

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OFTALMOLÓGICAS  
"RAMON CASTROVIEJO"  
[FACULTAD DE MEDICINA (DPTO. CIRUGIA II)]

**"GLIOARQUITECTURA DE LA CABEZA DEL  
NERVIO ÓPTICO HUMANO: ESTUDIO  
INMUNOHISTOQUÍMICO CON ANTI-PGFA"**

**TESIS DOCTORAL**  
**JUAN JOSÉ SALAZAR CORRAL**



\* 5 3 0 9 5 4 9 8 0 5 \*  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

Dirigida por: **PROF. D. JOSE MANUEL RAMÍREZ SEBASTIÁN**  
Profesor Titular de Oftalmología  
Facultad de Medicina de la U.C.M.

Codirigida por **PROF. D. BENJAMIN FERNANDEZ RUIZ**  
Catedrático de Biología Celular  
Facultad de CC. Biológicas de la U.C.M.

Vº Bº

Prof. J.M. Ramírez Sebastián    Prof. B. Fernández Ruiz

Juan José Salazar Corral.



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES  
OFTALMOLOGICAS  
«RAMON CASTROVIEJO»

**JOSE MANUEL RAMÍREZ SEBASTIÁN**, Profesor Titular de Oftalmología de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid, y  
**BENJAMIN FERNANDEZ RUIZ**, Catedrático de Biología Celular de la Facultad de CC. Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid,

**CERTIFICAN:** Que **D. Juan José Salazar Corral** ha realizado bajo su dirección los trabajos de investigación correspondientes a su Tesis Doctoral titulada: "GLIOARQUITECTURA DE LA CABEZA DEL NERVIO ÓPTICO HUMANO: ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO CON ANTI-PGFA", que ha terminado con el mayor aprovechamiento.

Revisado el trabajo, quedan conformes con su presentación para ser juzgado

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, firman el presente en Madrid a cinco de mayo de mil novecientos noventa y cuatro.

Fdo. Prof. Jose M. Ramírez Sebastián

Fdo. Prof. Benjamin Fernández Ruiz

*Como si la naturaleza hubiérase propuesto ocultar a nuestras miradas el maravilloso artificio de la organización, la célula, el misterioso protagonista de la vida, se recata obstinado en la doble invisibilidad de lo pequeño y de lo homogéneo.*

Santiago Ramón y Cajal.

*A mi mujer:*

**Ana**

## AGRADECIMIENTOS

Aunque pueden ser muchas las personas que me han brindado su ayuda desinteresada durante estos últimos años, y aún a riesgo de caer en el error de no citar a alguna de ellas, deseo expresar mi más profundo agradecimiento:

En primer lugar al **Prof. D. Julián García Sánchez**, por la oportunidad que me brindó de poder incorporarme a su grupo de investigación en el Instituto "Ramón Castroviejo", así como por todo su apoyo para la realización de esta Tesis.

En segundo lugar, mi sincero agradecimiento a los **Profesores D. Jose Manuel Ramírez Sebastián y D. Alberto Triviño Casado**, quienes además de introducirme e iniciarme en el mundo de la investigación, han hecho posible que se desarrolle en mí la pasión por la histología ocular, guiando mis pasos y siendo el ejemplo a seguir en el trabajo que conlleva una investigación. Sin su ayuda constante, su inestimable dirección y consejos no hubiera sido posible la realización de este estudio.

Al **Prof. D. Benjamín Fernández Ruiz**, quien además de prestarse amablemente a codirigir este trabajo, me inculcó en mi época de estudiante el entusiasmo que siente y transmite por el Sistema Nervioso, haciendo que su estudio resulte algo apasionante.

Para la **Dra. Ana Isabel Ramírez Sebastián** no encuentro palabras de agradecimiento, ya que sin su constante ayuda, colaboración y consejos no hubiera sido posible llevar a buen término este trabajo.

A la **Prof. Dña. Maite Solas Alados**, quién además de introducirme en el mundo de la microscopía electrónica, me ha brindado su inapreciable amistad.

A todos los componentes del equipo del **Centro de Microscopía Electrónica** de la U.C.M., y en especial a **D. Agustín Fernández**, que estuvo siempre dispuesto a prestarme su ayuda y en todo momento me animó a seguir adelante incluso en los momentos de desaliento.

A todos mis compañeros del Instituto "Ramón Castroviejo" y en especial a **Viñas, Carmen, Elvira, y Rosa**, quienes en todo momento estuvieron dispuestas a prestarme su ayuda y apoyo.

A **Rodolfo Manuel Ruiz**, gracias por su colaboración desinteresada en todo momento.

Finalmente tengo que reconocer la deuda ilimitada que tengo con mis padres y toda mi familia, por su comprensión, ayuda inestimable, y constante apoyo durante todos estos años.

