

Curso 2004/05  
CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS/28  
I.S.B.N.: 84-7756-669-0

**MARÍA NIEVES CASAÑAS ACOSTA**

**Proliferación y diversidad de las células astrogliales  
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 PADRES  
Y A MIS ABUELOS.**

*«...hubo que empezar por demostrar que  
las células de la glía realmente “escuchan”  
lo que las neuronas “se cuentan” entre sí  
y modifican su comportamiento  
en función de lo que “oyen”».*

***R. Douglas Fields***

## AGRADECIMIENTOS

Me gustaría expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que me han ayudado en la realización de este trabajo.

En primer lugar quiero dar las gracias a mis directoras de Tesis, la Dra. Carmen Magda Yanes Méndez y la Dra. Maximina Monzón Mayor, por haberme dado la oportunidad de descubrir el maravilloso y gratificante mundo de la investigación. Quiero agradecer especialmente a Magda el haber “endulzado” las interminables horas de trabajo y destacar su capacidad de comprensión, y a Mima por su gran sentido del humor y sus mensajes de ánimo. A ambas, por haberme transmitido esa pasión por el trabajo de investigación.

A mis compañer@s y amig@s Anita, Maritina, Eduardo, Pili y Nicanor, por los ánimos que me han transmitido y por su ayuda en la revisión del documento y, en general, a todos mis compañeros del Departamento de Biología Celular que de alguna manera han colaborado en este trabajo, especialmente a Miriam, Ricardo, Antonia, Irene, Carmela, Fernando e Isabel, por su amistad y por los buenos ratos que hemos pasado. También quiero agradecer a Mari Mar y a Juanfra su aporte e indicaciones en la parte experimental.

A todos los profesores del Departamento, especialmente a Manane por la revisión del trabajo y sus consejos.

Muy especialmente quiero agradecer a Raquel, mi compañera de fatigas, y a Elena, por haber sido tan buenas compañeras y amigas durante todos estos años. Por su colaboración en la parte experimental del trabajo y por sus consejos en la parte interpretativa pero, sobre todo, gracias por su complicidad.

A mi prima Natalia, y a mis amig@s Ana, Marta, Yoly, Anita, Elena y Javi, por estar siempre dispuestos a ayudarme cuando lo he necesitado y preocuparse por mí y por mi tesis a lo largo de estos años.

A Juan Luis, por ser una parte fundamental de mi vida y siempre estar a mi lado y, finalmente, quiero agradecer especialmente a mi hermana por ayudarme en la recta final de este trabajo y por poder contar siempre con ella.

## ÍNDICE

## **INTRODUCCIÓN**

<b>1. CÉLULAS GLIALES EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL .....</b>	<b>2</b>
<b>2. CÉLULAS MACROGLIALES EN EL SISTEMA VISUAL DE VERTEBRADOS.....</b>	<b>4</b>
<b>2.1. LA RETINA.....</b>	<b>4</b>
<b>2.2. CONUS PAPILLARIS .....</b>	<b>6</b>
<b>2.3. NERVIO ÓPTICO .....</b>	<b>7</b>
<b>3. INMUNOHISTOQUÍMICA EN CÉLULAS GLIALES Y PROLIFERATIVAS DE</b>	
<b>VERTEBRADOS .....</b>	<b>11</b>
<b>3.1. PROTEÍNA S-100 .....</b>	<b>11</b>
<b>3.2. PROTEÍNA VIMENTINA .....</b>	<b>13</b>
<b>3.3. PROTEÍNA GLIOFIBRILAR ÁCIDA (GFAP) .....</b>	<b>15</b>
<b>3.4. PROTEÍNA GLUTAMINA SINTETASA (GS) .....</b>	<b>17</b>
<b>2.3. ANTÍGENO NUCLEAR DE PROLIFERACIÓN CELULAR (PCNA) .....</b>	<b>18</b>
<b>4. ORIGEN, PROLIFERACIÓN Y DIFERENCIACIÓN CELULAR EN LA RETINA Y EL</b>	
<b>NERVIO ÓPTICO DE VERTEBRADOS .....</b>	<b>19</b>
<b>4.1. FORMACIÓN Y DESARROLLO DEL OJO DE VERTEBRADOS.....</b>	<b>19</b>
<b>4.2. DIFERENCIACIÓN Y CRECIMIENTO DE LA RETINA .....</b>	<b>19</b>
<b>4.2.1. Formación de la retina .....</b>	<b>19</b>
<b>4.2.2. Crecimiento de la retina: Zona marginal ciliar o germinal circunferencial .....</b>	<b>23</b>
<b>4.3. FORMACIÓN DEL CONUS PAPILLARIS .....</b>	<b>26</b>
<b>4.4. FORMACIÓN DEL NERVIO ÓPTICO.....</b>	<b>26</b>
<b>4.1.1. Crecimiento de los axones de las células ganglionares.....</b>	<b>27</b>
<b>4.1.2. Origen y formación de las células macrogliales.....</b>	<b>28</b>
<b>5. JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>30</b>
<b>6. OBJETIVOS .....</b>	<b>31</b>

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

<b>1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN: Origen y clasificación.....</b>	<b>34</b>
<b>2. PROCESAMIENTO DE LOS ANIMALES PARA LAS TÉCNICAS DE</b>	
<b>INMUNOHISTOQUÍMICA. ....</b>	<b>35</b>
<b>1.1. FIJACIÓN.....</b>	<b>35</b>
<b>2.2 DESHIDRATACIÓN, INCLUSIÓN Y OBTENCIÓN DE LAS SECCIONES. ....</b>	<b>35</b>
<b>2.3. DESPARAFINADO E HIDRATACIÓN.....</b>	<b>37</b>
<b>3. TINCIONES INMUNOHISTOQUÍMICAS .....</b>	<b>36</b>
<b>3.1. MARCAJE DE CÉLULAS GLIALES .....</b>	<b>36</b>
3.1.1. Marcajes simples: anti- S100, anti-Vimentina y anti-GFAP.....	36
3.1.2. Marcajes dobles: anti-S100/GFAP y anti-S100/GS .....	39
<b>3.2. MARCAJE DE CÉLULAS EN PROLIFERACIÓN .....</b>	<b>41</b>
3.2.1. Marcaje simple anti-PCNA .....	41
3.2.2. Marcajes dobles: anti- S-100/PCNA y anti- GFAP/PCNA .....	43
<b>3.3. CONTROLES DE LOS MARCAJES anti-S100, anti-PCNA y anti-GFAP.....</b>	<b>43</b>
<b>4. ESTUDIO DE LAS SECCIONES: MICROSCOPIA ÓPTICA. ....</b>	<b>44</b>

## **RESULTADOS**

<b>1. RETINA Y NERVIO ÓPTICO EN <i>Gallotia galloti</i>.....</b>	<b>46</b>
<b>2. CÉLULAS GLIALES. TÉCNICAS INMUNOHISTOQUÍMICAS.....</b>	<b>51</b>
<b>2.1. INMUNOMARCAJE ANTI-S100.....</b>	<b>51</b>
<b>2.2. INMUNOMARCAJE ANTI-VIMENTINA .....</b>	<b>59</b>
<b>2.3. INMUNOMARCAJE ANTI-GFAP.....</b>	<b>65</b>
<b>2.4. DOBLES MARCAJES INMUNOHISTOQUÍMICOS: ANTI-S100/GFAP.....</b>	<b>70</b>
<b>2.5. DOBLES MARCAJES INMUNOHISTOQUÍMICOS: ANTI-S100/GS .....</b>	<b>76</b>

<b>3. PROLIFERACIÓN CELULAR.....</b>	<b>81</b>
<b>3.1. INMUNOMARCAJE CON PCNA .....</b>	<b>81</b>
<b>3.2. DOBLES MARCAJES INMUNOHISTOQUÍMICOS: S100/PCNA.....</b>	<b>91</b>
<b>3.3. DOBLES MARCAJES INMUNOHISTOQUÍMICOS: GFAP/PCNA .....</b>	<b>95</b>

## **DISCUSIÓN**

<b>1. HETEROGENEIDAD DE LA POBLACIÓN GLIAL EN LA RETINA Y EL NERVIO ÓPTICO DURANTE LA ONTOGÉNESIS .....</b>	<b>98</b>
<b>1.1. IDENTIFICACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LAS CÉLULAS MACROGLIALES .....</b>	<b>98</b>
1.1.1. La proteína S-100 como marcador glial en el nervio óptico .....	98
1.1.2. Maduración de las poblaciones astrocitarias en función de la expresión de vimentina y GFAP .....	102
1.1.3. Inmunomarcaje de las células de Müller.....	107
1.1.4. Inmunomarcaje de las células gliales en la base del conus papillaris.....	112
<b>2. NEUROGÉNESIS Y GLIOGÉNESIS EN LA RETINA Y EL NERVIO ÓPTICO .....</b>	<b>114</b>
<b>2.1. FORMACIÓN DE LA RETINA .....</b>	<b>114</b>
2.1.1. Neurogénesis en la retina. ....	114
2.1.2. Crecimiento de la retina: Zona Marginal Proliferativa.....	117
<b>2.2. GLIOGÉNESIS EN EL CONUS PAPILLARIS.....</b>	<b>119</b>
<b>2.3. ORIGEN Y DIFERENCIACIÓN DE LOS ASTROCITOS EN EL NERVIO ÓPTICO</b>	<b>120</b>

<b><u>CONCLUSIONES</u> .....</b>	<b>123</b>
----------------------------------	------------

<b><u>ABREVIATURAS</u> .....</b>	<b>126</b>
----------------------------------	------------

<b><u>BIBLIOGRAFÍA</u> .....</b>	<b>128</b>
----------------------------------	------------

# **INTRODUCCIÓN**

## **1. CÉLULAS GLIALES EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL**

Durante los últimos años se ha descubierto que el papel de las células gliales en el Sistema Nervioso Central (SNC) es más complejo de lo que se creía, ya que pese a superar a las neuronas en una proporción de nueve a uno, sólo se le atribuían funciones de mantenimiento. Se ha demostrado que la glía participa activamente en la formación de las sinapsis y tiene un papel clave en el desarrollo, degeneración y regeneración del sistema nervioso.

Generalmente las células gliales del SNC se subdividen en células macrogliales, que comprenden a los astrocitos y los oligodendrocitos, de origen ectodérmico, términos que engloban a su vez diferentes tipos de células gliales (Anderson et al., 1999), y las células microgliales, cuyo origen mesodérmico es el más aceptado (Perry & Gordon, 1991; Cuadros & Navascués, 1998; Navascués et al., 2000).

Los *astrocitos* se clasifican en general en dos grupos: 1) *astrocitos protoplasmáticos*, localizados preferentemente en la sustancia gris, en la piamadre o limítrofes a los somas y dendritas de las neuronas, presentando prolongaciones abundantes, cortas y varicosas, y pies terminales asociados a los vasos sanguíneos, 2) *astrocitos fibrosos*, localizados preferentemente en la sustancia blanca, presentan procesos largos, finos y lisos, y se relacionan con las fibras nerviosas. En relación a las funciones de los astrocitos, se relacionan con la regulación del medio extracelular, imprescindible para la correcta actividad neuronal (Robert et al., 2000) y con la formación de los vasos retinales e inducción de la barrera hematoencefálica (Janzer & Raff, 1987). Además, intervienen en la formación y eficacia de las sinapsis (Ullian et al., 2001), participan activamente en respuesta a lesiones/traumatismos y procesos patológicos, formando la “cicatriz glial” que impide el recrecimiento de los axones (Reier et al., 1983), y proliferan actuando de guía en el crecimiento axonal de vertebrados (Reier & Webster, 1974). Así mismo, se cree que participan en el proceso de mielinización, interactuando con los oligodendrocitos, o incluso transformándose en estos últimos (Müller, 1992).

Por otro lado, los astrocitos presentan excitabilidad basada en variaciones de  $Ca^{2+}$  intracelular (Cornell-Bell et al., 1990; Charles et al., 1991), a modo de oscilaciones espontáneas independientes o dependientes de la actividad neuronal (Parri et al., 2001;

Aguado et al., 2002), lo que demuestra la existencia de una comunicación neurona-astrocito. Además, intervienen en la detoxificación del tejido nervioso al metabolizar amonio y glutamato para obtener glutamina (aminoácido obtenido por estas células mediante la acción de la glutamina sintetasa).

Los *oligodendrocitos* como responsables de la mielinización de los axones son imprescindibles para la rápida y eficiente conducción del impulso nervioso (Bunge, 1968). Estas células destacan por presentar un amplio polimorfismo. Atendiendo a la densidad electrónica de su citoplasma, los oligodendrocitos se clasifican en “claros”, “medios” y “oscuros” (Kruger & Maxwell, 1966; Mori & Leblond, 1970; Ling et al., 1973; Vaughan, 1984; Monzón-Mayor et al., 1990d; Yanes et al., 1997), densidad directamente relacionada con el tamaño y la actividad metabólica de los mismos (Blakemore, 1982; Monzón-Mayor et al., 1990d), de manera que los de citoplasma más claro mielinizan largos axones (Blakemore, 1982). En relación a sus funciones, los oligodendrocitos contienen anhidrasa carbónica II, enzima que cataliza la hidratación del dióxido de carbono (Ghandour et al., 1980; Kumpulainen et al., 1983; Cammer et al., 1985). Además, expresan moléculas de superficie O<sub>4</sub> y O<sub>1</sub> (Sommer & Schachner, 1981) y proteínas de mielina, como PLP (proteolipid protein), MBP (myelin basic protein), CNP (2'-3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase) y MAG (myelin-associated glycoprotein), esta última presente al menos en todos los tetrápodos (Tropak et al., 1995), incluyendo a *G. galloti* (Lang et al., 1998). El tiempo de mielinización es extremadamente preciso para cada región del SNC, sugiriendo que está regulada por señales locales inductivas (Shh) y represivas (BMPs) (See et al., 2004). Además, se ha demostrado que tras producir una lesión en el SNC, células precursoras de oligodendrocitos sobreexpresan determinadas moléculas de la matriz extracelular, como NG2, que inhiben del crecimiento axonal (Jones et al., 2002).

En relación a las células de *microglía*, existe controversia con respecto a su origen, de manera que algunos autores defienden un origen mesodérmico (del Río-Hortega, 1919, 1932; Perry & Gordon, 1991, Ling & Wong, 1993; Cuadros & Navascués, 1998; Wilms et al., 1999; Navascués et al., 2000), frente a otros que afirman que se trata de células neuroectodérmicas (Hao et al., 1991; Fedoroff et al., 1997; Kaur et al., 2001). En trabajos *in vitro* se observa que la diferenciación microglial depende en gran parte del contacto específico célula-célula con la población astrogliar, debido a la

liberación de factores específicos por estas últimas (Tanaka & Maeda, 1996; Kloss et al., 1997; Tanaka et al., 1999). Las células de microglía se distribuyen en la sustancia gris y en la blanca, y funcionalmente actúan como inmunomoduladoras e inmunoefectoras, sintetizando y liberando factores tróficos (Nagata et al., 1993; Jonakait et al., 1996; Mazzoni & Kenigsberg, 1997), promoviendo la proliferación de astrocitos (Giulian et al., 1988), favoreciendo la mielinización (Hamilton & Rome, 1994) o estimulando la vascularización (Streit, 2001). Además, participan como células macrofágicas durante el desarrollo y tras lesiones fagocitando detritus celulares, e intervienen en la remodelación sináptica (Ashwell, 1990, 1991; Castellano & González, 1996).

## **2. CÉLULAS MACROGLIALES EN EL SISTEMA VISUAL DE VERTEBRADOS**

### *2.1. LA RETINA*

En la retina de vertebrados se observan distintos tipos macrogliales: células de Müller, astrocitos y oligodendrocitos. Las primeras, descritas por Müller (1851), han sido ampliamente estudiadas desde el punto de vista morfológico y funcional (Ramón y Cajal, 1892; Pedler, 1963; Lasansky, 1965; Miller & Dowling, 1970; Rasmussen, 1972, 1973, 1974, 1975; Uga & Smelser, 1973; Lewis et al., 1988; Holländer et al., 1991; Fischer, 2005). Las células de Müller se catalogan como un tipo de glía radial (Bignami & Dahl, 1979; Reichenbach & Reichelt, 1986; Willbold et al., 1997; Willbold & Layer, 1998) cuyo soma se localiza en la capa nuclear interna y sus prolongaciones se extienden formando las membranas limitante externa e interna. Las células de Müller realizan funciones semejantes a los astrocitos, oligodendrocitos y células endoteliales en otras regiones del SNC (Holländer et al., 1991; Newman & Reichenbach, 1996). Así mismo, intervienen en el mantenimiento de las neuronas retinales (Poitry-Yamate & Tsacopoulos, 1991; Pfeiffer et al., 1994; Reichenbach & Robinson, 1995), ya que su alto contenido en glucógeno y en enzimas relacionadas con su metabolismo así lo indican (Chase, 1982). Además, en retinas amielínicas de mamíferos aíslan y protegen a las células ganglionares (Holländer et al., 1991), mientras que en retinas mielinizadas como la de aves parecen intervenir en el proceso de mielinización (Inoue et al., 1980; Yamada, 1989). También participan en la regeneración de las células de la retina de peces (Braisted et al., 1994; Wu et al., 2001; Yurco & Cameron, 2005) y aves (Fischer

& Reh, 2001a), ya que en este último grupo se desdiferencian dando lugar a todos los tipos celulares de la retina (Fischer & Reh, 2003b; García & Vecino, 2003; Fischer, 2005). Dicha capacidad queda confinada con la edad del animal a las regiones periféricas, donde las células de Müller son más inmaduras y poseen mayor plasticidad (Fischer & Reh, 2003b; Fischer et al., 2004). Estas células expresan distintos marcadores en función de la especie y edad del animal. Así, la proteína vimentina se expresa en mamíferos (Dräger, 1983; Shaw & Weber, 1983, 1984; Dräger et al., 1984; Schnitzer, 1985, 1988; Robinson & Dreher, 1990; Reichenbach et al., 1995; Famiglietti et al., 2003), aves (Lemmon & Rieser, 1983; Torelli et al., 1989; Chabot & Vincent, 1990; Gerhardt et al., 1999), reptiles (Gaur et al., 1988) y peces (Vaughan & Lasater, 1990; De Guevara et al., 1994); la proteína GFAP en mamíferos (Björklund et al., 1985; Erickson et al., 1987; Stone & Dreher, 1987; Ekström et al., 1988; Abd-El-Basset et al., 1988; Lewis et al., 1989; Guerin et al., 1990; Huxlin et al., 1995), aves (Torelli et al., 1989; Sassoé Pogneto et al., 1992), reptiles (Sassoé Pogneto et al., 1992) y peces (Bignami, 1984; Vaughan & Lasater, 1990; Sassoé Pogneto et al., 1992 ; De Guevara et al., 1994); la proteína S-100 en mamíferos (Cocchia, et al., 1983; Kondo et al., 1983; Terenghi et al., 1983; Kondo et al., 1984; Schnitzer, 1987) y peces (Vecino et al., 1997; Lillo et al., 2002); las proteínas glutamina sintetasa y anhidrasa carbónica en mamíferos (Linser et al., 1984), aves (Vardimon et al., 1986) y peces (Vaughan & Lasater, 1990).

Por otro lado, tras lesiones en la retina de mamíferos, se produce una sobreexpresión de las proteínas GFAP (Ekström et al., 1988; Guerin et al., 1990; Yoshida et al., 1993; Lewis et al., 1994; Lewis et al., 1995; Rungger-Brandle et al., 2000; Lewis & Fischer, 2003) y vimentina (Guerin et al., 1990; Lewis et al., 1995; Lewis & Fischer, 2003).

En las especies con retinas vascularizadas, fundamentalmente en mamíferos, además de las células de Müller se observan astrocitos (Stone & Dreher, 1987; Schnitzer, 1988), los cuales se diferencian en el nervio óptico y desde allí migran a la retina (Stone & Dreher, 1987; Watanabe & Raff, 1988; Ling & Stone, 1988; Ling et al., 1989; Chang-Ling & Stone, 1991; Fruttiger et al., 1996). Los mecanismos y factores que atraen a los astrocitos hasta la retina no se conocen bien, aunque se cree que migran a través de una lámina basal que forman células de origen mesodérmico dispuestas en hilera y precursoras de los vasos sanguíneos (Ling & Stone, 1988; Ling et al., 1989;

Chang-Ling & Stone, 1991). En este sentido, Fruttiger et al. (1996) sugirieron que la expresión por las células ganglionares de factores de crecimiento como el PDGF-A (Platelet-derived growth factor-A) podría intervenir en la migración de los astrocitos hacia la retina.

En cuanto a sus funciones, los astrocitos inducen la formación de los vasos y mantienen la integridad de la retina en mamíferos (Stone et al., 1995; Wechsler-Reya & Barres, 1997), como también ocurre en otras zonas del SNC (Janzer & Raff, 1987; Zhang & Stone, 1997). Se les atribuye un papel “inductor” de la barrera hematoencefálica, ya que se cree que secretan factores solubles sobre las células endoteliales vasculares (Lobrinus et al., 1992; Rubin & Staddon, 1999).

En la retina avascular de pollo existe controversia con respecto a la presencia de astrocitos, ya que existen trabajos que afirman que la retina de esta especie está desprovista de astrocitos (Reichenbach et al., 1993; Won et al., 2000; Seo et al., 2001), mientras otros han descrito la presencia de estas células en la capa ganglionar retinal (Prada et al., 1998).

Por otro lado, se han descrito oligodendrocitos en la capa ganglionar y capa de nervio de la retina de conejo (Schnitzer, 1985, 1988) y pollo (Nakazawa et al., 1993; Ono et al., 1998), los cuales proceden del nervio óptico (Ono et al., 1998). Además, Seo et al. (2001) describen en aves la presencia de oligodendrocitos en la capa de células ganglionares y en la zona central de la capa de fibras del nervio, sugiriendo la heterogeneidad y diferentes funciones de estas poblaciones, de manera que en la capa de células ganglionares llevarían a cabo funciones de soporte metabólico, mientras que en la capa de fibras del nervio estarían involucrados en la mielinización de los axones.

## *2.2 CONUS PAPILLARIS*

Como característica importante del sistema visual de reptiles y aves señalamos la ausencia de vasos sanguíneos en la retina, observándose en la cabeza del nervio óptico y en una estructura vascular, denominada conus papillaris en reptiles (Nguyen-H-Anh, 1974; Dieterich, 1976; Jasinski, 1977; Nguyen-Legros, 1978; Braekevelt, 1989), y pecten oculi en aves (Yew, 1978; Braekevelt, 1996; Gerhardt et al., 1996, 1999; Liebner et al., 1997; Wolburg, 1999; Schuck et al., 2000).

En reptiles, el conus papillaris se extiende desde la cabeza del nervio óptico hacia el interior del vítreo y presenta diferente morfología dependiendo de la especie. En la familia Lacertidae tiene forma cónica (Nguyen H. Anh., 1974; Dieterich & Dieterich, 1975; Dieterich et al., 1976) y está formado principalmente por células pigmentarias o melanocitos y células endoteliales de los vasos.

Sin embargo, el pecten oculi de aves presenta un tipo especial de glía, denominado glía pecteneal (Gerhardt et al., 1999; Schuck et al., 2000), con numerosos gránulos de pigmento y asociada a los vasos sanguíneos. Este tipo de glía es glutamina sintetasa y vimentina positivas, lo que indica que presenta características comunes con las células de Müller y del epitelio pigmentario de la retina (Gerhardt et al., 1999), a partir de las cuales parece que se originan (Yew, 1978; Uehara et al., 1990; Liebner et al., 1997).

El conus papillaris es una estructura inervada en algunas especies de Lacértidos (Nguyen-Legros, 1978), a diferencia del pecten oculi de aves, que únicamente presenta elementos nerviosos en su base (Ehinger, 1967). Al parecer, dicha inervación está íntimamente relacionada con las células pigmentarias estableciéndose una relación entre ellos similar a la que existe entre los axones y las células de Schwann, en el sistema nervioso periférico (Nguyen-Legros, 1978).

El pecten oculi y el conus son estructuras homólogas (Jasinski, 1977) a las que se atribuyen generalmente funciones de nutrición (Mann, 1924; Pettigrew et al., 1990), regulación del pH (Kauth & Sommer, 1953; Brach, 1975) y de la presión ocular (Seaman & Storm, 1963), o estabilización del vítreo (Tucker, 1975). Además, diversos estudios sobre la distribución de la proteína glutamina sintetasa en el pecten oculi indican que esta estructura podría estar involucrada en la detoxificación del medio por asimilación de amonio del vítreo, producido por la alta actividad metabólica de la retina (Gerhardt et al., 1999).

### *2.3 NERVIO ÓPTICO*

En cuanto al nervio óptico, en humanos se observan cuatro regiones denominadas región intraocular, intraorbital, intracanalular e intracraneal (Hogan et al., 1971; Reeh, 1981; Jonas & Naumann, 1993). La cabeza del nervio óptico, compuesta

por la región intraocular y la parte anterior de la región intraorbital (Hayreh, 1974; Jonas & Naumann, 1993), se ha subdividido en cuatro regiones: capa superficial de fibra del nervio, región prelaminar, región laminar y región retrolaminar.

Sin embargo, en otros vertebrados como reptiles el nervio es dividido en dos regiones: región intraocular y región extraocular (Dávila et al., 1987). Estudios realizados en pollo (Gerhardt et al., 1999; Schuck et al., 2000) y teleosteos (Lillo et al., 2002) diferencian distintas regiones en la zona intraocular, o cabeza del nervio óptico, en función de los diferentes tipos de células gliales existentes.

La cabeza del nervio óptico (CNO) o parte intraocular del nervio óptico (PIN), constituye una región importante de transición entre la retina y el nervio. Presenta una alta actividad morfogénica durante el desarrollo, pues los axones de las células ganglionares al salir de la retina cambian su orientación en esta zona y además contiene un número elevado de células gliales, que tienen un papel crucial en la guía y organización de los axones que van al nervio óptico (Ott et al., 1998; Stuermer & Bastmeyer, 2000), debido a su responsabilidad en la fasciculación y mielinización de los mismos (Anderson, 1967; Anderson & Hoyt, 1969; Salazar et al., 1998). Además, en esta zona se encuentran moléculas quimioatrayentes como las netrinas y repelentes como la Sema5A, que intervienen en la orientación de los conos de crecimiento de las células ganglionares (Petrausch et al., 2000; Oster et al., 2003).

En la CNO de vertebrados existen variaciones morfológicas y diferencias en la tipología celular glial. Así, en mamíferos, se observa una lámina cribosa (Fuchs, 1916) formada por lamelas conectivas donde predominan los astrocitos (Uga, 1974; Büssow, 1980; Morcos & Chan-Ling, 2000). En humanos se distinguen tres regiones: prelaminar (anterior y posterior), laminar y retrolaminar, con diferentes poblaciones astrocitarias relacionadas con las funciones que desempeñan en cada área. Al respecto, en la región prelaminar anterior presentan una morfología en cesta y ejercen una función protectora y de soporte de los axones amielínicos que realizan un giro de 90° al salir de la retina. Sin embargo, en la región prelaminar posterior, los astrocitos forman tubos gliales que podrían tener función mecánica para resistir las presiones que se originan con los movimientos oculares o bien de organización de axones para su entrada en los poros de la lámina cribosa. Y por último, la región laminar, con astrocitos que aíslan los axones

del colágeno en los poros cribosos, y la región retrolaminar donde aíslan los axones de los septos conectivos (Salazar et al., 1998).

Así mismo, en la CNO en humanos se han descrito dos grupos de astrocitos tipo 1: el tipo 1A, GFAP<sup>+</sup>, que se localiza en la zona laminar y forma la membrana limitante del nervio; y el tipo 1B, que son GFAP<sup>+</sup>, HNK-1<sup>+</sup>/N-CAM<sup>+</sup> y vimentina<sup>+</sup>, más abundantes que los anteriores y localizados en la zona que limita con el vítreo, región prelaminar y laminar (Ye & Hernández, 1995). Además, se confirma la antigenicidad de los astrocitos tipo 2 para la GFAP y A2 B5.

En aves se ha descrito un tipo de glía localizada en la base del pecten oculi, denominada glía peripapilaris, que presenta marcadores comunes con la glía radial y astrocitos (3CB2), neuronas (3BA8), y oligodendrocitos (MOSP), lo que indica que se trata de un tipo glial con características específicas (Quesada et al., 2004). En peces se observan poblaciones de células astrogliales y oligodendrogliales (Lillo et al., 2002), y en reptiles se han descrito astrocitos fibrosos dispuestos en columnas paralelas y oligodendrocitos en menor número (Dávila et al., 1987).

La parte extraocular del nervio (PEN) contiene células gliales similares a las de la sustancia blanca del SNC, oligodendrocitos y astrocitos, que a su vez se subdividen en astrocitos tipo 1 y tipo 2 (Raff et al., 1983 a, b) y se distinguen por diferencias morfológicas, antigénicas y de respuesta a factores de crecimiento (Raff et al., 1983b). En relación a la antigenicidad, los astrocitos tipo 2 expresan la proteína A2B5, mientras que los de tipo 1 son Ran<sup>+</sup> (Raff et al., 1984).

En el nervio óptico de rata se ha descrito que los procesos cortos de los astrocitos tipo 1 se orientan radialmente, formando parte de las membranas limitantes del nervio y asociándose generalmente a los vasos sanguíneos, mientras que los procesos largos de los astrocitos tipo 2 se disponen longitudinalmente al nervio y se asocian a los nódulos de Ranvier (Miller et al., 1989).

En general, los astrocitos del nervio óptico intervienen en la diferenciación de los oligodendrocitos (Raff, 1989), formación y mantenimiento de los nodos de Ranvier (Ffrench-Constant et al, 1986), fasciculación de los axones e inducción de la formación de la barrera hematoencefálica (Abbott, 1987). Además, los astrocitos que forman las

membranas limitantes en mamíferos se cree que constituyen una barrera que impide el paso de sustancias al interior del nervio, pues se observa una gran cantidad de fragmentos de mielina y cuerpos densos que podrían estar siendo degradados en sus citoplasmas (Ramírez et al., 1998).

El quiasma óptico de mamíferos presenta menor número de astrocitos y su distribución, principalmente en las zonas basal y caudal, es menos homogénea en relación a otras áreas del nervio. Además, contienen más orgánulos y menor cantidad de filamentos intermedios que los del nervio (Skoff et al., 1986). Sin embargo, en peces, el quiasma presenta células gliales con características similares a las del nervio (Lara et al., 1998).

En el tracto óptico de peces, los astrocitos y oligodendrocitos se distribuyen en grupos, especialmente en las zonas periféricas. En este sentido, los astrocitos presentan procesos más largos y finos que los localizados en las regiones rostrales formando la glía limitante (Lara et al., 1998).

En el techo óptico (TO) se produce la mayor parte de las sinapsis de los axones de las células ganglionares retinales (CGRs). Está formado por seis estratos: stratum opticum (SO), stratum griseum et fibrosum superficiale (SGFS), stratum griseum centrale (SGC), stratum album centrale (SAC), stratum griseum periventriculare (SGP) and stratum fibrosum periventriculare (SFP) (Huber & Crosby, 1933; Morales et al., 1989; Báez et al 1992, 2003) y los axones de las CGRs hacen sinapsis en los dos estratos más superficiales, SO y SGFS. En relación a las células gliales del TO, en peces se han descrito astrocitos, oligodendrocitos y microglía, distribuidos en distinta cantidad dependiendo del estrato, de forma que los tres tipos predominan en el SAC (Shin et al., 2003). Además, en peces se ha sugerido que los astrocitos y oligodendrocitos del TO son variantes funcionales de un mismo tipo celular (Lara et al., 1989). En pollo existen distintas poblaciones astrocitarias concentradas en las zonas de llegada de los axones, sugiriendo que podrían jugar un papel importante en la distribución y sinapsis de los mismos (Miskevich, 1999). Finalmente, en lagartos del género *Podarcis* coexisten los astrocitos y la glía radial que son GFAP<sup>+</sup> (Lazzari & Franceschini, 2001), mientras que en *G. galloti* se han descrito astrocitos GFAP<sup>+</sup> y vimentina<sup>+</sup> (Monzón-Mayor et al., 1990a), GS<sup>+</sup> (Monzón-Mayor et al., 1990b), y mediante estudios ultraestructurales

(Monzón-Mayor et al., 1990c, 1998), además de oligodendrocitos S-100<sup>+</sup> (Romero-Alemán et al., 2003) y mediante estudios de ultraestructura (Monzón-Mayor et al., 1990d) y microglía lectina<sup>+</sup> (Plaza, 2002).

### **3. INMUNOHISTOQUÍMICA EN CÉLULAS GLIALES Y PROLIFERATIVAS DE VERTEBRADOS**

#### *3.1. PROTEÍNA S-100*

La proteína S-100 se denomina así debido a la solubilidad que presenta en 100% de sulfato de amonio (Moore, 1965). Pertenece a un grupo de proteínas ácidas fijadoras de Ca<sup>2+</sup> de la familia “EF-hand”, donde se incluyen también la troponina C, calmodulina y parvalbúmina (Zolese et al., 1993). Son proteínas diméricas de bajo peso molecular (21 kDa) con dos subunidades ( $\alpha$  y  $\beta$ ). La S-100 $\alpha$  y S-100 $\beta$  son polipéptidos de 93 y 91 aminoácidos respectivamente, 54 de los cuales son comunes (Van Eldik et al., 1984). Existen tres formas en el tejido nervioso, los dos homodímeros S-100a<sub>o</sub> ( $\alpha$ ,  $\alpha$ ) y S-100b ( $\beta$ ,  $\beta$ ) y el heterodímero S-100a ( $\alpha$ ,  $\beta$ ), heterogeneidad que sugiere el marcaje en distintos tipos celulares. Las proteínas S-100a y S-100b predominan en el tejido nervioso de mamíferos mientras que la S-100a<sub>o</sub> es minoritaria (Isobe et al., 1984). Las neuronas del cerebro y nervios periféricos contienen sólo la subunidad  $\alpha$  (S-100 a<sub>o</sub>), las células gliales presentan ambas subunidades y las células de Schwann y satélites la subunidad  $\beta$  (S-100 b). Así mismo, la subunidad  $\beta$  se detecta en células astrogliales, oligodendrogliales y endodimales, pero no en neuronas (Isobe et al., 1984).

En general, la proteína S100 se localiza en el núcleo y citoplasma de células gliales (Hydén & McEwen, 1966; Matus & Mughal, 1975; Hydén & Rönnbäck, 1975; Haglid et al., 1976; Ludwin et al., 1976; Tabuchi et al., 1976; MØller et al., 1978) y en neuronas de mamíferos (Sviridov et al., 1972; Haglid et al., 1976; Tabuchi et al., 1976., (Rickmann & Wolff, 1995b), aunque también se han observado neuronas S-100<sup>-</sup> (Matus & Mughal, 1975; Cocchia, 1981; Langley et al., 1984). Otros estudios indican que la proteína S-100 se localiza en astrocitos de mamíferos (Ludwin et al., 1976; Kligman & Hilt, 1988), siendo más específica que la GFAP en ratas neonatales (Ghandour et al., 1981; Björklund et al., 1983; Janeczko, 1991). Sin embargo, también inmunotiñe

oligodendrocitos inmaduros la corteza visual de gato (Dyck et al., 1993), poblaciones de oligodendrocitos con actividad mielinizante en rata (Rickmann & Wolff, 1995a), y oligodendrocitos en techo óptico en aves (Linser, 1985; Linser & Perkins, 1987) y en el reptil *G. galloti* (Romero-Alemán et al., 2003). Igualmente presentan inmunorreactividad para la S-100 las células de Schwann del nervio ciático en rata (Mata et al., 1990), los ependimocitos en mamíferos (Cocchia, 1981; Didier et al., 1986) y peces (Manso et al., 1997), y la glía radial en mamíferos (Engel & Müller, 1989; Stagaard-Janas et al., 1991a, b) y peces (Manso et al., 1997).

Los estudios de la proteína S-100 en la vía óptica se han realizado fundamentalmente en mamíferos (Terenghi et al., 1983; Kondo et al., 1983, 1984; Karschin et al., 1986; Ling et al., 1989), en aves (Linser & Moscona, 1981; Linser, 1985) y en peces (Vecino et al., 1997; Velasco et al., 1997; Jimeno et al., 1999; Lillo et al., 2002). Sin embargo, la distribución y función de dicha proteína en el sistema visual de reptiles aún se desconoce. En peces, las células S-100 positivas de la cabeza del nervio óptico se identifican como astrocitos (Vecino et al., 1997; Lillo, et al., 2002), sin embargo en el techo óptico son oligodendrocitos (Velasco et al., 1997), como también ocurre en el tracto y techo óptico de *G. galloti* (Romero-Alemán et al., 2003) o en la corteza visual de gato (Dyck et al., 1993).

En la retina se observan variaciones en su distribución en los diferentes grupos estudiados, de modo que aparece en las células de Müller de peces (Vecino et al., 1997; Lillo et al., 2002) y mamíferos como la rata, el hámster, el conejo y el cerdo (Kondo et al., 1983, 1984; Terenghi et al., 1983; Schnitzer, 1987), así como en astrocitos localizados en retinas vasculares de rata y conejo (Kondo et al., 1983, 1984; Schnitzer, 1987). Además, esta proteína se expresa en todas las neuronas de la retina en pollo, dependiendo de su estadio del desarrollo (Linser & Moscona, 1981; Molnar et al., 1985) y en las células horizontales de peces (Vecino et al., 1997). En la retina de humanos se observa un marcaje muy débil S100<sup>+</sup> que se incrementa con la edad en las células ganglionares y los astrocitos (Karim & Itoh, 1997), aunque según Molnar et al. (1984) no fue detectada.

Las proteínas S100 se consideran multifuncionales con actividad intra y extracelular dependiente de Ca<sup>2+</sup> (Rickmann & Wolff, 1995a; Schäfer & Heizmann, 1996). Están involucradas en procesos intracelulares como la fosforilación de proteínas,

la regulación de la actividad enzimática, el dinamismo del citoesqueleto, y la proliferación y diferenciación celular (Donato, 1999). Durante el desarrollo puede ser liberada por las células gliales estimulando el crecimiento de las neuritas (Winningham-Mayor et al., 1989), la proliferación y diferenciación de las células gliales (Selinfreund et al., 1991), la plasticidad y el desarrollo (Dyck et al., 1993), así como la regulación del crecimiento axonal (Gordon-Weeks, 1989).

Además, esta proteína parece estar involucrada en la formación y reparación de la mielina (Rickmann & Wolff, 1995a), interviniendo en procesos regenerativos tras lesiones (Rickmann et al., 1995; Velasco et al., 1997), lo que sugiere una estrecha relación entre esta proteína y las células microgliales ante una lesión (Cerutti & Chadi, 2000; Adami et al., 2001). Además, se le ha implicado en desórdenes neurológicos como el Alzheimer (Marshak & Pena, 1992; Sheng et al., 1997), y en procesos de metástasis (Sherbet & Lakshmi, 1998; Aberg & Kozlova, 2000), aumentando su concentración a medida que progresa la enfermedad (Ortíz-Muñoz et al., 2003).

### *3.2. PROTEÍNA VIMENTINA*

La vimentina es una proteína de 52-57 kDa situada en los filamentos intermedios y conservada a través de la evolución (Franke et al., 1978). Su estructura primaria consta de tres dominios: N-terminal, central y C-terminal. El dominio central se encuentra formado por 300-310 aminoácidos organizados en 7 heptámeros, de los cuales 4 presentan una estructura primaria en  $\alpha$ -hélice enrollada y los otros 3 son segmentos no helicoidales.

La expresión de la vimentina en la glía radial y los astrocitos ha sido ampliamente estudiada en el SNC de vertebrados (Dahl et al., 1981a, 1981b, 1982; Bignami et al., 1982; Cochard & Paulin, 1984; Pixley & De Vellis, 1984; Bignami & Dahl, 1989; Monzón-Mayor et al., 1990b; Yanes et al., 1990; Janeczko, 1992, 1993; Galou et al., 1996; Pekny et al., 1999a, 1999b; Lazzari & Franceschini, 2001; Pekny, 2001; Kim et al., 2003; Weissman et al., 2003; Arochena et al., 2004; Ribotta et al., 2004; Wilhelmsson et al., 2004).

La presencia de vimentina en los astrocitos durante el desarrollo embrionario de mamíferos (Dahl et al., 1981a; Schnitzer et al., 1981; Pixley & De Vellis, 1984;

Quitschke et al., 1985; Schiffer et al., 1986), anfibios y peces (Quitschke et al., 1985), coincide con la etapa de proliferación y migración neuronal. En *G. galloti* la máxima expresión de vimentina aparece principalmente en las células de glía radial y también coincide aparentemente con la migración neuronal en el cerebro medio (Monzón-Mayor et al., 1990c) y en el telencéfalo (Yanes et al., 1990).

Durante el proceso de maduración de los astrocitos en mamíferos (Bignami et al., 1980; Levitt & Rakic, 1980; Onteniente et al., 1983), aves (Onteniente et al., 1983), reptiles (Monzón-Mayor et al., 1990b; Yanes et al., 1990), anfibios y peces (Onteniente et al., 1983), deja de expresarse vimentina en los filamentos intermedios y comienza la expresión de la GFAP. Sin embargo, estudios realizados *in vitro* en el nervio óptico de humanos (Yang & Hernández, 2003), y de rata (Dahl et al., 1981b; Shaw et al., 1981; Calvo et al., 1990), así como en otras áreas del SNC de ratón (Schnitzer et al., 1981), observan que ambos marcadores coexisten en astrocitos maduros, hecho que se interpreta como un signo de incompleta madurez (Shaw et al., 1981), o como una adaptación fenotípica a condiciones específicas del medio (Calvo et al., 1990).

En la vía óptica, la vimentina se expresa durante el desarrollo en las células de Müller de mamíferos (Shaw & Weber, 1983), pollo (Lemmon & Rieser, 1983; Chabot & Vincent, 1990), y peces (De Guevara et al., 1994), aunque permanece en ejemplares postnatales y adultos de mamíferos (Dräger, 1983; Dräger et al., 1984; Shaw & Weber, 1984; Schnitzer, 1985, 1988; Robinson & Dreher, 1990; Lewis et al., 1994; Reichenbach et al., 1995; Famiglietti et al., 2003), pollo (Gerhardt et al., 1999), tortuga (Gaur et al., 1988) y peces (Vaughan & Lasater, 1990; De Guevara et al., 1994).

Por otra parte, la vimentina también se ha observado en las células horizontales de ratón y rata (Dräger, 1983; Shaw & Weber, 1983), conejo (Schnitzer, 1985), pollo (Prada et al., 1995) y peces (Vaughan & Lasater, 1990). Además, se encuentra en las células del epitelio pigmentario, en la glía peripapilaris y la glía pecteneal madura de pollo (Gerhardt et al., 1999). Así mismo, en el nervio óptico de rata se ha descrito que las células precursoras de astrocitos tipo 1 (APCs) y los precursores de oligodendrocitos y astrocitos tipo 2 (OPCs ó O-2A), también son vimentina<sup>+</sup> (Mi & Barres, 1999; Lee et al., 2000).

Finalmente, la vimentina se ha detectado en células mesenquimáticas, endoteliales, musculares, hematíes y en meninges (Lazarides, 1982; Langley et al., 1984).

Funcionalmente, esta proteína se encuentra implicada en distintos procesos, como el ciclo celular, la diferenciación y procesos de locomoción (Fuchs & Weber, 1994). Se ha sugerido su relación con procesos de transporte de fluidos extracelulares o desde vasos sanguíneos al tejido parenquimático adyacente (Pixley & De Vellis, 1984). En mamíferos esta proteína juega un importante papel en la formación de la cicatriz glial tras lesiones en el SNC (Lin & Cai, 2004) y en peces se ha observado que las células vimentina<sup>+</sup> reaparecen después de lesionar el nervio óptico de adulto, sugiriendo su implicación en la regeneración del mismo (Cohen et al., 1994).

### *3.3. PROTEÍNA GLIOFIBRILAR ÁCIDA (GFAP)*

La proteína gliofibrilar ácida fue descubierta hace más de treinta años, analizando muestras de pacientes con esclerosis múltiple (Eng et al., 2000). En mamíferos se han descrito diferentes isoformas resultado de un procesamiento diferencial del ARNm, denominados  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  (Condorelli et al., 1999), y  $\epsilon$  (Nielsen et al., 2002). El ARNm  $\alpha$  codifica una proteína de 48-50 kDa que se expresa principalmente en astrocitos. Como en la vimentina, la estructura primaria de la GFAP consta de tres dominios, así, las isoformas  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  difieren en el dominio N-terminal (Feinstein et al., 1992), y las  $\delta$  y  $\epsilon$  en el C-terminal (Condorelli et al., 1999; Nielsen et al., 2002).

La GFAP forma parte de los filamentos intermedios de astrocitos (protoplasmáticos y fibrosos), de la glía de Bergmann (Bignami & Dahl, 1974; Schachner et al., 1977; Ghandour et al., 1983), y estudios recientes la describen en células progenitoras neuronales (Doetsch et al., 1999; Laywell et al., 2000; Malatesta et al., 2000; Noctor et al., 2001; Campbell & Gotz, 2002).

En *G. galloti* se ha demostrado que la glía radial también es GFAP<sup>+</sup> en el telencéfalo y mesencéfalo de ejemplares adultos (Monzón-Mayor et al., 1990b; Yanes et al., 1990). En el mesencéfalo la inmunorreactividad para esta proteína aparece primero

en las paredes ventriculares, fibras radiales y pies terminales perivasculares y subpiales a partir de E-34, decreciendo en las fibras radiales e incrementándose en los astrocitos durante el desarrollo (Monzón-Mayor et al., 1990b). En el telencéfalo, la GFAP comienza en los pies terminales de la zona marginal en E-35 y su intensidad se incrementa hasta adultos, sin embargo no se detectaron astrocitos GFAP<sup>+</sup> en esta área (Yanes et al., 1990).

En relación al sistema visual, la GFAP no se ha detectado en células de Müller de retinas embrionarias de mamíferos, aunque se ha descrito durante el desarrollo de peces (De Guevara et al., 1994) y pollo (Torelli et al., 1989). Tampoco parece detectarse en células de Müller de ejemplares adultos de mamíferos (Shaw & Weber, 1983, 1984; Schnitzer, 1985; Sarthy et al., 1991; Triviño et al., 1992, 1997), no obstante en otros trabajos se observa GFAP en los pies terminales de dichas células (Björklund et al., 1985; Erickson et al., 1987; Stone & Dreher, 1987; Abb-El-Basset et al., 1988; Ekström et al., 1988; Lewis et al., 1989; Guerin et al., 1990; Huxlin et al., 1995) y su expresión es elevada en la glía de Müller en condiciones patológicas (Molnar et al., 1984; Ekström 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).

En vertebrados no mamíferos existen estudios comparados que demuestran su expresión en las células de Müller de ejemplares adultos de peces, anfibios, reptiles y aves, e incluso en algunos mamíferos, como conejo y ratón (Sassoé Pogneto et al., 1992). Al respecto, se describen importantes diferencias entre especies próximas, distinguiendo dos grupos en función del patrón de marcaje: un grupo expresa GFAP en los pies y en los procesos de las células de Müller (peces: *Carassius*; anfibios: *Triturus*; reptiles: *Podarcis* y *Tarentola*; mamíferos: *Oryctolagus* y *Mus*), y un segundo grupo la expresa principalmente en los pies terminales (peces: *Pseudotropheus*; reptil: *Gallotia*; aves: *Gallus*).

Las células horizontales también presentan inmunorreactividad para la GFAP, lo que pone de manifiesto que pueden compartir características comunes con las células gliales (Linser et al., 1985; Jones & Schechter, 1987; Vaughan & Lasater, 1990).

En el nervio óptico se ha estudiado la distribución, tipología y funciones de los astrocitos con la GFAP (Dahl et al., 1985; Quitschke et al., 1985; Maggs & Scholes,

1986; Levine, 1989; Nona et al., 1989; Gerhardt et al., 1999; Lillo et al., 2002) y también se encuentra en poblaciones gliales con características específicas, como la glía peripapilaris de pollo (Gerhardt et al., 1999).

En relación a las funciones, se trata de una proteína del citoesqueleto, implicada en diversos procesos, como el ciclo celular y la locomoción (Fuchs & Weber, 1994; Goldman et al., 1999), aunque también se desregula frente a lesiones y traumatismos produciendo la astrogliosis, caracterizada por un aumento en la síntesis de GFAP (Latov et al., 1979; Eng & Ghirnikar, 1994; Eng et al., 2000; Pekny & Pekna, 2004). Esta proteína juega un papel importante en el mantenimiento de la mielina (Liedtke et al., 1996), y participa en la formación de la barrera hematoencefálica y en el proceso de vascularización del SNC (Pekny et al., 1998).

### *3.4. PROTEÍNA GLUTAMINA SINTETASA (GS)*

La glutamina sintetasa (GS) presente en mamíferos está formada por 8 subunidades de 45 kD. Estudios en diferentes áreas durante la ontogenia del SNC de mamíferos han demostrado que la GS está presente en células astrocitarias (Norenberg & Martínez-Hernández, 1979; Caldani et al., 1982; Didier et al., 1986; Mearow et al., 1989; Ong et al., 1996; Okere & Waterhouse, 2004) y precursores O-2A (Baas et al., 1998). Por otro lado, se ha observado en oligodendrocitos de ratón *in vitro* (Warringa et al., 1988; Wiesinger et al., 1991; Tansey et al., 1991) e *in vivo* (Miyake & Kitamura, 1992). En aves también se ha descrito en astrocitos fibrosos y protoplasmáticos del techo óptico (Linser, 1985). En reptiles, y concretamente en *G. galloti*, se ha observado GS en glía radial y astrocitos durante el desarrollo del mesencéfalo y telencéfalo (Monzón-Mayor et al., 1990a), así como en oligodendrocitos en el mesencéfalo de adultos (Monzón-Mayor et al., 1998), posteriormente descritos como S100<sup>+</sup>/GS<sup>+</sup> por Romero-Alemán et al. (2003). La GS también está presente en células endoteliales de rata (Abcouwer et al., 1995) y de pollo (Gerhardt et al., 1999).

En la vía óptica, la GS se expresa en las células de Müller de mamíferos adultos (Riepe & Norenberg., 1978; Lewis et al., 1988; Derouiche, 1996; Sarup et al., 2004), y durante el desarrollo y adultos de pollo (Prada et al., 1998; Gerhardt et al., 1999; Quesada et al., 2004) y peces (Lillo et al., 2002). Además, se ha observado en la glía

pecteneal, en células endoteliales de los vasos del pecten oculi y células gliales de la cabeza del nervio óptico de pollo (Gerhardt et al., 1999, 2000).

En relación a las funciones, se trata de una enzima que cataliza la formación de glutamina a partir de glutamato y amonio. La fijación del amonio por parte de la glutamina sintetasa no sólo regula la cantidad de glutamina en el medio extracelular, sino también la cantidad de lactato y alanina (Poitry et al., 2000). Esta enzima se encuentra implicada en multitud de mecanismos celulares tales como la detoxificación del amonio y el suplemento de glutamina para la síntesis de purinas y pirimidinas.

### 3.5. ANTÍGENO NUCLEAR DE PROLIFERACIÓN CELULAR (PCNA)

El antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) es una molécula de 36 kD que ha sido descrita por Miyachi et al. (1978), como la ciclina, otra proteína similar, por Bravo & Celis (1980). Ambas proteínas se han identificado posteriormente como moléculas iguales de 35 kDa (Mathews et al., 1984) y son proteínas auxiliares de la  $\delta$ -DNA-polimerasa (Bravo & McDonald-Bravo, 1987; Prelich et al., 1987).

