). Estos astrocitos se localizan principalmente en la capa de fibras del nervio (CFN) y en la capa ganglionar (CG) (Karim et al., 1996).

2.1.3. OLIGODENDROCITOS

Están ausentes en la retina de la mayoría de mamíferos a excepción del conejo, donde solo existen en una región central mielinizada llamada “medullary rays” o “myelinated streak” de estructura similar al nervio óptico y próxima a la CNO, (Schnitzer., 1985; Hollander et al., 1995; Morcos & Chan-Ling., 1997). Sin embargo, en aves los oligodendrocitos están presentes en la CG y CFN cercanos a la CNO (Nakazawa et al., 1993; Ono et al., 1998; Won et al., 2000; Seo., 2001) y en el reptil *G. Galloti* en la CFN (Santos., 2004).

Los oligodendrocitos expresan el antígeno O8 y galactocerebrósido en conejo (Schnitzer., 1985) y la proteína TfBP (Transferrin Binding Protein) en aves (Cho et al., 1999). En *G. galloti* se han observado ultraestructuralmente oligodendrocitos inmaduros en la CFN (Santos et al., 2005, en prensa). En relación a sus funciones, los oligodendrocitos podrían ser mielinizantes en la CFN y presentar un papel de soporte metabólico en la CG (Seo et al., 2001).

Respecto al origen, los precursores de los oligodendrocitos, se observan en la zona ventricular de la base del hipotálamo desde donde migran hacia la copa óptica a través del quiasma y nervio óptico (Small et al., 1987). Una vez diferenciados, expresan la proteína básica de la mielina (MBP) y la proteolipídica (PLP), específicas de oligodendrocitos maduros (Campagnoni & Macklin., 1988).

2.2. CÉLULAS GLIALES DEL CONUS PAPILLARIS

En el pecten oculi de aves se ha descrito un tipo específico de glía denominada glía pecteneal (Gerhardt et al., 1999; Schuck et al., 2000), con numerosos gránulos de pigmento y asociada a los vasos sanguíneos. Inmunohistoquímicamente, es GS-positiva y Vimentina-positiva, hechos que revelan características comunes con la glía de Müller y con las células del epitelio pigmentario (Gerhardt et al., 1999), a partir de las que se originan (Yew., 1978; Uehara et al., 1990; Liebner et al., 1997). En *G. galloti* se han detectado células gliales pigmentadas que expresan Vimentina y S-100 en E-35 y E-36, aunque en adultos son GFAP/S-100/ GS/Vim⁺ (Casañas., 2005), sin embargo se han observado células gliales en el adulto ultraestructuralmente (Alfayate et al., 2005).

2.3. CÉLULAS GLIALES DEL NERVIO ÓPTICO

2.3.1. Cabeza del nervio óptico (CNO)

La CNO o zona intraocular, es una zona de transición entre la retina y el nervio óptico extraocular, donde se observa un elevado número de células gliales cuya tipología presenta variaciones en los distintos vertebrados.

En mamíferos, concretamente en humanos, la CNO presenta tres regiones: prelaminar, laminar y retrolaminar, con distribución y tipología astrocitaria diferente, lo que sugiere distinta especialización y gran heterogeneidad (Ramírez et al., 1998; Salazar et al., 1998; Triviño et al., 1996; Ye et al., 1995). Entre las fibras del nervio óptico y el resto de los tejidos, se observan bandas de células gliales que forman las membranas limitantes. Estas, en la CNO de mamíferos se denominan: membrana limitante de Elsching, tejido intermediario de Kuhnt, tejido intermediario de Jacoby y manto periférico de Greef. Dichas membranas en mamíferos están constituidas por astrocitos (Ramírez et al., 1998) aunque en cerdos, el tejido intermediario de Kuhnt está formado

principalmente por células de Müller y probablemente astrocitos adosados (Hirata et al., 1991).

En pollos, la CNO se ha dividido en varias zonas: retinal, coroidal, esclerótica y periférica, atendiendo a las características de los astrocitos existentes (Fujita et al., 2001). Entre la zona periférica y coroidal, los astrocitos poseen abundantes microtúbulos y gliofilamentos, pero en la zona retinal no presentan microtúbulos. En cuanto a los oligodendrocitos son de tipo medio en la CNO, aunque en la capa de fibras del nervio son oscuros (Fujita et al., 2001.)

Por otro lado, en la CNO de pollo existe una glía especial denominada glía peripapilaris que forma una banda entre la retina, la CNO y el pecten, sin embargo, este tipo glial no se ha observado en mamíferos (Schuck et al., 2000; Quesada et al., 2004). La glía peripapilaris expresa antígenos de neuronas (3BA8), de oligodendrocitos (MOSP), de glía radial y astrocitos (3CB2) (Quesada et al., 2004). Sin embargo, no expresa GS o anhidrasa carbónica como ocurre en las células de Müller, lo cual parece indicar que se trata de un tipo especial de glía distinto a los descritos por el momento en el SNC (Quesada et al., 2004). Además, en teleósteos se observa que las células de Müller y de microglía se asocian en la zona de salida de las fibras del nervio óptico de la retina (Won et al., 2000; Lillo et al., 2002; Prada., 2003.)

En la CNO de reptiles, los estudios realizados han sido muy escasos. Concretamente, en la tortuga *Mauremys caspica*, las células están dispersas o forman columnas que bordean el parénquima nervioso. La astrogía forma la glía limitante que separa el nervio óptico del cuerpo vítreo, de la retina, de la coroides y de la esclerótica (Dávila et al., 1987). Estudios recientes en *G. galloti* demuestran la existencia de astrocitos en la zona donde se encuentra la glía peripapilaris de pollos, estableciéndose también la naturaleza astrocitaria de las membranas limitantes (Casañas., 2005), dicha glía expresa marcadores como la GFAP, Vimentina, y S-100 durante el desarrollo (Casañas., 2005). También, en la CNO se observan oligodendrocitos, axones mielinizados y no mielinizados (Dávila et al., 1987).

En teleósteos, y en la zona del disco óptico, las células de Müller presentan procesos vitreales muy delgados y están rodeados por astrocitos y microglía que, en conjunto, forman una barrera real entre la CNO y la retina (Lillo et al., 2002). Además, los procesos de Müller están formados por varias prolongaciones no observadas en el resto de la retina (Lillo et al., 2002). Entre la retina neural y la CNO de teleósteos, zona homóloga al tejido intermediario de Kunt de mamíferos, se han caracterizado glioblastos y procesos astrocitarios maduros (Lillo et al., 2002). En el resto de la CNO se observan oligodendrocitos dispuestos en hileras (Lillo et al., 2002).

La división entre la región intraocular y la extraocular del NO, está marcada en mamíferos y en aves por la lámina cribosa, formada por tejido conectivo con orificios para el paso de las fibras del nervio y rodeados por astrocitos. En reptiles parece no existir dicha esta estructura y, los astrocitos en su lugar, se disponen en finas columnas formando una laxa red a través de la cuál pasan los axones, de modo similar a la lámina cribosa de mamíferos (Dávila et al., 1987), hecho que también parece ocurrir en *G. galloti*, donde existe una gran cantidad de astrocitos GFAP-positivos (Casañas., 2005).

2. 3. 2. Zona extraocular del nervio

El nervio óptico de vertebrados está formado, en general, por los axones de las células ganglionares, células gliales y vasos sanguíneos. En relación a las células macrogliales, en mamíferos se observan oligodendrocitos, y astrocitos con dos linajes diferentes: tipo-1 y tipo-2. Los astrocitos tipo-1 son generados por las células APC (células precursoras de astrocitos), a su vez originadas de las células epiteliales del tallo óptico (Raff et al., 1989; Mi & Barres., 1999). Sin embargo, los oligodendrocitos y astrocitos tipo-2 se desarrollan a partir de un progenitor común bipotencial denominado O-2A que migra desde las zonas ventricular y subventricular del diencéfalo hacia el nervio óptico (Small et al., 1987; Raff., 1989).

En pollos existen oligodendrocitos de tipo medio y astrocitos fibrosos caracterizados por abundantes gliofilamentos y procesos (Fujita et al., 2001). En el reptil *G. galloti* se ha observado, en la zona más próxima a la CNO y dispuestos en hileras, astrocitos GFAP⁺/S-100⁺. Caudalmente se observan células dispersas GFAP⁺/S-100⁺, que podrían ser oligodendrocitos o precursores de astrocitos, ya que también se ha detectado la

proteína vimentina (Casañas., 2005). En teleósteos, se observan astrocitos maduros unidos por desmosomas entre los fascículos de los que emergen finas prolongaciones paralelas a los axones, y también oligodendrocitos maduros (Lara et al., 1998; Lillo et al., 1998).

2.4. QUIASMA Y TRACTO ÓPTICO

El quiasma óptico de mamíferos presenta una distribución menos homogénea y menor número de astrocitos, presentando más orgánulos y menor cantidad de filamentos, en relación al los astrocitos del nervio (Skoff et al., 1986). En *G. Galloti* se han observado subpoblaciones de oligodendrocitos S-100⁺/GFAP⁺/Vim⁻, y astrocitos S-100⁺/GFAP⁺ dispersos por toda la superficie del tracto (Casañas., 2005). En teleósteos, las células gliales del quiasma presentan aproximadamente las mismas características que el nervio en cuanto a morfología y distribución (Lara et al., 1998; Lillo et al., 1998). Así, las células gliales son similares a las descritas en regiones del nervio próximas al ojo, con una distribución condicionada a la diferente fasciculación de la zona, y, además los grupos celulares son más frecuentes en las zonas periféricas que en las centrales (Lara et al., 1998; Lillo et al., 1998).

3. MICROGLÍA

Las células de microglía fueron descritas por Río-Hortega (1919) y constituyen entre el 5 y 12 % del número total de células (Federoff., 1995), que se distribuyen de forma diferente en las distintas regiones del SNC. Al respecto, la densidad poblacional varía según la región y la morfología depende de la localización. Así, en la sustancia blanca, los procesos microgliales son paralelos a las fibras del nervio, y en la sustancia gris, se extienden en todas las direcciones (Lawson et al., 1990).

La microglía se ha estudiado con distintos métodos: carbonato de plata (Río-Hortega., 1932), histoenzimáticos (Castellano et al., 1991; Dalmau et al., 1998; Velasco et al., 1999; Plaza et al., 2002, 2004), autorradiográficos (Imamoto & Leblond., 1978), inmunohistoquímicos (Perry & Gordon., 1987; Ling et al., 1991; Cuadros et al., 1992, 1994, 1997; Provis et al., 1996; Marín-Teva et al., 1998, 1999 a,b,c; Navascués et al., 1994, 1995; Sánchez- López et al., 2004, 2005), ultraestructurales (Boya et al., 1987;

Sturrock., 1988; Kaur & Ling., 1991; Peters et al., 1991; Salvador-Silva., 2000), cultivos celulares (Banati et al., 2004; Cacci et al., 2005) y técnicas de hibridación *in situ* (Hirasawa et al., 2005; Lee et al., 2005).

También se han utilizado las lectinas como marcadores histoquímicos en mamíferos (Boya et al., 1991 a, b ; Acarín et al., 1994; Dalmau et al., 2003; Nagai et al., 2005; Park et al., 2005), en aves (Anderson et al., 1999, Shin et al., 2003), reptiles (Nacher et al., 1999; Plaza et al., 2002-2004), anfibios (Franceschini & Ciani., 1992; Naujoks-Manteuffel & Niemann., 1994), y en peces (Velasco et al., 1995; Jimeno et al., 1999).

En relación a la tipología microglial, y durante el desarrollo del SNC de vertebrados, se describen células que van desde ameboides a ramificadas pasando por las intermedias (Cuadros et al., 1994; Acarín et al., 1994; Díaz-Araya et al., 1995; Moujahid et al., 1996; Dalmau et al., 1997; Velasco et al., 1999; Orłowski et al., 2003; Plaza et al., 2002, 2004). Atendiendo a la morfología descrita en mamíferos, se han descrito durante la ontogenia de la corteza telencefálica y techo óptico en *G. galloti* cinco tipos de células microgliales: ameboide, pseudopódica, dendrítica, primitiva ramificada y ramificada (Plaza., 2002, 2004).

En el SNC el origen de la microglía presenta controversia. La mayoría de los autores consideran que la microglía tiene un origen mesodérmico, probablemente de tipo hematopoyético, integrándose en el parénquima nervioso por tres caminos: desde las meninges, los ventrículos, o a través de las paredes endoteliales (Perry & Gordon., 1991; Ling & Wong., 1993; Cuadros & Navascués., 1998; Wilms et al., 1999; Navascués et al., 2000; Kaur et al., 2001; Plaza et al., 2002, 2004). Sin embargo, otros autores sostienen la idea de que igual que la neuronas y la macroglía, se originan de células neuroepiteliales (Richardson et al., 1993; Wolswijk, 1995b; Federoff., 1995; Federoff et al., 1997). Posteriormente, las células microgliales una vez dentro del parénquima nervioso proliferan y migran (Navascués et al., 2000; Cuadros & Navascués., 2001).

En la retina de mamíferos, se sugiere que el origen y distribución de la microglía es vascular, a partir de monocitos circulantes (Boya et al., 1987; Díaz-Araya et al., 1995;

Provis et al., 1996). En conejo, donde los vasos sanguíneos están confinados a la región que rodea al disco óptico y el resto de la retina es completamente avascular, la microglía entra en la retina desde la circulación hialoide que se observa en el humor vítreo durante el desarrollo (Ashwell., 1989).

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

Por otro lado, el patrón de distribución de la microglía en la retina de adultos es común en muchas especies de vertebrados, observándose principalmente en las capas plexiformes (mamíferos: Kohno et al., 1982; Boya., 1987; Ashwell, 1989; Cheng et al., 2002; aves: Navascués et al., 1994; Jeon et al., 2004; peces: Dowding et al., 1991; Velasco et al., 1999; Salvador-Silva et al., 2000).

En relación al nervio óptico, la microglía se ha identificado a nivel ultraestructural en diferentes vertebrados (Vaughn & Peters., 1968; Peters et al., 1976; Stensaas., 1977; Sturrock., 1984; Lawson et al., 1994), inmunohistoquímicamente (Goodbrand & Gaze., 1991; Moujahid et al., 1996) e inmunocitoquímicamente (Battisti et al., 1995). Respecto a su origen, en el nervio óptico, existen escasos trabajos. Durante el desarrollo en humanos no parece presentar un origen monocítico, pues no se relacionan con los vasos sanguíneos (Sturrock., 1984). En aves, es de origen mesodérmico ya que los macrófagos pueden migrar al nervio desde la retina, la base del diencéfalo, las meninges, o los vasos sanguíneos (Mouhajid et al., 1996). Además, la muerte de células neuroepiteliales coincide cronológica y topográficamente con la invasión de macrófagos, los cuáles sufren cambios morfo-funcionales y se diferencian en células de microglía (Mouhajid et al., 1996).

Los estudios sobre microglía en la vía óptica de mamíferos son numerosos, sin embargo, en vertebrados no mamíferos son escasos, observándose los siguientes en aves (Cuadros et al., 1994; Moujahid et al., 1996; Marín-Teva et al., 1998, 1999 a, b, c ,

Navascués et al., 1994,1995;Won et al., 2000; Shin et al., 2003; Jeon et al., 2004; Sánchez- López et al., 2004, 2005), anfibios (Goodbrand & Gaze., 1991; Naujoks-Mantaufeld., 1994), y peces (Dowding et al., 1991; Velasco et al., 1995, 1999; Jimeno et al., 1999).

En relación a los reptiles, las células de microglía se estudian histoenzimáticamente y con lectinas durante la regeneración en la corteza telencefálica de *Podarcis hispánica* y *Podarcis muralis* (Castellano et al., 1991; López-García et al., 1994), y el córtex medial de *Podarcis hispánica* (López-García et al., 1994; Nacher et al., 1999). En nuestro grupo de trabajo en *G. galloti*, se realiza el estudio ontogénico en telencéfalo y mesencéfalo (Plaza et al., 2004) y durante la regeneración en la corteza telencefálica (Romero-Alemán et al., 2004). Sin embargo, en la vía óptica los primeros estudios sobre las células microgliales en *G. galloti* se realizan en este trabajo.

Clásicamente, en distintos vertebrados, se ha considerado que las células microgliales presentan una función local fagocítica (Innocenti et al., 1983; Cuadros & Navascués., 1998; Streit., 2002), sin embargo, en mamíferos, forman una red inmunocompetente en procesos inflamatorios o patológicos (Graeber et al., 1990). Participan en la neurotransmisión, regulación y establecimiento de las sinapsis (Murabe & Sano., 1982; Kreutzberg et al., 1993) y en el metabolismo de ciertos neuromoduladores (Castellano et al., 1990; Jensen et al., 1994).

Además, intervienen en la neurogénesis y gliogénesis mediante la secreción de factores de crecimiento (Mallat et al., 1989; Shimojo et al., 1991), promoviendo la supervivencia neuronal y el crecimiento neurítico (Merrill., 1992; Nakajima et al., 1994; Cuadros & Navascués., 1998; Streit., 2001). Controlan la proliferación y diferenciación astrogliol (Giulian et al., 1985 a,b,c), están envueltas en procesos de apoptosis, y en la vasculogénesis y angiogénesis mediante la secreción de citoquinas (Streit., 2001)

4. INMUNOHISTOQUÍMICA: PROTEÍNA GLUTAMINA SINTETASA (GS)

La GS, en el SNC de vertebrados, cataliza la formación de glutamina a partir de glutamato y amonio participando en la detoxificación (Weil-Malherbe., 1962), así como en la regulación metabólica del glutamato (Hamberger et al., 1979). Se localiza fundamentalmente en los astrocitos, *in vivo* e *in vitro* (Norenberg & Martínez-Hernández., 1979; Didier et al., 1986; Patel., 1986; Tholey et al., 1987; Mearow et al., 1989; Khelil et al., 1990; Derouiche & Frostscher., 1991; Domercq et al., 1999; Hernández et al., 1999; Struzynska et al., 2005).

También se ha observado en oligodendrocitos de mamíferos *in vivo* e *in vitro* (Warringa et al., 1988; Cammer., 1990; D'Amelio et al., 1990; Fressinaud et al., 1991; Tansey et al., 1991; Miyake & Kitamura., 1992; Domercq et al., 1999; Jennings et al., 2002; Romero-Alemán et al., 2003). Se han descrito en células endodiales de peces (Wicht et al., 1994), así como en la glía radial, endodimoglia, astrocitos y en una subpoblación de oligodendrocitos en cerebro de *G. galloti* (Monzón-Mayor et al., 1990e, 1998; Romero-Alemán et al., 2003, 2004). Además, se expresa en células endoteliales de pollo (Gerhardt et al., 1999) y de rata (Abcouwer et al., 1995).

En la **retina**, la GS se ha descrito en células Müller y epitelio pigmentario de mamíferos (Riepe & Norenberg., 1978; Linser et al., 1984; Lewis et al., 1988; Derouiche & Rauen, 1995; Derouiche., 1996). Se han observado en células de Müller en aves (Moscona & Degenstein., 1981; Prada et al., 1998; Gerhardt et al., 1999; Schuck., 2000; Quesada et al., 2004), reptiles (Sarchy & Lam., 1978; Poitry et al., 2000), anfibios (Jablonski et al., 2001) y teleosteos (Lillo et al., 2002). Su presencia en las células de Müller confieren a esta proteína un papel neuroprotector (Bringmann et al., 2000; Shaked., 2002; Suárez et al., 2002; García & Vecino., 2003).

En la retina de mamíferos, en condiciones patológicas se expresa en el epitelio pigmentario para suplir las necesidades de glutamina necesaria para la proliferación (Fröhlich & Klessen., 2000). Además, se ha sugerido su implicación en patologías retinianas como la diabetes (Leith et al., 2000).

En el **nervio óptico** de pollo se ha observado que la glía peripapilaris es GS-negativa en la CNO (Schuck., 2000; Quesada et al., 2004), aunque, algunas células en la CNO y en el margen entre CNO y retina son GS-positivas (Gerhardt et al., 1999, 2000). También, se ha detectado GS tanto en la glía pecteneal (Gerhardt et al., 1999; Shuck., 2000) como en las células endoteliales del pecten (Gerhardt et al., 1999). La GS, en la glía pecteneal podría participar en la regulación del pH del ojo, mientras que en las células endoteliales estaría relacionada con la detoxificación del amonio a glutamina como resultado de la degradación de la yema del huevo (Gerhardt et al., 1999).

Por otro lado, en la CNO, algunas células gliales GS-positivas coexpresan B-cadherina, marcador también expresado por la glía pecteneal, cuya función en la guía axonal es impedir la entrada de los axones de las células ganglionares al pecten (Gerhardt et al., 2000). También se han observado precursores y oligodendrocitos GS-positivos en el nervio óptico de gatos (Jennings et al., 2002).

5. INMUNOHISTOQUÍMICA: PROTEÍNA PCNA/ CICLINA

El **antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA)** es una proteína nuclear ácida de 35 kDa (Mathews et al., 1984). Se encuentra en dos formas básicas: una soluble, no relacionada con la replicación y otra insoluble asociada a la síntesis de ADN (Bravo & McDonald-Bravo., 1987; Hall & Woods., 1990).

La PCNA se expresa inicialmente en fase tardía (G1), aumenta en la fase S y decrece en la transición S/G2 y durante G2 y M (Bravo et al., 1987; Takahashi & Caviness., 1993). Se establece como marcador de proliferación (Kurki et al., 1986) y su utilización permite estimar toda la fracción de células proliferativas presentes en secciones de tejido. La PCNA es un polipéptido auxiliar de la ADN polimerasa δ cuya expresión es necesaria para la síntesis de ADN en la horquilla de replicación (Bravo et al., 1987; Prelich et al., 1987), siendo esencial para la síntesis de ADN en las células eucariotas (Takayashi & Caviness., 1993).

En la vía óptica, la PCNA se ha detectado en la retina de peces y aves (Negishi et al., 1990; Kwan et al., 1996; Julian et al., 1998; Velasco et al., 2001), y en la CNO de peces (Lillo et al., 2002). En el reptil *G. galloti* este marcador se expresa durante el desarrollo en la glía radial, astrocitos, células endoteliales, microglía y células de origen mesodérmico en la corteza cerebral (Romero-Alemán et al., 2004), así como durante el desarrollo de la vía óptica en neuronas retinales, células gliales y células endoteliales (Casañas., 2005).

6. INMUNOHISTOQUÍMICA: PROTEÍNA GLIOFIBRILAR ÁCIDA (GFAP)

La **proteína gliofibrilar ácida (GFAP)**, de 50 kDa (Albert et al., 1996), fue descubierta al analizar muestras de esclerosis múltiple (Eng et al., 2000). Forma parte de los gliofilamentos de células astrogliales (astrocitos protoplasmáticos y fibrosos), glía de Bergmann y glía radial en vertebrados (Ghandour et al., 1983; Eng., 1980; Levitt & Rakic., 1980; Onteniente et al., 1983; Dahl et al., 1985; Didier et al., 1986; Monzón-Mayor et al., 1990a, 1998; Yanes et al., 1990). Es una proteína del citoesqueleto, que modula la forma y movimiento de los procesos astrocitarios, se desregula frente a lesiones y traumatismos, sobreexpresándose y produciendo astrogliosis (Bignami & Dahl., 1976; Latov et al., 1979; Nathaniel & Nathaniel., 1981; Hozumi et al., 1990). Juega un papel importante en el mantenimiento de la mielina (Liedtke et al., 1996) y participa en la formación de la barrera hematoencefálica en el SNC (Pekny et al., 1998).

Recientemente se ha descrito la GFAP en células progenitoras neuronales (Laywell et al., 2000; Malatesta et al., 2000; Doctor et al., 2001; Campbell & Götz., 2002).

En relación a la **retina**, la GFAP se ha observado en astrocitos (Schnitzer., 1988; Huxlin et al., 1992; Distler et al., 1993; Karim, 1996), pies de Müller de mamíferos (Björklund & Dahl., 1985; Stone & Dreher., 1987; Ekström et al., 1988; Lewis et al., 1989; Guerin et al., 1990; Huxlin et al., 1995) y aumenta su expresión en condiciones patológicas (Guerin et al., 1990; Yoshida et al., 1993; Lewis et al., 1995; De Raad et al., 1996; Rungger-Brandle et al., 2000; Lupien et al., 2004). En vertebrados no mamíferos, se ha observado en células de Müller en teleósteos, anfibios, reptiles y aves (Sassoe et al., 1992), y en el lagarto *G. galloti* existe una fuerte inmunorreacción de los pies de

Müller vitreales (Sassoe et al., 1992, Casañas et al., 2005). En la retina de pollo, la GFAP aumenta durante el desarrollo en las células de Müller (Semple-Rowland., 1991).

En el **nervio óptico** de vertebrados se ha estudiado la distribución, tipología y funciones de los astrocitos GFAP-positivos (Dahl et al., 1985; Quitschke et al., 1985; Maggs & Acholes., 1986; Levine., 1989; Nona et al., 1989; Gerhardt et al., 1999; Lillo et al., 2002). También se sabe que, la GFAP está presente en la glía peripapilaris, aunque no en la glía pecteneal de pollo (Gerhardt et al., 1999).

En el reptil *G. galloti*, la GFAP se ha observado durante la ontogenia en astrocitos, glía radial y células endociliales en telencéfalo y mesencéfalo (Monzón-Mayor et al., 1990a, 1998; Yanes et al., 1990), en la glía radial hiperactiva durante la regeneración de la corteza cerebral (Romero-Alemán et al., 2004), en astrocitos del nervio óptico y en los pies vitreales de las células de Müller (Casañas., 2005).

7. HISTOQUÍMICA: LECTINA DE TOMATE (*Lycopersicon esculentum*)

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

La lectina de tomate (LEA), con afinidad por residuos de azúcar de poly-N-acetil lactosamina, ha permitido la identificación de células microgliales en el cerebro de ratas postnatales y adultas (Acarín et al., 1994) y durante el desarrollo del telencéfalo y mesencéfalo en el lagarto *G. galloti* (Plaza et al., 2004). Asimismo, se han detectado células LEA-positivas durante la regeneración de la vía óptica en peces (Velasco et al., 1995; Jimeno et al., 1999) en el córtex medial en *Podarcis hispánica* (López- García et al., 1994; Nacher et al., 1999) y en *G. galloti* (Romero-Alemán et al., 2004).

8. JUSTIFICACIÓN

Los reptiles constituyen un modelo de estudio interesante y peculiar ya que comparten características con vertebrados no mamíferos y mamíferos. Al respecto, el cerebro de los reptiles presenta una parte anterior (telencéfalo y diencéfalo) muy similar morfológica y molecularmente a peces y anfibios, y otra posterior (tronco encefálico y médula) comparable con aves y mamíferos. Estos hechos permiten estudiar características de vertebrados mamíferos y no mamíferos en un mismo animal.

En este sentido, en nuestro grupo de trabajo, hemos estudiado que el reptil *G. galloti* presenta caracteres primitivos como los peces y los anfibios, conservando su capacidad regenerativa en las células ganglionares retinales (CGRs) (Lang et al., 1998) y en las células de glía radial en el telencéfalo de ejemplares adultos (Romero-Alemán et al., 2004). Además, tienen analogías con aves y mamíferos en relación a que presentan la misma variedad morfológica de oligodendrocitos y la presencia de inhibidores del crecimiento axonal (Monzón-Mayor, et al., 1990; Lang et al., 1998, 2002). Asimismo, presentan un desarrollo bastante similar al de aves y mamíferos en relación a las proyecciones visuales (Dunlop et al., 2002).

El estudio del modelo de desarrollo del reptil *G. galloti* que se presenta tiene un interés especial, ya que, nos permite extrapolar y comparar con los estudios realizados en regeneración en la vía óptica de esta especie (Lang et al., 1998, 2002; Romero-Alemán et al., 2004) y en otros vertebrados.

Al respecto, nuestro grupo ha demostrado que en el reptil *G. galloti* existen dos tipos de regeneración distintos en telencéfalo y la vía óptica. En esta última, los axones de las CGRs colonizan el techo óptico después de lesiones del nervio óptico, hecho que no ocurre en mamíferos (Lang et al., 1998, 2002).

Además, en este modelo de regeneración, las CGRs atraviesan la zona de la lesión a pesar de la gliosis reactiva y de la presencia de inhibidores del crecimiento neurítico. Durante el proceso no se observa proliferación ni muerte de las CGRs, sin embargo existen moléculas Bcl-2 protectoras de muerte. Todo ello demuestra que se trata de una

regeneración neuronal verdadera (Lang et al., 1998, 2002). En esta línea, los resultados sobre el desarrollo de las células gliales en la vía óptica de *G. galloti* ayudarían a comprender esta regeneración peculiar en reptiles.

Por todo ello, consideramos que el reptil *G. galloti* constituye un modelo peculiar y diferente en relación al resto de los Vertebrados, por lo que los estudios de desarrollo y regeneración en esta especie ayudarían a esclarecer y complementar las cuestiones que actualmente se discuten en relación a la vía óptica de vertebrados.

9. OBJETIVOS

Como **objetivo general** nos proponemos conocer la tipología y distribución de las células gliales durante la ontogenia en diferentes regiones de la vía óptica (retina, conus papillaris, nervio, quiasma y tracto óptico) con objeto de analizar características de dichas poblaciones celulares en el reptil *G. galloti*.

Y como **objetivos específicos** nos hemos propuesto:

1. Realizar el estudio topográfico de la vía óptica durante la ontogenia con la técnica de Klüver-Barrera.
2. Estudiar la distribución y características de la población glial con la proteína glutamina sintetasa (GS) durante el desarrollo.
3. Analizar la población glial GS/GFAP para identificar las subpoblaciones celulares astrogliales en relación a la homo o heterogeneidad en la vía óptica del lagarto.
4. Estudiar la distribución y caracterización de las células de microglía con técnicas histoquímicas y ultraestructurales.
5. Analizar con dobles marcajes PCNA/Lectina, el origen, la proliferación y las vías de migración de las células microgliales, con objeto de establecer un modelo que nos permita comprender mejor el papel funcional de estas células.

Introducción

Y finalmente, este trabajo de desarrollo es básico para complementar los estudios de regeneración en la vía óptica de *G. galloti* sobre lesiones agudas (retina y nervio óptico), y crónicas (modelo experimental de glaucoma) actualmente en curso en nuestro grupo, y los estudios de desarrollo y regeneración con el resto de los vertebrados.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN:

Como especie de estudio se ha usado el reptil *Gallotia galloti* (familia Lacertidae, orden Squamata), endemismo de la isla de Tenerife.

En total se han utilizado 30 ejemplares adultos, que se consideran con capacidad reproductiva manifiesta, 20 postnatales y 99 embriones en diferentes estadios del desarrollo (desde E-31 a Eclosión). La clasificación de los embriones se ha realizado en base a la tabla de desarrollo de *G. galloti* (Ramos-Steffens., 1980), donde se establece la equivalencia con *Lacerta vivipara* (Dufaure y Hubert., 1961).

Tanto los ejemplares adultos, postnatales y los embriones extraídos de huevos fueron recolectados en su hábitat natural en el norte de la isla.

2. PROCESAMIENTO DE EMBRIONES, EJEMPLARES POSTNATALES Y ADULTOS:

2.1. FIJACIÓN

Para las técnicas inmunohistoquímicas e histoquímicas se ha utilizado el fijador Bouin y para microscopía electrónica el glutaraldehído al 2,5% en tampón Milloning. Los ejemplares adultos fueron anestesiados con éter dietílico y perfundidos vía ventrículo cardiaco durante 10 minutos, postfijándose por inmersión durante 4 o 48 horas con Bouin o glutaraldehído según fueran adultos o embriones. Los postnatales y embriones eran decapitados y fijados por inmersión, sin embargo los adultos se fijaban por perfusión intraventricular. Durante el tiempo de fijación los cerebros de los embriones (E-38 a E-40), postnatales y adultos se limpiaban cuidadosamente extrayendo las meninges y otras estructuras que impedían una buena fijación.

BOUIN	CONCENTRACIÓN
Ácido pícrico 1,4%	75 ml
Formaldehído 35-40%	25 ml
Ácido acético glacial	5 ml

GLUTARALDEHIDO	CONCENTRACIÓN
Glutaraldehído (2,5%)	20ml (Glut. 25%)
Tampón Milloning	200 ml

2.2. INCLUSIÓN

2.2.1. Técnicas inmunohistoquímicas e histoquímicas

Los cerebros fijados en Bouin se deshidrataron en concentraciones crecientes de alcoholes a temperatura ambiente y se incluyeron en parafina siguiendo el siguiente proceder:

1. Un baño de Alcohol de 70° durante 24 horas.
2. Dos baños de Alcohol de 96° de media hora cada uno.
3. Dos baños de Alcohol de 100° de 1 hora cada uno.
4. Dos baños de toluol, de 10 minutos y de 20 min. respectivamente.
5. Tres baños de parafina plastificada a 59°C durante 24 horas.
6. Elaboración de los bloques.

2.2.2. Técnicas de Microscopía Electrónica

Los cerebros fijados con glutaraldehído se incluyeron en Durcupan según el siguiente proceder:

1. Tres lavados, de 20 minutos, en tampón Milloning.
2. Postfijación en Tetróxido de osmio (OsO₄) al 2% en Tampón Milloning durante 2 horas a temperatura ambiente y en oscuridad.
3. Lavado de 15 minutos en tampón Milloning.
4. Deshidratación en serie crecientes de alcoholes: 30% 15 minutos, 45% 15 minutos, 60% 15 minutos y 70% 15 minutos.
5. Tinción de contraste: Acetato de uranilo al 2% en alcohol al 70% toda la noche, a 4° C.
6. Continuación de la deshidratación: alcohol al 80% 15 minutos, 90% 15 minutos, y tres cambios en alcohol 100% de 20 minutos.
7. Tres lavados, de 15 minutos, en oxido de propileno.

Material y métodos

8. Oxido de propileno–Durcupan en series crecientes de Durcupan: 1 hora en proporción 1:1; 1 hora en proporción 1:3 y dos horas en Durcupán 100%.
9. Dos días en molde de plástico, estufa a 65°C, para su polimerización

2.3. OBTENCIÓN DE SECCIONES Y MONTAJE.

Los cerebros incluidos en parafina se cortaron en microtomo (L. Jung) y las secciones horizontales de 10 y 20 micras se montaron en series paralelas en portas gelatinizados.

Las muestras incluidas en Durcupan para Microscopía electrónica se cortaron en Ultramicrotomo (Reichert Ultracut, Leica), obteniéndose secciones semifinas y ultrafinas que se tiñeron según el siguiente proceder:

Cortes Semifinos: Se tiñen con azul de Toluidina (100 ml H₂O destilada, 1gr de Azul de Toluidina, 1 gr de Borax).

Tinción de rejillas: Se hierva agua destilada durante 1 hora, se añade citrato de plomo al 2% y se tiñen las rejillas durante 20 minutos en dicha solución.

3. TINCIONES HISTOQUÍMICAS.

3.1. Klüver Barrera.

Para el estudio topográfico de las secciones procedimos a la tinción con Klüver Barrera, en la que el luxol tiñe la mielina y el violeta de cresilo los núcleos y citoplasma celulares, siguiendo el siguiente protocolo:

1. Desparafinado e hidratación de las secciones:

BAÑO	TIEMPO
Xilol	4 x 10 min
Alcohol 100%	2x 10 min
Alcohol 96%	2x 10 min
Alcohol 70%	3x 10 min
H ₂ O destilada	1 min

2. Luxol-blue: 6-18 horas.
3. Lavar con alcohol de 70%
4. Lavar con agua destilada
5. Diferenciar con una disolución acuosa de CO_3Li al 0,05% hasta que quede transparente.
6. Lavar con agua destilada.
7. Tinción de fondo con violeta de cresilo al 0,5% durante 2 minutos.
8. Lavar con agua destilada.
9. Deshidratar en concentraciones crecientes de alcoholes, aclarar y montar.

LUXOL-BLUE	CONCENTRACIÓN
Luxol-blue	0,1 gr.
Alcohol 96%	100 ml
Ácido acético	0,5 ml

3.2 Lectina de tomate (*Lycopersicon esculentum*).

Para la identificación de células microgliales hemos utilizado la lectina de tomate con afinidad por residuos de azúcar de poli-N-acetil lactosamina con el siguiente proceder:

1. Desparafinado e hidratación de las secciones (ver el apartado 3.1)
2. Tres lavados de 5 minutos en tampón PBS (tampón fosfato salino), diluido 0,01M a pH 7.2.
3. Inhibición de la peroxidasa endógena durante 10 minutos en la solución de: peróxido de hidrógeno al 3% y metanol al 10% en PBS.
4. Tres lavados de 5 min en PBS con BSA (albúmina de suero bovino) al 0,1%.
5. Tres lavados de 5 min en PBS con tritón X-100 al 0,1%
6. Tres lavados de 5 min en PBS con BSA al 0,1%.
7. Incubación de las secciones con la lectina de tomate biotilada (Sigma), diluida 1:50, en PBS con BSA al 0,1% durante dos horas a temperatura ambiente.
8. Tres lavados de 5 min en PBS con BSA al 0,1%.

Material y métodos

9. Incubación de las secciones con Avidina-peroxidasa (Sigma) diluida 1/400 en PBS durante una hora a temperatura ambiente.
10. Tres lavados de 5 min en PBS.
11. Revelado del marcador: la peroxidasa se detectó sumergiendo los portas en una disolución de 15mg de Diaminobencidina (DAB) + 1gr de Níquel en 60 ml de PBS durante 5 minutos, añadiéndole posteriormente 100 microlitros de peróxido de hidrógeno al 3%.
12. Tres lavados de 5 min con PBS.
13. Algunas de las secciones fueron contrateñidas con hematoxilina de Harris (Papanicolaou; Merck). Para ello se sumergieron los portas 5min en H₂O destilada, luego 30 seg en la hematoxilina y 30 seg en alcohol de 96°+ ácido acético para diferenciar.
14. Finalmente las secciones se deshidrataron en concentraciones crecientes de alcoholes, se aclararon con xilol y se montaron con Eukitt.

PBS	CONCENTRACIÓN
NaH ₂ PO ₄ . 2 H ₂ O	12gr
K ₂ HPO ₄	56 gr
NaCl	9gr
H ₂ O destilada	Enrasado a 1 litro

4. TINCIONES INMUNOHISTOQUÍMICAS

Se realizaron marcajes simples con Glutamina sintetasa (GS) y dobles marcajes: GS y GFAP (proteína gliofibrilar ácida).

4.1. Inmunotinción con anti-Glutamina sintetasa.

Las series fueron procesadas con la técnica del PAP (Peroxidasa anti-peroxidasa), según el siguiente protocolo:

1. Desparafinado e hidratación de secciones (ver apartado 3.1)
2. Preincubación con glicina (0,75%) y BSA (1%) en PBS, durante 24 horas a 4°C.

3. Tres lavados de 10 minutos cada uno en PBS.
4. Tres baños de 10 minutos cada uno en una disolución de leche desnatada al 0,5% y PBS.
5. Un baño de 10 minutos en tritón X-100 al 0,5% y PBS.
6. Tres lavados de 10 minutos cada uno en PBS.
7. Incubación con el primer anticuerpo monoclonal anti-GS (Chemicon), diluido 1/200 en BSA al 1% y 0,2% de tritón X-100 durante 48 horas en cámara húmeda a temperatura ambiente.
8. Tres lavados de 10 minutos cada uno en PBS.
9. Incubación con el segundo anticuerpo, Goat antimouse IgG (Dako), diluido 1/30 durante 1 hora a temperatura ambiente.
10. Tres lavados de 10 minutos cada uno en PBS.
11. Complejo PAP (DAKO) diluido 1/100 durante 1 hora, a temperatura ambiente.
12. Tres lavados de 10 minutos cada uno en PBS.
13. Revelado del marcador: la Peroxidasa se detectó sumergiendo los portas en una disolución de 15mg de Diaminobencidina (DAB) en 60 ml de PBS durante 5 minutos y se añadió posteriormente 100 microlitros de peróxido de hidrógeno al 3%.
14. Tres lavados en PBS, durante 10 minutos cada uno.
15. Deshidratación de las secciones con etanol a concentraciones crecientes, aclaradas en xilol y montadas en Eukitt.