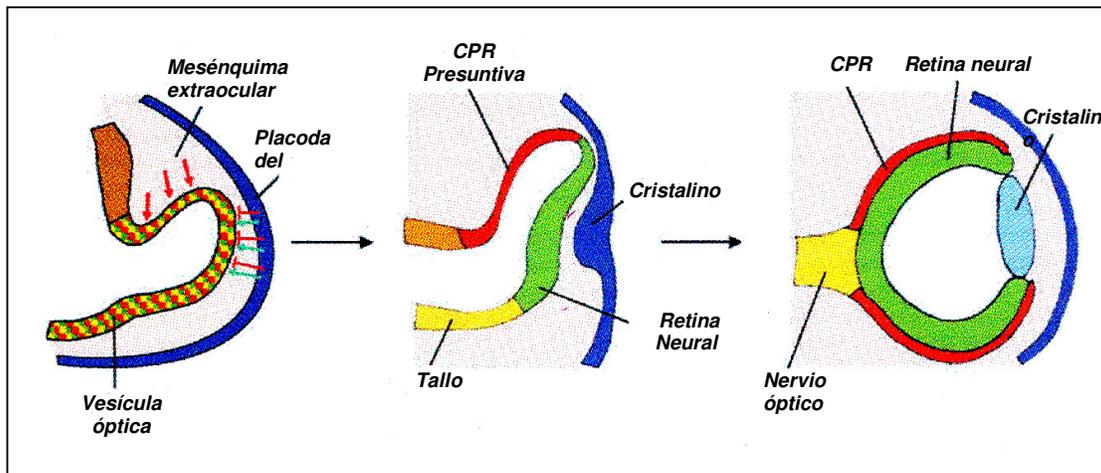
La PCNA/ciclina se expresa en el ciclo celular inicialmente en la fase G<sub>1</sub> tardía, aumenta en la fase S, decrece en la transición S/G<sub>2</sub> y durante G<sub>2</sub> y M (Bravo et al., 1987; Takahashi & Caviness, 1993) y se establece como marcador de todas las células en proliferación presentes en los tejidos (Kurki et al., 1986; Margota et al., 1999a, 1999b). Sin embargo, la timidina tritiada (TH<sup>3</sup>) y el método no radiactivo de la Bromodeoxiuridina (BrdU) sólo detectan células en fase S (Bravo & McDonald-Bravo, 1987; Lohr et al., 1995).

En la vía óptica, la PCNA se ha detectado en la retina de peces (Negishi et al., 1990; Kwan et al., 1996; Julian et al., 1998; Velasco et al., 2001) y aves (Fischer & Reh, 2002), así como en la cabeza del nervio óptico en peces (Lillo et al., 2002). En el reptil *G. galloti* este marcador se expresa durante el desarrollo y la regeneración del córtex cerebral en la glía radial, astrocitos, células endoteliales, microglía y células de origen mesodérmico (Romero et al., 2004), así como en la regeneración del nervio óptico (Lang et al., 2002). Por otra parte, se ha estudiado la capacidad proliferativa de la microglía en retinas con glaucoma en humanos (Yuan & Neufeld, 2001).

## **4. ORIGEN, PROLIFERACIÓN Y DIFERENCIACIÓN CELULAR EN LA RETINA Y EL NERVIÓ ÓPTICO DE VERTEBRADOS.**

### *4.1. FORMACIÓN Y DESARROLLO DEL OJO DE VERTEBRADOS*

En vertebrados, los ojos se forman a partir de protusiones laterales del prosencéfalo que forma las vesículas ópticas y se conectan a éste mediante el tallo óptico o pedúnculo. Estas vesículas ópticas contactan con el ectodermo superficial le inducen a invaginarse y forman la placoda del cristalino. Al mismo tiempo, la vesícula óptica se invagina formando la copa óptica o vesículas ópticas secundarias con dos capas, externa e interna, separadas por un espacio retiniano que se comunica con el tercer ventrículo por el pedúnculo (Fig. 1).



**Fig. 1.-** Formación del ojo. En una primera fase se origina la vesícula óptica (1) que dará lugar a la vesícula óptica secundaria (2) y ésta al ojo bien desarrollado (3). Factores de transcripción secretados por los tejidos adyacentes determinan la formación de la retina neural (flechas verdes) y la capa pigmentaria (CPR) (flechas rojas). Esquema tomado y modificado de Martínez-Morales et al., (2004).

### *4.2. DIFERENCIACIÓN Y CRECIMIENTO DE LA RETINA*

#### 4.2.1 Formación de la retina

La capa externa de la copa óptica es un epitelio monoestratificado que forma la capa pigmentaria de la retina y está en contacto con tejido mesenquimático. Las células de la capa interna contactan con el tejido ectodérmico, proliferan rápidamente dando

lugar a la retina neural, y sus células madre continúan dividiéndose. Sin embargo, en el epitelio pigmentario la proliferación cesa muy pronto (Mey & Thanos, 2000). Señales exógenas procedentes de los tejidos adyacentes determinarán la regionalización de la vesícula óptica en retina neural y epitelio pigmentario (Martínez-Morales et al., 2004) (Fig. 1). Estas señales son factores de transcripción como el FGF (fibroblast growth factor), que favorece la expresión de genes específicos de la retina neural e inhibe la formación de epitelio pigmentario (Nguyen & Arnheiter, 2000), o bien el Mitf (Microphthalmia-associated transcription factor) cuya función es la de favorecer la síntesis de melanina en la cresta neural y en el epitelio pigmentario (Goding, 2000) y su inactivación produce un epitelio despigmentado e hiperproliferativo propio de una retina neural (Mochii et al., 1998).

En general, la retina de vertebrados está formada por diferentes tipos neuronales y gliales, entre los que destacan las células de Müller, astrocitos y oligodendrocitos, con diferencias según las especies. En relación a su origen, se ha observado que todas las neuronas de la retina, así como las células de Müller, son generadas a partir de un único progenitor retinal (Turner & Cepko, 1987; Holt et al., 1988; Wetts & Fraser, 1988; Turner et al., 1990), aunque los fenotipos son generados a distintos tiempos. Aún así, existen controversias acerca de la influencia de diferentes factores externos (de crecimiento y de transcripción, integrinas, ciclinas, y enzimas que actúan sobre las células en proliferación, para dar lugar a una población heterogénea de progenitores que poseen mecanismos intrínsecos de restricción para producir únicamente determinados tipos celulares (Alexiades & Cepko, 1997; Belliveau & Cepko, 1999; Adler, 2000).

Las células de la retina central pasan de la fase de proliferación a la de diferenciación, conservándose el orden de aparición de los distintos tipos celulares en todos los grupos de vertebrados (Harris, 1997), salvo algunas excepciones. Las primeras células que se diferencian son las ganglionares (mamíferos: La Vail et al., 1991; Rapaport et al., 1996, 2004; pollo: Kahn, 1973, 1974; Prada et al., 1991; Adler, 2000; peces: Sharma & Ungar, 1980), seguidas de las amacrinas, horizontales y fotorreceptores, siendo las de Müller y las bipolares las últimas en formarse (Kahn, 1974; Spence & Robson, 1989; Prada et al., 1991). Sin embargo, algunos autores afirman que las células de Müller aparecen temprano en el desarrollo (Ramón y Cajal,

1892; Willbold & Layer, 1998; Peterson et al., 2001), debido al importante papel que ejercen en la neurogénesis (Willbold & Layer, 1998; Peterson et al., 2001).

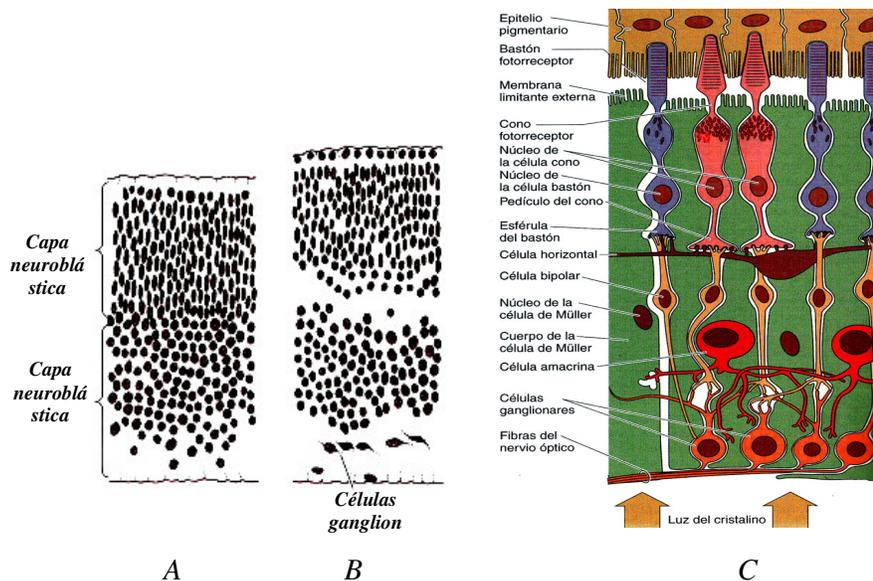
Otros estudios en mamíferos diferencian dos fases: 1) Formación de células ganglionares, horizontales, conos y amacrinas, y 2) Formación de bastones, bipolares y células de Müller (Harman et al., 1989; Rapaport et al., 2004). En peces se destaca la incorporación de los bastones cuando el resto de las células retinales están diferenciadas (Carter-Dawson & LaVail, 1979; Hagedorn & Fernald, 1992; Kwan et al., 1996; Otteson et al., 2001; Otteson & Hitchcock, 2003), y se sugiere su formación a partir de células madre localizadas en la capa nuclear interna (Johns, 1982; Raymon & Rivlin, 1987; Hagedorn & Fernald, 1992).

Aunque en las primeras etapas del desarrollo la actividad mitótica es uniforme en toda la superficie de la retina, posteriormente se observa un gradiente de diferenciación, más acentuado en la zona central que en la periferia (Sidman, 1961; Fujita y Horii, 1963; Hollyfield, 1968; Kahn, 1973, 1974; Carter-Dawson & La Vail, 1979; Young, 1985; Zimmerman et al., 1988). De esta manera, la retina comienza siendo un neuroepitelio pseudoestratificado y se transforma en un órgano sensorial multilaminado.

En relación a la retina central de vertebrados, la migración tiene lugar de forma vertical, desde la zona externa hasta el vítreo, con parada diferencial de neuroblastos a distintos niveles. Las células ganglionares y las amacrinas desplazadas se dirigen hacia la futura capa ganglionar; las amacrinas, ganglionares desplazadas, bipolares y horizontales forman la capa nuclear interna, y los fotorreceptores permanecen en la zona externa, y formarán la futura capa nuclear externa. Cuando este proceso comienza, una capa de fibras libre de células subdivide el neuroepitelio retinal primitivo en dos estratos neuroblásticos (Figs. 2 A, B) (Willbold & Layer, 1992). Los procesos de migración celular dependen de las interacciones entre las células y de éstas con moléculas de la matriz extracelular. Al respecto, se piensa que la glía de Müller se comporta como la glía radial en las primeras fases del desarrollo, actuando de guía en la migración de neuroblastos desde la zona externa hacia el vítreo, y es la responsable de las señales que dirigen la migración y diferenciación (Meller & Tetzlaff, 1976; Bauch et al., 1998; Willbord & Layer, 1998; Peterson et al., 2001).

Sin embargo, parece que los neuroblastos que originan las células ganglionares no requieren de la glía radial de Müller para migrar, sino de una interacción local con moléculas de la matriz extracelular. Así, cuando las células ganglionares neuroblásticas terminan su última mitosis, se separan de la superficie externa de la retina, extendiendo un proceso hacia cada lado de la misma, de manera que cuando comienzan a migrar, mantienen el contacto en ambas direcciones. Finalmente, se desprende el proceso externo y el axón crece en la zona vitreal (Nishimura et al., 1979; Watanabe & Raff, 1992).

Las capas plexiformes de la retina madura resultan del crecimiento de las neuritas y ramificaciones dendríticas de las células retinales, conservando la estructura columnar del desarrollo (Meller & Tetzlaff, 1976; Mey & Thanos, 2000). Las prolongaciones de las células amacrinas y bipolares dan lugar a la capa plexiforme interna, mientras que las prolongaciones de las células horizontales, bipolares y fotorreceptores forman la capa plexiforme externa (Fig. 2 C). Las primeras sinapsis se observan en la capa plexiforme interna (Hughes & LaVelle, 1974; Hering & Kröger, 1996) y posteriormente entre las células bipolares y fotorreceptores de la capa plexiforme externa.



**Fig. 2.-** Desarrollo de la retina humana. A, B) Separación de los estratos neuroblásticos (esquema tomado del Gilbert, 2000). C) Ilustración de la retina diferenciada (tomada de Gartner & Hiatt, 2002).

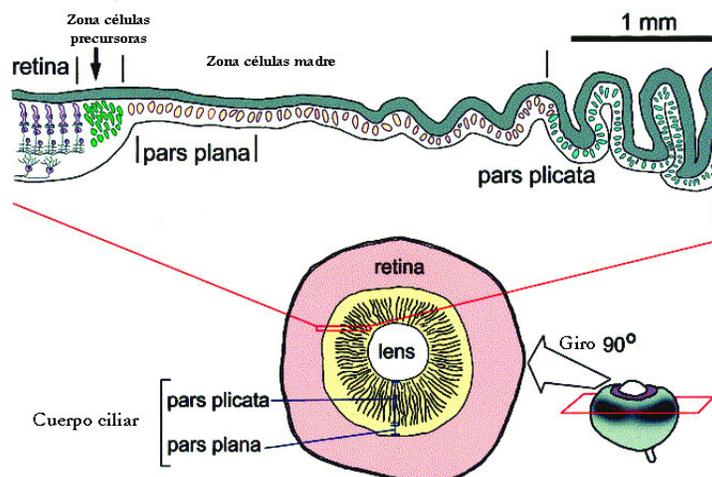
4.2.2. Crecimiento de la retina: Zona marginal ciliar o germinal circunferencial.

En estadios avanzados del desarrollo embrionario, la mayor parte de las divisiones celulares en la retina de vertebrados quedan confinadas a la zona periférica de la misma, próxima a la *ora serrata* (Kahn, 1973, 1974; Johns, 1977; Dütting et al., 1983; Otteson et al., 2001; Otteson & Hitchcock, 2003). En peces y anfibios, el extremo marginal de la retina conserva células proliferativas, en la denominada **zona marginal ciliar** o **germinal circunferencial** (Fig. 3), con capacidad para añadir neuronas a la retina durante toda la vida (Raymond & Hitchcock, 1997, 2000; Reh & Levine, 1998; Perron & Harris, 2000). En pollo se añaden nuevas células a partir del margen periférico al menos durante tres semanas después de la eclosión (Fischer & Reh, 2000). Sin embargo, la multipotencialidad observada en anfibios y peces parece restringida en el pollo (Perron & Harris, 2000; Reh & Fischer, 2001). Además, en pollo sólo se generan en esta zona las células amacrinas y bipolares, mientras que en peces y anfibios se añaden todos los tipos celulares de la retina (Fischer & Reh, 2000). En relación a reptiles, esta zona comienza a estudiarse en *G. galloti*, observándose que después de la transección completa del nervio óptico las células de la zona marginal son BrdU<sup>+</sup>/PCNA<sup>-</sup>, es decir no proliferan (Lang et al., 2002). Tampoco en mamíferos existen evidencias de la presencia de una zona marginal proliferativa en ejemplares adultos. El crecimiento postnatal del ojo en aves y mamíferos, no se debe a la adición de nuevas células desde el margen periférico a la región central, como sucede en peces y anfibios, sino a un alargamiento de la retina asociada al crecimiento de la órbita, lo que permite incrementar el espacio extracelular (Teakle et al., 1993).

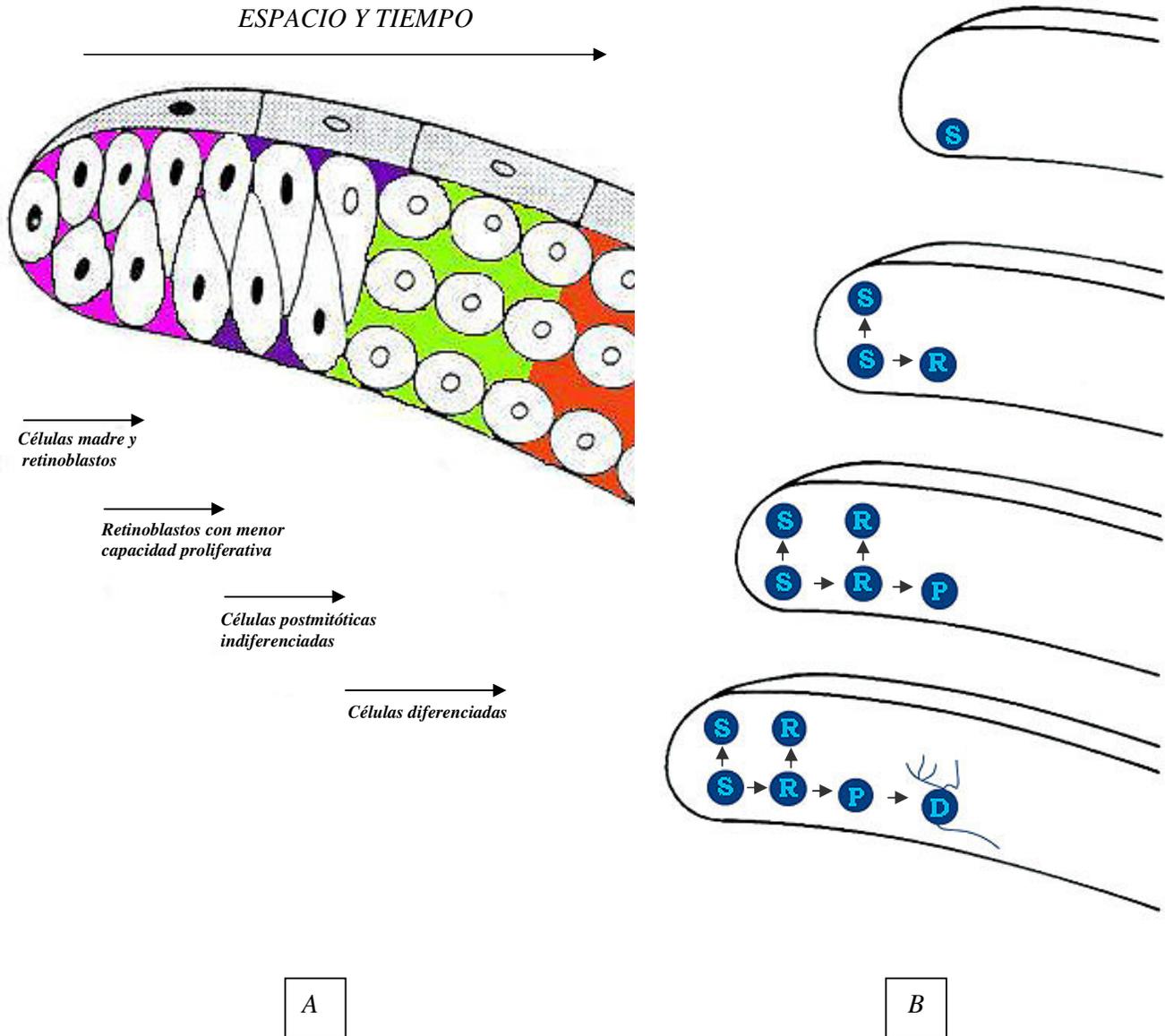
Harris & Perron (1998), sugieren que en esta zona marginal ciliar de peces, existe una secuencia en el desarrollo que atiende a un orden en la expresión de determinados genes, y proponen un desarrollo en cascada planteando una subdivisión de esta zona en cuatro partes, donde cada zona da lugar a la siguiente (Fig. 4 A). La zona más periférica contiene células madre, que se dividen y originan otras células madre y retinoblastos. Éstos producen retinoblastos con propiedades proliferativas más limitadas y estos últimos, a su vez, a células postmitóticas indiferenciadas que darán lugar finalmente a las células diferenciadas de la retina (Fig. 4 B) (Harris & Perron, 1998; Ohnuma et al., 2002).

Adyacente a la zona marginal ciliar, se encuentra el cuerpo ciliar, que procede también de la copa óptica y está formado por dos capas: la externa pigmentada, o cuerpo ciliar pigmentado, que se continúa con el epitelio pigmentario de la retina, y la interna no pigmentada, que se continúa con la retina neural. A su vez, el cuerpo ciliar se subdivide en dos regiones: la *pars plana*, contigua a la zona marginal de la retina, y la *pars plicata* entre la *pars plana* y el cristalino (Fig. 3). Estudios realizados en ejemplares postnatales de peces, anfibios y aves ponen de manifiesto que, en la *pars plana* del cuerpo ciliar, existe una población de células que expresan genes comunes a las células progenitoras de la retina (Fischer & Reh, 2000) (Fig. 3). Además, en mamíferos adultos, las células del cuerpo ciliar pigmentado (continuación del epitelio pigmentario de la retina) pueden generar *in vitro* células neuronales (Ahmad et al., 2000; Tropepe et al., 2000), lo que sugiere que esta zona en mamíferos podría ser análoga a la zona marginal ciliar de peces, anfibios y aves (Ahmad et al., 2000).

Así mismo, en determinados grupos de vertebrados existen mecanismos para la regeneración de la retina adulta. Así, en peces y anfibios, son las células madre de la zona marginal ciliar las responsables del crecimiento de la retina durante el desarrollo (Johns, 1977; Meyer, 1978), que también incrementan su producción en respuesta a lesiones retinales (Reh & Tully, 1986; Reh, 1987).



**Fig. 3.-** Ilustración de la retina marginal y el cuerpo ciliar de pollo. Se observa la retina neural, zona de células precursoras en el margen periférico de la retina y la zona de las células madre en el epitelio no pigmentado del cuerpo ciliar. Esquema modificado de Fischer & Reh (2003a).



**Fig. 4.-** Modelo de desarrollo celular en la zona marginal de la retina. A) Las células madre se localizan en la parte más periférica de la retina y más centralmente las células diferenciadas son añadidas a la retina central. B) Desarrollo celular, desde una célula madre (S), que da lugar a otra célula madre y a un retinoblasto (R), que más tarde originará una célula postmitótica indiferenciada (P) que dará lugar finalmente a una célula diferenciada (D). Esquemas modificados a partir del trabajo de Harris & Perron (1998).

Sin embargo, en algunos anfibios, la regeneración de la retina la realizan las células del epitelio pigmentario, como células muy especializadas capaces de desdiferenciarse, perder el pigmento, dividirse y dar lugar a nuevas neuronas (Stone, 1950; Stroeve & Mitashov, 1983; Reh & Nagy, 1987; Reh & Levine, 1998). Este proceso se ha denominado “transdiferenciación” o “metaplasia” (Okada, 1980). Por el contrario, estudios realizados por Knight & Raymond (1995) en peces, y por Fischer & Reh (2001b) en pollo, demuestran que el epitelio pigmentario es incapaz de transdiferenciarse, aunque no excluyen la posibilidad de que ocurra en condiciones más extremas, como se ha observado en otras especies (Park & Hollenberg, 1989, 1991).

Finalmente, las células de Müller también parecen intervenir en la regeneración de las células de la retina (Fischer & Reh, 2001a; Yurco & Cameron, 2005), ya que pueden desdiferenciarse y dar lugar a todos los tipos celulares retinales (Fischer & Reh, 2003b). Los estudios de la glía de Müller en relación al desarrollo y la regeneración de la retina en reptiles aún no se han realizado.

#### *4.3. FORMACIÓN DEL CONUS PAPILLARIS*

El origen del conus papillaris no se conoce por el momento, pero sí cómo se origina la estructura homóloga presente en aves, el pecten oculi. Se trata de una estructura vascular constituida fundamentalmente por vasos, células pigmentarias y células gliales. Las células pigmentarias del pecten oculi se forman a partir de células neuroepiteliales proliferativas (células de la capa pigmentaria de la retina) localizadas en el margen vitreal del tallo óptico. Debido a su origen, estas células pigmentarias son definidas como células gliales (Yew; 1978; Uehara et al., 1990; Liebner et al., 1997). Sin embargo, las células endoteliales, y las estructuras relacionadas con la vascularización en este órgano tienen un origen mesodérmico (Mann, 1924; Yew, 1978).

#### *4.4. FORMACIÓN DEL NERVIO ÓPTICO*

En las primeras fases del desarrollo, el tallo óptico o pedúnculo es una estructura transitoria que sirve de sustrato para que los primeros axones de las células ganglionares se extiendan desde la retina hasta el diencéfalo. El nervio óptico está formado

básicamente por fibras nerviosas, provenientes de los axones de las células ganglionares retinales, células gliales (macroglía y microglía), vasos sanguíneos y tejido conectivo.

#### **4.4.1. Crecimiento de los axones de las células ganglionares**

Los primeros axones que invaden el tallo óptico se originan de las primeras células ganglionares diferenciadas, localizadas en las zonas más cercanas a la cabeza del nervio óptico, y posteriormente se añaden los axones de las células ganglionares de regiones más periféricas de la retina (Oster et al., 2004). Los primeros axones surgen del polo ventro-nasal en peces (Laessing & Stuermer, 1996), del dorso-temporal en anfibios y mamíferos (Grant & Rubin, 1980a, b) y del polo dorsal en aves (Halfter et al., 1985).

El cono de crecimiento axónico es una estructura especializada que explora y responde a las moléculas del medio extracelular mediante sus receptores (Oster & Sretavan, 2003). Esta unión origina cambios en los componentes del citoesqueleto, que controla la movilidad y el crecimiento axonal, produciendo un avance o una retracción del mismo en función del tipo de molécula extracelular con la que interactúe (Suter & Forscher, 1998, 2000; Song & Poo, 1999; Oster et al., 2004). Algunas de estas moléculas de atracción presentes en la matriz extracelular son la laminina, la fibronectina, y la netrina-1. Esta última es expresada por células gliales de la cabeza del nervio óptico y juega un importante papel en la salida de los axones desde la retina hacia el nervio óptico en peces (Strähle et al., 1997; Lauderdale et al., 1997), anfibios (de la Torre et al., 1997) y mamíferos (Deiner et al., 1997). En cuanto a moléculas inhibitorias, se ha descrito la Sema5A expresada específicamente en el disco óptico de mamíferos (Oster et al., 2003) y el condroitín sulfato que inhibe el crecimiento axonal erróneo *in vitro* (Brittis et al., 1992; Snow & Letourneau, 1992). Recientemente, se han descubierto las efrinas y sus receptores como la mayor clase de moléculas de guía repulsivas dependientes de contacto (Drescher et al., 1995), que favorecen, en determinadas condiciones, la adhesión celular (Martínez et al., 2004). Por otro lado, tienen un papel clave en la formación de mapas topográficos mediante su expresión en gradientes, de manera que las efrinas de clase A y B parecen estar implicadas en la formación de numerosos mapas topográficos del sistema visual (Cheng et al., 1995; Drescher et al., 1995; Feldheim et al., 1998; Thanos & Mey, 2001). Además, se ha descrito la proteína Sonic hedgehog (SHH), potente morfógeno relacionado con la formación del patrón dorso-ventral del tubo neural como reguladora de la formación de

la vesícula óptica y, sin embargo, supresora del crecimiento axonal, de manera que si se sobreexpresa en el quiasma óptico se detiene el crecimiento de los axones (Trousse et al., 2001).

#### 4.4.2. Origen y formación de las células macrogliales

La aparición de células proliferativas en la pared ventral del tallo óptico coincide con la invasión de axones en dicha área (Navascués et al., 1985). Estas células proliferativas dan lugar a los glioblastos indiferenciados, que extienden radialmente sus procesos hacia las zonas más periféricas, contribuyendo así a la orientación de los axones en crecimiento (Navascués et al., 1987).

Durante este periodo degenera gran número de células neuroepiteliales localizadas en la zona central, mayor en los extremos rostral y caudal del nervio. Se cree que esta bionecrosis elimina células sobrantes y facilita una vía de menor resistencia para la posterior entrada y crecimiento de los axones (Navascués et al., 1985; Horsburgh & Sefton, 1986). Las células epiteliales que no degeneran comienzan a proliferar con la llegada de las fibras nerviosas para dar lugar a nuevos glioblastos indiferenciados (Navascués et al., 1985). Muchos autores aceptan que las células gliales se originan a partir de estas células neuroepiteliales, aunque algunos estudios demuestran que las células gliales maduras no provienen, en su totalidad, del neuroepitelio del pedúnculo (Small et al., 1987).

A este respecto, los astrocitos tipo-1 son generados por Células Precursoras de Astrocitos (APCs), originadas a partir de las células neuroepiteliales del tallo óptico (Raff et al., 1984; Miller et al., 1985, 1989; Mi & Barres, 1999), las cuales son Ran-2<sup>+</sup>, como los astrocitos tipo-1 (Raff et al., 1984). Sin embargo, los oligodendrocitos y los astrocitos tipo-2 se desarrollan a partir de un progenitor común bipotencial, denominado O-2A (Raff et al., 1983a). Estudios realizados en rata, evidencian que el progenitor O-2A no se desarrolla a partir de las células neuroepiteliales, sino que prolifera en las zonas ventricular y subventricular del diencéfalo desde donde migran al nervio óptico (Small et al., 1987), y son células A2B5<sup>+</sup>, O4<sup>+</sup> y vimentina<sup>+</sup> en estadios perinatales. Durante la migración, estos precursores gliales interactúan con moléculas como la Netrina-1 y la Sema3A, presentes en el quiasma óptico, que los guían hacia el nervio (Spassky et al., 2002), aunque no todos los precursores reaccionan de igual forma ante

estas moléculas, hecho que indica la naturaleza heterogénea de los mismos (Sugimoto et al., 2001).

Estudios realizados en rata determinan que la mayoría de los astrocitos del nervio son generados durante el período prenatal y la primera semana postnatal, antes de la formación de los oligodendrocitos (Vaughn, 1969; Skoff et al., 1976; Skoff, 1990). Las células APCs inducen el desarrollo de las células endoteliales en el nervio y luego éstas promueven la diferenciación de las APCs en astrocitos maduros (Mi & Barres, 1999; Mi et al., 2001). Estudios *in vitro* demuestran que los astrocitos tipo-1 podrían jugar un papel importante en la expansión y diferenciación de los oligodendrocitos durante el desarrollo del nervio (Noble & Murray, 1984). Aunque se ha considerado a los astrocitos como el recurso más importante de factores de crecimiento que influyen en el desarrollo de los oligodendrocitos (Barres & Raff, 1994), este proceso también está regulado por los axones de las células ganglionares (Barres & Raff, 1993, 1994) y por factores que secretan las propias células precursoras (Levi et al., 1991).

Estudios recientes sobre la gliogénesis en el SNC han identificado al menos siete tipos diferentes de precursores gliales, hecho que revela su gran heterogeneidad (Trotter & Schachner, 1989; Grinspan et al., 1990; Rao & Mayer-Pröschel, 1997; Seidman et al., 1997; Zhang et al., 1998; Mi & Barres, 1999).

Recientemente se han identificado células precursoras tripotenciales, precursores gliales restringidos (GRP), marcados con la proteína A2B5 (Rao & Mayer-Pröschel, 1997), los cuales dan lugar *in vitro* a oligodendrocitos y a dos tipos de astrocitos con diferente antigenicidad (astrocitos tipo I y II) (Rao et al., 1998; Gregori et al., 2002). Las células GRP difieren de las O-2A/OPCs en varios aspectos, entre ellos que responden ante diferentes factores de crecimiento y de diferenciación (Noble et al., 2004). Sin embargo, trabajos *in vitro* han demostrado que las GRP pueden dar lugar a O-2A/OPCs, si éstas se exponen a determinadas moléculas (Gregori et al., 2002).

## **5. JUSTIFICACIÓN**

Los reptiles constituyen un modelo de estudio interesante ya que se encuentran a mitad de la escala zoológica y comparten características de vertebrados mamíferos y no mamíferos.

El cerebro de los reptiles presenta una parte anterior (telencéfalo y diencefalo) muy similar morfológica y molecularmente a peces y anfibios, y otra posterior (tronco encefálico y médula) comparable con aves y mamíferos, hecho que permite estudiar características de los diferentes grupos de vertebrados en un mismo animal. El desarrollo visual de reptiles es simpliomórfico en relación al de peces y anfibios (comparten caracteres primitivos), y la capacidad regenerativa de los axones de las células ganglionares demostrada en *G. galloti* es una prueba de ello (Lang et al., 1998). Sin embargo, también es apomórfico con el de aves y mamíferos (comparten caracteres derivados), como demuestra el hecho de que el desarrollo de las proyecciones visuales de reptiles se asemeje al de mamíferos y aves (Dunlop et al., 2002).

El conocimiento de las moléculas implicadas en el desarrollo y en la guía axonal de las células ganglionares retinales (CGRs), presenta un interés especial en relación a la extrapolación de los resultados obtenidos en desarrollo a los estudios de regeneración en ésta y otras especies de vertebrados.

Hemos demostrado que en reptiles existen al menos dos tipos de regeneración en el SNC, en telencéfalo y en la vía óptica. En este último, los axones de las CGRs colonizan el techo óptico después de lesiones completas del nervio óptico, hecho que no ocurre en mamíferos. En este sentido, los resultados del presente estudio desvelarían la distribución, características y posibles funciones de las células gliales en la vía óptica, datos que ayudarían a comprender esta regeneración peculiar en reptiles.

Además, en este segundo modelo, las CGRs son capaces de atravesar la zona de la lesión a pesar de la gliosis reactiva y de la presencia de inhibidores del crecimiento neurítico. Durante este proceso no hay proliferación ni muerte de las CGRs y existen moléculas Bcl2 protectoras de muerte, hecho que demuestra que se trata de una regeneración neuronal verdadera (Lang et al., 1998, 2002). El trabajo que se presenta en

esta Tesis sobre células gliales y marcadores de proliferación celular permite ampliar los conocimientos y resolver muchas cuestiones planteadas en el modelo experimental lesionado.

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 los diferentes vertebrados.

## **6. OBJETIVOS**

Como objetivo general se pretende conocer la distribución y tipología de las distintas células gliales en determinadas áreas de la vía óptica (retina, nervio, quiasma y tracto óptico), con objeto de analizar la proliferación y diferenciación de estas poblaciones durante la ontogenia del reptil *G. galloti*.

Como objetivos específicos nos planteamos:

- Estudiar las células gliales S100 durante la ontogenia del lagarto, lo que nos permitirá establecer un modelo de identificación de estos tipos celulares y así comprender el papel funcional de esta proteína.
- Estudiar la distribución y características de la población astrogliar con las proteínas vimentina y GFAP durante la ontogenia, con objeto de entender y extrapolar los resultados al proceso de regeneración en el lagarto y su relación con otras especies.
- Analizar la población glial S100/GFAP y S100/GS para identificar las subpoblaciones celulares astrogliales y oligodendrogliales en relación a la homogeneidad o heterogeneidad en la vía óptica del lagarto y comparar con otras especies.
- Analizar el origen, la proliferación y las vías de migración de las células gliales GFAP/PCNA y S100/PCNA, para conocer sus precursores y comparar con otros vertebrados.

- Correlacionar los resultados de desarrollo obtenidos en este trabajo con: 1) los estudios de regeneración de la vía óptica de reptiles sobre lesiones agudas (retina y nervio óptico), y 2) con estudios de regeneración realizados en otros vertebrados.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

Con objeto de identificar las células gliales presentes en la vía óptica del reptil *Gallotia galloti* durante el desarrollo, se llevaron a cabo técnicas inmunohistoquímicas utilizando como marcadores los anticuerpos contra las proteínas S-100, GFAP (proteína gliofibilar ácida), vimentina y GS (glutamina sintetasa). Además, se estudió la población celular en proliferación utilizando la proteína anti-PCNA (antígeno nuclear de proliferación celular), y se identificaron los tipos de células gliales con PCNA mediante el uso de S-100 y GFAP.

### **1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN: Origen y clasificación.**

Se ha utilizado un total de 50 ejemplares adultos, 35 postnatales y 93 embriones de la especie *Gallotia galloti eisentrauti* Bischoff 1982 (Familia Lacertidae, Orden Squamata), reptil endémico de Tenerife.

Los embriones se obtuvieron a partir de huevos, que fueron extraídos de su medio natural bajo tierra, durante los meses de julio a septiembre. La mayor parte de los ejemplares postnatales nacieron en el laboratorio a partir de los huevos recolectados y otros fueron capturados en su hábitat natural. Los ejemplares adultos y los postnatales fueron mantenidos en terrarios acondicionados que disponían de una fuente de luz y calor conectada a un temporizador. El alimento se basaba fundamentalmente en fruta natural, compota y granulado para gato.

En cuanto al reconocimiento de los distintos estadios embrionarios, se utilizó la nomenclatura establecida por Dufaure & Hubert (1961) en *Lacerta vivípara* y por Ramos-Steffens (1980) en *Gallotia galloti*. Así mismo, hemos considerado como ejemplares adultos aquellos con capacidad reproductora manifiesta, cuyas hembras gestantes presentan una longitud cabeza-cloaca mínima de 6,5 cm y los machos con características sexuales definidas con tallas iguales o superiores a 7 cm (Castanet & Báez, 1988).

## **2. PROCESAMIENTO DE LOS ANIMALES PARA LAS TÉCNICAS DE INMUNOHISTOQUÍMICA.**

### ***2.1. FIJACIÓN***

La fijación y postfijación de los cerebros se realizó con Bouin, utilizando 75 ml de ácido pícrico (1,4%), 25 ml de formaldehído (37-40%) y 5 ml de ácido acético glacial.

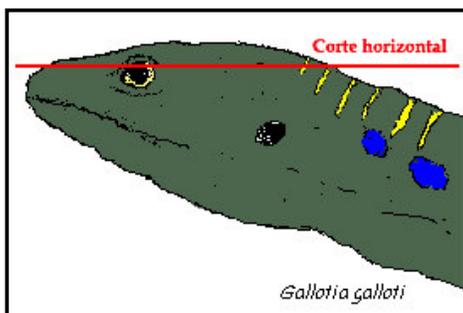
Los embriones y postnatales fueron decapitados y sus cerebros fijados por inmersión en Bouin durante 48 horas a temperatura ambiente. Los ejemplares adultos fueron anestesiados con éter dietílico, perfundidos vía ventrículo cardíaco y decapitados. Posteriormente se extrajeron los cerebros mediante el levantamiento de huesos craneales y se postfijaron durante 48 horas.

### ***2.2. DESHIDRATACIÓN, INCLUSIÓN Y OBTENCIÓN DE LAS SECCIONES.***

Los cerebros siguieron un proceso de deshidratación a temperatura ambiente usando concentraciones crecientes de etanol. Posteriormente se incluyeron en parafina. Los pasos fueron los siguientes:

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

Se obtuvieron cortes consecutivos seriados de 10 micras de grosor en microtomo de parafina (modelo *R. Jung*), realizándose el montaje en paralelo (Fig. 5).



**Fig. 5.-** Ilustración que muestra el plano de corte.

### **2.3. DESPARAFINADO E HIDRATACIÓN**

Las secciones se sometieron al siguiente proceso de hidratación antes de comenzar con el protocolo de los distintos anticuerpos:

1. Cuatro baños de xilol de 10 minutos cada uno.
2. Dos baños con etanol absoluto de 10 minutos cada uno.
3. Dos baños con etanol 96% de 10 minutos cada uno.
4. Tres lavados con etanol 70% de 10 minutos cada uno.

Posteriormente, se realizaron lavados con tampón trizma base salino (TRIS) 0,05M pH 7,2. Para preparar un litro de tampón fueron necesarios 18,171gr de trizma base, 21,77 gr de NaCl y 1 litro de agua destilada. Finalmente y una vez ajustado el pH a 7,2 se añadieron 100µl de azida de sodio a la disolución.

## **3. TINCIONES INMUNOHISTOQUÍMICAS**

### **3.1. MARCAJE DE CÉLULAS GLIALES**

Las células gliales en el nervio óptico y la retina se inmunotñieron con la proteína S-100, marcador de astrocitos y oligodendrocitos en el lagarto. También las células astrocitarias y las células de Müller se marcaron con la proteína GFAP. Además, se realizaron dobles marcajes S-100/GFAP y S-100/GS, para caracterizar las distintas poblaciones gliales.

#### **3.1.1. Marcajes simples: anti- S100, anti-vimentina y anti-GFAP**

##### **3.1.1.1. Marcaje anti-S100**

Tras hidratar las secciones, se procedió a realizar la tinción según el siguiente protocolo:

1. **Inhibición de la peroxidasa endógena** de las secciones mediante la inmersión en agua oxigenada al 3% en TRIS, durante 10 minutos a temperatura ambiente.

2. Tres lavados con TRIS de 10 minutos cada uno.
3. Inhibición de las posibles uniones inespecíficas con preincubación de las secciones en una solución de sero-albúmina bovina (BSA) al 1% en TRIS durante 24 horas.
4. **Incubación con el primer anticuerpo policlonal anti-S100** (rabbit anti-cow, de DAKO), dilución a 1/800 en una solución de BSA al 1%, durante 3 días a 4°C.
5. Tres lavados en TRIS, durante 10 minutos cada uno.
6. **Incubación con el segundo anticuerpo biotinilado** (Goat anti-rabbit IgG biotinilado, de Vector), dilución a 1/200 en TRIS, durante una hora a temperatura ambiente.
7. Tres lavados en TRIS, durante 10 minutos cada uno.
8. **Incubación con el complejo Avidina-peroxidasa** (ABC<sub>standard</sub> KIT, de Vector), preparado 30 minutos antes según el siguiente procedimiento:
  - Disolución de 4,5 µl de la solución A en 1 ml de TRIS con 1% de Triton X-100.
  - Disolución de 4,5 µl de la solución B en A, manteniéndola en la oscuridad y a 4°C.
9. **Revelado del marcador** mediante una disolución de Diaminobencidina (DAB) al 0,025% en tampón TRIS y añadiendo posteriormente 8 µl de agua oxigenada. Las secciones se incubaron en esta disolución durante 5-10 minutos.
10. Tres lavados en TRIS, durante 10 minutos cada uno.
11. Deshidratación de las secciones con etanol a concentraciones crecientes, se aclararon con xilol y se montaron en Eukitt.

### *3.1.1.2. Marcaje anti-vimentina*

Tras hidratar las secciones, se siguieron los siguientes pasos:

1. Preincubación con glicina (0,75%) y BSA (1%) en TRIS, durante 24 horas a 4°C.
2. Tres lavados de 10 minutos cada uno en TRIS.

3. Tres baños de 10 minutos cada uno en una disolución de leche desnatada al 0,5% y TRIS.
4. Un baño de 10 minutos en triton X-100 al 0,5% y TRIS.
5. Tres lavados de 10 minutos cada uno en TRIS.
6. **Incubación con el primer anticuerpo monoclonal anti-vimentina (H5, DSHB)** diluido 1/20 en BSA al 1% y 0,2% de triton X-100 durante 24 horas en cámara húmeda a temperatura ambiente.
7. Tres lavados de 10 minutos cada uno en TRIS.
8. **Incubación con el segundo anticuerpo, goat antimouse IgG (DAKO)**, diluido 1/500 durante 1 hora a temperatura ambiente.
9. Tres lavados de 10 minutos cada uno en TRIS.
10. **Complejo PAP (DAKO)** diluido 1/100 durante 1 hora, a temperatura ambiente.
11. Tres lavados de 10 minutos cada uno en TRIS.
12. **Revelado del marcador** mediante una disolución de Diaminobencidina (DAB) al 0,025% en tampón TRIS y añadiendo posteriormente 8µl de agua oxigenada. Las secciones se incubaron en esta disolución durante 5-10 minutos.
13. Tres lavados en TRIS, durante 10 minutos cada uno.
14. Deshidratación de las secciones con etanol a concentraciones crecientes, aclaradas en xilol y montadas en Eukitt.

### *3.1.1.3. Marcaje anti-GFAP*

Después de hidratar las secciones, se siguieron los siguientes pasos:

1. Preincubación con glicina (0,75%) y BSA (1%) en TRIS, durante 24 horas a 4°C.
2. Tres lavados de 10 minutos cada uno en TRIS.
3. Tres baños de 10 minutos cada uno en una disolución de leche desnatada al 0,5% y TRIS.
4. Un baño de 10 minutos en triton X-100 al 0,5% y TRIS.
5. Tres lavados de 10 minutos cada uno en TRIS.

6. **Incubación con el primer anticuerpo monoclonal anti-GFAP** (Sigma), diluido 1/200 en BSA al 1% y 0,2% de triton durante 48 horas en cámara húmeda a temperatura ambiente.
7. Tres lavados de 10 minutos cada uno en TRIS.
8. **Incubación con el segundo anticuerpo, goat antimouse IgG (DAKO)**, diluido 1/30 durante 1 hora a temperatura ambiente.
9. Tres lavados de 10 minutos cada uno en TRIS.
10. **Complejo PAP (DAKO)** diluido 1/100 durante 1 hora, a temperatura ambiente.
11. Tres lavados de 10 minutos cada uno en TRIS.
12. **Revelado del marcador** mediante una disolución de Diaminobencidina (DAB) al 0,025% en tampón TRIS y añadiendo posteriormente 8µl de agua oxigenada. Las secciones se incubaron en esta disolución durante 5-10 minutos.
13. Tres lavados en TRIS, durante 10 minutos cada uno.
14. Deshidratación de las secciones con etanol a concentraciones crecientes, aclaradas con xilol y montadas con Eukitt.

### *3.1.2. Marcajes dobles: anti-S100/GFAP y anti-S100/GS*

#### *3.1.2.1. Marcaje anti-S100/GFAP*

Se utilizó la técnica de dobles marcajes con inmunofluorescencia indirecta para detectar simultáneamente la proteína S-100 y GFAP.

1. **Inhibición de las posibles uniones inespecíficas** con preincubación de las secciones en una solución de sero-albúmina bovina (BSA) al 1% en TRIS durante 24 horas.
2. Tres baños de diez minutos cada uno en una solución de triton al 0,2%, BSA al 1% y TRIS.
3. **Incubación del anticuerpo policlonal anti-S100**, diluido 1/200, y del **monoclonal anti-GFAP**, diluido 1/200, simultáneamente durante 2 días en cámara húmeda a 4°C.

4. Tres lavados de BSA al 1% en TRIS de 10 minutos cada uno.
5. **Incubación de los segundos anticuerpos** marcados con fluorocromos durante 1 hora y media, utilizando Texas Red anti-mouse, diluido 1/100, para la detección de anti-GFAP, y Alexa Fluor 488 anti-rabbit, en dilución 1/1000, para detectar anti-S100.
6. Tres lavados con TRIS de 10 minutos cada uno.
7. Las secciones fueron montadas con Mowiol, el cual se prepara siguiente manera:

<b>REACTIVOS</b>	<b>CANTIDAD</b>
PBS	10 ml
Mowiol	2,5 gr
Glicerol	5 ml
Thymerosal 2%	0,15 ml
n-propyl Gallate	1 mg/ml

La disolución de Mowiol y PBS se realizó durante 3 días; el glicerol y el thymerosal se disolvieron a 4°C durante 1 semana. Se centrifugó la mezcla a 4000 rpm durante 15 minutos, se conservó el sobrenadante a -20°C y se añadió para su uso, 1 mg/ml de n-propyl gallate.

#### *3.1.2.2. Marcaje anti-S100/GS*

Se utilizó la técnica de dobles marcajes con inmunofluorescencia indirecta para detectar simultáneamente la proteína S-100 y GS.

1. **Inhibición de las uniones inespecíficas** con preincubación de las secciones en una solución de BSA al 1% en TRIS durante 24 horas.

2. Tres baños de diez minutos cada uno en una solución de triton X-100 al 0,2%, BSA al 1% y TRIS.
3. **Incubación del anticuerpo policlonal anti-S100**, diluido 1/200, y **monoclonal anti-GS**, diluido 1/200, durante 2 días en cámara húmeda a 4°C.
4. Tres lavados de BSA al 1% en TRIS de 10 minutos cada uno.
5. **Incubación de los segundos anticuerpos** marcados con fluorocromos durante 1 hora y media, utilizando Texas Red anti-mouse, diluido 1/100, para la detección de anti-GS, y Alexa Fluor 488 anti-rabbit, en dilución 1/1000, para detectar anti-S100.
6. Tres lavados con TRIS de 10 minutos cada uno.
7. Las secciones fueron montadas con Mowiol.

### 3.2. MARCAJE DE CÉLULAS EN PROLIFERACIÓN

Para determinar el grado de proliferación celular se utilizó el *antígeno nuclear de proliferación celular* (PCNA) que marca las células en cualquier fase de la división celular, a diferencia de otras moléculas como la *bromodeoxiuridina* (BrdU) o la *timidina tritiada* (TH<sup>3</sup>), que sólo marcan las células que se encuentran en la fase S. Las secciones se procesaron según las técnicas de inmunoperoxidasa, método indirecto ABC (Complejo Avidina-Biotina).

#### 3.2.1. Marcaje simple anti-PCNA

Después de la hidratación y el lavado con tampón TRIS, las secciones se procesaron de la siguiente manera:

1. **Desenmascaramiento antigénico**, que fue realizado utilizando un baño termostático con agua en ebullición, dentro del cual se introdujo una cubeta con tampón citrato, donde se colocaron las secciones. Éstas se mantienen a unos 102°C durante diez minutos y luego se dejaron enfriar lentamente durante 20 minutos. Para preparar el tampón citrato se

mezclaron 2,94 grs de Tri-sodium Citrate (Merck) en 1 litro de agua destilada y se ajustó a pH 6.

2. **Inhibición de la peroxidasa endógena** de las secciones mediante la inmersión en agua oxigenada al 3% en TRIS, durante 10 minutos a temperatura ambiente.
3. Tres lavados con TRIS de 10 minutos cada uno.
4. Inhibición de las posibles uniones inespecíficas con preincubación de las secciones en una solución de sero-albúmina bovina (BSA) al 1% en TRIS durante 1 hora.
5. **Incubación con el anticuerpo monoclonal anti-PCNA** (Novocastra), diluido a 1/60 en BSA al 1% en TRIS, durante 24 horas 4°C.
6. Tres lavados con TRIS de 10 minutos cada uno.
7. **Incubación de las secciones en el segundo anticuerpo IgG antimouse biotinilado** (Vector), diluido 1/200 en TRIS, durante 1 hora.
8. Tres lavados con TRIS de 10 minutos cada uno.
9. Incubación con el conjugado Avidina-peroxidasa (Sigma) diluido 1/400 en TRIS, durante 1 hora.
10. Tres lavados con TRIS de 10 minutos cada uno.
11. **Revelado del marcador** mediante una disolución de Diaminobencidina (DAB) al 0,025% en tampón TRIS y añadiendo posteriormente 8µl de agua oxigenada. Las secciones se incubaron en esta disolución durante 5-10 minutos.
12. Tres lavados en TRIS, durante 10 minutos cada uno.
13. Deshidratación de las secciones con etanol a concentraciones crecientes, se aclararon en xilol y se montaron en Eukitt.

### 3.2.2. Marcajes dobles: anti-S-100/PCNA y anti- GFAP/PCNA

#### 3.2.2.1. *Marcaje anti-S-100/PCNA*

1. Se comenzó con el protocolo para el marcaje simple de PCNA, con la única diferencia de que en el momento del revelado se utilizó la

diaminobencidina-níquel (DAB-Ni), añadiendo níquel al 2%, que transforma el marcaje en color negro.

2. Tres lavados con TRIS de 10 minutos cada uno.
3. Se prosiguió con el protocolo descrito para el marcaje simple de la proteína S-100, utilizando en este caso únicamente DAB en el momento del revelado de la actividad peroxidasa, adquiriendo esta proteína el color marrón.

#### *3.2.2.2. Marcaje anti-GFAP/PCNA*

1. Se realizó en primer lugar un marcaje simple PCNA utilizando como cromógeno la DAB.
2. Tres lavados de 10 minutos cada uno en TRIS.
3. Se continuó con el protocolo para la GFAP simple, utilizando en el revelado 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.

#### *3.3. CONTROLES DE LOS MARCAJES anti-S100, anti-PCNA y anti-GFAP*

Se realizaron todos los controles necesarios para los marcadores anti-S100, anti-PCNA, anti-vimentina y anti-GFAP, tanto en técnicas de inmunoperoxidasa como en técnicas de inmunofluorescencia, hecho que garantiza la fiabilidad de los anticuerpos utilizados.

Para ello, en las **técnicas de inmunoperoxidasa** se descarta la actividad de la peroxidasa endógena y de marcaje inespecífico en general, al realizar los protocolos en ausencia de alguno de los anticuerpos, del complejo ABC o complejo PAP.

En el caso de las **técnicas de inmunofluorescencia** se realizó de la misma manera, procediendo a eliminar alguno de los anticuerpos.

#### **4. ESTUDIO DE LAS SECCIONES: MICROSCOPIA ÓPTICA.**

Todas las secciones procesadas con técnicas de inmunohistoquímica, tanto las reveladas con métodos de inmunoperoxidasa como las de inmunofluorescencia, fueron estudiadas con un microscopio óptico (modelo *Leitz Laborlux S*).

## **RESULTADOS**

## **1. RETINA Y NERVIO ÓPTICO EN *Gallotia galloti*.**

Con el objeto de facilitar el estudio descriptivo en la retina y el nervio óptico en la especie de estudio, estas estructuras se han subdividido en diferentes regiones.

En lo que respecta a la división de la **retina**, hay que destacar el polo dorso-ventral y el polo temporal-nasal. En este trabajo nos centramos principalmente en el estudio del polo temporal-nasal de la retina a nivel del nervio óptico. A su vez, atendiendo a la proliferación celular que existe durante el desarrollo, la retina queda dividida en dos zonas (*Esquema 1*):

1. **Retina Central (RC)**
2. **Retina Marginal (RM), en el extremo del globo ocular, limitando con la zona ciliar pigmentada.**

Además, esta estructura está formada por varias capas dispuestas paralelamente, que se encuentran a su vez compuestas por diferentes tipos celulares. Estas capas, desde la región más externa del ojo a la más interna, limitando con el **vítreo (Vi)**, son las siguientes:

- 1) ***Capa pigmentaria de la retina (CPR)***, formada por células epiteliales fuertemente pigmentadas.
- 2) ***Capa de fotorreceptores (CF)***, formada por los segmentos externos e internos de los fotorreceptores.
- 3) ***Membrana limitante externa (MLE)***, entre las prolongaciones externa e interna de los fotorreceptores. No es una verdadera membrana sino las prolongaciones de las células de Müller entre los intersticios que separan las membranas plasmáticas de los fotorreceptores.
- 4) ***Capa nuclear externa (CNE)***, formada por los somas de las células fotorreceptoras.
- 5) ***Capa plexiforme externa (CPE)***, región de conexión sináptica entre las células fotorreceptoras, bipolares y horizontales.
- 6) ***Capa nuclear interna (CNI)***, formada por los somas celulares de las células horizontales, amacrinas, bipolares y células de Müller.

- 7) *Capa plexiforme interna (CPI)*, región de conexión sináptica entre las células bipolares, amacrinas y las ganglionares.
- 8) *Capa ganglionar (CG)*, formada por los somas de las **células ganglionares retinales (CGRs)**.
- 9) *Capa del nervio (CN)*, formada por los axones de las células ganglionares.
- 10) *Membrana limitante interna (MLI)*, lámina basal formada por los pies de las células de Müller y marca la división entre la retina y el vítreo.

Durante la formación de las diferentes capas que forman la retina se van observando cambios en el grosor de las mismas y en el número de células que las forman, de manera que a medida que avanza el estadio del desarrollo y la retina crece en longitud, disminuye el número de células en las capas y se van haciendo más delgadas (*Esquema 2*).

Distinguimos la presencia de una estructura vascular denominada **conus papillaris (CP)**, con morfología cónica que se proyecta hacia el vítreo desde el nervio óptico.

En cuanto al **nervio óptico**, hemos realizado una división exhaustiva, atendiendo a las diferencias morfológicas y sobre todo citológicas que presenta de manera que, dentro de la zona intraocular y la zona extraocular, distinguimos diferentes regiones que se denominan de la siguiente manera (*Esquema 1*):

**1. Parte intraocular del nervio (PIN) o cabeza del nervio óptico (CNO):** Definimos esta zona como la región del nervio que se encuentra dentro del globo ocular, y a su vez la subdividimos en dos zonas en función de la presencia de un tipo específico de glía astrocitaria descrita por primera vez en la cabeza del nervio de pollo, denominada glía peripapillaris.

**1.1. Zona peripapillaris (ZP)** o región que limita con el conus papillaris.

**1.2. Zona distal al conus papillaris (ZDC)**, que limita con la región extraocular del nervio.

En la zona intraocular del nervio distinguimos la **zona limitante del nervio y la retina (ZLNR)** y la **zona de transición del nervio y la retina (ZTNR)**.

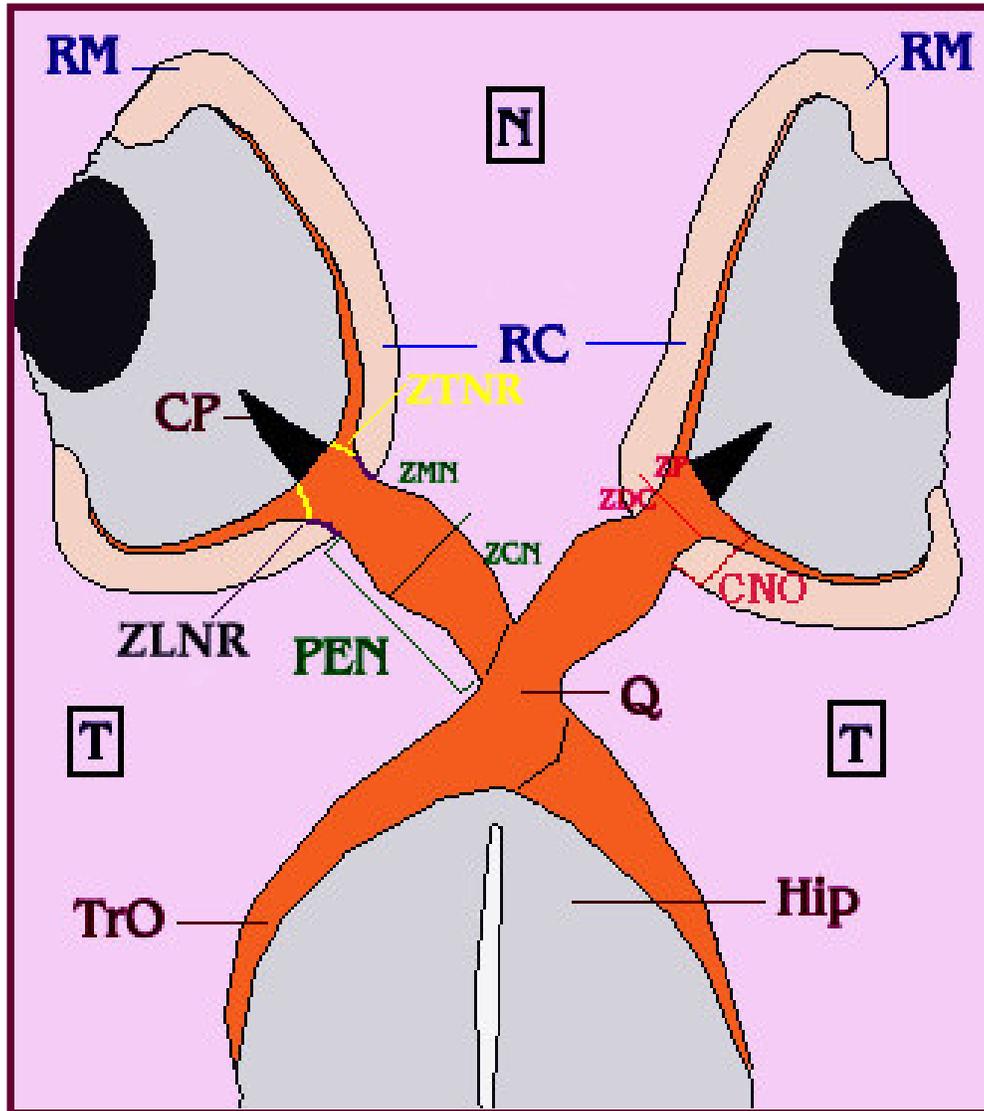
**2. Parte extraocular del nervio (PEN):** Región que limita en su parte más próxima a la retina con la ZDC y en la más alejada de ésta con el **quiasma óptico (Q)**. Esta región la hemos dividido en dos zonas basándonos en diferencias morfológicas de las células que la forman:

**2.1. Zona medial (ZMN),** o región más rostral del nervio, que se caracteriza por presentar células alargadas agrupadas en hileras.

**2.2. Zona caudal (ZCN),** en la cual se identifican células aisladas, con morfología redondeada, o también en algunos casos estrellada.

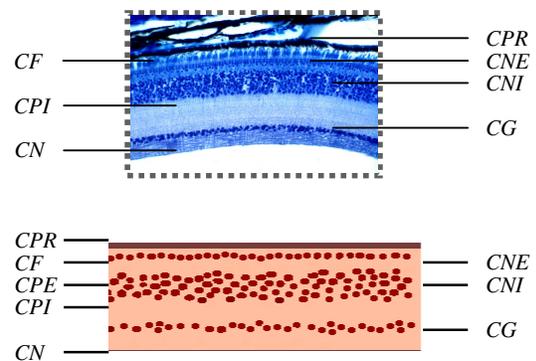
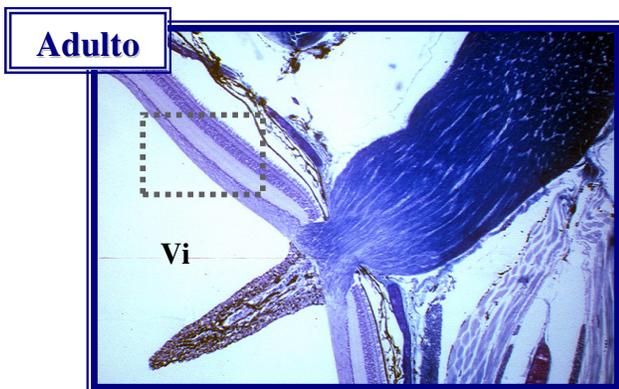
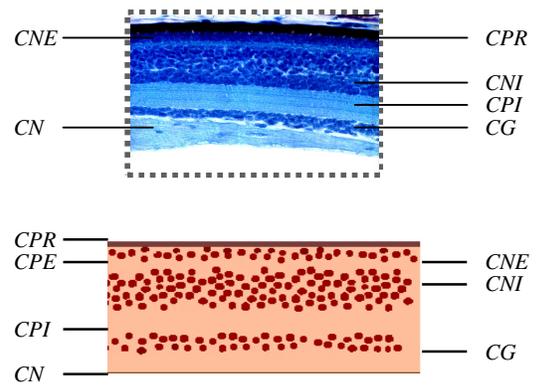
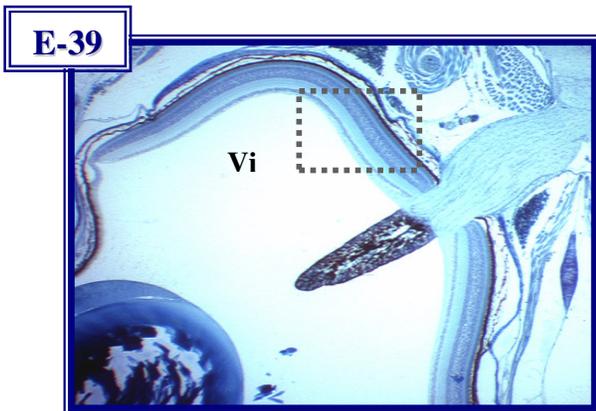
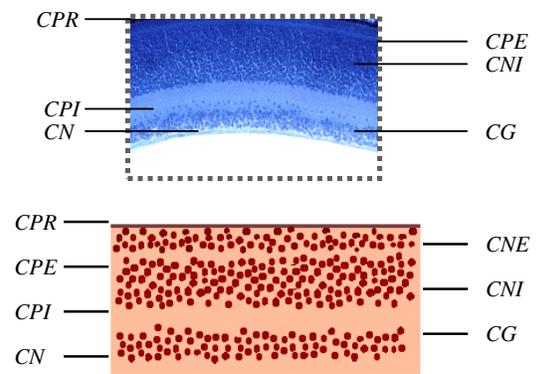
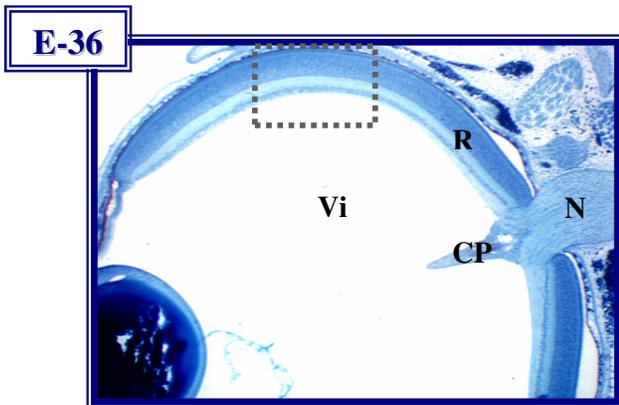
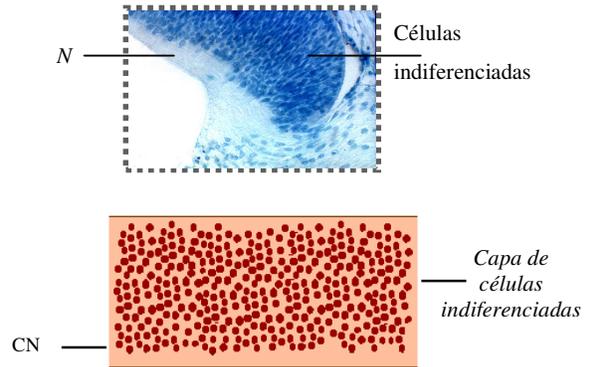
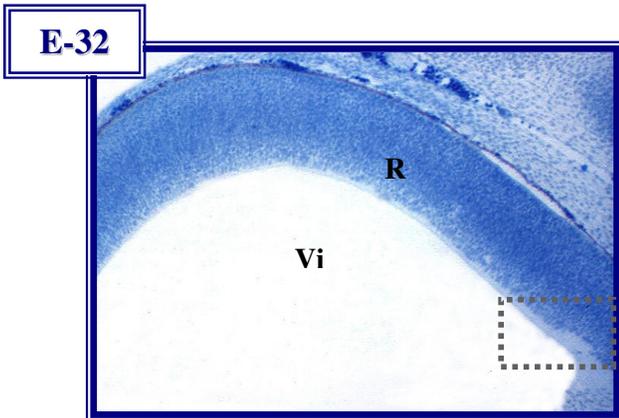
Además, se analiza también el marcaje en la región del **tracto óptico (TrO)** más próxima al quiasma, y **región hipotalámica (Hip)**, principalmente en la zona ventricular por ser un área directamente relacionada con células precursoras que migran hacia la retina.

Esquema 1



Obsérvense las distintas zonas del nervio óptico y la retina en un corte horizontal de un ejemplar adulto de *G. galloti*.

Esquema 2



## ***Esquema 2***

Obsérvense las diferentes capas que conforman la retina de *G. galloti* en diferentes estadios del desarrollo, y cómo las capas formadas por células se van haciendo más delgadas a medida que avanza el desarrollo.

### **2. CÉLULAS GLIALES. TÉCNICAS INMUNOHISTOQUÍMICAS**

#### ***2.1. INMUNOMARCAJE ANTI-S100***

La cantidad de células S-100 positivas y la intensidad del marcaje varía en función de la zona y el estadio del animal (Tabla 1). En general, la inmunorreactividad S-100 se observó en los cuerpos y pies de las células de Müller, en la base del conus papillaris, en el nervio y quiasma óptico (Fig. 6). El inmunomarcaje se observó en el citoplasma y el núcleo celular. A continuación, describiremos la inmunorreactividad a la proteína S-100 en las diferentes estructuras y estadios de la vía óptica e hipotálamo.

En la retina, en E-32, se observa una monocapa celular S-100<sup>-</sup>, diferenciándose únicamente la capa pigmentaria. Sin embargo, en el estadio E-35 ya se observan algunas de las capas que van a conformar la retina y se destaca el marcaje incipiente S-100<sup>+</sup> de los pies de las células de Müller, en la capa de nervio que limita con el vítreo.

A partir del estadio E-37 se incrementa el marcaje de los cuerpos de las células de Müller y de sus prolongaciones rodeando a las propias células ganglionares (Fig. 7A-B).

Desde eclosión hasta adulto se producen cambios en las capas de la retina, de manera que en ejemplares adultos la capa nuclear interna y la capa ganglionar son más delgadas, mientras que la capa de los axones de las células ganglionares aumenta de grosor (Fig. 7C). En ejemplares adultos, el marcaje en los somas y los pies de Müller se intensifica hacia la zona de la *ora serrata* (Fig. 7D).

En relación al nervio óptico, en el estadio E-32 presenta células indiferenciadas con forma redondeada en toda su longitud y se comienza a observar marcaje muy tenue en la zona caudal del nervio, así como en la zona ventricular del hipotálamo.

Las primeras células S-100 positivas aparecen en E-35 claramente marcadas a lo largo del nervio y del quiasma óptico, las cuales han adquirido la morfología típica de cada zona: células redondeadas aisladas o bien estrelladas en el quiasma y células redondeadas dispuestas en hileras en la ZMN y CNO (Fig. 9A).

En la mayor parte de las estructuras en E-36 no se aprecian diferencias significativas con respecto al estadio anterior, excepto que aumenta el número de células pigmentadas en el conus papillaris y comienzan a observarse células S-100<sup>+</sup> en la base del mismo (Fig. 8A-B). La expresión de esta proteína se incrementa en el nervio óptico y en el quiasma hasta E-39 (Figs. 8C-D, 9B), a partir del cual empieza a disminuir la cantidad de células inmunorreactivas.

En el nervio óptico (CNO y PEN) y en el quiasma óptico de ejemplares adultos, la disposición y la morfología de las células S-100<sup>+</sup> es diferente en relación al desarrollo. Así, se observa que se intensifica el marcaje y las células están más dispersas que en estadios embrionarios, adquiriendo una forma ovalada o piriforme (Figs. 8E-F, 9C). Por otra parte, se presenta inmunorreacción en la zona del tracto óptico, hecho que hasta el momento era prácticamente inexistente.

Durante el desarrollo, desde el estadio E-32 hasta E-39, se observan células S-100<sup>+</sup> tapizando el ventrículo hipotalámico (Fig. 10), disminuyendo posteriormente el marcaje hasta ejemplares postnatales y adultos, donde no se observa inmunotinción en esta zona.

A continuación se expone una tabla que presenta la inmunorreacción de la proteína S-100 observada en la retina, nervio óptico, quiasma, tracto óptico y ventrículo hipotalámico durante el desarrollo, observándose un incremento del marcaje en todas las áreas estudiadas, excepto en el ventrículo del hipotálamo, que presenta un marcaje máximo en E37/39, y luego disminuye progresivamente hasta prácticamente desaparecer en ejemplares adultos.

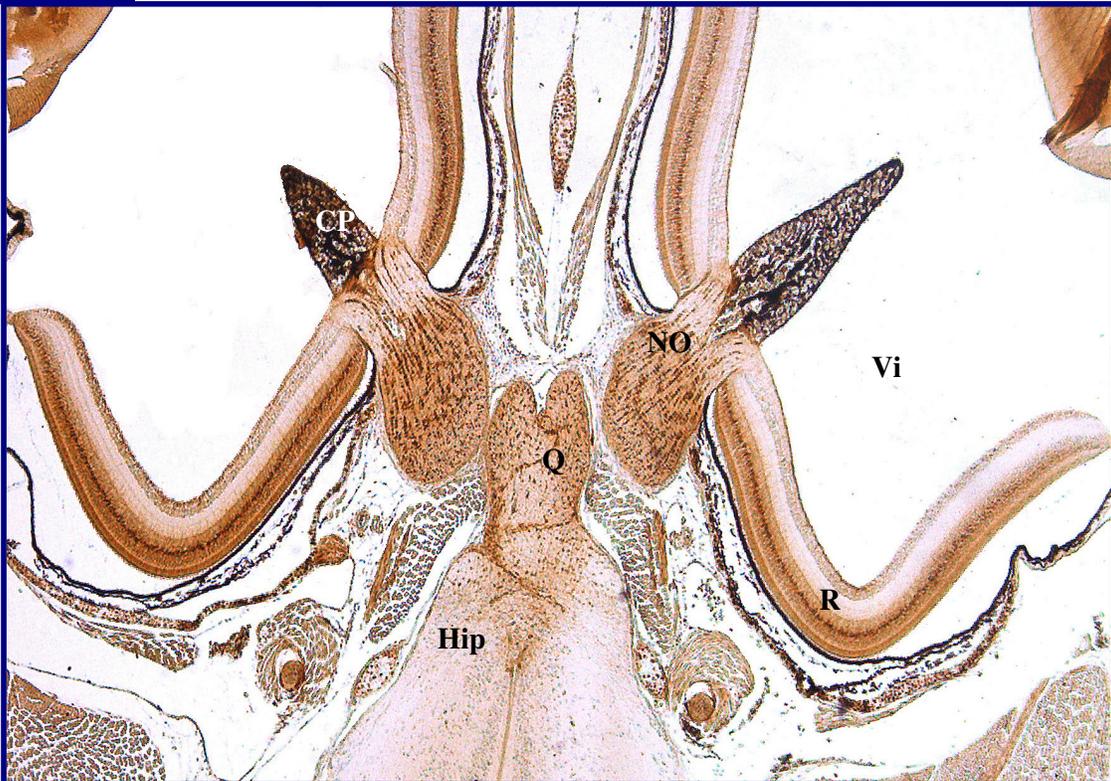
<i>ESTADÍO</i>	<i>HIP</i>	<i>TrO</i>	<i>Q</i>	<i>ZMN/ZCN</i>	<i>CNO</i>	<i>R (células de Müller)</i>
<b>E-32</b>	+	*	*	-	-	-
<b>E-35</b>	++	*	+++	+++	+	+
<b>E-37</b>	+++	-	+++	+++	++	+++
<b>E-39</b>	+++	-	+++	++++	+++	++++
<b>Eclosión</b>	++	-	+++	++++	+++	++++
<b>Adulto</b>	-	+++	+++	++++	++++	++++

**TABLA 1.-** Inmunorreactividad de la proteína S-100 en el hipotálamo y distintas áreas del sistema visual de *G. galloti*. Se observa que en la vía óptica la intensidad del marcaje aumenta conforme avanza el estadio del desarrollo, al contrario de lo que sucede en el ventrículo hipotalámico.

(\* ) No se observa aún esta estructura, (-) No existe marcaje, (+) marcaje débil, (++) marcaje medio, (++++) marcaje alto, (++++) marcaje muy alto.

**CNO:** cabeza del nervio óptico; **Hip:** hipotálamo; **Q:** quiasma; **R:** retina; **TrO:** tracto óptico; **ZCN:** zona caudal del nervio; **ZMN:** zona medial del nervio.

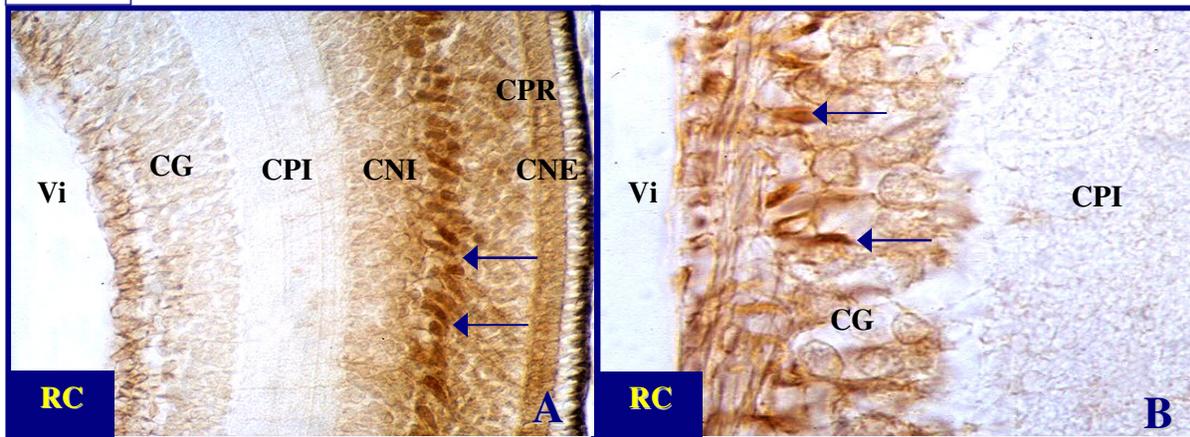
E-39



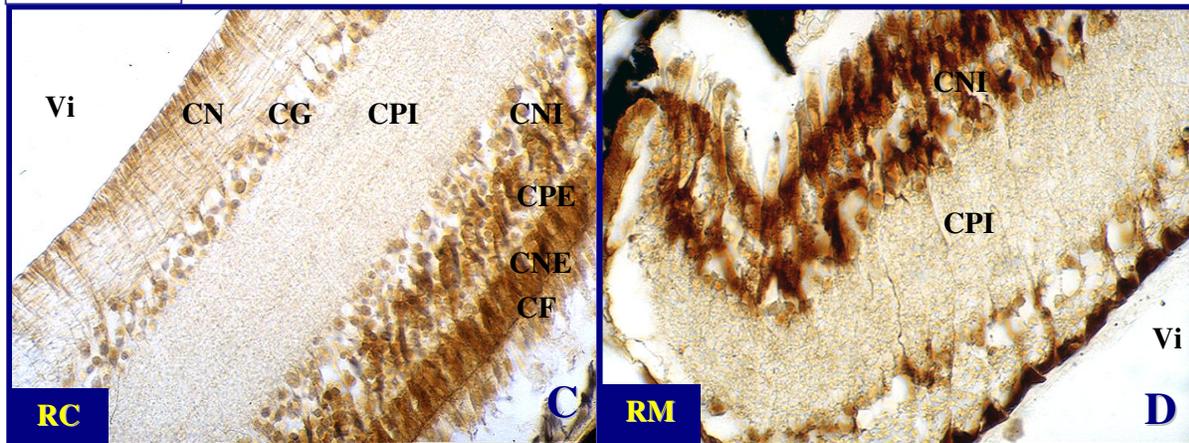
**Fig. 6.-** Inmunomarcaje de la proteína S-100 en la retina (**R**), nervio óptico (**NO**), quiasma (**Q**) e hipotálamo (**Hip**) en E-39. **CP**: conus papillaris; **Vi**: vítreo.

170x

E-37



Adulto

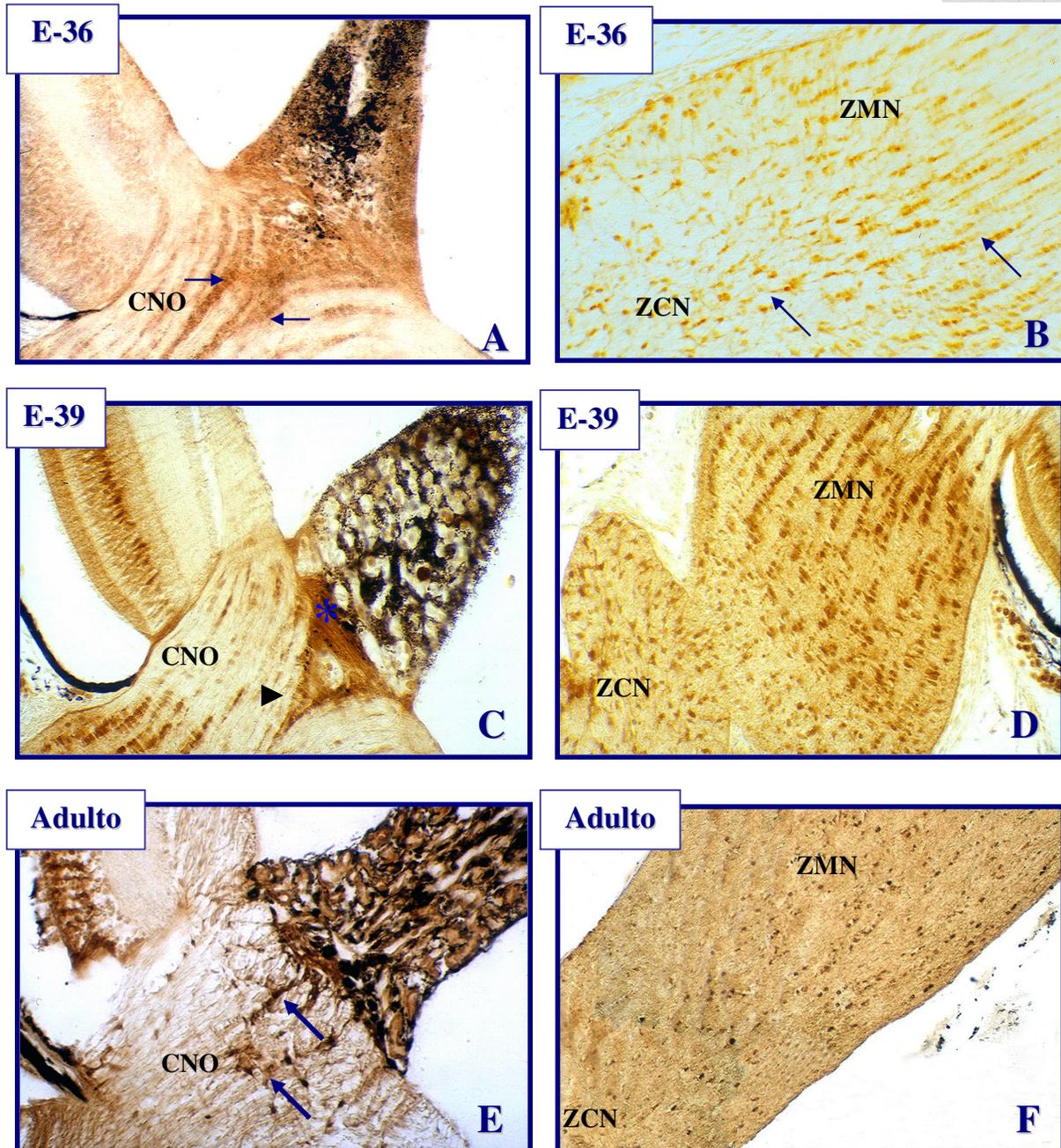


**Fig. 7.-** Inmunomarcaje de la proteína S-100 en la retina. A) Sección horizontal de la retina central (**RC**) en E-37, puede observarse la inmunorreactividad de las células de Müller (→). B) Aumento de un fragmento de A, que muestra el marcaje de los pies de las células de Müller a nivel de la capa ganglionar (→). C) Corte horizontal de la retina madura de adulto, donde se aprecian todas las capas de la retina. D) Zona marginal de la retina (**RM**), donde se observa el considerable aumento de la inmunorreactividad para la S-100.

A, C, D: 1000x; B: 2400x.

**CF:** capa de fotorreceptores; **CG:** capa ganglionar; **CN:** Capa del nervio; **CNE:** capa nuclear externa; **CNI:** capa nuclear interna; **CPE:** capa plexiforme externa; **CPI:** capa plexiforme interna; **CPR:** capa pigmentaria de la retina; **Vi:** vítreo.

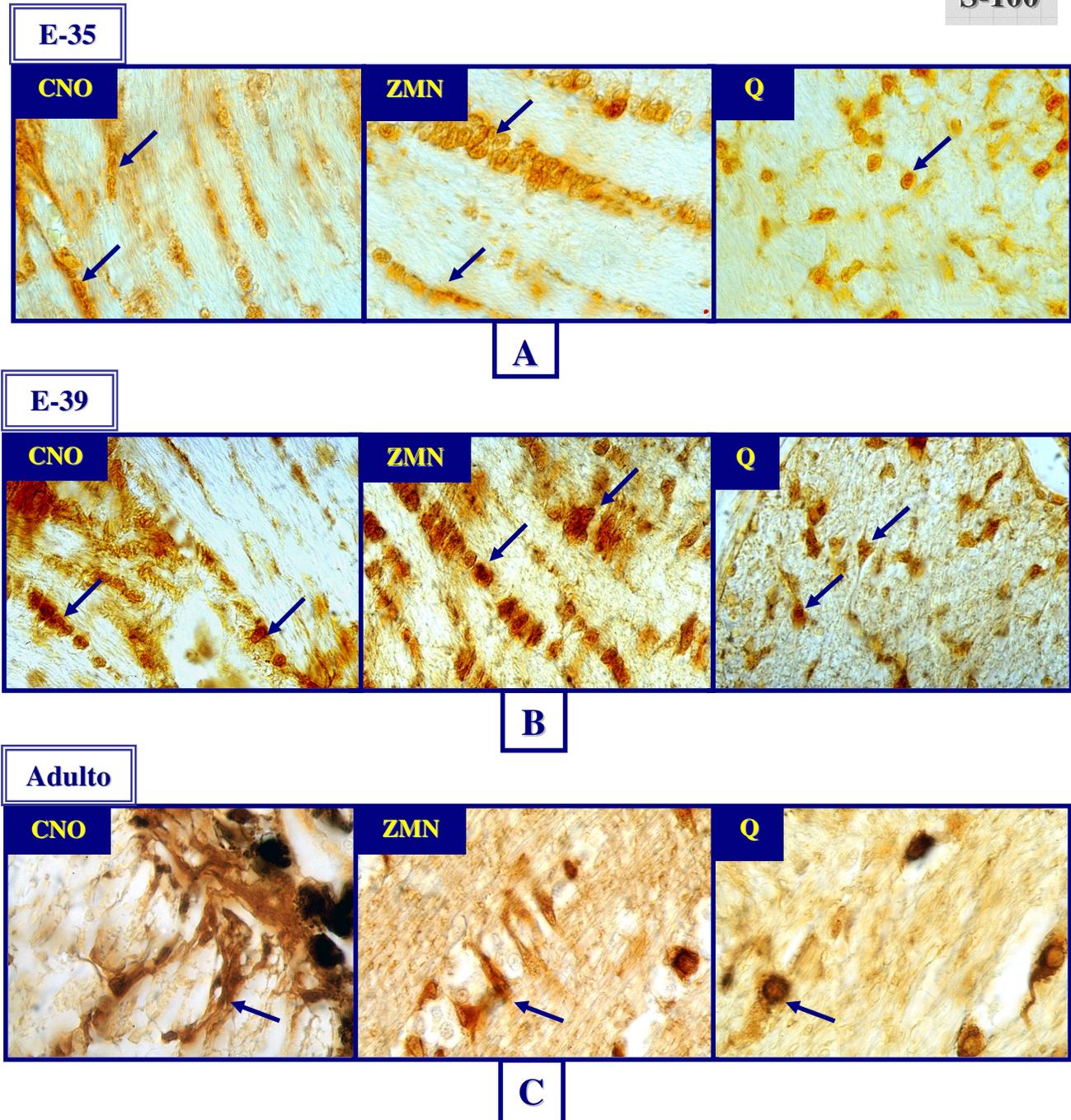
S-100



**Fig. 8.-** Inmunorreacción de la proteína S-100 en diferentes zonas del nervio óptico. A) Cabeza del nervio óptico (CNO) en E-36, donde se observa el marcaje de algunas células (→). B) Células S-100<sup>+</sup> en la zona medial del nervio (ZMN) y la zona caudal (ZCN) en E-36 (→). C) Obsérvese el marcaje en la CNO en E-39, muy intenso en la base del conus papillaris (\*) y en la parte central de la zona distal del conus (▶). D) Intenso marcaje en la ZMN y la ZCN en E-39. E) CNO en adulto, con pocas células S-100<sup>+</sup>, aunque muy intensas (→). F) En la ZMN y ZCN en adulto se observan muchas células S-100<sup>+</sup> marcadas intensamente.

A-F: 570x.

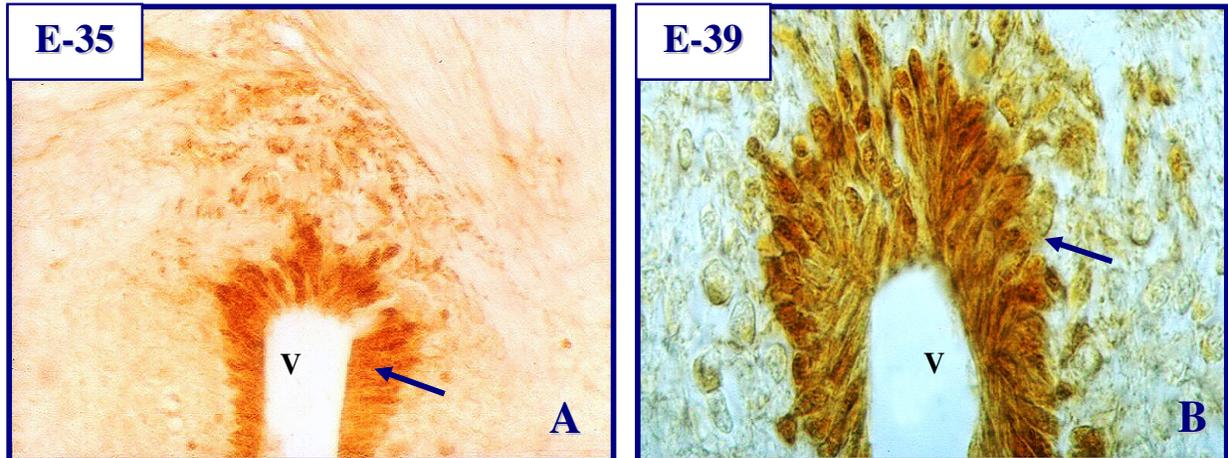
S-100



**Fig. 9.-** Distribución y diferencias morfológicas de las células S-100<sup>+</sup> en la cabeza del nervio óptico (**CNO**), zona medial del nervio (**ZMN**) y en el quiasma óptico (**Q**). **A)** Obsérvese en el E-35 las células redondeadas y en hileras en el CNO y ZMN y estrelladas en el Q (→). **B)** Se aprecia en el E-39 el aumento de las células S-100<sup>+</sup> en las tres zonas estudiadas (→). **C)** En ejemplares adultos las células están más dispersas y se intensifica el marcaje (→).

A-C: 1700x.

S-100



**Fig. 10.-** Inmunomarcaje del ventrículo hipotalámico (V) en la zona más próxima al nervio, en E-35 (A) y E-39 (B). Obsérvense las células S-100<sup>+</sup> tapizando dicho ventrículo (→).

A: 950x; B: 2360x.

## 2.2. INMUNOMARCAJE ANTI-VIMENTINA

La expresión de la vimentina comienza muy tempranamente en el desarrollo de *G. galloti*, de manera que en el estadio embrionario E-33 se puede observar esta proteína en los pies de las células de Müller en la retina marginal (Fig. 11A).

A partir de este estadio aumenta el marcaje en los pies de las células de Müller, y en E-35 comienza en los pies localizados en la zona central de la retina. Además, también se observan células vimentina<sup>+</sup> en la ZCN, ZP, ZLNR, ZTNR y en los bordes marginales del conus (Figs. 11B, 12A-B, 14A-B).

En el estadio E-36 aparece en la zona ventricular hipotalámica, haciéndose más intenso en E-37 (Fig. 11H). También se incrementa en los pies de las células de Müller, tanto en la retina central como en la marginal (Fig. 11C-F), zona peripapilaris, base del conus papilaris (Fig. 14C-D) y a lo largo del nervio óptico (Fig. 12C-D).

A partir del estadio E-39 se reduce el número de células marcadas en la zona peripapilaris y el conus, mientras que en la retina, parte extraocular del nervio y quiasma se mantiene la expresión de esta proteína (Tabla 2).

En ejemplares adultos, la inmunorreactividad disminuye en la zona medial del nervio con respecto a otros estadios, aunque se observan algunas células positivas. Sin embargo, en la zona caudal del nervio óptico aparecen grandes células de morfología estrellada vimentina<sup>+</sup>. En la zona del quiasma también se observan algunas células similares a las anteriormente descritas (Fig. 13).

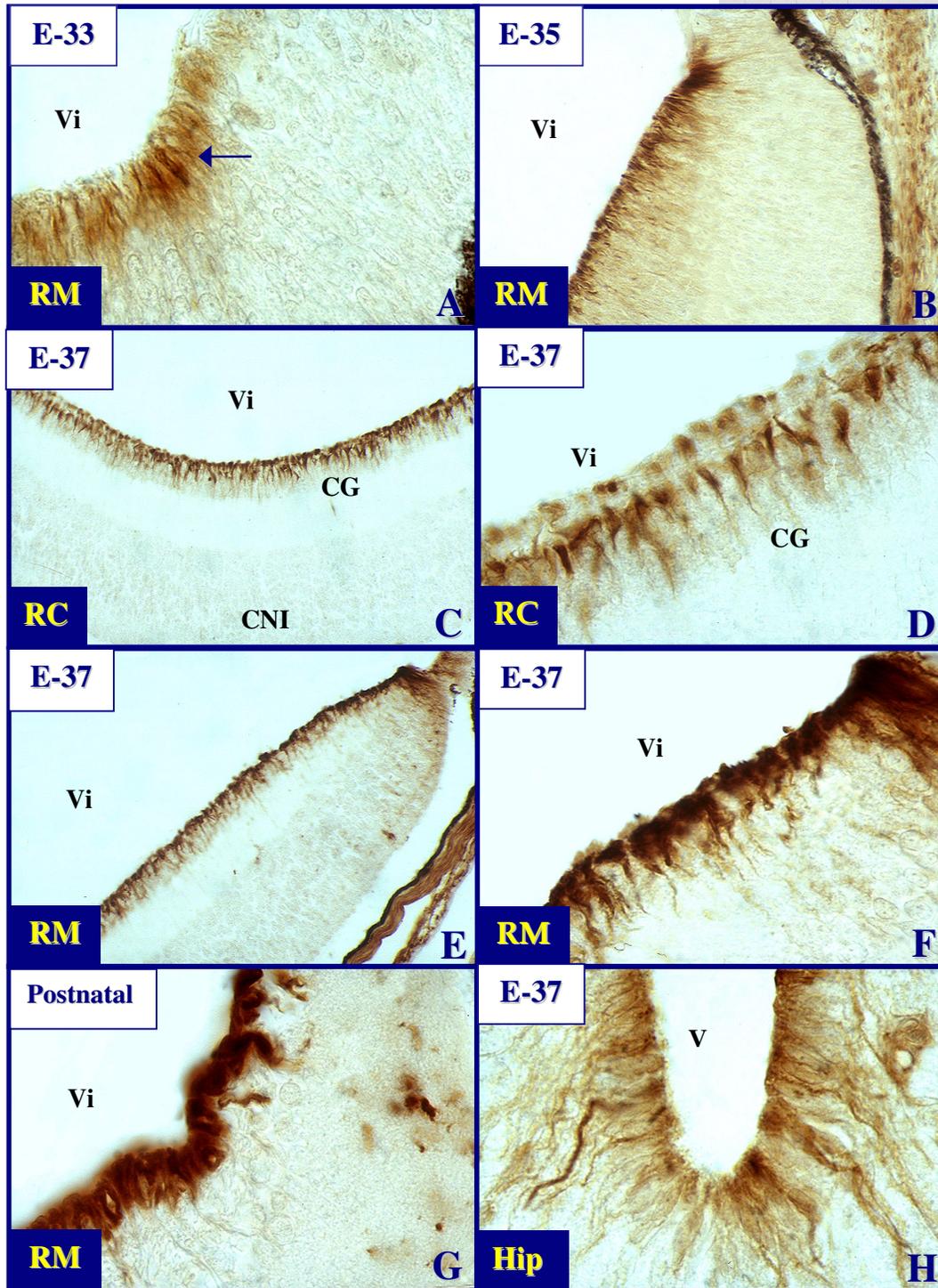
En la tabla que se expone a continuación se detalla el grado de expresión de la vimentina en la vía óptica e hipotálamo durante el desarrollo. Se observa que se expresa desde estadios muy tempranos y en la retina se mantiene el marcaje hasta adulto, siendo más intenso en la retina marginal, sin embargo en la cabeza del nervio desaparece y en la zona medial disminuye considerablemente en adulto. En la zona caudal y el quiasma comienza a expresarse más tarde que en otras áreas más rostrales del nervio pero se marca intensamente en adulto.

<i>ESTADÍO</i>	<i>Hip</i>	<i>Q</i>	<i>ZCN</i>	<i>ZMN</i>	<i>CNO</i>	<i>RM</i>	<i>RC</i>
<b>E-33</b>	-	*	-	-	-	-	+
<b>E-35</b>	-	-	-	+	+	+	++
<b>E-36</b>	+	+	+	++	++	+	++
<b>E-37</b>	+++	+	++	+++	+++	++	+++
<b>E-39</b>	+	+	++	+++	++	++	+++
<b>Eclósión</b>	-	+	++	+++	+	++	+++
<b>Postnatal</b>	-	++	+++	++	-	+	++
<b>Adulto</b>	-	+++	++++	+	-	+	++

**TABLA 2.-** Inmunorreactividad para la vimentina en la vía óptica e hipotálamo durante el desarrollo.

(\*) No se observa aún esta estructura, (-) No existe marcaje, (+) marcaje débil, (++) marcaje medio, (+++) marcaje alto, (++++) marcaje muy alto.

**CNO:** cabeza del nervio óptico; **Hip:** hipotálamo; **Q:** quiasma; **RC:** retina central; **RM:** retina marginal; **ZCN:** zona caudal del nervio; **ZMN:** zona medial del nervio.

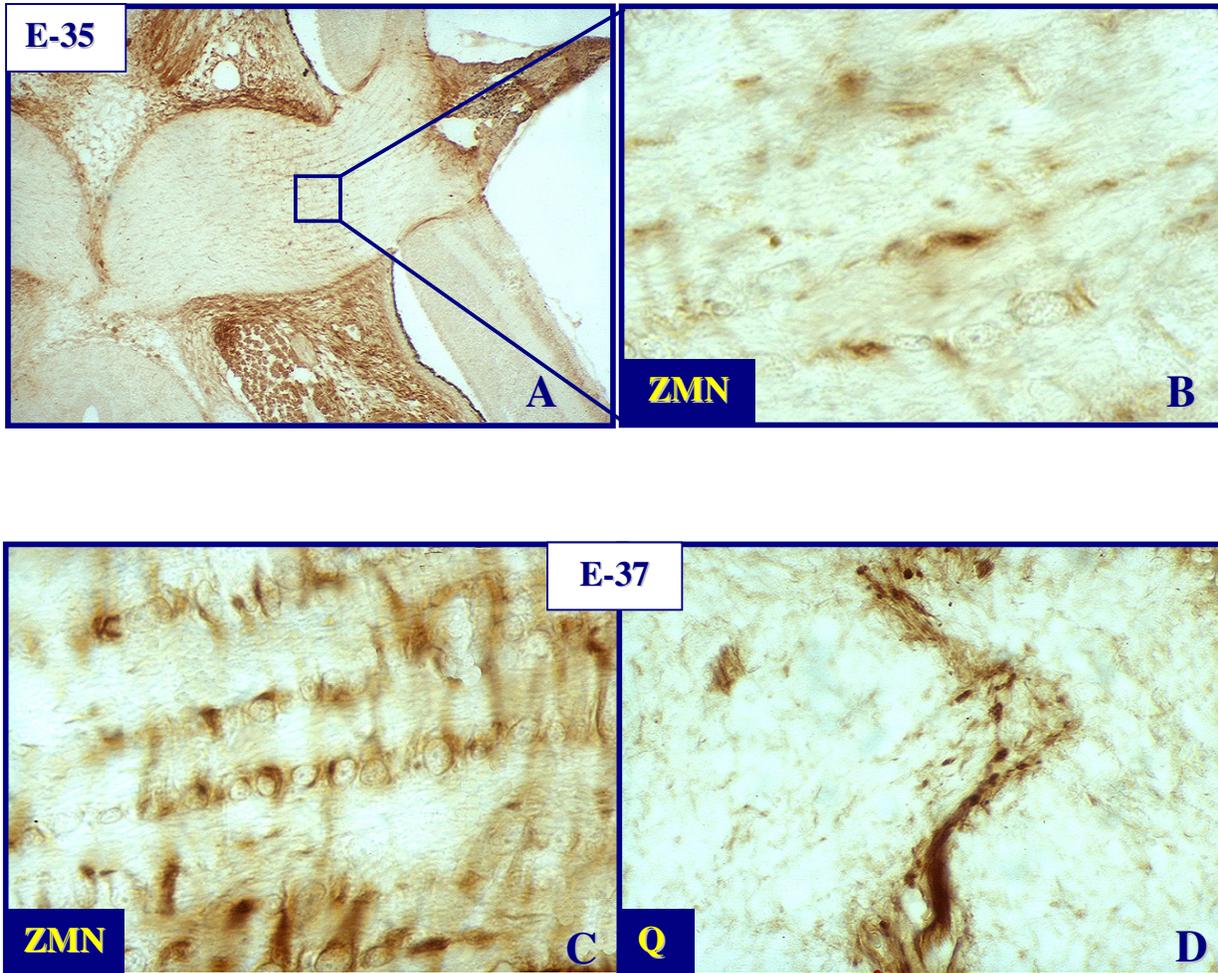


**Fig. 11.-** Inmunoreactividad para la vimentina durante el desarrollo de la retina en *G. galloti*. A) En la retina marginal en el estadio E-33, comienzan a aparecer células Vim<sup>+</sup> (→). B) Aumento de la expresión en la misma región en E-35. C) Células Vim<sup>+</sup> en la zona central de la retina en E-37. D) Detalle en la zona central de la retina en E-37. E) Vista general de la retina marginal en E-37. F) Detalle celular de la retina marginal en E-37. G) Retina marginal en postnatal, donde disminuye el número de células Vim<sup>+</sup>. H) Zona ventricular hipotalámica próxima al quiasma óptico en E-37, con células altamente inmunorreactivas.

A, D, F-H: 2100x; B: 850x; C: 530x; E: 530x.

CG: capa ganglionar; CNI: capa nuclear interna; Hip: hipotálamo; RC: retina central; RM: retina marginal; Vi: vítreo; V: ventrículo.

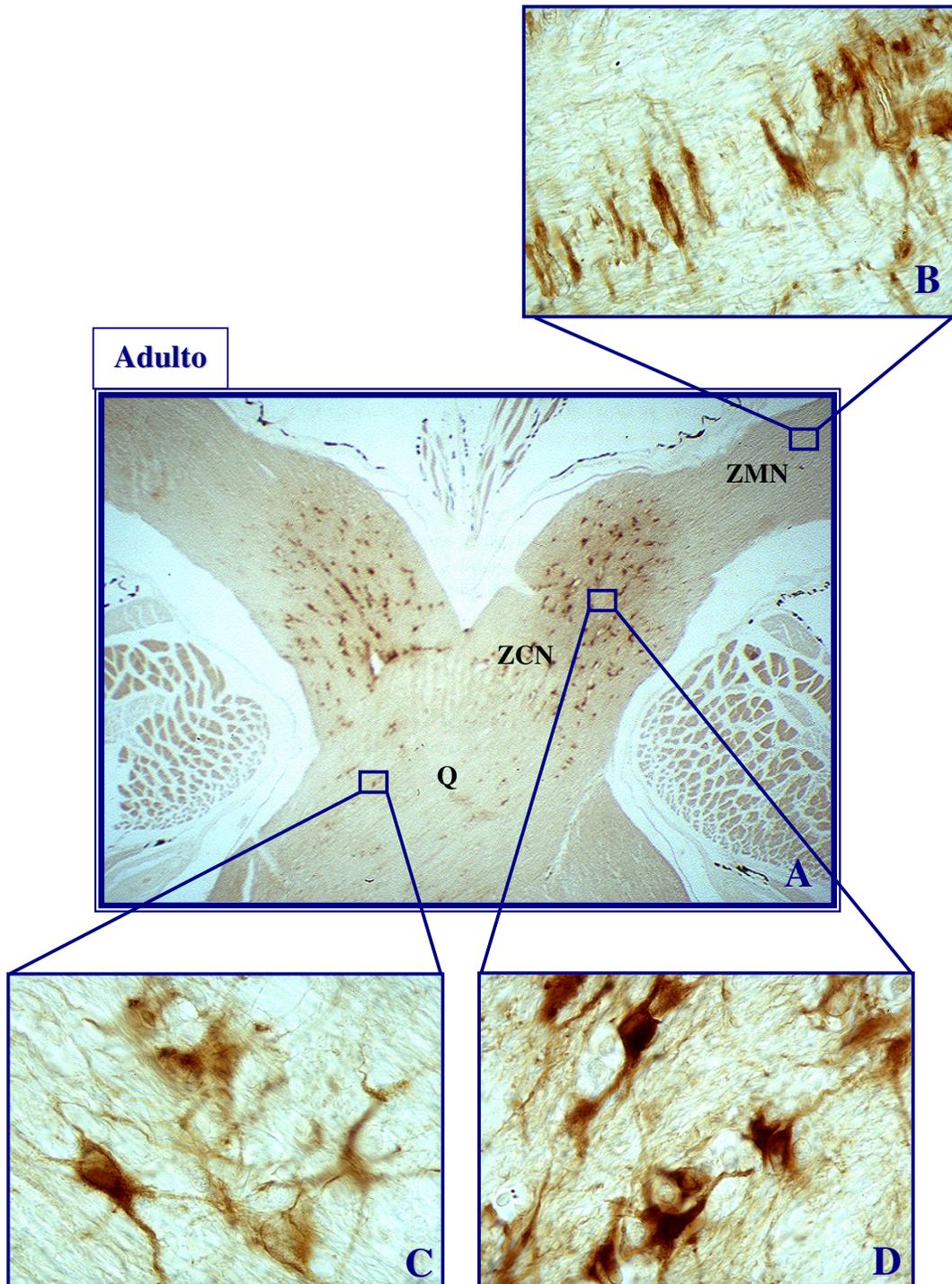
## VIMENTINA



**Fig. 12.-** Células inmunorreactivas para la vimentina en el nervio óptico de *G. galloti*. A) Panorámica del nervio óptico en el estadio E-35 con células Vim<sup>+</sup>. B) Detalle de las células inmunorreactivas presentes en ZMN en E-35. C) El marcaje aumenta en la zona medial del nervio (ZMN) en E-37. D) Se observa un incremento del marcaje en la zona del quiasma óptico (Q) en E-37.