4.2. Doble inmunotinción: anti-GS/anti-GFAP

La técnica de doble marcaje con inmunofluorescencia indirecta se utilizó para detectar simultáneamente la proteína GS y GFAP. Para ello se realizaron los siguientes pasos:

1. Desparafinado e hidratación de las secciones (ver apartado 3.1)
2. Tres lavados de PBS de 5 mins.
3. Desenmascaramiento antigénico, con baño termostático, agua en ebullición, y cubeta de tampón citrato, donde se colocan las secciones. Se mantienen a 100°C durante diez minutos y luego se enfrían lentamente durante 20 minutos. Para

Material y métodos

preparar el tampón citrato se mezcla 2,94 grs de Tri-sodium Citrate (Merck) en 1 litro de agua destilada y se ajusta a pH 6.

TAMPON CITRATO	CONCENTRACIÓN
Trisodium citrato	2,94 gr.
H ₂ O de stilada	1 litro

4. Tres lavados de PBS de 10 minutos.
5. Bloqueo de las uniones inespecíficas sumergiendo los portas en una solución de BSA al 1% en PBS durante 1h.
6. Incubación con los primeros anticuerpos, policlonal anti-GFAP (Biotrend) diluido a 1/50 y monoclonal anti-GS (Chemicon) diluido a 1/200, ambos en PBS y tritón al 0,2% durante 48 h. en cámara húmeda a temperatura ambiente.
7. Tres lavados de PBS de 10 mins.
8. Incubación con los segundos anticuerpos marcados con fluorocromos usando Alexa anti-rabbit diluido a 1/1000 para la detección de anti-GFAP y Cy3 anti-mouse diluido a 1/1000, para detectar el anti-GS, durante 1,5 horas.
9. Incubación con DAPI (diaminido fenilindol) diluido a 1/100 durante 5 minutos.
10. Tres lavados de PBS de 10 mins.
11. Las secciones fueron montadas con una disolución de Mowiol, preparada con los siguientes reactivos y de la forma siguiente:

REACTIVOS	CONCENTRACIÓN
PBS	10 ml
Mowiol	2,5 gr
Glicerol	5 ml
Thymerosal 2%	0,15 ml
n-propyl gallate	1 mg/ml

El Mowiol y PBS se disolvieron durante tres días, y el glicerol y Thymerosal durante una semana a 4°C. Se centrifugó la mezcla a 4000 rpm durante 15 minutos, se conservó el sobrenadante a -20° y se añadió para su uso, 1mg/ml de n-propyl gallate.

4.3. Doble inmunotinción: anti-PCNA/lectina de tomate

Para determinar el grado de proliferación o las distintas fases de división celular de las células microgliales se utilizó el anticuerpo contra la proteína PCNA (*antígeno nuclear de proliferación celular*). Para ello, primero se detectó dicho antígeno mediante las técnicas de inmunoperoxidasa y el método indirecto ABC (Complejo Avidina-Biotina), como a continuación se detalla, y posteriormente se realizó la técnica histoquímica con lectina de tomate tal como se ha descrito en el apartado 3.2.

1. Desparafinado e hidratación de las secciones (ver apartado 3.1).
2. Tres lavados de 10 minutos con PBS
3. Desenmascaramiento antigénico, realizado igual que en el apartado anterior (4.2.)
4. Inhibición de la peroxidasa endógena mediante inmersión de las secciones en agua oxigenada al 3% en PBS, durante 10 minutos a temperatura ambiente.
5. Tres lavados con PBS de 10 minutos cada uno.
6. Inhibición de las posibles uniones inespecíficas con preincubación de las secciones en una solución de BSA al 1% en PBS durante 1 hora.
7. Incubación con el anticuerpo monoclonal anti-PCNA (Novocastra), diluido a 1/60 en BSA al 1% en PBS, durante 24 horas a 4°C.
8. Tres lavados con PBS de 10 minutos cada uno.
9. Incubación de las secciones en el segundo anticuerpo IgG antimouse biotinilado (Vector), diluido 1/200 en PBS, durante 1 hora.
10. Tres lavados con PBS de 10 minutos cada uno.
11. Incubación con el conjugado Avidina-peroxidasa (Sigma) diluido 1/400 en PBS, durante 1 hora.
12. Tres lavados con PBS de 10 minutos cada uno.
13. Revelado del marcador: la Peroxidasa se detectó sumergiendo los portas en una disolución de 15mg de Diaminobencidina (DAB) en 60 ml de PBS durante 5 minutos y añadiéndole posteriormente 100 microlitros de peróxido de hidrógeno al 3% (color marrón). Otros portas se revelaron utilizando el 4-Cloro 1-Naftol, con el que se consigue un marcaje de color azul. Se sumergieron las secciones durante 5 minutos en una disolución compuesta por 20 gr de 4-Cloro, 1-Naftol diluido en 100

µl de dietilformamida y 50 ml de TRIS. Posteriormente, se añadió a la disolución anterior 40 µl de agua oxigenada al 3% durante 2-3 minutos.

14. Tres lavados en PBS, durante 10 minutos cada uno.

15. Se continuó el protocolo con el marcaje histoquímico de lectinas (*Lycopersicum esculentum*) (apartado 3.2) salvo que esta vez, la peroxidasa se reveló con una dilución de DAB (color marrón) o con 4-cloro, 1 naftol (color azul) dependiendo de si el revelado con la PCNA había sido con 4-Cloro, 1- Naftol o si había sido con DAB respectivamente.

16. Finalmente las secciones se deshidrataron en concentraciones crecientes de alcoholes, se aclararon en xilol y se montaron en Eukitt.

5. CONTROLES DE LOS MARCAJES anti-GS, anti-PCNA, anti-GFAP.

Para garantizar la fiabilidad de las técnicas inmunohistoquímicas se establecieron una serie de controles tanto para las técnicas de inmunoperoxidasa como para técnicas de inmunofluorescencia.

Para las técnicas de inmunoperoxidasa se descartó la presencia de actividad de la peroxidasa endógena al realizar los protocolos sin incubación de anticuerpos y revelando. Además se descartó la presencia de marcaje inespecífico, realizando los protocolos: 1º en ausencia de alguno de los anticuerpos primarios, 2º en ausencia de los secundarios, 3º en ausencia del complejo ABC o complejo PAP.

En el caso de las técnicas de inmunofluorescencia se realizó de la misma manera, realizando los protocolos en ausencia de alguno de los anticuerpos.

6. ESTUDIO DE LAS SECCIONES: MICROSCOPIA ÓPTICA Y ELECTRÓNICA.

Todas las secciones procesadas con las técnicas histoquímicas e inmunohistoquímicas, fueron estudiadas y fotografiadas con microscopio óptico (Leitz DMRB, y Zeiss Axiovert 200M). Asimismo las rejillas fueron observadas y microfotografiadas en un Microscopio Electrónico JEOL mod. 1010.

RESULTADOS

1. VÍA ÓPTICA ANTERIOR. RETINA Y NERVIO ÓPTICO EN *G. Galloti*.

La vía óptica de reptiles es estructuralmente similar a la del resto de vertebrados. El nervio óptico está formado por los axones de las células ganglionares que salen de la retina, se decusan y forman el quiasma óptico (QO). Estas continúan hacia el Tracto óptico (TrO), terminando en el techo óptico (TO) donde establecen conexiones con las células diana, fundamentalmente en las dos capas más externas, stratum opticum (SO) y stratum griseum fibrosum superficiale (SGFS).

Para el estudio de la vía óptica del reptil *Gallotia galloti*, hemos subdividido el **nervio óptico** (NO) en las siguientes zonas, atendiendo a la diversidad y morfología de su población glial (Esquema 1):

a) **Zona intraocular del nervio (ZIN) o cabeza del nervio óptico (CNO):** Situada dentro del globo ocular y a su vez subdividida en cuatro zonas atendiendo a subpoblaciones gliales observadas:

1. **Zona peripapilaris (ZP):** Zona del nervio que limita con la base del conus papillaris.
2. **Zona distal al conus papillaris (ZDC):** Zona de la CNO más próxima a la zona extraocular del nervio.
3. **Zona limitante nervio retina (ZLNR):** Separa la retina y el nervio óptico y es homóloga al tejido intermediario de Kuhnt.
4. **Zona transición nervio retina (ZTNR):** Zona de transición entre la capa de fibras del nervio de la retina y el NO.

b) **Zona extraocular del nervio (ZEN):** Zona del nervio situada fuera del globo ocular y que limita en su parte más caudal con el quiasma óptico (QO).

Esta zona a su vez se ha subdividido en:

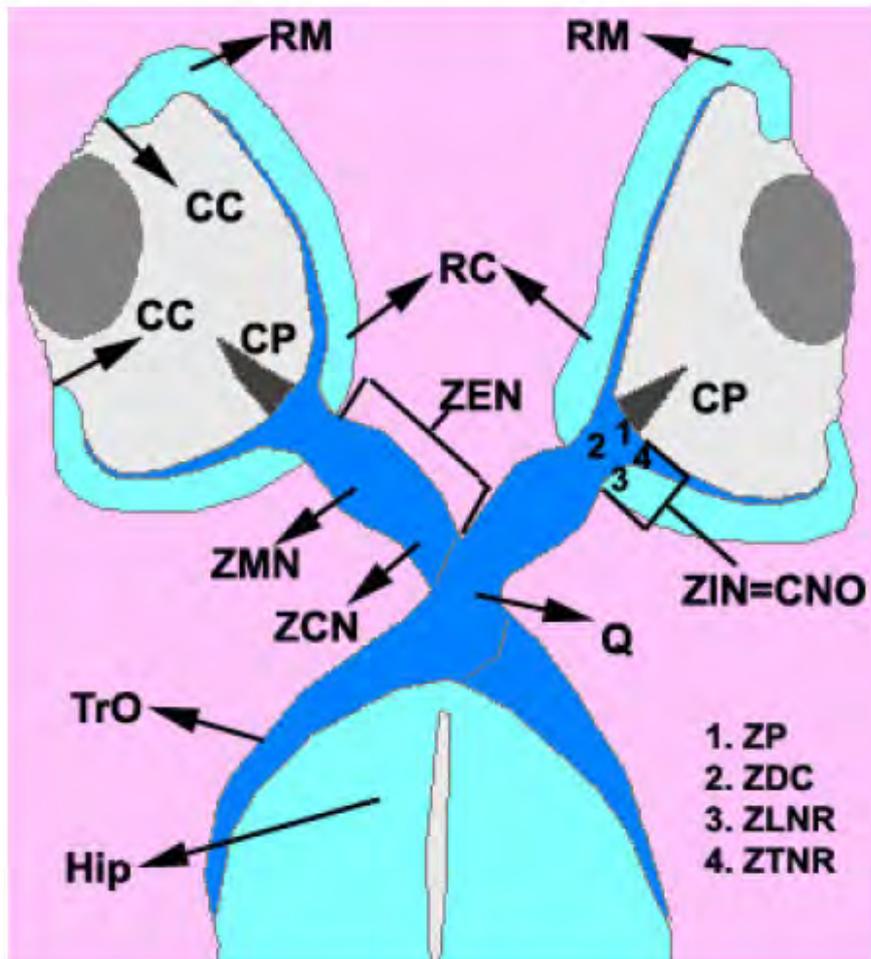
1. **Zona Medial (ZMN),** o zona más rostral.
2. **Zona caudal (ZCN),** o zona próxima al quiasma óptico.

Por otra parte la retina la hemos dividido en:

1. **Retina Central (RC):** zona de la retina próxima a la CNO.
2. **Retina Marginal (RM):** zona de la retina próxima al cuerpo ciliar(CC).

Además al igual que el resto de vertebrados en el estado adulto la retina de *Gallotia galloti* está formada por 10 capas:

1. **Epitelio pigmentario de la retina (EPR)**
2. **Capa de fotorreceptores (CF)**
3. **Membrana limitante externa (MLE)**
4. **Capa nuclear externa (CNE)**
5. **Capa plexiforme externa (CPE)**
6. **Capa nuclear interna (CNI)**
7. **Capa plexiforme interna (CPI)**
8. **Capa ganglionar (CG)**
9. **Capa de fibras del nervio (CFN)**
10. **Membrana limitante interna (MLI)**



Esquema 1

Se muestran las distintas zonas del Nervio óptico y la Retina en un corte horizontal del adulto de *Gallotia galloti*. Esquema tomado y modificado de Casañas Acosta, N. (2005).

2. ESTUDIO TOPOGRAFICO CON LA TECNICA DE KLÜVER- BARRERA

Para describir los procesos del desarrollo en la vía óptica de *G. galloti* hemos definido tres niveles horizontales en el estudio topográfico: a) ventral, que incluye el hipotálamo ventral y retina ventral, b) medial, que comprende, la retina, el conus papillaris, el nervio óptico, el quiasma y tracto óptico, y c) dorsal, que incluye el techo óptico y retina dorsal.

2.1. RETINA

En la retina de *G. galloti* se definen dos zonas: la central (RC), situada en las proximidades de la cabeza del nervio óptico (CNO) y la marginal (RM), cercana al cuerpo ciliar (CC) (Esquema 1).

La retina comienza su desarrollo en estadios muy tempranos (E-31), se estratifica de forma gradual hasta eclosión, y concluye en los ejemplares adultos. La retina central se diferencia antes que la marginal (gradiente central-periférico), y la CPI de la retina dorsal se diferencia antes que la ventral en estadios tempranos (gradiente dorso-ventral) (Fig 1A,B). En E-31, se aprecia que la retina nasal es mayor en longitud que la temporal, sin embargo el desarrollo de las capas se produce antes en la retina temporal que en la nasal desde E-32 al E-35. Aunque, la retina temporal y nasal parecen completar su desarrollo al unísono desde el E-35 hasta el Eclosión (datos no mostrados).

En relación al desarrollo de las capas de la retina, en el E-31, está formada por la retina pigmentaria, con células de escasos gránulos, y la retina neural, con un epitelio pseudoestratificado, que aumenta en la zona marginal. Las células indiferenciadas presentan un abundante citoplasma, núcleo eucromático con uno o dos nucléolos, situándose las mitosis en la zona externa, próximas al epitelio pigmentario (datos no mostrados).

Entre el E-32 y el E-35, se desarrollan: la capa de fibras del nervio (CFN), la ganglionar (CG), la plexiforme interna (CPI) y comienza a manifestarse la CNI. Así, en el E-32, la CFN ocupa solo la retina central y se sitúa en los tres niveles estudiados (dorsal, medial y ventral), siendo más gruesa en niveles medios y en la zona próxima a

la cabeza del nervio óptico (CNO) (Fig. 1A). En niveles dorsales y en la retina central comienza el desarrollo de la CPI (Fig 1B).

En el E-33, la CPI sólo se observa en niveles medios y dorsales, ocupando la zona central de la retina. Desde el E-33 hasta el E-35 la CPI aumenta en grosor y ocupa claramente las zonas central y marginal de la retina, observándose en los tres niveles de estudio en el E-35 (Fig. 1C,D). Además, en el E-35 se observan algunas células en la CPI, próximas a la CG en los tres niveles (Fig. 1D-inset), en ambas zonas, central y marginal. Paralelamente, en la CFN se detectan células dispersas fusiformes especialmente en la retina central (Fig. 1C). Las mitosis aún continúan en la zona más externa de la retina, próxima a la capa pigmentaria.

Entre el E-35 y el E-39, se diferencian las capas nuclear interna (CNI) y plexiforme externa (CPE). En el E-35, la CNI presenta varios estratos de células ovoides, donde se destacan células en división; y la CPE aparece en la retina central, observándose en el E-39 por toda la retina en los tres niveles de estudio (Fig. 1E,F).

Desde el E-39 al estadio de eclosión se diferencian la capa nuclear externa (CNE) y de fotorreceptores (CF) (Fig 1E,F), aunque la retina no termina de crecer hasta ejemplares adultos.

En adultos, todas las capas están completamente diferenciadas en los tres niveles, y no se observan diferencias significativas entre estos (Fig. 1G,H). Sin embargo, en la capa del nervio, se observan, en la retina marginal y central, en mayor número, células fusiformes. Además se observan mayores espacios intercelulares sobre todo en la CG.

El resumen simplificado del desarrollo ontogénico de la retina se observa en el Esquema 2 (pag. 45)

2.2 NERVIO ÓPTICO

El nervio óptico se observa por primera vez en el E-32, y hasta el E-34, la cabeza del nervio óptico (CNO), presenta, numerosas células ovoides, dispuestas en hileras paralelas a las fibras (Fig. 2A,B). Por el contrario, la porción extraocular del nervio

contiene células dispersas (Fig. 2A,C,D). Entre el E-32 y el E-34, las fibras ópticas de ambos nervios comienzan a entrecruzarse, aunque aún no se ha formado el quiasma óptico (Fig 2A), sin embargo, en el E-35 ya se observa el entrecruzamiento que formará el quiasma.

Desde E-35 hasta E-38, se observan algunas modificaciones de las células gliales en relación a los estadios anteriores. Al respecto, en la zona central de la CNO, se observan numerosas células formando un triángulo, en la base del incipiente conus papillaris, y agrupadas en hileras en la periferia (Fig. 2E,F). En la zona medial del nervio (ZMN), las células se disponen paralelamente a las fibras (Fig. 2E,G). Por el contrario, en la zona caudal del nervio (ZCN) y en el quiasma óptico (QO), la población celular es dispersa y la mayoría presenta una morfología estrellada (Fig. 2E,H).

En E-37, se detectan por primera vez escasas células ovoides en toda la superficie del tracto óptico. A partir del E-39, la distribución y morfología de la población glial en el nervio, se modifica, de manera que en la CNO, y concretamente, en la base del conus las células se reducen en número (Fig. 3A,B). En la zona medial del nervio se mantiene el patrón en hileras (Fig. 3A,C), y en la caudal, la población celular continúa dispersa, aunque la morfología es, en general, ovoide (Fig. 3A,D).

Por otro lado, la población de células en el tracto óptico aumenta considerablemente a partir del E-39 hasta ejemplares adultos. Tanto en eclosión (Fig. 3E,F,G,H) como en adultos (Fig 3I,J,K), la organización celular anterior se mantiene, y destaca la gran cantidad de mielina en las fibras del NO en adultos, que se hace patente a partir de eclosión.

2.3. CONUS PAPILLARIS

El conus papillaris (CP) se forma entre el E-32 y E-34, a modo de pequeña papila o protuberancia (botón papilar) y en dirección al humor vítreo. Esta papila presenta numerosas células ovoides (Fig 4A). En el E-35, las células que forman el conus presentan gránulos de pigmento, y se observan espacios extracelulares, que formaran los primeros vasos sanguíneos en esta estructura eminentemente vascular (Fig 4B).

Resultados

El crecimiento del conus se realiza en longitud alcanzando el máximo tamaño en ejemplares adultos. Las células pigmentadas aumentan de forma gradual hasta adultos, y ocupan toda la extensión del conus desde el E-37 (Fig. 4C).

Paralelamente, los vasos sanguíneos en desarrollo ocupan las posiciones más internas del CP (Fig 4C). A partir del E-39, los vasos se extienden por toda la longitud del conus (Fig 4D), y aumentan en la zona central en estadios posteriores (Fig 4E). Además, las células con pigmentos que en el E-37 ocupaban toda la extensión del conus se van concentrando alrededor de los vasos sanguíneos, sobre todo alrededor de los de mayor tamaño situados centralmente (Fig. 4E).

Esta organización del CP continúa manteniéndose en el adulto y se estructura de la siguiente manera: en el centro se sitúan los vasos de mayor calibre y en la periferia los más pequeños. Las células pigmentadas se disponen alrededor de los vasos, aunque su concentración es mayor en la región central del conus (Fig 4E,F).

Esquema 2: Modelo del desarrollo ontogénico de la retina central (RC) con la técnica de Klüver-Barrera

En E-32, se observa solo la CFN en la retina neural y las células de la capa pigmentaria con escasa pigmentación.

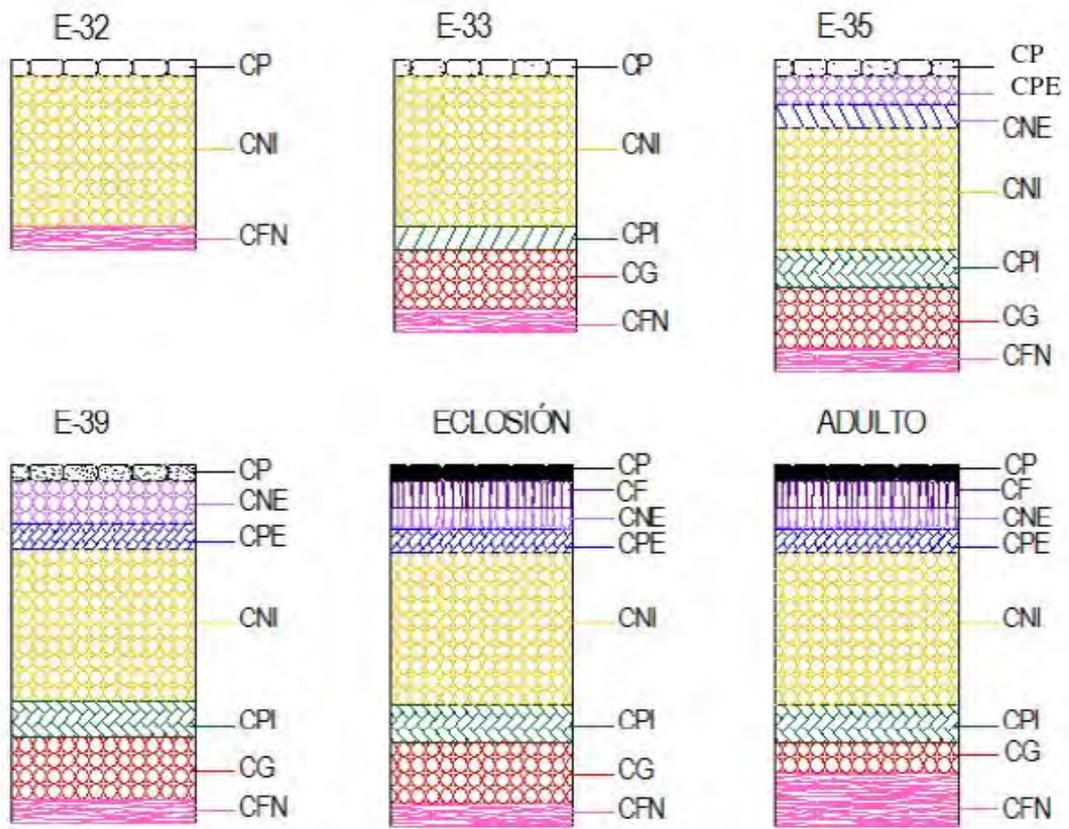
En el E-33 empieza a diferenciarse la CG y a manifestarse la CPI, por tanto comienza a diferenciarse las primeras células que forman la CNI.

En el E-35, comienza a diferenciarse las primeras células de la CNE y a manifestarse la CPE de la diferenciación de células de la CNI y de la CNE.

En el E-39 la CNI está desarrollada por completo y la CPE es muy similar a la del los adultos

En eclosión se observan la CNE y la CF completamente desarrolladas, y la retina presenta el aspecto de los adultos, a excepción de la CG, donde las células disminuyen y aumentan los espacios intercelulares y la CFN aumenta.

Además, la cantidad de células pigmentarias aumenta gradualmente desde el E-32 hasta adultos, donde se observa la máxima expresión.



ESQUEMA 2

Fig 1: Secciones horizontales de la retina durante el desarrollo de *G. galloti* con la técnica de Klüver-Barrera. A) En el E-32, se observa la CFN en la retina central en niveles mediales. B) En el E-32, se observa el desarrollo de la CPI en la retina central a nivel dorsal. C y D) En el E-35, se aprecia la retina central y periférica, a nivel medial con las capas CNI, CPI, CG y CFN. Nótese la presencia de células indiferenciadas, en la CPI en ambas retinas. En el recuadro D se muestra un detalle de estas células inmaduras. E y F) En el E-39, se distingue la retina central y periférica a nivel medial, con la CPE completamente desarrollada. G y H) Nivel medial de adultos con retina central y marginal respectivamente donde se observa el desarrollo completo de todas las capas retinales y numerosas células en la capa de fibras del nervio. CFN: Capa de fibras del nervio; CG: Capa ganglionar; CPI: capa plexiforme interna; CNI: Capa nuclear interna; CPE: capa plexiforme externa; CNE: Capa nuclear externa; CF: Capa de fotorreceptores. A,C,D,E,F,H: 550x; B: 130x; Recuadro en D: 1330x; G: 330X.

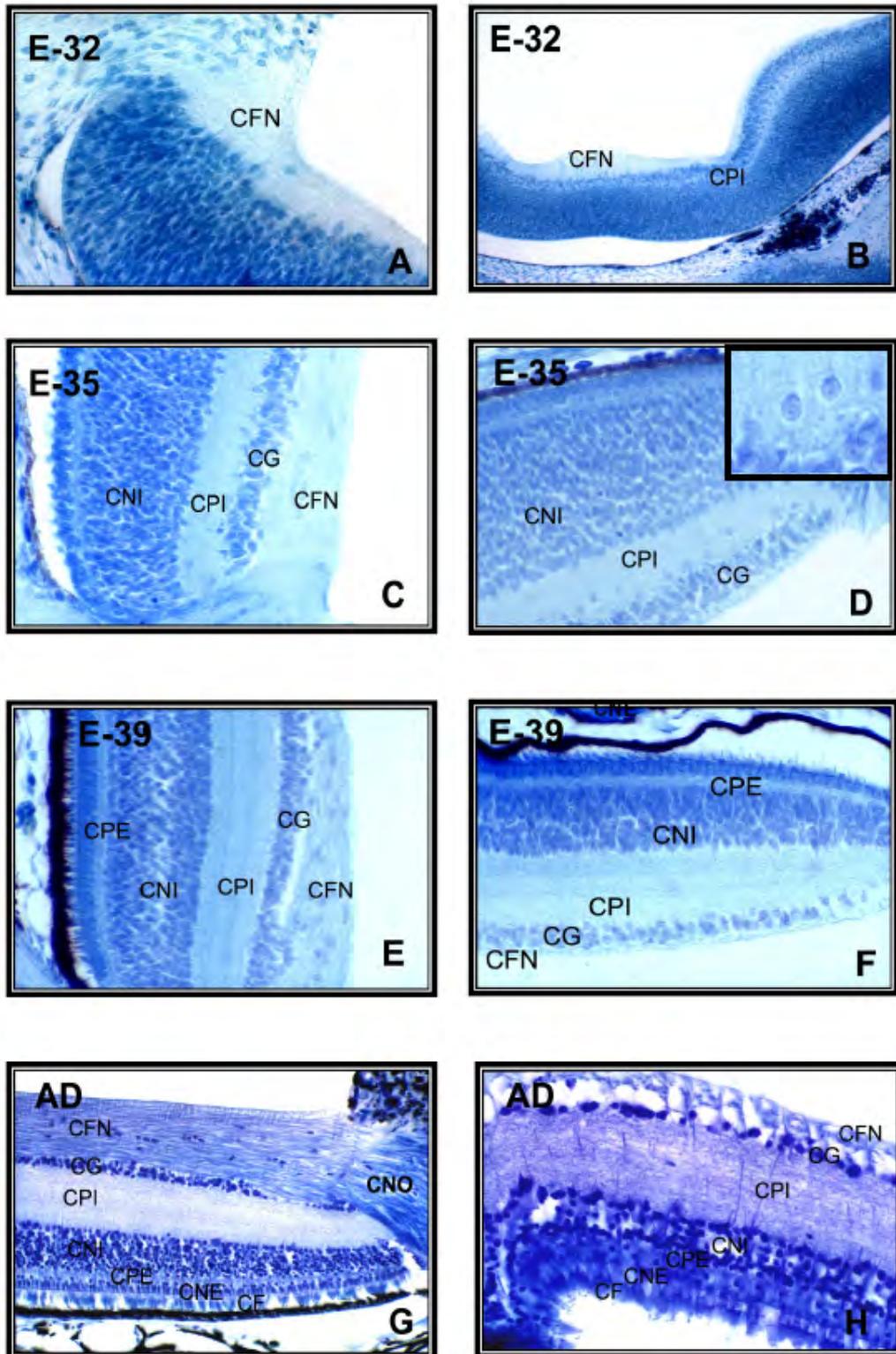


Fig 1.

Fig 2: Secciones horizontales del nervio óptico, en niveles medios, durante el desarrollo de *G. galloti*. A) En el E-33, se observa la distribución en hileras de células ovoides por toda la superficie del nervio, sin formarse aún el quiasma óptico. B) Mayor detalle de las células de la CNO; C) de la ZMN; D) y de la ZCN. E) En el E-37, se aprecia distinta morfología y distribución celular respecto a estadíos anteriores. Obsérvese la formación en triángulo de las células situadas en la base de CP (Flechas). En F) se destacan células ovoides en la base del conus papillaris; en G) células de ovoides en la ZMN; y en H) células estrelladas dispersas en la ZCN. CNO: cabeza del nervio óptico; ZMN: zona medial del nervio; ZCN: Zona caudal del nervio; NO: nervio óptico. A, E: 350x; B, C, D: 1050x; F, G, H: 1250x.

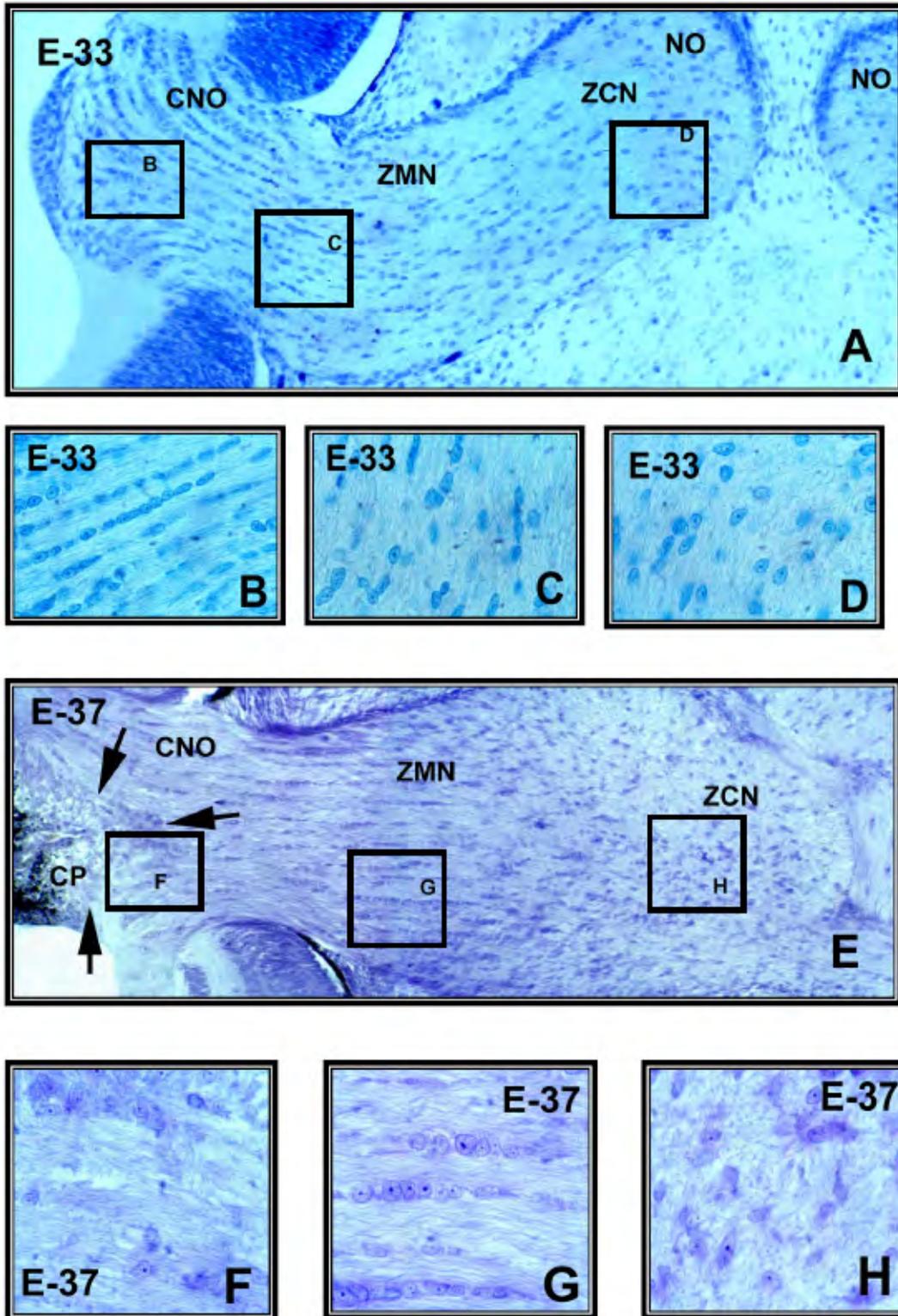


Fig 2.

Resultados

Fig 3: Secciones horizontales de niveles medios en el nervio óptico en *G.galloti*. A) En el E-39, se observan células ovoides distribuídas por toda la superficie del nervio. B) Aumento de la CNO, y reducción de células en relación al E-37. C) Detalle de la ZMN y continuidad de la disposición celular en hileras. D) Detalle de la ZCN, con células dispersas y ovoides. E) En eclosión, se muestran aproximadamente las mismas características de E-39. Obsérvense en F, G, y H detalles de células ovoides de la Fig. E. Asimismo, en ejemplares adultos y en I, J, K se muestran detalles de las tres regiones del nervio descritas, de características similares a Eclosión, aunque aumentan las fibras mielínicas. CNO: cabeza del nervio óptico; ZMN: zona medial del nervio; ZCN: Zona caudal del nervio. A, E: 350x; B, C, D: 950x; F, G, H, I, J, K: 1150x.

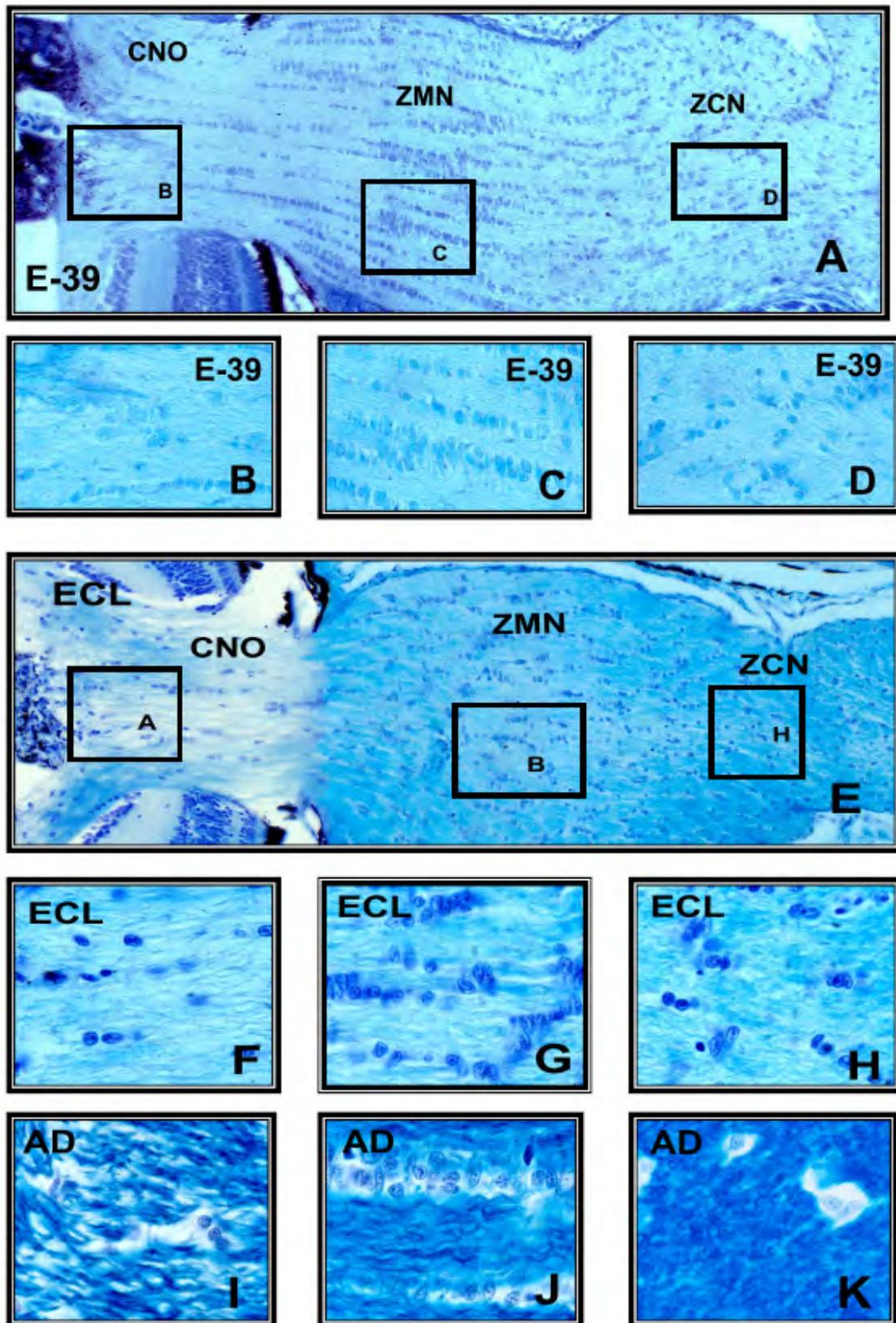


Fig 3.

Fig 4: Secciones horizontales en niveles mediales del conus papillaris (CP) en *G. galloti*. A) En el E-33 se esboza el CP formado por una pequeña papila con numerosas células ovoides. B) En el E-35, se observan las primeras células con gránulos de pigmento (flechas) y lagunas extracelulares o vasos en fase del desarrollo, en la base del conus (cabezas de flechas). C) En el E-37, las células pigmentadas se distribuyen por todo el conus. D) En el E-39, los vasos ocupan la longitud completa de la estructura. E) En eclosión, se aprecian los vasos centrales más desarrollados y rodeados por numerosas células pigmentadas. F) En adultos aumenta la luz de los vasos centrales (*) continúan rodeados por células pigmentadas. A: 1350x; B, C, D, E: 350x; F: 150x.

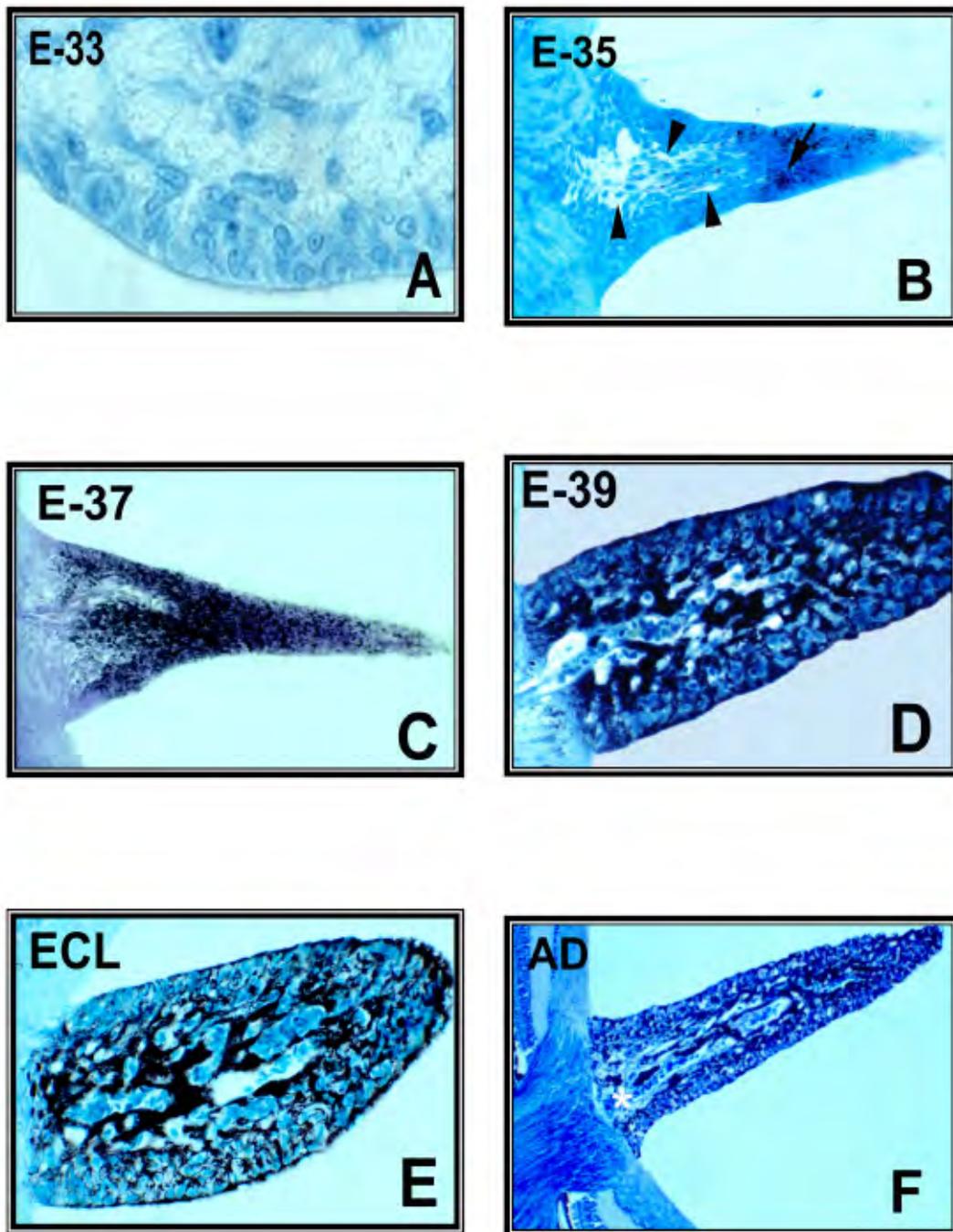


Fig 4.