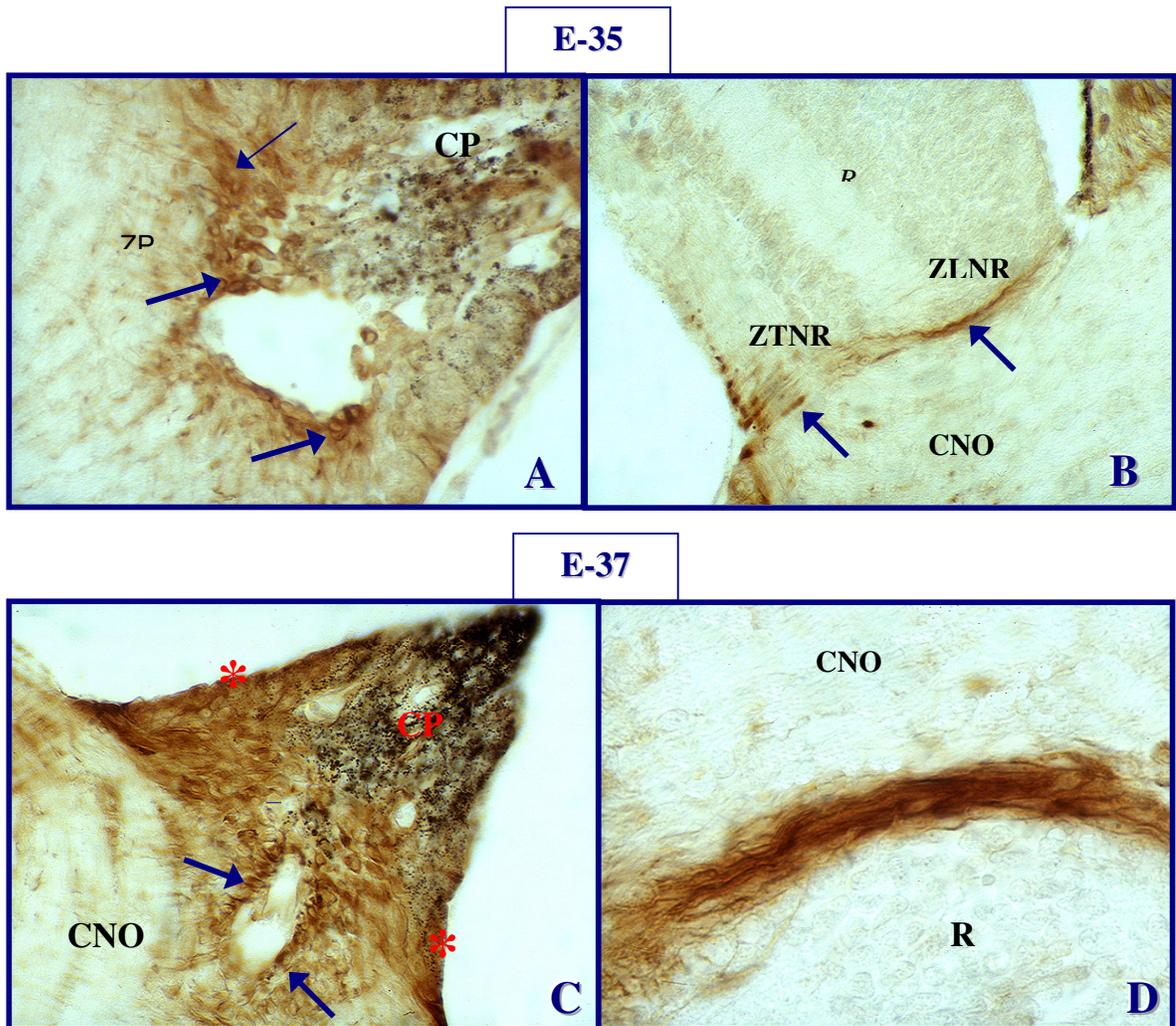
A: 240x; B-D: 2420x.

## VIMENTINA



**Fig. 13.-** Inmunorreactividad para la vimentina en el nervio óptico de adulto. A) Obsérvese la variedad morfológica de las células marcadas presentes en las diferentes áreas del nervio. B) En la zona medial del nervio (ZMN) se reduce considerablemente el marcaje. C) En el quiasma óptico (Q) se observan grandes células Vim<sup>+</sup>. D) La mayor inmunorreactividad se encuentra en la zona caudal del nervio (ZCN).

A: 65x; B-D: 1950x.



**Fig. 14.-** Inmunomarcaje para la vimentina en la cabeza del nervio óptico (CNO) y en el conus papillaris (CP). A) Primeras células marcadas en la zona peripapillaris (ZP) y en la base del conus en el estadio E-35 (→). B) Marcaje en la zona limitante nervio retina (ZLNR) y zona de transición nervio retina (ZTNR) en E-35 (→). C) Obsérvese en E-37 el aumento del marcaje con respecto a estadios inferiores en la ZP (→) y en la base del conus (▶), así como la presencia de células marcadas en la zona del conus que limita con el vítreo (Vi) (\*). D) La inmunoreactividad también se intensifica en la ZLNR en E-37.

A-C: 920x; D: 2300x.

### 2.3. INMUNOMARCAJE ANTI-GFAP

La inmunorreactividad de la GFAP durante el desarrollo se observa por primera vez en el estadio E-37, con marcaje en la base del conus papillaris (Fig. 15A-B), en procesos celulares en la zona de la interfase entre la retina y el nervio (Fig. 15C) y débilmente en la zona medial del nervio que limita con la cabeza del mismo (Fig. 15A).

En estadios más avanzados del desarrollo hay que destacar el aumento de la inmunorreactividad en las células localizadas en la base del conus papillaris, y en la interfase entre la retina y el nervio. Desde el estadio E-39 hasta eclosión, el marcaje permanece invariable (Fig. 16A), y se observa un gran número de células inmunorreactivas principalmente en la cabeza del nervio óptico, tanto en la zona peripapillaris (Fig. 16B) como en la zona distal del conus (Fig. 16C), y en la zona medial del nervio más próxima a la retina (Fig. 16D). En esta última zona, así como en la cabeza del nervio, más concretamente en la zona distal al conus, aparecen marcadas las prolongaciones de las células positivas para esta proteína, dispuestas en hileras, formando un entramado o red (Fig. 16C-D). Así mismo, la inmunorreactividad se incrementa en la interfase entre la retina y el nervio (Fig. 16 E).

En ejemplares postnatales y adultos se intensifica el marcaje en los pies de las células de Müller (Fig. 17A, F) y en la ZMN (Fig. 17A-B). Cabe destacar la relación que existe entre los vasos sanguíneos y las células GFAP<sup>+</sup> en adulto, observada en la ZP (Fig. 17C). Además, en ejemplares postnatales comienza a observarse un gran número de células y procesos celulares marcados en la zona del tracto óptico (Fig. 17D-E), totalmente ausente en estadios inferiores.

En la tabla expuesta a continuación se detalla el grado de expresión de la GFAP en el hipotálamo y la vía óptica, observándose que el marcaje con esta proteína se intensifica a medida que avanza el desarrollo en la cabeza del nervio óptico y la zona medial del nervio, haciéndose máximo en adulto. En el tracto y en los pies de las células de Müller aparece marcaje intenso a partir de ejemplares postnatales, y en el hipotálamo la inmunorreactividad se hace máxima en eclosión.

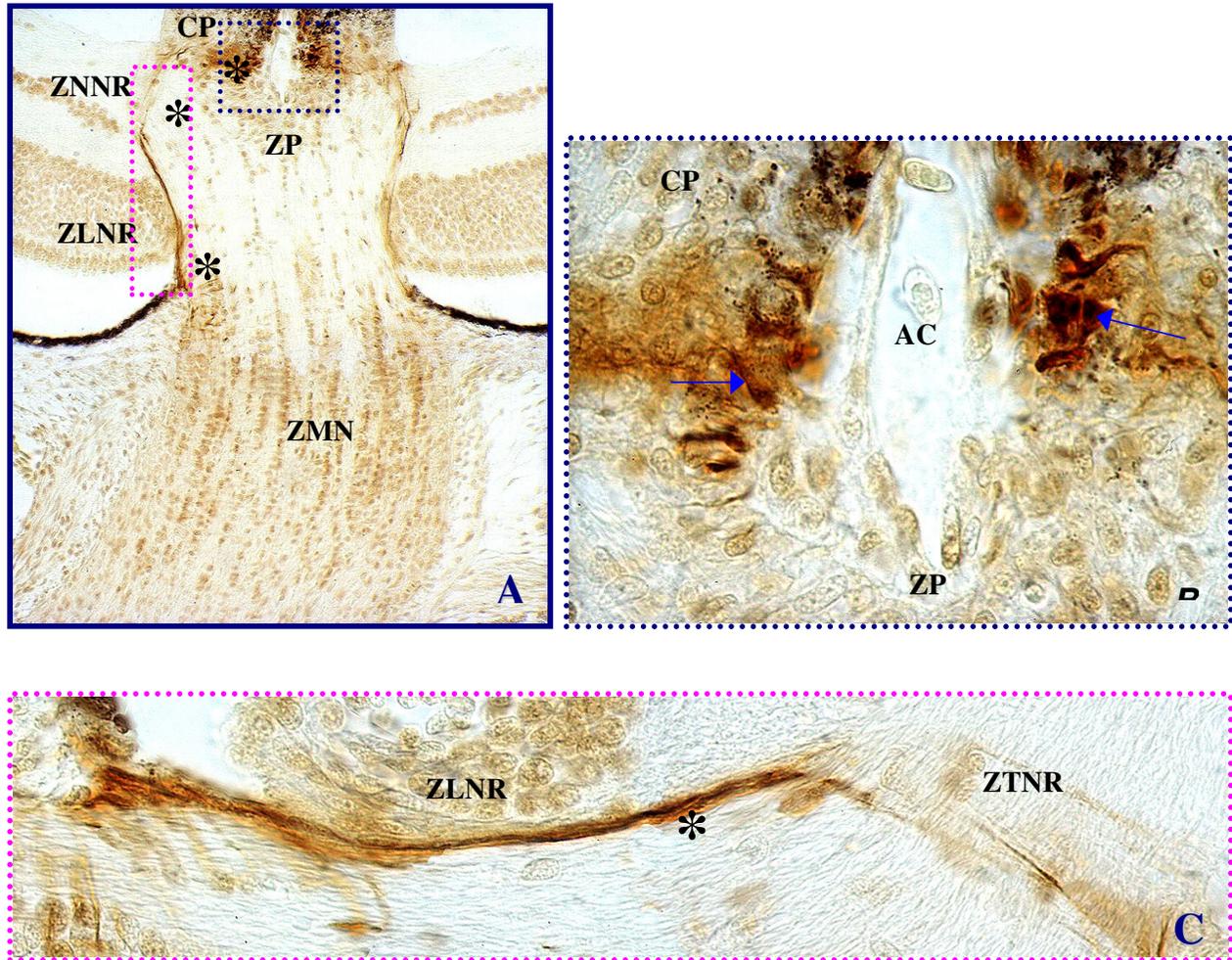
<b>ESTADÍO</b>	<b>HIP</b>	<b>Q/TrO</b>	<b>ZMN</b>	<b>CNO</b>	<b>R</b> <i>(pies células de Müller)</i>
<b>E-37</b>	-	-	+	+	-
<b>E-39</b>	+	-	++	++	-
<b>Eclosión</b>	+++	+	+++	+++	-
<b>Adulto</b>	-	++++	++++	++++	++++

**TABLA 3.-** Inmunorreactividad de la proteína GFAP en distintas áreas del sistema visual y en el hipotálamo de *G. galloti*. Se observa que esta proteína aparece a partir de E-37 en determinadas áreas y aumenta con el estadio.

(\*) No se observa aún esta estructura, (-) no existe marcaje, (+) marcaje débil, (+ +) marcaje medio, (+ + +) marcaje alto, (+ + + +) marcaje muy alto.

**CNO:** cabeza del nervio óptico; **Hip:** hipotálamo; **Q:** quiasma; **R:** retina; **TrO:** tracto óptico; **ZMN:** zona medial del nervio.

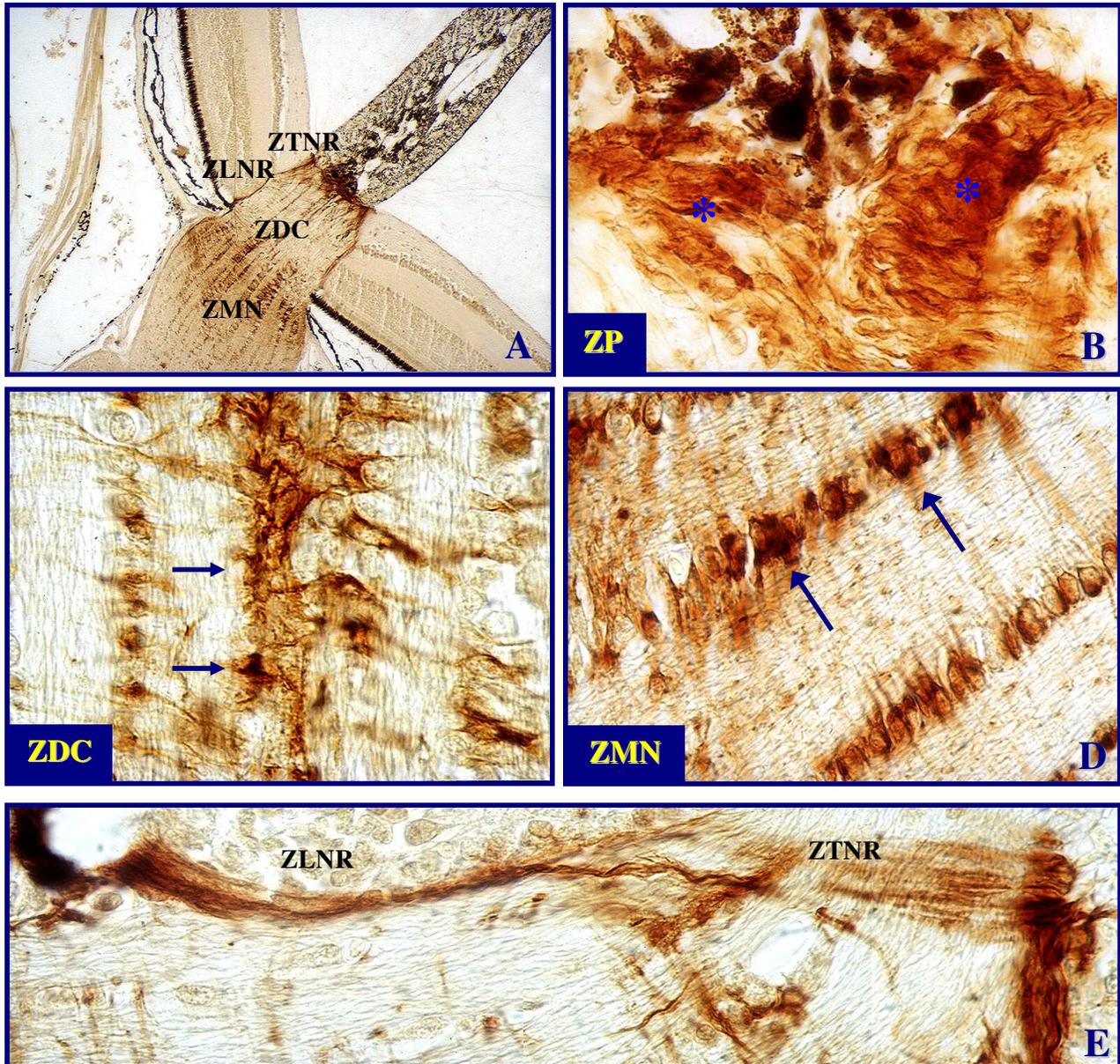
E-37



**Fig. 15.-** Inmunorreactividad de la anti-GFAP en el nervio óptico en E-37. A) Sección horizontal del nervio óptico mostrando el marcaje en la base del conus papillaris (CP), zona limitante nervio y retina (ZLNR) y zona de transición nervio y retina (ZTNR) (\*), y muy débilmente en la zona medial del nervio (ZMN) (→). B) Ampliación de la zona peripapilaris (ZP) con células inmunorreactivas alrededor de la arteria central (AC) (→). C) En la ZLNR y ZTNR se observan nítidamente los procesos celulares GFAP<sup>+</sup> (\*).

A: 550x; B: 2700x; 5000x.

## Eclosión

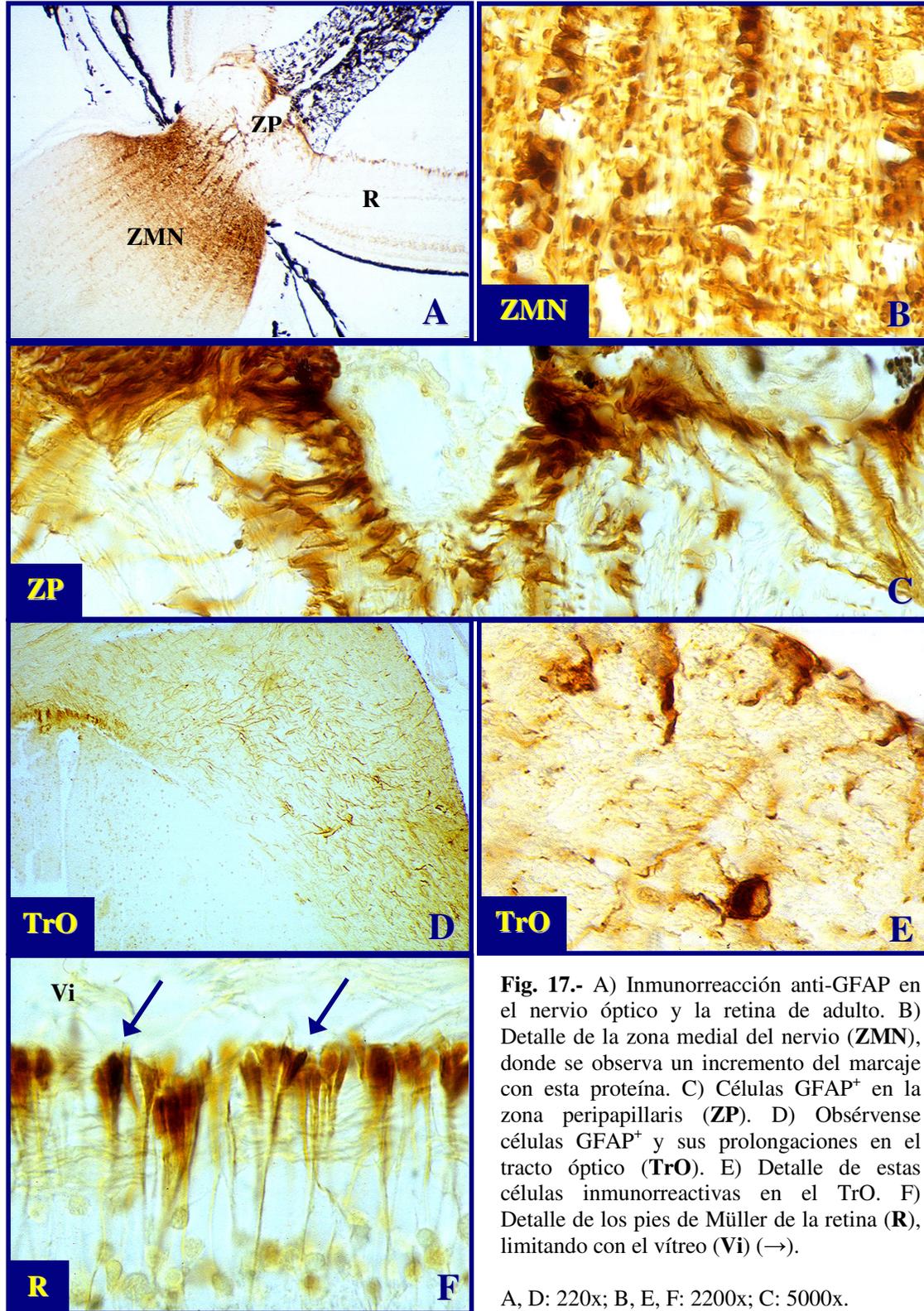


**Fig. 16.-** Inmunomarcaje de la proteína GFAP en el nervio óptico y la retina en el estadio de eclosión. A) Obsérvese incremento de la inmunorreactividad en la zona peripapilaris (ZP), zona distal del conus (ZDC), zona limitante nervio retina (ZLNR), zona de transición nervio retina (ZTNR) y zona medial del nervio (ZMN). B) Ampliación de ZP donde se aprecia la gran concentración de células GFAP<sup>+</sup> (\*). C) En la ZDC se observa disminución del número de células positivas con respecto a la ZP (→). D) Marcaje de la ZMN donde se aprecia la disposición celular en hileras, típica de esta zona (→). E) ZLNR y ZTNR, con incremento el marcaje en relación a estadios anteriores.

A: 250x; B-D: 2540x; D: 5000x.

Adulto

GFAP



**Fig. 17.-** A) Inmunorreacción anti-GFAP en el nervio óptico y la retina de adulto. B) Detalle de la zona medial del nervio (ZMN), donde se observa un incremento del marcaje con esta proteína. C) Células GFAP<sup>+</sup> en la zona peripapilaris (ZP). D) Obsérvense células GFAP<sup>+</sup> y sus prolongaciones en el tracto óptico (TrO). E) Detalle de estas células inmunorreactivas en el TrO. F) Detalle de los pies de Müller de la retina (R), limitando con el vítreo (Vi) (→).

A, D: 220x; B, E, F: 2200x; C: 5000x.

#### *2.4. DOBLES MARCAJES INMUNOHISTOQUÍMICOS: ANTI-S100/GFAP.*

En la retina se puede observar que coexisten los dos marcadores en los pies de Müller únicamente en ejemplares postnatales y adultos (Fig. 18A), siendo la retina marginal más inmunorreactiva (Fig. 18B).

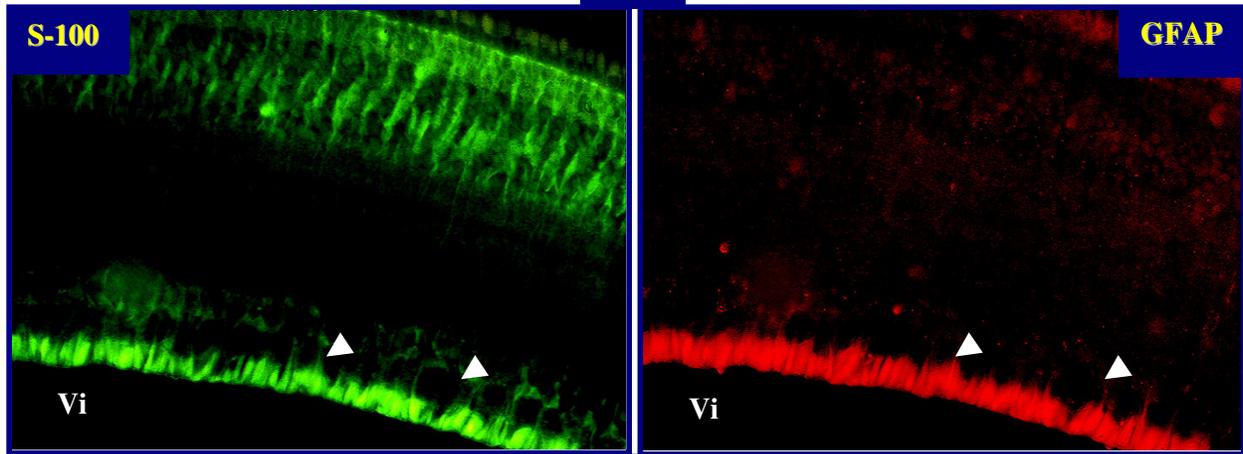
En lo que respecta al nervio óptico, estas dos proteínas presentan un patrón de marcaje diferente, puesto que la GFAP aparece a partir de E-37 en la base del conus papillaris, en la interfase entre la retina y el nervio, y de manera muy débil en la zona medial del nervio (Fig. 19A), mientras que la proteína S-100 comienza en E-34/35 y se encuentra presente a lo largo de todo el nervio hasta ejemplares adultos (Fig. 19A, B).

En E-37 coexisten ambos marcadores únicamente en la zona medial del nervio más próxima a la retina (Fig. 20A), mientras que en estadíos más avanzados aumenta el número de células doblemente marcadas. En eclosión, particularmente en la zona medial del nervio, se observa un fuerte marcaje GFAP<sup>+</sup>/S-100<sup>+</sup> (Fig. 20B), y en otras regiones como la base del conus papillaris (Fig. 21A). Así mismo, existen células fuertemente marcadas GFAP<sup>+</sup> y débilmente S-100<sup>+</sup> en la interfase entre la retina y el nervio. Sin embargo, en la zona del quiasma la mayoría de las células son únicamente inmunorreactivas para la proteína S-100, observándose algunas que poseen ambos marcadores.

En ejemplares postnatales y adultos predominan las células doblemente inmunorreactivas en la zona medial del nervio (Fig. 20C). En la mayoría de las células de la cabeza del nervio óptico coexisten los dos marcadores, excepto en algunas que presentan una de las proteínas (Fig. 21B). Además, en la zona del tracto óptico aparece por primera vez inmunoreactividad para ambos marcadores, aunque no parece existir colocalización celular (Fig. 22), observándose células S-100<sup>+</sup>/GFAP<sup>-</sup> y fibras S-100<sup>-</sup>/GFAP<sup>+</sup>.

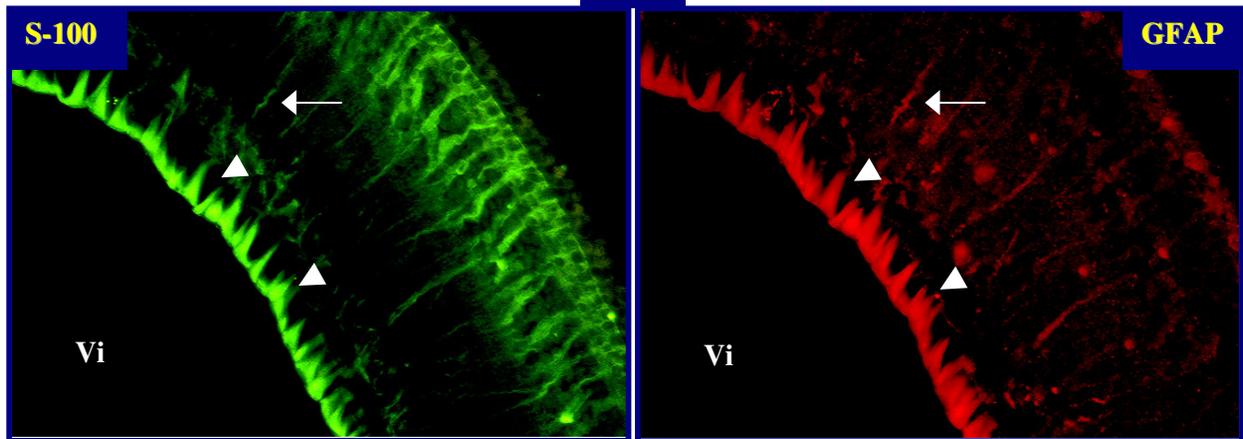
Adulto

RC



A

RM



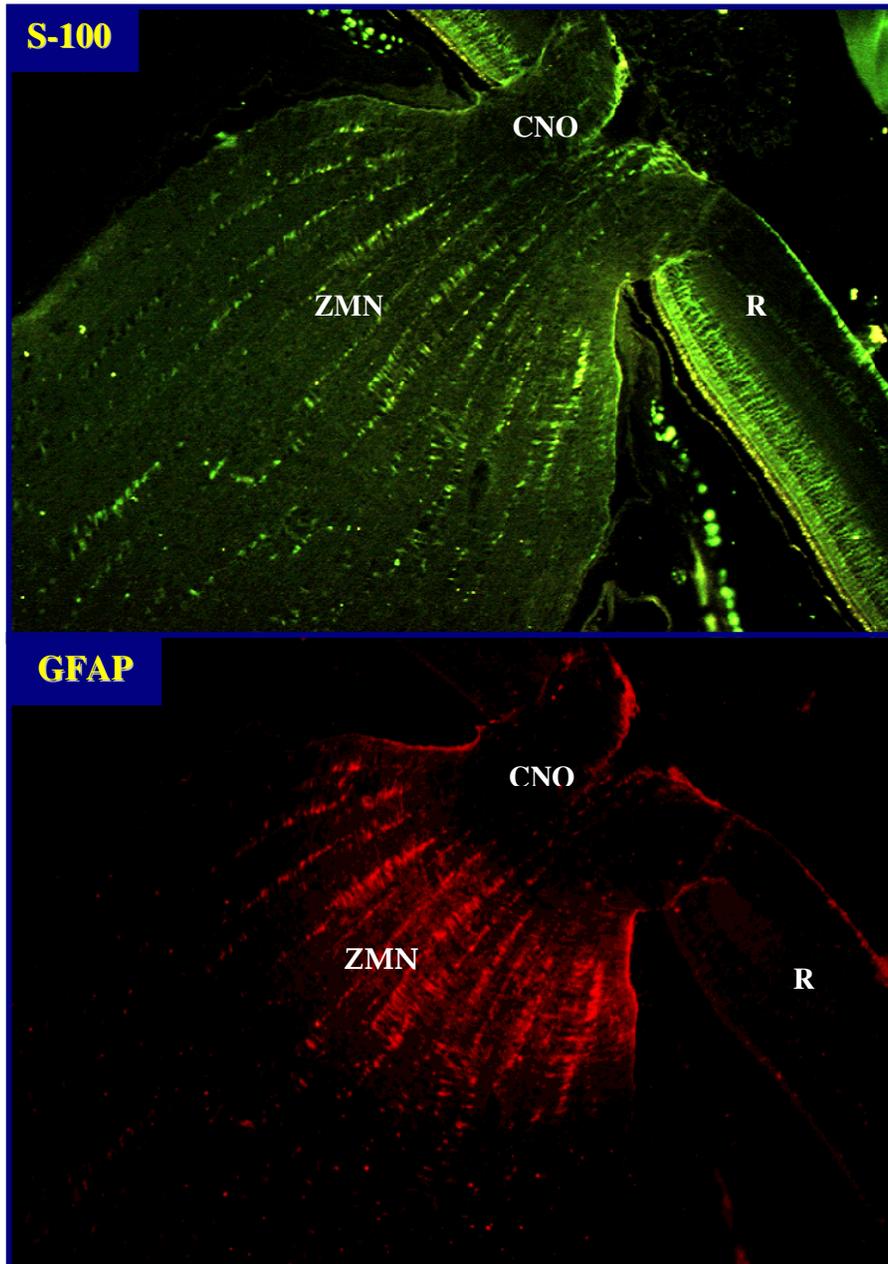
B

**Fig. 18.-** Doble inmunomarcaje S-100 (verde) y GFAP (rojo) en la retina de adulto. Desde la retina central (RC) (A) hasta la retina marginal (RM) (B), se observa coexistencia en los pies de Müller (►) que limitan con el vítreo (Vi), y en algunos procesos de las células de Müller en la retina marginal (→).

A-B: 960x.

Adulto

S-100/GFAP



**Fig. 19.-** Distribución de la proteína S-100 (verde) y GFAP (rojo) en el nervio óptico y la retina de adulto. Obsérvese que la proteína S-100 se expresa en un área del nervio más amplia que la GFAP.

360x

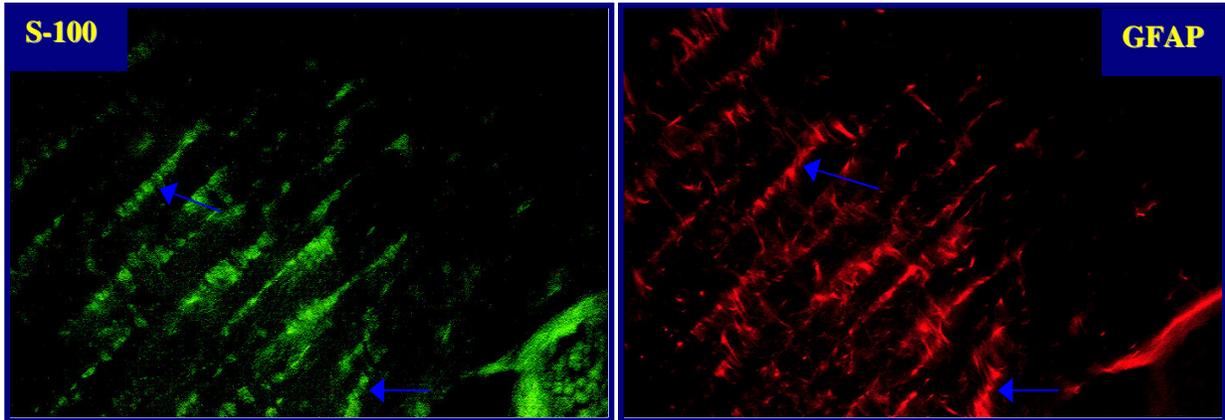
CNO: Cabeza del nervio óptico; R: Retina; ZMN: Zona medial del nervio.

**Fig. 20.-** Coexistencia de las proteínas S-100 (verde) y GFAP (rojo) en la **zona medial del nervio** más próxima a la retina, en E-37 (A), Eclosión (B) y adulto (C). Obsérvese que existen muchas células S-100<sup>+</sup>/GFAP<sup>+</sup> (→), que aumentan a medida que avanza el estadio de desarrollo.

970x

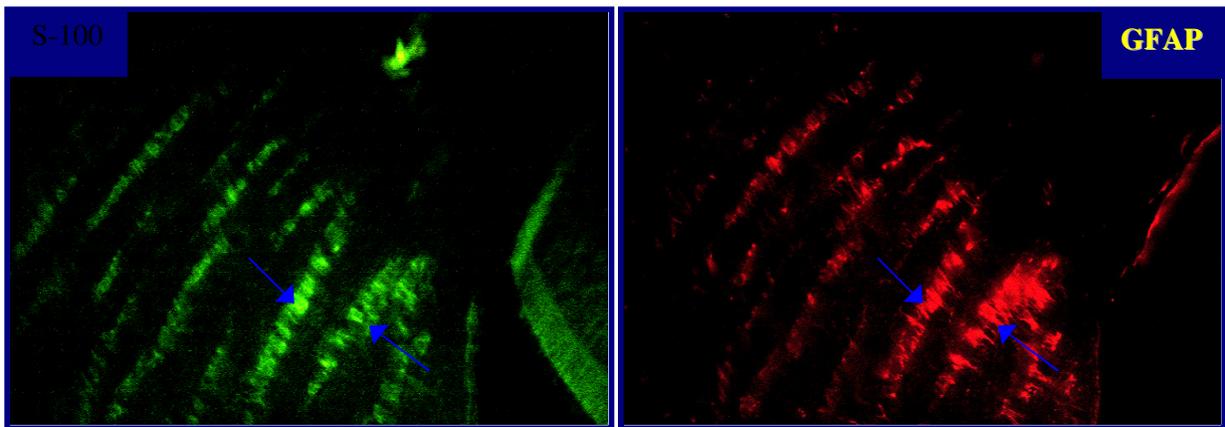
E-37

S-100/GFAP



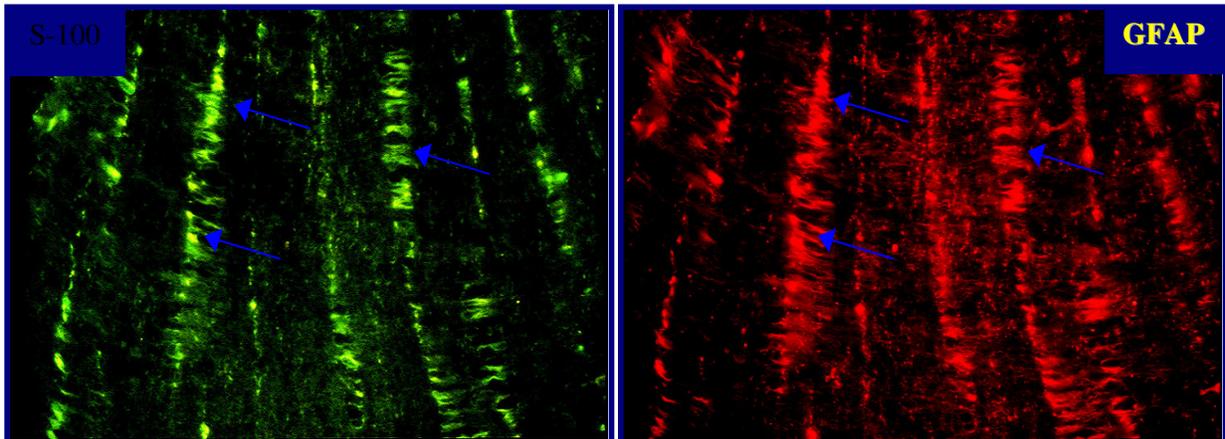
A

Eclosión



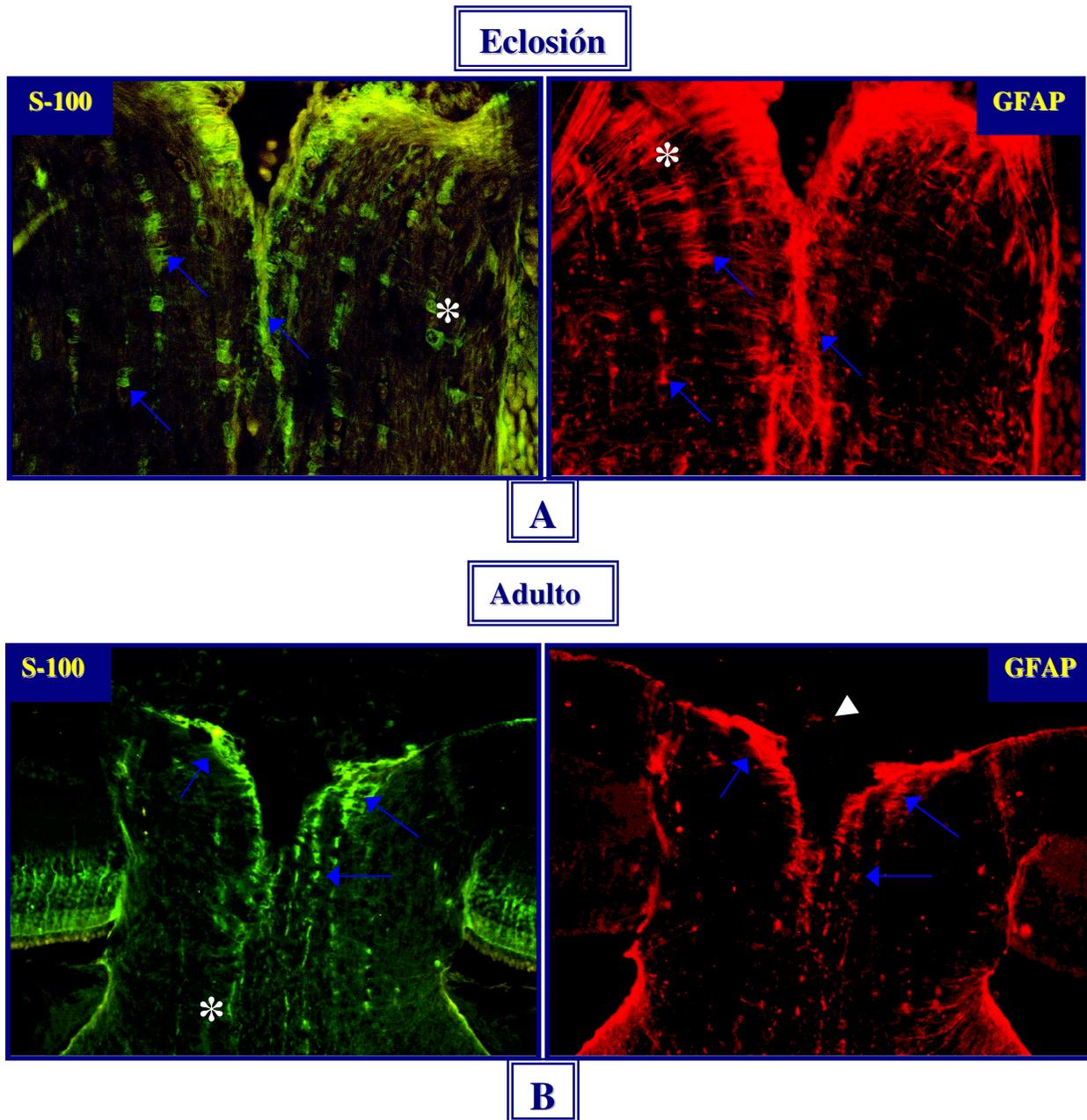
B

Adulto



C

Fig 20

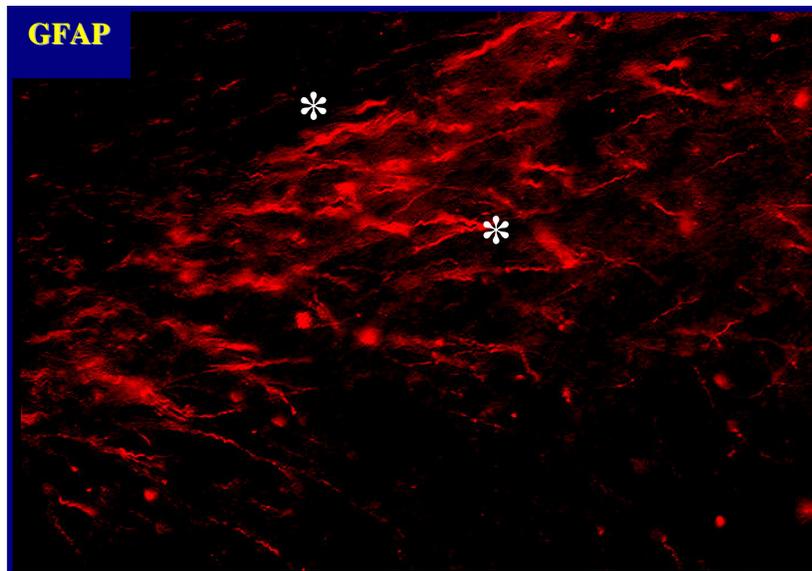
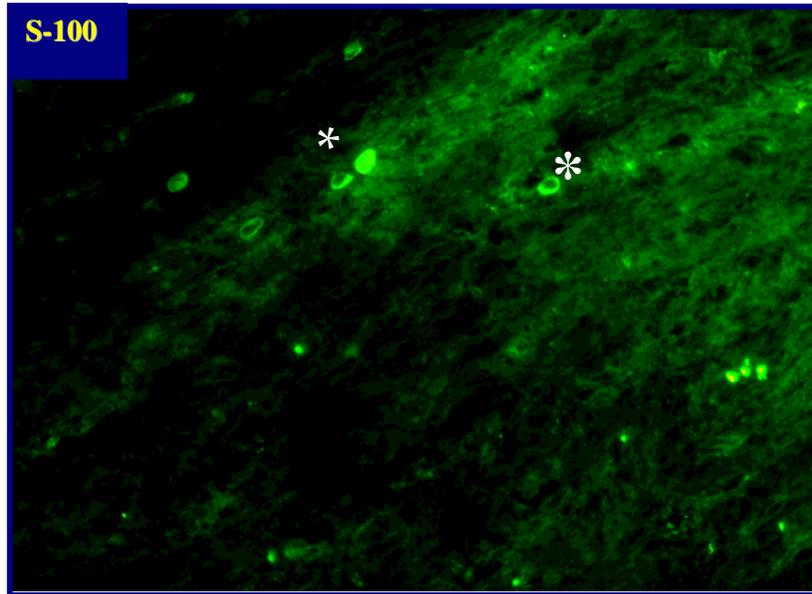


**Fig. 21.-** Doble inmunomarcaje con las proteínas S-100 (verde) y GFAP (rojo) en la **cabeza del nervio óptico** en eclosión (A) y adulto (B). La mayoría de las células marcadas presentan ambos marcadores (→), aunque algunas células son inmunorreactivas sólo para uno de los marcadores (\*). Obsérvese el marcaje GFAP<sup>+</sup> dentro del conus papillaris, en su base (▶).

970x

S-100/GFAP

Adulto



**Fig. 22.-** Doble inmunomarcaje en el **tracto óptico** en ejemplares adultos. Se observa inmunoreactividad para las proteínas S-100 (verde) y GFAP (rojo), ausente en otros estadios del desarrollo en esta zona, aunque no hay coexistencia de ambos marcadores (\*).

A-B: 650x.

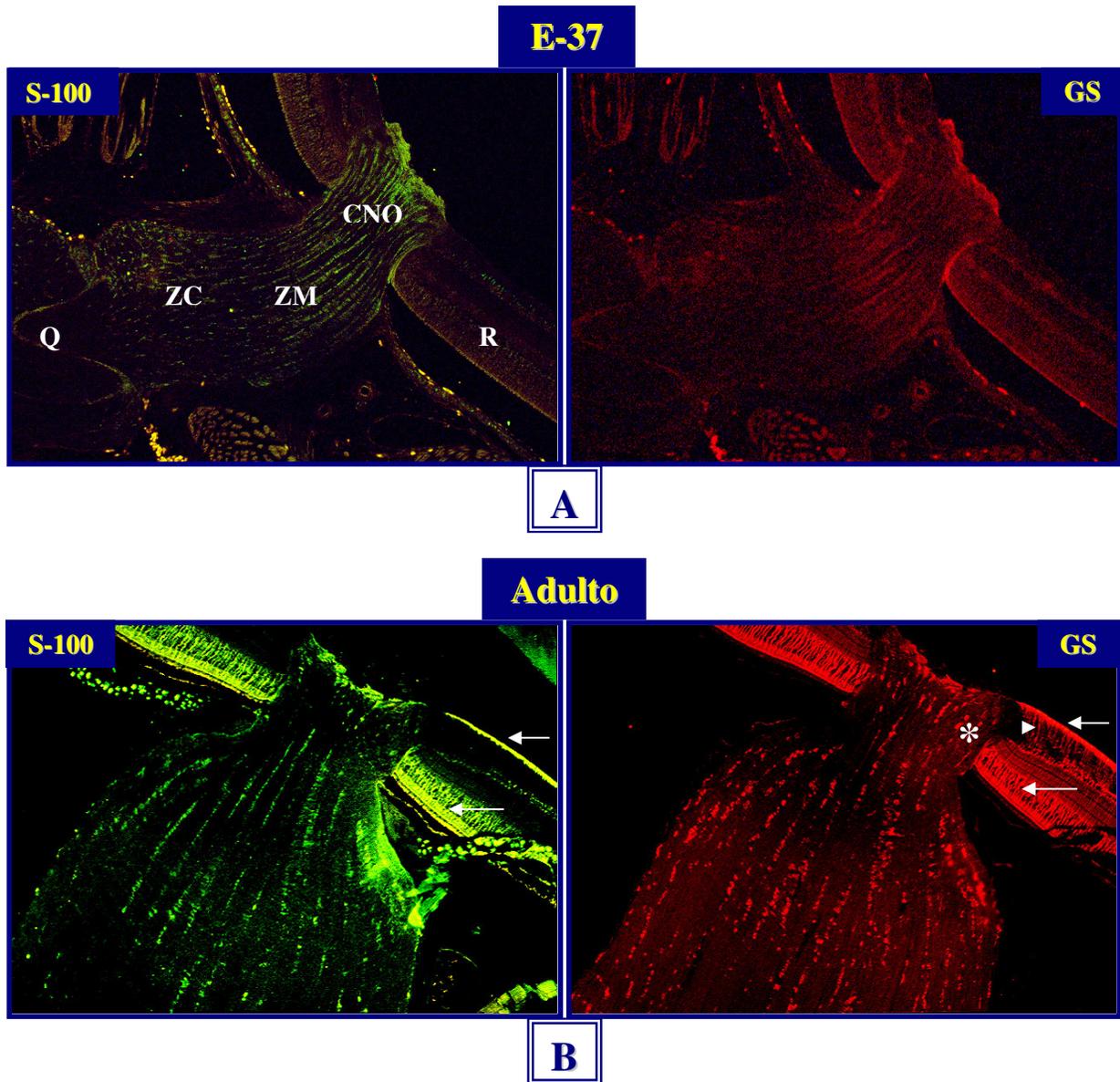
*2.5. DOBLES MARCAJES INMUNOHISTOQUÍMICOS: ANTI-S100/GS.*

La expresión de ambas proteínas se observa a partir del estadio E-35, y el marcaje se intensifica hasta llegar al estado adulto (Fig. 23), observándose un gran número de células doblemente marcadas tanto en el nervio óptico como en la retina durante el desarrollo.

En la retina se observa la coexistencia de las dos proteínas en los somas y los pies de Müller a partir del estadio E-39 y permanece en ejemplares adultos (Figs. 23B, 25A), aunque en la retina central los procesos en toda su longitud son sólo GS<sup>+</sup>.

En E-36/37 y eclosión predominan las células doblemente marcadas en el nervio óptico y el quiasma (Fig. 24). En ejemplares postnatales y adultos también existen muchas células donde coexisten ambos marcadores, principalmente en la zona medial del nervio (Fig. 25B). Sin embargo, una gran población celular únicamente presenta la proteína GS, ya que en lo que respecta a la proteína S-100, a partir del estadio postnatal disminuye su expresión, sobre todo en la cabeza del nervio, aunque también existe una población importante de células S-100<sup>+</sup>/GS<sup>+</sup> (Fig. 25A). En el tracto óptico aparecen por primera vez células inmunorreactivas para la S-100 y se observa coexistencia de los dos marcadores, sin embargo predomina el tipo celular S-100<sup>-</sup>/GS<sup>+</sup> (Fig. 25C).

En general, nuestros resultados demuestran la coexpresión de S-100 y GS en la mayoría de las células presentes en las áreas estudiadas y en los diferentes estadios, excepto en adulto, donde se incrementa el número de células S-100<sup>-</sup>/GS<sup>+</sup>.



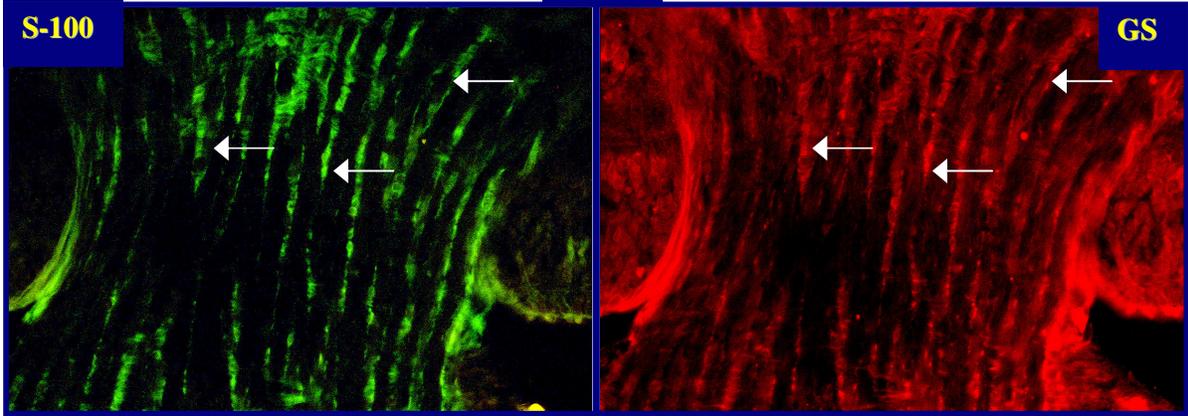
**Fig. 23.-** Doble inmunomarcaje S-100 (verde) y GS (rojo) del nervio óptico y la retina en E-37 (A) y adulto (B). Obsérvese que en E-37 la población celular que predomina es la S-100<sup>+</sup>/GS<sup>+</sup>, mientras que en adulto se observa un gran número de células S-100<sup>+</sup>/GS<sup>+</sup> en algunas zonas, como la cabeza del nervio óptico (\*). En la retina de adultos, las proteínas coexisten a nivel de los pies de las células de Müller y de sus somas (→), mientras que sus prolongaciones sólo presentan la proteína GS (▶).

CNO: cabeza del nervio óptico; Q: quiasma; R: retina; ZCN: zona caudal del nervio; ZMN; zona medial del nervio.

A-B: 250x

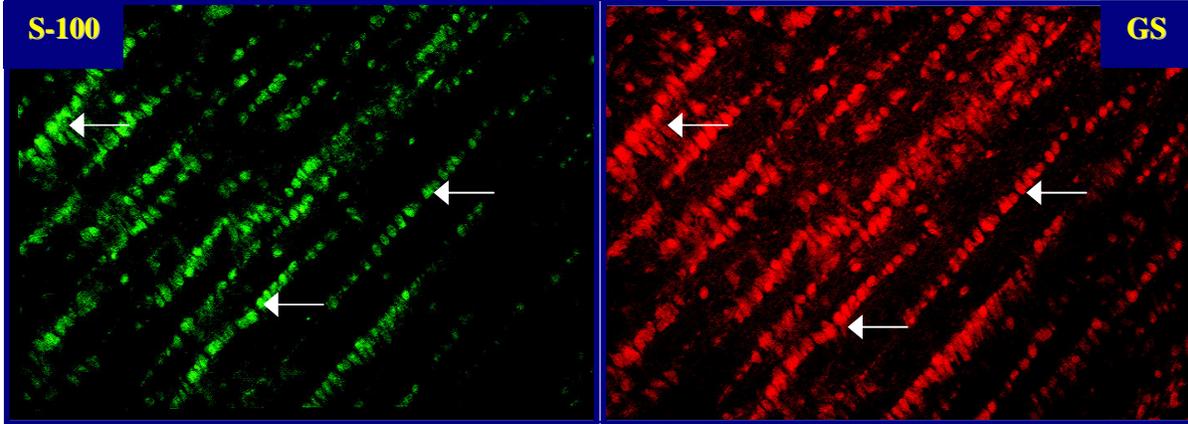
E-37

CNO



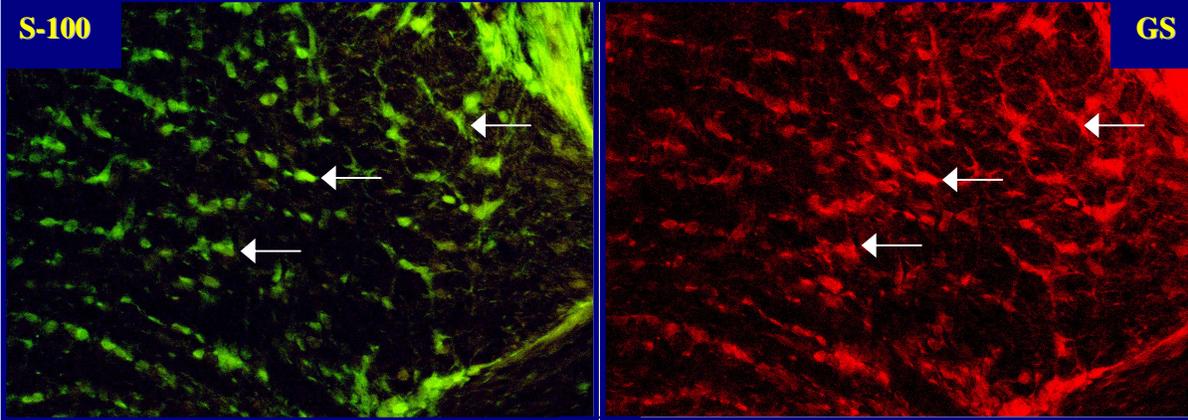
A

ZMN



B

ZCN/Q

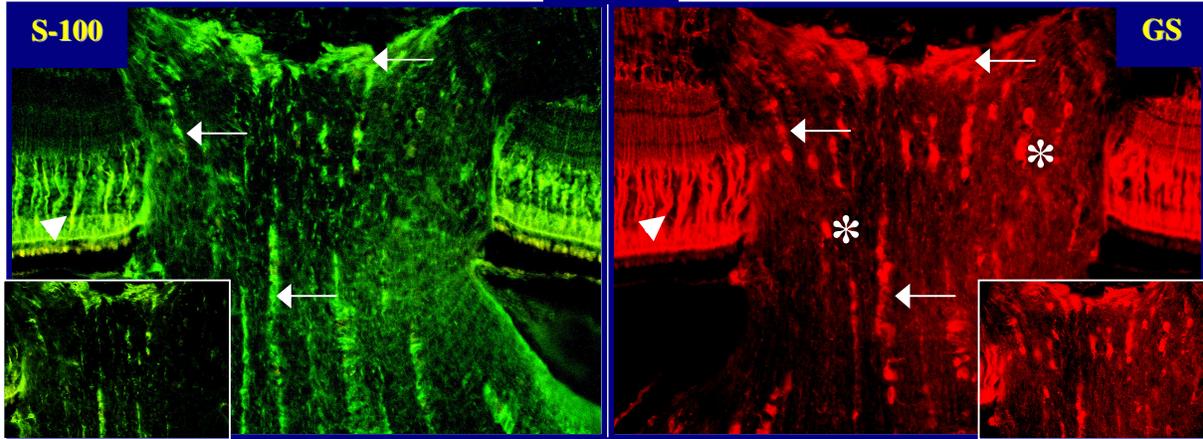


C

Fig. 24

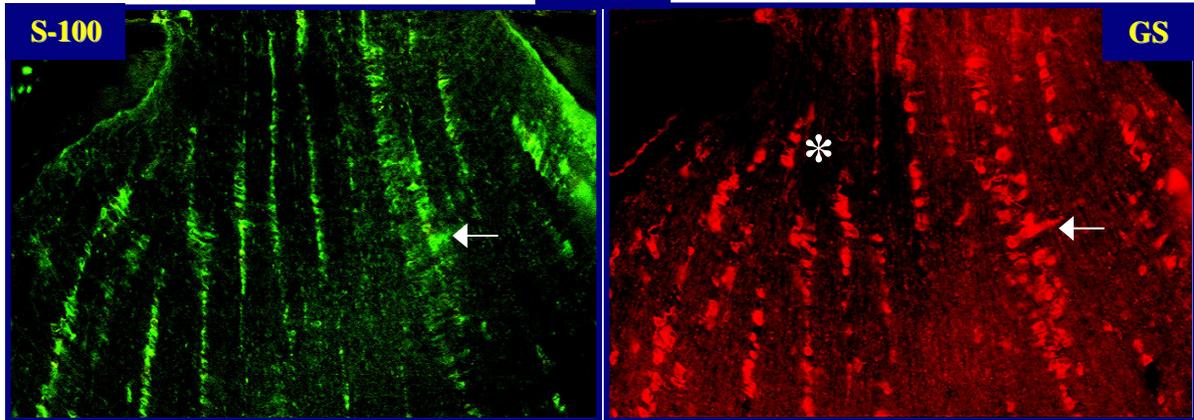
Adulto

CNO



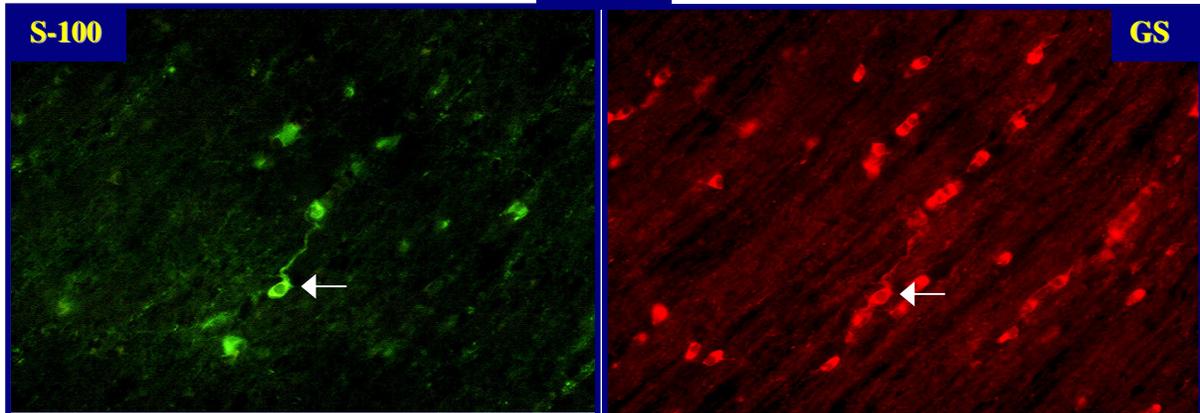
A

ZMN



B

TrO



C

Fig. 25

**Fig. 24.-** Doble inmunomarcaje con la proteína S-100 (verde) y GS (rojo) en el nervio óptico en E-37. A) En la cabeza del nervio óptico (**CNO**) se puede apreciar la coexpresión de ambos marcadores en la mayor parte de las células marcadas (flechas). B) En la zona medial del nervio (**ZMN**) existe una mayoría de células que presentan ambos marcadores (flechas). C) En la zona caudal del nervio (**ZCN**) también aparecen mayoritariamente células S-100<sup>+</sup>/GS<sup>-</sup> (flechas).

A-C: 950x.

---

**Fig. 25.-** Se muestra la coexistencia de las proteínas S-100 (verde) y GS (roja) en diferentes zonas de la retina y el nervio de adulto. A) Coexpresión de ambas proteínas en los somas de las células de Müller (►) y en la cabeza del nervio (**CNO**) también coexisten en algunas células (→), aunque otra población importante de células es S-100<sup>-</sup>/GS<sup>+</sup> (\*). B) En la zona medial del nervio (**ZMN**) predomina también la población S-100<sup>+</sup>/GS<sup>+</sup> (→) y S-100<sup>-</sup>/GS<sup>+</sup> (\*). C) Zona del tracto óptico (**TrO**), donde predominan las células S-100<sup>-</sup>/GS<sup>+</sup> (\*) y algunas S-100<sup>+</sup>/GS<sup>+</sup> (→).

A: 600x y 950x; B: 600x; C: 950x.

### **3. PROLIFERACIÓN CELULAR**

#### *3.1. INMUNOMARCAJE CON PCNA*

En la retina de E-33 se observan células PCNA<sup>+</sup> indiferenciadas principalmente en la parte externa de la retina que limita con la capa pigmentaria. El marcaje se hace algo más intenso en la retina periférica, hacia la zona de la ora serrata. En E-35 se observan algunas capas diferenciadas, con marcaje en la capa nuclear interna y externa (Fig. 27A), siendo más fuerte el marcaje en la retina marginal (Fig. 27B). A partir de E-37 se destaca la presencia de células redondeadas PCNA<sup>+</sup> en la capa ganglionar de la retina central y células fusiformes en la capa de nervio (Fig. 27E), reduciéndose el marcaje de la capa nuclear interna (Fig. 27C) que se concentra en la zona marginal de la retina (Fig. 27D, F). En este estadio, la capa plexiforme externa también presenta marcaje. En E-40 y eclosión destaca el claro descenso de la inmunorreactividad en la retina marginal (Fig. 27H) y se reduce en la capa ganglionar de la retina y la capa de nervio (Fig. 27G). En la capa nuclear interna se observan algunas células PCNA<sup>+</sup> principalmente en el límite con las capas plexiformes interna y externa. En ejemplares postnatales y adultos únicamente existe proliferación en la capa nuclear externa. En relación a la zona marginal de la retina no hemos observado células PCNA<sup>+</sup> (*Esquema 3*).

En la zona del disco óptico, a partir de la cual se originará el conus papillaris, desde el estadio E-33 se observan algunas células PCNA<sup>+</sup>, y se incrementa el marcaje en el conus a medida que avanza el desarrollo (Fig. 28A-C). Sin embargo, en ejemplares postnatales y adultos se observa un claro descenso, aunque permanecen algunas células en la zona medial y apical del conus (Fig. 28D).

La proliferación celular en el nervio óptico varía en función del estadio del desarrollo, alcanzando un mayor número de células inmunorreactivas en los estadios tempranos, y decreciendo progresivamente desde E-40 hasta ejemplares adultos (Fig.26).

En E-33 se observan células aisladas con morfología redondeada, distribuidas uniformemente en la cabeza del nervio óptico (Fig. 26 A), muy similar al marcaje en E-35 en esta misma zona (Fig. 29A, B). Sin embargo, desde E-37 hasta E-39 se intensifica

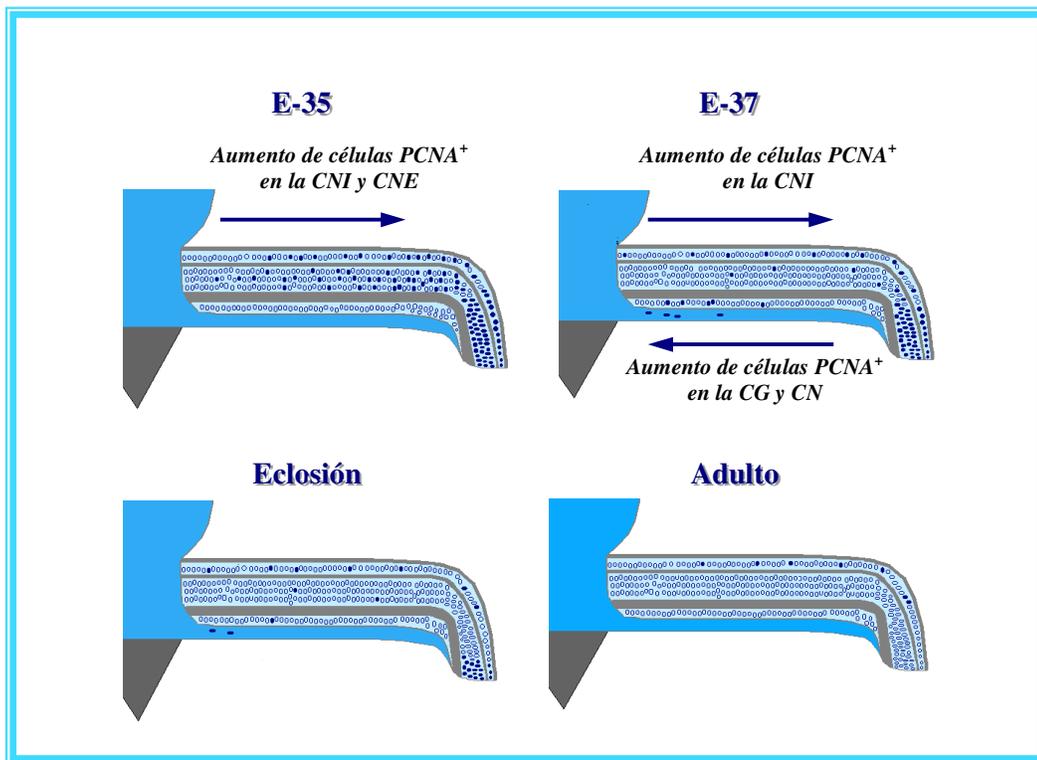
el marcaje y se observan células inmunorreactivas formando las hileras características de esta zona (Fig. 29C-D). A partir de E-40 empieza a disminuir el número de células marcadas, de manera que en eclosión se observan muy pocas en esta zona (Fig. 29E-F).

En cuanto a la zona medial y la zona caudal del nervio óptico, en E-33 presentan núcleos alargados PCNA<sup>+</sup> dispersos (Fig. 26A). El marcaje aumenta y en E-35 se observan células inmunorreactivas dispuestas en hileras en ZMN, y con forma estrellada en ZCN (Figs. 26B, 30A). El marcaje se presenta muy intenso desde el estadio E-37 hasta el E-39 a lo largo del nervio óptico (Fig. 30B) y a partir del estadio E-40 empieza a disminuir el número de células PCNA<sup>+</sup>. En eclosión se observan todavía células marcadas en las diferentes zonas del nervio óptico, aunque en número reducido (Figs. 26D, 30C).

En el quiasma óptico se observan algunas células PCNA<sup>+</sup> en E-35 (Fig. 31A), pero es a partir del E-37 hasta E-39 cuando se advierte una gran población de células inmunorreactivas en esta zona (Fig. 26D, 31B). En el tracto óptico también se observan células marcadas desde E-37, y disminuye el marcaje hasta eclosión, de manera que en estadios más avanzados no se observan células PCNA<sup>+</sup> en esta zona.

En relación al ventrículo del hipotálamo, en E-33 se encuentra tapizado por varias capas de células PCNA<sup>+</sup>, pero estas capas se van reduciendo conforme avanza el estadio de desarrollo, transformándose en una monocapa a partir de E-37. En E-35 algunas células periventriculares destacan del resto por presentar un fuerte marcaje PCNA<sup>+</sup>. En E-39 sólo existe marcaje desde la mitad del ventrículo hipotalámico hasta el agujero de Monrow, de manera que en el adulto únicamente se observa tinción en las células que se encuentran tapizando dicho orificio (*Esquema 4*).

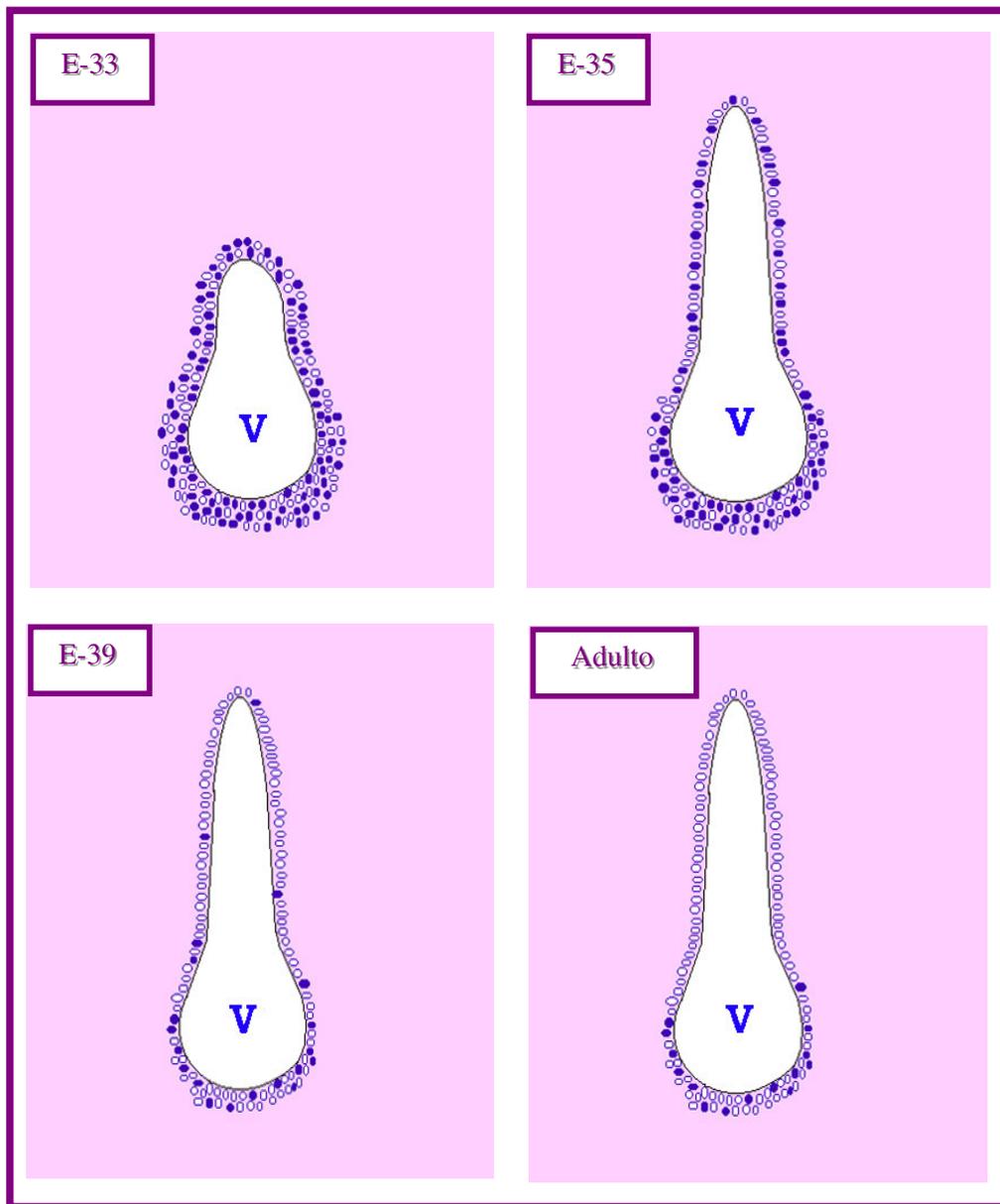
Esquema 3



Distribución de las células PCNA<sup>+</sup> en la retina durante la ontogenia de *G. galloti*. La expresión disminuye conforme avanza el desarrollo.

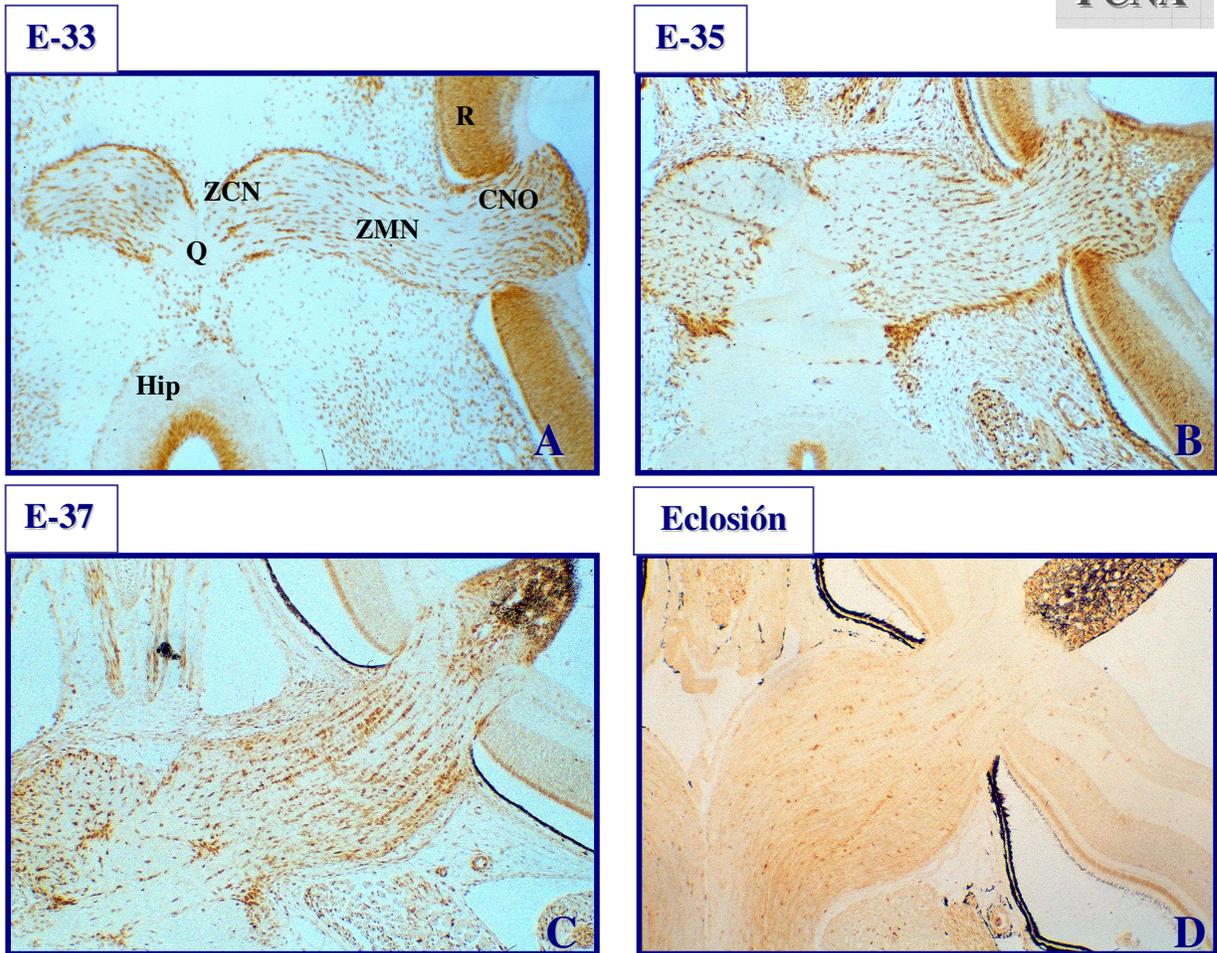
CG: capa ganglionar; CN: capa de nervio; CNE: capa nuclear externa; CNI: capa nuclear interna.

Esquema 4



Inmunomarcado PCNA<sup>+</sup> en la zona ventricular del hipotálamo de *G. galloti*.

V: ventrículo.



**Fig. 26.-** Evolución del marcaje anti-PCNA en diferentes estadios del desarrollo. Obsérvese la abundancia de células PCNA<sup>+</sup> en el nervio y la retina en E-33 (A), E-35 (B) y E-37 (C) y la disminución a partir de eclosión (D).

A-D: 230x.

**CNO:** cabeza del nervio óptico; **Hip:** hipotálamo; **Q:** quiasma; **R:** retina; **ZCN:** zona caudal del nervio; **ZMN:** zona medial del nervio.

**Fig. 27.-** Inmunomarcaje anti-PCNA<sup>+</sup> en la retina en desarrollo. A-B) En E-35 existe una alta actividad proliferativa en la capa nuclear interna (**CNI**) y capa nuclear externa (**CNE**) de la retina central (**RC**) (→ en A) y en la retina marginal (**RM**) (B). C-F) En E-37 disminuye el número de células PCNA<sup>+</sup> en la CNI de la RC (→ en C), pero aumenta el número de células positivas en la CNE (\* en C) y aparecen en la capa ganglionar (**CG**) y capa de nervio (**CN**) que limita con el vítreo (**Vi**). Disminuye el marcaje en la retina marginal (→ en D). Detalle de algunas células proliferativas en la CG y CN en E-37 (→ en E). Abundantes células marcadas en la RM (→ en F). G-H) Detalle de algunas células PCNA<sup>+</sup> en la CG en la RC (→ en G) y escasas células proliferativas en la RM de eclosión (→ en H).

A, D: 550x; B-C: 900x; E-H: 2270x.

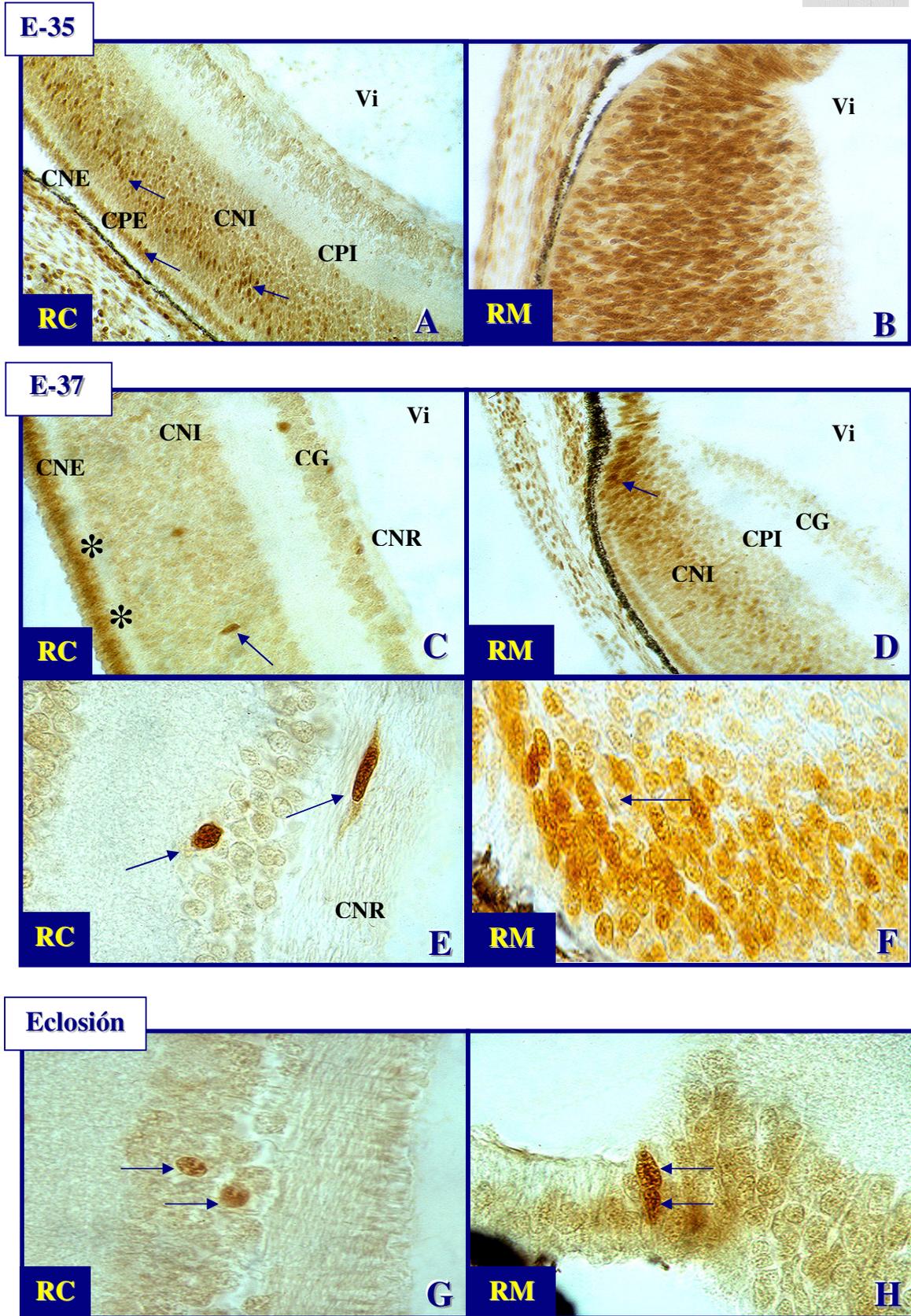
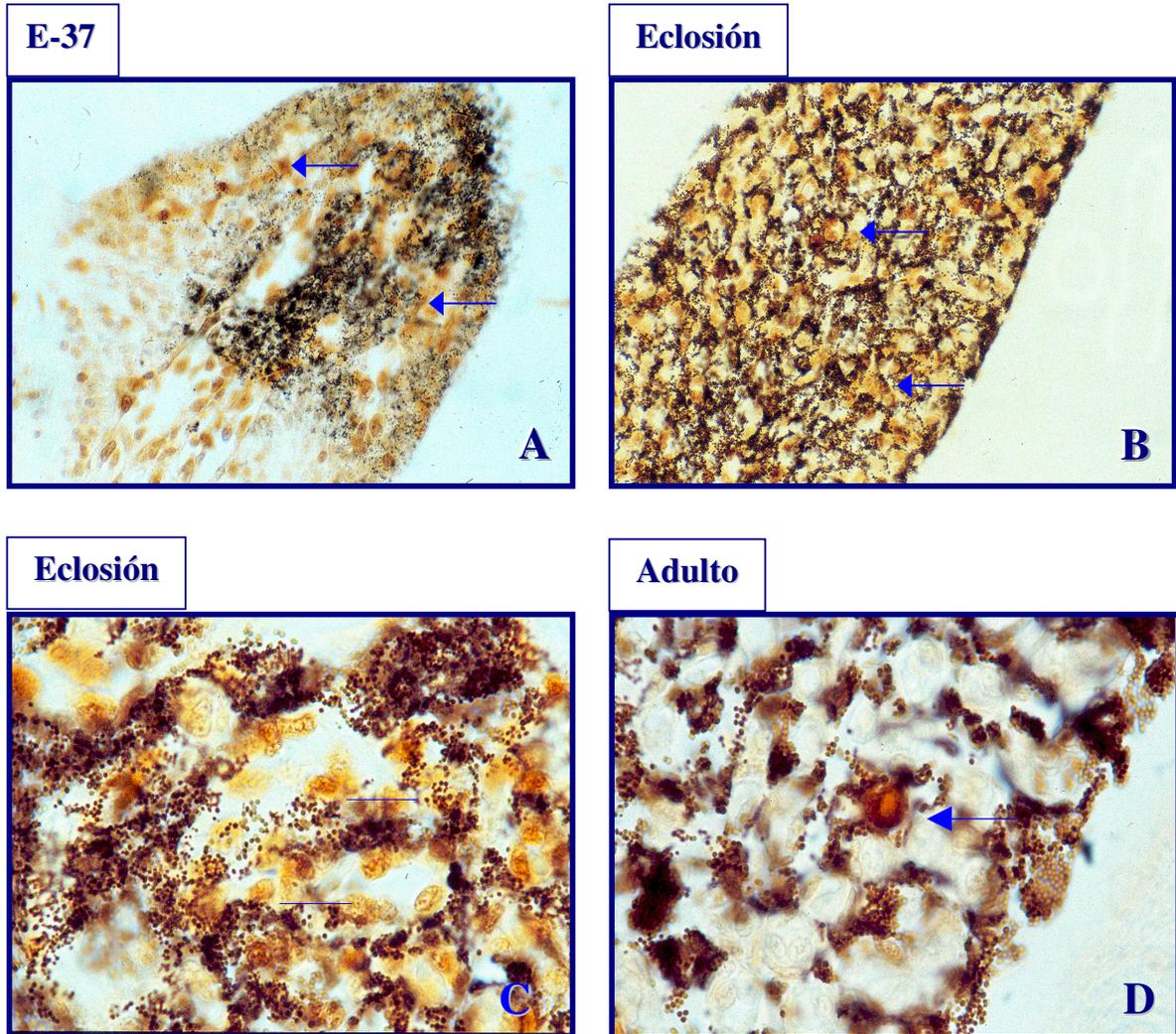
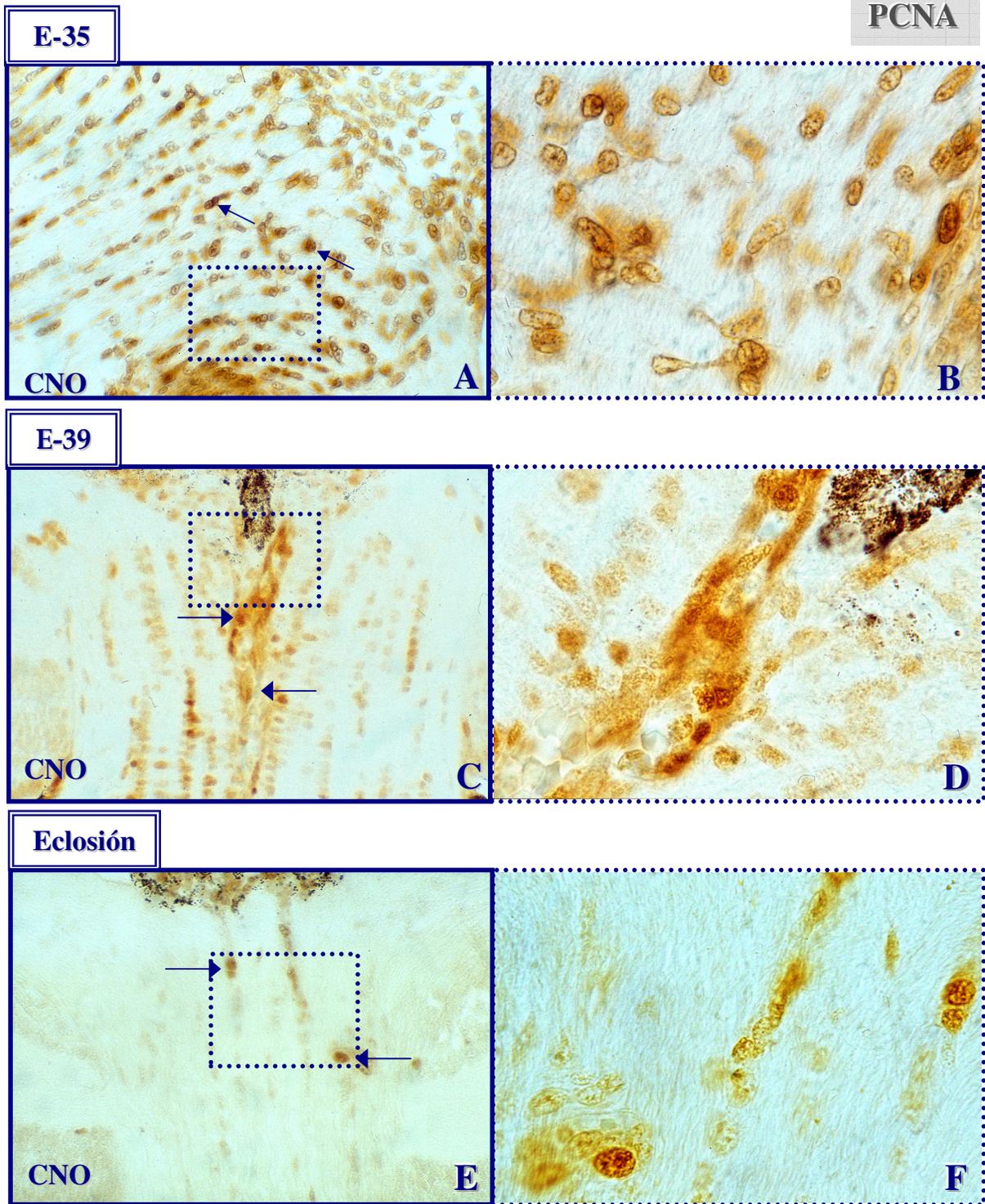


Fig. 27



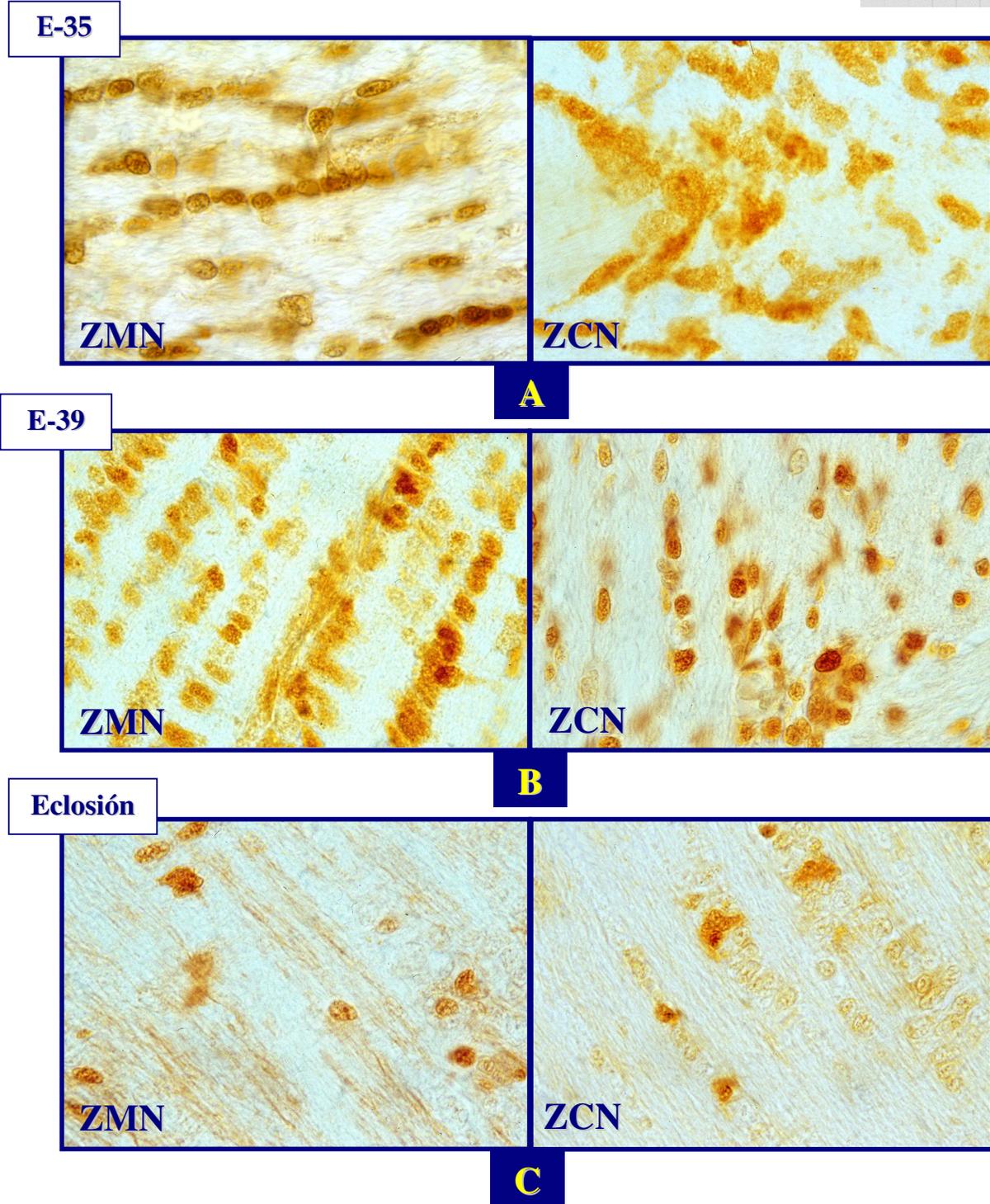
**Fig. 28.-** Células PCNA<sup>+</sup> en el **conus papillaris**. Abundantes células marcadas en E-37 (A) (→) y eclosión (B) (→). C) Detalle de células PCNA<sup>+</sup> en la zona medial del conus en eclosión (→). D) En adulto se observan algunas células aisladas PCNA<sup>+</sup> (→) en la zona apical del conus.

A- B: 900x; C-D: 2270x.



**Fig. 29.-** Inmunorreactividad para la PCNA en la cabeza del nervio óptico (CNO) durante el desarrollo. A) En E-35 se observa un gran número de células PCNA<sup>+</sup> distribuidas homogéneamente por toda la CNO (→). B) Detalle de esta zona en E-35. C) CNO en E-39, con células PCNA<sup>+</sup> en hilera localizadas principalmente en la zona central (→). D) Detalle de las células PCNA<sup>+</sup> en esta zona en E-39. E) En eclosión se observan pocas células marcadas (→). F) Aumento de la zona peripapilar en eclosión.

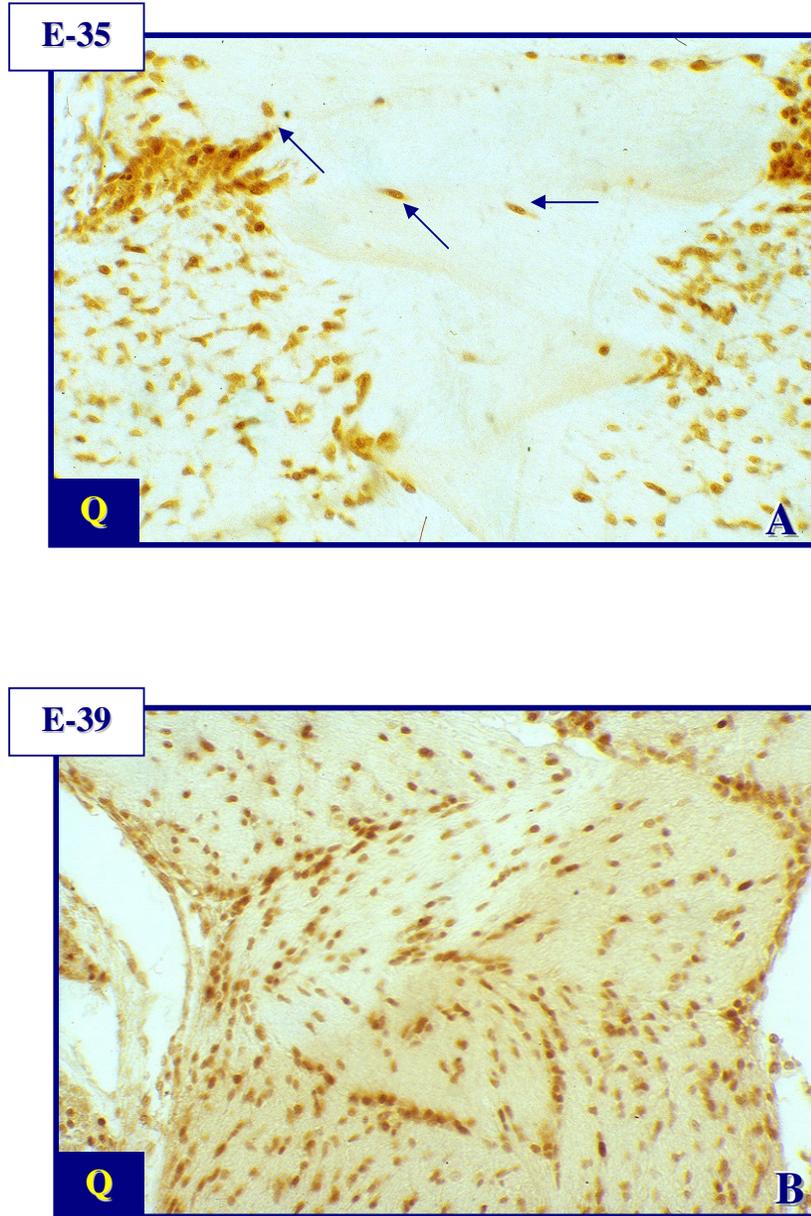
A, C, E: 950x; B, D, F: 2360x.



**Fig. 30.-** Inmunorreactividad para la PCNA en la zona medial del nervio (ZMN) y en la zona caudal del nervio (ZCN) en diferentes estadios. Obsérvese el descenso en el número de células PCNA<sup>+</sup> a partir del estadio de eclosión. ZMN y ZCN en E-35 (A), en el E-39 (B) y en Eclosión (C).

A-C: 2270x.

PCNA



**Fig. 31.-** Las células proliferativas PCNA<sup>+</sup> comienzan en el quiasma óptico (Q) en E-35 (A) (→). Obsérvese que el número de células inmunorreactivas ha aumentado considerablemente en E-39 (B).

A-B: 450x.

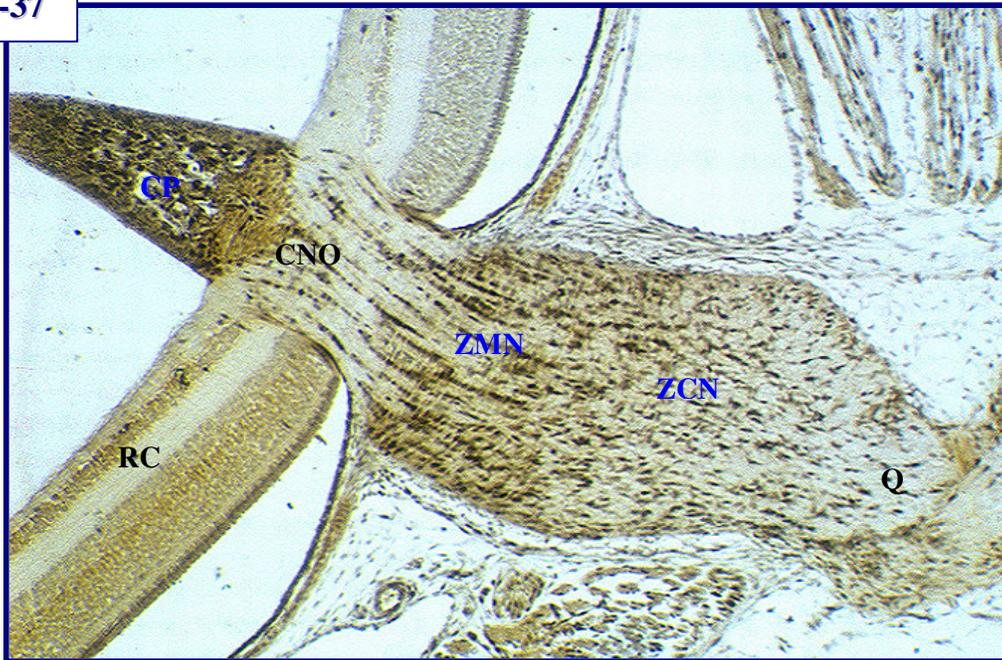
### 3.2. DOBLES MARCAJES INMUNOHISTOQUÍMICOS: S-100/PCNA

Durante el desarrollo de la retina, generalmente estos dos marcadores no coexisten en la misma célula, aunque se pueden observar algunas células aisladas en la capa nuclear interna (E-37) con ambos marcadores en determinados estadíos. En E-35 se expresan ambos marcadores, aunque el marcaje es débil principalmente para la S-100, por tanto el doble marcaje aún no se puede distinguir con nitidez (Fig. 33A). En E-37 el marcaje S-100<sup>+</sup> aumenta en la capa nuclear interna de la retina mientras que el de PCNA disminuye, siendo escasas las células S-100<sup>+</sup>/PCNA<sup>+</sup> en dicha capa (Fig. 33B). Durante los estadíos posteriores se repite el mismo patrón de marcaje con predominio de las células S-100<sup>+</sup>/PCNA<sup>-</sup> o bien S-100<sup>-</sup>/PCNA<sup>+</sup> (Fig. 33C-D). En la retina marginal no se observan células doblemente marcadas (Fig. 33E-F), observándose en adulto células PCNA<sup>+</sup> en la capa nuclear externa rodeadas por las prolongaciones de las células de Müller (Fig. 33G).

Durante el desarrollo del nervio óptico se pueden observar abundantes células doblemente marcadas, principalmente desde E-35 hasta E-39 (Fig. 34). Desde el estadío E-35 se distinguen células positivas para ambos marcadores (Fig. 34A). En E-37 se observan muchas células que coexpresan estas proteínas en el nervio (Fig. 32), y desde este estadío hasta E-39 aumenta la reactividad de ambos marcadores (Fig. 34B-E), para luego volver a disminuir progresivamente hasta ejemplares adultos, donde se observan algunas células aisladas S-100<sup>+</sup>/PCNA<sup>+</sup> (Fig. 34F).

Células PCNA<sup>+</sup> tapizan el ventrículo hipotalámico durante el desarrollo, como se ha descrito en el apartado del marcaje simple (*Esquema 4*), y sólo en los estadíos más tempranos (E-35) se observa colocalización de ambos marcadores.

E-37



**Fig. 32.-** Doble marcaje S-100 (marrón) y PCNA (negro) en el nervio óptico y la retina del estadio E-37. Obsérvese la gran cantidad de células S-100<sup>+</sup>/PCNA<sup>+</sup>.

200x

CNO: cabeza del nervio óptico; CP: conus papillaris; Q: quiasma; RC: retina central; ZMN: zona medial del nervio; ZCN: zona caudal del nervio.