3. INMUNOHISTOQUÍMICA DE LAS CÉLULAS GLUTAMINA SINTETASA

En general, la distribución de las células Glutamina sintetasa (GS) varía en función de las zonas de la vía óptica, y su intensidad depende de la región o del estadio que se considere (Tabla 1).

A continuación se describirán los resultados obtenidos con la GS en las siguientes zonas de la vía óptica: pared ventricular hipotalámica, tracto, quiasma, nervio óptico, conus papillaris y retina.

3.1. PARED VENTRICULAR HIPOTALÁMICA

La inmunoreactividad comienza a partir del E-34, con células GS-positivas débilmente marcadas y aumenta gradualmente del E-36 a ejemplares adultos, donde se observa la máxima inmunoreactividad (Tabla 1), (Fig. 5 A,B). En niveles dorsales y desde el E-37 hasta el estadio de eclosión, llama la atención la gran cantidad de células GS-positivas próximas a la zona ventricular proliferativa del hipotálamo, las cuáles, no se observan en ejemplares adultos (datos no mostrados).

3.2. TRACTO ÓPTICO

A partir de E-37, se observan algunas células GS-positivas débilmente marcadas paralelas a las fibras del tracto y próximas a la pímadre. Estas características se modifican gradualmente desde este estadio hasta ejemplares adultos, donde se observan numerosas células ovoides intensamente marcadas (Tabla 1).

3.3. QUIASMA ÓPTICO

A partir del E-34, se observan células GS-positivas dispersas por el quiasma, de morfología estrellada y escasa inmunoreactividad en todos los niveles.

El E-37, se caracteriza por presentar células con diferente morfología y disposición en los distintos niveles. De esta manera, en niveles dorsales, las células son estrelladas y se disponen laxamente (Fig. 5C,D), mientras que en los mediales, presentan células

ovoides, distribuidas generalmente en la periferia del quiasma y entre los haces de fibras (Fig. 5 E,F). Del E-38 al E-40, en niveles mediales, las células ovoides están dispersas por toda la superficie del quiasma, sin embargo, en los niveles dorsales no se modifican. Finalmente, y de eclosión a ejemplares adultos, las células ovoides GS-positivas se disponen en hileras y siguen la dirección de las fibras en todos los niveles.

En síntesis, la inmunoreactividad y número de las células ovoides aumenta de forma gradual desde el E-34 hasta ejemplares adultos (Fig. 5G,H), (Tabla 1).

3.4. NERVIÓ ÓPTICO

Desde el E-35 al E-37, observamos las primeras células GS-positivas estrelladas y dispersas en el NO, en zonas limítrofes al quiasma y con inmunoreactividad débil. Entre el E-37 y el E-38 se detectan en la zona medial del nervio (ZMN) las primeras células ovoides GS-positivas débilmente marcadas, en hileras y en la dirección de las fibras, así como estrelladas próximas al quiasma. La cabeza del nervio óptico (CNO) se caracteriza por la presencia de células ovoides con largos procesos GS-positivos en la zona peripapilaris (ZP), en la zona de transición nervio-retina (ZTNR) y en la zona limitante nervio retina (ZLNR). En E-40, la intensidad y el número de células ovoides GS-positivas aumenta en las tres regiones del nervio, particularmente en la CNO (Fig. 6A). Finalmente, de E-40 a ejemplares adultos, concretamente en eclosión, la población celular GS-positiva sigue aumentando en número e intensidad de marcaje (Figs. 6B,C,D,E). En adultos, se observa la máxima expresión y densidad de la proteína GS en poblaciones de células ovoides de la CNO, ZMN y zona caudal del nervio (ZCN) (Figs. 7A,B,C,D).

3.5. CONUS PAPILLARIS

Esta estructura está formada por una pequeña protuberancia que se proyecta hacia el humor vítreo (HV), con escasas células GS-positivas marcadas débilmente en la zona apical desde E-34 a E-36 (Fig. 8A). El conus papilaris (CP) al tiempo que crece en longitud, se vasculariza y las células GS-positivas se distribuyen de diferente manera según los estadios del desarrollo. Al respecto, en el E-37, la células GS-positivas aumentan y se extienden en toda su superficie (Fig. 8B). Desde el E-38 hasta eclosión,

las células conservan la misma intensidad de marcaje, sin embargo disminuye el número y se localizan preferentemente en la periferia que contacta con el vítreo y en la zona basal (Fig. 8C). Finalmente, en postnatales, la inmunoreactividad decrece y ya no se observa en ejemplares adultos (Fig. 8D).

3.6. RETINA

A partir del E-37, se observa débil inmunoreacción GS a nivel de los pies de Müller vitreales, que aumenta en el E-39 en procesos y pies de Müller en las CNI, CPE y CNE (Fig. 9A). Esta inmunoreactividad se mantiene hasta eclosión donde la expresión de GS aumenta en intensidad y se extiende por los procesos celulares, desde la membrana limitante interna (MLI) hasta la membrana limitante externa (MLE) (Fig. 9B). A partir de este estadio aumenta gradualmente la intensidad en dichas células y es máxima en ejemplares adultos (Fig. 9 C,D).

Tabla 1. Inmunoreactividad de la glutamina sintetasa (GS) e intensidad del marcaje en las distintas regiones de estudio durante la ontogenia: (-) no existe marcaje; (+) ligeramente marcado; (++) marcaje medio; (+++) marcaje alto; (++++) marcaje muy alto.

	Pared ventricular hipotalámica	Tracto óptico	Quiasma	Nervio	Conus	Retina
E-34	+	-	+	-	+	-
E-37	++	+	++	+	++	+
E-39	+++	+	+++	++	++	++
Eclosión	+++	+	+++	+++	++	+++
Adulto	++++	++++	++++	++++	-	++++

Fig 5: Inmunomarcaje de la glutamina sintetasa (GS) en cortes horizontales del hipotálamo y quiasma óptico en *G. galloti*. A) En el E-37, se observan las células ventriculares positivas en la pared ventricular hipotalámica a nivel medial (flechas). B) En E-40, se aprecian células fuertemente reactivas en la pared ventricular hipotalámica en niveles mediales (flechas). C) En el E-37, en la zona dorsal del quiasma, se observan células estrelladas positivas (flechas). D) Ampliación de la zona C. E) En el E-37, en el quiasma y en un nivel medial, se aprecia marcaje de células situadas en la periferia (flecha) y en la intersección de los nervios (cabezas de flecha). F) Ampliación de dicha intersección en E (cabezas de flechas). G) Quiasma de ejemplares adultos a nivel medial, donde se destaca la intensa inmunoreactividad de las células ovoides que siguen la dirección de las fibras del nervio (flechas). H) Ampliación de las células ovoides intensamente marcadas (flechas), mostradas en G. A, B, D: 1150x; C, E: 280x; F, H: 1200x; G: 110x.

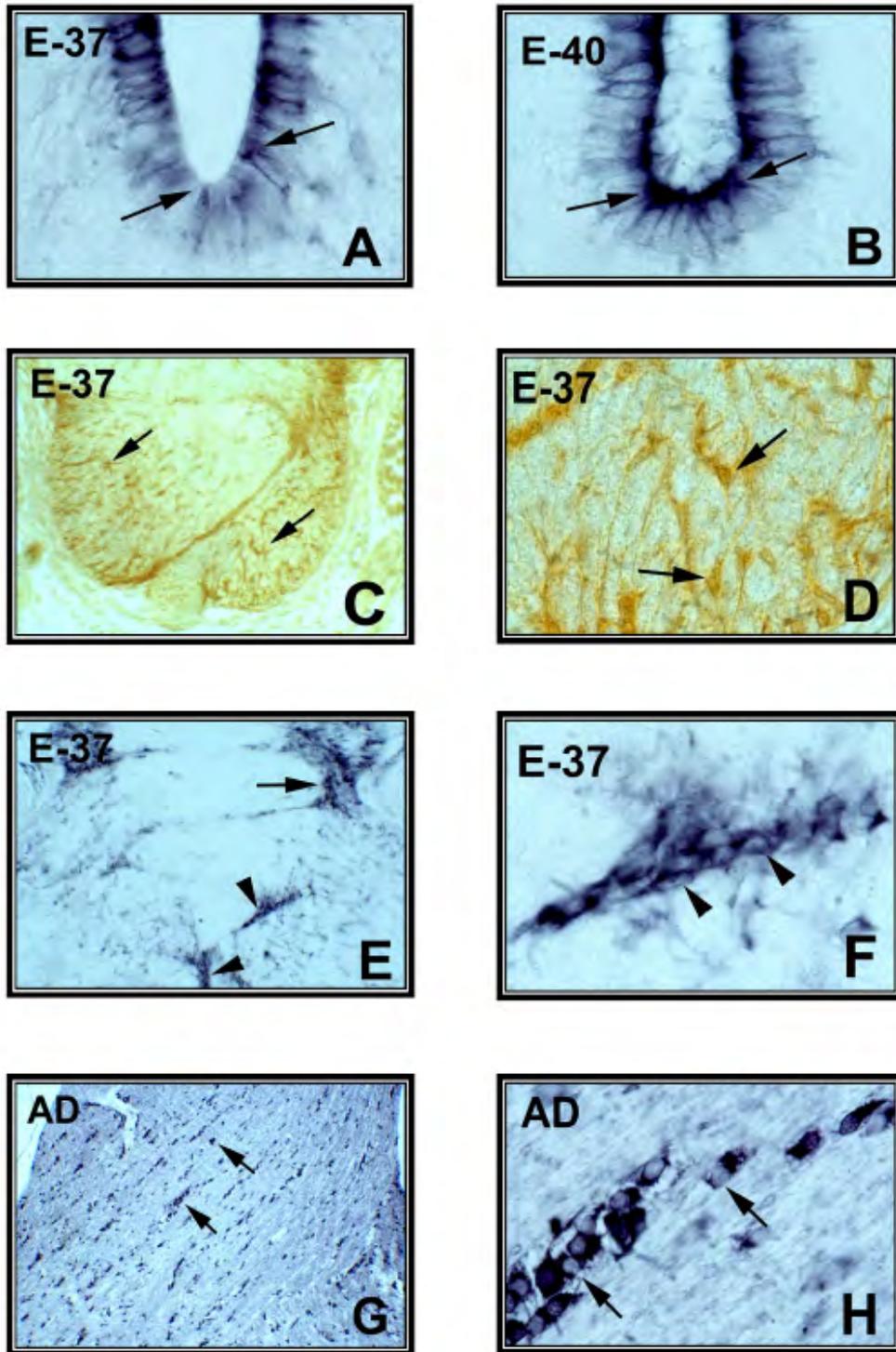


Fig 5.

Resultados

Fig 6: Inmunoreactividad de la glutamina sintetasa (GS) en secciones horizontales del nervio óptico en niveles medios de *G. galloti*. A) En el E-40, se observa positividad en células ovoides de la CNO (flechas). B) En eclosión, se aprecia la distribución heterogénea en las células ovoides. Ampliación de las células (flechas) de la CNO (C), la zona medial (D) y caudal del nervio (E). A, E: 1150x; B: 350x; C, D: 1350x.

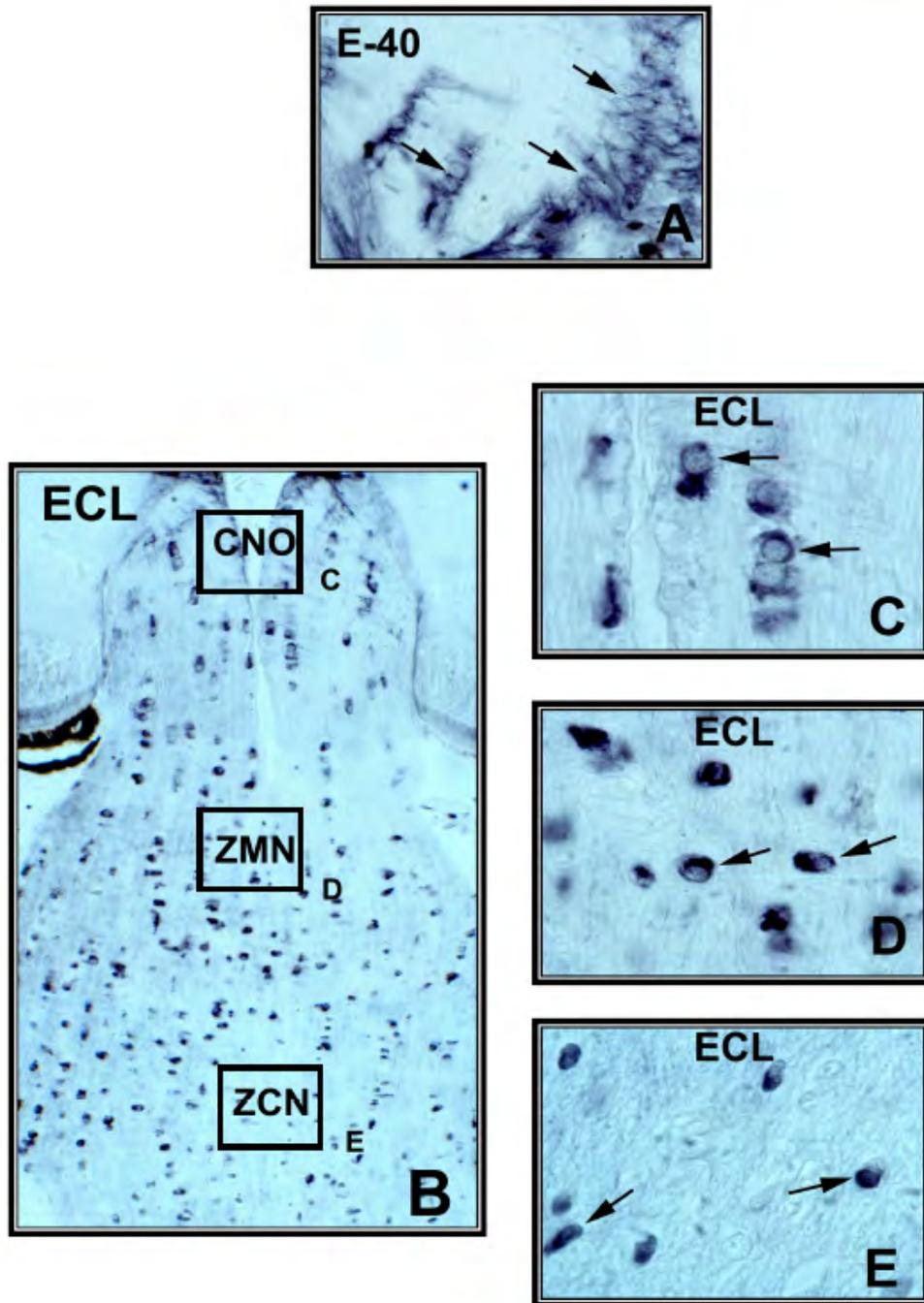


Fig 6.

Fig 7: Inmunomarcaje de células GS-positivas en cortes horizontales del nervio óptico en ejemplares adultos de *G. galloti*. A) Obsérvese la diferente distribución de las células en las distintas zonas del nervio óptico. B) Mayor detalle de las células ovoides positivas (flechas) y de sus procesos (cabezas de flechas) en la CNO. C) Aumento de las células intensamente marcadas dispuestas en hileras en la ZMN. D) Detalle de las células ovoides con intensa inmunoreactividad en la ZCN. A: 150x; B, C, D: 1150x.

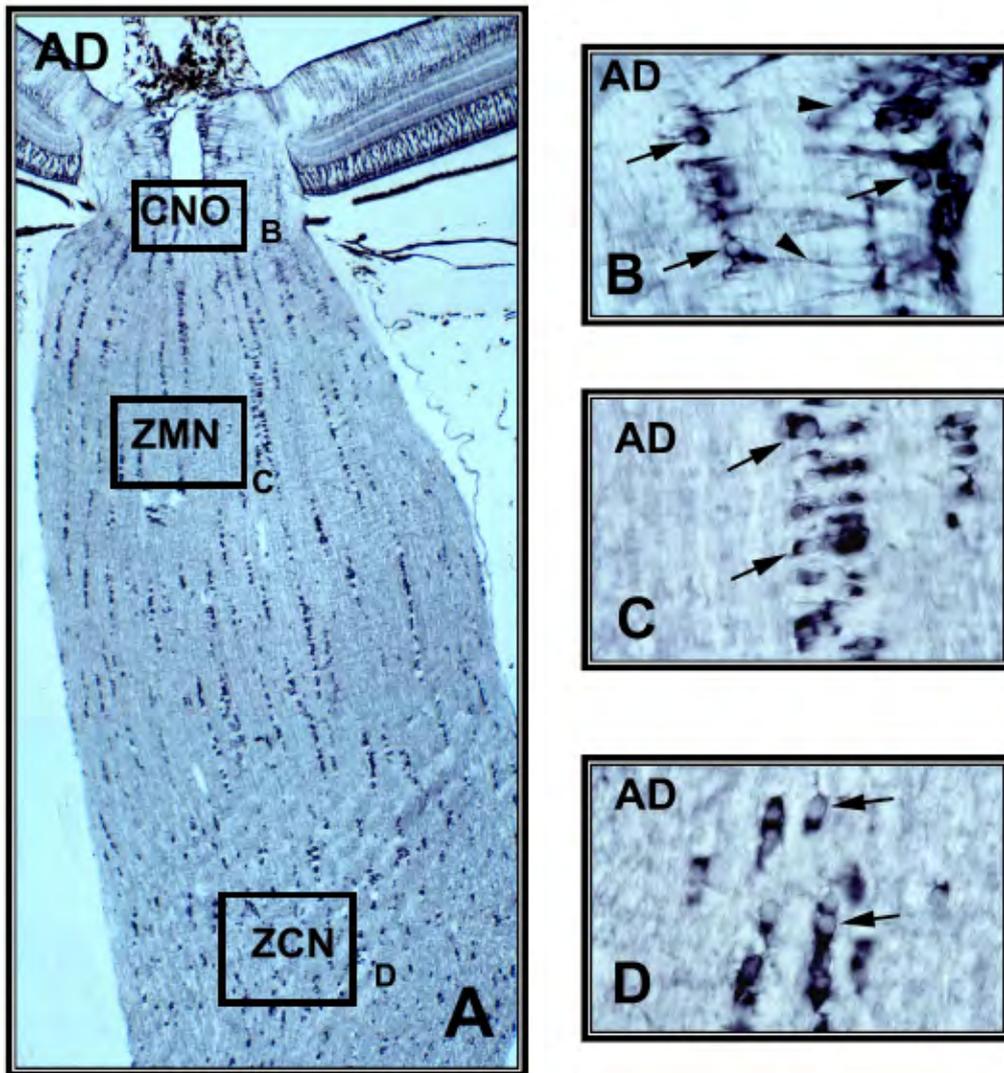


Fig 7.

Fig 8: Inmunomarcaje en cortes horizontales del conus papillaris (CP) durante el desarrollo en *G. galloti*. A) En el E-34, se muestran células GS-positivas débilmente marcadas en el ápice del conus (flechas). B) En el E-37, el marcaje de la enzima se encuentra por toda la superficie del CP. C) En el E-39, se muestra marcaje solo en las células de la zona basal (flechas). En B y C: Se aprecia intensa inmunoreactividad de la glía peripapillaris en la base del conus (asteriscos). D) En ejemplares adultos el marcaje es negativo en dicha estructura. A: 150x; B, C, D: 350x.

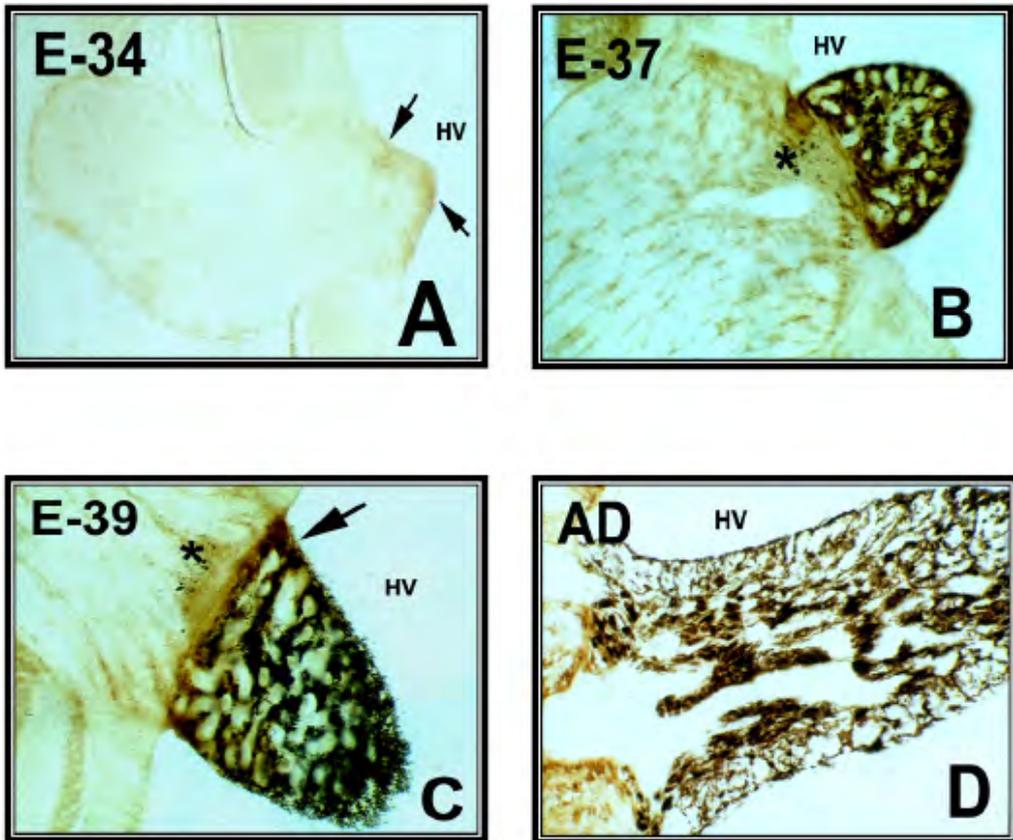


Fig 8.

Fig 9: Inmunoreactividad de la GS en cortes horizontales de la retina durante el desarrollo de *G. galloti*. A) En el E-39, se aprecia débil marcaje en los pies de Müller (flechas). B) En Eclosión, aumenta en pies (flechas) y procesos de Müller (cabezas de flechas). C) En adultos, se observa fuerte marcaje en los procesos y pies de Müller en todas las capas de la retina desde la MLI a la MLE. D) Aumento de (C) donde se muestran las células de Müller GS⁺ en las diferentes capas retinales, y especialmente en la capas nucleares y en la ganglionar: Pies de Müller vitreales (flechas) Pies de Müller externos (flecha gruesa); procesos de Müller (cabeza de flechas); soma de las células de Müller (asteriscos). CF: capa de fotorreceptores, CNE: capa nuclear externa, CPE: capa plexiforme externa, CNI: capa nuclear interna, CPI: capa plexiforme interna, CG: capa ganglionar, CFN: capa de fibras del nervio, HV: humor vítreo. A, B, C: 550x; D: 2000x.

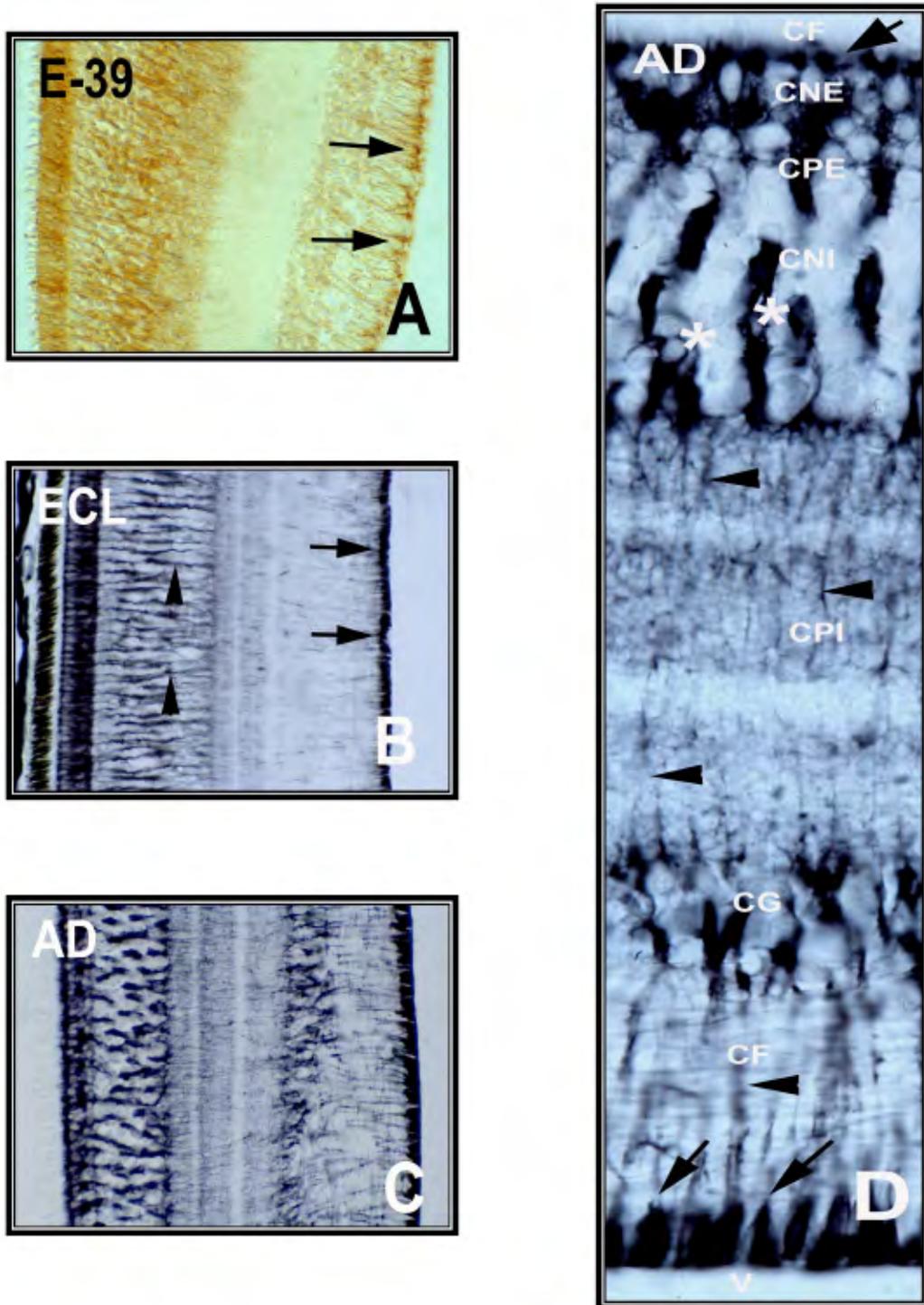


Fig 9.

4. INMUNOHISTOQUIMICA DE DOBLES MARCAJES GS/GFAP

En la vía óptica, las proteínas GS y GFAP coexisten a partir del E-37 y aumentan gradualmente hasta ejemplares adultos, donde la reactividad es máxima en todas las zonas de estudio, excepto en ZTNR y en el conus papillaris. En este, la GS muestra intensa inmunoreactividad desde el E-37 hasta el E-40, pero no se observa coexistencia con la GFAP, y la población celular es negativa con los dos marcadores en adultos.

En **la retina**, se detecta coexistencia muy débil con ambos marcadores en los pies de Müller en el E-37 (Fig. 10A,B), y los procesos comienzan a ser GS-positivos en el E-39. A medida que avanza el desarrollo y gradualmente hasta adultos, el doble marcaje GS/GFAP en los pies se incrementa y la expresión de la GS aumenta en los procesos de Müller por toda la superficie de la retina (Fig. 10C,D). Al respecto, en la retina solo hemos observado células de Müller con ambos marcadores.

También en **la cabeza del nervio óptico (CNO)** se distinguen varias zonas:

Zona 1: Se sitúa en la zona peripapillaris, donde coexisten ambos marcadores, y se observa que la GS es más intensa que la GFAP, en el E-37 (Fig. 11A,B). Desde E-37 hasta postnatales el doble marcaje aumenta (Fig. 11C,D) observándose la máxima reacción en adultos (Fig 12A,B,C).

Zona 2: Se sitúa distalmente a la zona peripapillaris y en ella coexisten ambos marcadores desde E-37 hasta eclosión (Fig 11 A,B,C,D). En adultos se observan dos poblaciones celulares, una se dobleinmunotiñe y otra expresa solo la GS (Fig. 12A,B,C.)

Zona 3: Es la zona limitante entre el nervio y la retina (ZLNR), en la que coexisten ambos marcadores con intensa reactividad desde el E-37 (Fig. 11E,F), hasta adultos (Fig. 12B,C).

Zona 4: Es la zona de transición nervio-retina (ZTNR), donde el marcaje es negativo en el E-37 para ambos marcadores (Fig. 11E,F), solo se observan células

Resultados

GFAP positivas en el E-40 (Fig. 11G,H) y conforme avanza el desarrollo es inmunoreactiva para ambos marcadores, observándose una fuerte reacción en ejemplares adultos (Fig. 12A,B).

En la **zona medial del nervio (ZMN)** ambos marcadores coexisten durante el desarrollo y en adultos se estudian dos zonas:

Zona 5: Próxima a la CNO y caracterizada por la presencia de numerosas células doblemente marcadas (Fig. 13A,B).

Zona 6: Más distal a la CNO con una población de células GS/GFAP positivas y otra solo GS positiva (Fig. 13C,D).

En la **zona del quiasma** y en sus proximidades con el nervio, se aprecian numerosas células doblemente teñidas desde el E-37 hasta eclosión, destacando intensa inmunoreactividad de las células GS-positivas en el E-37. En estadios más avanzados la intensidad aumenta y permanece aproximadamente igual en adultos. En estos, y en ambas regiones se han diferenciado tres subpoblaciones: $GS^+/GFAP^-$, $GS^-/GFAP^+$ y $GS^+/GFAP^+$, observándose un aumento en el número de células (Fig. 14A,B.)

En la **región hipotalámica** y en E-37, se observa que, en la zona ventricular la GS es más intensa que la GFAP, pero en la zona intermedia, es a la inversa (Fig. 15A,B). El marcaje en ambos marcadores aumenta en la zona ventricular hasta el E-40, y los procesos de las células ventriculares que llegan hasta la pía son más intensos con la GS que con la GFAP (Fig 15C,D). Asimismo en E-40, se observan células gliales $GFAP^+$ (Fig 15D), sin embargo las GS^+ son escasas (Fig 15C). En ejemplares adultos la dobleinmureacción es muy alta en la pared ventricular (Fig. 15E,F) y además se observan células donde colocan ambos marcadores o no (Figs 15E,F).

Resultados

Fig 10: Doble inmunofluorescencia para GS (rojo) y GFAP (verde) en la retina de *G. galloti*. (A,B) En E-37, se observa débil marcaje de ambas proteínas en los pies de Müller (flechas). (C,D) En el adulto se muestra intensa inmunoreactividad en los pies de Müller (flechas) con ambos marcadores. Nótese la intensa inmunotinción de la GS en los procesos de las células de Müller (cabezas de flechas). A, B: 550x; C,D: 350x.

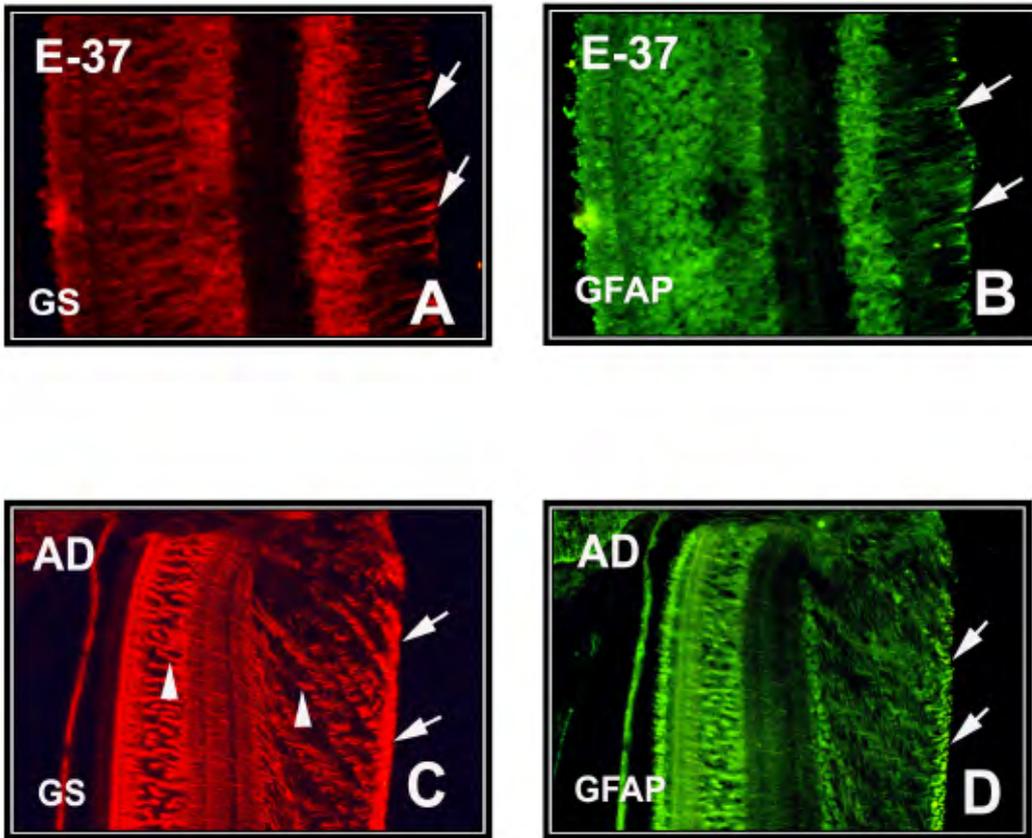


Fig 10.

Fig 11: Doble inmunofluorescencia con GS (rojo) y GFAP (verde) en la CNO de *G. galloti*. Obsérvese en las zonas 1, 2, 3, 4, la coexpresión de ambos marcadores en el E-37 (A,B) y en E-40 (C,D). En la ZLNR (flechas) también se observan células doblemente marcadas en E-37 (E,F) y E-40 (G,H), sin embargo en la ZTNR(cabeza de flecha) solo se detecta la GFAP en E-40. Zona 1 (ZP): Zona peripapilaris; Zona 2: distal a la peripapilaris; Zona 3 (ZLNR): zona limitante nervio retina; Zona 4 (ZTNR): zona transición nervio retina. A, B, G, H: 350x; C, D, E, F: 550x.

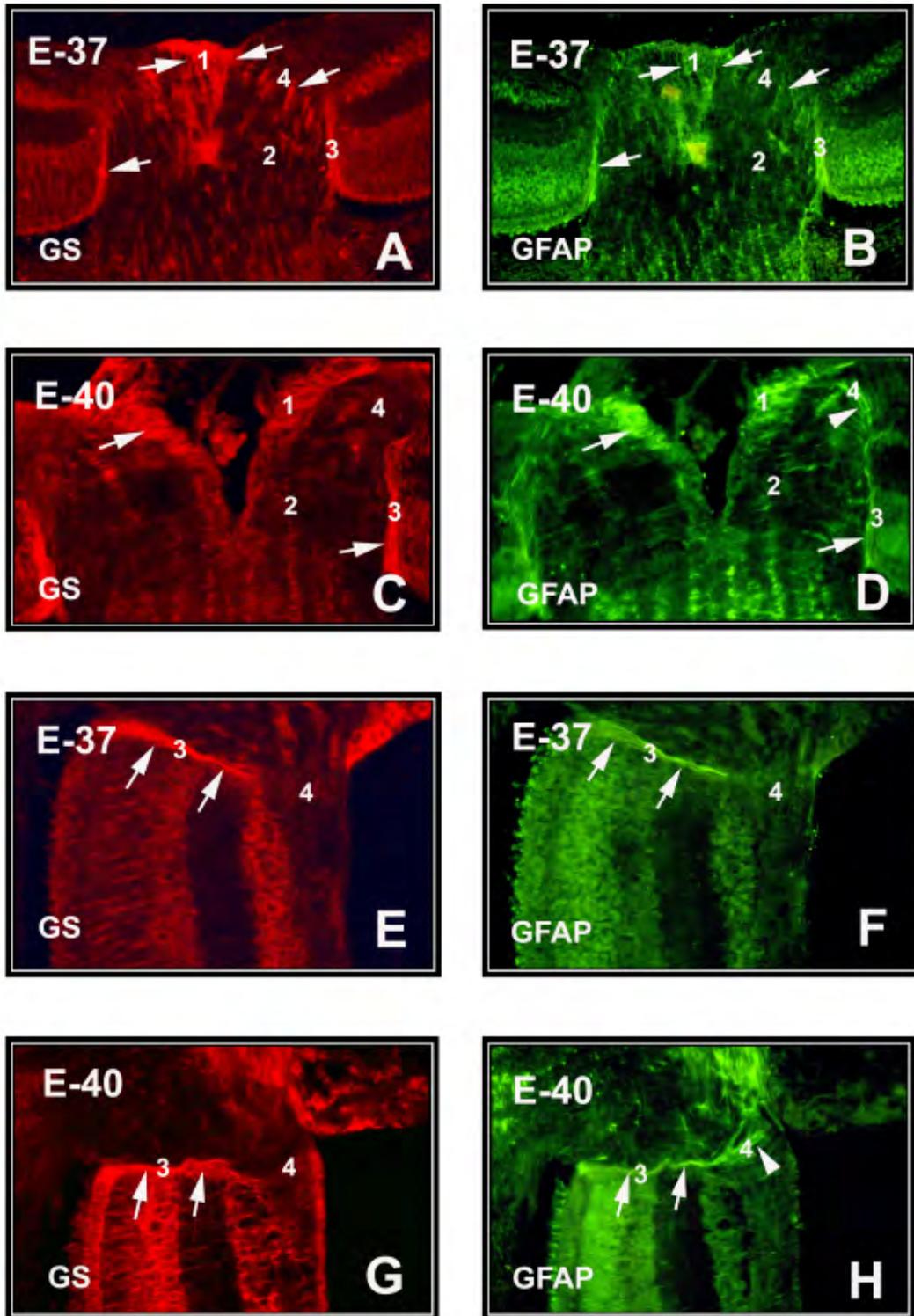


Fig 11.

Fig 12: Triple inmunofluorescencia con GS (rojo), GFAP (verde) y DAPI (azul) en distintas zonas de la CNO de ejemplares adultos de *G. galloti*. (A,B,C) Nótese la presencia de células positivas para los tres marcadores en la zona peripapilaris (zona 1); en la ZLNR (zona 3) y en la ZTNR (zona 4). En la zona 2 distal a la peripapilaris observamos células GS⁺/DAPI⁺ doblemente marcadas (cabeza de flecha en B), así como positivas para los tres marcadores (flechas en A, B y C). A, B, C: 450x.