**Fig. 33.-** Expresión de S-100 (marrón) y PCNA (negro) en la retina. A) En E-35 la retina central (RC) presenta abundantes células S-100<sup>+</sup>/PCNA<sup>+</sup> (\*). B) En E-37, la capa nuclear interna (CNI) presenta células de Müller S-100<sup>+</sup> (\*) y alguna célula S-100<sup>+</sup>/PCNA<sup>+</sup> aislada (→). C) En la capa ganglionar (CG) se distinguen células S-100<sup>+</sup>/PCNA<sup>+</sup> (\*) y otras S-100<sup>+</sup>/PCNA<sup>-</sup> (→). D) En eclosión, células S-100<sup>+</sup>/PCNA<sup>+</sup> en la CG y en CNI (\*) y los pies de las células de Müller S-100<sup>+</sup> limitando con el vítreo (Vi) (→). E) La retina marginal (RM) presenta abundantes células S-100<sup>+</sup>/PCNA<sup>+</sup> en E-35 (\*). F) En E-37 predominan las células S-100<sup>+</sup>/PCNA<sup>+</sup> (\*). G) Sin embargo, en adulto abundan las células S-100<sup>+</sup>/PCNA<sup>-</sup> (\*), aunque se observan células S-100<sup>+</sup>/PCNA<sup>+</sup> en la capa nuclear externa (CNE) (→).

A-G: 2200x.

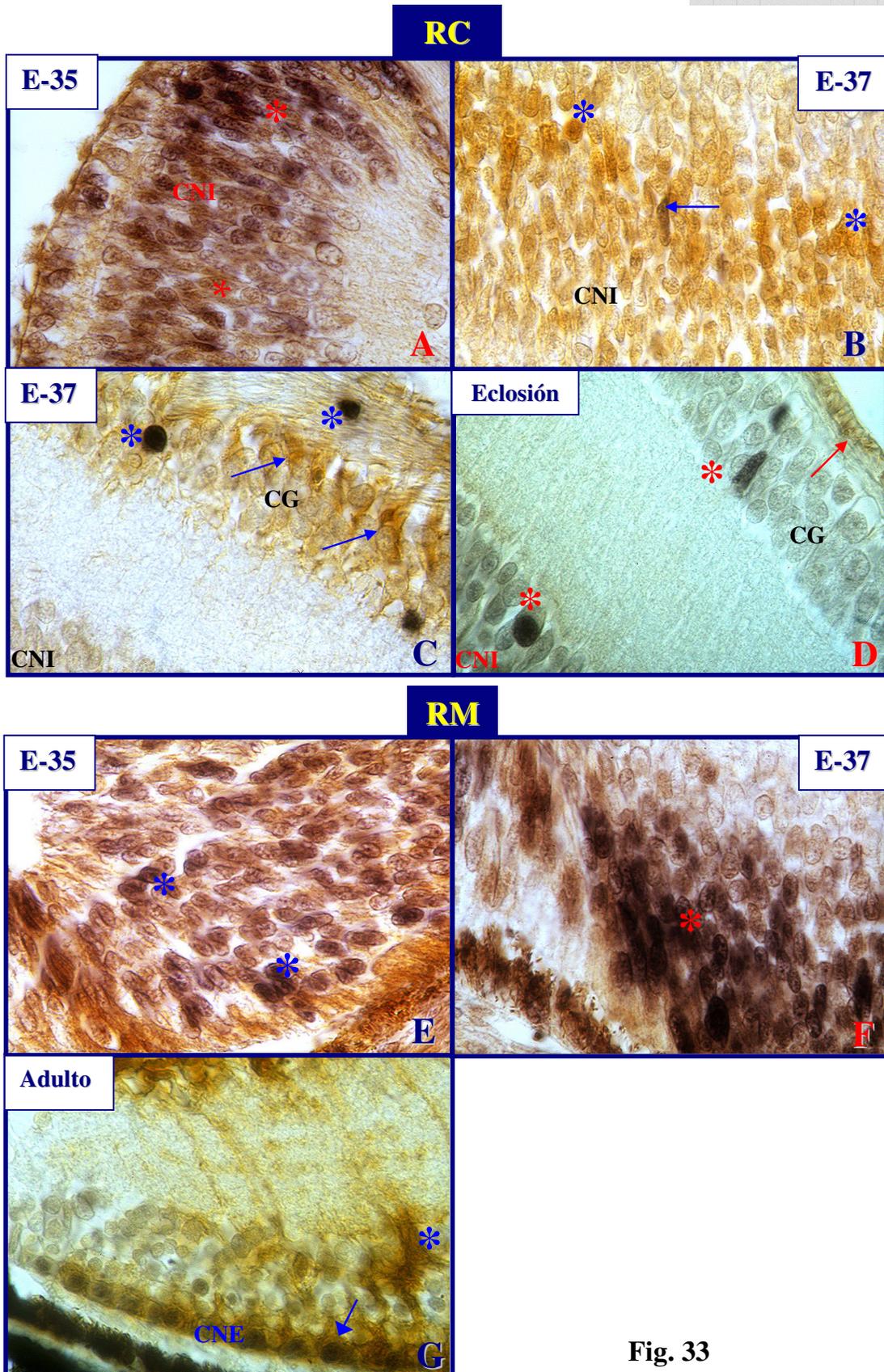
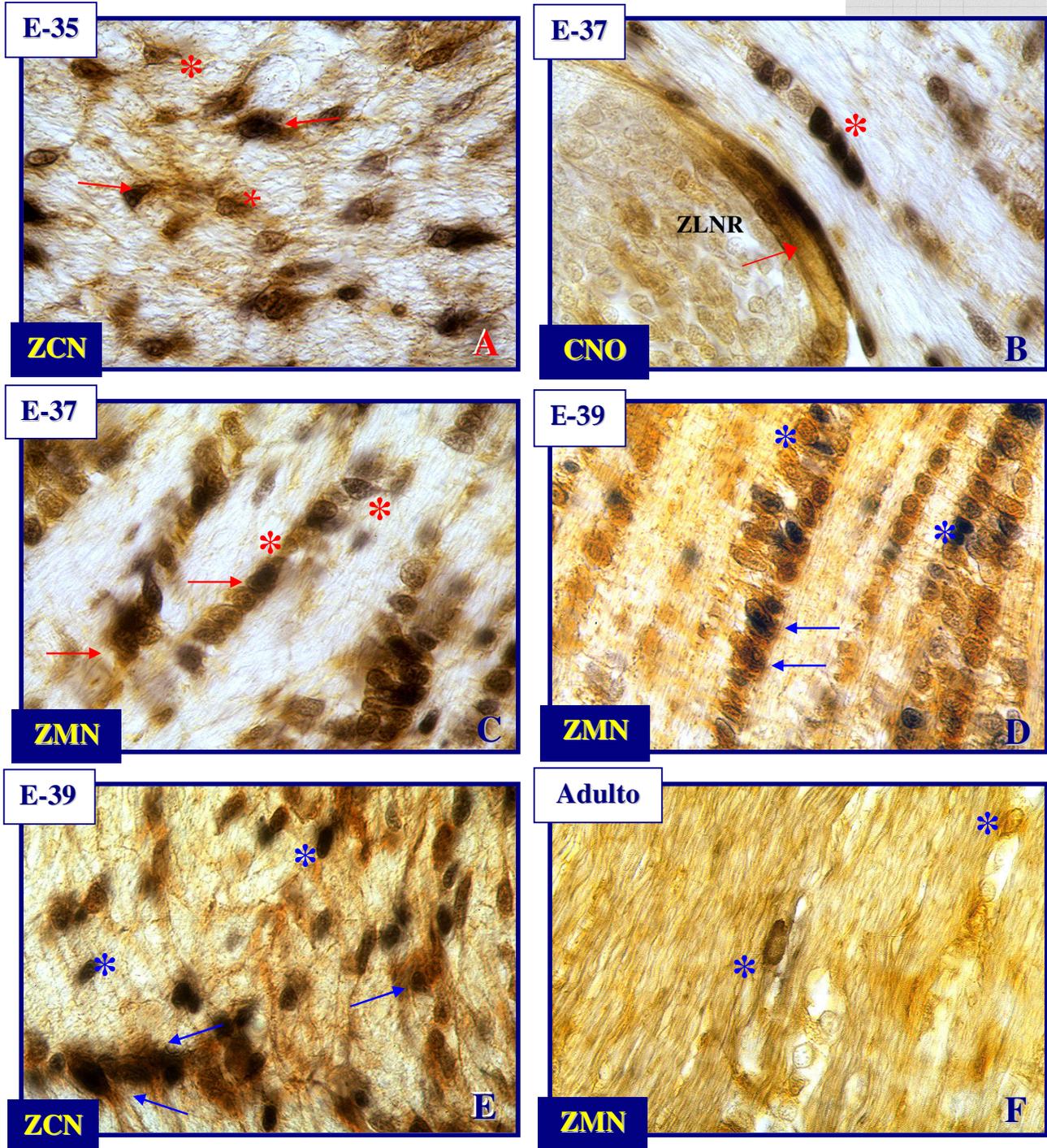


Fig. 33



**Fig. 34.-** Dobles marcajes S-100 (marrón) y PCNA (negro) en el nervio óptico. A) En E-35 la zona caudal del nervio (ZCN) presenta células S-100<sup>+</sup>/PCNA<sup>+</sup> (→) y otras S-100<sup>+</sup>/PCNA<sup>-</sup> (\*). B) En la cabeza del nervio (CNO) en E-37, existe un fuerte marcaje PCNA<sup>+</sup> (\*) y la zona limitante nervio y retina (ZLNR) presenta células S-100<sup>+</sup>/PCNA<sup>+</sup> (→). C) La zona medial del nervio (ZMN) presenta abundantes células S-100<sup>+</sup>/PCNA<sup>+</sup> en E-37 (→) y otras S-100<sup>+</sup>/PCNA<sup>-</sup> y S-100<sup>+</sup>/PCNA<sup>+</sup> (\*). D) Células doblemente marcadas en E-39 (→) y S-100<sup>+</sup>/PCNA<sup>-</sup> y S-100<sup>+</sup>/PCNA<sup>+</sup> (\*). E) En la zona caudal del nervio (ZCN) de E-39 se observa coexpresión en algunas células (→) mientras que otras presentan sólo uno de los marcadores, S-100<sup>+</sup>/PCNA<sup>+</sup> (\*). F) En adulto disminuyen las células S-100<sup>+</sup>/PCNA<sup>-</sup> y S-100<sup>+</sup>/PCNA<sup>+</sup> (\*).

A-F: 2450x.

### 3.3. DOBLES MARCAJES INMUNOHISTOQUÍMICOS: GFAP/PCNA

La proteína GFAP comienza a expresarse en E-37, y a partir de este estadio se estudia su coexistencia con la PCNA.

En la retina, no existe coexistencia, pues la GFAP marca sólo los pies de las células de Müller de postnatales y adultos, y la PCNA es negativa o reducida a alguna célula de la capa nuclear externa en estos estadios.

En el nervio óptico de E-37, la actividad PCNA es muy intensa, mientras que la proteína GFAP comienza a expresarse en alguna célula aislada en determinadas regiones, como en la base del conus papillaris, cabeza del nervio y en la zona medial del nervio. Algunas células en la cabeza del nervio y la zona medial expresan ambos marcadores (Figs. 35A-B). En E-39 se observa que existen muchas células que expresan ambos marcadores en la zona medial del nervio (Fig. 35E), mientras que en otras zonas existen células con uno sólo de los marcadores, como en la cabeza del nervio óptico (Fig. 35C). Las prolongaciones de la glía peripapilaris, en la base del conus papillaris, aparecen intensamente marcadas con GFAP, lo que dificulta distinguir la coexistencia en estas células (Fig. 35D). En la zona caudal del nervio existen únicamente células GFAP/PCNA<sup>+</sup> (Fig. 35F). En eclosión el número de células PCNA<sup>+</sup> y las células doblemente marcadas disminuyen en el nervio óptico, desapareciendo prácticamente en postnatales y adultos.

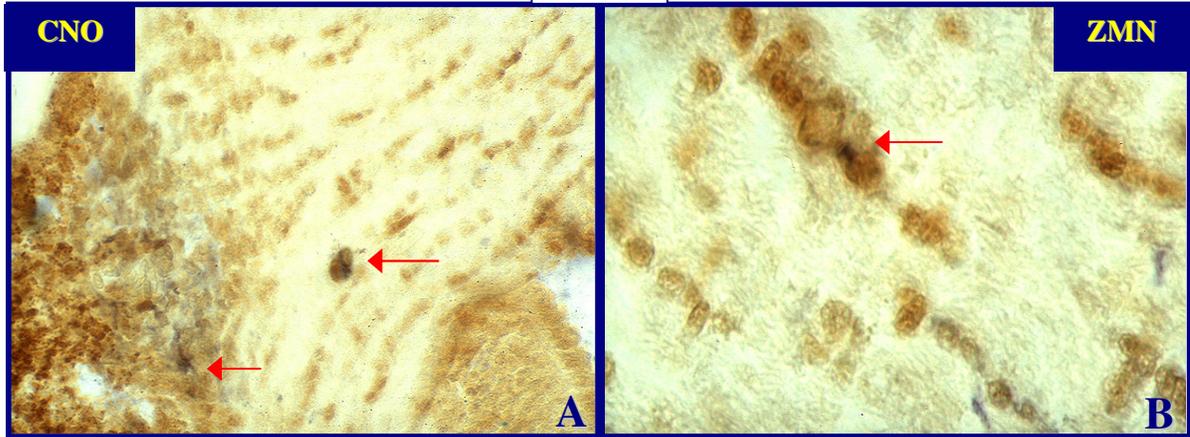
---

**Fig. 35.-** Coexpresión de las proteínas PCNA (marrón) y GFAP (azul). A, B) En la cabeza del nervio óptico (A) (CNO) y en la zona medial del nervio (B) (ZMN) en E-37, se observa alguna célula aislada GFAP<sup>+</sup>/PCNA<sup>+</sup> (→). C) En la CNO de E-39 se observan células GFAP<sup>+</sup>/PCNA<sup>-</sup> y GFAP<sup>-</sup>/PCNA<sup>+</sup> (→). D) Detalle celular de la zona peripapilaris (ZP), donde se aprecian multitud de prolongaciones celulares GFAP<sup>+</sup> (→) y núcleos PCNA<sup>+</sup> (\*). E) Detalle de la ZMN donde se observan algunas células con ambos marcadores (→). F) En la zona caudal del nervio (ZCN) sólo existen células GFAP/PCNA<sup>+</sup>.

A, C, F: 950x; B, D, E: 2400x.

GFAP/PCNA

E-37



E-39

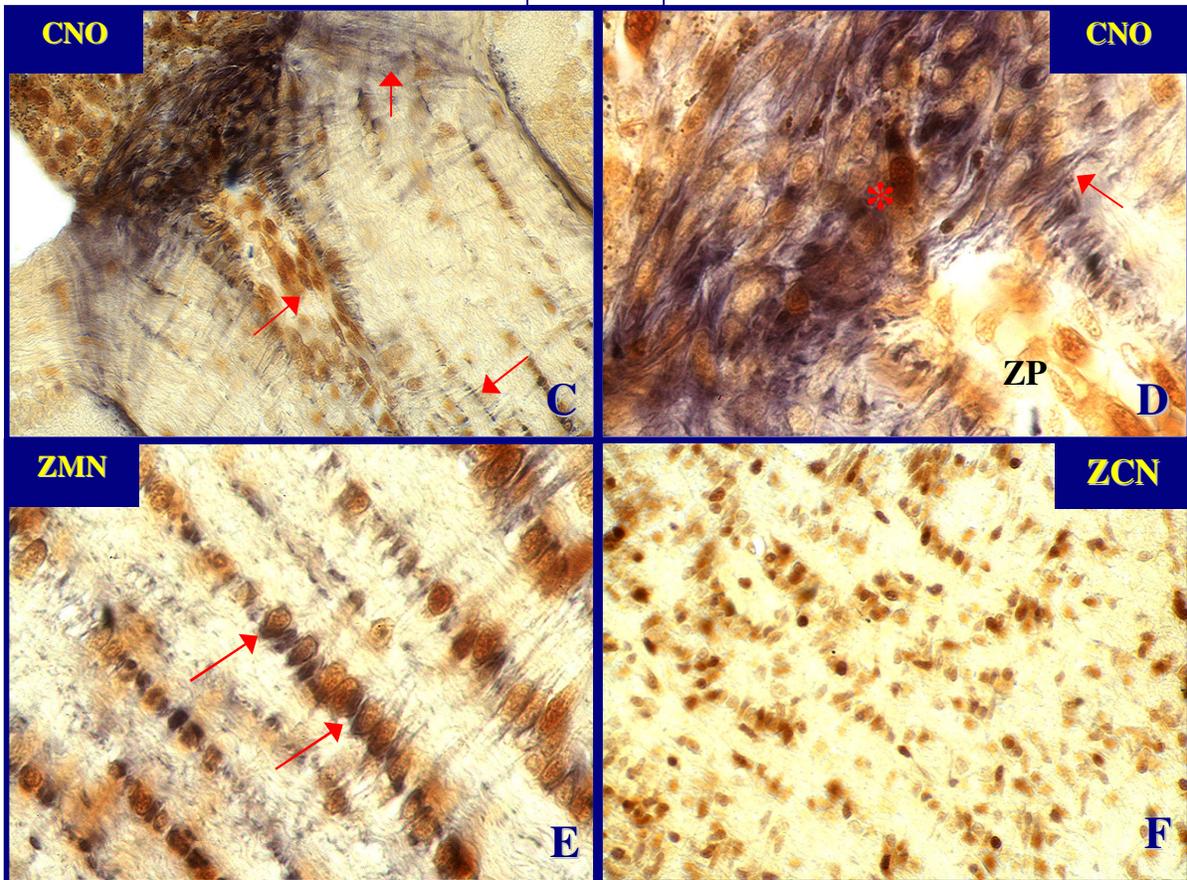


Fig. 35

## **DISCUSIÓN**

## **1. HETEROGENEIDAD DE LA POBLACIÓN GLIAL EN LA RETINA Y EL NERVIÓ ÓPTICO DURANTE LA ONTOGÉNESIS.**

### *1.1. IDENTIFICACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LAS CÉLULAS MACROGLIALES.*

Los marcadores que se discuten a continuación se estudian por primera vez en las células gliales de la retina y el nervio óptico de *G. galloti* con objeto de conocer su distribución y posibles funciones durante la ontogenia y comparar con el proceso de desarrollo y regeneración en otros vertebrados.

#### *1.1.1. La proteína S-100 como marcador glial en el nervio óptico.*

La proteína S-100 se encuentra implicada en diversas actividades intracelulares dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  (Rickmann & Wolff, 1995a; Schäfer & Heizmann, 1996), como la fosforilación de proteínas, la regulación de la actividad enzimática y de la movilidad de los componentes del citoesqueleto, actúa como factor trófico durante el desarrollo y en lesiones, y dependiendo de las concentraciones puede actuar también como factor tóxico (Donato, 2001). Además, interviene en la proliferación y diferenciación celular (Donato, 1999), en la estimulación del crecimiento de las neuritas (Winningham-Mayor et al., 1989) y en la formación y reparación de la mielina (Rickmann & Wolff, 1995a).

En relación al nervio óptico en *G. galloti* se observa un gran número de células S-100<sup>+</sup> durante el desarrollo, población que se mantiene en ejemplares adultos. Su presencia sugiere que podría estar asociada con la morfogénesis y la diferenciación del nervio, y su alto contenido en ejemplares adultos podría relacionarse con la reparación del sistema en caso de traumatismos. Al respecto, en el nervio óptico y la retina de ejemplares adultos de *G. galloti* (Arbelo-Galván et al., resultados no publicados), se observa un aumento de esta proteína después de lesiones agudas. Estos hechos coinciden con los observados en la vía óptica de peces donde se constata su papel en la regeneración y remielinización (Velasco et al., 1997), así como en mamíferos, cuya presencia se relaciona con el proceso regenerativo de la retina (Karim & Itoh, 1997; Gunduz et al., 1999).

Esta proteína se encuentra en astrocitos en el nervio óptico de peces (Vecino et al., 1997; Lillo et al., 2002), y oligodendrocitos en la corteza visual en gato (Dyck et al., 1993) y en el techo óptico de *G. galloti* (Romero-Alemán et al., 2003). En este sentido, nuestros resultados demuestran que la proteína S-100, excepto en la retina, se expresa en diferentes tipos celulares en la vía óptica en desarrollo. Así, en la parte intraocular del nervio se observan dos subpoblaciones, una cercana al conus papillaris formada por células S-100<sup>+</sup> con procesos muy largos y anexos a los vasos sanguíneos, y otra distal al conus con procesos más cortos y disposición en hilera. Además, en la parte extraocular del nervio, existen otras dos subpoblaciones, en la zona medial con abundantes células dispuestas en hilera que podría tratarse de la misma subpoblación localizada en la zona distal del conus aunque con un mayor número de células, y en la zona caudal con células aisladas, de morfología estrellada o redondeada. Esto demuestra que la proteína S-100 se expresa en diferentes tipos de células gliales, lo que podría confirmar su importancia en los procesos celulares que tienen lugar durante el desarrollo y en adultos.

Los **dobles marcajes S-100/GFAP**, nos indican que ambos marcadores coexisten en las subpoblaciones de la cabeza del nervio óptico (CNO), principalmente en la base del conus papillaris, y en la zona medial del nervio (ZMN), desde E-37 hasta ejemplares adultos, sugiriendo que la S-100 podría expresarse en precursores y en astrocitos maduros. Sin embargo, en estas zonas también se observan subpoblaciones de astrocitos GFAP<sup>+</sup>/S-100<sup>-</sup>. En relación a estos datos, estudios realizados en peces (Lillo et al., 2002), reptiles (Dávila et al., 1987), aves (Gerhardt et al., 1999; Schuck et al., 2000; Quesada et al., 2004) y mamíferos (Ye & Hernández, 1995; Triviño et al., 1996; Ramírez et al., 1998; Salazar et al., 1998), coinciden con nuestros resultados ya que en la zona intraocular del nervio se observan diferentes subpoblaciones de astrocitos específicos de esta zona. Estos astrocitos cumplirían una función esencial en la orientación y protección de los axones que salen de la retina hacia el nervio.

Por otro lado, también se observan células sólo S-100<sup>+</sup> en la CNO y ZMN, abundantes desde E-37 y que permanecen en adulto. Éstas podrían ser precursores de oligodendrocitos, posiblemente relacionadas con la morfogénesis o con el proceso de mielinización. Este hecho también ha sido corroborado por Santos (2004) en esta

especie, observándose marcadores específicos de oligodendrocitos inmaduros en estas zonas (4F2, 12F7 y 14F7) y mediante estudios ultraestructurales.

Sin embargo, en la zona caudal del nervio (ZCN) durante E-37/E-39 se observa un aumento de la expresión de S-100 y su coexistencia con marcadores específicos de oligodendrocitos inmaduros (4F<sub>2</sub>) (Santos, 2004), lo que podría indicar su posible papel en el proceso de mielinización. Así mismo, en ejemplares adultos se observan principalmente células S-100<sup>+</sup> que podrían ser subpoblaciones de oligodendrocitos maduros, observados también en estudios ultraestructurales en esta zona (Santos, com. pers.) y en otras áreas del cerebro de *G. galloti* (Romero-Alemán et al., 2003), cuya función podría relacionarse con el mantenimiento de la mielina.

Por otro lado, y teniendo en cuenta el alto marcaje observado con vimentina en la ZCN en adultos, estas células podrían ser astrocitos inmaduros, confirmación que se realizará en breve con los dobles marcajes de S-100/vimentina.

En cuanto a los **dobles marcajes S-100/GS**, estas dos proteínas coexisten en la mayor parte del nervio óptico, como ocurre en otras áreas del SNC de *G. galloti* (Romero-Alemán et al., 2003). En algunas zonas, concretamente en la CNO y la ZMN, se observan células S-100<sup>+</sup>/GFAP<sup>+</sup>/GS<sup>+</sup>, lo que sugiere que podría tratarse de otra subpoblación astrocitaria. En este caso, y durante el desarrollo de la vía óptica de *G. galloti*, la proteína GS aumenta en adultos, como ocurre en otras áreas del cerebro de mamíferos (Fages et al., 1988), hecho que podría estar asociado con la diferenciación de los astrocitos GS<sup>+</sup> (Caldani et al., 1982; Patel et al., 1982). La expresión de GS en la CNO de *G. galloti*, parece tener un papel funcional clave, ya que en la vía óptica de peces sólo se observa en las células de Müller (Lillo et al., 2002), y en aves las células GS<sup>+</sup> son escasas en la CNO (Gerhardt et al., 1999; Schuck et al., 2000). En relación a estos hechos sugerimos que, como en mamíferos (Bringmann et al., 1998), la función de la GS en *G. galloti* sería la de impedir altas concentraciones de glutamato y de amonio al medio extracelular. Además, en la CNO de pollo la presencia de estas células GS<sup>+</sup> se ha relacionado con la expresión de B-cadherinas, moléculas que participan en la guía axonal (Gerhardt et al., 2000).

En este estudio se observa que la subpoblación de células gliales de la base del conus papillaris expresa un amplio rango de proteínas como la S-100, GFAP, GS, vimentina, así como otros estudios han descrito la presencia de algunas proteínas propias de oligodendroglía inmadura, como el 4F2, 12F7 y 14F7 (Santos, 2004). Estos datos coinciden con aves, en relación a la expresión de un amplio abanico de moléculas para astrogliá, glía radial (3CB2), oligodendroglía (MOSP), e incluso para neuronas (3BA8) (Quesada et al., 2004), aunque en *G. galloti* aún no se han detectado marcadores para estas últimas. La relación de estas células con los vasos sanguíneos y la diversidad de proteínas expresada en esta zona, nos sugiere que podría tratarse de una subpoblación homóloga a la glía peripapillaris descrita en aves por Schuck et al (2000).

En relación al tracto óptico, existen células que expresan S-100, GS y GFAP en ejemplares adultos, aunque sólo se observa coexistencia de GS y GFAP en algunas células (Viñoly, com. pers.). Estos hechos podrían indicar nuevamente la existencia de distintas subpoblaciones de astrocitos cuyos perfiles antigénicos serían S-100<sup>-</sup>/GFAP<sup>+</sup>/GS<sup>-</sup> y S-100<sup>-</sup>/GFAP<sup>+</sup>/GS<sup>+</sup>, y posibles oligodendrocitos S-100<sup>+</sup>/GFAP<sup>-</sup>/GS<sup>-</sup> y S-100<sup>-</sup>/GFAP<sup>-</sup>/GS<sup>+</sup>. Esta gran variedad antigénica podría también indicar un grado de especialización funcional diferente en dicha zona.

Finalmente, durante el desarrollo de *G. galloti* la proteína S-100 se expresa principalmente en células con características de astrocitos en la CNO y ZMN. Sin embargo, en el tracto óptico de adultos se observa en subpoblaciones que podrían ser oligodendrocitos, ya que son células S-100<sup>+</sup>/GFAP<sup>-</sup>/Vim<sup>-</sup>. Las poblaciones de astrocitos de la ZMN coinciden con los datos ultraestructurales obtenidos en tortuga, donde el número de células astrocitarias aumenta con respecto a otras zonas del nervio y se disponen en columnas paralelas (Dávila et al., 1987). Así mismo, en *G. galloti* se observan algunas células S-100<sup>+</sup> en la CNO, posiblemente oligodendrocitos, que podrían estar relacionados con el mantenimiento de la mielina, hecho observado también en tortuga cerca de los axones mielinizados (Dávila et al., 1987).

Todo ello demuestra que existe una gran variabilidad y heterogeneidad en las poblaciones gliales del nervio óptico, lo que aumenta la complejidad con respecto a su funcionalidad y permite una mayor plasticidad en el sistema.

1.1.2. Maduración de poblaciones astrocitarias en función de la expresión de vimentina y GFAP.

La distribución de los astrocitos en el nervio óptico proporciona a los axones un soporte estructural y metabólico en su trayectoria hacia el cerebro (Salazar et al., 1998). Los trabajos sobre las poblaciones astrocitarias, principalmente en la cabeza del nervio óptico en otros grupos de vertebrados, son numerosos. Sin embargo, la escasez de información en reptiles es notoria en la vía óptica.

La GFAP ha sido considerada como marcador característico de astrocitos maduros (Eng, 1980; Oteniente et al., 1983), mientras que la vimentina lo ha sido de astrocitos inmaduros (Starger et al., 1978; Ramaekers, 1980; Dahl et al., 1981a; Bignami et al., 1982; Cochard & Paulin, 1984; Pixley & De Vellis, 1984). Sin embargo, estudios recientes consideran la posibilidad de que la GFAP se exprese en células madre multipotentes, capaces de dar lugar a neuronas y células gliales (Steindler & Laywell, 2003). Además, ambas proteínas coexisten en ejemplares adultos (Shaw et al., 1981; Calvo et al., 1990; Yang & Hernández, 2003), lo que podría reflejar una adaptación fenotípica a las condiciones del medio como es la relación con la mielina o con otros factores (Calvo et al., 1990).

En el nervio óptico de *G. galloti*, principalmente en la CNO y la ZMN se observan células vimentina<sup>+</sup> en estadios tempranos (E-35/37) y abundantes células GFAP<sup>+</sup> desde el E-39 hasta adultos. Al respecto, las células vimentina<sup>+</sup> disminuyen en la CNO y en la ZMN desde E-39 hasta adultos.

Así mismo, entre E-37 y E-39 ambos marcadores coexisten en las mismas células en dichas zonas, como también se constata en el nervio óptico de mamíferos (Calvo et al., 1990) y en otras áreas del cerebro de la especie en estudio (Monzón-Mayor et al., 1990a; Yanes, et al 1990). Estos cambios de células Vim<sup>+</sup>, Vim<sup>+</sup>/GFAP<sup>+</sup>, GFAP<sup>+</sup> probablemente estén relacionados con la transformación de células inmaduras a maduras durante el proceso de gliogénesis y neurogénesis en *G. galloti* (Monzón-Mayor et al., 1990a; Yanes, et al 1990). En ratón, Schnitzer et al. (1981), sugirieron que podían coexistir durante determinados estadios del desarrollo estos dos sistemas de filamentos intermedios (uno con GFAP y otro con vimentina) en las mismas células en ratón.

Además, la presencia de ambas proteínas en algunas poblaciones celulares podría estar relacionada con la formación de heteropolímeros, como se ha descrito anteriormente en la glía de Bergmann, en las que se observó que la GFAP se ensambla correctamente si se expresa vimentina (Giménez Y Ribotta et al., 2000).

Todo ello parece indicar que la maduración de las células gliales del nervio presenta un determinado gradiente, siendo las primeras células en madurar y perder la vimentina, las primeras que expresan esta proteína durante el desarrollo. Por otro lado, la presencia de vimentina en estas zonas podría estar relacionada con la migración axonal durante el desarrollo del nervio, como ocurre en otras áreas del SNC de *G. galloti* (Monzón-Mayor et al., 1990a) y en otros vertebrados (Dahl et al., 1981a; Schnitzer et al., 1981; Pixley & De Vellis, 1984; Quitsche et al., 1985; Schiffer et al., 1986).

Las abundantes células vimentina<sup>+</sup> en estadios tempranos del desarrollo de *G. galloti* podrían corresponderse con las células O-2A perinatales descritas en rata, que producen oligodendrocitos y astrocitos tipo 2, o bien con células precursoras de astrocitos (APC), los cuáles originarán astrocitos tipo 1 y 2, y que son vimentina<sup>+</sup> en mamíferos (Mi & Barres, 1999; Lee et al., 2000).

Por otro lado, la expresión de GFAP podría estar relacionada con la formación de los vasos, que comienza en E-35 en el nervio de *G. galloti* (Alfayate et al., resultados no publicados). Así, proponemos que los precursores gliales podrían inducir el desarrollo de las células endoteliales y éstas, a su vez, la diferenciación de dichos precursores que darían lugar a los astrocitos GFAP<sup>+</sup>, como sucede en la rata (Mi & Barres, 1999; Mi et al., 2001).

En cuanto a las células gliales de la CNO en el lagarto se observa, como sucede en pollo (Gerhardt et al., 1999; Schuck et al., 2000), que vimentina y GFAP se expresan en la zona peripapilaris (ZP), confirmándose la similitud de dichas subpoblaciones en las dos especies. Así, la vimentina se expresa en *G. galloti* desde E-34, es sustituida por la GFAP desde E-37, y ambas proteínas se expresan simultáneamente en la glía peripapilaris, como ocurre en pollo (Schuck et al., 2000). Todo ello demuestra que en la

CNO de *G. galloti* existen células Vim<sup>+</sup>, GFAP<sup>+</sup> o Vim<sup>+</sup>/GFAP<sup>+</sup>, lo que indica el carácter heterogéneo de la población glial en esta zona especial.

Según Gerhardt et al (1999), las células expresan distintos filamentos intermedios en función de sus contactos intercelulares. En este sentido, la heterogeneidad de las células de la glía peripapilaris en *G. galloti* podría tener relación con la diversidad de contactos intercelulares que mantienen con neuronas, vasos, conus papilaris y células de la ZLNR, como se ha sugerido en pollo (Schuck et al., 2000).

La distribución de las células GFAP<sup>+</sup> en la CNO de *G. galloti* es específica, siendo abundantes las que forman la glía peripapilaris y escasas las que se sitúan distalmente al conus. De esta manera, se distinguen dos zonas, en cuanto a la organización, disposición, densidad y morfología de los astrocitos, como ocurre en la zona prelamina de humanos (Salazar et al., 1998). Al respecto, la población de la glía peripapilaris y la ZTNR en *G. galloti* se correspondería con las células en cesta de la región prelamina anterior descrita en humanos. Estas células presentan alto contenido en GFAP, lo que proporciona cierta rigidez a las prolongaciones gliales, y parecen proteger a los axones que salen de la retina (Salazar et al., 1998). Por otro lado, en la CNO de pollo se ha relacionado a las células GFAP<sup>+</sup> con la expresión de R-cadherinas, moléculas implicadas en la organización de los axones de las células ganglionares en esta zona (Gerhardt et al., 2000).

En la ZMN se observa un aumento de células astrocitarias con alto contenido en GFAP, formando un entramado de células en hilera con prolongaciones extensas que rodean a los axones que salen de la parte intraocular del nervio. Ello sugiere que podrían suplir la ausencia de lámina cribosa, como ocurre en otras especies con lámina cribosa poco desarrollada, como la rata (Wolburg & Buerle, 1993), el pollo (Fujita et al., 2001) y la tortuga (Dávila et al., 1987), y desempeñar las funciones de ésta como barrera (Wolburg & Buerle, 1993), protección y estabilización de la presión entre la parte intraocular y la parte extraocular del nervio (Jonas et al., 1991).

En la ZCN de *G. galloti* la GFAP se expresa muy débilmente durante la ontogenia, sin embargo la vimentina se observa desde E-39 hasta ejemplares adultos en células de gran tamaño que podrían ser homólogas a las células APC ó O-2A vimentina<sup>+</sup>

descritas en mamíferos adultos (Mi & Barres, 1999; Lee et al., 2000). En el quiasma de pollo también se ha descrito una población glial vimentina<sup>+</sup> a la que se le atribuyó un papel importante en la regulación de la decusación de las fibras nerviosas que se dirigen hacia el techo óptico (Kalman et al., 1998).

Por otro lado, podría tratarse de astrocitos que expresan vimentina, ya que esta proteína es expresada por dicha población glial en el cerebro de ratas adultas (Shaw et al., 1981). Esta observación nos sugiere el carácter inmaduro que conserva el nervio óptico de lagartos adultos. Por otro lado, se ha planteado que la expresión de esta proteína podría estar relacionada con el contacto de las células con volúmenes considerables de fluido extracelular, proponiendo que podría estar involucrada en el transporte intracelular (Pixley & De Vellis, 1984). Esta hipótesis explicaría la presencia de vimentina en el nervio óptico de adultos, ya que el nervio forma parte de la materia blanca del SNC y ésta presenta un espacio extracelular más amplio que la materia gris (Klatzo, 1967).

Las membranas limitantes de la CNO se conservan a lo largo de la evolución en los diferentes grupos de vertebrados, aunque existen diferencias en cuanto a la nomenclatura y los tipos celulares que las forman. En mamíferos, las células que forman estas limitantes (limitante de Elschning, tejido intermediario de Kuhnt, tejido intermediario de Jacoby y manto periférico glial de Greef) son astrocitos según Ramírez et al. (1998). En peces, se denomina interfase entre la retina y el nervio (Lillo et al., 2002) a la zona homóloga al tejido intermediario de Kuhnt y de Jacoby en mamíferos. A esta interfase en peces, formada por largos pies de Müller GFAP<sup>+</sup> que alcanzan el vítreo, se adosan astrocitos y microglía (Won et al., 2000; Lillo et al., 2002; Prada, 2003). En pollo, se denomina zona ventricular de la retina o hendidura ventricular (Schuck et al., 2000; Quesada et al., 2004) donde se observan prolongaciones de la glía peripapilaris (Quesada et al., 2004). En reptiles se han descrito astrocitos fibrosos en esta zona formando una fina capa limitante (Dávila et al., 1987).

Entre las funciones que desempeñan se encuentra la de actuar de barrera, impidiendo el paso de sustancias al interior del nervio desde los tejidos adyacentes, y de amortiguadores de rozamientos en los pequeños desplazamientos del NO producidos por movimientos del globo ocular, evitando daños en las fibras nerviosas de las zonas

periféricas del nervio (Ramírez, et al., 1998). Esta idea se corrobora por la presencia de GFAP, que proporciona cierta rigidez y fuerza tensional a las prolongaciones celulares (Ramírez et al., 1998; Won et al., 2000; Lillo et al., 2002; Prada, 2003).

En relación a *G. galloti*, la ZLNR -homóloga al tejido intermediario de Kuhnt de mamíferos- expresa vimentina en E-35/36 y abundante GFAP a partir del E-37, marcaje que podría corresponder a las prolongaciones de astrocitos de la zona distal del conus. En este caso, nuestros resultados coincidirían con los descritos en mamíferos (Triviño et al., 1996; Ramírez et al., 1998) y otros reptiles (Dávila et al., 1987), que establecen la naturaleza astrocitaria de estas membranas limitantes. Por otro lado, la ZLNR podría estar formada por los procesos de la glía peripapilaris que se extienden hasta esta zona, como en pollo (Quesada et al., 2004), puesto que la ZLNR y la glía peripapilaris del lagarto expresan marcadores comunes como la GFAP, vimentina, S-100 y GS durante el desarrollo.

En cuanto a las prolongaciones de la glía peripapilaris de la ZTNR expresan vimentina en E-35/36, y en E-37 comienzan a expresar GFAP, que permanece en ejemplares adultos. Esta glía peripapilaris en *G. galloti*, podría impedir que los vasos sanguíneos penetren en la retina avascular, como también se ha sugerido en pollo (Prada et al., 1989; Schuck et al., 2000; Quesada et al., 2004).

En mesencéfalo y telencéfalo de *G. galloti* la expresión de la vimentina comienza en E-32, presenta máxima expresión en E-37, y decrece paulatinamente conservándose en los pies gliales (Monzón-Mayor et al., 1990a; Yanes et al., 1990). En el nervio óptico y la retina la expresión también comienza en E-32 y decrece lentamente a partir de E-39, pero en adultos persiste una población considerable de células vimentina<sup>+</sup> en la parte caudal del nervio. Este hecho sería indicativo de que, en determinadas áreas del SNC, la presencia de este marcador podría estar relacionada con la existencia de una mayor plasticidad y capacidad de regeneración, como se ha descrito en cerebro adulto de peces (Arochena et al., 2004).

Por otro lado, la expresión de GFAP en el mesencéfalo y telencéfalo de *G. galloti* comienza más temprano (E-35) que en el nervio óptico y la retina (E-37),

resultados que nos sugieren la inmadurez más acusada que presenta la vía óptica en relación a otras áreas del cerebro.

Paralelamente, se han observado astrocitos hipertróficos en nervio óptico lesionado de *G. galloti*, con aumento de prolongaciones GFAP<sup>+</sup> y vimentina<sup>+</sup>, y formación de una cicatriz glial en la zona lesionada que no impide la regeneración de los axones dañados (Arbelo-Galván et al., resultados no publicados). Estos resultados confirman una vez más que la regeneración en la vía óptica de *G. galloti* es un modelo peculiar y diferente al resto de los vertebrados (Lang et al., 1998, 2002).

Así mismo, en peces se observa un aumento en la expresión de vimentina en astrocitos reactivos, hecho que también se asocia con el crecimiento y la regeneración de los axones (Stafford et al., 1990; Cohen et al., 1994; Clint & Zupanc, 2002).

Estudios *in vitro* realizados en ratón demuestran que la ausencia de GFAP y vimentina en los filamentos intermedios de los astrocitos mejora el proceso regenerativo tras una lesión (Wilhelmsson et al., 2004). Sin embargo, estudios *in vitro* e *in vivo* en *G. galloti* confirman la abundancia de filamentos intermedios GFAP<sup>+</sup>, y la regeneración *in vivo* es posible (Monzón-Mayor, resultados no publicados). Probablemente estos resultados a priori contradictorios se deban a diferencias evolutivas entre las distintas especies.

### 1.1.3. Inmunomarcaje de las células de Müller.

Nuestros resultados en *G. galloti* muestran que las células de Müller expresan proteínas comunes a las células macrogliales, lo que nos sugiere que estarían implicadas en procesos metabólicos fundamentales para el mantenimiento de la retina, pudiendo llevar a cabo las funciones propias de astrocitos, oligodendrocitos y células endoteliales en otras áreas del SNC (Newman & Reichenbach, 1996). Por otra parte, es el único tipo celular de la retina que expresa todos los marcadores utilizados en este estudio (S-100, vimentina, GFAP y GS).

La proteína S-100 se observa en las células de Müller de peces (Vecino et al., 1997; Lillo et al., 2002) y algunos mamíferos (Kondo et al., 1983, 1984; Terenghi et al.,

1983; Schnitzer, 1987), como ocurre en *G. galloti*. También se observa en astrocitos de la retina de estos grupos, células ausentes en la retina de reptiles. Nuestros resultados demuestran que esta proteína no se detecta en neuronas, como ocurre en aves (Linser & Moscona, 1981; Molnar et al., 1985), lo que confirma la especificidad glial de dicha proteína en *G. galloti*, también demostrada en oligodendrocitos en otras áreas del cerebro en esta misma especie (Romero-Alemán et al., 2003). Por todo ello, se establece que la proteína S-100 se conserva en las células de Müller durante la filogenia.

La proteína S-100 en *G. galloti* se observó en los somas, parte de los procesos y pies de las células de Müller, resultados obtenidos también en peces (Vecino et al., 1997), lo que contrasta con la presencia de GFAP sólo en los pies.

La expresión de S-100 en las células de Müller de la retina adulta en esta especie podría relacionarse con la diversidad de procesos celulares en los que interviene, como fosforilación de proteínas, regulación de la actividad enzimática o incluso en la movilidad celular, ya que se encuentra relacionada con los componentes del citoesqueleto (Donato, 2001). Como se comentó anteriormente esta proteína interviene en la proliferación y diferenciación celular (Donato, 1999), en la estimulación del crecimiento de las neuritas (Winningham-Mayor et al., 1989) y en la formación y reparación de la mielina (Rickmann & Wolff, 1995a). Además, se observa un aumento de esta proteína en las células de Müller después de lesiones en la retina de *G. galloti* (Arbelo-Galván et al., resultados no publicados), y en la retina de rata (Lam et al., 2003), lo que sugiere que también está implicada en procesos regenerativos de la misma.

Por otra parte, las células de Müller de *G. galloti*, como en otros vertebrados, también expresan GS (Linser et al., 1984, 1985; Vaughan & Lasater, 1990; Derouiche, 1996; Peterson et al., 2001; Jablonski et al., 2001; Lillo et al., 2002; Psarra et al., 2003), enzima involucrada en la neuroprotección (Heidinger et al., 1999; Poitry et al., 2000; Shaked et al., 2002), ya que transforma el glutamato en glutamina, metabolizando el amonio y el glutamato que en concentraciones elevadas producirían la muerte neuronal. Así, neurotransmisores como el glutamato son capturados de manera selectiva por las células de Müller (Brandon & Lam, 1983), constituyendo la mejor ruta de fijación del amonio en la retina (Poitry et al., 2000).

Además, en las células de Müller de *G. galloti* se expresan proteínas del citoesqueleto como la vimentina y la GFAP, aunque su expresión no es homogénea a lo largo de la célula, sino que se concentra principalmente en los pies terminales en contacto con el vítreo.

La inmunorreactividad para la vimentina en los pies terminales de Müller en *G. galloti* comienza en la retina marginal de estadios tempranos (E-32/33), se extiende a la retina central, y permanece en adultos más intensamente en la zona marginal. La expresión de esta proteína se observa en los pies de Müller en mamíferos (Shaw & Weber, 1984; Dräger et al., 1984; Schnitzer, 1988; Robinson & Dreher, 1990; Reichenbach et al., 1995; Famiglietti et al., 2003), pollo (Lemmon & Rieser, 1983; Torelli et al., 1989; Chabot & Vincent, 1990; Gerhardt et al., 1999), tortuga (Gaur, 1988) y peces (Vaughan & Lasater, 1990; De Guevara et al., 1994). Los trabajos realizados con vimentina durante el desarrollo en otras especies demuestran que se expresa también en los procesos radiales de las células de Müller, aunque no reflejan la expresión diferencial entre la retina central y periférica observada en *G. galloti*.

Aunque se ha comprobado la existencia de vimentina en las células de Müller de diferentes vertebrados, la expresión de GFAP presenta algunas controversias. Así, nuestros resultados en *G. galloti* revelan la presencia de GFAP en los pies terminales a partir de ejemplares postnatales, como también ha demostrado Sassoé Pognetto et al. (1992) en esta misma especie. Sin embargo, y según este autor, existen importantes diferencias en el patrón de expresión de esta proteína en los diferentes vertebrados. Básicamente se distinguen dos grupos: uno que expresa GFAP en pies y procesos de Müller (peces: *Carassius*; anfibios: *Triturus*; reptiles: *Podarcis* y *Tarentola*; mamíferos: *Oryctolagus* y *Mus*), y el otro que se expresa principalmente en los pies (peces: *Pseudotropheus*; reptil: *Gallotia*; aves: *Gallus*) aunque por el momento se desconocen sus funciones precisas en las distintas especies.

Esta regionalización de la expresión de GFAP y vimentina en *G. galloti* podría tener relación con una mayor conductividad para el K<sup>+</sup> descrita en anfibios (Newman, 1984, 1985, 1986), aunque en mamíferos la conductividad es alta en la zona central de la célula. Según estos resultados se ha sugerido que, en retinas vasculares como en

mamíferos, el exceso de  $K^+$  es transferido por las células de Müller hacia los capilares de la retina o hacia el vítreo, mientras que en retinas no vascularizadas como en aves o reptiles se elimina a través del vítreo (Newman, 1987).

Además, en *G. galloti* las células de Müller podrían estar implicadas en la absorción de nutrientes que son vertidos al vítreo desde el conus papillaris, como ocurre en aves a través del pecten (Liebner et al., 1997; Wolburg et al., 1999). Estos resultados en *G. galloti* sugieren una gran actividad metabólica y funcional, principalmente a nivel de los pies de Müller, que estarían implicados en la absorción de nutrientes y en la excreción de sustancias tóxicas a través del vítreo.

GFAP y vimentina coexisten en ejemplares postnatales y adultos en los pies de las células de Müller, de manera más intensa en la retina marginal. Este hecho podría estar relacionado con la inmadurez de las células de Müller marginales, como ocurre en pollo, donde se sugiere que la retina periférica mantiene la capacidad regenerativa y estas células conservan características inmaduras (Fischer & Reh, 2003b). Sin embargo, Pixley & De Vellis (1984) relacionaron la expresión de la vimentina con el contacto de las células con los fluidos extracelulares, de manera que dejan de expresarla cuando pierden el contacto con ellos y añaden que, en adultos, sólo se expresa esta proteína en células con esta característica, como células endoteliales, ependimales, tanicitos, glía de Bergman, glía radial y células de Müller, proponiendo que la vimentina podría estar relacionada con el transporte intracelular de estos fluidos. Esto explicaría la presencia de esta proteína en los pies de Müller en contacto con el vítreo, de forma que podría estar involucrada en el transporte de nutrientes hacia el interior de estas células.

Por otro lado, las células horizontales de algunos mamíferos (Dräger, 1983; Shaw & Weber, 1983; Schnitzer, 1985), pollo (Prada et al., 1995) y peces (Jones & Schechter, 1987; Vaughan & Lasater, 1990) son vimentina<sup>+</sup>. Así mismo, estas células expresan también la proteína GFAP en diferentes vertebrados (Linser et al., 1985; Jones & Schechter, 1987; Vaughan & Lasater, 1990). Sin embargo, en *G. galloti* estos marcadores no se expresan en las células horizontales ni en otras neuronas, lo que indica que no existe una relación directa entre estos marcadores gliales y las neuronas.

En mamíferos se compara la expresión de marcadores como la GS, anhidrasa carbónica y GFAP en astrocitos de la retina y en las células de Müller, demostrando que existen similitudes entre ambas células en la expresión de GFAP y anhidrasa carbónica, pero también se observan importantes diferencias ya que la GS se expresa sólo en las células de Müller (Lewis et al., 1988). En la especie que nos ocupa, como en otras especies de retinas avasculares, no se observan astrocitos, de manera que las células de Müller podrían realizar las funciones de aquéllos, como se ha descrito en aves (Won et al., 2000).

Además, en *G. galloti*, la proteína S-100 aparece en las prolongaciones de las células de Müller que rodean los somas de las células ganglionares. Todo ello podría indicarnos la interrelación de la glía de Müller con las células ganglionares, en sustitución de los astrocitos ausentes en la retina de reptiles.

Se ha demostrado que las células de Müller podrían ser un recurso para la regeneración de las neuronas en la retina de peces (Yurco & Cameron, 2005) y de pollo (Fischer & Reh, 2001a, 2003b), aunque los mecanismos que regulan este proceso han sido mejor identificados en peces (Fischer, 2005). Así, la glía de Müller en respuesta a una lesión entra de nuevo en el ciclo celular, se desdiferencia, y expresa factores de transcripción que normalmente son expresados por las células madre. Estas nuevas células que se originan pueden permanecer indiferenciadas, formar células de Müller, o diferenciarse en neuronas (Fischer, 2005). Recientemente, se ha demostrado la importancia del microambiente en los procesos de regeneración, comprobándose que la combinación de insulina y determinados factores de crecimiento (FGF2), en ausencia de lesiones, estimula la desdiferenciación y proliferación de las células de Müller, de manera que comienzan a expresar factores de transcripción (Cash1, Pax6 y Chx 10) propios de células madre, para generar nuevas neuronas en pollo (Fischer et al., 2002; Fischer & Reh, 2002).

Los resultados obtenidos en *G. galloti*, demuestran que el carácter inmaduro de las células de Müller permanece en ejemplares adultos, y además se observan muchas similitudes entre las retinas de reptiles y aves en relación a tipos celulares gliales y a sus marcadores. Al respecto, trabajos preliminares en *G. galloti* demuestran que, tras la sección completa del NO, la zona marginal de la retina presenta un aumento de células

de Müller vimentina<sup>+</sup> (Monzón-Mayor et al., resultados no publicados). Todo ello indicaría que las células de Müller en *G. galloti* por su carácter inmaduro podrían estar también implicadas en la regeneración, como ocurre en aves.

*1.1.4. Inmunomarcaje de las células gliales en la base del conus papillaris.*

Como en otros lacértidos, el conus papillaris de *G. galloti* presenta morfología cónica y de gran tamaño, hecho que podría relacionarse con una alta agudeza visual, como se ha descrito en especies diurnas de aves, donde un mayor pecten también indica mayor agudeza (Meyer, 1977; Braekevelt & Richardson, 1996). En relación a la inmunorreactividad que presenta esta estructura en *G. galloti* se observa que en estadios de gran actividad metabólica (E-35/37) se expresa la proteína GS (Viñoly, com. pers.), la S-100 y la vimentina en zonas marginales de la base del conus papillaris. Esta expresión podría indicar que se trata de células gliales inmaduras o glioblastos.