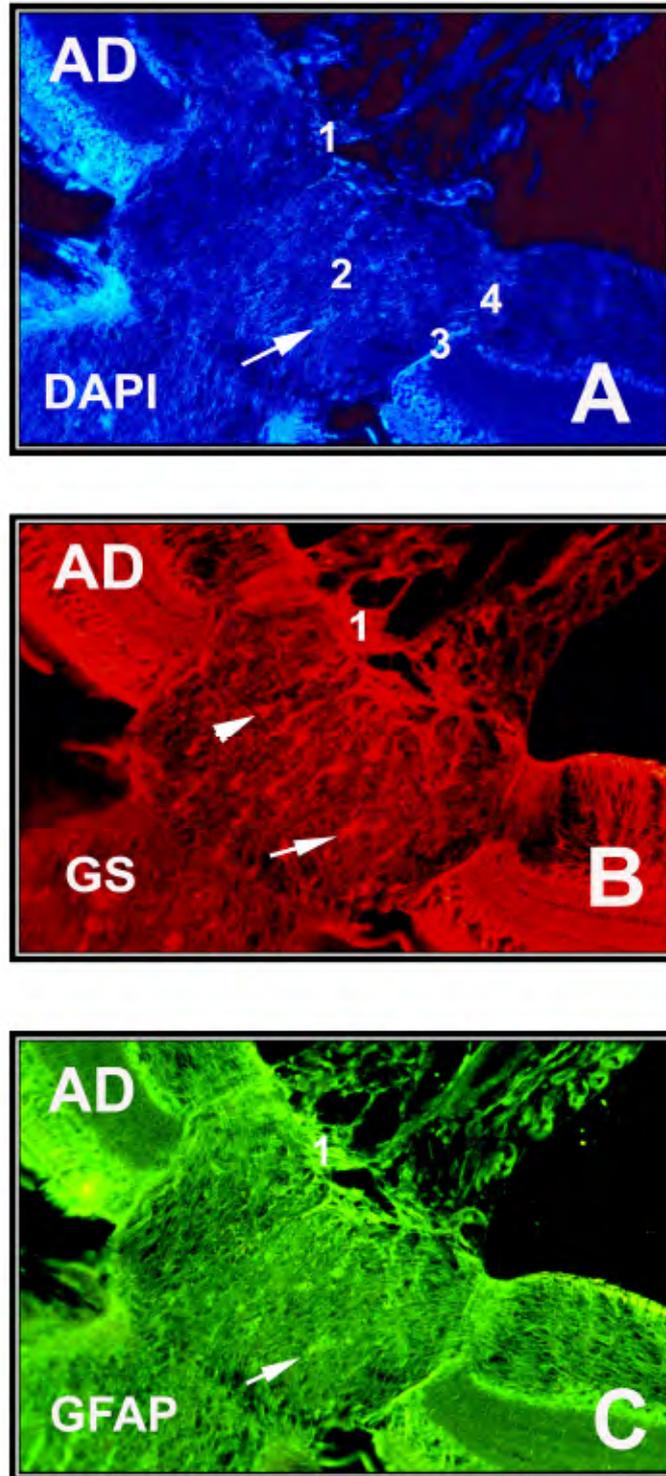


Fig 12.

Fig 13: Doble inmunoreacción de GS (rojo) y GFAP (verde) en la zona medial del nervio en *G. galloti* adulto. (A,B) En la zona próxima a la CNO (zona 5) se muestra amplia coexistencia de los dos marcadores (flechas). (C,D) En una zona más distal (zona 6), se observan numerosas células inmunoreactivas sólo para la GS (cabezas de flechas), y para ambos marcadores (flechas). A, B, C, D: 550x.

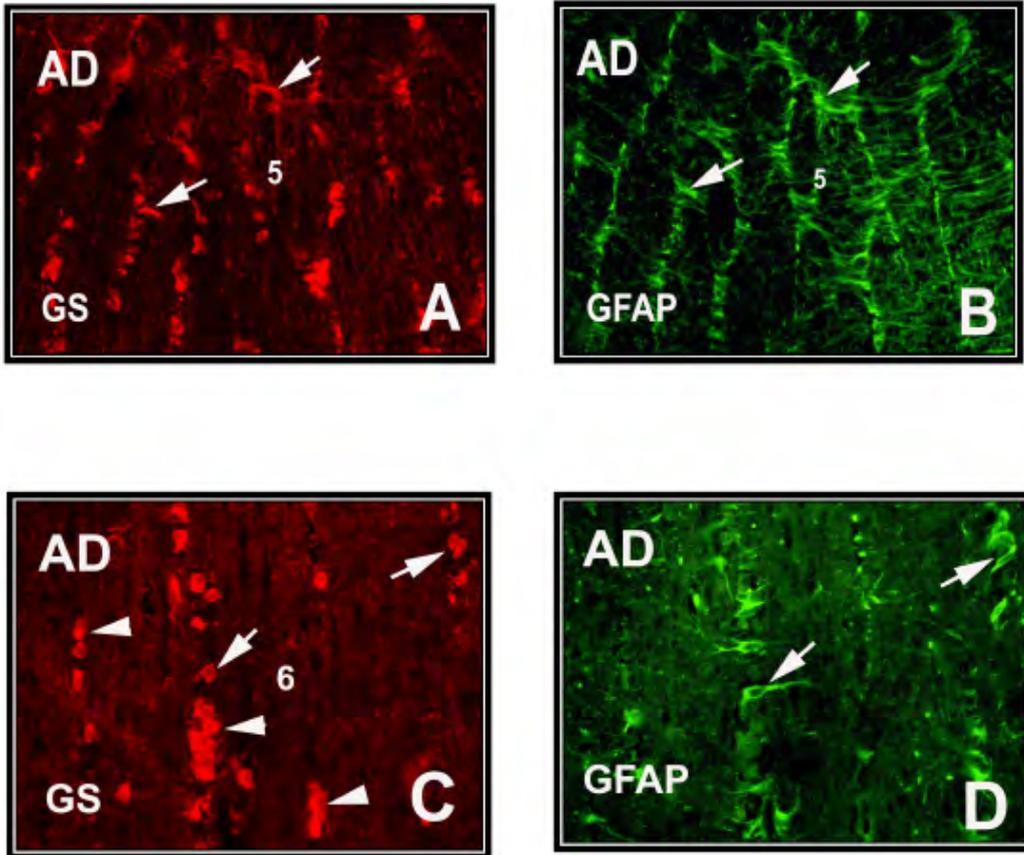


Fig 13.

Fig 14: Triple inmunoreactividad de la GS (rojo), GFAP (verde) y DAPI (azul) en el quiasma de *G. galloti* adulto. (A, B) Se destacan células GFAP⁺/GS⁺ (flecha gruesa). También se detectan células GFAP⁺/GS⁺ (flechas) y GFAP⁺/GS⁻ (cabeza de flechas) A, B: 1050x.

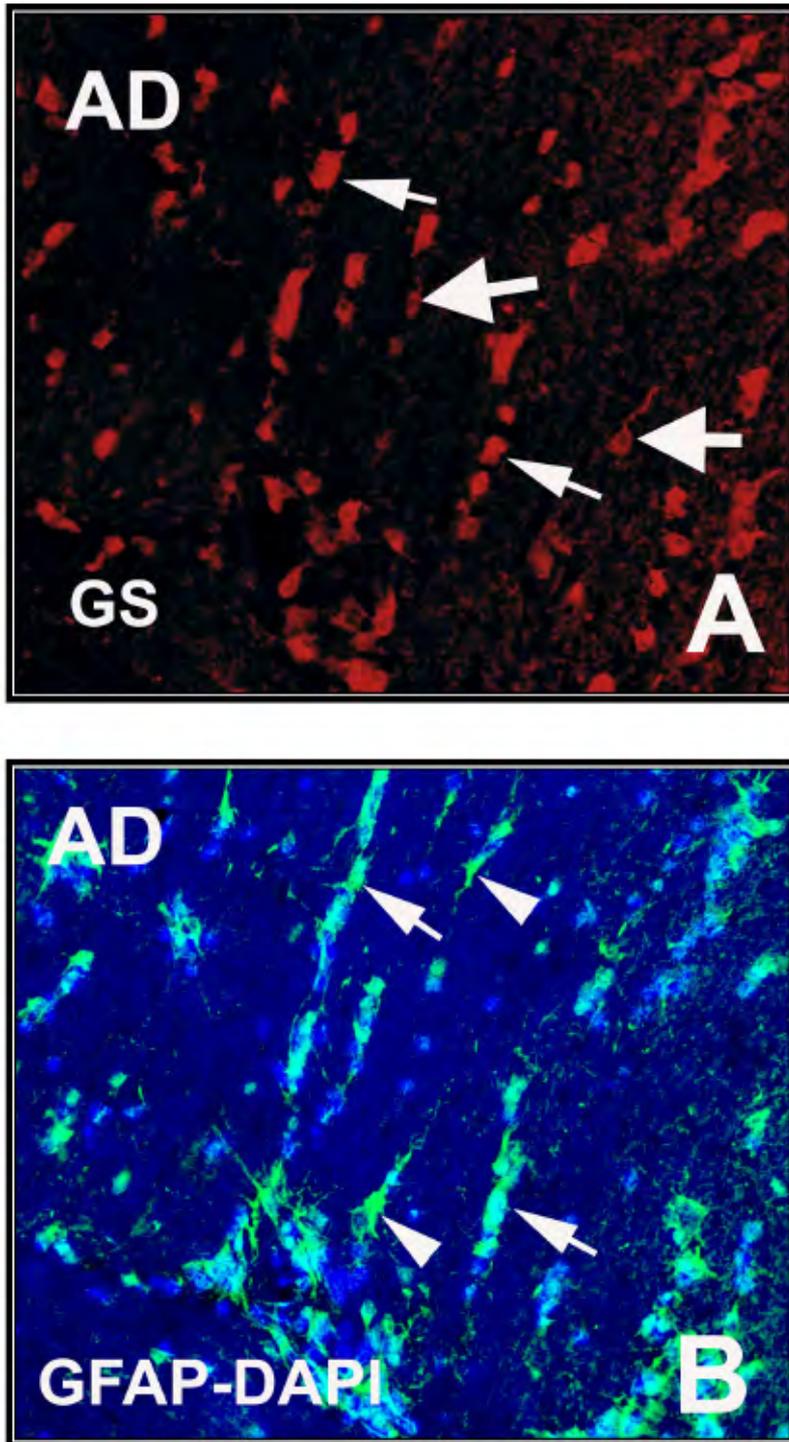


Fig 14.

Fig 15: Doble inmunoreactividad de la GS (rojo) y GFAP (verde) en el hipotálamo de *G. galloti*. (A,B) En el E-37, se muestra intensa inmunoreactividad GS⁺ (flechas) y GFAP⁺ (cabezas de flechas) en las células ventriculares. (C,D) En el E-40 se observa intenso marcaje GS+/GFAP+ en la ZV (flechas) y en los procesos celulares que se prolongan hasta la pía (flecha gruesa). Asimismo se aprecian células GFAP+. (E,F) Células GS⁺/GFAP⁺ en la zona periventricular (flechas) de ejemplares adultos. Además, se observan células gliales donde colocalizan los dos marcadores (flechas) o no (cabeza de flechas) en el tracto óptico (A, B, C, D): 550x; E, F: 350x.

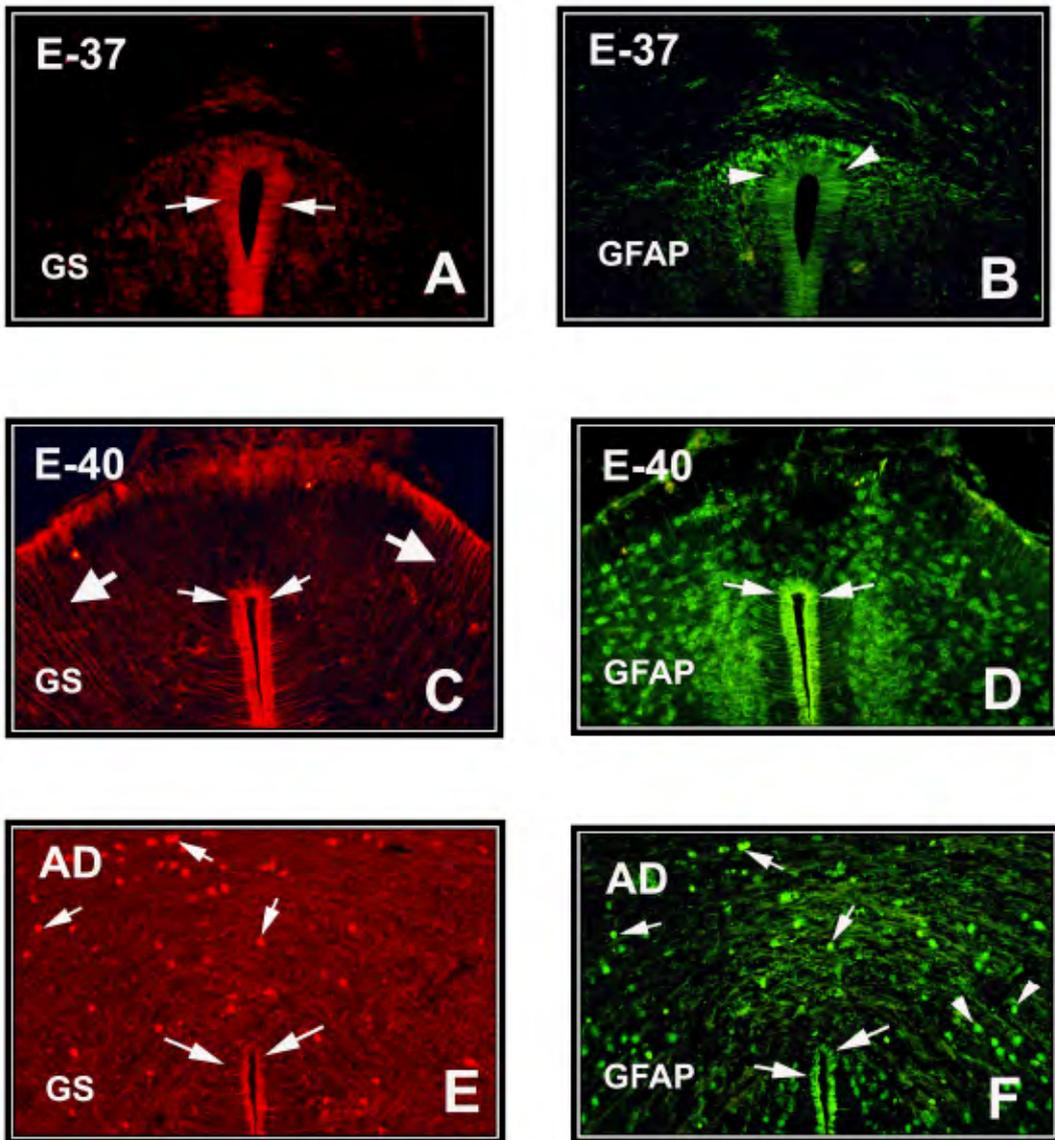


Fig 15.

5. CÉLULAS LECTINA POSITIVAS (*Lycopersicon esculentum*) EN LA VÍA ÓPTICA.

5.1. CONUS PAPILLARIS

A partir del E-35 comienzan a observarse por primera vez células lectina positivas (LEA⁺), con apariencia de microglía ameboide adosadas o rodeando al esbozo del conus papillaris (CP) que contacta con el humor vítreo. A partir del E-37, destaca un aumento de la población celular LEA⁺ por toda la superficie del conus, además de células de aspecto ameboide en el interior (Fig. 16A,B). En adultos, la intensidad de marcaje aumenta en el conus en relación a los primeros estadios, mostrando también en su interior células lectina positivas de aspecto ameboide aunque no en la superficie que contacta con el humor vítreo (Fig. 16C,D).

5.2. RETINA

Desde el E-35 se detectan las primeras células LEA⁺ de pequeño tamaño con apariencia de microglía ameboide en la CFN y en la MLI (Fig. 17B) y paralelamente en el margen ciliar, se aprecian procesos de células de Müller LEA⁺ que van desde la MLI hasta la MLE (Fig. 17A). En el E-37, se aprecian escasas células LEA⁺ de apariencia dendrítica en la CFN (Fig. 17C) y pseudopódicas adosadas a la MLI (Fig. 17D). En el E-40, se observa microglía de apariencia dendrítica entre la CNI y CPI, así como células de aspecto ameboide en la CG (Fig. 17E).

En la retina periférica del E-37, aparecen células pequeñas LEA⁺ de apariencia ameboide en la capa ganglionar y en la CPE se observa marcaje positivo a modo de pequeñas puntuaciones (Fig. 18A). Además, los procesos de las células de Müller comienzan a ser positivos, en la superficie de la retina sobre todo en la CPI. Asimismo, se observa que la futura capa de fotorreceptores es también LEA⁺ (Fig. 18A).

En el E-40, se observa marcaje en la capa de fotorreceptores, en la CPE, CNI, CPI y CG como en el estadio anterior (Fig. 18B). Asimismo, se destaca en la CPI una banda LEA⁺ en la retina central, no observada en la retina periférica (Fig. 18B).

En el adulto, la CFN se caracteriza por la presencia de células LEA⁺ similares a las ameboides y pseudopódicas, y en contacto con las células ganglionares se observan células LEA⁺ ameboides (Fig. 19A). La CPI muestra varias hileras de células microgliales, que ocupan toda la extensión de la retina (Fig. 19A,B). Por otro lado, la CNI presenta cuerpos celulares LEA⁺ centrados en dicha capa o próximos a la CPE (Fig. 19A,C). Asimismo, los procesos de Müller y la capa de fotorreceptores continúan siendo reactivos por toda la retina (Fig. 19A,B,C).

5.3. NERVIO

A partir del E-35, se observan las primeras células LEA⁺ en la CNO, caracterizadas por ser pequeñas y de morfología estrellada o bipolar. Se distribuyen principalmente en la zona de transición nervio retina (ZTNR) (Fig. 20A) y en la base del CP, destacando que en ambas zonas la población celular es muy alta. Sin embargo, en la ZMN las células son escasas, aunque aumentan en la ZCN, pero en ambas zonas las células son pequeñas de apariencia ameboides o dendríticas que se orientan en dirección a las fibras del nervio (Fig. 20 B,C).

En el E-37 en la CNO, numerosas células LEA⁺ se distribuyen por toda la superficie de la CNO, y en la ZTNR se disponen a modo de barrera, presentando la misma morfología que en estadios anteriores (Fig. 20D). Por otra parte, en E-37 y en la ZMN se observan escasas células LEA⁺ de morfología dendrítica (Fig. 20E) y en la ZCN se aprecian células positivas dendríticas (datos no mostrados) y ameboides (Fig. 20F).

En el E-40, en la CNO, se detectan numerosas células LEA-positivas bipolares y estrelladas en la ZTNR, igual que en estadios anteriores (Fig. 21A). En la zona medial y caudal del nervio se aprecian escasas células positivas ameboides y dendríticas (Fig. 21B,C). En el adulto, las células LEA⁺ se distribuyen de manera dispersa en la CNO y no se concentran en la ZTNR como en estadios anteriores, siendo pequeñas y redondeadas con finos y pequeños procesos (Fig. 21D,E).

En la ZMN y ZCN la mayor parte de las células LEA⁺ responden a las formas primitiva ramificada y ramificada y están dispersas por toda la superficie del nervio. Por otro lado, en la ZMN algunas células pequeñas alargadas y ovoides LEA⁺ se disponen

entre las hileras de células macrogliales. También se observan células ovoides próximas a la arteria central del nervio (Fig. 21F) y ramificadas asociadas a los vasos sanguíneos (Fig. 21G). Otra constante a destacar durante el desarrollo sería la presencia de esta lectina en los vasos sanguíneos (Fig. 21G).

5.4. QUIASMA ÓPTICO

En niveles mediales del quiasma y desde E-35 a E-37 observamos pequeñas células ameboides y pseudopódicas (Fig. 22A). Otro hecho a destacar en niveles dorsales del quiasma es la presencia de células ameboides próximas al límite del parénquima nervioso (Fig. 22B). En el E-40 es frecuente observar numerosas células pequeñas de morfología estrellada y células ramificadas. En adultos, las células LEA⁺ generalmente del tipo microglía ramificada, son muy numerosas y están distribuidas en toda la superficie del quiasma (Fig. 22C,D).

5.5. TRACTO ÓPTICO:

En el E-37, el tracto posee pequeñas células LEA⁺ de cortos procesos, distribuidas de forma dispersa, y escasas células fusiformes tipo dendrítica en la dirección de las fibras del tracto (Fig. 22E). En el E-40, se detectan numerosas células pequeñas, ovoides, bipolares y estrelladas distribuidas por la superficie del tracto (Fig. 22,F). En adultos, el número de células se reduce respecto a las fases perinatales, son ramificadas y se distribuyen por toda la superficie.

5.6. PARED VENTRICULAR HIPOTALÁMICA:

A partir del E-35, la zona ventricular (ZV) muestra células LEA⁺ de baja reactividad. En E-37 la tinción aumenta y se observan células ameboides positivas en el interior del ventrículo (Fig. 23A). En E-40 se produce un aumento de la reactividad en las células de la zona ventricular (Fig. 23B). Paralelamente, se aprecian numerosas células LEA⁺ colonizando todo el parénquima a nivel anterior del hipotálamo, en la región limítrofe con el tracto óptico (Fig. 23C). Asimismo, en niveles ventrales hipotalámicos, llama la atención la presencia de células ameboides positivas contactando con la piamadre (Fig. 23D) y células muy pequeñas puntiformes positivas

Resultados

en los límites del parénquima nervioso (Fig. 23D). En adultos continúan observándose células positivas en la zona proliferativa hipotalámica y es notoria la presencia de vasos LEA⁺.

Fig. 16: Células LEA⁺ en secciones horizontales del conus papillaris en niveles medios durante el desarrollo de *G. galloti*. A) En E-37, se muestran los vasos positivos a la lectina y células con apariencia de ameboides B) Detalle de células LEA⁺ de apariencia ameboide en el interior del conus papillaris (flechas) y en la superficie que contacta con el humor vítreo (cabeza de flechas). C) En adultos, se observan células de aspecto ameboide LEA⁺ en el interior del conus, vasos LEA⁺, aunque ya no se aprecian células positivas en el humor vítreo. D) Detalle del recuadro en (C), donde se destaca la reactividad de las células con apariencia de ameboides en el interior de los vasos. A, C: 300x; B, D: 1900x.

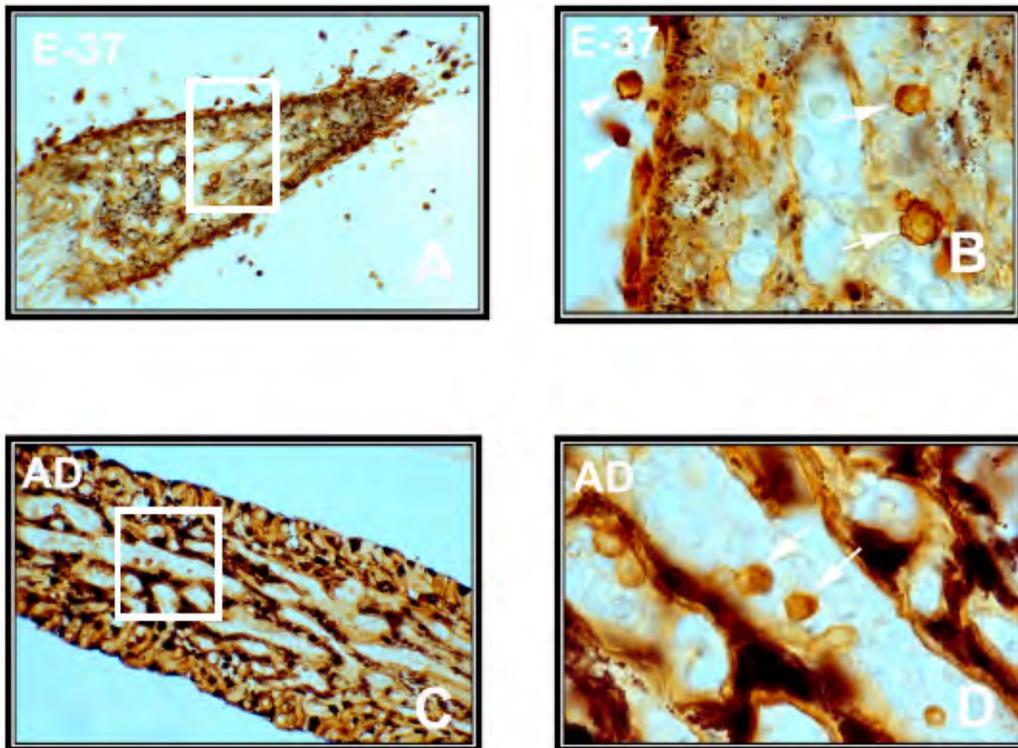


Fig 16.

Fig 17: Células LEA⁺ en niveles medios de la retina durante el desarrollo de *G. galloti*. A) En el E-35, se observan procesos de células de Müller LEA⁺ en la retina periférica (asteriscos). B) En el E-35 de las células reactivas de apariencia ameboide dispersas en la CFN y próximas a la CG de la retina central. C) En el E-37, se muestra una célula LEA⁺ de apariencia dendrítica en la CFN de la retina central. D) En el E-37, se aprecian células LEA⁺ pseudopódicas contactando con la MLI de la retina central. E) En el E-40, se muestran células positivas de apariencia dendrítica en la CNI limítrofes a la CPI (flechas) y células pequeñas positivas de aspecto ameboide en la CG (puntas de flechas). CFN: capa de fibras del nervio; CG: capa ganglionar; CNI: capa nuclear interna; CPI: capa plexiforme interna; MLI: membrana limitante interna. A,B,C,E: Óptica Normaski. A, C, D, E: 1200x; B: 1700x.

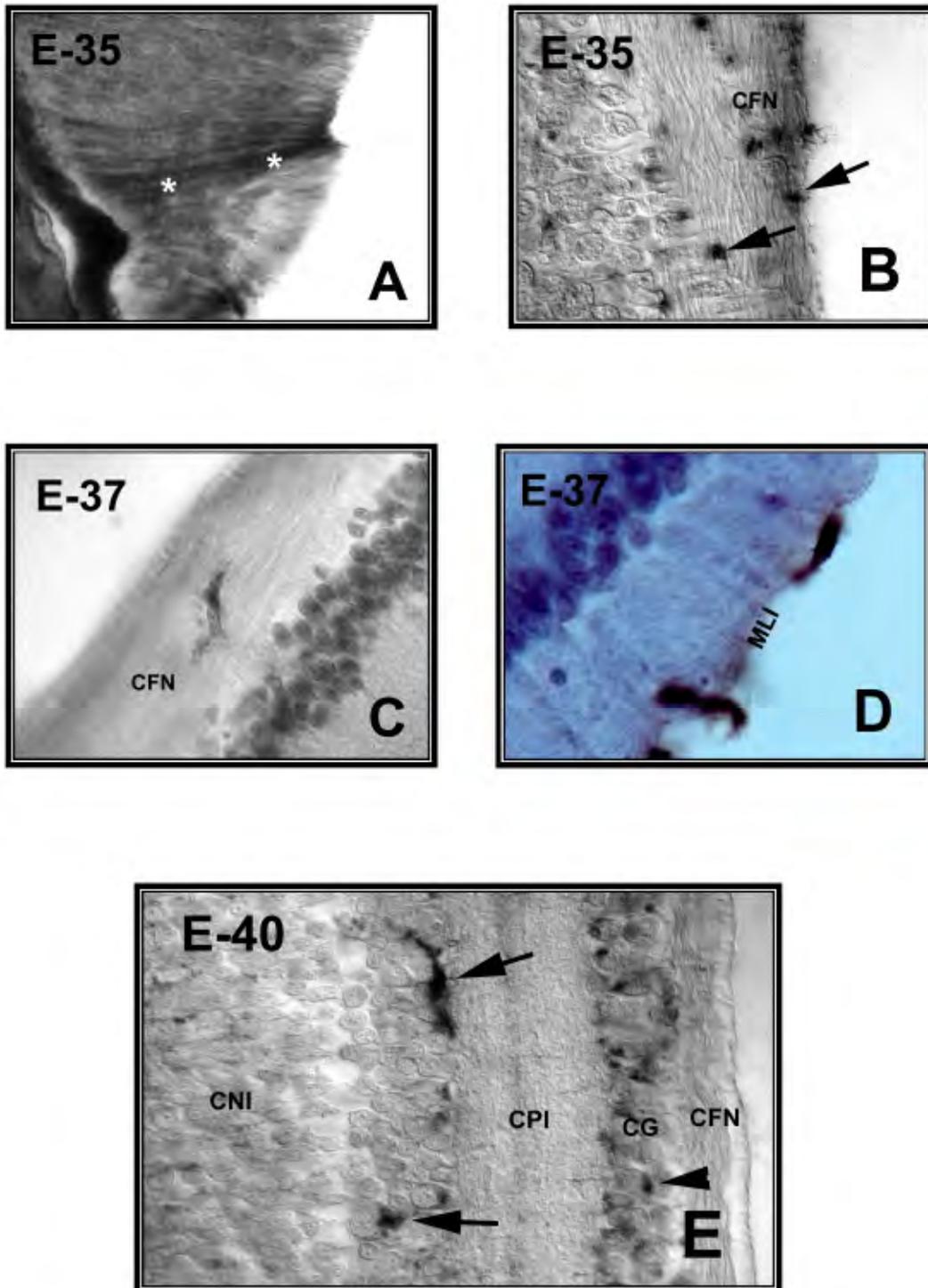


Fig 17.

Fig 18: Células LEA⁺ en niveles medios de la retina durante el desarrollo embrionario de *G. galloti*. A) En el E-37, en la retina periférica se observa positividad en células ovoides de pequeño tamaño con apariencia ameboide en la CG (flecha gruesa), en los procesos de células de Müller en la CPI (flechas), a modo de puntos en la CPE (cabezas de flechas) y en la CF en la retina periférica. B) En el E-40, son LEA⁺ las células de pequeño tamaño con apariencia ameboide en la CG (flecha gruesa), los procesos de las células de Müller en la CPI y la CNI (cabezas de flechas), Puntuaciones LEA⁺ en la CPE (asterisco) y células en la CNI próxima a la CPI (flecha). CF: capa de fotorreceptores; CFN: capa de fibras del nervio; CG: capa ganglionar; CNI: capa nuclear interna; CPE: capa plexiforme externa; CPI: capa plexiforme interna. Óptica Normaski. A, B: 1200x.

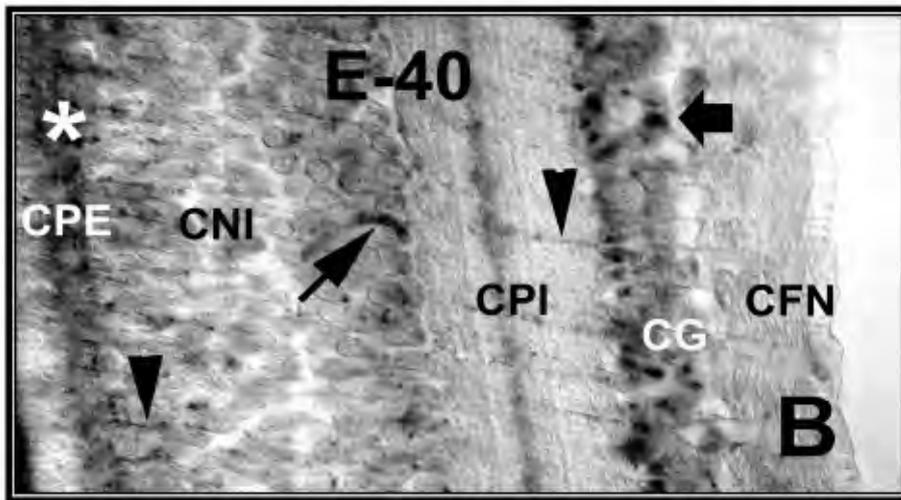
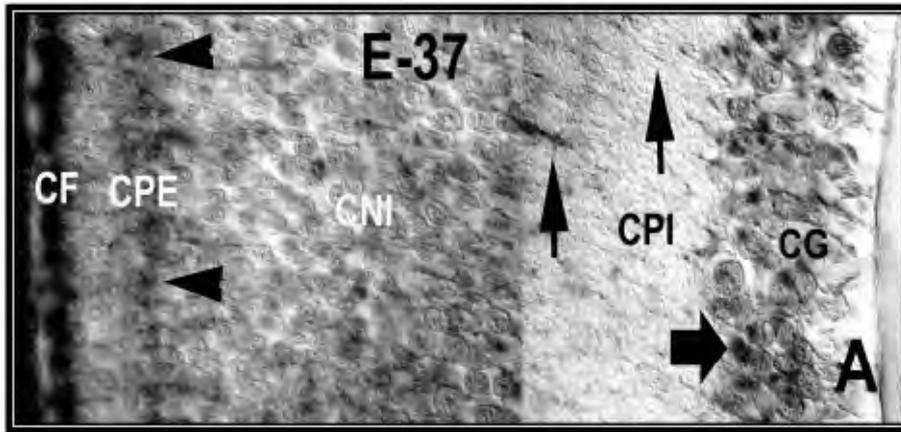


Fig 18.

Fig 19: Células LEA⁺ en niveles medios de la retina en ejemplares adultos de *G.galloti*. A) Se observa la distribución del marcaje LEA⁺ en la CF, cuerpos celulares y procesos en las células de Müller en la CNI, CPI, y en la CG. Obsérvense las hileras de células microgliales LEA⁺ en la CPI (asteriscos). B) Mayor detalle de dichas células (asteriscos). C) Células LEA⁺ en la CNI. CF: capa de fotorreceptores; CFN: capa de fibras del nervio; CG: capa ganglionar; CNE: capa nuclear externa; CNI: capa nuclear interna; CPE: capa plexiforme externa; CPI: capa plexiforme interna. Óptica Normaski. A: 480x; B, C: 1200x.

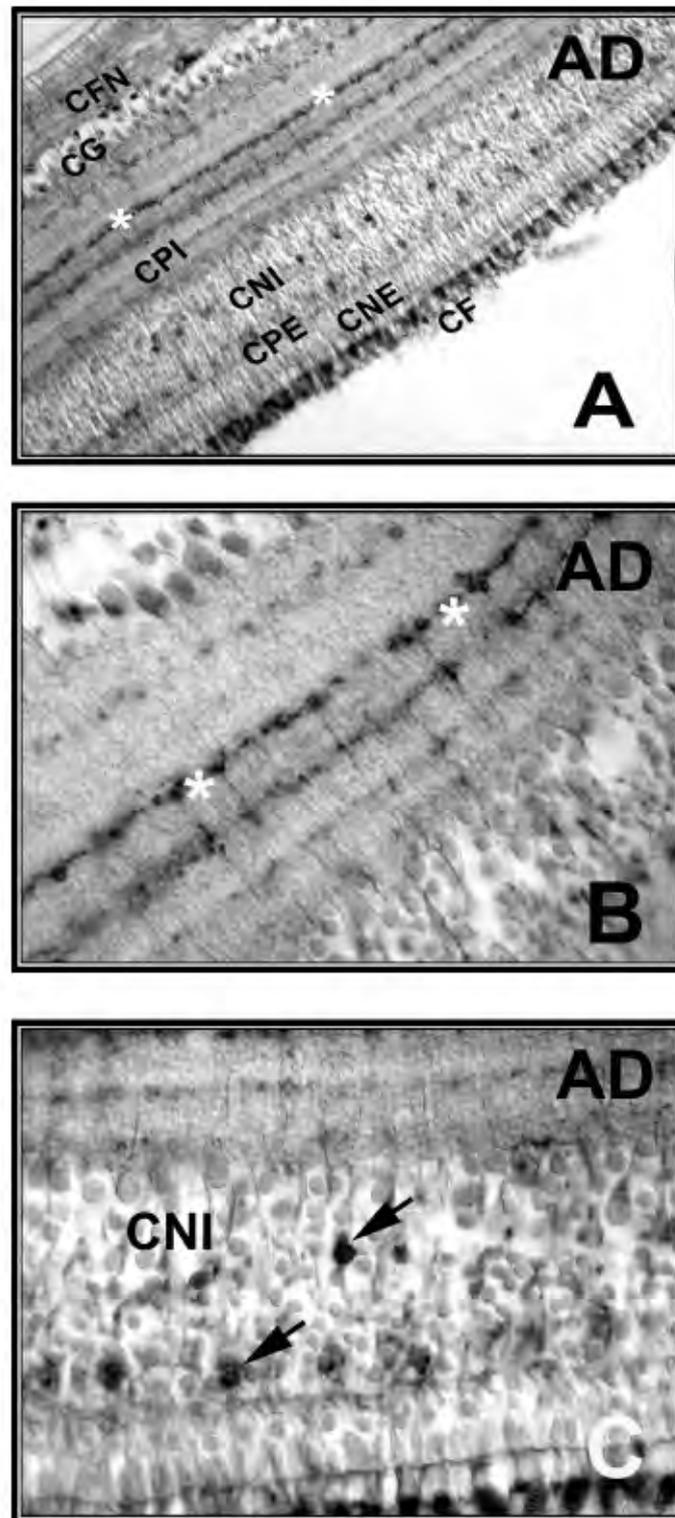


Fig 19.

Fig 20: Células LEA⁺ en niveles medios de secciones horizontales en la CNO de *G. galloti*. A) En E-35, obsérvese la presencia de numerosas células reactivas pequeñas con finas ramificaciones bipolares y estrelladas en la ZTNR. B) En E-35, se muestran células reactivas de pequeño tamaño con finas ramificaciones y apariencia ameboide en el nervio medial. C) En E-35, se observan células dendríticas reactivas en la ZCN. D) En E-37, el número de células en la ZTNR es máximo y presentan la misma morfología. E,F) En E-37, se muestra una célula dendrítica en la ZMN y ameboide en la ZCN. CNO: cabeza del nervio óptico; ZTNR: zona transición nervio retina. (E,C,F, óptica Normaski). A,C,D,E,F: 1250x; B: 1150x.

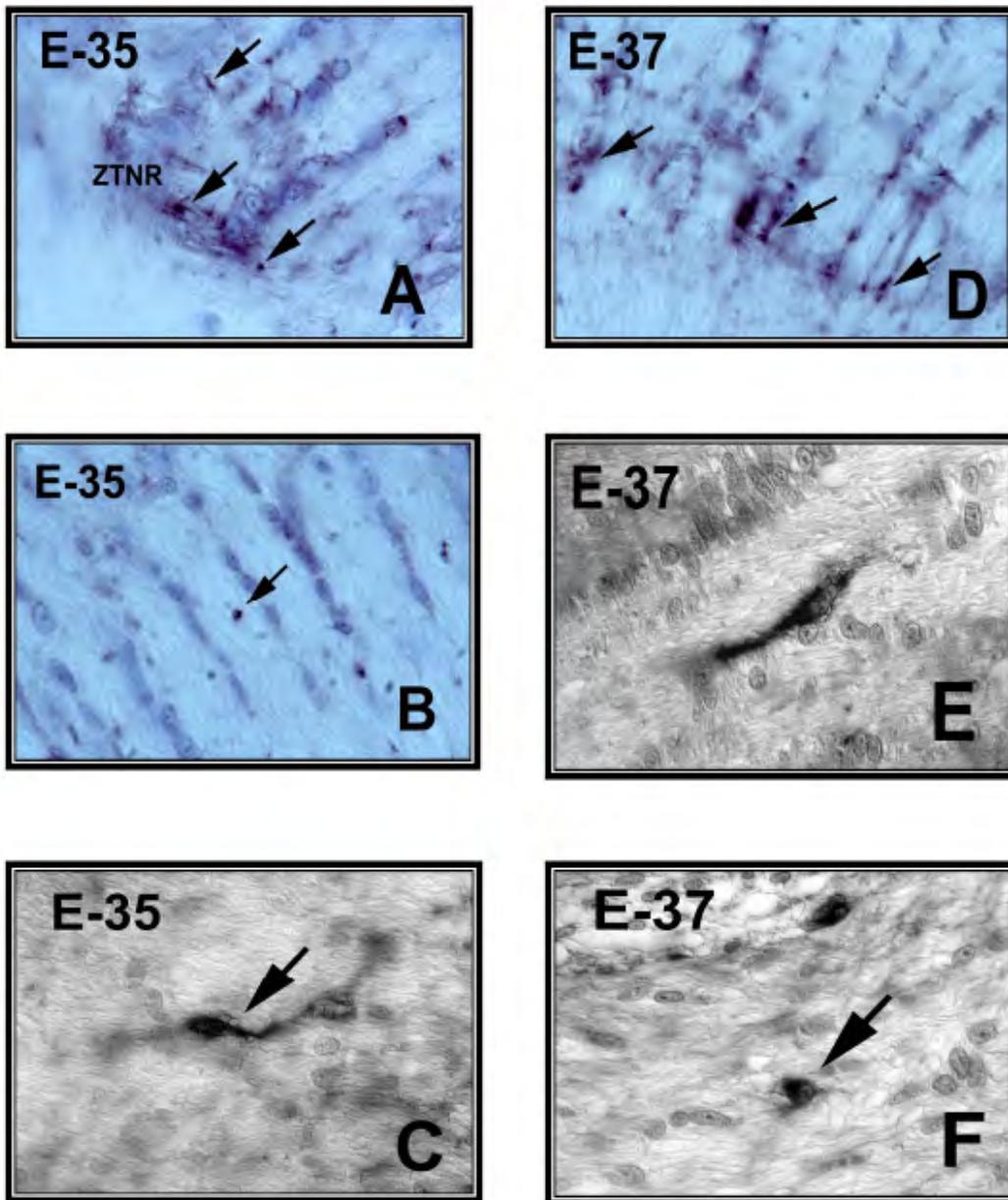


Fig 20.