Por otro lado, la S-100 y la vimentina también se expresan en células pigmentarias, por lo que podría tratarse de melanocitos inmaduros o melanoblastos que posteriormente incorporan los gránulos de pigmento. El marcaje de estas proteínas en el conus disminuye cuando aumentan los gránulos en las células pigmentarias y podría deberse a: 1) que las células dejan de expresar estas proteínas porque se diferencian en melanocitos o en distintos tipos de células gliales, 2) que el marcaje quede enmascarado por los gránulos de pigmento en estadios más avanzados. En síntesis, estas células pigmentarias en *G. galloti* con gránulos de pigmento y expresión de GS y vimentina, aunque GFAP<sup>+</sup>, podrían ser homólogas a la glía pecteneal descrita en aves (Gerhardt et al., 1999). La expresión de GS en estas células abre nuevas vías acerca de las funciones que desempeña esta estructura en la detoxificación del medio (Gerhardt et al., 1999). En este caso, la alta actividad metabólica de la retina podría producir una acidificación e intoxicación por altos niveles de amonio y lactato (Bringmann et al., 1998).

La GFAP se observa en células localizadas justo en el límite del conus, alrededor de la arteria central, desde E-37 hasta ejemplares adultos de *G. galloti*. Los resultados ultraestructurales también confirman en esta especie la gran cantidad de células astrocitarias ricas en gliofilamentos rodeando al vaso central en la base del conus (Alfayate et al., resultados no publicados). Estos hechos confirmarían la hipótesis

planteada por Gerhardt et al. (1999), donde el patrón de expresión de los marcadores depende de las interacciones existentes entre las células. Así, la expresión de la GFAP en células gliales se relaciona con sus contactos con neuronas y células endoteliales. En *G. galloti*, ocurriría lo mismo con las células del conus, los astrocitos del nervio y la glía peripapilaris. Así mismo, se podría suponer que las células GFAP<sup>+</sup> ubicadas en el límite del conus en *G. galloti* podrían originarse a partir de células inmaduras del conus o de migraciones de la glía peripapilaris GFAP<sup>+</sup>.

En cuanto a la función, tanto al conus papilaris de reptiles como al pecten de aves, se les atribuye funciones de nutrición mediante el intercambio de fluidos con el vítreo (Dieterich et al., 1976), supliendo la ausencia de vascularización en la retina. Al pecten de aves también se le asigna la regulación del pH debido a la expresión de anhidrasa carbónica (Kauth & Sommer, 1953; Dieterich et al., 1973), la regulación de la presión en el ojo (Seaman & Storm, 1963), y de la temperatura (Bachsich & Gellèrt, 1935). Además, se sabe que la melanina presente en esta estructura absorbe la luz aumentando la temperatura del pecten, necesaria para el metabolismo (Bawa & YashRoy, 1974). Estos hechos también podrían ser válidos para *G. galloti* debido a la presencia de células pigmentarias en el conus papilaris. Así, las células pigmentarias del pecten también desempeñan una función estructural, ya que poseen numerosos microtúbulos y microfilamentos (Braekevelt, 1991a, 1991b, 1993), hecho también corroborado ultraestructuralmente en *G. galloti* (Alfayate, com. pers.). También se ha estudiado el pecten como un verdadero modelo de barrera hematoencefálica *in vivo* (Gerhardt et al., 1996), demostrando la gran cantidad de transportadores de glucosa que existen en las células endoteliales que llevan la glucosa al vítreo, y mediante las células de Müller desde éste a la retina (Liebner et al., 1997; Wolburg et al., 1999). Por las similitudes observadas en el conus de *G. galloti* y el pecten de pollo, en relación a las uniones tight junctions entre las células endoteliales (Alfayate et al., resultados no publicados), y la gran actividad existente a nivel de los pies de las células de Müller, se sugiere que el conus también ejercería funciones de aporte de glucosa a la retina.

Actualmente, se realizan estudios ultraestructurales (Alfayate et al., com. pers.) e *in vitro* (Monzón-Mayor, com. pers.) del conus papilaris, que complementarían los inmunohistoquímicos ya realizados, con objeto de profundizar en esta estructura, y conocer su importancia en retinas avasculares. Todo ello sería de gran utilidad para

extrapolar a modelos experimentales de lesiones agudas (nervio óptico y retina) y crónicas (glaucoma) actualmente en curso en nuestro grupo.

## **2. NEUROGÉNESIS Y GLIOGÉNESIS EN LA RETINA Y EL NERVIÓ ÓPTICO.**

### *2.1. FORMACIÓN DE LA RETINA*

#### *2.1.1. Neurogénesis y gliogénesis en la retina.*

Normalmente, las neuronas que detienen primero el ciclo celular ( $G_0$ ) se diferencian antes que las que concluyen su ciclo más tardíamente (Ohnuma et al., 2002). En nuestro estudio, el uso del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA), hemos obtenido células con marcaje más intenso en la fase S durante el desarrollo de la retina de *G. galloti*. Así, hemos correlacionado la ausencia de expresión de PCNA con las células diferenciadas que forman las distintas capas retinales. En este sentido, la retina central de *G. galloti* presenta la máxima proliferación en E-33, decrece hasta E-36, y luego se observan aisladamente. Esta etapa proliferativa coincide con formación de la mayoría de las capas de la retina en esta especie (Viñoly et al., resultados no publicados).

En relación a la formación de los tipos celulares de la retina, en peces se forman todos durante las primeras fases del desarrollo aunque siguen añadiéndose bastones después del nacimiento (Hagedorn & Fernald, 1992). En pollo, la neurogénesis de la retina comienza en el segundo día de incubación, siendo las células ganglionares las primeras en terminar el ciclo celular, y sobre el día 12 lo hacen las últimas bipolares (Prada et al., 1991). Sin embargo, en rata las células ganglionares, horizontales, amacrinas y conos, son producidos en el período prenatal, mientras que los bastones, bipolares y células de Müller se diferencian en el postnatal (Rapaport et al., 2004).

Nuestros resultados en *G. galloti* reflejan que, igual que en el resto de los vertebrados, las células que primero se forman son las ganglionares, pues desde el E-33 hasta adultos no se observa proliferación a nivel de la capa ganglionar en la retina central, y al mismo tiempo parecen originarse las amacrinas, ya que en el límite con la

capa plexiforme interna se observa muy poca proliferación desde E-33 en adelante. En *G. galloti* entre E-34 y E-36, especialmente en E-35, la capa nuclear externa (CNE) y la capa nuclear interna (CNI), donde se ubican las células de Müller, bipolares y horizontales, presentan abundantes células proliferativas. Suponemos que en estos estadíos se originan estos tres tipos celulares, aunque el orden exacto de formación aún no se ha determinado. Sin embargo, la diferenciación de las células de Müller comienza a partir de E-35 y los pies son S-100<sup>+</sup>, GS<sup>+</sup> y vimentina<sup>+</sup>. Además los dobles marcajes de PCNA/S-100 indican que las células de Müller continúan proliferando en la retina central en E-37, lo que sugiere que se trata del último tipo celular que se diferencia. Estos resultados contrastarían con los algunos obtenidos en mamíferos (Ramón y Cajal, 1982) y peces (Peterson et al., 2001), que afirman que las células de Müller se encuentran entre las primeras que se incorporan a la retina.

Por otro lado, las células PCNA<sup>+</sup> observadas en la capa del nervio de la retina (CN), próximas a la CNO, desde E-37 hasta eclosión, podrían ser células precursoras de oligodendrocitos, que desde E-39 mielinizan las fibras de nervio en la retina. En el lagarto se han detectado células en esta zona que expresan proteínas principales de la mielina como la PLP y se ha propuesto que proceden del nervio óptico, invaden la retina, llegan hasta la capa de nervio y mielinizan los axones de las CGRs (Santos, 2004), hecho también descrito en pollo (Ono et al., 1997, 1998).

Sin embargo, no parece probable que estas células sean precursoras de microglía en *G. galloti*, ya que las únicas que se observan en estos estadíos están adheridas a los pies de Müller en la membrana limitante interna (Viñoly, com. pers.), hecho que coincide con aves donde los pies de Müller forman un sustrato por el que migran las células microgliales en la retina (Navascués et al., 2000). Así mismo, se ha comprobado que las células microgliales en la retina de aves son poblaciones heterogéneas que migran hacia la retina desde la cabeza del nervio óptico, pecten oculi y cuerpo ciliar (Marín-Teva et al., 1999).

Algunas de estas células precursoras proliferativas en la CN poseen un núcleo fusiforme, típico de las células en migración en la retina de peces (Otteson et al., 2001), lo que significa que se produce la replicación del ADN al tiempo que migran. En relación a *G. galloti*, esta simultaneidad de procesos tan complejos para la célula podría

fundamentarse en el hecho de que los oligodendrocitos podrían tener establecido un número de divisiones previas a la diferenciación, como ocurre en el nervio óptico de rata (Miller, 2002), que varía dependiendo del número de axones que vayan a mielinizar (Burne et al., 1996).

Coincidiendo con la aparición de las células proliferativas en la CN en E-37, se observan otras células PCNA<sup>+</sup> en la capa ganglionar en la retina central de *G. galloti*, hecho que podría relacionarse con una subpoblación de oligodendrocitos, situados en la CG, que intervendrían en el soporte metabólico de estas células, según se describe en pollo (Seo et al., 2001).

El hecho de que en eclosión de *G. galloti* existan células PCNA<sup>+</sup> en la CNI próximas a la CPI y CPE se asemeja a lo observado en peces, donde aparecen células precursoras de bastones que se originan de poblaciones mitóticamente activas localizadas en la CNI (Raymond, 1985; Hagedorn & Fernald, 1992; Hoke & Fernald, 1997; Otteson & Hitchcock, 2003). Sugerimos que estas células proliferativas PCNA<sup>+</sup> observadas en estadíos próximos a eclosión podrían corresponderse con los precursores de bastones, que se van dividiendo y migrando hasta la CNE. Sin embargo, en esta especie no observamos los grupos celulares denominados PINCs (proliferating inner nuclear cells) descritos en algunos peces (Julian et al., 1998).

Finalmente, podemos resumir que en *G. galloti* el orden de diferenciación de las células de la retina, salvo alguna variación, es similar al descrito en otras especies (Kahn, 1974; Spence & Robson, 1989; Prada et al., 1991), de forma que, primero aparecen las células ganglionares y amacrinas y posteriormente las horizontales, bipolares y las de Müller. Aún no hemos establecido si los bastones se incorporan una vez se han diferenciado el resto de los tipos celulares, como sucede en peces (Carter-Dawson & LaVail, 1979; Hagedorn & Fernald, 1992; Kwan et al., 1996; Otteson et al., 2001; Otteson & Hitchcock, 2003), aunque la proliferación en la CNE se observa desde E-33/34 y continúa hasta ejemplares adultos.

Nuestros resultados en *G. galloti* reflejan que en el centro de la retina la densidad celular disminuye progresivamente a medida que avanza el desarrollo, excepto la capa de fotorreceptores, debido al alargamiento de la retina como consecuencia de su

crecimiento, proceso también descrito en peces (Johns, 1977; Johns & Fernald, 1981; Fernald, 1990; Hagedorn & Fernald, 1992). El mantenimiento de la densidad celular en la capa de fotorreceptores en *G. galloti* podría deberse a que continuamente, e incluso en ejemplares adultos, se están incorporando células en esta capa.

### 2.1.2. Crecimiento de la retina: Zona Marginal Proliferativa.

En el lagarto, como en otros vertebrados, se observa que la mayor parte de la proliferación celular en la retina, en estadíos avanzados del desarrollo, permanece en la zona periférica y la *pars plana* del cuerpo ciliar. A partir de la zona periférica se forman todos los tipos celulares de la retina durante el desarrollo y se produce un crecimiento de la misma por dicho margen.

En reptiles no se ha estudiado el mecanismo de incorporación de los diferentes tipos celulares a la retina, sin embargo en peces y anfibios se ha comprobado este proceso a partir del margen de la retina (Harris & Perron, 1998; Ohnuma et al., 2002). En estos vertebrados la RM se divide en cinco regiones consecutivas desde la periferia al centro y cada una origina la siguiente, presentando una capacidad de división cada vez más limitada (Harris & Perron, 1998; Ohnuma et al., 2002), de manera que la células madre de la región I originarán los retinoblastos de la región II, y así sucesivamente hasta dar lugar a la región V, donde se encuentran las células diferenciadas (Fig.4). Las regiones I y II expresan genes activadores del ciclo celular y las células se dividen rápidamente, disminuyendo luego su expresión y aumentando la de genes Notch, que mantienen a las células indiferenciadas, y cuya actividad conjunta con moléculas proneurales o determinantes gliales refuerza la diferenciación celular hacia neuronas o glía, respectivamente. Así, en la región IV y V aumenta la expresión de moléculas proneurales originando neuronas, luego decrece su expresión y se incrementa la de inductores gliales, como p27Xcl, originando las células de Müller (Ohnuma et al., 1999). La gran proliferación observada en la retina marginal de *G. galloti*, así como la mayor intensidad de marcaje en las células adyacentes a la ora serrata, indican que el mecanismo de diferenciación celular en la retina del lagarto podría asemejarse al de peces y anfibios, por lo que sería interesante realizar experimentos con estas moléculas implicadas en la diferenciación neuronal y glial en esta zona.

En peces y anfibios, la retina continúa creciendo después del nacimiento mediante la adición de células en anillos concéntricos desde la zona marginal ciliar (Johns, 1977; Wetts et al., 1989; Hagedorn & Fernald, 1992). Sin embargo, en aves y mamíferos, el crecimiento de la retina no se produce por incorporación de células, sino por alargamiento de la retina existente asociada al crecimiento de la órbita, lo que produce un incremento del espacio entre sus células (Teakle, 1993). Además, en pollo existe otro mecanismo que reduce la cantidad de retina que se somete a estiramiento durante el crecimiento, y es que se desarrolla una *pars plana* más grande de lo normal si la comparamos con otras especies (Reh & Fischer, 2001; Fischer & Reh, 2003a). Según nuestros resultados, la multipotencialidad observada en peces y anfibios parece no existir en *G. galloti*, como sucede en aves o mamíferos, ya que no se observa proliferación celular en la zona marginal ciliar después de varias semanas post-eclosión. ¿A qué se debe la retención o pérdida de la capacidad proliferativa en la zona marginal ciliar de las diferentes especies? La retención de esta capacidad de proliferación podría estar relacionada con el crecimiento del ojo después del nacimiento, de manera que en grupos con ojos que crecen significativamente después de estadios embrionarios, como peces y anfibios, la retina continúa creciendo añadiendo nuevas células para compensar dicho crecimiento y reducir la cantidad de retina que se somete a estiramiento (Reh & Fischer, 2001). Sin embargo, en mamíferos y aves no se observa esta diferencia significativa en el tamaño del ojo desde el nacimiento hasta adultos, de manera que es suficiente el mecanismo de estiramiento para el aumento de la retina.

La presencia de células vimentina<sup>+</sup> en el margen de la retina desde estadios tempranos (E-32/33) coincide con la expresión de PCNA, sugiriendo que estas células podrían ser PCNA<sup>+</sup>/Vim<sup>+</sup>, y precursoras de las células de Müller.

Todo lo expuesto parece indicar que existen dos mecanismos de crecimiento en la retina en *G. galloti*: 1) Durante el desarrollo embrionario (desde E-32 hasta Eclosión) se añaden los distintos tipos celulares desde la zona periférica a la central, 2) la retina central se alarga de forma progresiva desde ejemplares postnatales hasta adultos. En definitiva, el crecimiento de la retina en reptiles se relaciona más con aves y mamíferos que con peces y anfibios. Por tanto, una vez más, se constata que los reptiles presentan características similares a mamíferos y aves, como en general ocurre con los tipos de

células gliales y la presencia de inhibidores del crecimiento axonal (Monzón-Mayor et al, 1990c, 1990d; Lang et al., 1998).

La zona marginal ciliar prolifera frente a lesiones en peces, anfibios y aves (Reh & Tully, 1986; Reh, 1987; Reh & Fischer, 2001). En relación a reptiles, y concretamente en *G. galloti*, se ha observado que tras la lesión completa del nervio óptico las CGRs no mueren ni proliferan, de manera que los axones dañados regeneran y alcanzan el techo óptico después de nueve meses postlesión (Lang, et al., 2002). En nuestro modelo de estudio no se ha detectado activación celular en la zona marginal, por lo que se deduce que se trata de una regeneración verdadera, es decir de las mismas CGRs dañadas, y no de una regeneración por proliferación (Lang, et al., 2002). Estudios en otras especies del orden Squamata -*Ctenophorus ornatus*- también coinciden en que el proceso regenerativo del nervio no se produce por incorporación de nuevas células a la retina (Beazley et al., 1998). Para complementar estos trabajos, actualmente se realizan lesiones agudas en la retina de *G. galloti* utilizando marcadores de células madre, con objeto de profundizar en el conocimiento de la regeneración en esta zona.

Por otro lado, observamos que la diferenciación de la retina en *G. galloti* no es simétrica, ya que durante el desarrollo existe mayor proliferación en la retina periférica que en la central, y en el polo nasal respecto al temporal. Por tanto, parece existir una asimetría central/periférica, diferenciándose antes la retina central, y nasal/temporal, de modo que el lado nasal es más largo que el temporal, y por tanto crece más rápido. Este crecimiento asimétrico se ha descrito también en peces (Easter, 1992; Kwan et al., 1996; Julian et al., 1998). Además, en *G. galloti* proponemos la diferenciación de un tercer gradiente vítreo-esclerótica, diferenciándose primero la capa ganglionar y la zona interna de la CNI que limita con la CPI, y permaneciendo células proliferativas en la parte esclerótica de la CNI y en la CNE.

## 2.2. *GLIOGÉNESIS EN EL CONUS PAPILLARIS.*

Con el estudio de la proliferación y de los diferentes marcadores gliales, se ha intentado establecer una hipótesis sobre el origen del conus papillaris en *G. galloti*, ya que, según nuestro conocimiento, por el momento no existe constancia acerca de la génesis de esta estructura en reptiles. Nuestros resultados revelan que el conus podría

originarse a partir de células neuroepiteliales proliferativas localizadas en el margen vitreal del tallo óptico en E-32/33, aunque no hemos observado migración celular desde la capa pigmentaria a través de la hendidura ventricular, como sucede en el pecten de aves (Yew; 1978; Uehara et al., 1990; Liebner et al., 1997). Sin embargo, proponemos que las células neuroepiteliales precursoras podrían estar expuestas a señales exógenas que determinarían la síntesis de melanina, de manera similar a la diferenciación de las células del epitelio pigmentario de la retina, donde se han descrito factores de crecimiento que intervienen en su formación, como el Mitf (Microphthalmia-associated transcription factor) que favorece la síntesis de melanina (Goding, 2000), y miembros de la familia de los TGF $\beta$  (Transforming growth factor-beta) (Fuhrmann et al., 2000). Estos factores son secretados por el mesénquima adyacente (Martínez-Morales et al., 2004), hecho que también podría ocurrir en el conus de *G. galloti*, como los vasos sanguíneos que se originan en esta estructura. La confirmación de esta hipótesis se realizará en posteriores trabajos.

### 2.3. ORIGEN Y DIFERENCIACIÓN DE LOS ASTROCITOS EN EL NERVIÓ ÓPTICO.

Nuestros resultados en el lagarto reflejan que la aparición de células PCNA<sup>+</sup> en el nervio óptico se corresponde con el crecimiento de los primeros axones de las células ganglionares en E-32. Estas células PCNA<sup>+</sup> podrían ser neuroepiteliales del tallo óptico que darían lugar a glioblastos, y en próximos trabajos comprobaremos si se trata de precursores gliales Ran-2 (Raff et al., 1984) ó A2B5 (Rao & Mayer-Pröschel, 1997) previamente descritos, pues hemos detectado A2B5 *in vitro* en otras áreas del cerebro (Lang et al., 1998) pero no *in vivo*. Además estos glioblastos indiferenciados parece que orientan los axones en crecimiento (Navascués et al., 1987), hecho que también se ha constatado ultraestructuralmente en *G. galloti* (Santos et al., resultados no publicados).

Por otro lado, los oligodendrocitos y astrocitos tipo 2 se originan de precursores de las zonas ventricular y subventricular del diencéfalo y migran al nervio óptico (Small et al., 1987). Estas células son A2B5<sup>+</sup>, O4<sup>+</sup> y vimentina<sup>+</sup> en estadios perinatales de rata (Lee et al., 2000). Nuestros resultados muestran en la pared ventricular hipotalámica células proliferativas PCNA<sup>+</sup>, S-100<sup>+</sup>, vimentina<sup>+</sup> y GFAP<sup>+</sup> durante el desarrollo, y también se ha descrito en *G. galloti* la presencia de marcadores de oligodendrocitos 4F2,

12F7 y 14 F7 (Santos, 2004). Además, durante la regeneración de la vía óptica de *G. galloti* también se han observado células PCNA<sup>+</sup>, S-100<sup>+</sup>, vimentina<sup>+</sup> y GFAP<sup>+</sup>, lo que nos sugiere una vez más que la regeneración presenta un patrón del modelo del desarrollo (Arbelo-Galván et al., resultados no publicados). La expresión de todos estos marcadores en la pared ventricular del hipotálamo confiere a la vía óptica una plasticidad que el animal conserva durante toda la vida.

Por otra parte, en el tracto óptico de ejemplares adultos de *G. galloti*, se observan subpoblaciones de astrocitos GFAP<sup>+</sup> y de células S-100<sup>+</sup>, que no se observan en estadios perinatales y que podrían proceder de células precursoras que no expresaban dichos marcadores.

La plasticidad de la vía óptica en *G. galloti* se confirma de nuevo, ya que hemos observado poblaciones de células inmaduras vimentina<sup>+</sup> en el nervio óptico y la retina durante el desarrollo y en ejemplares adultos, expresión que tiende a desaparecer en otras áreas del cerebro (Monzón-Mayor et al., 1990a; Yanes et al., 1990). Estos hechos ponen de manifiesto el carácter inmaduro que conserva la vía óptica de *G. galloti*, concretamente el nervio óptico, en relación a otras áreas del SNC.

En la ZCN y el quiasma de *G. galloti* la GFAP se expresa muy débilmente, aunque existe una subpoblación de células S-100<sup>+</sup> que podría ser de oligodendrocitos. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Santos et al. (com. pers.), donde se observan marcadores de oligodendrocitos inmaduros (4F2, 12F7 y 14F7) y aumento en la expresión de MBP (myelin basic protein) si se compara con la CNO. En la ZCN se observan más oligodendrocitos que en la CNO, hecho que podría relacionarse con la cantidad de fascículos de mayor diámetro en la ZCN y en el quiasma, como también ocurre en peces (Lillo et al., 1998).

Durante el desarrollo, y principalmente en estadios de gran actividad (E-35/39), se observan abundantes células PCNA<sup>+</sup>/S-100<sup>+</sup> en el nervio óptico, que disminuyen en estadios avanzados. Estas células, localizadas en la CNO y la ZMN, podrían ser precursoras de oligodendrocitos o astrocitos. A partir de E-37/39 comienza la expresión de GFAP<sup>+</sup>/PCNA<sup>+</sup> y GFAP<sup>+</sup>/S-100<sup>+</sup> en estas zonas, datos que ponen de manifiesto la existencia de células S-100<sup>+</sup>/GFAP<sup>+</sup>/PCNA<sup>+</sup>. Los resultados con dobles marcajes

revelan que algunos astrocitos conservan su capacidad proliferativa en los estadios E-37/39, hecho que podría indicar que se trata de astrocitos multipotentes (Steindler & Laywell, 2003), que se reactivan después de lesionar el nervio óptico y favorecen la regeneración en el lagarto (Arbelo et al., resultados no publicados).

Estos resultados también se relacionan con la formación de los vasos, que en *G. galloti* comienza en E-35 en el nervio óptico (Alfayate et al., resultados no publicados), ya que, de la misma manera que se ha descrito en rata para las células gliales precursoras de astrocitos (Mi & Barres, 1999; Mi et al., 2001), las células PCNA<sup>+</sup>/S-100<sup>+</sup> podrían inducir el desarrollo de las células endoteliales y posteriormente éstas promoverían la diferenciación de las células precursoras en astrocitos S-100<sup>+</sup>/GFAP<sup>+</sup>/PCNA<sup>+</sup>, GFAP<sup>+</sup>/PCNA<sup>+</sup> y GFAP<sup>+</sup>/S-100<sup>+</sup>.

La organización de las células gliales en el nervio óptico probablemente esté ligada a sus diferentes funciones y podrían estar relacionadas con la organización de los axones. Esta especialización con características singulares, originarían poblaciones celulares heterogéneas, como confirman los resultados obtenidos. Esta heterogeneidad de las células gliales ya ha sido descrita en el techo óptico de *G. galloti* (Monzón-Mayor et al., 1998), y corrobora la complejidad observada en la vía óptica en esta especie.

## **CONCLUSIONES**

- 1) Existe una gran heterogeneidad glial en el nervio óptico de *G. galloti*, observándose mayor concentración de células astrogiales respecto a las oligodendrogiales en la CNO y ZMN de ejemplares adultos, lo que también sugiere que existe diferente especialización funcional de la glía en el nervio.
- 2) La proteína S-100 se expresa en células de Müller de *G. galloti*, sin embargo, en mamíferos se observa también en astrocitos, y en aves y peces en neuronas. Además, en el lagarto la expresión de S100, GFAP, vimentina y GS, se concentra en los pies de Müller, lo que sugiere una gran actividad metabólica y funcional a este nivel, implicados en la absorción de nutrientes y excreción de sustancias tóxicas a través del vítreo.
- 3) Las células de Müller en esta especie tienen características específicas, ya que expresan marcadores propios de astrocitos y de oligodendrocitos. Por ello, consideramos que estas células en el lagarto podrían llevar a cabo funciones típicas de ambos tipos celulares, como la mielinización o servir de almacén para los elementos neuronales de la retina.
- 4) La expresión de las proteínas S-100, vimentina y GFAP en la zona peripapilaris, y su relación con los vasos sanguíneos, nos indica que se trata de una subpoblación homóloga a la glía peripapilaris descrita en pollo, cuya función se relaciona con la guía axonal, e impide el crecimiento vascular hacia la retina.
- 5) Durante el proceso de gliogénesis y neurogénesis del nervio óptico en *G. galloti*, la GFAP y la vimentina coexisten en la CNO y la ZMN desde E-37 a E-39, hecho también observado en telencéfalo y mesencéfalo de esta especie, lo que probablemente esté relacionado con la transformación de células inmaduras a maduras.
- 6) La maduración de las células vimentina<sup>+</sup> ubicadas en el nervio óptico presenta un determinado gradiente, siendo las primeras en madurar las que primero expresan esta proteína durante el desarrollo, hecho que relacionamos con la migración axonal en el nervio debido a su coincidencia en el tiempo. Así mismo, en la vía óptica de ejemplares adultos de *G. galloti* la vimentina es abundante, lo que implica mayor inmadurez en

relación a otras áreas del cerebro, donde se conserva sólo en los pies gliales. La presencia de vimentina en los pies de Müller, ZCN y Q en el adulto, estaría relacionada con una mayor plasticidad y capacidad de regeneración, como ocurre en peces.

7) La diferenciación de las células de la retina en *G. galloti*, excepto algunas variaciones, es similar a la descrita en la mayor parte de los vertebrados, de forma que primero se diferencian las células ganglionares y amacrinas y posteriormente las horizontales, bipolares y células de Müller, diferenciándose estas últimas en E-35/37 en el lagarto.

8) En general, existen dos mecanismos de crecimiento de la retina en *G. galloti*: 1) se añaden los distintos tipos celulares desde margen periférico a la zona central, 2) la retina central se alarga de forma progresiva. Por tanto, el crecimiento de la retina en *G. galloti* se relaciona más con aves y mamíferos que con peces y anfibios, existiendo una asimetría central/periférica, nasal/temporal y vítreo-esclerótica.

9) La zona marginal de la retina del lagarto presenta alta proliferación de células PCNA<sup>+</sup> durante el desarrollo que disminuye y desaparece en ejemplares postnatales, lo que indica que la multipotencialidad observada en peces y anfibios adultos no existe en *G. galloti*, característica que también le asemeja a mamíferos y aves.

10) En lo que respecta a la formación del conus papillaris en *G. galloti*, proponemos que las células neuroepiteliales precursoras del mismo, estarían expuestas a señales exógenas que determinarían la síntesis de melanina, de forma similar a la diferenciación del epitelio pigmentario de la retina.

11) Finalmente concluimos que el trabajo de desarrollo presentado constituye una base sólida para la investigación en curso de nuestro grupo, ya que en él se analizan y comparan las moléculas implicadas durante la regeneración en distintos modelos de lesiones agudas (nervio óptico y retina) en la vía óptica del reptil *G. galloti* con otros vertebrados, incluidos los mamíferos.

## **ABREVIATURAS**

<b>AC:</b>	Arteria central
<b>CF:</b>	Capa de fotorreceptores
<b>CG:</b>	Capa ganglionar
<b>CGRs:</b>	Células ganglionares retinales
<b>CN:</b>	Capa de fibras del nervio óptico
<b>CNE:</b>	Capa nuclear externa
<b>CNI:</b>	Capa nuclear interna
<b>CNO:</b>	Cabeza del nervio óptico
<b>CPE:</b>	Capa plexiforme externa
<b>CPI:</b>	Capa plexiforme interna
<b>CPR:</b>	Capa pigmentaria de la retina
<b>Hip:</b>	Hipotálamo
<b>MLE:</b>	Membrana limitante externa
<b>MLI:</b>	Membrana limitante interna
<b>N:</b>	Nasal
<b>PEN:</b>	Parte extraocular del nervio
<b>PIN:</b>	Parte intraocular del nervio
<b>Q:</b>	Quiasma óptico
<b>RC:</b>	Retina central
<b>RM:</b>	Retina marginal
<b>T:</b>	Temporal
<b>TrO:</b>	Tracto óptico
<b>V:</b>	Ventrículo
<b>Vi:</b>	Vítreo
<b>ZCN:</b>	Zona caudal del nervio
<b>ZCP:</b>	Zona ciliar pigmentada
<b>ZDC:</b>	Zona distal al conus papillaris
<b>ZMN:</b>	Zona medial del nervio
<b>ZP:</b>	Zona peripapillaris

## **BIBLIOGRAFÍA**

**Abbott NJ.** (1987) Neurobiology Glia and the blood-brain barrier. *Nature*, 325(6101):195.

**Abcouwer SF,** Lukaszewicz GC, Ryan US & Souba WW. (1995) Molecular regulation of lung endothelial glutamine synthetase expression. *Surgery*, 118(2):325-34; discussion 335.

**Abd-el-Basset EM,** Kalnins VI & Fedoroff S. (1988) Expression of 48-kilodalton intermediate filament-associated protein in differentiating and in mature astrocytes in various regions of the central nervous system. *J. Neurosci. Res.*, 21(2-4):226-37.

**Aberg F &** Kozlova EN. (2000) Metastasis-associated mts1 (S100A4) protein in the developing and adult central nervous system. *J. Comp. Neurol.*, 424 (2):269-82.

**Adami C,** Sorci G, Blasi E, Agneletti AL, Bistoni F & Donato R. (2001) S100B expression in and effects on microglia. *Glia*, 33 (2):131-42.

**Adler R.** (2000) A model of retinal cell differentiation in the chick embryo. *Prog. Retin. Eye Res.*, 19(5):529-57.

**Aguado F,** Espinosa-Parrilla JF, Carmona MA & Soriano E. (2002) Neuronal activity regulates correlated network properties of spontaneous calcium transients in astrocytes in situ. *J Neurosci.*, 22(21):9430-44.

**Ahmad I.,** Tang L & Pham H. (2000) Identification of neural progenitors in the adult mammalian eye. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 270:517-521.

**Alexiades MR &** Cepko CL. (1997) Subsets of retinal progenitors display temporally regulated and distinct biases in the fates of their progeny. *Development.*, 124(6):1119-31.

**Anderson DR,** Hoyt WF & Hogan MJ. (1967) The fine structure of the astroglia in the human optic nerve and optic nerve head. *Trans. Am. Ophthalmol. Soc.*, 65:275-305.

**Anderson DR** & Hoyt WF. (1969) Ultrastructure of intraorbital portion of human and monkey optic nerve. *Arch. Ophthalmol.*, 82(4):506-30.

**Anderson ES**, Bjartmar C, Westermark G & Hildebrand C. (1999) Molecular heterogeneity of oligodendrocytes in chicken white matter. *Glia*, 27(1):15-21.

**Arochena M**, Anadon R & Díaz-Regueira SM. (2004) Development of vimentin and glial fibrillary acidic protein immunoreactivities in the brain of gray mullet (*Chelon labrosus*), an advanced teleost. *J. Comp. Neurol.*, 469(3):413-36.

**Ashwell K.** (1990) Microglia and cell death in the developing mouse cerebellum. *Brain Res. Dev. Brain Res.*, 55(2):219-30.

**Ashwell K.** (1991) The distribution of microglia and cell death in the fetal rat forebrain. *Brain Res. Dev. Brain Res.*, 58(1):1-12.

**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.

**Bachsich P** & Gellèrt A. (1935) Beiträge zur Kenntnis der Struktur und Funktion des Pecten oculi im Vogelauge. *Graefe´s Arch. Ophthalmol.*, 133:448-460.

**Báez J.** (1992) Formación y citodiferenciación del techo óptico del lagarto *Gallotia galloti*. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Médicas y de La Salud de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. España.

**Báez J**, Monzón-Mayor M, Yanes C, del Mar Romero-Alemán M, Francisco Arbelo-Galván J & Puelles L. (2003) Neuronal differentiation patterns in the optic tectum of the lizard *Gallotia galloti*. *Brain Res.*, 975(1-2):48-65.

**Barres BA** & Raff MC. (1993) Proliferation of oligodendrocyte precursor cells depends on electrical activity in axons. *Nature*, 21; 361(6409):258-60.

**Barres BA & Raff MC.** (1994) Control of oligodendrocyte number in the developing rat optic nerve. *Neuron*, 12(5):935-42

**Bauch H, Stier H & Schlosshauer B.** (1998) Axonal versus dendritic outgrowth is differentially affected by radial glia in discrete layers of the retina. *J. Neurosci.*, 18(5):1774-85.

**Bawa SR & YashRoy RC.** (1974) Structure and function of vulture pecten. *Acta Anat. (Basel)*, 89(3):473-80.

**Beazley LD, Tennant M, Stewart TM & Anstee SD.** (1998) The primary visual system of adult lizards demonstrates that neurogenesis is not obligatorily linked to central nerve regeneration but may be a prerequisite for the restoration of maps in the brain. *Vision Res.*, 38(6):789-93.

**Belliveau MJ & Cepko C.L.** (1999) Extrinsic and intrinsic factors control the genesis of amacrine and cone cells in the rat retina. *Development*, 126 (3):555-66.

**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.** (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.

**Bignami A, Dahl D & Seiler MW.** (1980) Neurofilaments in the chick embryo during early development. I. Immunofluorescent study with antisera to neurofilament protein. *Dev. Neurosci.*, 3(4-6):151-61.

**Bignami A, Raju T & Dahl D.** (1982) Localization of vimentin, the nonspecific intermediate filament protein, in embryonal glia and in early differentiating neurons. In

vivo and in vitro immunofluorescence study of the rat embryo with vimentin and neurofilament antisera. *Dev. Biol.*, 91(2):286-95.

**Bignami A.** (1984) Glial fibrillary acidic (GFA) protein in Muller glia. Immunofluorescence study of the goldfish retina. *Brain Res.*, 300(1):175-8.

**Bignami A & Dahl D.** (1989) Vimentin-GFAP transition in primary dissociated cultures of rat embryo spinal cord. *Int. J. Dev. Neurosci.*, 7(4):343-57.

**Björklund H, Dahl D, Haglid K, Rosengren L & Olson L.** (1983) Astrocytic development in fetal parietal cortex grafted to cerebral and cerebellar cortex of immature rats. *Brain Res.*, 285(2):171-80.

**Björklund H, Bignami A & Dahl D.** (1985) Immunohistochemical demonstration of glial fibrillary acidic protein in normal rat Muller glia and retinal astrocytes. *Neurosci. Lett.*, 54(2-3):363-8.

**Blakemore WF.** (1982) Ethidium bromide induced demyelination in the spinal cord of the cat. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, 8(5):365-75.

**Brach V.** (1975) The effect of intraocular ablation of the pecten oculi of the chicken. *Invest. Ophthalmol.*, 14 (2):166-8.

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

**Braekevelt CR.** (1991a) Electron microscopic observations on the pecten of the great blue heron (*Ardea herodias*). *Histol. Histopathol.*, 6(3):345-51.

**Braekevelt CR.** (1991b) Fine structure of the pecten oculi of the red-tailed hawk (*Buteo jamaicensis*). *Anat. Histol. Embryol.*, 20(4):354-62.

**Braekevelt CR.** (1993) Fine structure of the pecten oculi in the great horned owl (*Bubo virginianus*). *Histol. Histopathol.*, 8(1):9-15.

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

**Braisted JE**, Essman TF & Raymond PA. (1994) Selective regeneration of photoreceptors in goldfish retina. *Development*, 120 (9):2409-2419.

**Brandon C** & Lam DM. (1983) L-glutamic acid: a neurotransmitter candidate for cone photoreceptors in human and rat retinas. *Proc Natl Acad Sci USA*, 80(16):5117-21.

**Bravo R** & Celis JE. (1980) A search for differential polypeptide synthesis throughout the cell cycle of Hela cells. *J. Cell Biol.*, 84:795-802.

**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**, Frank R, Blundell PA & McDonald-Bravo H. (1987) Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase- $\delta$ . *Nature*, 326:515-517.

**Bringmann A**, Kuhrt H, Germer A, Biedermann B & Reichenbach A. (1998) Muller (glial) cell development in vivo and in retinal explant cultures: morphology and electrophysiology, and the effects of elevated ammonia. *J. Hirnforsch.*, 39(2):193-206.

**Brittis PA**, Canning DR & Silver J. (1992) Chondroitin sulfate as a regulator of neuronal patterning in the retina. *Science*, 255(5045):733-6.

**Bunge RP**. (1968) Glial cells and the central myelin sheath. *Physiol. Rev.*, 48(1):197-251.

**Burne JF**, Staple JK & Raff MC. (1996) Glial cells are increased proportionally in transgenic optic nerves with increased numbers of axons. *J. Neurosci.*, 16(6):2064-73.

**Büssow H**. (1980) The astrocytes in the retina and optic nerve head of mammals: a special glia for the ganglion cell axons. *Cell Tissue Res.*, 206(3):367-78.

**Caldani M**, Rolland B, Fages C & Tardy M. (1982) Glutamine synthetase activity during mouse brain development. *Experientia*, 38(10):1199-202.

**Calvo JL**, Carbonell AL & Boya J. (1990) Coexpression of vimentin and glial fibrillary acidic protein in astrocytes of the adult rat optic nerve. *Brain Res.*, 532:355-357.

**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.

**Campbell K** & Gotz M. (2002) Radial glia: multi-purpose cells for vertebrate brain development. *Trends Neurosci.*, 25(5):235-8.

**Carter-Dawson LD** & LaVail MM. (1979) Rods and cones in the mouse retina. II. Autoradiographic analysis of cell generation using tritiated thymidine. *J. Comp. Neurol.*, 188(2):263-72.

**Castanet J** & Báez M. (1988) Data on age and longevity in *Gallotia galloti* (Sauria, Lacertidae) assessed by skeletochronology. *Herpetological J.*, 1:212-222.

**Castellano B** & González B. (1996) Las células de microglía: origen, diferenciación y función en el cerebro normal. *Boletín SENC*, Vol. 5 Num. 1.

**Cerutti SM** & Chadi G. (2000) S-100 immunoreactivity is increased in reactive astrocytes of the visual pathways following a mechanical lesion of the rat occipital cortex. *Cell Biol. Int.*, 24 (1):35-49.

**Clint SC** & Zupanc GK. (2002) Up-regulation of vimentin expression during regeneration in the adult fish brain. *Neuroreport.*, 13(3):317-20.

**Cocchia D.** (1981) Immunocytochemical localization of S-100 protein in the brain of adult rat. An ultrastructural study. *Cell Tissue Res.*, 214:529-540.

**Cocchia D**, Polak JM, Terenghi G, Battaglia F, Stolfi V, Gangitano C & Michetti F. (1983) Localization of S-100 protein in Muller cells of the retina--2. Electron microscopical immunocytochemistry. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 24(7):980-4.

**Cochard P** & Paulin D. (1984) Initial expression of neurofilaments and vimentin in the central and peripheral nervous system of the mouse embryo *in vivo*. *J. Neurosci.*, 4(8):2080-94.

**Cohen I**, Sivron T, Lavie V, Blaugrund E & Schwartz M. (1994) Vimentin immunoreactive glial cells in the fish optic nerve: implications for regeneration. *Glia*, 10(1):16-29.

**Condorelli DF**, Nicoletti VG, Barresi V, Conticello SG, Caruso A, Tendi EA & Giuffrida Stella AM. (1999) Structural features of the rat GFAP gene and identification of a novel alternative transcript. *J. Neurosci. Res.*, 56(3):219-28.

**Cornell-Bell AH**, Finkbeiner SM, Cooper MS & Smith SJ. (1990) Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: long-range glial signaling. *Science*, 247(4941):470-3.

**Cuadros MA** & Navascués J. (1998) The origin and differentiation of microglial cells during development. *Prog Neurobiol.* 56(2):173-89.

**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.

**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.

**Charles AC**, Merrill JE, Dirksen ER & Sanderson MJ. (1991) Intercellular signaling in glial cells: calcium waves and oscillations in response to mechanical stimulation and glutamate. *Neuron*, 6(6):983-92.

**Cheng HJ**, Nakamoto M, Bergemann AD & Flanagan JG. (1995) Complementary gradients in expression and binding of ELF-1 and Mek4 in development of the topographic retinotectal projection map. *Cell*, 82:371-81.

**Dahl D**, Rueger DC, Bignami A, Weber K & Osborn M. (1981a) Vimentin, the 57 000 molecular weight protein of fibroblast filaments, is the major cytoskeletal component in immature glia. *Eur. J. Cell. Biol.*, 24(2):191-6.

**Dahl D**, Bignami A, Weber K & Osborn M. (1981b) Filament proteins in rat optic nerves undergoing Wallerian degeneration: localization of vimentin, the fibroblastic 100-A filament protein, in normal and reactive astrocytes. *Exp. Neurol.*, 73(2):496-506.

**Dahl D**, Strocchi P & Bignami A. (1982) Vimentin in the central nervous system. A study of the mesenchymal-type intermediate filament-protein in Wallerian degeneration and in postnatal rat development by two-dimensional gel electrophoresis. *Differentiation*, 22(3):185-90.

**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.

**Dávila JC**, Guirado S, De La Calle A & Marín-Girón F. (1987) The intra-ocular portion of the turtle *Mauremys caspica*. *J. Anat.*, 151:189-198.

**De Guevara R**, Pairault C & Pinganaud G. (1994) Expression of vimentin and GFAP and development of the retina in the trout. *C. R. Acad. Sci. III.*, 317(8):737-41.

**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.

**Deiner MS**, Kennedy TE, Fazeli A, Serafini T, Tessier-Lavigne M & Sretavan DW. (1997) Netrin-1 and DCC mediate axon guidance locally at the optic disc: loss of function leads to optic nerve hypoplasia. *Neuron*, 19(3):575-89.

**De la Torre JR**, Hopker VH, Ming GL, Poo MM, Tessier-Lavigne M, Hemmati-Brivanlou A & Holt CE. (1997) Turning of retinal growth cones in a netrin-1 gradient mediated by the netrin receptor DCC. *Neuron*, 19(6):1211-24.

**Del Río-Hortega P.** (1919) El "tercer elemento" de los centros nerviosos. *Bol. Soc. Esp. Biol.*, 9:68–120.

**Del Río-Hortega P.** (1932) Microglia. In: W. Penfield (ed.): *Cytology and Cellular Pathology of the Nervous System*, Vol. 2, New York: Paul B. Hoeber, pp: 481–534.

**Derouiche A.** (1996) Possible role of the Muller cell in uptake and metabolism of glutamate in the mammalian outer retina. *Vision Res.*, 36(24):3875-8.

**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, Spycher MA & Pfautsch M. (1973) Fine structural observations of the pecten oculi capillaries of the chicken. Freeze-etching, scanning and transmission electron microscopic investigations. *Z. Zellforsch .Mikrosk. Anat.*, 146(4):473-89.

**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.

**Doetsch F**, Caille I, Lim DA, García-Verdugo JM & Álvarez-Buylla A. (1999) Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell*, 97(6):703-16.

**Donato R.** (1999) Functional roles of S100 proteins, calcium binding proteins of the EF-hand type. *Biochim. Biophys. Acta*, 1450:191-231.

**Donato R.** (2001) S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *The Int. J. Bioch. & Cell Biol.*, 7:637-668.

**Dräger UC.** (1983) Coexistence of neurofilaments and vimentin in a neurone of adult mouse retina. *Nature*, 303(5913):169-72.

**Dräger UC**, Edwards DL & Barnstable CJ. (1984) Antibodies against filamentous components in discrete cell types of the mouse retina. *J. Neurosci.*, 4(8):2025-42.

**Drescher U**, Kremoser C, Handwerker C, Loschinger J, Noda M & Bonhoeffer F. (1995) In vitro guidance of retinal ganglion cell axons by RAGS, a 25 kDa tectal protein related to ligands for Eph receptor tyrosine kinases. *Cell*, 82(3):359-70.

**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 LB, 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(1):71-84.

**Dütting D**, Gierer A & Hansmann G. (1983) Self-renewal of stem cells and differentiation of nerve cells in the developing chick retina. *Brain Res.*, 312(1):21-32.

**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.

**Easter SS Jr.** (1992) Retinal growth in foveated teleosts: nasotemporal asymmetry keeps the fovea in temporal retina. *J. Neurosci.*, 12(6):2381-92.

**Ehinger B.** (1967) Adrenergic nerves in the avian eye and ciliary ganglion. *Z. Zellforsch Mikrosk. Anat.*, 82(4):577-88.

**Ekström P**, Sanyal S, Narfstrom K, Chader GJ & van Veen T. (1988) Accumulation of glial fibrillary acidic protein in Muller radial glia during retinal degeneration. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 29(9):1363-71.

**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.** (1994) GFAP and astrogliosis. *Brain Pathol.*, 4(3):229-37.

**Eng LF**, Ghirnikar RS & Lee YL. (2000) Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochem. Res.*, 25(9-10):1439-51.

**Engel AK & Müller CM.** (1989) Postnatal development and vimentin-immunoreactive radial glia cells in the primary visual cortex of the cat. *J. Neurocytol.*, 18: 437-450.

**Erickson PA**, Fisher SK, Guerin CJ, Anderson DH & Kaska DD. (1987) Glial fibrillary acidic protein increases in Muller cells after retinal detachment. *Exp. Eye Res.*, 44(1):37-48.

**Fages C**, Khelil M, Rolland B, Bridoux AM & Tardy M. (1988) Glutamine synthetase: a marker of an astroglial subpopulation in primary cultures of defined brain areas. *Dev. Neurosci.*, 10(1):47-56.

**Famiglietti EV**, Stopa EG, McGookin ED, Song P, LeBlanc V & Streeten BW. (2003) Immunocytochemical localization of vascular endothelial growth factor in neurons and glial cells of human retina. *Brain Res.*, 969(1-2):195-204.

**Fedoroff S**, Zhai R & Novak JP. (1997) Microglia and astroglia have a common progenitor cell. *J Neurosci Res.* 50(3):477-86.

**Feinstein DL**, Weinmaster GA & Milner RJ. (1992) Isolation of cDNA clones encoding rat glial fibrillary acidic protein: expression in astrocytes and in Schwann cells. *J. Neurosci. Res.*, 32(1):1-14.

**Feldheim DA**, Vanderhaeghen P, Hansen MJ, Frisen J, Lu Q, Barbacid M & Flanagan JG. (1998) Topographic guidance labels in a sensory projection to the forebrain. *Neuron*, 21(6):1303-13.

**Fernald RD**. (1990) Teleost vision: seeing while growing. *J. Exp. Zool., Suppl.* 5:167-80.

**Ffrench-Constant C**, Miller RH, Kruse J, Schachner M & Raff MC. (1986) Molecular specialization of astrocyte processes at nodes of Ranvier in rat optic nerve. *J. Cell Biol.*, 102(3):844-52.

**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. (2001a) Müller glia are a potential source of neural regeneration in the postnatal chicken retina. *Nat. Neurosci.*, 4 (3):247-252.

**Fischer AJ** & Reh TA. (2001b) Transdifferentiation of pigmented epithelial cells: a source of retinal stem cells? *Dev Neurosci.*, 23(4-5):268-76.

**Fischer AJ**, McGuire CR, Dierks BD & Reh TA. (2002) Insulin and fibroblast growth factor 2 activate a neurogenic program in Muller glia of the chicken retina. *J. Neurosci.*, 22(21):9387-98.

**Fischer AJ** & Reh T.A. (2002) Exogenous growth factors stimulate the regeneration of ganglion cells in the chicken retina. *Dev. Biol.*, 251:367-379.

**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.

**Fischer AJ**, Omar G, Eubanks J, McGuire CR, Dierks BD & Reh TA. (2004) Different aspects of gliosis in retinal Muller glia can be induced by CNTF, insulin, and FGF2 in the absence of damage. *Mol. Vis.*, 10:973-86.

**Fischer AJ.** (2005) Neural regeneration in the chick retina. *Prog Retin Eye Res.* 24 (2):161-82.

**Franke WW**, Schmid E, Osborn M & Weber K. (1978) Different intermediate-sized filaments distinguished by immunofluorescence microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 75(10):5034-8.

**Fruttiger M**, Calver AR, Kruger WH, Mudhar HS, Michalovich D, Takakura N, Nishikawa S & Richardson WD. (1996) PDGF mediates a neuron-astrocyte interaction in the developing retina. *Neuron*, 17(6):1117-31.

**Fuchs E.** (1916) Über die Lamina cribosa. *Graefe's Arch. Ophthalmol.*, 91, 435.

**Fuchs E** & Weber K. (1994) Intermediate filaments: structure, dynamics, function, and disease. *Annu. Rev. Biochem.*, 63:345-82.

**Fuhrmann S**, Levine EM & Reh TA. (2000) Extraocular mesenchyme patterns the optic vesicle during early eye development in the embryonic chick. *Development*, 127(21):4599-609.

**Fujita S** & Horii M. (1963) Analysis of cytogenesis in chick retina by tritiated thymidine autoradiography. *Arch. Histol. Jpn.* 23:359-66.

**Fujita Y**, Imagawa T & Uehara M. (2001) Fine structure of the retino-optic nerve junction in the chicken. *Tissue Cell.* 33(2):129-34.

**Galou M**, Colucci-Guyon E, Ensergueix D, Ridet JL, Gimenez y Ribotta M, Privat A, Babinet C & Dupouey P. (1996) Disrupted glial fibrillary acidic protein network in astrocytes from vimentin knockout mice. *J. Cell Biol.*, 133 (4):853-63.

**García M** & Vecino E. (2003) Role of Muller glia in neuroprotection and regeneration in the retina. *Histol. Histopathol.*, 18(4):1205-18.

**Gartner LP** & Hiatt JL. (2002) *Texto Atlas de Histología. Segunda edición por McGraw-Hill Interamericana Editores. México. Capítulo 22, pp:485-509.*

**Gaur VP**, Eldred W & Sarthy PV. (1988) Distribution of Muller cells in the turtle retina: an immunocytochemical study. *J. Neurocytol.*, 17(5):683-92.

**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.

**Gerhardt H**, Rascher G, Schuck J, Weigold U, Redies C & Wolburg H. (2000) R- and B-cadherin expression defines subpopulations of glial cells involved in axonal guidance in the optic nerve head of the chicken. *Glia*, 31(2):131-43.

**Ghandour MS**, Langley OK, Vincendon G, Gombos G, Filippi D, Limozin N, Dalmaso D & Laurent G. (1980) Immunochemical and immunohistochemical study of carbonic anhydrase II in adult rat cerebellum: a marker for oligodendrocytes. *Neuroscience*, 5(3):559-71.