Fig 21: Células LEA⁺ en la ZMN y ZCN durante la ontogenia de *G. galloti*.

A) En E-40, el número de células disminuye y se mantiene la misma morfología. B,C) En E-40, se muestran células ameboides y dendríticas en la ZMN. D) En adultos no se observan células LEA⁺ en la ZTNR. E) Mayor detalle de la zona de la CNO recuadrada en D, nótese la presencia de las células LEA⁺ bipolares y con aspecto ameboides (flechas). F) En adultos, se aprecian células ameboides en la ZMN próximas a un vaso sanguíneo (flechas). G) En adultos, se observan células ramificadas, distribuidas en toda la ZCN (flechas), véase una célula ramificada relacionada con un vaso sanguíneo (cabeza de flecha). ZCN: zona caudal del nervio; ZMN: zona medial del nervio (A,C,D Y E, óptica Normaski). A:1150x; B: 1700; D: 500x; C,E,F: 1250X; G:750.

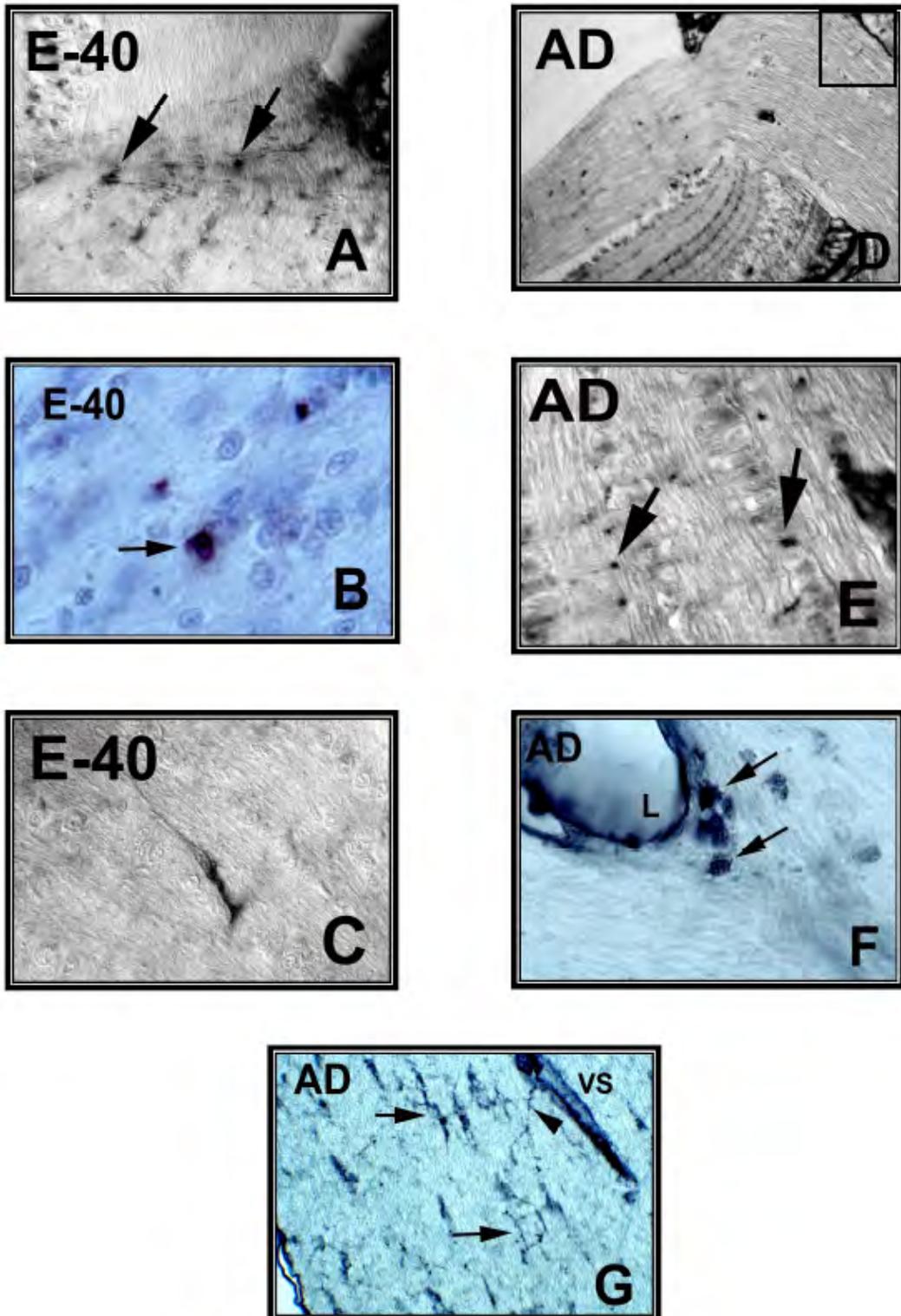


Fig 21.

Resultados

Fig 22: Células LEA⁺ en el quiasma y tracto óptico durante la ontogenia de *G. galloti*
A) En el E-37 y en niveles mediales del quiasma se observan células pseudopódicas (flecha) y ameboides (cabeza de flecha). B) En el E-37, y en niveles dorsales del quiasma se muestran células positivas en el límite del parénquima nervioso (flechas) y en los vasos sanguíneos de la píamadre (cabeza de flecha). C) En el quiasma de adultos, se observan numerosas células microgliales ramificadas por toda la superficie. D) Mayor detalle de las células recuadradas en C. E) En el E-37, se muestra una célula dendrítica y vasos sanguíneos reactivos en el tracto óptico. F) En el E-40 se observan numerosas células LEA⁺ de apariencia ameboides (flechas) en el tracto. Q: quiasma; TrO: tracto óptico. (B,C,D,F,G,H, óptica Normanski). A, E: 1250x; B, D, F: 1150x; C: 450x.

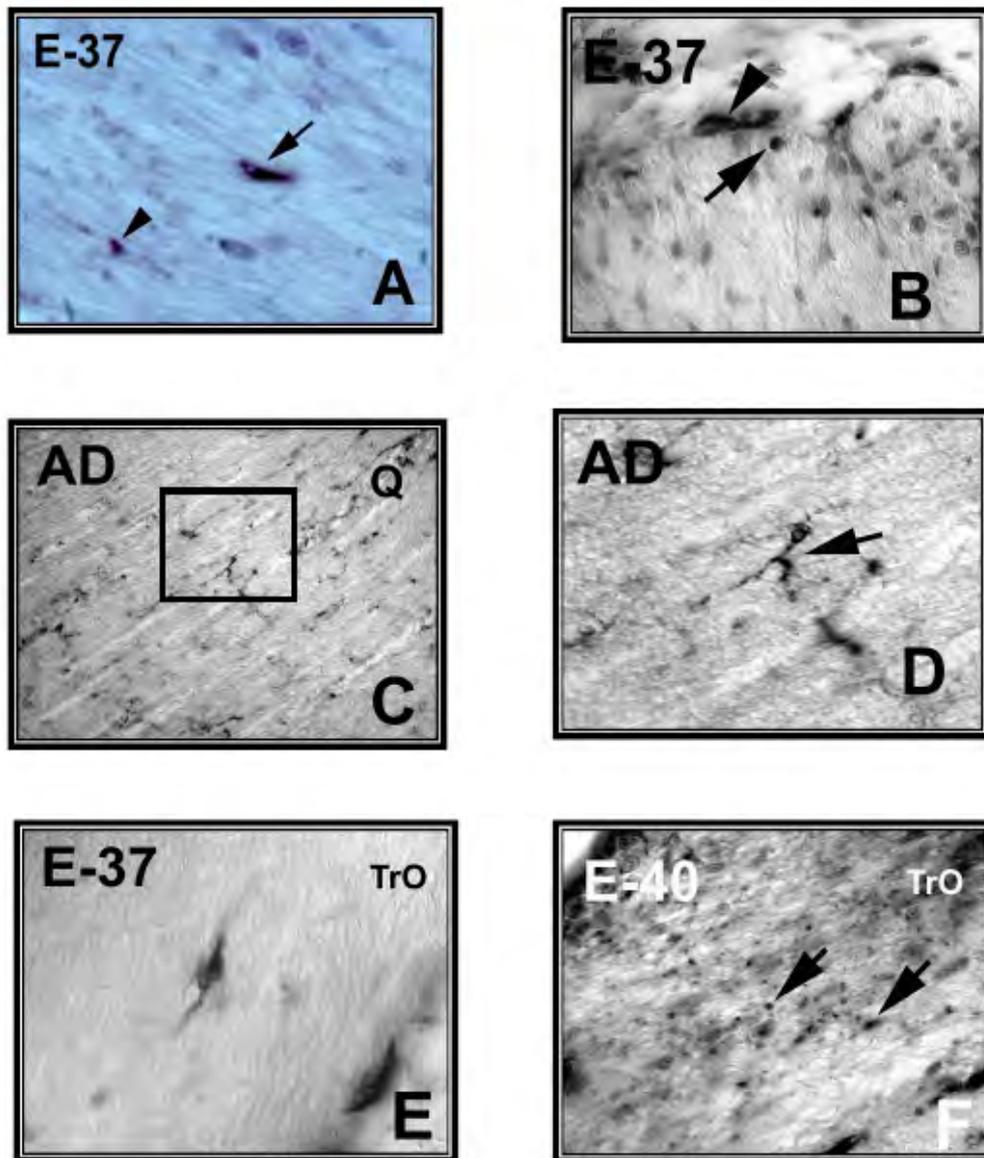


Fig 22.

Fig 23: Células LEA⁺ en la zona hipotalámica proliferativa durante el desarrollo de *G galloti*. A) En el E-37, se observan células positivas en la zona ventricular (flechas), y ameboides en la luz del ventrículo (cabeza de flecha). B) En el E-40, se aprecian numerosas células reactivas en la zona ventricular (flechas). C) En el parénquima nervioso, limítrofe al tracto óptico se aprecian numerosas células positivas de aspecto ameboide (flechas) y pseudopódica (cabezas de flechas). D) Células ameboides positivas en la pía madre (flecha) y de tamaño muy reducido o puntiformes en el parénquima nervioso (cabeza de flechas). TrO: tracto óptico (B,C,D óptica Normaski). A, B, C, D: 1150x.

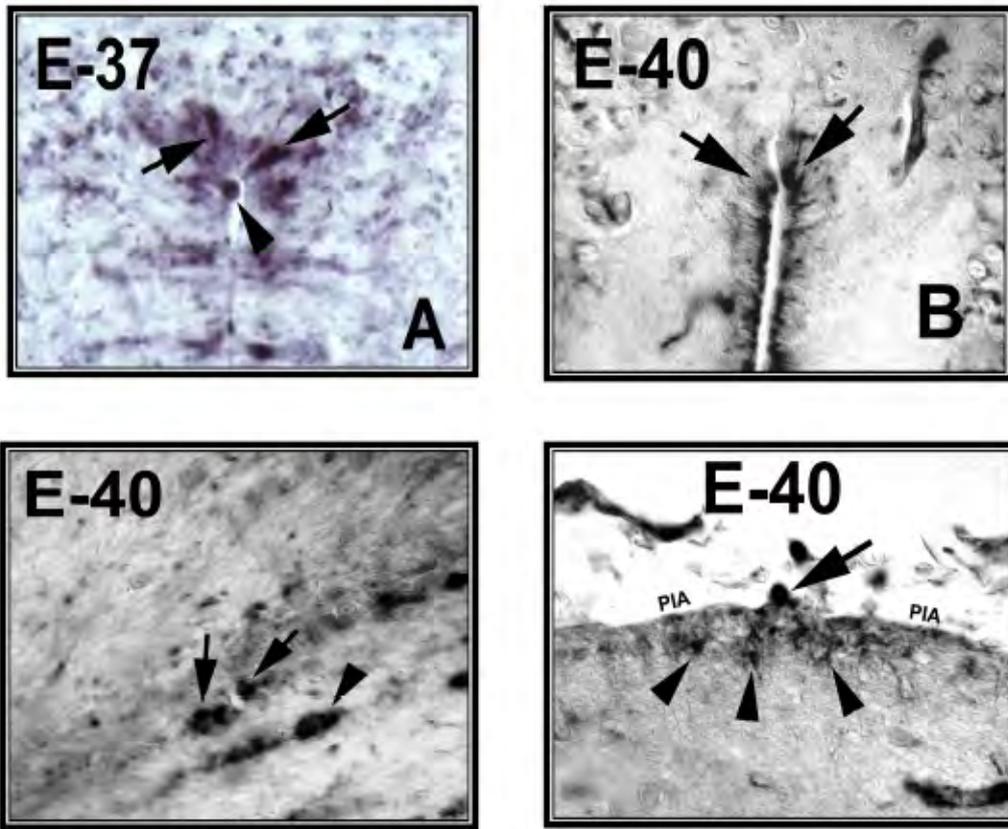


Fig 23.

6. ULTRAESTRUCTURA DE LAS CÉLULAS MICROGLIALES.

Las células microgliales se han estudiado ultraestructuralmente desde E-35 hasta ejemplares adultos en la vía óptica de *G galloti*. Destacamos que desde el E-35 hasta el E-38 no se detectan claramente células microgliales, sin embargo, se han identificado a partir del E-39.

En este estadio, se han observado células macrofágicas, en el humor vítreo, próximo al conus papillaris. Se caracterizan por presentar núcleos ovalados de heterocromatina perinuclear y citoplasma con numerosos cuerpos electrodensos, ribosomas libres, y procesos citoplásmicos (Fig. 24A).

En el estadio de eclosión se han observado células microgliales con características intermedias entre el E-39 y postnatal. En postnatales, y en la ZMN (zona medial del nervio) y ZCN (zona caudal del nervio) se observan células de microglía asociadas a las hileras macrogliales ya estudiadas con inmunohistoquímica con la GS (glutamina sintetasa). La microglía presenta núcleos de heterocromatina patente, y citoplasmas con numerosos cuerpos densos y mitocondrias (Fig. 24B).

En ejemplares adultos y en la zona de la CNO observamos células microgliales de núcleo ovalado heterocromatínico y citoplasma con cuerpos densos característicos (Fig. 24C). Asimismo se aprecian procesos astrocitarios próximos a las células microgliales.

Fig 24: Células microgliales y macrófagos en la vía óptica de *Gallotia galloti*.

A) En E-39, se observa una célula de aspecto macrofágico en el humor vítreo próxima al conus papillaris. Obsérvese la heterocromatina próxima a la membrana nuclear y citoplasma con vesículas distribuidas por toda la superficie y numerosos cuerpos electrodensos. B) En ejemplares postnatales, se destaca microglía en la ZMN asociada a las células macrogliales dispuestas en hileras. Obsérvense los numerosos cuerpos densos en el citoplasma (flechas) y núcleo heterocromatínico. O: oligodendrocitos; M: microglía. C) Célula microglial próxima a procesos astrocitarios (As), en la CNO del adulto. Obsérvese el núcleo heterocromatínico y citoplasma con cuerpos densos (flechas). O: oligodendrocitos; As: proceso astrocitario; G: Golgi. A: 10.000x; B: 9.000x; C: 6.600x.

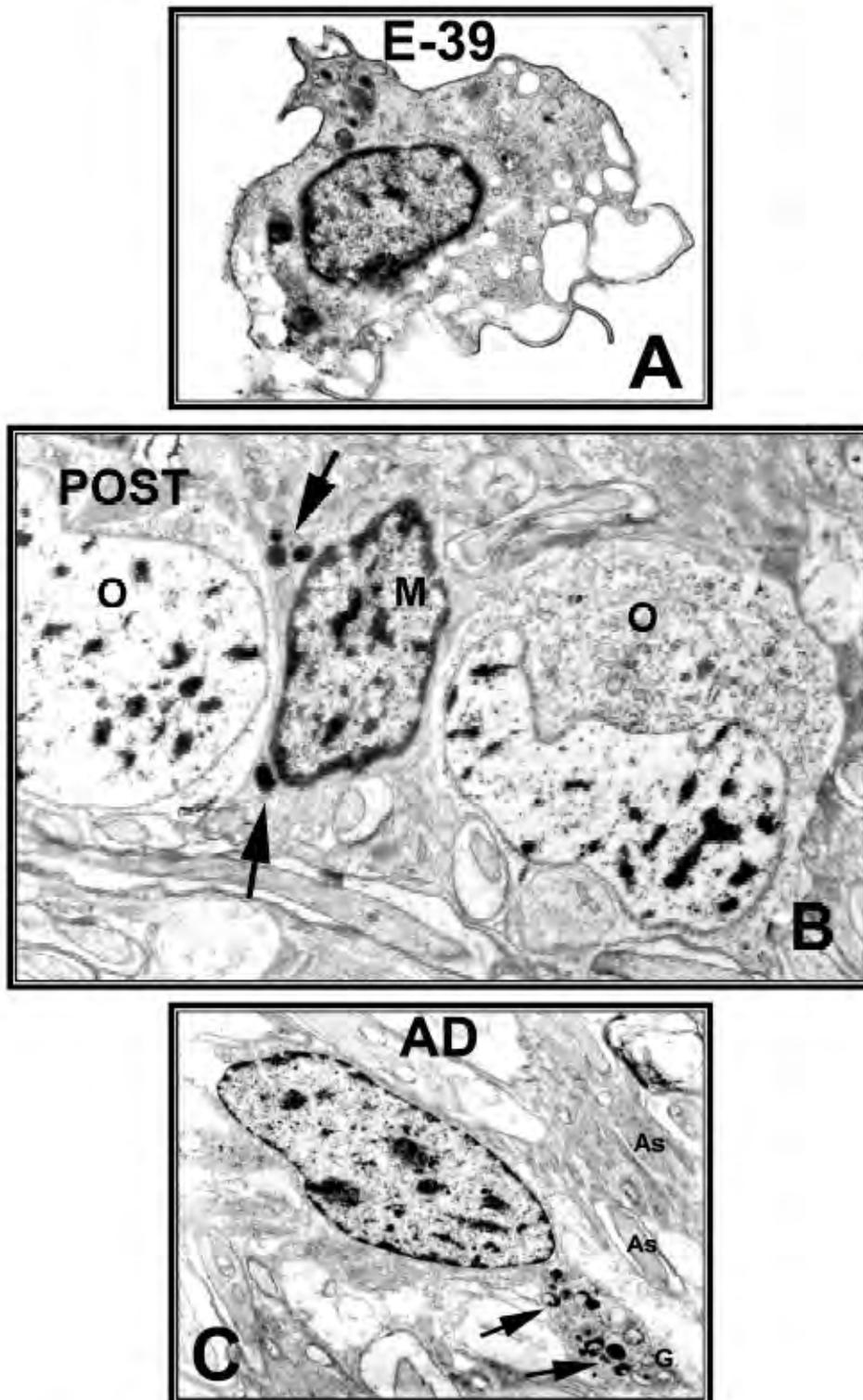


Fig 24.

7. DOBLE-INMUNOHISTOQUÍMICA CON PCNA/LECTINA

En los estudios inmunohistoquímicos con PCNA/LECTINA, nos llama la atención la escasa coexistencia de ambos marcadores durante la ontogenia en la vía óptica.

7.1. NERVIÓ ÓPTICO

En E-35, la mayoría de las células son solo PCNA⁺ y se disponen en hileras por toda la superficie del nervio. Sin embargo, en la ZCN se observan células fusiformes doblemente marcadas. El quiasma óptico, contiene escasas células PCNA⁺, sin embargo en la ZV hipotalámica se observa una alta proporción de células proliferativas.

En E-37 se siguen observando abundantes células PCNA⁺, sin embargo algunas células fusiformes son PCNA⁺/LEA⁺ o solo LEA⁺ en la ZCN y en la ZMN. En la CNO se observa una alta población de células proliferativas, de las cuáles sólo algunas expresan ambos marcadores presentando morfología ameboides (Fig. 25A). En la superficie del quiasma se detectan células estrelladas PCNA⁺, aunque a nivel de la piamadre se observan células ovoides que presentan ambos marcadores (Fig. 25B). En el tracto óptico la población celular fusiforme PCNA⁺/LEA⁺ es escasa y siguen la dirección de las fibras (Fig. 25C). En la ZV se observan escasas células positivas doblemente marcadas, aunque las células LEA⁺ son numerosas.

En E-40, tanto en el nervio como en el tracto óptico la población celular es en su mayoría PCNA⁺ aunque se reduce en relación a estadios anteriores. En el quiasma se observan células LEA⁺ en la intersección de los nervios, numerosas PCNA⁺ y algunas fusiformes doblemente marcadas. En el tracto hemos observado tres subpoblaciones: células PCNA⁺/LEA⁺, PCNA⁺/LEA⁻ y mayormente PCNA⁺/LEA⁻. En el hipotálamo, la ZV, muestra células PCNA⁺/LEA⁺ y escasas células positivas para ambos marcadores. Por otra parte, en el parénquima nervioso limítrofe al tracto en el E-40 se observan numerosas células LEA⁺/PCNA⁺, células LEA⁺/PCNA⁻ y algunas LEA⁻/PCNA⁺.

En relación a los vasos sanguíneos, desde el E-35 hasta el E-40 se detectan células endoteliales inmunoreactivas para ambos marcadores.

7.2. RETINA

En la retina, la coexistencia de ambos marcadores es muy baja. Así, en el E-35, se observa doble marcaje en células del margen ciliar y en el E-37, en células con apariencia de microglia pseudopódica en la CG limítrofe con la CPI de la retina central (Fig 25D). A partir del E-40 ya no se observan células con ambos marcadores en el margen ciliar.

7.3. CONUS PAPILLARIS

Desde E-35 hasta el estadio de eclosión hemos observado la coexistencia de ambos marcadores en dicha estructura, probablemente en células macrofágicas.

Fig 25. Inmunoreactividad PCNA (negro grisáceo)/lectina (marrón) en células de distintas regiones en la vía óptica de *G. galloti* en E-37. A) En la CNO se observan células ovoides reactivas para ambos marcadores (flechas) y células solo PCNA⁺ (cabezas de flechas) en la base del CP. B) En el quiasma se observan células ovoides doblemente marcadas en la piamadre (flecha). C) En el tracto, se muestra la coexistencia PCNA/lectina en células fusiformes, de aspecto dendrítico (cabeza de flecha), cercana a una célula PCNA⁺. D) En la retina se muestra una célula fusiforme en la CG donde coexisten los dos marcadores. A, C: 1300x; B, D: 1500x.

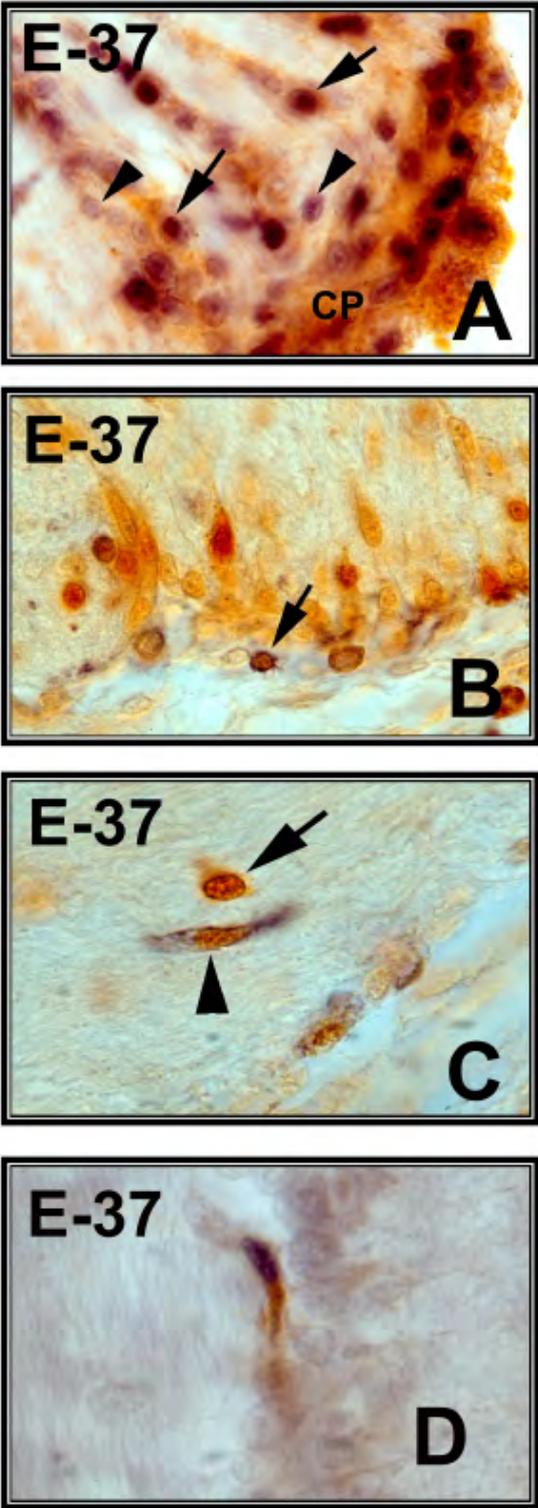


Fig 25.

DISCUSIÓN

1. TOPOGRAFÍA DE LA VÍA ÓPTICA

El análisis topográfico sobre la formación del conus papillaris, retina y nervio óptico, se estudia por primera vez con la técnica de Klüver-Barrera (K-B) en la especie *Gallotia galloti*. Este trabajo es básico para comprender el desarrollo y la regeneración de la vía óptica en esta especie y en el resto de vertebrados.

1.1. CONUS PAPILLARIS

El conus papillaris (CP) de *G. galloti* es una estructura dual formada por células pigmentadas y vasos sanguíneos, características que le homologan al pecten oculi de aves (Jasinski, 1977; Braekevelt, 1989, 1994; Braekevelt & Richardson, 1996). Las funciones del pecten oculi están relacionadas con la: nutrición, barrera hematoencefálica, detoxificación del amonio vitreal y regulación del pH ocular (Gerhardt et al., 1996, 1999; Wolburg et al., 1999), funciones que podrían también llevarse a cabo en el CP del lagarto (Alfayate et al., com. personal).

1.1.1. Interrelación entre las células pigmentadas y la vascularización

La papila inicial del conus papillaris de *G. galloti* crece y forma una capa epitelial densa, contacta con el humor vítreo en el E-34, y se correlaciona con el primordio del pecten en aves (Liebner et al., 1997; Wolburg et al., 1999). En el lagarto, la papila aumenta, debido a, la presencia de células PCNA-positivas (Casañas., 2005) y a la aparición de los primeros vasos sanguíneos en el E-35, características también observadas en aves (Braekevelt & Richardson., 1996; Liebner et al., 1997; Wolburg et al., 1999).

Otro hecho significativo en *G. galloti* ha sido la aparición de células con gránulos de pigmento a partir del E-35, que aumentan gradualmente hasta E-37, ocupando toda la extensión del conus, constante también observada en el pecten oculi de aves (Braekevelt & Richardson., 1996; Liebner et al., 1997; Wolburg et al., 1999). Asimismo, ultraestructuralmente en el lagarto se muestra que las células pigmentadas forman un soporte estructural del CP (Alfayate et al., 2005), hecho que también ocurre en el pecten de las aves (Braekevelt & Richardson., 1996).

Por otro lado, al tiempo que se diferencian en el lagarto las células pigmentarias en el E-35, se inicia el proceso de vascularización, que aumenta gradualmente hasta eclosión, y presenta características muy similares a las de adultos. Estudios ultraestructurales paralelos en *G. galloti* demuestran que los vasos sanguíneos están formados por un endotelio continuo con micropliegues luminales y abluminales, uniones estrechas, pericitos y lámina basal (Alfayate et al., 2005), características homólogas a las observadas en el pecten de las aves (Braekevelt & Richardson., 1996).

La presencia de células endoteliales con uniones estrechas (Alfayate et al., 2005) sugieren que el conus papillaris podría inducir la formación de la barrera hematoencefálica (BHE) en el lagarto, inducción y mantenimiento que es regulada por la interacción permanente entre células endoteliales y neuroectodermas (Engelhardt & Risau, 1995). En relación a estos hechos, también las células pigmentadas del CP de *G. galloti*, podrían ser buenas candidatas en la inducción de la BHE, como se describe en pollos (Gerhardt et al., 1996; Liebner et al., 1997; Wolburg et al., 1999).

1.1.2. Relación entre el patrón de formación del conus papillaris (CP) y de la retina

Nuestras observaciones muestran que el desarrollo del CP es paralelo al de las capas retinales, como también ocurre en aves, particularidad relacionada con la función principal de nutrición del pecten oculi, aportando oxígeno y nutrientes a la retina durante la morfogénesis (Yew, 1978). Al respecto, el pecten de pollos provee de glucosa a la retina avascular, debido a la existencia de transportadores de glucosa en las células endoteliales de los vasos (Wolburg, 1999). Así, la glucosa saldría de los vasos, difundiría a través del vítreo, y es captada por las células de Müller, que contienen también dichos transportadores (Liebner et al., 1997). En este aspecto y debido a las similitudes del pecten con el CP, sugerimos que la misma función nutritiva podría llevarse a cabo en *G. galloti*, aunque son necesarios estudios moleculares que confirmen este hecho.

1.1.3 Origen de las células pigmentadas

Las células pigmentadas del pecten en las aves son consideradas células gliales que proceden de las células pigmentarias de la retina, las cuáles se localizan en el margen vitreal del tallo óptico desde donde proliferan, migran y dan lugar al primordio del pecten (Yew., 1978; Uehara et al., 1990; Liebner et al., 1997; Wolburg et al., 1999; Gerhardt et al., 1999). Las células pigmentadas observadas en el CP y clasificadas ultraestructuralmente como gliales en *G. galloti* (Alfayate et al., 2005) posiblemente tengan el mismo origen que las del pecten en las aves, aunque es necesario realizar estudios de migraciones celulares que nos permitan demostrar claramente su origen.

Asimismo, la morfología cónica y de gran tamaño del CP en el lacértido *G. galloti*, como el pecten de gran tamaño en las aves diurnas podría relacionarse con una mayor agudeza visual (Meyer., 1977; Braekevelt & Richardson., 1996).

1.2. RETINA

Nuestros resultados demuestran la existencia de cuatro gradientes de neurogénesis en la formación de la retina de *G. galloti*. Así, se observa que la CFN ocupa la retina central en el E-32 y la retina periférica en el E-33, la CPI ocupa solo regiones centrales en E-33 y toda la extensión de la retina en el E-35, y la CPE se observa solo en la retina central en el E-35 en toda la superficie en el E-39. Estos datos parecen indicar que: primero, se diferencian las células que forman la retina central cuyos procesos forman las capas citadas (CPI, CPE) y, posteriormente la retina periférica. Por lo que en *G. galloti* existe un gradiente de formación *central-periférico*, descrito también en otros vertebrados (mamíferos: Lavail et al., 1991; Reese et al., 1996; Rapaport et al., 2004; aves: Prada et al., 1991; peces: Negishi & Wagner, 1995; anfibios: Holt et al., 1988), y con otras técnicas inmunohistoquímicas, en esta misma especie (Casañas., 2005).

Además, el desarrollo de las capas retinales en *G. galloti* va del interior al exterior, observándose primero la CFN, luego la CG, CPI, CNI, CPE, CNI y la capa de fotorreceptores, lo que indica que existe un gradiente *vítreo-esclerótico*, como se ha

Discusión

observado en esta misma especie con inmunohistoquímica (Casañas., 2005). Asimismo, observamos que en el E-32 se desarrolla la CPI en niveles dorsales, y en el E-35 en los ventrales, hecho que demuestra la existencia de un gradiente *ventral-dorsal*, observado también durante el desarrollo de la retina de aves (Prada et al., 1991) y anfibios (Holt et al., 1988). Además constatamos en *G. galloti* que la retina temporal se desarrolla antes que la nasal, en estadios tempranos, con un gradiente temporal-nasal también observado en aves (Prada et al., 1991), pero no en teleósteos (Kwan et al., 1996; Julian et al., 1998).

Por otro lado, en el E-33, la CFN es la única capa que se manifiesta claramente en *G. galloti*, y ocupa toda la extensión de la retina, lo que sugiere que las células ganglionares son las primeras que se diferencian como también ocurre en el resto de vertebrados (mamíferos: Lavail et al., 1991; Rapaport et al., 1996; 2004; aves: Kahn., 1973, 1974; Prada et al., 1991; peces: Sharma & Ungar, 1980). Además, en la retina central y en el E-33 de *G. galloti*, no se observan células proliferativas PCNA-positivas, en la CG (Casañas., 2005), hecho que corrobora nuestros hallazgos.

También observamos que desde el E-35 hasta el E-39 en *G. galloti* se forma el grueso de la CNI y por lo tanto se están diferenciando las células de Müller, las amacrinas, horizontales, y bipolares, características que coinciden con las descripciones en pollo (Kanh., 1974; Spencer & Robson., 1989; Prada et al., 1991).

Además en el E-35, se forma la CPE en la zona central de la retina, como resultado del crecimiento de neuritas de células horizontales y bipolares, cuya diferenciación comienza en este estadio, y acaba en E-39, donde ya la CPE ocupan toda la extensión de la retina. Finalmente, en eclosión termina el desarrollo de la CNE y la capa de fotorreceptores.

En función de lo expuesto se establece un patrón de diferenciación de las células de la retina en *G. galloti*: primero se diferencian las células ganglionares luego las células de la CNI (amacrinas, horizontales, bipolares y células de Müller), cuyo orden aún

queda por establecer, y finalmente la capa de fotorreceptores. Este patrón es similar al observado en el resto de vertebrados (Harris., 1997) y en esta misma especie (Casañas., 2005).

También se observa con K-B que, la retina de *G. galloti* sigue creciendo y modificándose a partir de eclosión, posiblemente debido a un alargamiento de la órbita, por aumento del espacio celular, como ocurre en aves y mamíferos (Teakle et al., 1993). Hechos similares también se confirman en *G. galloti* debido a la ausencia de células proliferativas en el margen de la retina a partir del estadio de eclosión (Casañas., 2005).

Por otro lado, hemos observado desde el E-35 hasta ejemplares adultos células en la CFN, también detectadas ultraestructuralmente y caracterizadas como oligodendrocitos inmaduros (Santos et al., en prensa). Este hecho nos sugiere que podrían ser oligodendrocitos que proceden de precursores que migran desde el NO como ocurre en pollo (Ono et al., 1997, 1998) cuya función sería mielinizar la CFN formada por los axones de las células ganglionares.

Asimismo destacamos que la mielinización de la CFN en el lagarto es también una característica de vertebrados no mamíferos (Nakazawa et al., 1993; Becker et al., 1999; Wolburg., 1980) como observa con inmunohistoquímica en *G. galloti* (Santos et al., 2004), sin embargo, en mamíferos esta mielinización solo se encuentra en la retina central del conejo (Reichenbach., 1988).

1.3. NERVIÓ ÓPTICO

La formación del nervio óptico comienza en el lagarto entre el E-30 y el E-31, después de la formación de la copa óptica, como también ocurre en rata (Kuwabara., 1975). Al respecto, se observa que, en periodos prenatales (E-32 a E-37), los axones de las células ganglionares (CG) colonizan el nervio y además tiene lugar la migración y diferenciación glial, comenzando, la mielinización en estadios perinatales. También, las primeras células ganglionares (CGs) se forman en el E-32 en la retina central (próxima a la CNO) y luego se añaden al nervio los axones que forman parte de la retina marginal,

dando lugar al gradiente *central-periférico*. Además, CGs de la retina ventral se diferencian antes que la dorsal formando el gradiente *ventral-dorsal*, por lo que suponemos que son los axones de la retina central y ventral, los primeros que alcanzan el tallo óptico. Todas las características mencionadas están estrechamente relacionadas con las descripciones observadas en los diferentes vertebrados (Kuwabara., 1975, Navascués et al, 1985, Oster et al., 2004).

Por otra parte, en el nervio óptico del lagarto se encuentran, células gliales a partir del E-32, más abundantes en la CNO que en la ZCN, lo que establece un gradiente de gliogénesis retino-diencefálico, como también ocurre en aves (Navascués et al., 1987). Sin embargo, las células que forman el NO podrían proceder tanto de las células neuroepiteliales del tallo óptico, como del cerebro (Small, 1987; Raff, 1989). Al respecto, se ha demostrado en aves que los oligodendrocitos originados en el tercer ventrículo, migran hacia el nervio óptico (Ono et al., 1997), debido a factores, como la netrina-1 y la semaforina 3A producidos en el quiasma óptico (Sugimoto et al., 2001; Tsai & Miller, 2002).

Con relación a la formación del quiasma en *G. galloti*, ésta comienza en el E-35, lo que hace suponer que las primeras células gliales observadas podrían proceder del tallo óptico y dar lugar a astrocitos tipo-1 como en mamíferos (Raff et al., 1989, Miller et al., 1989, Mi & Barres, 1999). Asimismo en el E-37, cuando el quiasma está totalmente formado, los precursores O-2A podrían migrar desde el cerebro hasta el nervio óptico, y dar lugar a los astrocitos tipo-2 y los oligodendrocitos como ocurre en mamíferos (Small et al., 1987, Raff, 1989, Tsai & Miller, 2002) y en aves (Ono et al., 1997). La mielinización del nervio en *G. galloti* comienza en estadios tardíos del desarrollo como en las aves (Nakazawa et al., 1993), sin embargo, en mamíferos este proceso es postnatal (Kuwabara 1975, Moore et al., 1976). Al respecto, estudios inmunohistoquímicos con PLP y MBP demuestran que en el nervio óptico del lagarto, la mielinización comienza en periodos perinatales (E-39) y termina en postnatales (Santos et al., 2004), hecho que también ocurre en el mesencéfalo y telencéfalo (Yanes et al., 1992). Estas observaciones, nos sugieren que el lagarto presenta la vía óptica prácticamente madura en el momento de nacer.

Por otro lado, también hemos observado un incremento de la mielina desde postnatales hasta adultos, hecho que posiblemente se deba al aumento del tamaño de las vainas de mielina, como también se describe en el SNC del reptil *Eumeces fasciatus* (Nadon et al., 1995) y en *G. galloti* (Santos, et al.; en prensa).

La formación del nervio óptico en *G. galloti* se completa cuando acaba la formación de la retina, y está prácticamente maduro cuando el animal eclosiona, hecho relevante ya que presentará una visión activa y madura en el momento del nacimiento, contrariamente a lo que ocurre en ratas donde el sistema visual maduro se observa en postnatales (Kuwabara., 1975).

Asimismo, la formación de los vasos sanguíneos en el nervio del lagarto comienza en la especie de estudio en E-35, y finaliza en el estadio de eclosión (Alfayate, et al., com pers) sin embargo, en mamíferos este proceso es postnatal (Kuwabara., 1975).

2. PATRÓN DE EXPRESIÓN DE LA GLUTAMINA SINTETASA DURANTE LA ONTOGENIA DE LA VÍA ÓPTICA

2.1. CONUS PAPILLARIS

Las células gliales del pecten están relacionadas con la diferenciación de la barrera hematoencefálica (Tontsch y Bauer, 1991; Engelhardt & Risau 1995; Earle & Mitrofanis, 1998). En relación a este hecho, en *G. galloti*, se observan dos tipos de células en el conus papillaris: gliales pigmentadas y endoteliales. Estas, presentan uniones estrechas que forman una barrera continua y a su vez están rodeadas por las células gliales pigmentadas, lo que también sugiere la existencia de una barrera hematoencefálica (Alfayate et al., 2005).

En el lagarto, las células GS-positivas forman parte de la estructura del conus papillaris (CP) desde E-34 hasta eclosión y es negativa en adultos. Esta población de células GS-positivas podrían ser endoteliales, como se ha demostrado en pollos

(Gerhardt et al., 1999) y rata (Abcouwer et al., 1995) o bien células gliales, estudios que actualmente se realizan en el lagarto con técnicas de inmunocitoquímica.

Debido a la similitud entre el CP de reptiles y el pecten de la aves, probablemente la expresión de la GS en el conus de *G. galloti* durante el desarrollo estaría relacionada con la detoxificación del amonio producido por la degradación de la yema del huevo como ocurre en pollo (Gerhardt et al., 1999).

2.2. RETINA

La Glutamina Sintetasa (GS) comienza su expresión débilmente en el E-37, en los pies vitreales de la glía de Müller y a medida que avanza el desarrollo se distribuye por toda la célula. Entre el E-37 y el E-40, los fotorreceptores todavía no se han formado en *G. galloti*, por lo tanto dicha enzima parece no estar implicada en la degradación del glutamato descargado por los fotorreceptores, y posiblemente sí esté relacionada con el aporte de glutamina como fuente de nitrógeno en la síntesis de distintas moléculas, como ocurre en aves (Prada et al., 1998).

En condiciones fisiológicas, el glutamato es descargado por las neuronas, recaptado por las células gliales y amidado a un componente neuroinactivo: la glutamina (Weil-Malherbe, 1962; Hertz et al., 1992). Esta amidación es catalizada por la enzima GS, que en la retina está confinada exclusivamente, a las células de Müller (Riepe & Noremborg, 1977; Linser et al., 1984). Además, también se ha demostrado el papel neuroprotector de la GS en la glía de Müller (Sharthy & Lam, 1978; Gorovits et al, 1997; Heidenger, 1999; Bringmann et al, 2000; Shaked et al, 2002; Suárez et al, 2002; García & Vecino, 2003).

Nuestros resultados demuestran que a partir del estadio de eclosión, cuando la capa de fotorreceptores está completamente formada, la expresión de la GS aumenta, siendo máxima en los ejemplares adultos. En relación a estos datos, sugerimos que en *G. galloti*, la GS es necesaria para la inactivación del glutamato después de su descarga por

los fotorreceptores y como en otros vertebrados el papel de las células de Müller podría ser crucial en la protección neuronal.

Por otro lado, después de lesionar el nervio óptico en *G. galloti*, se observa un aumento de la inmunoreactividad GS en las células de Müller, lo que podría indicar su implicación en el proceso regenerativo (Arbelo, com pers). Sin embargo, no se observan cambios en la expresión de GS en las células de Müller después de cortar el nervio óptico de ratas (Chen & Weber, 2000).

Además, cabe destacar que el patrón temporal de expresión de la GS, durante la ontogenia en la retina de *G. galloti* es similar al de aves (Moscona, 1972; Moscona & Linser, 1983; Prada et al., 1998). Asimismo, en adultos, el patrón de expresión espacial de la GS en pollo es igual al de *G. galloti*, observándose marcaje desde la MLI hasta la MLE en las células de Müller (Prada et al., 1998), sin embargo, en mamíferos dicha expresión se localiza principalmente en los procesos de Müller que rodean a los fotorreceptores (Derouiche & Rauen, 1995; Derouiche, 1996).

2.3. NERVIÓ ÓPTICO

La expresión de la GS en la glía del nervio óptico (NO) de *G. galloti* comienza desde el E-34 en las zonas caudales (ZCN) y en las regiones más rostrales (ZMN-CNO) conforme avanza el desarrollo; hecho que corrobora el gradiente *caudo-rostral* observado en el cerebro de esta especie (Monzón-Mayor et al., 1990d). Además, la expresión de la GS en el nervio óptico del lagarto aumenta en eclosión y es máxima en adultos, contrariamente a lo que ocurre en el telencéfalo y mesencéfalo donde la expresión decrece después de la eclosión (Monzón-Mayor et al., 1990), lo que indica que comparativamente la actividad enzimática es mayor en el nervio óptico que en otras zonas del cerebro.

Al respecto, el aumento de la GS durante el desarrollo en cerebro de mamíferos se asocia con la diferenciación de los astrocitos (Caldani et al., 1982; Patel et al., 1982), hecho, que podría también extrapolarse al NO de *G. galloti*.

Por otro lado, en mamíferos se ha demostrado que el gen de la GS, se encuentra en los progenitores O-2A, y su expresión es estimulada durante la maduración de los oligodendrocitos (Baas et al., 1998), particularidad que también podría tener lugar en una subpoblación de oligodendrocitos GS-positivos observados en este trabajo y durante el desarrollo y regeneración del NO del lagarto (Casañas, 2005; Arbelo et al., com pers), aunque su confirmación precisa las técnicas realizadas en mamíferos.

A partir del E-37, en la **CNO** existen células GS-positivas de largos procesos en la zona peripapilaris y en la ZLNR, expresión que aumenta al avanzar el desarrollo. En el adulto, se aprecia marcaje a modo de banda GS-positiva en la ZP, ZTNR, ZLNR, que separan la retina y el CP del NO, formando así, la glía limitante de la CNO. Dicha glía ha sido descrita en pollos como glía peripapilaris (Sckuck et al., 2000; Quesada et al., 2004), aunque es GS-negativa (Sckuck et al., 2000; Quesada et al., 2004).

En la **zona distal del conus papilaris (ZDC)**, de la CNO de *G. galloti*, también se observan desde el E-37 células GS-positivas en hileras que progresivamente aumentan hasta adultos. En la vía óptica de peces la expresión de la GS queda relegada a las células de Müller (Lillo et al., 2002), y en aves son escasas en la CNO (Gerhardt et al., 1999; Schuck et al., 2000). Todo ello podría indicar que el aumento de la GS en la CNO de *G. galloti* estaría relacionado con la reducción de altas concentraciones de glutamato, como nervio óptico de ratas (Domercq et al., 1999), o de amonio al medio extracelular, como ocurre en el SNC de mamíferos (Suárez et al., 2002).

En la **ZMN** del lagarto y desde E-37, se detectan células ovoides GS-positivas dispuestas en hileras y paralelas a las fibras del nervio, las cuales aumentan su inmunoreactividad hasta ejemplares adultos. Estas células, podrían considerarse astrocitos (Norenberg & Martínez-Hernández, 1979; Derouiche & Frostcher, 1991; Okere & Waterhouse, 2004), u oligodendrocitos, como en el cerebro de mamíferos (Warringa et al., 1988, Cammer, 1990; D'amelio et al., 1990; Fressinaud et al., 1991; Tansey et al., 1991; Miyake y Kitamura, 1992, Bass et al., 1998), o bien,

oligodendrocitos interfasciculares como en el NO de ratas (Domercq et al., 1999) y gatos (Jennings et al., 2002).

En relación a estos hechos, en la ZMN de *G. galloti* se han detectado células que expresan marcadores de oligodendrocitos inmaduros (4F2, 12F7 y 14F7) (Santos., 2004), Además, también se observan en esta especie, células $GS^+/S100^+$, en dicha zona durante el desarrollo y regeneración (Casañas., 2005, Arbelo et al, com pers). Todo ello parece indicar que en la ZMN existe una subpoblación de células GS-positivas que podrían caracterizarse como oligodendrocitos y que intervendrían en el proceso de mielinización o en el mantenimiento de la mielina.

En la ZCN y **quiasma óptico** de *G. galloti* se observa que la mayor parte de las células GS-positivas presentan morfología estrellada entre E-34 y E-40, sin embargo, a partir de eclosión hasta adulto, la morfología es de tipo ovoide. Esta variación morfológica sugiere la existencia de cambios funcionales durante la maduración. Al respecto, existen subpoblaciones de células $Vimentina^+ GFAP^+/GS^+$ y $GS^+/S100^+$ entre E-34-40 (Casañas., 2005), que podrían dar lugar a las subpoblaciones de astrocitos y oligodendrocitos maduros observados desde eclosión hasta ejemplares adultos.

2.3.1. Función de la Glutamina Sintetasa en el nervio óptico

En los tractos, el glutamato se libera al espacio extracelular desde los axones después de la propagación de potenciales de acción (Weihreich & Hammerschlag., 1975), debido a los transportadores del glutamato en los nódulos de Ranvier (Kriegler & Chiu., 1993). Además, los oligodendrocitos son vulnerables al glutamato (Yoshioka et al., 1996; Matute et al., 1997; Matute et al., 1998; Mac Donald., 1998). En relación a estos hechos, la presencia de GS en células gliales del nervio y del quiasma óptico en *G. galloti*, es importante para mantener la concentración de glutamato en niveles que no sean potencialmente tóxicos, como también ocurre en los oligodendrocitos del NO de mamíferos (Domercq et al., 1999).

Por otro lado, la GS, se relaciona con el suplemento de grupos amino a través de la glutamina para la síntesis de bases púricas y pirimidínicas (Weil-Malherbe, 1962), necesarias para la síntesis de ácidos nucleicos. Al respecto, las células GS-positivas del nervio y quiasma óptico podrían intervenir en la síntesis de ARN mensajeros, cuya expresión proteica, podría estar relacionada con la síntesis y/o mantenimiento de la mielina.

Además, se demuestra que, el patrón de expresión de la S-100 en el nervio óptico de *G. galloti* (Casañas., 2005) es similar al observado con la GS en este trabajo. Este hecho podría implicar a estas células gliales en la mielinización, o bien en la regeneración y remielinización de la vía óptica como ocurre en peces (Velasco et al., 1997) y en reptiles (Arbelo et al; com pers).

3. HETEROGENEIDAD MORFOLÓGICA Y FUNCIONAL DE LAS SUBPOBLACIONES GLIALES

3.1. RETINA

La expresión de la proteína GFAP en la retina de *G. galloti*, sólo se observa en los pies vitreales de la glía de Müller a partir del E-37, siendo su expresión máxima en adultos, hecho que coincide con peces, anfibios, reptiles y aves (Sassoe et al., 1992). La localización de esta proteína solo en los pies de Müller del lagarto, podría relacionarse con una función compartimentalizada, es decir, solo en los pies, no en el resto de la célula. En este caso, como la retina de *G. galloti* es avascular y la GFAP se concentra a modo de almacén estructural en los pies de Müller vitreales, estos podrían estar relacionados con funciones de absorción de nutrientes y excreción de sustancias tóxicas a través del vítreo como también ocurre en aves (Liebner et al., 1997; Wolburg et al., 1999).

En relación a la expresión de la GFAP durante el desarrollo de la retina en vertebrados, en la literatura todavía existe mucha controversia. Así, en pollo durante el desarrollo se demuestra su presencia (Torelli et al., 1989) o ausencia en la glía de Müller (Chabot & Vincent, 1990) y en mamíferos adultos se confirma su existencia

Discusión

(Bignami & Dahl 1978; Stone & Dreher, 1987; Lewis et al., 1988; Sassoe et al., 1992; Vauhan & Lasater 1990; Karim et al., 1996; Knabe & Kuhn, 2000), o ausencia en dichas células (Shaw & Weber 1983; Schnitzer, 1983; Hollander et al., 1991; Sarthy et al., 1991; Triviño et al. 1997; Haddad et al., 2001).

Por otro lado, Sassoe (1992), describe importantes diferencias en relación a la expresión de la GFAP en distintos vertebrados y divide a las especies en dos grupos. 1) donde la glía de Müller expresa GFAP en los pies de Müller y en sus procesos: (peces: *Carassius auratus*; anfibios: *Triturus carnifex*; reptiles: *Podarcis sicula* y *Tarentola delalandii*; mamíferos: *Oryctolagus cuniculus* y *Mus musculus*), 2) donde se expresa fundamentalmente en los pies de Müller (peces: *Pseudotropheus lombardoi*; anfibios: *Xenopus laevis* y *Rana ridimunda*; aves: *Gallus gallus*) y en reptiles: *G. galloti*.

El conjunto de estas aportaciones nos demuestran que la GFAP es una proteína que se conserva en las células de Müller de los distintos vertebrados, aunque ontogenética y filogenéticamente existan diferencias en cuanto a su distribución.

Respecto a otros tipos celulares se observa que, las células horizontales de diferentes vertebrados también expresan GFAP (aves: Linser et al., 1985; teleosteos: Jones & Schechter, 1987; Vaughan & Lasater., 1990), aunque en la especie de estudio, no se ha detectado.

Nuestros resultados en *G. galloti* demuestran que la glía de Müller expresa las proteínas GFAP y GS, comunes a otras células gliales. Al respecto, la GFAP se observa en astrocitos y glía de Bergman en mamíferos (Bignami & Dahl., 1974; Ghandour et al., 1983), en la glía radial (Monzón-Mayor et al., 1990; Yanes et al., 1990), y astrocitos en el cerebro de *G. galloti* (Monzón-Mayor et al., 1990). Todo ello demuestra que la glía de Müller como otras células gliales GFAP-positivas podrían participar en la formación de la barrera hematoencefálica (Pekny et al., 1998) y mantenimiento de la mielina (Liedtke et al., 1996).

La GS se observa en astrocitos de mamíferos (Martínez-Hernández et al., 1977; Tholey et al., 1987; Derouiche & Frostscher., 1991; Hernández et al., 1999, Domercq et al., 1999; Struzynska et al., 2005), en oligodendrocitos de mamíferos (Warringa et al., 1988; Cammer., 1990; D`Amelio et al., 1990; Fressinaud et al., 1991; Tansey et al., 1991; Miyake & Kitamura., 1992; Domercq et al., 1999; Jennings et al., 2002), en células endimales de teleósteos (Wicht et al., 1994), así como, en la glía radial, endimoglia, astrocitos y en una subpoblación de oligodendrocitos en el cerebro del reptil *G. galloti* (Monzón-Mayor et al., 1990, 1998; Romero-Alemán et al., 2004). De todo ello se deduce que las células de Müller GFAP⁺/GS⁺ en *G. galloti*, podrían realizar múltiples funciones relacionadas con astrocitos y oligodendrocitos como se ha descrito en otros vertebrados (Newman & Reichenbach, 1996; Bringmann, 2000; Sarthy & Ripps, 2001).

En adultos de *G. galloti* la proteína GFAP se expresa en las células de Müller como ocurre en mamíferos. Al respecto, después de lesionar directamente la retina o el nervio óptico del lagarto, se observa que la GFAP aumenta, no solo en los pies vitreales sino también en los procesos de la glía de Müller (Romero-Alemán et al., 2005; Arbelo, et al, com pers), como también ocurre en la glía de Müller en lesiones retinales de mamíferos (Ekstorm et al, 1988; Guerin et al., 1990; Yoshida et al., 1993; Lewis et al., 1995; de Raad et al., 1996; Rungger- Brandle et al., 2000). Estos hechos claramente indican la implicación de las células de Müller en el proceso regenerativo.

3.2. NERVIO ÓPTICO

En la CNO de *G. galloti* coexisten la GFAP y GS desde el E-37 hasta eclosión, excepto en la ZTNR que es solo GFAP-positiva. En el adulto, ambos marcadores coexisten, incluso en la ZTNR, aunque no en la zona distal al conus papillaris (ZDC). En dicha zona se localizan dos subpoblaciones de células ovoides distintas, dispuestas en hileras, una GFAP⁺/GS⁺ y otra GFAP⁺/GS⁻. La primera subpoblación se relaciona con astrocitos y la segunda podrían ser oligodendrocitos GS⁺ ya descritos en el mesencéfalo de esta especie (Monzón-Mayor et al., 1998). Además, existe una subpoblación de células S-100⁺/GS⁺/GFAP⁻ que podrían corresponderse con

Discusión

oligodendrocitos, posiblemente relacionados con el proceso de mielinización (Casañas., 2005).

Al respecto, en la CNO de la tortuga *Mauremys caspica* se observan células dispersas o alineadas en la dirección de los axones, mayormente caracterizadas como astrocitos, aunque también existen oligodendrocitos relacionados con la mielina (Dávila et al., 1987).

Además, estudios ultraestructurales en la CNO de teleósteos han demostrado la existencia de oligodendrocitos y astrocitos indiferenciados en hileras (Lillo et al., 2002). También, en el NO completo, incluida la CNO de *G. galloti*, se han observado oligodendrocitos inmaduros y astrocitos con técnicas inmunohistoquímica (Santos., 2004) y ultraestructurales (Santos, com pers.).

Por otro lado, en la CNO de pollo se relaciona la presencia de células GS⁺ y GFAP⁺ con la expresión de B-cadherinas y R-cadherinas, a su vez implicadas en la guía axónica de las células ganglionares (Gerhardt et al., 2000), hecho que también podría ocurrir con la macroglía GS⁺/GFAP⁺ observada en *G. galloti*, aunque son necesarios los estudios con las cadherinas.

Además, en la CNO de ejemplares adultos de *G. galloti*, observamos células que coexpresan ambos marcadores, GFAP/GS y forman una banda o membrana limitante entre la retina, conus papillaris y el nervio óptico. Esta membrana también expresa la proteína S-100 (Casañas., 2005), el 12F7, el 14F7 que se expresa en oligodendrocitos premielinizantes y el 4F2 que marca oligodendrocitos inmaduros (Santos., 2004). La glía peripapilaris en pollo se localiza en este mismo lugar (Schuck et al., 2000; Quesada et al., 2004) y expresa también numerosos marcadores como el 3BA8, marcador de neuronas, el MOSP, marcador de oligodendrocitos y la GFAP marcador de astrocitos y glía radial (Quesada et al., 2004).

Discusión

En función de estos datos, proponemos que la glía que forma la membrana limitante de la CNO de *G. galloti* estaría formada por células gliales especiales que, desde el punto de vista estructural y funcional, por el momento, no podemos encuadrar en ningún tipo concreto, aunque podrían tener similitud con las descritas en pollo (Shuck et al., 2000; Quesada et al., 2004).

Por otro lado, en mamíferos, las membranas limitantes de la CNO están formadas por astrocitos que expresan GFAP, cuya función principal sería formar una barrera para el paso de moléculas entre el NO y los tejidos adyacentes (Triviño et al., 1996, Ramírez et al., 1998; Salazar et al., 1998). También, la proteína GFAP proporciona rigidez y fuerza tensional a los procesos astrocitarios, y protege a los axones de las CG de pequeños desplazamientos producidos por los movimientos del globo ocular (Triviño et al., 1996; Salazar et al., 1998). En relación al lagarto, la presencia de GFAP es notoria en las membranas limitantes de la CNO, por lo que las funciones descritas en mamíferos también podrían ocurrir en esta especie.

En la ZMN de *G. galloti*, se observan dos zonas claramente diferenciadas en relación a la población glial. En la zona más próxima a la CNO (zona 5), la mayoría de células coexpresan GFAP/GS y presentan procesos GFAP positivos. Estas células contienen gran cantidad de gliofilamentos y podrían ser astrocitos con función mecánica, como en la CNO de mamíferos (Triviño et al., 1996). En esta región y en la tortuga *Mauremys caspica*, donde parece no existir lámina cribosa, se observa la misma disposición de astrocitos, y se sugiere la formación de una red similar a la lámina cribosa de mamíferos (Dávila et al., 1987). En *G. galloti*, los astrocitos podrían formar un red similar a dicha lámina como ocurre en tortuga, o presentar una función mecánica, mediante un amazón celular que separa los axones en haces, como en humanos (Salazar et al., 1998). En la zona más distal a la CNO (zona 6) existen dos poblaciones celulares una $GS^+/GFAP^+$ y otra $GS^+/GFAP^-$, como ocurría en la zona distal del conus papillaris (ZDC) de la CNO, por lo que su interpretación podría también ser similar (pg.144).

En la ZCN, así como, en el quiasma y tracto de *G. galloti*, se observan tres poblaciones celulares: $GS^+/GFAP^+$, que es mayoritaria, $GS^-/GFAP^+$ y $GS^+/GFAP^-$. Las dos primeras serían subpoblaciones celulares diferentes de astrocitos y la tercera podría ser una subpoblación de astrocitos u oligodendrocitos, ya que la GS también se expresa en estos últimos en mamíferos (Warringa et al., 1988, Cammer., 1990; D'amelio et al., 1990; Fressinaud et al., 1991; Tansey et al., 1991; Miyake & Kitamura., 1992; Domercq et al., 1999), y en el mesencéfalo en *G. galloti* (Monzón-Mayor et al., 1998).

Asimismo, en el nervio caudal y quiasma del reptil *G. galloti* se han detectado células que expresan los marcadores 4F2 y 14F7 en oligodendrocitos inmaduros (Santos, 2004) y en el quiasma también se ha demostrado ultraestructuralmente una subpoblación de oligodendrocitos maduros (Santos, resultados no publicados, 2005). Al respecto, alguna subpoblación de células GS-positiva observada durante el desarrollo en el lagarto, podría relacionarse con oligodendrocitos inmaduros o en fase de diferenciación, que intervendrían en el proceso de mielinización o bien en el mantenimiento de la mielina.

Por otro lado, durante la ontogenia de *G. galloti* se observan células $GFAP^+/GS^+$ alrededor de los vasos sanguíneos, las cuáles podrían relacionarse con astrocitos que inducen a las células endoteliales a formar la barrera hematoencefálica, como ocurre en mamíferos (Janzer et al., 1987; Lobrinus et al., 1992; Triviño et al., 1996), o a secretar factores solubles (Lobrinus et al., 1992; Janzer et al., 1993), que inducen la formación de uniones estrechas y la polaridad de transporte molecular en las células endoteliales (Tout et al., 1993).

Todo ello nos induce a pensar que el NO del reptil *G. galloti*, presenta una distribución glial específica en cuanto a la localización y la expresión de marcadores en las distintas zonas estudiadas, y además se confirma la heterogeneidad de las poblaciones gliales en esta región de la vía óptica.

4. MICROGLÍA

4.1 CONUS PAPILLARIS

Desde el E-37 hasta ejemplares adultos observamos células Lectina-positivas (LEA⁺) por toda la superficie del conus papillaris (CP), y debido a la gran cantidad de vasos sanguíneos, dicho marcaje parece corresponderse con células endoteliales, aunque no se descarta la presencia de microglía dentro del conus. Además, se muestra la presencia de células tipo ameboide LEA⁺ dentro de los vasos sanguíneos en el CP entre E-37 hasta adultos, y ultraestructuralmente dentro del conus (Alfayate, com pers,), lo que nos hace suponer que las células LEA⁺ pasen desde los vasos al conus. O bien, podrían entrar y migrar para formar parte de la microglía de la retina, como se ha sugerido en pollos (Navascués et al., 1995).

Por otro lado, en el lagarto se observan desde el E-35 hasta el E-40, células LEA⁺ de aspecto macrofágico en el humor vítreo próximas al conus o adosadas a su pared, también detectadas en pollos y denominadas peripecteneales (Uehara et al., 1990; Wolburg et al., 1999). Además, en pollos se supone que, estas células atraviesan la membrana basal del pecten oculi, migran a la retina y la colonizan (Navascués., 1995).

4.2. RETINA

4.2.1. Fenotipos microgliales durante la ontogenia

Durante el desarrollo, en E-35, las primeras células LEA⁺ presentan aspecto ameboide, en la MLI y la CG. En el E-37, se observan células pseudopódicas en la MLI, dendríticas en la CFN, y ameboides con pequeñas ramificaciones en la retina periférica. Y finalmente, en el E-40 se observan ameboides como las anteriores en la CG, CNI, y dendríticas en la CNI. Estos tipos morfológicos también se han identificado durante el desarrollo en cerebro de *G. galloti*, aves y ratas (Murabe & Sano., 1982; Ling et al., 1988; Castellano et al., 1991; Cuadros et al., 1994,1997, 1998; Dalmau et al., 1997; 1999; Plaza et al, 2002).

Sin embargo, las ovoides detectadas del E-37 al E-40 en la CG, no parecen corresponderse con la tipología general descrita en el SNC de Vertebrados (Murabe y

Sano, 1984; Ling et al., 1988; Castellano et al. 1991; Dalmau et al., 1997; 1999; Plaza et al, 2002).

Además, se observan estructuras muy pequeñas LEA⁺, en forma de puntos, en la CPE del E-37 al E-40, a modo de restos de poly-N-acetyl-lactosamina como ocurre en las fibras retinales de teleósteos (Jimeno et al., 1999).

En lagartos adultos, se observan células microgliales de aspecto ameboide y pseudopódicas en la CFN, y otras de gran tamaño y aspecto ameboide adosadas a las células ganglionares, ya descritas en teleósteos (Jimeno et al., 1999), aves (Navascués et al., 1994; Jeon et al., 2004) y mamíferos (Boya, 1987; Ashwell, 1989;Díaz Araya et al., 1995; García-Valenzuela et al., 2005).

En vertebrados, en general, la microglía se encuentra en las capas plexiformes (Aves: Navascués, 1994; peces: Dowding et al., 1991; Velasco et al., 1999; mamíferos: Kohno et al 1982; Boya et al., 1987; Chen et al., 2002; García-Valenzuela et al., 2005).

En relación a *G. galloti* en la CPI existen varias hileras de células LEA⁺ perfectamente delimitadas, Además, en el lagarto, estas hileras celulares son Vim⁺/GFAP⁺/GS⁺/S100⁺/Smi⁺/KB⁺. (Casañas, 2005; Arbelo et al com pers), hechos que confirman aún más la naturaleza microglial de dichas hileras celulares, aunque no se descarta la existencia de algunos procesos de Müller.

En relación a estos hechos y aunque en *G. galloti*, la microglía es abundante en la CPI, se reduce en las CFN, CG, CNI y en las proximidades de la CPE. Probablemente, estas diferencias con otros vertebrados se deban a las técnicas utilizadas en las distintas especies o bien a que los reptiles presenten un sistema diferente.

Al respecto, la presencia de la microglía en las capas plexiformes de *G. galloti* se relaciona con el papel macrofágico en regiones de contactos sinápticos como ya se ha

descrito en aves (Navascués et al., 1994). Por otro lado, centralmente a la CNI del lagarto, se detectan células LEA⁺, que podrían corresponderse con los cuerpos de la glía de Müller, detectados también con la proteína S-100 (Casañas., 2005), o bien con células de microglía. Próximas a la CPE se observan también células ovoides LEA⁺ que podrían ser cuerpos celulares desplazados de Müller, o células de microglía.

Otra característica de las células de microglía en el lagarto es que las formas ameboides aparecen en la superficie vítreal y luego ocupan posiciones más externas de la retina, lo que podría indicar migración de la zona vítreal a la esclerótica como también ocurre en la codorniz (Navascués et al., 1995).

Además observamos que las células de Müller son LEA positivas hecho también observado en teleósteos (Jimeno et al., 1999).

4.2.2. Vías de entrada de la microglía en la retina

En mamíferos se piensa que la microglía entra en la retina a través de los vasos sanguíneos (Sanyal & De Ruiter., 1985; Boya et al., 1987; Díaz-Araya et al., 1995), lo que sugiere un origen mesodérmico y monocítico. Por otra parte, se sabe que en la retina de conejo, la microglía está presente en una región avascular denominada “myelinated streak” (Schnitzer., 1989), y en aves, en retinas avasculares (Navascués et al., 1994; Sánchez-López et al., 2004) lo que indica que el origen monocítico parece descartarse en estos vertebrados. Sin embargo, en aves también se sugiere un origen mesodérmico postulándose distintas vías de entrada. Al respecto, en aves, los macrófagos del humor vítreo entran al pecten, migran a lo largo de la MLI, y se distribuyen desde la zona central a la periférica y de la vítreal a la esclerótica de la retina, enriqueciendo las capas plexiformes, donde se diferencian en microglía ramificada (Navascués et al., 1995). Además la microglía también accede a la retina desde el cuerpo ciliar (Marin-Teva et al., 1999) y desde la CNO (Navascués et al., 1995), aunque no se descarta un origen monocítico desde los vasos sanguíneos del pecten (Navascués et al., 1995).

Nuestros resultados en *G. galloti* parecen indicar que las células microgliales de la retina podrían proceder de:

1. Macrófagos vitreales que se adhieren a la superficie del conus papillaris, cruzan la lámina basal y migran desde el conus a la MLI, enriqueciendo las capas plexiformes como ocurre en aves (Navascués et al., 1995).
2. Los vasos sanguíneos del CP, ya que observamos células LEA⁺ en el interior de los mismos desde el E-37 hasta ejemplares adultos, como ocurre en aves (Navascués et al., 1995)
3. Desde el margen ciliar, ya que en estadios tempranos, se observan células pequeñas LEA⁺ en la capa ganglionar, que progresivamente ocupan regiones más centrales de la retina. Este hecho también ocurre en humanos, donde la microglía parece llegar a la retina, desde los vasos del cuerpo ciliar o el iris (Díaz-Araya et al., 1995), y en aves, donde la microglía parece acceder a la retina desde el cuerpo ciliar (Marin-Teva et al., 1999).

Todo lo comentado parece indicar, que las vías de entrada de la microglía en la retina de reptiles, aves y mamíferos, son bastante similares.

4.2.3. Relación entre las células picnóticas y la microglía en la retina

Las células picnóticas se han observado en el lagarto, sobretodo en las CG y CNI del E-35 al E-37. Esta presencia coincide con el periodo en que los axones de las células ganglionares comienzan a inervar el techo óptico, hecho que se relaciona con la hipótesis de que la muerte celular de las CGs depende de su diana (Oppenheim., 1991). También en mamíferos se describe que la muerte celular es el estímulo que favorece la entrada de las células gliales en la retina (Hume et al., 1983; Perry., 1987; Schnitzer., 1989; Ashwell., 1989; Pearson et al., 1993). En este sentido, en la retina de *G. galloti* se observa microglía y una alta población de células picnóticas desde E-35, que podrían estimular su entrada en la misma, particularidad también observada en el techo óptico de esta misma especie (Plaza et al., 2002).

4.3. NERVIO ÓPTICO

4.3.1. Morfología microglial durante la ontogenia

Nuestros resultados indican que las células microgliales del nervio quiasma y tracto óptico, se corresponden con los fenotipos observados en el techo óptico y corteza telencefálica de esta misma especie: ameboides, pseudopódicas, dendríticas, primitivas ramificadas y ramificadas (Plaza, 2002, 2004). Sin embargo, en la vía óptica hemos detectado otros dos tipos: de pequeño tamaño con morfología estrellada o bipolar, además de existir una diferencia temporal en la aparición de los distintos fenotipos.

La comparación de los tipos celulares microgliales de la parte anterior de la vía óptica (retina, nervio y quiasma) y la posterior o techo óptico (Plaza et al, 2002), nos indica, que los tipos de microglía aparecen de forma diferente en el tiempo. Así, la microglía ramificada se observa antes en el techo que en la vía óptica anterior, lo que parece indicar que esta región madura más tarde que el techo óptico (Plaza et al, 2002).

Por otra parte, durante el desarrollo del nervio óptico de aves se han detectado cuatro fenotipos diferentes de células microgliales: macrófagos redondeados, ameboides, alargados y células ramificadas (Mouhajid et al., 1996). También en humanos y durante el desarrollo del nervio óptico, se describen formas intermedias antes de que aparezca la microglía ramificada (Sturrock., 1984). La tipología microglial anteriormente descrita es muy similar a la observada en *G. galloti*.

Por otro lado, la microglía ramificada en el lagarto, suele presentar sus procesos orientados principalmente en la dirección de las fibras del nervio, lo que indica que, como en mamíferos, se adapta a la citoarquitectura del SNC (Lawson et al, 1994).

4.3.2. Vías de entrada de la microglía en el nervio óptico

Las células de microglía cambian sus fenotipos en relación a las condiciones microambientales variables del desarrollo (Wang et al., 1990) o a sus diferentes orígenes (Milligan et al., 1991; De Groot et al., 1992; Díaz-Araya et al., 1995; Provis et

Discusión

al., 1996; Andjelkovic et al., 1998). En relación a estos hechos, sugerimos que la microglía del nervio óptico de *G. galloti* podría tener varias vías de entrada:

1. La población de microglía pequeña, estrellada o bipolar localizada en la CNO, podría provenir del CP, a partir de macrófagos procedentes del humor vítreo como ocurre en aves (Navascués et al., 1995), o de macrófagos procedentes de los vasos que enriquecen el conus y migran luego a la CNO, posibilidad no descrita en otras especies.
2. La microglía situada en el nervio óptico, quiasma y tracto, podrían proceder de una población celular proveniente de las meninges, ya que se observan células LEA⁺ ameboides a ambos lados de la piamadre, dentro del nervio y rodeando el mesénquima.
3. Desde el ventrículo hipotalámico donde hemos observado células ameboides LEA⁺ en el E-37. Estas células podrían migrar entre las células neuroepiteliales como ocurre en el SNC de aves (Cuadros et al., 1994; Navascués et al., 1996; Castellano., 1996; Cuadros & Navascués, 1998; Navascués et al., 2000).
4. Desde los vasos sanguíneos mediante trasvase de células a través del endotelio como ocurre en el SNC de otros vertebrados (Castellano & González., 1996, revisión; Cuadros & Navascués., 1998, revisión). Así, hemos observado células ameboides LEA⁺ en el adulto próximas a la arteria central del nervio, dato que apoya la entrada desde los vasos sanguíneos.

En conjunto, estas posibilidades, a excepción de las migraciones desde el CP, también han sido propuestas para la microglía existente en el NO de aves (Mouhajid et al., 1996).

Por tanto, en el nervio óptico de *G. galloti*, la microglía parece tener fundamentalmente un origen mesodérmico a partir de precursores con linaje hematopoyético. Así, proceden de las meninges, luz ventricular, vasos sanguíneos y humor vítreo. Este origen hematopoyético, ha sido propuesto en distintos vertebrados, en general, en aves y mamíferos (Cuadros & Navascués., 1998; Navascués et al., 2000; Kaur et al., 2001; Levinson et al., 2003). Además, las células de microglía migran largas distancias desde su origen y se dividen durante la migración (Navascués et al., 2001a,b), hecho también observado en las células fusiformes PCNA⁺/LEA⁺ del nervio óptico durante el desarrollo en *G. galloti*.

4.3.3. Ultraestructura de las células microgliales en el nervio óptico

La ultraestructura de las células microgliales en el NO de *G. galloti* durante el desarrollo coincide con la descrita en los distintos vertebrados (Vaughn & Peters 1968; Stensaas, 1977; Murabe & Sano, 1982; Sturrock, 1984; Battisti et al., 1995), hecho que confirma su conservación durante la filogenia.

4.3.4. Significado funcional de la microglía durante la ontogenia

Durante el desarrollo del nervio óptico de *G. galloti*, una de las funciones de las células microgliales podría estar relacionada con la fagocitosis de los axones que degeneran, hecho también descrito en teleósteos (Dowding et al., 1991), tritón (Naujoks-Manteuffel & Niemann., 1994), *Xenopus* (Goodbrand & Gaze, 1991), aves (Mouhajid., 1996), ratón (Lawson et al., 1994), y humanos (Sturrock., 1984).

Además, la microglía en el SNC presenta funciones de guía y son promotoras del crecimiento axonal en mamíferos (Rabchevsky & Streit, 1997; Streit, 2001), y en el nervio óptico en aves (Mouhajid et al., 1996). En el lagarto, desde E-35 a E-40, la alta densidad de microglía presente en la ZTNR podría también estar relacionada con la participación en la guía de axones de las células ganglionares.

Asimismo, durante el desarrollo, la microglía interviene en la gliogénesis, mediante secreción de factores de crecimiento (Shimogo et al., 1991) y en el control de la proliferación y diferenciación astrogial (Giulian, a,b,c; Castellano et al., 1996). En nuestro estudio y, debido a la similitud de las poblaciones gliales, fundamentalmente con aves y mamíferos, no descartamos que las citadas funciones de la microglía sean vitales en la gliogénesis del nervio óptico.

En relación a la alta densidad microglial presente en el adulto de *G. galloti*, sugerimos que, podrían formar parte de una red inmunocompetente (Graeber et al.,

1990) o bien secretar factores de crecimiento como en la etapa embrionaria, e intervenir en la regeneración del nervio óptico (Lang et al., 1998, 2000).

4.4. EXPRESIÓN FUNCIONAL DE LA LECTINA DE TOMATE EN LA POBLACIÓN MICROGLIAL.

Durante el desarrollo de la vía óptica del lagarto, la intensidad en la expresión de la lectina se reduce desde las células ameboides a ramificadas. Esta característica también ha sido demostrada en el techo óptico y corteza telencefálica en esta misma especie (Plaza., 2002) postulándose en rata que dichas variaciones podrían deberse al grado de diferenciación de cada fenotipo (Acarín et al., 1994).

Por otra parte, las lectinas son proteínas que unen grupos de carbohidratos e interactúan específicamente con los glicoconjugados de membrana (Mannoji et al., 1986; Streit et al., 1987; Acarín et al., 1994) o se unen a los residuos del azúcar poli-N-acetil-lactosamina que se encuentra en la membrana de la microglía en rata y peces (Acarín et al., 1994; Velasco et al., 1995; Jimeno et al., 1999) y en el reptil *G. Galloti* (Plaza., 2002). Aunque no se conoce el papel exacto de estos residuos, como polilactosaminoglicanos, se les atribuyen funciones de reconocimiento (Feizi et al., 1985), de adherencia celular (Chang et al., 1977), de interacción mediada por receptor (Nakagawa et al., 1986) o de interrelación con neurotransmisores (Torrens et al., 1986, 1989; Marty et al., 1989), funciones que, con mucha probabilidad podrían conservarse a través de la filogenia.

4.5. CÉLULAS LEA-POSITIVAS/PCNA-POSITIVAS

4.5.1. CONUS PAPILLARIS

En el lagarto, se ha detectado la coexistencia de los marcadores Lectina-PCNA desde E-37 hasta eclosión. Este hecho, posiblemente se deba a la proliferación de las células endoteliales durante la formación de los vasos sanguíneos, o a la proliferación de células macrofágicas que migran hasta la retina y la CNO. En el resto de las especies no se ha realizado este marcaje.

4.5.2. RETINA

La proliferación de la microglía durante el desarrollo del SNC es un evento que contribuye al establecimiento de la densidad microglial en el individuo maduro (Dalmau et al., 2003).

La densidad de las células proliferativas microgliales es variable en las distintas regiones del SNC (Lawson et al., 1990). Al respecto, la retina de *G. galloti* presenta densidad diferente respecto al techo óptico y la corteza cerebral en esta misma especie (Plaza et al., 2002), así como en relación a la retina de aves (Marin-Teva., 1999).

En aves, se observa invasión de microglía en los últimos estadios embrionarios y la BHE madura algunos días más tarde en postnatales (Stewart & Willey., 1981) o después de 2 semanas en ratas postnatales (Xu et al., 1993). Estos eventos, probablemente se lleven a cabo con anterioridad en el lagarto, es decir, a partir de eclosión, cuando el animal presenta una vía óptica prácticamente funcional.

4.5.3. NERVIO ÓPTICO

Durante el desarrollo del nervio óptico del lagarto nos llama la atención que, la mayor parte de las células proliferativas son macrogliales, observándose algunas microgliales dendríticas proliferativas en la ZCN y ZMN. Sin embargo, en la CNO la microglía proliferativa es baja, causa que puede deberse a que sus precursores se originan fuera de la vía óptica, como ocurre en la mayoría de los vertebrados (revisión: Navascués et al., 2000).

Por otro lado, en el lagarto y a partir del E-40, la microglía proliferativa aumenta en la zona del quiasma limítrofe con el tracto, observándose un aumento de la población glial en la zona caudal del nervio y quiasma entre eclosión y adulto. Este hecho hace suponer que existe algún tipo de proliferación local en la zona del quiasma limítrofe con el tracto como se describe en roedores (Milligan et al., 1991; Perry & Gordon., 1991).

CONCLUSIONES

Conclusiones

1. Los cambios más significativos que ocurren durante el desarrollo en el Conus papillaris (CP) de *G. galloti*, como son, la formación del primordio, aparición de células pigmentadas, vasos sanguíneos e inducción de la barrera hematoencefálica, también se observa en el pecten de aves, lo que indica que ambas estructuras son prácticamente homólogas.
2. El desarrollo del CP es paralelo a la formación de las capas de la retina y como en aves se relaciona con el requerimiento de oxígeno y nutrientes necesarios para la morfogénesis. Asimismo, el CP es cónico, de gran tamaño y podría relacionarse con el aumento en la agudeza visual, como ocurre en el pecten de aves diurnas.
3. En la retina de *G. Galloti* las primeras células en diferenciarse son las ganglionares, y los gradientes de maduración de las capas retinales, central-periférico y vítreo-esclerótica coincide en todos los vertebrados. Sin embargo, el gradiente temporal-nasal es análogo al de aves.
4. La expresión de la GS y GFAP en la retina del lagarto se observa en las células de Müller como en otros vertebrados, lo que indica que dichas proteínas se conservan durante la filogenia. Además, el patrón de expresión temporal de la GS en *G. galloti* es similar al de aves.
5. En el nervio óptico (NO) de *G. Galloti* la diferenciación y migración glial ocurre prenatalmente, como en aves y mamíferos. Sin embargo, la mielinización es un proceso perinatal como en aves, aunque es postnatal en mamíferos.
6. En el nervio óptico del lagarto, las células gliales GS^+ , presentan un gradiente caudo-rostral, como en cerebro, sin embargo, la expresión aumenta hasta adultos en la vía óptica. Este hecho podría indicar que en el NO existe una mayor actividad enzimática que mantiene el glutamato en niveles no tóxicos para los oligodendrocitos, como ocurre en mamíferos.
7. El nervio óptico, presenta distintas subpoblaciones gliales ($GS^+/GFAP^+$, $GS^-/GFAP^+$, $GS^+/GFAP^-$), que se distribuyen en sus diferentes zonas, hecho que confirma la heterogeneidad glial, como sucede en el SNC de mamíferos.