**Ghandour MS**, Langley OK, Labourdette G, Vincendon G & Gombos G. (1981) Specific and artefactual cellular localization of S100: an astrocyte marker in rat cerebellum. *Dev. Neurosci.* 4 (1):66-78.

**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.

**Gilbert SF** (2000) The central nervous system and the epidermis. In: *Developmental Biology*. Sixth Edition. Sinauer Associates, Inc, Publishers. pp: 379-410.

**Giménez Y Ribotta M**, Langa F, Menet V & Privat A. (2000) Comparative anatomy of the cerebellar cortex in mice lacking vimentin, GFAP, and both vimentin and GFAP. *Glia*, 31(1):69-83.

**Giulian D**, Woodward J, Young DG, Krebs JF & Lachman LB. (1988) Interleukin-1 injected into mammalian brain stimulates astrogliosis and neovascularization. *J. Neurosci.*, 8(7):2485-90.

**Gordon-Weeks PR**. (1989) Growth at the growth cone. *Trends. Neurosci.*, 12(7):238-40.

**Goding CR**. (2000) Melanocyte development and malignant melanoma. *Forum (Genova)*, 10(3):176-87.

**Goldman RD**, Chou YH, Prahlad V & Yoon M. (1999) Intermediate filaments: dynamic processes regulating their assembly, motility, and interactions with other cytoskeletal systems. *FASEB J.* 13 Suppl 2:S261-5.

**Grant P** & Rubin E. (1980a) Ontogeny of the retina and optic nerve in *Xenopus laevis*. II. Ontogeny of the optic fiber pattern in the retina. *J. Comp. Neurol.*, 89(4):671-98.

**Grant P** & Rubin E. (1980b) Disruption of optic fibre growth following eye rotation in *Xenopus laevis* embryos. *Nature*, 287(5785):845-8.

**Gregori N**, Proschel C, Noble M & Mayer-Proschel M. (2002) The tripotential glial-restricted precursor (GRP) cell and glial development in the spinal cord: generation of bipotential oligodendrocyte-type-2 astrocyte progenitor cells and dorsal-ventral differences in GRP cell function. *J. Neurosci.*, 1: 22(1):248-56.

**Grinspan JB**, Stern JL, Pustilnik SM & Pleasure D. (1990) Cerebral white matter contains PDGF-responsive precursors to O2A cells. *J. Neurosci.*, 10(6):1866-73.

**Gunduz K**, Eagle RC Jr, Shields CL, Shields JA & Augsburger JJ. (1999) Invasive giant cell astrocytoma of the retina in a patient with tuberous sclerosis. *Ophthalmology*. 106(3):639-42.

**Guerin CJ**, Anderson DH & Fisher SK. (1990) Changes in intermediate filament immunolabeling occur in response to retinal detachment and reattachment in primates. *Invest Ophthalmol Vis. Sci.*, 31(8):1474-82.

**Hagedorn M** & Fernald RD. (1992) Retinal growth and cell addition during embryogenesis in the teleost, *Haplochromis burtoni*. *J. Comp. Neurol.*, 321(2):193-208.

**Haglid KG**, Hamberger A, Hansson HA, Hyden H, Persson L & Ronnback L. (1976) Cellular and subcellular distribution of the S-100 protein in rabbit and rat central nervous system. *Neurosci. Res.*, 2(3):175-91.

**Halfter W**, Deiss S & Schwarz U. (1985) The formation of the axonal pattern in the embryonic avian retina. *J. Comp. Neurol.*, 232(4):466-80.

**Hamilton SP** & Rome LH. (1994) Stimulation of in vitro myelin synthesis by microglia. *Glia*, 11(4):326-35.

**Hao C**, Richardson A & Fedoroff S. (1991) Macrophage-like cells originate from neuroepithelium in culture: characterization and properties of the macrophage-like cells. *Int. J. Dev. Neurosci.*, 9(1):1-14.

**Harman AM**, Snell LL & Beazley LD. (1989) Cell death in the inner and outer nuclear layers of the developing retina in the wallaby *Setonix brachyurus* (quokka). *J. Comp. Neurol.*, 289(1):1-10.

**Harris WA**. (1997) Cellular diversification in the vertebrate retina. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 7(5):651-8.

**Harris WA** & Perron M. (1998) Molecular recapitulation: the growth of the vertebrate retina. *Int. J. Dev. Biol.*, 42(3):299-304.

**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-glia 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.

**Hogan MJ**, Alvarado JA & Weddell JE. (1971) Histology of the human eye. An atlas and textbook, Toronto; W.B. Saunders, pp:523-606.

**Hoke K** & Fernald RD. (1997) Rod photoreceptor neurogenesis. *Prog. Retin. Eye Res.*, 16:31-49.

**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.

**Hollyfield JG.** (1968) Differential addition of cells to the retina in *Rana Pipiens tadpoles*. *Dev. Biol.*, 18(2):163-79.

**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.

**Horsburgh GM & Sefton AJ.** (1986) The early development of the optic nerve and chiasm in embryonic rat. *J. Comp. Neurol.*, 243(4):547-60.

**Huber G & Crosby EC.** (1933) The reptilian optic tectum. *J. Comp. Neurol.*, 57:57-163.

**Hughes WF & LaVelle A.** (1974) On the synaptogenic sequence in the chick retina. *Anat. Rec.*, 179(3):297-301.

**Huxlin KR, Dreher Z, Schulz M & Dreher B.** (1995) Glial reactivity in the retina of adult rats. *Glia*, 15(2):105-18.

**Hydén H & McEwen B.** (1966) A glial protein specific for the nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 55(2):354-8.

**Hydén H & Ronnback L.** (1975) Membrane-bound S-100 protein on nerve cells and its distribution. *Brain Res.*, 100(3):615-28.

**Inoue Y, Sugihara Y, Nishimura Y & Shimai K** (1980) Atypical neural sheaths formed by Müller cells in chicken retina. *Okajimas Folia Anat. Jpn.*, 57(2-3):79-88.

**Isobe T, Takahashi K & Okuyama T.** (1984) S100<sub>a0</sub> protein is present in neurons of the central and peripheral nervous system. *J. Neurochem.*, 43: 494-1496.

**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.

**Janeczko K.** (1991) The proliferative response of S-100 protein-positive glial cells to injury in the neonatal rat brain. *Brain Res.*, 564:86-90.

**Janeczko K.** (1992) A comparison of the proliferative activity of astrocytes and astrocyte-like cells expressing vimentin in the injured mouse cerebral hemisphere. *Folia Histochem. Cytobiol.*, 30(1):27-33.

**Janeczko K.** (1993) Co-expression of GFAP and vimentin in astrocytes proliferating in response to injury in the mouse cerebral hemisphere. A combined autoradiographic and double immunocytochemical study. *Int. J. Dev. Neurosci.*, 11(2):139-47.

**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.

**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 Res.*, 816(1):175-89.

**Johns PR.** (1977) Growth of the adult goldfish eye. III. Source of the new retinal cells. *J. Comp. Neurol.*, 176(3):343-57.

**Johns PR.** (1982) Formation of photoreceptors in larval and adult goldfish. *J. Neurosci.*, 2(2):178-98.

**Johns PR & Fernald RD.** (1981) Genesis of rods in teleost fish retina. *Nature*, 293(5828):141-2.

**Jonakait GM, Luskin MB, Wei R, Tian XF & Ni L.** (1996) Conditioned medium from activated microglia promotes cholinergic differentiation in the basal forebrain in vitro. *Dev. Biol.*, 177(1):85-95.

**Jonas JB**, Mardin CY, Schlotzer-Schrehardt U & Naumann GO. (1991) Morphometry of the human lamina cribrosa surface. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 32(2):401-5.

**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.

**Jones LL**, Yamaguchi Y, Stallcup WB & Tuszynski MH. (2002) NG2 is a major chondroitin sulfate proteoglycan produced after spinal cord injury and is expressed by macrophages and oligodendrocyte progenitors. *J. Neurosci.*, 22(7):2792-803.

**Julian D**, Ennis K & Korenbrot JJ. (1998) Birth and fate of proliferative cells in the inner nuclear layer of the mature fish retina. *J. Comp. Neurol.*, 11; 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.

**Kalman M**, Szekely AD & Csillag A. (1998) Distribution of glial fibrillary acidic protein and vimentin-immunopositive elements in the developing chicken brain from hatch to adulthood. *Anat. Embryol. (Berl)*, 198(3):213-35.

**Karim MM** & Itoh H. (1997) Demonstration of S-100 protein immunoreactivity in normal human retina and retinoblastoma. *Ophthalmologica*, 211(6):351-3.

**Karschin A**, Wassle H & Schnitzer J. (1986) Immunocytochemical studies on astroglia of the cat retina under normal and pathological conditions. *J. Comp. Neurol.*, 249(4):564-576.

**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.

**Kim DH**, Heo SD, Ahn MJ, Sim KB & Shin TK. (2003) Activation of embryonic intermediate filaments contributes to glial scar formation after spinal cord injury in rats. *J. Vet. Sci.*, 4(2):109-12.

**Klatzo I**. (1967) Presidential address. Neuropathological aspects of brain edema. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 26(1):1-14.

**Kligman D** & Hilt DC. (1988) The S-100 family. *TIBS* 13:437-443.

**Kloss CU**, Kreutzberg GW & Raivich G. (1997) Proliferation of ramified microglia on an astrocyte monolayer: characterization of stimulatory and inhibitory cytokines. *J. Neurosci. Res.*, 49(2):248-54.

**Knight JK** & Raymond PA. (1995). Retinal pigmented epithelium does not transdifferentiate in adult goldfish. *J. Neurobiol.*, 27(4):447-56.

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

**Kondo H**, Takahashi H & Takahashi Y. (1984) Immunohistochemical study of S-100 protein in the postnatal development of Müller cells and astrocytes in the rat retina. *Cell Tissue Res.*, 238:503-508.

**Kruger L** & Maxwell DS. (1966) The fine structure of ependymal processes in the teleost optic tectum. *Am. J. Anat.*, 119(3):479-97.

**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 & E.M. Tan (1986) Expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA)/cyclin during the cell cycle. *Exp. Cell. Res.*, 166:209-219.

**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.

**La Vail MM**, Rapaport DH & Rakic P. (1991) Cytogenesis in the monkey retina. *J. Comp. Neurol.*, 309(1):86-114.

**Laessing U** & Stuermer CA. (1996) Spatiotemporal pattern of retinal ganglion cell differentiation revealed by the expression of neurodin in embryonic zebrafish. *J. Neurobiol.*, 29(1):65-74.

**Lam TT**, Kwong JM & Tso MO. (2003) Early glial responses after acute elevated intraocular pressure in rats. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 44(2):638-45.

**Lang DM**, Monzón-Mayor M, Bandtlow CE & Stuermer CAO. (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.

**Langley OK** & Ghandour MS, Gombos G. (1984) Immunohistochemistry of cell markers in the central nervous system. In: Lajtha A, editor. *Handbook of Neurochemistry*. Plenum Publishing Corporation. pp: 545-611.

**Lara JM**, Alonso JR, Vecino E, Covenas R & Aijón J. (1989) Neuroglia in the optic tectum of teleosts. *J Hirnforsch*, 30(4):465-72.

**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. pp:3-18.

**Lasansky A.** (1965) Functional implications of structural findings in retinal glial cells. *Prog. Brain Res.*, 15:48-72.

**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.

**Lauderdale JD**, Davis NM & Kuwada JY. (1997) Axon tracts correlate with netrin-1a expression in the zebrafish embryo. *Mol. Cell. Neurosci*, 9(4):293-313.

**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.

**Lazarides E.** (1982) Intermediate filaments: a chemically heterogeneous, developmentally regulated class of proteins. *Annu. Rev. Biochem.*, 51:219-50.

**Lazzari M** & Franceschini V. (2001) Glial fibrillary acidic protein and vimentin immunoreactivity of astroglial cells in the central nervous system of adult *Podarcis sicula* (Squamata, Lacertidae). *J. Anat.*, 198(Pt 1):67-75.

**Lee JC**, Mayer-Proschel M & Rao MS. (2000) Gliogenesis in the central nervous system. *Glia*, 30(2):105-21.

**Lemmon V & Rieser G.** (1983) The development distribution of vimentin in the chick retina. *Brain Res.*, 313(2):191-7.

**Levi G, Agresti C, D'Urso D & Aloisi F.** (1991) Is the oligodendroglial differentiation of bipotential oligodendrocyte-type 2 astrocyte progenitors promoted by autocrine factors? *Neurosci. Lett.*, 128(1):37-41.

**Levine RL.** (1989) Organization of astrocytes in the visual pathways of the goldfish: an immunohistochemical study. *J.Comp. Neurol.*, 285(2):231-45.

**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 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, Erickson PA, Guerin CJ, Anderson DH & Fisher SK.** (1989) Changes in the expression of specific Muller cell proteins during long-term retinal detachment. *Exp. Eye Res.*, 49(1):93-111.

**Lewis GP, Guerin CJ, Anderson DH, Matsumoto B & Fisher SK.** (1994) Rapid changes in the expression of glial cell proteins caused by experimental retinal detachment. *Am. J. Ophthalmol.*, 118(3):368-76.

**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.

**Lewis GP & Fisher SK.** (2003) Up-regulation of glial fibrillary acidic protein in response to retinal injury: its potential role in glial remodeling and a comparison to vimentin expression. *Int. Rev. Cytol.*, 230:263-90.

**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.

**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.

**Lin J** & Cai W. (2004) Effect of vimentin on reactive gliosis: in vitro and in vivo analysis. *J. Neurotrauma.*, 21(11):1671-82.

**Ling EA**, Paterson JA, Privat A, Mori S & Leblond CP. (1973) Investigation of glial cells in semithin sections. I. Identification of glial cells in the brain of young rats. *J. Comp. Neurol.*, 149(1):43-71.

**Ling EA** & Wong WC. (1993) The origin and nature of ramified and amoeboid microglia: a historical review and current concepts. *Glia*, 7(1):9-18.

**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 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.

**Linser P** & Moscona AA. (1981) Developmental changes in the distribution of S-100 in avian neural retina. *Dev. Neurosci.*, 4(6):433-41.

**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.

**Linser PJ**. (1985) Multiple marker analysis in the avian optic tectum reveals three classes of neuroglia and carbonic anhydrase-containing neurons. *J. Neurosci.*, 5(9):2388-2396.

**Linser PJ** & Perkins M. (1987) Gliogenesis in the embryonic avian optic tectum: neuronal-glia 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.

**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.

**Lohr F**, Wenz F, Haas S & Flentje M. (1995) Comparison of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) staining and BrdUrd-labelling index under different proliferative conditions in vitro by flow cytometry. *Cell Prolif.*, 28(2):93-104.

**Ludwin SK**, Kosek JC & Eng LF (1976) The topographical distribution of S-100 and GFA proteins in the adult rat brain: An immunohistochemical study using horseradish peroxidase-labelled antibodies. *J. Comp. Neurol.*, 165 (2):197-207.

**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.

- Mann IC.** (1924) The function of the pecten. *Br. J. Ophthalmol.*, 8:209-226.
- Manso MJ,** Becerra M, Becerra M & Anadon R. (1997) Expression of a low-molecular-weight (10 KDa) calcium binding protein in glial cells of the brain of the trout. *Anat Embryol.*, 196(5):403-416.
- Margotta V,** Morelli A & Alfei L. (1999a) PCNA Positivity in the telencephalic matrix areas in the adult of a lizard, *Podarcis sicula*. *J. Brain Res.*, 39(3):271-276.
- Margotta V,** Morelli A & Alfei L. (1999b) PCNA Positivity in the telencephalic matrix areas in the adult of a newt, *Triturus carnifex*. *J. Brain Res.*, 39 (4):525-530.
- Marín-Teva JL,** Calvente R, Cuadros MA, Almendros A & Navascués J. (1999) Circumferential migration of ameboid microglia in the margin of the developing quail retina. *Glia*, 27(3):226-38.
- Marshak DR & Pena LA.** (1992) Potential role of S100 beta in Alzheimer's disease: an hypothesis involving mitotic protein kinases. *Prog. Clin. Biol. Res.*, 379:289-307.
- Martínez A,** Otal R & Soriano García E. (2004) Efrinas, desarrollo neuronal y plasticidad. *Rev Neurol.* 38(7):647-55.
- Martínez-Hernández A,** Bell KP & Norenberg MD. (1977) Glutamine synthetase: glial localization in brain. *Science*, 195(4284):1356-8.
- Martínez-Morales JR,** Rodrigo I & Bovolenta P. (2004) Eye development: a view from the retina pigmented epithelium. *Bioessays*, 26(7):766-77.
- Mata M,** Alessi D, & Fink DJ. (1990) S100 is preferentially distributed in myelin-forming Schwann cells. *J. Neurocytol.*, 19(3):432-42.
- Mathews MB,** Bernstein RM, Franza BR & Garrels JI. (1984) Identity of the proliferating cell nuclear antigen and cyclin. *Nature*, 309:374-376.

**Matus A** & Mughal S. (1975) Immunohistochemical localisation of S-100 protein in brain. *Nature*, 258(5537):746-8.

**Mazzoni IE** & Kenigsberg RL. (1997) Microglia from the developing rat medial septal area can affect cholinergic and GABAergic neuronal differentiation in vitro. *Neuroscience*, 76(1):147-57.

**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(4):223-32.

**Meller K** & Tetzlaff W. (1976) Scanning electron microscopic studies on the development of the chick retina. *Cell Tissue Res.*, 170(2):145-59.

**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.

**Meyer RL.** (1978) Evidence from thymidine labeling for continuing growth of retina and tectum in juvenile goldfish. *Exp. Neurol.*, 59(1):99-111.

**Mi H** & Barres BA. (1999) Purification and characterization of astrocyte precursor cells in the developing rat optic nerve. *J. Neurosci.*, 19(3):1049-61.

**Mi H**, Haeberle H & Barres BA. (2001) Induction of astrocyte differentiation by endothelial cells. *J. Neurosci.*, 21(5):1538-47.

**Miller RF** & Dowling JE. (1970) Intracellular responses of the Müller (glial) cells of mudpuppy retina: their relation to b-wave of the electroretinogram. *J. Neurophysiol.*, 33(3):323-41.

**Miller RH**, David S, Patel R, Abney ER & Raff MC. (1985) A quantitative immunohistochemical study of macroglial cell development in the rat optic nerve: in vivo evidence for two distinct astrocyte lineages. *Dev. Biol.*, 111(1):35-41.

**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.

**Miller RH**. (2002) Regulation of oligodendrocyte development in the vertebrate CNS. *Prog. Neurobiol.*, 67(6):451-67.

**Miskevich F**. (1999) Laminar redistribution of a glial subtype in the chick optic tectum. *Brain Res. Dev. Brain Res.*, 115(2):103-9.

**Miyachi K**, Fritzler MJ & Tan EM. (1978) Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells. *J. Immunol.*, 121(6):2228-34.

**Miyake T** & Kitamura T. (1992) Glutamine synthetase immunoreactivity in two types of mouse brain glial cells. *Brain Res.*, 586(1):53-60.

**Mochii M**, Ono T, Matsubara Y & Eguchi G. (1998) Spontaneous transdifferentiation of quail pigmented epithelial cell is accompanied by a mutation in the *Mitf* gene. *Dev. Biol.*, 196(2):145-59.

**Møller M**, Ingild A & Bock E. (1978) Immunohistochemical demonstration of S-100 protein and GFA protein in interstitial cells of the rat pineal gland. *Brain Res.*, 140:1-13.

**Molnar ML**, Stefansson K, Marton LS, Tripathi RC & Molnar GK. (1984) Distribution of S-100 protein and glial fibrillary acidic protein in normal and gliotic human retina. *Exp. Eye Res.*, 38:27-34.

**Molnar ML**, Stefansson K, Molnar GK, Tripathi RC & Marton LS. (1985) Species variations in distribution of S100 in retina. Demonstration with a monoclonal antibody and a polyclonal antiserum. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 26(3):283-8.

**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.

**Monzón-Mayor M**, Yanes C, James JL & Sturrock RR. (1990d) An ultrastructural study of the development of oligodendrocytes in the midbrain of the lizard. *J. Anat.*, 170:43-49.

**Monzón-Mayor M**, Yanes-Méndez 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.

**Moore BW**. (1965) A soluble protein characteristic of the nervous system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 19:739-744.

**Morales MC**, Monzón M, Yanes C, Díaz C, Martín A & Marrero A. (1989) Neuronal typology of *Gallotia galloti* optic tectum. *J. Hirnforsch.*, 30(2):175-83.

**Morcós Y** & Chan-Ling T. (2000) Concentration of astrocytic filaments at the retinal optic nerve junction is coincident with the absence of intra-retinal myelination: comparative and developmental evidence. *J. Neurocytol.*, 29(9):665-78.

**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.

**Müller H.** (1851) Zur Histologie der Netzhaut. Zeitschr. f. wissensch. Zoologie, 3:234-237.

**Müller CM.** (1992) Astrocytes in cat visual cortex studied by GFAP and S-100 immunocytochemistry during postnatal development. J. Comp. Neurol., 317:309-323.

**Nagata K,** Takei N, Nakajima K, Saito H & Kohsaka S. (1993) Microglial conditioned medium promotes survival and development of cultured mesencephalic neurons from embryonic rat brain. J. Neurosci. Res., 34(3):357-63.

**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.

**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. (Berl), 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. (Berl), 176(1):79-85.

**Navascués J,** Calvente R, Marin-Teva JL & Cuadros MA. (2000) Entry, dispersion 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.

**Newman E & Reichenbach A.** (1996) The Müller cell: a functional element of the retina. Trends Neurosci., 19(8):307-12.

**Newman EA.** (1984) Regional specialization of retinal glial cell membrane. Nature, 309(5964):155-7.

**Newman EA.** (1985) Voltage-dependent calcium and potassium channels in retinal glial cells. *Nature*, 317(6040):809-11.

**Newman EA.** (1986) Regional specialization of the membrane of retinal glial cells and its importance to K<sup>+</sup> spatial buffering. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 481:273-86.

**Newman EA.** (1987) Distribution of potassium conductance in mammalian Muller (glial) cells: a comparative study. *J. Neurosci.*, 7(8):2423-32.

**Nguyen-H-Anh J.** (1974) The ultrastructure of the conus papillaris in *Zonosaurus ornatus* (Gerrhosauridea). *Acta Anat. (Basel)*, 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.

**Nguyen M & Arnheiter H.** (2000) Signaling and transcriptional regulation in early mammalian eye development: a link between FGF and MITF. *Development*, 127(16):3581-91.

**Nielsen AL, Holm IE, Johansen M, Bonven B, Jorgensen P & Jorgensen AL.** (2002) A new splice variant of glial fibrillary acidic protein, GFAP epsilon, interacts with the presenilin proteins. *J. Biol. Chem.*, 277(33):29983-91.

**Nishimura Y, Inoue Y & Shimai K.** (1979) Morphological development of retinal ganglion cells in the chick embryo. *Exp. Neurol.*, 64(1):44-60.

**Noble M & Murray K.** (1984) Purified astrocytes promote the in vitro division of a bipotential glial progenitor cell. *EMBO J.*, 3(10):2243-7.

**Noble M, Proschel C & Mayer-Proschel M.** (2004) Getting a GR(i)P on oligodendrocyte development. *Dev. Biol.*, 265(1):33-52.

**Noctor SC**, Flint AC, Weissman TA, Dammerman RS & Kriegstein AR. (2001) Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex. *Nature*, 409(6821):714-20.

**Nona SN**, Shehab SA, Stafford CA & Cronly-Dillon JR. (1989) Glial fibrillary acidic protein (GFAP) from goldfish: its localisation in visual pathway. *Glia*, 2(3):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.

**Ohnuma S**, Philpott A, Wang K, Holt CE & Harris WA. (1999) p27Xic1, a Cdk inhibitor, promotes the determination of glial cells in *Xenopus* retina. *Cell*, 99(5):499-510.

**Ohnuma S**, Hopper S, Wang KC, Philpott A & Harris WA. (2002) Co-ordinating retinal histogenesis: early cell cycle exit enhances early cell fate determination in the *Xenopus* retina. *Development*, 129(10):2435-46.

**Okada TS**. (1980) Cellular metaplasia or transdifferentiation as a model for retinal cell differentiation. *Curr. Top. Dev. Biol.*, 16:349-80.

**Okere CO** & Waterhouse BD. (2004) Capsaicin increases GFAP and glutamine synthetase immunoreactivity in rat arcuate nucleus and median eminence. *Neuroreport*, 15(2):255-8.

**Ong WY**, Leong SK, Garey LJ, Reynolds R & Liang AW. (1996) An immunocytochemical study of glutamate receptors and glutamine synthetase in the hippocampus of rats injected with kainate. *Exp. Brain Res.*, 109(2):251-67.

**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.

**Ono K**, Tsumori T, Kishi T, Yokota S & Yasui Y. (1998) Developmental appearance of oligodendrocytes in the embryonic chick retina. *J. Comp. Neurol.*, 398:309-322.

**Onteniente B**, Kimura H & Maeda T. (1983) Comparative study of the glial fibrillary acidic protein in vertebrates by PAP immunohistochemistry. *J. Comp. Neurol.*, 215(4):427-36.

**Ortíz-Muñoz B**, Menéndez-López A, Yaya-Tur R, Arribas-Alpuente L, Maiquez-Richart J & Bordes-Monmeneu M. (2003) S100 protein in tumours of the central nervous system. *Rev Neurol.*, 36(11):1011-5.

**Oster SF**, Bodeker MO, He F & Sretavan DW. (2003) Invariant Sema5A inhibition serves an ensheathing function during optic nerve development. *Development.*, 130(4):775-84.

**Oster SF** & Sretavan DW. (2003) Connecting the eye to the brain: the molecular basis of ganglion cell axon guidance. *Br. J. Ophthalmol.*, 87(5):639-45.

**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.

**Ott H**, Bastmeyer M & Stuermer CA. (1998) Neurolin, the goldfish homolog of DM-GRASP, is involved in retinal axon pathfinding to the optic disk. *J. Neurosci.*, 18(9):3363-72.

**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.

**Park CM** & Hollenberg MJ. (1989) Basic fibroblast growth factor induces retinal regeneration in vivo. *Dev. Biol.*, 134(1):201-5.

**Park CM & Hollenberg MJ.** (1991) Induction of retinal regeneration in vivo by growth factors. *Dev. Biol.*, 148(1):322-33.

**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.

**Pedler C.** (1963) The fine structure of the radial fibres in the reptile retina. *Exp. Eye Res.*, 44:296-303.

**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 GFAP-deficient mice. *Glia*, 22(4):390-400.

**Pekny M,** Johansson CB, Eliasson C, Stakeberg J, Wallen A, Perlmann T, Lendahl U, Betsholtz C, Berthold CH & Frisen J. (1999a) Abnormal reaction to central nervous system injury in mice lacking glial fibrillary acidic protein and vimentin. *J. Cell Biol.*, 145(3):503-14.

**Pekny M,** Eliasson C, Siushansian R, Ding M, Dixon SJ, Pekna M, Wilson JX & Hamberger A. (1999b) The impact of genetic removal of GFAP and/or vimentin on glutamine levels and transport of glucose and ascorbate in astrocytes. *Neurochem. Res.*, 24(11):1357-62.

**Pekny M.** (2001) Astrocytic intermediate filaments: lessons from GFAP and vimentin knock-out mice. *Prog. Brain Res.*, 132:23-30.

**Pekny M & Pekna M.** (2004) Astrocyte intermediate filaments in CNS pathologies and regeneration. *J. Pathol.*, 204(4):428-37.

**Perron M & Harris WA** (2000) Retinal stem cells in vertebrates. *Bioessays*, 22(8):685-8.

**Perry VH** & Gordon S. (1991) Macrophages and the nervous system. *Int. Rev. Cytol.*, 125:203-44.

**Peterson RE**, Fadool JM, McClitock 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.*, 429:530-540.

**Petrausch B**, Jung M, Leppert CA & Stuermer CA. (2000) Lesion-induced regulation of netrin receptors and modification of netrin-1 expression in the retina of fish and grafted rats. *Mol. Cell Neurosci.*, 16(4):350-64.

**Pettigrew JD**, Wallman J & Wildsoet CF. (1990) Saccadic oscillations facilitate ocular perfusion from the avian pecten. *Nature*, 343(6256):362-3.

**Pfeiffer B**, Grosche J, Reichenbach A & Hamprecht B. (1994) Immunocytochemical demonstration of glycogen phosphorylase in Müller (glial) cells of the mammalian retina. *Glia*, 12(1):62-7.

**Pixley SK** & de Vellis J. (1984) Transition between immature radial glia and mature astrocytes studied with a monoclonal antibody to vimentin. *Brain Res.*, 317(2):201-9.

**Plaza ML**. (2002) Células de microglía NDPasa y lectina positivas durante la ontogenia del reptil *Gallotia galloti*. Comparación de la corteza telecefálica y el techo óptico. Tesis Doctoral. Departamento de Morfología. Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. España.

**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 C** & Tsacopoulos M. (1991) Glial (Müller) cells take up and phosphorylate [3H]2-deoxy-D-glucose in mammalian retina. *Neurosci. Lett.*, 122(2):241-4.

**Prada C**, Puga J, Pérez-Méndez L, López R & Ramírez G (1991) Spatial and Temporal Patterns of Neurogenesis in the Chick Retina. *Eur. J. Neurosci.*, 3(6):559-569.

**Prada FA**, Espinar A, Chmielewski CE, Dorado ME & Genis-Galvez JM. (1989) Regional adaptation of Muller cells in the chick retina. A Golgi and electron microscopical study. *Histol. Histopathol.*, 4(3):309-15.

**Prada FA**, Dorado ME, Quesada A, Prada C, Schwarz U & de la Rosa EJ. (1995) Early expression of a novel radial glia antigen in the chick embryo. *Glia*, 15(4):389-400.

**Prada FA**, Quesada A, Dorado ME, Chmielewski C & Prada C. (1998) Glutamine synthetase (GS) activity and spatial and temporal patterns of GS expression in the developing chick retina: relationship with synaptogenesis in the outer plexiform layer. *Glia*, 22(3):221-36.

**Prada FA**, Aguilera Y, Quesada A, Santano C, López R & Prada C. (2003) Diferenciación de la célula de Müller. *Revista de Neurología (Separata, Congreso SENC)*, 37:1062.

**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- $\delta$  auxiliary protein. *Nature*, 326:517-520.

**Psarra AM**, Bochaton-Piallat ML, Gabbiani G, Sekeris CE & Tsacopoulos M. (2003) Mitochondrial localization of glucocorticoid receptor in glial (Muller) cells in the salamander retina. *Glia*, 41(1):38-49.

**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(4):346-55.

**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.

**Raff MC**, Miller RH & Noble M. (1983a) A glial progenitor cell that develops in vitro into an astrocyte or an oligodendrocyte depending on culture medium. *Nature*, 303(5916):390-6.

**Raff MC**, Abney ER, Cohen J, Lindsay R & Noble M. (1983b) Two types of astrocytes in cultures of developing rat white matter: differences in morphology, surface gangliosides, and growth characteristics. *J. Neurosci.*, 3(6):1289-1300.

**Raff MC**, Abney ER & Miller RH. (1984) Two glial cell lineages diverge prenatally in rat optic nerve. *Dev. Biol.*, 106 (1):53-60.

**Raff MC**. (1989) Glial cell diversification in the rat optic nerve. *Science*, 243(4897):1450-5.

**Ramaekers FC**, Osborn M, Schmid E, Weber K, Bloemendal H & Franke WW. (1980) Identification of the cytoskeletal proteins in lens-forming cells, a special epitheloid cell type. *Exp. Cell Res.*, 127(2):309-27.

**Ramírez AI**, Salazar JJ, Triviño A, Solas M & Ramírez JM. (1998) Las células astrogiales como constituyentes de las barreras limitantes de la cabeza del nervio óptico humano. *Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología*, N°1.

**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.

**Rao MS** & Mayer-Pröschel M. (1997) Glial-restricted precursors are derived from multipotent neuroepithelial stem cells. *Dev. Biol.*, 188(1):48-63.

**Rao MS**, Noble M & Mayer-Proschel M. (1998) A tripotential glial precursor cell is present in the developing spinal cord. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95(7):3996-4001.

**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.

**Rasmussen KE**. (1972) A morphometric study of the Müller cell cytoplasm in the rat retina. *J. Ultrastruct. Res.*, 39(5):413-29.

**Rasmussen KE**. (1973) A morphometric study of the Müller cells, their nuclei and mitochondria, in the rat retina. *J. Ultrastruct. Res.*, 44(1):96-112.

**Rasmussen KE**. (1974) The Müller cell: a comparative study of rod and cone retinas with and without retinal vessels. *Exp. Eye Res.*, 19(3):243-57.

**Rasmussen KE**. (1975) A morphometric study of the Müller cell in rods and cone retinas with and without retinal vessels. *Exp. Eye Res.*, 20(2):151-66.

**Raymond PA**. (1985) Cytodifferentiation of photoreceptors in larval goldfish: delayed maturation of rods. *J. Comp. Neurol.*, 236(1):90-105.

**Raymond PA** & Rivlin PK. (1987) Germinal cells in the goldfish retina that produce rod photoreceptors. *Dev Biol.* 122(1):120-38.

**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.

**Reeh, MJ.** (1981) The optic nerve: definition and description. In MJ Reeh, JL Wobig, JD Wirtschafter (Eds): Ophthalmic anatomy. A manual with some clinical applications, Part 2: The globe. California, American Academy of Ophthalmology, pp:146-151.

**Reh TA & Tully T.** (1986) Regulation of tyrosine hydroxylase-containing amacrine cell number in larval frog retina. *Dev. Biol.*, 114(2):463-9.

**Reh TA.** (1987) Cell-specific regulation of neuronal production in the larval frog retina. *J. Neurosci.*, 7(10):3317-24.

**Reh TA & Nagy T.** (1987) A possible role for the vascular membrane in retinal regeneration in *Rana catesbeiana* tadpoles. *Dev. Biol.*, 122(2):471-82.

**Reh TA & Levine E.M.** (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, Stolzenburg JU, Eberhardt W, Chao TI, Dettmer D & Hertz L.** (1993) What do retinal muller (glial) cells do for their neuronal 'small siblings'? *J. Chem. Neuroanat.*, 6(4):201-13.

**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, Fromter C, Engelmann R, Wolburg H, Kasper M & Schnitzer J.** (1995) Muller glial cells of the tree shrew retina. *J. Comp. Neurol.*, 360(2):257-70.

**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.

**Ribotta MG**, Menet V & Privat A. (2004) Glial scar and axonal regeneration in the CNS: lessons from GFAP and vimentin transgenic mice. *Acta Neurochir. Suppl.*, 89:87-92.

**Rickmann M** & Wolff JR. (1995a) S100 immunoreactivity in a subpopulation of oligodendrocytes and Ranvier's nodes of adult rat brain. *Neurosci. Lett.*, 186(1):13-6.

**Rickmann M** & Wolff JR. (1995b) S100 protein expression in subpopulations of neurons of rat brain. *Neuroscience*, 67(4):977-91.

**Rickmann M**, Wolff JR & Meyer DL. (1995) Expression of S100 protein in the vestibular nuclei during compensation of unilateral labyrinthectomy symptoms. *Brain Res.*, 688(1-2):8-14.

**Riepe RE** & Norenberg MD. (1978) Glutamine synthetase in the developing rat retina: an immunohistochemical study. *Exp. Eye Res.*, 27(4):435-44.

**Robert A**, Howe JR & Waxman SG. (2000) Development of glutamatergic synaptic activity in cultured spinal neurons. *J. Neurophysiol.*, 83(2):659-70.

**Robinson SR** & Dreher Z. (1990) Muller cells in adult rabbit retinae: morphology, distribution and implications for function and development. *J. Comp. Neurol.*, 292(2):178-92.

**Romero-Alemán M del M**, Monzón-Mayor M, Yanes C, Arbelo-Galván JF, Lang D, Renau-Piqueras J & Negrín-Martínez C. (2003) S100 immunoreactive glial cells in the

forebrain and midbrain of the lizard *Gallotia galloti* during ontogeny. *J. Neurobiol.*, 57(1):54-66.

**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.

**Rubin LL** & Staddon JM. (1999) The cell biology of the blood-brain barrier. *Annu. Rev. Neurosci.*, 22:11-28.

**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.

**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.

**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.

**Sarup V**, Patil K & Sharma SC. (2004) Ciliary neurotrophic factor and its receptors are differentially expressed in the optic nerve transected adult rat retina. *Brain Res.*, 1013(2):152-8.

**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.

**Schachner M**, Hedley-Whyte ET, Hsu DW, Schoonmaker G & Bignami A. (1977) Ultrastructural localization of glial fibrillary acidic protein in mouse cerebellum by immunoperoxidase labeling. *J. Cell. Biol.*, 75(1):67-73.

**Schäfer BW** & Heizmann W. (1996) The S-100 family of EF-hand calcium-binding proteins: functions and pathology. *Trends. Biochem. Sci.*, 21(4):134-40.

**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.

**Schiffer D**, Giordana MT, Migheli A, Giaccone G, Pezzotta S & Mauro A. (1986) Glial fibrillary acidic protein and vimentin in the experimental glial reaction of the rat brain. *Brain Res.*, 374(1):110-8.

**Schnitzer J**, Franke WW & Schachner M. (1981) Immunocytochemical demonstration of vimentin in astrocytes and ependymal cells of developing and adult mouse nervous system. *J. Cell. Biol.*, 90(2):435-47.

**Schnitzer J.** (1985) Distribution and immunoreactivity of glia in the retina of the rabbit. *J. Comp. Neurol.*, 240(2):128-42.

**Schnitzer J.** (1987) Immunocytochemical localization of S-100 protein in astrocytes and Muller cells in the rabbit retina. *Cell Tissue Res.*, 248(1):55-61.

**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.*, 259:263-275.

**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.

**See J**, Zhang X, Eraydin N, Mun SB, Mamontov P, Golden JA & Grinspan JB. (2004) Oligodendrocyte maturation is inhibited by bone morphogenetic protein. *Mol. Cell. Neurosci.*, 26(4):481-92.

**Seidman KJ**, Teng AL, Rosenkopf R, Spilotro P & Weyhenmeyer JA. (1997) Isolation, cloning and characterization of a putative type-1 astrocyte cell line. *Brain Res.*, 753(1):18-26.

**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.

**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 SC** & Ungar F. (1980) Histogenesis of the goldfish retina. *J. Comp. Neurol.*, 191(3):373-82.

**Shaw G**, Osborn M & Weber K. (1981) An immunofluorescence microscopical study of the neurofilament triplet proteins, vimentin and glial fibrillary acidic protein within the adult rat brain. *Eur. J. Cell. Biol.*, 26(1):68-82.

**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.

**Shaw G** & Weber K. (1984) The intermediate filament complement of the retina: a comparison between different mammalian species. *Eur. J. Cell. Biol.*, 33(1):95-104.

**Sheng JG**, Mrak RE & Griffin WS. (1997) Glial-neuronal interactions in Alzheimer disease: progressive association of IL-1alpha+ microglia and S100beta+ astrocytes with neurofibrillary tangle stages. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 56(3):285-90.

**Sherbet GV** & Lakshmi MS. (1998) S100A4 (MTS1) calcium binding protein in cancer growth, invasion and metastasis. *Anticancer Res*, 18(4A):2415-21.

**Shin DH**, Lee E & Cho SS. (2003) Glial cells in the chicken optic tectum. *Brain Res.*, 962(1-2):221-5.

**Sidman R.** (1961) In: Smelser (Ed.), *Histogenesis of the mouse retina studied with tritiated thymidine*. Academic. Press. New York.

**Skoff RP**, Price DL & Stocks A. (1976) Electron microscopic autoradiographic studies of gliogenesis in rat optic nerve. II. Time of origin. *J. Comp. Neurol.*, 169:313-334.

**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.

**Skoff RP.** (1990) Gliogenesis in rat optic nerve: astrocytes are generated in a single wave before oligodendrocytes. *Dev. Biol.*, 139(1):149-68.

**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(6126):155-7.

**Snow DM** & Letourneau PC. (1992) Neurite outgrowth on a step gradient of chondroitin sulfate proteoglycan (CS-PG). *J. Neurobiol.*, 23(3):322-36.

**Sommer I** & Schachner M. (1981) Monoclonal antibodies (O1 to O4) to oligodendrocyte cell surfaces: an immunocytological study in the central nervous system. *Dev. Biol.*, 83(2):311-27.

**Song HJ** & Poo MM. (1999) Signal transduction underlying growth cone guidance by diffusible factors. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 9(3):355-63.

**Spassky N**, de Castro F, Le Bras B, Heydon K, Queraud-LeSaux F, Bloch-Gallego E, Chedotal A, Zalc B & Thomas JL. (2002) Directional guidance of oligodendroglial migration by class 3 semaphorins and netrin-1. *J. Neurosci.*, 22(14):5992-6004.

**Spence SG** & Robson JA. (1989) An autoradiographic analysis of neurogenesis in the chick retina in vitro and in vivo. *Neuroscience*, 32(3):801-12.

**Stafford CA**, Shehab SA, Nona SN & Cronly-Dillon JR. (1990) Expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in goldfish optic nerve following injury. *Glia*, 3(1):33-42.

**Stagaard-Janás M**, Nowakowski RS, Terkelsen OB & Møllgård K. (1991a) Glial cell differentiation in neuron-free and neuron-rich regions. I. Selective appearance of S-100 protein in radial glial cells of the hippocampal fimbria in human fetuses. *Anat. Embryol.*, 184(6):549-558.

**Stagaard-Janás M**, Nowakowski RS & Møllgård K. (1991b) Glial cell differentiation in neuron-free and neuron-rich regions. II. Early appearance of S-100 protein positive astrocytes in human fetal hippocampus. *Anat. Embryol. (Berl)*, 184(6):559-69.

**Starger JM**, Brown WE, Goldman AE & Goldman RD. (1978) Biochemical and immunological analysis of rapidly purified 10-nm filaments from baby hamster kidney (BHK-21) cells. *J. Cell. Biol.*, 78(1):93-109.

**Steindler DA** & Laywell ED. (2003) Astrocytes as stem cells: nomenclature, phenotype, and translation. *Glia*, 43(1):62-9.

**Stone LS**. (1950) Neural retina degeneration followed by regeneration from surviving retinal pigment cells in grafted adult salamander eyes. *Anat. Rec.*, 106(1):89-109.

**Stone J** & Dreher Z. (1987) Relationship between astrocytes, ganglion cells and vasculature of the retina. *J. Comp. Neurol.*, 255(1):35-49.

**Stone J**, Itin A, Alon T, Pe'er J, Gnessin H, Chan-Ling T & Keshet E. (1995) Development of retinal vasculature is mediated by hypoxia-induced vascular endothelial growth factor (VEGF) expression by neuroglia. *J. Neurosci.*, 15(7 Pt 1):4738-47.

**Streit WJ.** (2001) Microglia and macrophages in the developing CNS. *Neurotoxicology*, 22(5):619-24.

**Strähle U**, Fischer N & Blader P. (1997) Expression and regulation of a netrin homologue in the zebrafish embryo. *Mech. Dev.*, 62(2):147-60.

**Stroeva OG** & Mitashov VI. (1983) Retinal pigment epithelium: proliferation and differentiation during development and regeneration. *Int. Rev. Cytol.*, 83:221-93.

**Stuermer CA** & Bastmeyer M. (2000) The retinal axon's pathfinding to the optic disk. *Prog. Neurobiol.*, 62(2):197-214.

**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.

**Suter DM** & Forscher P. (1998) An emerging link between cytoskeletal dynamics and cell adhesion molecules in growth cone guidance. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 8(1):106-16.

**Suter DM** & Forscher P. (2000) Substrate-cytoskeletal coupling as a mechanism for the regulation of growth cone motility and guidance. *J Neurobiol*, 44(2):97-113.

**Sviridov SM**, Korochkin LI, Ivanov VN, Maletskaya EI & Bakhtina TK. (1972) Immunohistochemical studies of S-100 protein during postnatal ontogenesis of the brain of two strains of rats. *J Neurochem*, 19(3):713-8.

**Tabuchi K**, Kirsch WM & Nakane PK. (1976) The fine structural localization of S-100 protein in rodent cerebellum. *J. Neurol. Sci.*, 28(1):65-76.

**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.

**Tanaka J** & Maeda N. (1996) Microglial ramification requires nondiffusible factors derived from astrocytes. *Exp Neurol.*, 137(2):367-75.

**Tanaka J**, Toku K, Sakanaka M & Maeda N. (1999) Morphological differentiation of microglial cells in culture: involvement of insoluble factors derived from astrocytes. *Neurosci. Res.*, 34:207-215.

**Tansey FA**, Farooq M & Cammer W. (1991) Glutamine synthetase in oligodendrocytes and astrocytes: new biochemical and immunocytochemical evidence. *J. Neurochem.*, 56(1):266-72.

**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.

**Terenghi G**, Cocchia D, Michetti F, Diani AR, Peterson T, Cole DF, Bloom SR & Polak JM. (1983) Localization of S-100 protein in Müller cells of the retina. *Invest. Ophthalm. Vis. Sci.*, 24: 976-985.

**Thanos S** & Mey J. (2001) Development of the visual system of the chick. II. Mechanisms of axonal guidance. *Brain Res. Brain Res. Rev.*, 35(3):205-45.

**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.

**Triviño A**, Ramírez JM, Ramírez AI, Salazar JJ & García-Sánchez J. (1992) Retinal perivascular astroglia: an immunoperoxidase study. *Vision Res.*, 32(9):1601-7.

**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.

**Tropak MB**, Jansz GF, Abramow-Newerly W & Roder JC. (1995) Conservation of functionally important epitopes on myelin associated glycoprotein (MAG). *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.*, 112(2):345-54.

**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.

**Trotter J** & Schachner M (1989) Cells positive for the O4 surface antigen isolated by cell sorting are able to differentiate into astrocytes or oligodendrocytes. *Brain Res. Dev. Brain Res.*, 46(1):115-22.

**Trousse F**, Marti E, Gruss P, Torres M & Bovolenta P. (2001) Control of retinal ganglion cell axon growth: a new role for Sonic hedgehog. *Development*, 128(20):3927-36.

**Tucker R**. (1975) The surface of the pecten oculi in the pigeon. *Cell Tissue Res.*, 157(4):457-65.

**Turner DL** & Cepko CL. (1987) A common progenitor for neurons and glia persists in rat retina late in development. *Nature*, 328(6126):131-6.

**Turner DL**, Snyder EY & Cepko CL. (1990) Lineage-independent determination of cell type in the embryonic mouse retina. *Neuron*, 4(6):833-45.

**Uehara M**, Oomori S, Kitagawa H & Ueshima T. (1990) The development of the pecten oculi in the chick. *Nippon Juigaku Zasshi*, 2(3):503-12.

**Uga S** & Smelser GK. (1973) Electron microscopic study of the development of retinal Müllerian cells. *Invest. Ophthalmol*, 12(4):295-307.

**Ullian EM**, Sapperstein SK, Christopherson KS & Barres BA. (2001) Control of synapse number by glia. *Science*, 291(5504):657-61.

**Van Eldik LJ**, Ehrenfried B & Jensen RA. (1984) Production and characterization of monoclonal antibodies with specificity for the S100 beta polypeptide of brain S100 fractions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 81(19):6034-8.

**Vardimon L**, Fox LE & Moscona AA. (1986) Developmental regulation of glutamine synthetase and carbonic anhydrase II in neural retina. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 83(23):9060-4.

**Vaughan DW**. (1984) The structure of neuroglial cells. *Functional Properties of cortical cells* (ed. E.G. Jones & A. Peters). New York and London: Plenum Press. In *cerebral Cortex*, 2:285-329.

**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**. (1969) An electron microscopic analysis of gliogenesis in rat optic nerve. *Z. Zellforsch.*, 94:293-324.

**Vecino E**, Velasco A, Caminos E & Aijón J. (1997) Distribution of S-100 immunoreactivity in the retina and optic nerve head of the teleost *Tinca tinca* L. *Microsc. Res. Tech.*, 36:17-25.

**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.**, Cid E, Ciudad J, Orfao A, Aijón J & Lara JM. (2001) Temperature induces variations in the retinal cell proliferation rate in a cyprinid. *Brain Research*, 913:190-194.

**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.

**Watanabe T** & Raff MC. (1992) Diffusible rod-promoting signals in the developing rat retina. *Development*, 114(4):899-906.

**Wechsler-Reya RJ** & Barres BA. (1997) Retinal development: communication helps you see the light. *Curr. Biol*, 7(7):R433-6.

**Weissman T**, Noctor SC, Clinton BK, Honig LS & Kriegstein AR. (2003) Neurogenic radial glial cells in reptile, rodent and human: from mitosis to migration. *Cereb. Cortex*, 13(6):550-9.

**Wetts R**, Serbedzija GN & Fraser SE. (1989) Cell lineage analysis reveals multipotent precursors in the ciliary margin of the frog retina. *Dev. Biol.*, 136(1):254-63.

**Wetts R** & Fraser SE. (1988) Multipotent precursors can give rise to all major cell types of the frog retina. *Science*, 239(4844):1142-5.

**Wiesinger H**, Schuricht B & Hamprecht B. (1991) Replacement of glucose by sorbitol in growth medium causes selection of astroglial cells from heterogeneous primary cultures derived from newborn mouse brain. *Brain Res.*, 550(1):69-76.

**Wilhelmsson U**, Li L, Pekna M, Berthold CH, Blom S, Eliasson C, Renner O, Bushong E, Ellisman M, Morgan TE & Pekny M. (2004) Absence of glial fibrillary acidic protein

and vimentin prevents hypertrophy of astrocytic processes and improves post-traumatic regeneration. *J. Neurosci.*, 24 (21):5016-21.

**Wilms H**, Wollmer MA & Sievers J. (1999) In-vitro staining specificity of the antibody 5-D-4 for microglia but not for monocytes and macrophages indicates that microglia are a unique subgroup of the myelomonocytic lineage. *J. Neuroimmunol.*, 98:89-95.

**Willbold E** & Layer PG. (1992) Formation of neuroblastic layers in chicken retinospheroids: the fibre layer of Chievitz secludes AChE-positive cells from mitotic cells. *Cell Tissue Res.*, 268(3):401-8.

**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 Pt 1):3063-71.

**Wolburg H** & Buerle C. (1993) Astrocytes in the lamina cribrosa of the rat optic nerve: are their morphological peculiarities involved in an altered blood-brain barrier? *J. Hirnforsch.*, 34(3):445-59.

**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.

**Won MH**, Kang TC & Cho SS. (2000) Glial cells in the bird retina: immunochemical detection. *Microsc. Res. Tech.*, 50:151-160.

**Wu DM**, Schneiderman T, Burgett J, Gokhale P, Barthel L & Raymond PA. (2001). Cones regenerate from retinal stem cells sequestered in the inner nuclear layer of adult goldfish retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*, 42 (9):2115-2124.

**Yamada E.** (1989) Myelinated perikarya of the ganglion cells in the avian retina. *Okajimas Folia Anat. Jpn.*, 66(4):211-21.

**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.

**Yang P** & Hernández MR. (2003) Purification of astrocytes from adult human optic nerve heads by immunopanning. *Brain Res. Brain Res. Protoc.*, 12(2):67-76.

**Ye H** & Hernández 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-vitrectomy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 34(11):3154-60.

**Young RW.** (1985) Cell differentiation in the retina of the mouse. *Anat Rec*, 212(2): 199-205.

**Yuan L** & Neufeld AH. (2001) Activated microglia in the human glaucomatous optic nerve head. *Neurosci. Res.*, 64(5):523-32.

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

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

**Zhang SC**, Lundberg C, Lipsitz D, O'Connor LT & Duncan ID. (1998) Generation of oligodendroglial progenitors from neural stem cells. *J. Neurocytol.*, 27(7):475-89.

**Zimmerman RP**, Polley EH & Fortney RL. (1988) Cell birthdays and rate of differentiation of ganglion and horizontal cells of the developing cat's retina. *J. Comp. Neurol.*, 274(1):77-90.

**Zolese G**, Giambanco I, Curatola G, De Stasio G & Donato R. (1993) Time-resolved fluorescence of S-100a protein in the absence and presence of calcium and phospholipids. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1162(1-2):47-53.