Conclusiones

8. Los tipos de células microgliales observados en la vía óptica (retina, NO, quiasma y tracto óptico de *G. galloti* se corresponden con células ameboides, pseudopódicas, dendríticas, primitivas ramificadas y ramificadas, similares a las observadas en el cerebro de esta especie, en aves y en mamíferos.
9. Las células LEA positivas (microglía y Müller) situadas en las zonas sinápticas de la Capa Plexiforme Interna, podrían realizar funciones macrofágicas como ocurre en otros vertebrados
10. La gran cantidad de microglía presente entre el E-35-40 y su ausencia en adultos, en la zona de transición nervio retina (CNO) nos sugiere su participación en la formación de una barrera real entre la retina y el NO como en teleosteos, además de su implicación en la guía de axones de las células ganglionares, como ocurre en otras regiones del SNC de mamíferos.
11. Se propone que las células microgliales de la retina en *G. galloti* tienen un origen mesodérmico, con vías de entrada que proceden del vítreo, margen ciliar o de vasos sanguíneos del CP, como en aves, o bien del margen ciliar y humor vítreo como en humanos.
12. Sugerimos que en el NO del lagarto, la microglía tiene un origen mesodérmico, y proviene del humor vítreo, o bien de meninges, ventrículo hipotalámico y vasos sanguíneos, como en aves y mamíferos.
13. Y finalmente, la vía óptica del lagarto es prácticamente madura en el momento de la eclosión como en pollos contrariamente a mamíferos que es posnatal.

ABREVIATURAS

Abreviaturas

AD: Adulto
AC: Arteria central
CC: Cuerpo ciliar
CF: Capa de fotorreceptores
CG: Capa ganglionar
CGs: Células ganglionares retinales
CP: Conus papillaris
CFN: Capa de fibras del nervio óptico.
CNE: Capa nuclear externa
CNI: Capa nuclear interna
CNO: Cabeza del nervio óptico.
CPE: Capa plexiforme externa
CPI: Capa plexiforme interna
ECL: Eclosión.
E-31 al E-40: Estadíos de desarrollo.
HV: Humor vítreo
K-B: Klüver- Barrera.
MLE: Membrana limitante externa
MLI: Membrana limitante interna.
MBP: Proteína básica de la mielina.
NO: Nervio óptico
PLP: Proteína proteolípida.
Q: Quiasma óptico
RC: Retina central
RM: Retina marginal.
TrO: Tracto óptico.
ZCN: Zona caudal del nervio.
ZDC: Zona distal al conus papillaris.
ZEN: Zona extraocular del nervio.
ZIN: Zona intraocular del nervio.
ZLNR: Zona limitante nervio retina.
ZP: Zona peripapillaris.
ZTNR: Zona transición nervio retina.
ZMN: Zona medial del nervio.

BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía

- Abcouwer SF, Lukaszewicz GC, Ryan US & Souba WW (1995).** Molecular regulation of lung endothelial glutamine synthetase expression. *Surgery*. 118(2):325-34.
- Acarín L, Vela JM, González B & Castellano B (1994).** Demonstration of poly-N-acetyl lactosamine residues in amoeboid and ramified microglial cells in rat brain by tomato lectin binding. *J Histochem Cytochem*. 42(8):1033-41.
- Ahmad I, Tang L & Pham H (2000).** Identification of neural progenitors in the adult mammalian eye. *Biochem Biophys Res Commun*. 270: 517-521.
- Albert B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K & Watson JD (1996b).** El citoesqueleto. En *Biología molecular de la célula*. Omega S.A, tercera edición, cap. 16, pp. 852-860.
- Alfayate MC, Santos E, Yanes C, Casañas N, Viñoly R, Romero- Aleman M & Monzón- Mayor M (2005).** Is the conus papillaris of the lizard a model of blood brain barrier?. VII European meeting on Glial Cell Function in Health and Disease. Amsterdam
- Alunni A, Vaccari S, Torcia S, Meomartini ME, Nicotra A & Alfei L (2005).** Characterization of glial fibrillary acidic protein and astroglial architecture in the brain of a continuously growing fish, the rainbow trout. *Eur. J. Histochem*. 49(2): 157-66.
- Alvarez-Buylla A, Herrera DG & Wichterle H (2000).** The ventricular zone: source of neuronal precursors for brain repair. *Prog Brain Res*. 127: 1-11.
- Anderson ES, Bjartmar C, Westermarck G & Hildebrand C (1999).** Molecular heterogeneity of oligodendrocytes in chicken white matter. *Glia*. 27(1):15-21.
- Andjelkovic AV, Nikolic B, Pachter JS & Zecevic N (1998).** Macrophages/microglial cells in human central nervous system during development: an immunohistochemical study. *Brain Res*. 814(1-2):13-25.
- Ashwell K (1989).** Development of microglia in the albino rabbit retina. *J Comp Neurol*. 287: 286-301.
- Ashwell KW, Holländer H, Streit W & Stone J (1989).** The appearance and distribution of microglia in the developing retina of the rat. *Vis Neurosci*. 2:437-448.

Bibliografía

- Baas D, Dalencon D, Fressinaud C, Vitkovic L & Sarlieve LL** (1998). Oligodendrocyte-type-2 astrocyte (O-2A) progenitor cells express glutamine synthetase: developmental and cell type-specific regulation. *Mol Psychiatry*. 3(4):356-61.
- Banati RB, Egenesperger R, Maassen A, Hager G, Kreutzberg GW & Graeber MB** (2004). Mitochondria in activated microglia in vitro. *J Neurocytol*. 33(5):535-41
- Battisti WP, Wang K & Murray M** (1995). Macrófagos, microglía, and astrocytes are rapidly activated after crush injury of the goldfish optic nerve: a light and electron microscopic analysis. *J. Comp. Neurol*. 354: 306-320.
- Bignami A & Dahl D** (1974). The development of Bergmann glia in mutant mice with cerebellar malformations: reeler, staggerer and weaver. Immunofluorescence study with antibodies to the glial fibrillary acidic protein. *J Comp Neurol*. 155(2):219-29.
- Bignami A & Dahl D** (1976a). Immunogenic properties of the glial fibrillary acidic protein. *Brain Res*. 29; 116(1):150-7.
- Bignami A & Dahl D** (1979). The radial glia of Muller 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(1):63-9.
- Becker CG, Becker T, Meyer RL, Schachner M** (1999). Tenascin-R inhibits the growth of optic fibers in vitro but is rapidly eliminated during nerve regeneration in the salamander *Pleurodeles waltl*. *J Neurosci*. 19(2):813-27.
- Björklund H & Dahl D** (1985). Glial fibrillary acidic protein (GFAP)-like immunoreactivity in the rodent eye. *J Neuroimmunol*. 8:331-345.
- Blakemore WF** (1982). Ethidium bromide induced demyelination in the spinal cord of the cat. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 8(5):365-75.
- Boya J, Calvo JL & Carbonell AL** (1987). Appearance of microglial cells in the postnatal rat retina. *Arch Histol Jap*. 50:223-228.
- Boya J, Carbonell AL, Calvo JL & Borregon A** (1991). Microglial cells in the Central Nervous System of the rabbit and rat: cytochemical identification using two different lectins. *Acta Anat* 140:250-253.
- Brach V** (1975). The effect of intraocular ablation of the pecten oculi of the chicken. *Invest Ophthalmol*. 14 (2):166-8

- Bringmann A, Skarchkov SN, Pannicke T, Biedermann B, Wolburg H, Orkand RK & Reichenbach A** (2000). Müller Glial Cells in Anuran Retina. *Microscopy research and technique* 50:384-393.
- Braekevelt CR** (1989). Fine structure of the conus papillaris in the bobtail goanna (*Tiliqua rugosa*). *Histol Histopathol.* 4(3):287-93.
- Braekevelt CR** (1994). Fine structure of the pecten oculi in the American crow (*Corvus Branchyrhynchos*). *Anat Histol Embryol.* 23(4): 357-66
- Braekevelt CR & Richardson KC** (1996). Fine structure of the pecten oculi in the Australian galah (*Eolophus roseicapillus*) (Aves). *Histol Histopathol.* 11(3):565-71.
- Bravo R & McDonald-Bravo H** (1987). Existence of two populations of cyclin/proliferating cell nuclear antigen during the cell cycle. Association with DNA replication sites. *J Cell Biol.* 105:1549-1554.
- Bravo R, R Frank, PA Blundell & McDonald-Bravo H** (1987). Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase- δ . *Nature.* 326: 515-517.
- Bunge RP** (1968). Glial cells and the central myelin sheath. *Physiol Rev.* 48(1):197-251.
- Buss A, Sellhaus B, Wolmsley A, Noth J, Schwab ME & Brook GA** (2005). Expression pattern of NOGO-A protein in the human nervous system. *Acta Neuropathol.* 110(2): 113-9.
- Cacci E, Claasen JH & Kokaia Z** (2005). Microglia-derived tumor necrosis factor-alpha exaggerates death of newborn hippocampal progenitor cells in vitro. *J Neurosci Res.* 15;80(6):789-97.
- Caldani M, Rolland B, Fages C & Tardy M** (1982). Glutamine synthetase activity during mouse brain development. *Experientia.* 38(10):1199-202.
- Cammer W, Sacchi R & Sapirstein V** (1985). Immunocytochemical localization of carbonic anhydrase in the spinal cords of normal and mutant (shiverer) adult mice with comparisons among fixation methods. *J Histochem Cytochem.* 33(1):45-54.
- Cammer W** (1990). Glutamine synthetase in the central nervous system is not confined to astrocytes. *J Neuroimmunol.* 26:173-178.

Bibliografía

- Campagnoni AT & Macklin WB** (1988). Cellular and molecular aspects of myelin protein gene expression. *Mol Neurobiol.* 2:41-89.
- Campbell K & Gotz M** (2002). Radial glia: multi-purpose cells for vertebrate brain development. *Trends Neurosci.* 25(5):235-8.
- Casañas N** (2005). Proliferación y Diversidad de las células astrogiales durante la ontogenia del Sistema Visual de *Galloti galloti*. Tesis Doctoral, Facultad de Biología de la Universidad de la Laguna.
- Castellano B & González B** (1996). Las células de microglía: origen, diferenciación y función en el cerebro normal. *Boletín SENC*, Vol. 5 Num. 1.
- Castellano B, Gonzalez B, Finsen BR & Zimmer J** (1990). Histochemical demonstration of purine nucleoside phosphorylase (PNPase) in microglial and astroglial cells of adult rat brain. *J Histochem Cytochem.* 38(11):1535-9.
- Castellano B, Gonzalez B, Dalmau I & Vela JM** (1991). Identification and distribution of microglial cells in the cerebral cortex of lizard: a histochemical study. *J Comp Neurol.* 311: 434-444.
- Castellano-López, González B & Nieto-Sampedro M** (1998). Understanding glial cells. *Kluwer Academic publishers.* p 19-111.
- Chabot P & Vincent M** (1990). Transient expression of an intermediate filament-associated protein (IFAPa-400) during in vivo and in vitro differentiation of chick embryonic cells derived from neuroectoderm. *Brain Res Dev Brain Res.* 54(2):195-204.
- Chang CM, Rosen SD & Barondes SH** (1977). Cell surface location of an endogenous lectin and its receptor in *Polysphondylium pallidum*. *Exp Cell Res.* 104(1):101-9.
- Chan-Ling T & Stone J** (1991). Factors determining the migration of astrocytes into the developing retina: migration does not depend on intact axons or patent vessels. *J Comp Neurol.* 303 (3): 375-386.
- Chen H & Weber AJ** (2002). Expression of glial fibrillary acidic protein and glutamine synthetase by Muller cells after optic nerve damage and intravitreal application of brain-derived neurotrophic factor. *Glia.* 38(2):115-25.
- Chen L, Yang P & Kijlstra A** (2002). Distribution, markers, and functions of retinal microglía. *Ocul Immunol Inflamm.* 10(1): 27-39.

- Cho SS, Lucas JJ & Hyndman** (1999). Transferrin binding protein is expressed by oligodendrocytes in the avian retina. *Brain Res.* 816(1): 229-33
- Cuadros MA, Moujahid A, Martín-Partido G & Navascués J** (1992). Microglia in the mature and developing quail brain as revealed by a monoclonal antibody recognizing hemopoietic cells. *Neurosci Lett.* 148:11-14
- Cuadros MA, Martín C, Coltey P, Almendros A & Navascués J** (1993). First appearance, distribution, and origin of macrophages in the early development of the avian central nervous system. *J Comp Neurol.* 330:113-129.
- Cuadros MA, Moujahid A, Quesada A & Navascués J** (1994). Development of microglia in the quail optic tectum. *J Comp Neurol.* 348:207-224.
- Cuadros MA, Rodríguez-Ruiz J, Calvente R, Almendros A, Marin-Teva JL & Navascués J** (1997). Microglia development in the quail cerebellum. *J Comp Neurol.* 389(3):390-401.
- Cuadros MA & Navascués J** (1998). The origin and differentiation of microglial cells during development. *Prog Neurobiol.* 56: 173-189.
- Cuadros MA & Navascués J** (2001). Early origin and colonization of the developing central nervous system by microglial precursors. *Elsevier Science B.* 132: 51-56.
- D'amelio F, Eng LF & Gibas MA** (1990). Glutamine synthetase immunoreactivity is present in oligodendroglia of various regions of the central nervous system. *Glia.* 3:335-341.
- Dahl D, Crosby CJ, Sethi JS & Bignami A** (1985). Glial fibrillary acidic (GFA) protein in vertebrates: immunofluorescence and immunoblotting study with monoclonal and polyclonal antibodies. *J Comp Neurol.* 239(1):75-88.
- Dalmau I, Finsen B, Tender N, Zimmer J, González B & Castellano B** (1997). Development of microglia in the prenatal rat hippocampus. *J Comp Neurol.* 377:70-84.
- Dalmau I, Vela JM, González B & Castellano B** (1998). Expresión of purine metabolism-related encimes by microglial cells in the developing rat brain. *J Comp Neurol.* 398(3): 333- 46
- Dalmau I, Vela JM, González B, Finsen B & Castellano B** (2003). Dynamics of Microglia in the Developing Rat Brain. *J Comp Neurol.* 458:144-157.

- Dávila JC, Guirado S, De la Calle A & Marín-Girón F** (1987). The intra-ocular portion of the optic nerve in the turtle *Mauremys caspica*. *J Anat.* 151:189-98
- De Groot CJ, Huppes W, Sminia T, Kraal G & Dijkstra CD** (1992). Determination of the origin and nature of brain macrophages and microglial cells in mouse central nervous system, using non-radioactive in situ hybridization and immunoperoxidase techniques. *Glia.* 6(4):301-9.
- De Raad S, Szczesny PJ, Munz K & Reme CE** (1996). Light damage in the rat retina: glial fibrillary acidic protein accumulates in Muller cells in correlation with photoreceptor damage. *Ophthalmic Res.* 28(2):99-107.
- Del Río-Hortega P** (1919). El "tercer elemento" de los centros nerviosos. *Bol Soc Esp Biol.* 9:68-120.
- Derouiche A & Frotscher M** (1991). Astroglial processes around identified glutamatergic synapses contain glutamine synthetase: evidence for transmitter degradation. *Brain Res.* 552(2):346-50.
- Derouiche A & Rauen T** (1995). Coincidence of L-glutamate/L-aspartate transporter (GLAST) and glutamine synthetase (GS) immunoreactions in retinal glía: Evidence for coupling of GLAST and GS in transmitter clearance. *J Neurosci Res.* 41:131-143.
- Derouiche A** (1996). Possible role of the Muller cell in uptake and metabolism of glutamate in the mammalian outer retina. *Vision Res.* 36(24):3875-80.
- Diaz-Araya CM, Provis JM, Penfold PL & Billson FA** (1995). Development of microglial topography in human retina. *J Comp Neurol.* 363: 53-68.
- Didier M, Harandi M, Aguera M, Bancel B, Tardy M, Fages C, Calas A, Stagaard M, Mollgard K & Belin MF** (1986). Differential immunocytochemical staining for glial fibrillary acidic (GFA) protein, S-100 protein and glutamine synthetase in the rat subcommissural organ, nonspecialized ventricular ependyma and adjacent neuropil. *Cell Tissue Res.* 245:343-351.
- Dieterich CE, Dieterich HJ & Hildebrand R** (1976). Comparative electron-microscopic studies on the conus papillaris and its relationship to the retina in night and day active geckos. *Albrecht Von Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol.* 200(3):279-92.
- Dieterich HJ & Dieterich CE** (1975). Comparative electron microscopy studies on the pecten oculi in birds and the conus papillaris in reptiles. *Verh Anat Ges.* 69:635-42.

Bibliografía

- Distler C, Weigel H & Hoffmann KP** (1993). Glia cells of the monkey retina. I. astrocytes. *J Comp Neurol.* 333(1):134-47.
- Distler C, Kopatz K & Telkes I** (2000). Developmental changes in astrocyte density in the macaque perifoveal region. *Eur J Neurosci.* 12: 1331-1341.
- Domercq M, Sánchez-Gómez MV, Areso P & Matute C** (1999). Expression of glutamate transporters in rat optic nerve oligodendrocytes. *European Journal of Neuroscience.* 11: 2226-2236.
- Dowding AJ, Maggs A & Scholes J** (1991). Diversity amongst the microglia in growing and regenerating fish CNS: immunohistochemical characterization using FL.1, an anti-macrophage monoclonal antibody. *Glia.* 4(4):345-64.
- Dufaure JP & Hubert J** (1961). Table de développement du lézard vivipare (*Lacerta vivipara* jacquin). *Arch Anat Microsc Morphol Exp.* 50: 309-327.
- Dunlop SA, Tee LBG, Rodger J, Harvey AR, Roberts JD & Beazley LD** (2002). Development of Visual projections follows an avian/mammalian-like sequence in the lizard *Ctenophorus ornatus*. *J Comp Neurol.* 453:71-84.
- Dyck RH, Van Eldik LJ & Cynader MS** (1993). Immunohistochemical localization of the S-100b protein in postnatal cat visual cortex: spatial and temporal patterns of expression in cortical and subcortical glia. *Dev Brain Res.* 72:181-192.
- Earle KL & Mitrofanis J** (1998). Development of glia and blood vessels in the internal capsule of rats. *J Neurocytol.* 27(2):127-39.
- Easter SSJr, Russoff AC & Kish PE** (1981). The growth and organization of the optic nerve and tract in juvenile and adult goldfish. *J Neurosci.* 1:793-811.
- Ekström P, Sanyal S, Narfström K, Chader J & Van Veen T** (1988). Accumulation of glial fibrillary acidic protein in Müller radial glia during retinal degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 29:1363-1371.
- Eng LF** (1980). The glial fibrillary acidic (GFA) protein. In R. Bradshaw and D. Schneider (eds): *Proteins of the Nervous System*. New York: Raven Press, pp 85-117.
- Eng LF, Ghirnikar RS & Lee YL** (2000). Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochem Res.* 25(9-10):1439-51.

Bibliografía

- Engelhardt B & Risau W** (1995). Development of the blood-brain barrier. In "New Concepts of a Blood-Brain Barrier" (J. Greenwood et al., eds.), pp. 11-31. Plenum. New York.
- Federoff S** (1995). Development of microglia. In: Kettenmann H.& RANSOM br, editors. Neuroglia. New York: Oxford University Press, pp 162-181.
- Fedoroff S, Zhair R & Novak J P** (1997). Microglia and astroglia have a common progenitor cell. *J Neurosci Res.* 50: 477-486.
- Feizi T** (1985). Demonstration by monoclonal antibodies that carbohydrate structures of glycoproteins and glycolipids are onco-developmental antigens. *Nature.* 314:53.
- Fischer AJ & Reh TA** (2000). Identification of a proliferating marginal zone of retinal progenitors in postnatal chickens. *Develop Biol.* 220: 197-210.
- Fischer AJ & Reh TA** (2001). Müller glia are a potential source of neural regeneration in the postnatal chicken retina. *Nat Neurosci.* 4 (3): 247-252.
- Fischer AJ & Reh TA** (2003a). Growth factors induce neurogenesis in the ciliary body. *Dev Biol.* 259: 225-240.
- Fischer AJ & Reh TA** (2003b). Potential of Müller glia to become neurogenic retinal progenitor cells. *Glia.* 43(1): 70-6.
- Franceschini V & Ciani F** (1992). A histochemical study of the microglial cells in the brain of *Salamandra salamandra* by lectin bindin. *Eur J Histochem.* 36: 215-222.
- Fressinaud C, Weinrauder H, Delaunoy J-P, Tholey G, Labourdette G & Sarlieve LL** (1991). Glutamine Synthetase Expresión in Rat Oligodendrocytes in culture: Regulation by Hormones and Growth Factors. *J Cell Physiol.* 149:459-468.
- Fröhlich E & Klessen K** (2000) Glutamine synthetase and marker enzymes of the blood-retina barrier in fetal bovine retinal pigment epithelial cells. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol.* 238: 500-507.
- Fujita Y, Imagawa T & Uehara M** (2001). Fine structure of the retino-optic nerve junction in the chicken. *Tissue Cell.* 33 (2): 129-34.
- García M & Vecino E** (2003). Role of Muller glia in neuroprotection and regeneration in the retina. *Histol Histopathol.* 18(4):1205-18.

Bibliografía

- García-Valenzuela E, Sansar C, Sharma & Piña A** (2005). Multilayered retinal microglial response to optic nerve transection in rats. *Molecular Vision*. 11:225-231
- Gensert JM & Goldman JE** (2001). Heterogeneity of cycling glial progenitors in the adult mammalian cortex and white matter. *J Neurobiol*. 48(2):75-86.
- Gerhardt H, Liebner S & Wolburg H** (1996). The pecten oculi of the chicken as a new in vivo model of the blood-brain barrier. *Cell Tissue Res*. 285: 91-100.
- Gerhardt H, Schuck J & Wolburg H** (1999). Differentiation of a unique macroglial cell type in the pecten oculi of the chicken. *Glia*. 28: 201-214.
- Ghandour MS, Langley OK & Clos J** (1983) Immunohistochemical and biochemical approaches to the development of neuroglia in the CNS, with special reference to cerebellum. *Int J Dev Neurosci*. 1:411-425.
- Ghandour MS, Langley OK, Vincendon G, Gombos G, Filippi D, Limozin N, Dalmaso D & Laurent G** (1980). Immunohistochemical and immunohistochemical study of carbonic anhydrase II in adult rat cerebellum: a marker for oligodendrocytes. *Neuroscience*. 5(3):559-71.
- Gilbert** (2000). *Developmental Biology*. 6th Ed. Sinauer 143-176 & 399-403.
- Giulian D & Baker TJ** (1985). Peptides released by ameboid microglia regulate astroglial proliferation. *J Cell Biol*. 101(6):2411-5.
- Giulian D & Lachman LB** (1985). Interleukin-1 stimulation of astroglial proliferation after brain injury. *Science*. 228(4698):497-9.
- Giulian D, Tomozawa Y, Hindman H & Allen RL** (1985). Peptides from regenerating central nervous system promote specific populations of macroglia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 82(12):4287-90.
- Götz A, Buffo A & Hack M** (2005). The neurogenic roles of radial glia and astroglia a new view on gliosis. VII European meeting on Glial Cell Function in Health and Disease. Amsterdam
- Goodbrand LA & Gaze RM** (1991). Microglia in tadpoles of *Xenopus laevis*: normal distribution and the response to optic nerve injury. *Anat Embryol*. 184:71-82.
- Gorovits R, Avidan N, Avisar N, Shaked I & Vardimon L** (1997). Glutamine synthetase protects against neuronal degeneration in injured retinal tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94(13):7024-9.

Bibliografía

- Graeber BM & Streit JW** (1990). Microglial: immune network in the CNS. *Brain Pathol.* 1:2-5.
- Guérin CJ, Anderson DH & Fisher SK** (1990). Changes in intermediate filament immunolabeling occur in response to retinal detachment and reattachment in primates. *Inv Ophthalmol Vis Sci.* 31: 1474-1482.
- Haddad A, Ramírez AI, Laicine EM, Salazar JJ, Triviño A & Ramírez JM** (2001). Immunohistochemistry in association with scanning electron microscopy for the morphological characterization and location of astrocytes of the rabbit retina. *J Neurosci Methods.* 106:131-137.
- Hagedorn M & Fernald RD** (1992). Retinal growth and cell addition during embryogenesis in the teleost, *Haplochromis burtoni*. *J Comp Neurol.* 321(2): 193-208.
- Hall PA & Woods L** (1990). Immunohistochemical markers of cellular proliferation: achievements, problems and prospects. *Cell Tissue Kinet.* 23: 505-522.
- Hamberger AC, Chiang GH, Nysten ES, Scheff SW & Cotman CW** (1979). Glutamate as a CNS transmitter. I. Evaluation of glucose and glutamine as precursors for the synthesis of preferentially released glutamate. *Brain Res.* 168(3):513-30.
- Harris WA** (1997). Cellular diversification in the vertebrate retina. *Curr Opin Genet Dev.* 7(5): 651-8.
- Hayreh SS** (1974). Anatomy and physiology of the optic nerve head. *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol.* 78: 240-274.
- Heidinger V, Hicks D, Sahel J & Dreyfus H** (1999). Ability of retinal Muller glial cells to protect neurons against excitotoxicity in vitro depends upon maturation and neuron-glial interactions. *Glia.* 25(3):229-39.
- Hering H & Kröger S** (1996). Formation of synaptic specializations in the inner plexiform layer of the developing chick retina. *J Comp Neurol.* 375(3):393-405.
- Hertz L, Peng L, Westergaard N, Yudkoff M & Schousboe A** (1992). Neuronal-astrocyte interactions in metabolism of transmitter amino acids of the glutamate family. In: *Drug research related to neuroactive amino acids.* Schousboe A, Diemer N and Kotod H (eds). Copenhagen. Munksgaard. pp 30-48

Bibliografía

- Hirasawa T, Ohsawa K, Imai Y, Ondo Y, Akazawa C, Uchino S & Kohsaka S** (2005). Visualization of microglia in living tissues using Ibal-EGFP transgenic mice. *J Neurosci Res.* 81(3): 357-62
- Hirata A, Kitaoka T, Ishigooka H & Ueno S** (1991). Cytochemical studies of transitional area between retina and optic nerve. *Acta Ophthalmol.* 69(1):71-5.
- Hogan MJ, Alvarado JA & Weddell JE** (1971) *Histology of the human eye. An atlas and textbook*, Toronto; W.B. Saunders, pp:523-606.
- Holländer H, Makarov F, Dreher Z, van Driel D, Chan-Ling TL & Stone J** (1991). Structure of the macroglia of the retina: sharing and division of labour between astrocytes and Müller cells. *J Comp Neurol.* 313(4): 587-603.
- Hollander H, Makarov F, Stefani FH & Stone J** (1995). Evidence of constriction of optic nerve axons at the lamina cribrosa in the normotensive eye in humans and other mammals. *Ophthalmic Res.* 27(5):296-309.
- Holt CE, Bertsch TW, Ellis HM & Harris WA** (1988). Cellular determination in the *Xenopus* retina is independent of lineage and birth date. *Neuron.* 1(1):15-26.
- Hozumi I, Chiu FC & Norton WT** (1990). Biochemical and immunocytochemical changes in glial fibrillary acidic protein after stab wounds. *Brain Res.* 524(1):64-71.
- Hu M & Easter SS** (1999). Retinal neurogenesis: the formation of the initial central patch of postmitotic cells. *Dev Biol.* 207(2):309-21.
- Hughes WF & LaVelle A** (1974). On the synaptogenic sequence in the chick retina. *Anat Rec.* 179(3):297-301.
- Hume DA, Perry VH & 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(1):253-7.
- Huxlin KR, Sefton AJ & Furby JH** (1992). The origin and development of retinal astrocytes in the mouse. *J Neurocytol.* 21(7): 530-544.
- Huxlin KR, Dreher Z, Schulz M & Dreher B** (1995). Glial reactivity in the retina of adult rats. *Glía.* 15(2):105-18.

- Imamoto K & Leblond CP** (1978). Radioautographic investigation of gliogenesis in the corpus callosum of young rats. II. Origin of microglial cells. *J Comp Neurol.* 180:139-164.
- Innocenti GM, Koppel H & Clarke S** (1983) Transitory macrophages in the white matter of the developing visual cortex. I. Light and electron microscopic characteristics and distribution. *Brain Res.* 313(1):39-53.
- Jablonski MM, Tombran-Tink J, Mrazek DA & Iannaccone A** (2001). Pigment epithelium-derived factor supports normal Muller cell development and glutamine synthetase expression after removal of the retinal pigment epithelium. *Glia.* 35(1):14-25.
- Janzer RC & Raff MC** (1987). Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cells. *Nature.* 325(6101): 253-257.
- Jasinski A** (1977). Fine structure of capillaries in the conus papillaris of the limbless lizard, *Ophisaurus apodus* (anguidae, lacertilia). *Cell Tissue Res.* 182(3): 421-4.
- Jennings AR, Kirilak Y & Carroll WM** (2002). In situ characterisation of oligodendrocyte progenitor cells in adult mammalian optic nerve. *J Neurocytol.* 31:27-29.
- Jensen MB, Gonzalez B, Castellano B & Zimmer J** (1994). Microglial and astroglial reactions to anterograde axonal degeneration: a histochemical and immunocytochemical study of the adult rat fascia dentata after entorhinal perforant path lesions. *Exp Brain Res.* 98(2):245-60.
- Jeon GS, Kang TC, Park SW, Kim DW, Seo JH & Cho SS** (2004). Microglial responses in the avascular quail retina following transection of the optic nerve. *Brain Res.* 1023(1):15-23.
- Jimeno D, Velasco A, Lillo C, Lara JM & Aijón J** (1999). Response of microglial cells after a cryolesion in the peripheral proliferative retina of Tench. *Brain Research.* 816:175-189.
- Jonas JB & Naumann GOH** (1993). The optic nerve: Its embryology, histology, and morphology. In: Varma GL, Spaeth GL, Parker KW: *The Optic Nerve in Glaucoma.* Philadelphia: J.B. Lippincott Company, pp:3-26.
- Jones PS & Schechter N** (1987). Distribution of specific intermediate-filament proteins in the goldfish retina. *J Comp Neurol.* 266(1):112-21.

- Julian D, Ennis K & Korenbrot JI** (1998). Birth and fate of proliferative cells in the inner nuclear layer of the mature fish retina. *J Comp Neurol.* 394(3):271-82.
- Kahn AJ** (1973). Ganglion cell formation in the chick neural retina. *Brain Res.* 63: 285-90.
- Kahn AJ** (1974). An autoradiographic analysis of the time of appearance of neurons in the developing chick neural retina. *Dev Biol.* 38(1):30-40.
- Karim MM, Fujisawa K, Kanomata N & Ito H** (1996). Glial Fibrillary acidic protein expression in the developing human retina. *Kobe J Med Sci.* 42:111-117.
- Kaur C, Ling EA & Wong WC** (1990). Lectin labelling of amoeboid microglial cells in the brain of postnatal rats. *J Anat.* 173:151-60.
- Kaur C & Ling EA** (1991). Study of the transformation of amoeboid microglial cells into microglia labelled with the isolectin Griffonia simplicifolia in postnatal rats. *Acta Anat.* 142: 118-125.
- Kaur C, Hao AJ, Wu CH & Ling EA** (2001). Origin of microglia. *Microsc Res Tech.* 54(1): 2-9.
- Kauth H & Sommer H** (1953). Das Ferment Kohlensäureanhydratase im Tierkörper. IV. Über die Funktion des Pektin im Vogelaug. *Biol. Zentralbl.* 72:196-209.
- Khelil M, Rolland B, Fages C & Tardy M** (1990). Glutamine synthetase modulation in astrocyte cultures of different mouse brain areas. *Glia.* 3(1):75-80.
- Knabe W & Kuhn H** (2000). Capillary-contacting horizontal cells in the retina of the tree shrew *Tupaia belangeri* belong to the mammalian type A. *Cell Tissue Res.* 229: 3007-311.
- Kohno T, Inomata H & Taniguchi Y** (1982). Identification of microglia cell of the rat retina by light and electron microscopy. *Jpn J Ophthalmol.* 26: 53-68.
- Korzhevskii DE, Otellin VA & Grigor'ev IP** (2004). Glial fibrillary acidic protein in astrocytes of the human neocortex. *Morfologiya.* 126 (5): 7-10.
- Kriegler S & Chiu SY** (1993). Calcium signalling of glial cells along mammalian axons. *J Neurosci.* 13: 4229-4245.

- Kumpulainen T, Dahl D, Korhonen LK & Nystrom SH** (1983). Immunolabeling of carbonic anhydrase isoenzyme C and glial fibrillary acidic protein in paraffin-embedded tissue sections of human brain and retina. *J Histochem Cytochem.* 31(7):879-86
- Kurki P, Vanderlaan M, Dolbeare F, Gray J & Tan EM** (1986). Expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA)/cyclin during the cell cycle. *Exp Cell Res.* 166: 209-219.
- Kuwabara T** (1975). Development of the optic nerve of the rat. *Invest Ophthalmol.* 14(10): 732-45
- Kwan JW, Lee MJ, Mack AF, Chiu JF & Fernald RD** (1996). Nonuniform distribution of cell proliferation in the adult teleost retina. *Brain Res.* 712: 40-44.
- Lam TK, Chan WJ, Kuang G, Wei H, Shum, ASW & Yew DT** (1995). Differential expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in the retinae and visual cortices of rats with experimental renal hypertension. *Neurosci Lett.* 198: 165-168.
- Lang DM, Monzón-Mayor M, Bandtlow CE & Stuermer CA** (1998). Retinal axon regeneration in the lizard *Gallotia galloti* in the presence of CNS myelin and oligodendrocytes. *Glia.* 23:61-74.
- Lang DM, del Mar Romero-Alemán M, Arbelo-Galván JF, Stuermer CA & Monzón-Mayor M** (2002). Regeneration of retinal axons in the lizard *Gallotia galloti* is not linked to generation of new retinal ganglion cells. *J Neurobiol.* 52(4):322-35.
- Lang DM, Monzón-Mayor M, Bandtlow CE & Stuermer CA** (1998). Retinal axon regeneration in the lizard *Gallotia galloti* in the presence of CNS myelin and oligodendrocytes. *Glia.* 23:61-74.
- Lara JM, Velasco A, Lillo C, Jimeno D, & Aijón J** (1998). Characterization of the glial cells in the teleost visual pathway. In: *Understanding glial cells.* Edited by Bernardo Castellano, Berta González y Manuel Nieto-Sampedro. Kluwer Academic Publishers. p:3-18.
- Latov N, Nilaver G, Zimmerman EA, Johnson WG, Silverman AJ, Defendini R & Cote L** (1979). Fibrillary astrocytes proliferate in response to brain injury: a study combining immunoperoxidase technique for glial fibrillary acidic protein and radioautography of tritiated thymidine. *Dev Biol.* 72(2):381-4.

- La Vail MM, Rapaport DH & Rakic P** (1991). Cytogenesis in the monkey retina. *J Comp Neurol.* 309(1):86-114.
- Lawson LJ, Perry VH, Dri P & Gordon S** (1990). Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience.* 39: 151-170.
- Laywell ED, Rakic P, Kukekov VG, Holland EC & Steindler DA** (2000). Identification of a multipotent astrocytic stem cell in the immature and adult mouse brain. *Proc Natl Acad Sci. USA,* 97(25):13883-8.
- Levine RL** (1989). Organization of astrocytes in the visual pathways of the goldfish: an immunohistochemical study. *J Comp Neurol.* 285(2):231-45.
- Levison SW, Druckman SK, Young GM & Basu A** (2003). Neural Stem Cells in the Subventricular Zone Area a Source of Astrocytes and Oligodendrocytes, but Not Microglia. *Dev Neurosci.* 25:184-196.
- Levison SW & Goldman JE** (1993). Both oligodendrocytes and astrocytes develop from progenitors in the subventricular zone of postnatal rat forebrain. *Neuron.* 10(2):201-12.
- Levitt P & Rakic P** (1980). Immunoperoxidase localization of glial fibrillary acidic protein in radial glial cells and astrocytes of the developing rhesus monkey brain. *J Comp Neurol.* 193(3):815-40.
- Lewis G P, Erickson PA, Guérin CJ, Anderson DH & Fisher SK** (1989). Changes in the expression of specific Müller cell proteins during long-term retinal detachment. *Exp Eye Res.* 49: 93-111.
- Lewis GP, Erickson PA, Kaska DD & Fisher SK** (1988). An immunocytochemical comparison of Muller cells and astrocytes in the cat retina. *Exp Eye Res.* 47 (6): 839-853.
- Lewis GP, Matsumoto B & Fisher SK** (1995). Changes in the organization and expression of cytoskeletal proteins during retinal degeneration induced by retinal detachment. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 36(12):2404-16.
- Liebner S, Gerhardt H & Wolburg H** (1997). Maturation of the blood-retina barrier in the developing pecten oculi of the chicken. *Develop Brain Res.* 100: 205-219.

Liedtke W, Edelmann W, Bieri PL, Chiu FC, Cowan NJ, Kucherlapati R & Raine CS (1996). GFAP is necessary for the integrity of CNS white matter architecture and long-term maintenance of myelination. *Neuron*. 17(4):607-15. **Lieth E, Gardner TW, Barber AJ and Antonetti DA (2000).** Retinal neurodegeneration early pathology in diabetes. *Clin Exp Ophthalmol*. 28:3-8.

Lillo C, Velasco A, Jimeno D, Lara JM & Aijon J (1998). Ultrastructural organization of the optic nerve of the tench (Cyprinidae, teleostei). *J Neurocytol*. 27 (8): 593-604.

Lillo C, Velasco A, Jimeno D, Cid E, Lara JM & Aijon J (2002). The glial design of a teleost optic nerve head supporting continuous growth. *J Histochem Cytochem*. 50 (10): 1289-302.

Ling TL, Mitrofanis J & Stone J (1989). Origin of retinal astrocytes in the rat: evidence of migration from the optic nerve. *J Comp Neurol*. 286(3): 345-352.

Ling TL, Stone J (1988). The development of astrocytes in the cat retina: evidence of migration from the optic nerve. *Brain Res Dev Brain Res*. 44(1): 73-85.

Ling EA, Kaur C & Wong WC (1991). Expression of major histocompatibility complex and leukocyte common antigens in amoeboid microglia in postnatal rats. *J Anat*. 177:117-26.

Ling E. & Won W (1993). The Origin and Nature of Ramified and Amoeboid Microglia: A Historical Review and Current Concepts. *Glia*. 7:9-18.

Linser PJ & Perkins M (1987). Gliogenesis in the embryonic avian optic tectum: neuronal-glial interactions influence astroglial phenotype maturation. *Dev Brain Res*. 32: 227-290.

Linser PJ, Smith K & 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(2):264-72.

Linser PJ, Sorrentino M & Moscona AA (1984). Cellular compartmentalization of carbonic anhydrase-C and glutamine synthetase in developing and mature mouse neural retina. *Brain Res*. 315(1):65-71.

- Lobrinus JA, Juillerat-Jeanneret L, Darekar P, Schlosshauer B & Janzer RC** (1992). Induction of the blood-brain barrier specific HT7 and neurothelin epitopes in endothelial cells of the chick chorioallantoic vessels by a soluble factor derived from astrocytes. *Brain Res Dev Brain Res.* 70(2):207-11.
- López-García C, Molowny A, Martínez-Guijarro FJ, Blasco-Ibañez JM, Luis de la Iglesia JA, Bernabeu A & García-Verdugo JM** (1992). Lesion and regeneration in the medial cerebral cortex of lizards. *Histol Histopathol.* 7: 725-746.
- Lupien C, Brenner, Guérin S & Salesse C** (2004). Expression of glía fibrillary acidic protein in primary cultures of human Müller cells. *Exp Eye Res.* 79: 423-429
- Maggs A & Scholes J** (1986). Glial domains and nerve fiber patterns in the fish retinotectal pathway. *J Neurosci.* 6(2):424-38.
- Malatesta P, Hartfuss E & Götz M** (2000). Isolation of radial glial cells by fluorescent-activated cell sorting reveals a neuronal lineage. *Development.* 127(24):5253-63.
- Mallat M, Houlgatte R, Brachet P & Prochiantz A** (1989). Lipopolysaccharide-stimulated rat brain macrophages release NGF in vitro. *Dev Biol.* 133(1):309-11.
- Mannoji H, Yeger H & Becker LE** (1986). A specific histochemical marker (lectin *Ricinus communis* agglutinin-1) for normal human microglia, and application to routine histopathology. *Acta Neuropathol.* 71(3-4):341-3.
- Marín-Teva JL, Almendros A, Calvente R, Cuadros MA & Navascués J** (1998). Tangential migration of ameboid microglia in the developing quail retina: mechanism of migration and migratory behavior. *Glia.* 22(1):31-52.
- Marín-Teva JL, Almendros A, Caliente R, Cuadros MA & Navascués J** (1999a). Proliferation of actively migrating ameboid microglia in the developing quail retina. *Anat Embryol.* 200:289-300.
- Marín-Teva JL, Calvente R, Cuadros MA, Almendros A & Navascués J** (1999b). Circumferential Migration of Ameboid Microglia in the Margin of the Developing Quail Retina. *Glia* 27:226-238.
- Marín-Teva JL, Cuadros MC, Calvente R, Almendros A & Navascués J** (1999c). Naturally occurring cell death and migration of microglial precursors in the quail retina during normal development. *J Comp Neurol.* 412: 255-275.

- Marshall C, Suzuki S & Goldman J** (2003) Gliogenic and neurogenic progenitors of the subventricular zone: Who are they, Where did they come from, and Where are they going? *Glia*. 43: 52-61.
- Martínez-Hernández A, Bell KP & Norenberg MD** (1977). Glutamine synthetase: glial localization in brain. *Science*. 195(4284):1356-8.
- Mathews MB, Bernstein RM, Franza BR & Garrels JI** (1984). Identity of the proliferating cell nuclear antigen and cyclin. *Nature*. 309: 374-376.
- Matsuda A, Tagawa Y, Yoshida K, Matsuda H & Nishihira J** (1997). Expression of macrophage migration inhibitory in rat retina and its immunohistochemical localization. *J Neuroimmunol*. 77: 85-90.
- Matute C** (1998). Characteristics of acute and chronic kainite excitotoxic damage to the optic nerve. *Proc Natl Acad Sci. USA*, 95 . 10229-10234.
- Matute C, Sánchez-Gómez MV, Martínez-Millán L & Miledi R** (1997). Glutamate receptor-mediated toxicity in optic nerve oligodendrocytes. *Proc Natl Acad Sci. USA*. 94. 8830-8835.
- McDonald JW, Althomsoms S P, Hyre KL, Choi DW & Goldberg MP** (1998). Oligodendrocytes from forebrain are highly vulnerable to AMPA/kainite receptor-mediated excitotoxicity. *Nature Med*. 4. 291-297.
- Mearow KM, Mill JF & Vitkovic L** (1989). The ontogeny and localization of glutamine synthetase gene expression in rat brain. *Brain Res Mol Brain Res*. 6:223-232.
- Merkle FT, Tramontin AD, Garcia-Verdugo JM & Alvarez-Buylla A** (2004). Radial glia give rise to adult neural stem cells in the subventricular zone. *Proc Natl Acad Sci. U S A*. 14;101(50):17528-32.
- Merrill JE** (1992). Tumor necrosis factor alpha, interleukin 1 and related cytokines in brain development: normal and pathological. *Dev Neurosci*. 14(1):1-10.
- Mey J & Thanos S** (2000) Development of the visual system of the chick. I. Cell differentiation and histogenesis. *Brain Res Brain Res Rev*. 32(2-3): 343-79.
- Meyer DB** (1977). The avian eye and its adaptations. In: *Handbook of sensory physiology*. Vol VII 5. The visual system in vertebrates. Crescitelli F. (ed). Springer-Verlag. Berlin, pp:549-612.

- Mi H & Barres BA** (1999). Purification and characterization of astrocyte precursor cells in the developing rat optic nerve. *J Neurosci.* 19(3):1049-61.
- Miller RH** (1996). Oligodendrocyte origins *Trends Neurosci.* 19(3):92-6.
- Miller RH, Fulton BP & Raff MC** (1989). A Novel Type of Glial Cell Associated with Nodes of Ranvier in Rat Optic Nerve. *Eur J Neurosci.* 1(2):172-180.
- Milligan CE, Cuningham TJ & Levitt P** (1991). Differential immunochemical marker reveal the normal distribution of brain macrophages and microglía in the developing rat brain. *J Comp Neurol.* 314 (1):125-135.
- Miyake T & Kitamura T** (1992). Glutamine synthetase immunoreactivity in two types of mouse brain glial cells. *Brain Research.* 586:53-60.
- Monzón-Mayor M, Yanes C, De Barry J, Capdevilla-Carbonell C, Renau-Piqueras J, Tholey G & Gombos G** (1998). Heterogeneous Immunoreactivity of glial cells in the Mesencephalon of a lizard: a double Labeling Immunohistochemical Study. *J Morphol.* 235: 109-119.
- Monzón-Mayor M, Yanes C, Ghandour MS, de Barry J & Gombos G** (1990a). Glial fibrillary acidic protein and vimentin immunohistochemistry in the developing and adult midbrain of the lizard *Gallotia galloti*. *J Comp Neurol.* 295: 569-579.
- Monzón-Mayor M, Yanes C, James JL & Sturrock RR** (1990b). An ultrastructural study of the development of astrocytes in the midbrain of the lizard. *J Anat.* 170:33-41.
- Monzón-Mayor M, Yanes C, Tholey G, de Barry J & Gombos G** (1990c). Immunohistochemical localization of glutamine synthetase in mesencephalon and telencephalon of the lizard *Gallotia galloti* during ontogeny. *Glia* 3: 81-97.
- Moore CL, Kalil R, Richards W** (1976). Development of myelination in optic tract of the cat. *J Comp Neurol.* 165(2):125-36.
- Morcos Y & Chan-Ling T** (1997). Identification of oligodendrocyte precursors in the myelinated streak of the adult rabbit retina in vivo. *Glia.* 21(2):163-82.
- Mori S & Leblond CP** (1970). Electron microscopic identification of three classes of oligodendrocytes and a preliminary study of their proliferative activity in the corpus callosum of young rats. *J Comp Neurol.* 139(1):1-28.

- Moscona AA & Linser P** (1983). Developmental and experimental changes in retinal glia cells: Cell interactions and control of phenotype expression and stability. *Curr Top Dev Biol.* 18:155-188.
- Moscona AA** (1972). Introduction of glutamina synthetase in embryonic neural retina: A model for the regulation of specific gene expresión in embryonic cells. In: *Biochemistry of Cell Differentiation.* A. Monroy and R. Tsanev, eds. Academic Press, London. FEBS Symp. Vol. 24. pp. 1-23.
- Moujahid A, Navascués J, Marín-Teva JL & Cuadros MA** (1996). Macrophages during avian optic nerve development: relationship to cel death and diferentation into microglia. *Anat Embryol.* 193:131-144.
- Müller CM** (1992). Astrocytes in cat visual cortex studied by GFAP and S-100 immunocytochemistry during postnatal development. *J Comp Neurol* 317: 309-323.
- Murabe Y & Sano Y** (1982). Morphological studies on neuroglia. *Cell Tissue Res.* 223: 493-506.
- Muscoli C, Visalli V, Colica C, Nistico R, Palma E, Costa N, Rotiroti D, Nistico G & Mollace V** (2005). The effect of inflammatory stimuli on NMDA-related activation of glutamine synthase in human cultured astroglial cells. *Neurosci Lett.* 373(3):184-8.
- Nacher J, Ramírez C, Palop JJ, Artal P, Molowny A & López-García C** (1999). Microglial cells during the lesion-regeneration of the lizard medial cortex. *Histol Histopathol.*14(1): 103-17.
- Nadon NL, Crotzer DR & Stewart JR** (1995). Embryonic Development of Central Nervous System Myelination in a Reptilian Species, *Eumeces fasciatus*. *J Comp Neurol.* 362:433-440.
- Nagai A, Mishima S, Ishida Y, Ishikura H, Harada T, Kobayashi S & Kim Su** (2005). Immortalized human microglial cell line: Phenotypic expression. *J Neurosci Res.*
- Nakajima K, Hamanoue M, Takemoto N, Hattori T, Kato K & Kohsaka S** (1994). Plasminogen binds specifically to alpha-enolase on rat neuronal plasma membrane. *J Neurochem.* 63(6):2048-57.
- Nakazawa T, Tachi S, Aikawa E & Ihnuma M** (1993). Formation of the myelinated nerve fiber layer in the chicken retina. *Glia.* 8(2):114-21.

Bibliografía

- Nathaniel EJ & Nathaniel DR** (1977). Astroglial response to degeneration of dorsal root fibers in adult rat spinal cord. *Exp Neurol.* 54(1):60-76.
- Naujoks-Manteuffel C & Niemann U** (1994). Microglial cells in the brain of *Pleurodeles vatl* (Urodela, Salamandridae) after Vallerian degeneration in the primary visual system using *Bandeiraea simplicifolia* isolectin B4 –Cytochemistry. *Glia.* 10:101-113.
- Navascués J, Rodríguez-Gallardo L, Martín-Partido G & Álvarez IS** (1985). Proliferation of glial precursors during the early development of the chick optic nerve. *Anat Embryol.* 172(3): 365-73
- Navascués J, Martín-Partido G, Álvarez IS, Rodríguez-Gallardo L & García-Martínez V** (1987). Glioblast migration in the optic stalk of the chick embryo. *Anat Embryol.* 176:79-85.
- Navascués J, Moujahid A, Quesada A, Cuadros MA** (1994). Microglía in the avian retina: immunocytochemical demonstration in the adult quail. *J Comp Neurol.* 350: 171-186.
- Navascués J, Moujahid A, Almendros A, Marín-Teva JL & Cuadros MA** (1995). Origin of microglía in the quail retina: vitreal-to-scleral migration of microglial precursors during development. *J Comp Neurol.* 354:209-228.
- Navascués J, Calvente R, Marín-Teva JL & Cuadros MA** (2000). Entry, Dispersión and Differentiation of Microglia in the Developing Central Nervous System. *An Acad Bras Cienc.* 72(1):91-102
- Negishi K, Stell WK & Takasaki Y** (1990). Early histogenesis of the teleostean retina: studies using a novel immunochemical marker, proliferating cell nuclear antigen (PCNA/cyclin). *Brain Res Dev Brain Res.* 55(1):121-5.
- Negishi K & Wagner HJ** (1995). Differentiation of photoreceptors, glía, and neurons in the retina of the cichlid fish *Aequidens pulcher*; an immunocytochemical study. *Brain Res Dev Brain Res.* 89(1):87-102
- Newman E & Reichenbach A** (1996). The Müller cell: a functional element of the retina. *Trends Neurosci.* 19(8): 307-17.

Bibliografia

- Nguyen-H-Anh J** (1974). The ultrastructure of the conus papillaris in *Zonosaurus ornatus* (Gerrhosauridea). *Acta Anat.* 88(1): 44-55.
- Nguyen-Legros J** (1978). Innervation of the Conus Papillaris in the eyes of Lacertilian. *Albrecht V Graefes Arch Klin Exp Ophthalm.* 208: 169-175.
- Nona SN, Sheab CA, Stafford CA & Cronly-Dillon JR** (1989). Glial fibrillary acidic protein (GFAP) from goldfish: Its localisation in visual pathway. *Glia.* 2: 189-200.
- Norenberg MD & Martínez-Hernández A** (1979). Fine structural localization of glutamine synthetase in astrocytes of rat brain. *Brain Res.* 161(2):303-10.
- Okere CO & Waterhouse BD** (2004). Capsaicin increases GFAP and glutamine synthetase immunoreactivity in rat arcuate nucleus and median eminence. *Neuroreport.* 15(2):255-8.
- Ono K, Tsumori T, Yokotu K & Yasui Y** (1998). Developmental appearance of oligodendrocytes in the embryonic chick retina *J Comp Neurol.* 398(3):309-322.
- Ono K, Yasui Y, Rutishauser U & Miller RH** (1997). Focal ventricular origin and migration of oligodendrocyte precursors into the chick optic nerve. *Neuron* 19(2):283-92.
- Onteniente B, Kimura H & Maeda T** (1983). Comparative study of the glial fibrillary acidic protein in vertebrates by PAP immunohistochemistry. *J Comp Neurol.* 215:427-436.
- Oppenheim RW** (1991). Cell death during development of the nervous system. *Annu Rev Neurosci.* 14:453-501.
- Orlowski D, Soltys Z & Janeczko K** (2003). Morphological development of microglia in the postnatal rat brain. A quantitative study. *Int J Dev Neurosci.* 21(8):445-50.
- Oster SF, Deiner M, Birgbauer E & Sretavan DW** (2004). Ganglion cell axon pathfinding in the retina and optic nerve. *Semin. Cell Dev Biol.* 15(1):125-36.
- Otteson DC, D'Costa AR & Hitchcock PF.** (2001). Putative stem cells and the lineage of rod photoreceptors in the mature retina of the goldfish. *Dev Biol.* 232(1): 62-76.
- Otteson DC & Hitchcock PF** (2003). Stem cells in the teleost retina: persistent neurogenesis and injury-induced regeneration. *Vision Res.* 43(8): 927-36.

Bibliografía

- Paniagua R, Nistal M, Sesma P, Alvarez-Uría M, Fraile B, Anadón R & Sáez FJ** (2002). Citología e histología vegetal y animal. Biología de las células y tejidos animales y vegetales. Mc Graw- Hill- interamericana de España., 3º edición.
- Park KW, Lee DY, Joe EH, Kim SU & Jin BK** (2005). Neuroprotective role of microglia expressing interleukin-4. *J Neurosci Res.* 81(3): 397-402
- Patel AJ** (1986). Development of astrocytes: In vivo studies. In: *Advances in the Biosciences*, Vol. 61, *Dynamic Properties of Glial Cells: Cellular and Molecular aspects*. T. Grisar, G. Frank, L. Herzt, M. Sensenbrenner, and DM. Woodbury, eds. Pergamon Press, Oxford, pp. 87-96
- Patel AJ, Hunt A, Gordon RD & Balazs R** (1982). The activities in different neural cell types of certain enzymes associated with the metabolic compartmentation glutamate. *Brain Res.* 256(1):3-11.
- Pearson HE, Payne BR & Cunningham TJ** (1993). Microglial invasion and activation in response to naturally occurring neuronal degeneration in the ganglion cell layer of the postnatal cat retina. *Brain Res Dev Brain Res.* 76(2):249-55.
- Pekny M, Stanness KA, Eliasson C, Betsholtz C & Janigro D** (1998). Impaired induction of blood-brain barrier properties in aortic endothelial cells by astrocytes from FAP-deficient mice. *Glia.* 22(4):390-400.
- Perry VH & Gordon S** (1987). Modulation of CD4 antigen on macrophages and microglia in rat brain. *J Exp Med.* 166:1138-1143.
- Perry VH & Gordon S** (1991). Macrophages and the nervous system. *Int Rev Cytol.* 125:203-44.
- Pesheva P & Probstmeier R** (2000). Association of tenascin-R with murine brain myelin membranes: involvement of divalent cations. *Neurosci Lett.* 283(3):165-8.
- Peters A, Palay SL & Webster HF** (1976). *The Fine Structure of the Nervous System. Neurons and supporting cells.* W.B. Saunders Company.
- Peterson RE, Fadool JM, McClintock J & Linser PJ** (2001). Müller cell differentiation in the zebrafish neural retina: evidence of distinct early and late stages in cell maturation. *J Comp Neurol.* 429(4): 530-40.
- Pettigrew JD, Wallman J & Wildsoet CF** (1990). Saccadic oscillations facilitate ocular perfusion from the avian pecten. *Nature.* 343(6256):362-3.

Bibliografía

- Plaza M** (2002) Células de microglía NDPasa y Lectina Positivas durante la ontogenia del reptil *Gallotia galloti*. Comparación de la corteza telencefálica y el techo óptico. Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.
- Poitry S, Poitry-Yamate C, Ueberfeld J, MacLeish PR & Tsacopoulos M** (2000). Mechanisms of glutamate metabolic signaling in retinal glial (Muller) cells. *J Neurosci*. 20(5):1809-21.
- Poitry-Yamate CL, Poitry S & Tsacopoulos M** (1995). Lactate released by Muller glial cells is metabolized by photoreceptors from mammalian retina. *J Neurosci*. 15:5179-91.
- Prada C, Puga J, Perez-Mendez L, Lopez R & Ramirez G.** (1991) Spatial and Temporal Patterns of Neurogenesis in the Chick Retina. *Eur J Neurosci*. 3(6):559-569.
- Prada FA, Quesada A, Dorado ME, Chmielewski C & Prada C** (1998). Glutamina Synthetase (GS) Activity and Spatial and Temporal Patterns of GS Expresión in the Developing Chick Retina: Relationship UIT Synaptogenesis in the Outer Plexiform Layer. *Glia*. 22:221-326.
- Prelich G, Tan CK, Kostura M, Matheus MB, So AG, Downey KM & Stillman B** (1987). Functional identity of proliferating cell nuclear antigen and a DNA polymerase- δ auxiliary protein. *Nature*. 326: 517-520.
- Provis JM, Diaz CM & Penfold PL** (1996). Microglia in Human retina: A heterogeneous population with distinct ontogenies. *Perspect Dev Neurobiol*. 3(3):213-22.
- Provis JM** (2001). Development of the primate retinal vasculature. *Prog retinal eye Res*. 20 (6): 799-821.
- Quesada A, Prada FA, Aguilera Y, Espinar A, Carmona A & Prada C** (2004). Peripapillary glial cells in the chick retina: a special glial cell type expressing astrocyte, radial glia, neuron, and oligodendrocyte markers throughout development. *Glia*. 46:346-355.
- Quitschke W, Jones PS & Schechter N** (1985). Survey of intermediate filament proteins in optic nerve and spinal cord: evidence for differential expression. *J Neurochem*. 44(5):1465-76.

- Rabchevsky AG & Streit WJ** (1997). Grafting of cultured microglial cells into the lesioned spinal cord of adult rats enhances neurite outgrowth. *J Neurosci Res.*47(1):34-48.
- Raff MC** (1989). Glial cell diversification in the rat optic nerve. *Science.* 243:1451-1455.
- Ramírez AI, Salazar JJ, Triviño A, Solas M & Ramírez JM** (1998). Las células astrogliales como constituyentes de las barreras limitantes de la cabeza del nervio óptico. *Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología N. 1.*
- Ramírez JM, Ramírez AI, Salazar JJ, de Hoz R & Triviño A** (2001). Changes astrocytes in retinal ageing and age- related macular degeneration. *Exp Eye Res.* 73: 601- 615.
- Ramón y Cajal S** (1892). La rétine des vertébrés. *La Cellule.* 9:17-257.
- Ramos-Steffens A** (1980). Tabla del desarrollo embrionario de la lacerta *Gallotia galloti* (período de la organogénesis), y aspectos de su reproducción. Tesina, Facultad de Biología, Universidad de La Laguna. Spain.
- Rapaport DH, Rakic P & LaVail MM** (1996). Spatiotemporal gradients of cell genesis in the primate retina. *Perspect Dev Neurobiol.* 3(3):147-59.
- Rapaport DH, Wong LL, Wood ED, Yasumura D & LaVail MM** (2004) Timing and topography of cell genesis in the rat retina. *J Comp Neurol.* 474(2):304-24.
- Raymond PA & Hitchcock PF** (1997). Retinal regeneration: common principles but a diversity of mechanisms. *Adv Neurol.* 72:171-84.
- Raymond PA & Hitchcock PF** (2000). How the neural retina regenerates. *Results Probl Cell Differ.* 31:197-218.
- Raymond PA** (1991). Retinal regeneration in teleost fish. *Ciba Found Symp.*160:171-191.
- Reese BE, Johnson PT & Baker GE** (1996). Maturation gradients in the retina of the ferret. *J Comp Neurol.* 375(2):252-73.
- Reh TA & Levine EM** (1998). Multipotential stem cells and progenitors in the vertebrate retina. *J Neurobiol.* 36 (2): 206-220.

- Reh TA & Fischer AJ** (2001). Stem cells in the vertebrate retina. *Brain Behav. Evol.*, 58(5):296-305.
- Reichenbach A & Reichelt W** (1986). Postnatal development of radial glial (Muller) cells of the rabbit retina. *Neurosci Lett.* 71(2):125-30.
- Reichenbach A & Robinson SR** (1995). Ependymoglia and ependymoglia-like cells. In *Neuroglia*. Kettenmann H. and Ranson B. (eds). NY. Oxford University Press, pp: 58-85.
- Reichenbach A, Schippel K, Schumann R & Hagen E** (1988). Ultrastructure of rabbit retinal fibre layer: neuro-glial relationships, myelination, and never fibre spectrum. *J Hirnforsch.* 29 (5):481-91.
- Reier PJ & Webster HF** (1974). Regeneration and remyelination of *Xenopus* tadpole optic nerve fibres following transection or crush. *J Neurocytol.* 3(5):591-618.
- Reier PJ, Stensaas LJ & Guth L** (1983). The astrocytic scar as an impediment to regeneration in the central nervous system, in *Spiral Cord Reconstruction* (Kao CC Bunge RP Reier PJ, eds.), Raven, New York, pp: 163-196.
- Richardson A, Hao C & Fedoroff S** (1993). Microglia progenitor cells: a subpopulation in cultures of mouse neopallial astroglia. *Glia.* 7:25-33.
- Rickmann M & Wolff JR** (1995). S-100 immunoreactivity in a subpopulation of oligodendrocytes and Ranvier's nodes of adult rat brain. *Neurosci Lett.* 186(1):13-6.
- Riepe RE & Norenberg MD** (1978). Glutamine synthetase in the developing rat retina: an immunohistochemical study. *Exp Eye Res.* 27(4):435-44.
- Río-Hortega del P** (1932). Microglia. In: *Cytology and Cellular Pathology of the Nervous System*. Vol.2. W. Penfield. Ed. Paul B. Hoeber. New York. Pp. 481-534.
- Robert A, Howe JR & Waxman SG** (2000). Development of glutamatergic synaptic activity in cultured spinal neurons. *J Neurophysiol.* 83(2): 659-70.
- Romero-Alemán M, Monzón-Mayor M, Yanes C, Arbelo-Galván JF, Lang D, Renau-Piqueras J & Negrín-Martínez C** (2003). S-100 immunoreactive glial cells in the forebrain and midbrain of the lizard *Gallotia galloti* during ontogeny. *J Neurobiol.* 57(1):54-66.

Bibliografía

- Romero-Alemán MM, Monzón-Mayor M, Yanes C & Lang D** (2004). Radial glial cells, proliferating periventricular cells, and microglia might contribute to successful structural repair in the cerebral cortex of the lizard *Gallotia galloti*. *Exp Neurol*. 188(1):74-85.
- Ruiz-Ederra J, Hitchcock PF & Vecino E** (2003). Two classes of astrocytes in the adult human and pig retina in terms of their expression of high affinity NGF receptor (TrkA). *Neurosci Lett*. 337: 127-130
- Rungger-Brandle E, Dosso AA & Leuenberger PM** (2000). Glial reactivity, an early feature of diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 41(7):1971-80.
- Salazar JJ, Ramírez AI, Ramírez JM, Andrés MV, De Hoz R & Triviño A** (1998). Papel funcional de los astrocitos del nervio óptico en la fasciculación axonal. *Archivos de Sociedad Española de Oftalmología*, Nº 2.
- Salvador-Silva M, Vidal-Sanz M & Villegas- Pérez MP** (2000). Microglial cells in the retina of *Carassius auratus*: effects of optic nerve crush. *J Comp Neurol*. 417:431-447.
- Sánchez-López A, Cuadros M A, Caliente R, Tassi M, Marín-Teva JL & Navascués J** (2004). Radial migration of developing microglial cells in quail retina: a confocal microscopy study. *Glia*. 46(3): 261-73.
- Santos E** (2004). Progenitores macrogliales y mielinización en la Vía Óptica de *Gallotia galloti*. Tesis de Licenciatura, Facultad de Biología de la Universidad de La Laguna. España.
- Sanyal S & De Ruiter A** (1985). Inosine diphosphatase as a histochemical marker of retinal microvasculature, with special reference to transformation of microglia. *Cell Tissue Res*. 241(2):291-7.
- Sarthy PV & Egal H** (1995). Transient induction of the glial intermediate filament protein gene in Müller cells in the mouse retina. *DNA Cell Biol*. 14 (4): 313-320
- Sarthy PV, Fu M & Huang J** (1991). Developmental expression of the glial fibrillary acidic protein (GFAP) gene in the mouse retina. *Cell Mol Neurobiol*. 11(6):623-37.
- Sarthy PV & Lam DM** (1978). Biochemical studies of isolated glial (Muller) cells from the turtle retina. *J Cell Biol*. 78(3):675-84.

- Sassoè Pognetto M, Panzanelli P, Artero C, Fasolo A & Cantino D** (1992). Comparative study of glial fibrillary acidic protein (GFAP) like immunoreactivity in the retina of some representative vertebrates. *Eur J Histochem.* 36: 467-477.
- Schnitzer J** (1985). Distribution and immunoreactivity of glia in the retina of the rabbit. *J Comp Neurol.* 240(2):128-42.
- Schnitzer J** (1988). The development of astrocytes and blood vessels in the postnatal rabbit retina. *J Neurocytol.* 17(4):433-49.
- Schuck J, Gerhardt H & Wolburg H** (2000). The peripapillary glia of the optic nerve head in the chicken retina. *Anat Rec.* 259(3): 263-275.
- Schwab ME, Kapfhammer JP & Bandtlow CE** (1993). Inhibitors of neurite growth. *Annu Rev Neurosci.* 16:565-95.
- Schwab ME** (2004). Nogo and axon regeneration. *Curr Opin Neurobiol.* 14(1): 118-24.
- Seaman AR & Storm H** (1963). A correlated light and electron microscope study of the pecten oculi of the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *Exp Eye Res.* 2:163-172.
- Selinfreund RH, Barger SW, Pledger WJ & Van Eldik LJ** (1991). Neurotrophic protein S100 beta stimulates glial cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci. USA,* 88(9):3554-8.
- Semple-Rowland** (1991). Expression of glial fibrillary acidic protein by Müller cells in rd chick retina. *J Comp Neurol.* 305:582-590.
- Seo JH, Haam YG, Park SW, Kim DW, Jeon GS, Lee C, Hwang DH, Kim YS & Cho SS** (2001). Oligodendroglia in the avian retina: immunocytochemical demonstration in the adult bird. *J Neurosci Res.* 65: 173-183.
- Shaked I, Ben-Dror I & Vardimon L** (2002). Glutamine synthetase enhances the clearance of extracellular glutamate by the neural retina. *J Neurochem.* 83(3):574-80.
- Sharma RK, O'Leary TE, Fields CM & Johnson DA** (2003). Development of the outer retina in the mouse. *Brain Res Dev Brain Res.* 145(1):93-105.
- Sharma SC & Ungar F** (1980). Histogenesis of the goldfish retina. *J Comp Neurol.* 191(3):373-82.

Bibliografía

- Shaw G & 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(2): 219-32.
- Shimojo M, Nakajima K, Takei N, Hamanoue M & Kohsaka S** (1991). Production of basic fibroblast growth factor in cultured rat brain microglia. *Neurosci Lett.* 123(2):229-31.
- Shin DH, Lee E & Cho SS** (2003). Glial cells in the chicken optic tectum. *Brain Res.* 962(1-2):221-5.
- Skoff RP, Knapp PE & Bartlett WP** (1986). Astrocytic diversity in the optic nerve: a cytoarchitectural study. In S. Fedoroff and A. Vernadakis (eds): *Astrocytes Vol. 1: Development, morphology, and regional specialization of astrocytes.* Orlando: Academic Press, INC, pp: 269-291.
- Small RK, Riddle P & Noble M** (1987). Evidence for migration of oligodendrocyte-type-2 astrocyte progenitor cells into the developing rat optic nerve. *Nature.* 328:155-157.
- Spassky N, Goujet-Zalc C, Parmantier E, Olivier C, Martínez S, Ivanova A, Ikenaka K, Macklin W, Cerruti I, Zalc B & Thomas JL** (1998). Multiple restricted origin of oligodendrocytes *J Neurosci.* 18(20):8331-43.
- Spencer SG & Robson JA** (1989). An autoradiographic analysis of neurogenesis in the chick retina in vitro and in vivo. *Neuroscience.* 32(3):801-12.
- Steindler DA & Laywell ED** (2003). Astrocytes as stem cells: nomenclature, phenotype and translation. *Glia.* 43:62-69.
- Stensaas LJ** (1977). The ultrastructure of astrocytes, oligodendrocytes, and microglia in the optic nerve of urodele amphibians. *J Neurocytol.* 6 (3): 269-86.
- Stewart PA & Wiley MJ** (1981). Structural and histochemical features of the avian blood-brain barrier. *J Comp Neurol.* 202: 157- 167
- Stone J & Dreher Z** (1987). Relationship between astrocytes, ganglion cells and vasculature of the retina. *J Comp Neurol.* 255(1): 35-49.
- Streit WJ** (2001). Microglia and macrophages in the developing CNS. *Neurotoxicology.* 22(5): 619-624.

- Streit WJ** (2002). Microglia as neuroprotective, immunocompetent cells of the CNS. *Glia*. 40:133-139.
- Streit WJ** (1990). An improved staining method for rat microglial cells using the lectin from *Griffonia simplicifolia* (GSA I-B4). *J Histochem Cytochem*. 38(11):1683-6.
- Streit WJ & Kreutzberg GW** (1987). Lectin binding by resting and reactive microglia. *J Neurocytol*. 16(2): 249-60.
- Struzynska L, Chalimoniuk M & Sulkowski G** (2005). The role of astroglia in Pb-exposed adult rat brain with respect to glutamate toxicity. *Toxicology*. 212(2-3): 185-94.
- Sturrock RR** (1984). Microglia in the human embryonic optic nerve. *J Anat*. 139:81-91.
- Suárez I, Bodega G & Fernández B** (2002). Glutamine synthetase in brain: effect of ammonia. *Neurochem Int*. 41(2-3):123-42.
- Sugimoto Y, Taniguchi M, Yagi T, Akagi Y, Nojyo Y & Tamamaki N** (2001) Guidance of glial precursor cell migration by secreted cues in the developing optic nerve. *Development*. 128(17):3321-30.
- Suzuki H, Franz H, Yamamoto T, Iwasaki Y & Konno H** (1988). Identification of the normal microglial population in human and rodent nervous tissue using lectin-histochemistry. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 14(3):221-7.
- Takahashi T & Caviness VS Jr** (1993). PCNA-binding to DNA at the G1/S transition in proliferating cells of the developing cerebral wall. *J Neurocytol*. 22: 1096-1102.
- Tansey FA, Farooq M & Cammer W** (1991). Glutamine Synthetase in oligodendrocytes and Astrocytes: New biochemical and immunocytochemical evidence. *J Neurochem*. 56(1):266-431.
- Teakle EM, Wildsoet CF & Vaney DI** (1993). The spatial organization of tyrosine hydroxylase-immunoreactive amacrine cells in the chicken retina and the consequences of myopia. *Vision Res*. 33(17):2383-96.
- Tholey G, Ghandour MS, Bloch S, Ledig M & Mandel P** (1987). Glutamine synthetase and energy metabolism enzymes in cultivated chick neurons and astrocytes: modulation by serum and hydrocortisone. *Brain Res*. 428(1):73-81.
- Tontsch U & Bauer HC** (1991). Glial cells and neurons induce blood-brain barrier related enzymes in cultured cerebral endothelial cells. *Brain Res*. 539(2):247-53.

- Torelli S, Sogos V, Marzilli MA, D'Atri M & Gremo F (1989).** Developmental expression of intermediate filament proteins in the chick embryo retina: in vivo and in vitro comparison. *Exp Biol.* 48(4):187-96.
- Torrens Y, Beaujouan JC, Saffroy M, Daguët de Montety MC, Bergstrom L & Glowinski J (1986).** Substance P receptors in primary cultures of cortical astrocytes from the mouse. *Proc Natl Acad Sci. U S A.* 83(23):9216-20.
- Torrens Y, Dietl M, Beaujouan JC & Glowinski J (1989).** [Reduction induced by substance P of the initial accumulation of myo(3H)inositol in acinar cells of the parotid gland in rats] *C R Acad Sci III.* 309(8):295-9.
- Tout S, Chan-Ling T, Hollander H & Stone J (1993).** The role of Muller cells in the formation of the blood-retinal barrier. *Neuroscience.* 55(1):291-301.
- Triviño A, Ramírez JM, Salazar JJ, Ramírez AI & García-Sánchez J (1996).** Immunohistochemical study of human optic nerve head astroglia. *Vision Res.* 36(14):2015-28.
- Triviño A, Ramírez JM, Ramírez AI, Salazar JJ & García-Sánchez J (1997).** Comparative study of astrocytes in human and rabbit retinae. *Vision Res.* 37(13):1707-11.
- Tropepe V, Coles BL, Chiasson BJ, Horsford DJ, Elia AJ, McInnes RR & van der Kooy D (2000).** Retinal stem cells in the adult mammalian eye. *Science.* 287(5460):2032-6.
- Tsai H & Miller RH (2002).** Glial cell migration directed by axon guidance cues. *Trends Neurosci.* 25(4): 173-5
- Tucker R (1975).** The surface of the pecten oculi in the pigeon. *Cell Tissue Res.* 157(4):457-65.
- Uehara M, Oomori S, Kitagawa H & Ueshima T (1990).** The development of the pecten oculi in the chick. *Nippon Juigaku Zasshi.* 52(3):503-12.
- Ullian EM, Sapperstein SK, Christopherson KS & Barres BA (2001).** Control of synapse number by glia. *Science.* 291(5504): 657-61.
- Vaughan DK, Erikson PA & Fisher SK (1990).** Glial fibrillary acidic protein (GFAP) immunoreactivity in rabbit retina: Effect of fixation. *Exp Eye Res.* 50(4):385-92.

Bibliografía

- Vaughan DK & Lasater EM** (1990). Glial and neuronal markers in bass retinal horizontal and Muller cells. *Brain Res.* 537(1-2):131-40.
- Vaughn JE & Peters A** (1968). A third neuroglial cell type. An electron microscopic study. *J Comp Neurol.* 133(2):269-88.
- Velasco A, Briñón JG, Caminos E, Lara JM & Aijón J** (1997). S-100 positive glial cells are involved in the regeneration of the visual pathway of teleost. *Brain Res Bull.* 43(3):327-336.
- Velasco A, Jimeno D, Lillo C, Caminos E, Lara JM & Aijón J** (1999). Enzyme histochemical identification of microglial cells in the retina of a fish (*Tinca tinca*). *Neurosci Lett.* 263(2-3):101-4.
- Velasco A, Cid E, Ciudad J, Orfao A, Aijón J & Lara JM** (2001). Temperature induces variations in the retinal cell proliferation rate in a cyprinid. *Brain Res.* 913:190-194.
- Velasco A, Caminos E, Vecino E, Lara JM & Aijón J** (1995). Microglia in normal and regenerating visual pathways of the tench (*Tinca tinca* L., 1758; teleost): a study with tomato lectin. *Brain Res.* 705:315-324.
- Wang L, Cioffi GA, Cull G, Dong J & Fortune B** (2002). Immunohistology evidence for retinal glia cell changes in human glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 43(4):1088-1094.
- Wang WC, Lee N, Aoki D, Fukuda M & Fukuda M** (1991). The poly-N-acetyllactosamines attached to lysosomal membrane glycoproteins are increased by the prolonged association with the golgi complex. *J Biol Chem.* 256: 23185-90
- Warringa RA, van Berlo MF, Klein W & Lopes-Cardozo M** (1988). Cellular location of glutamine synthetase and lactate dehydrogenase in oligodendrocyte-enriched cultures from rat brain. *J Neurochem.* 50(5):1461-8.
- Watanabe T & Raff MC** (1988). Retinal astrocytes are immigrants from the optic nerve. *Nature.* 332(6167): 834-7.
- Weil-Malherbe H** (1962). Ammonia metabolism in the brain. In: *Neurochemistry*, 2nd ed. KAC. Elliot, IH. Page, and JH. Quastel, eds. Charles C. Thomas, Springfield, IL, pp. 321-330.

Bibliografía

- Weinreich D & Hammerschlag R** (1975). Nerve impulse-enhanced release of amino acids from non-synaptic regions of peripheral and central nerve trunks of bullfrog. *Brain Res.* 84: 137-142.
- Wetts R & Fraser SE** (1988). Multipotent precursors can give rise to all major cell types of the frog retina. *Science.* 239(4844):1142-5.
- Wicht H, Derouiche A & Korf HW** (1994). An immunocytochemical investigation of glial morphology in the Pacific hagfish: radial and astrocyte-like glia have the same phylogenetic age. *J Neurocytol.* 23 (9): 565-76.
- Willbold E, Berger J, Reinicke M & Wolburg H** (1997). On the role of Muller glia cells in histogenesis: only retinal spheroids, but not tectal, telencephalic and cerebellar spheroids develop histotypical patterns. *J Hirnforsch.* 38(3):383-96.
- Willbold E & Layer PG** (1998). Müller glia cells and their possible roles during retina differentiation in vivo and in vitro. *Histol Histopathol.* 13(2): 531-52.
- Winningham-Major F, Staecker JL, Barger SW, Coats S & Van Eldik LJ** (1989). Neurite extension and neuronal survival activities of recombinant S100 beta proteins that differ in the content and position of cysteine residues. *J Cell Biol.* 109(6):3063-71.
- Wolburg H, Liebner S, Reichenbach A & Gerhardt H** (1999). The pecten oculi of the chicken: a model system for vascular differentiation and barrier maturation. *Int Rev Cytol.* 187:111-59.
- Wolswijk G** (1995). Perinatal to adult transition in precursor populations of the oligodendrocyte-type-2 astrocyte (O-2A) lineage. *Handbook of experimental immunology.* L.A. Herzenberg, L.A. Herzenberg, y A. Weir, eds. Blackwell Scientific Publications, Cambridge.
- Won MH, Kang TC & Cho SS** (2000). Glial cells in the bird retina: immunochemical detection. *Microsc Res Tech.* 50(2):151-60.
- Xu J, Kaur C & Ling EA** (1993). Variation with age in the labelling of ameboid microglial cells in rats following intraperitoneal or intravenous injection of a fluorescent dye. *J Anat.* 182: 53-63.
- Yanes C, Monzón-Mayor M, de Barry J & Gombos G** (1992). Myelin and myelination in the telencephalon and mesencephalon of the lizard *Gallotia galloti* as

Bibliografía

revealed by the immunohistochemical localization of myelin basic protein. *Anat Embryol.* 185: 475-487.

Yanes C, Monzón-Mayor M, Ghandour MS, de Barry J & Gombos G (1990). Radial glia and astrocytes in developing and adult telencephalon of the lizard *Gallotia galloti* as revealed by immunohistochemistry with Anti-GFAP and Anti-Vimentin antibodies. *J Comp Neurol.* 295: 559-568.

Yanes C, Monzón-Mayor M, Gombos G, Renau-Piqueras J & Sturrock RR. (1997). Glial cells in the lizard *Gallotia galloti* subpallial nuclei during ontogeny: An ultrastructural study. *J Morphol.* 233: 1-13.

Ye H & Hernandez MR (1995). Heterogeneity of astrocytes in human optic nerve head. *J Comp Neurol.* 362(4):441-52.

Yew DT (1978). The origin and initial development of the pecten oculi. *Anat Anz.* 143: 383-387.

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

Yoshioka A., Bacskai B. & Pleasure D (1996). Pathophysiology of oligodendroglial excitotoxicity. *J Neurosci Res.* 46, 427-437.

Yurco P & Cameron DA (2005). Responses of Muller glia to retinal injury in adult zebrafish. *Vision Res.* 45(8):991-1002.

Zerlin M, Levison SW & Goldman JE (1995). Early patterns of migration, morphogenesis, and intermediate filament expression of subventricular zone cells in the postnatal rat forebrain. *J Neurosci.* 15(11):7238-49.

Zhang Y & Stone J (1997). Role of astrocytes in the control of developing retinal vessels. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 38 (9): 1653-1666.