<b>1.- INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>1.1.- CONCEPTOS GENERALES ANATÓMICO-HISTOLÓGICOS DEL NERVIÓ ÓPTICO</b> .....	1
<b>1.1.1.- LA CABEZA DEL NERVIÓ ÓPTICO</b> .....	3
A) Capa superficial de fibras nerviosas (C.S.F.N.).	4
B) Región prelaminar .....	6
C) Región laminar .....	8
D) Región retrolaminar. ....	10
<b>1.2.- ESTUDIOS SOBRE LAS CÉLULAS GLIALES.</b> .....	13
<b>1.2.1- HISTORIA DE LA DESCRIPCIÓN DE LOS DISTINTOS TIPOS GLIALES.</b> .....	13
<b>1.2.2.- ESTUDIOS SOBRE LA ASTROGLIA DEL NERVIÓ OPTICO EN LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN</b> .....	19
A) Descripciones morfológicas con las técnicas de impregnación argéntica. ....	19
B) Estudios con microscopía electrónica. ....	25
C) Estudios mediante las técnicas inmunohistoquímicas. ....	31
<b>1.3.- LAS CÉLULAS ASTROGLIALES DE LA CABEZA DEL NERVIÓ ÓPTICO HUMANO.</b> .....	40
A) Estudios con impregnaciones argénticas. ....	40
B) Estudios a microscopía electrónica. ....	48
C) Estudios inmunohistoquímicos empleando anti-PGFA. ....	55
<b>1.4.- PAPEL FUNCIONAL DE LOS ASTROCITOS EN EL NERVIÓ ÓPTICO</b> ...	59
<b>1.4.1.- LOS ASTROCITOS EN LOS PROCESOS DE MIELINIZACIÓN DEL NERVIÓ ÓPTICO: FUNCIÓN DE LAS PROLONGACIONES ASTROGLIALES PERINODALES.</b> .....	60

1.4.2.- PARTICIPACIÓN DE LOS ASTROCITOS EN LA FORMACIÓN DE CICATRICES GLIALES Y REPARACIÓN DEL NERVIÓ ÓPTICO. . . . .	67
1.4.3.- INTERACCIONES ASTROCITO-NEURONA DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO DEL NERVIÓ ÓPTICO. . .	75
1.4.4.- LA FUNCIÓN DE BARRERA DE LOS ASTROCITOS DEL NERVIÓ ÓPTICO. . . . .	77
1.4.5.-IMPLICACIÓN DE LOS ASTROCITOS EN LAS ALTERACIONES ISQUÉMICAS DE LA CABEZA DEL NERVIÓ ÓPTICO: NEUROPATÍA OPTICA ISQUÉMICA (N.O.I.) Y GLAUCOMA.	79
<b>2.- JUSTIFICACIÓN E HIPOTESIS.</b> . . . . .	<b>87</b>
<b>3.- MATERIAL Y MÉTODOS.</b> . . . . .	<b>90</b>
3.1.- <i>CASUÍSTICA.</i> . . . . .	91
3.2.- <i>DESCRIPCIÓN DE LAS TÉCNICAS EMPLEADAS EN MICROSCOPIA ÓPTICA.</i> . . . . .	93
3.2.1.- FIJACIÓN Y OBTENCIÓN DEL TEJIDO . . . . .	93
3.2.2.- REALIZACIÓN DE LOS CORTES HISTOLÓGICOS DEL NERVIÓ ÓPTICO. . . . .	93
3.2.2.- TINCIÓNES HISTOLÓGICAS EMPLEADAS. . . . .	96
A) Hematoxilina-eosina . . . . .	96
B) Tinción de Unna-Tänzer (Orceína-picrocarmín índigo). .	97
C) Tinción inmunohistoquímica. . . . .	98
3.2.3.- OBSERVACIÓN DE LAS PREPARACIONES . . . . .	102
3.3.- <i>PROCESAMIENTO DE LOS NERVIOS PARA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA.</i> . . . . .	104

<b>4.- RESULTADOS.</b> . . . . .	107
4.1.- <i>OBSERVACIONES A MICROSCOPIA ÓPTICA</i> . . . . .	108
4.1.1.- LOCALIZACIÓN DE LA INMUNORREACTIVIDAD ANTI-PGFA EN LA CABEZA DEL NERVIO ÓPTICO HUMANO . . . . .	108
A) Capa Superficial de Fibras Nerviosas. . . . .	109
B) Región Prelaminar. . . . .	110
C) Región laminar. . . . .	113
D) Región retrolaminar. . . . .	114
4.1.2.- ANÁLISIS DE LA MORFOLOGÍA DE LOS ASTROCITOS Y DE SU DISTRIBUCIÓN EN LA CABEZA DEL NERVIO ÓPTICO HUMANO . . . . .	116
4.1.2.1.- MORFOLOGÍA ASTROGLIAL . . . . .	116
A) Astrocitos con cuerpo celular grueso. . . . .	117
B) Astrocitos con cuerpo celular delgado. . . . .	120
C) Astrocitos con baja inmunorreactividad PGFA(+). . . . .	121
4.1.2.2.- DISTRIBUCIÓN DE LOS ASTROCITOS: GLIOARQUITECTURA DE LA CABEZA DEL NERVIO ÓPTICO. . . . .	123
A) Capa superficial de fibras nerviosas. . . . .	123
B) Región prelaminar . . . . .	128
* Región prelaminar anterior. . . . .	128
* Región prelaminar posterior: . . . . .	135
C) Región laminar. . . . .	140
D) Región retrolaminar. . . . .	143
4.2.- <i>OBSERVACIONES A MICROSCOPIA ELECTRÓNICA.</i> . . . . .	152
4.2.1.- ULTRAESTRUCTURA DE LOS ASTROCITOS QUE CONSTITUYEN LAS LIMITANTES GLIALES DEL NERVIO ÓPTICO . . . . .	152
4.2.2.- CAPA SUPERFICIAL DE FIBRAS NERVIOSAS. . . . .	154

4.2.3.- REGIÓN PRELAMINAR. . . . .	155
A) Región prelaminar anterior. . . . .	155
B) Región prelaminar posterior. . . . .	156
4.2.4.- REGIÓN LAMINAR. . . . .	157
4.2.5.- REGIÓN RETROLAMINAR. . . . .	158
4.2.6.- RELACIONES ENTRE LOS ASTROCITOS: UNIONES INTERASTROCITARIAS . . . . .	160
4.2.7.- RELACIONES VASO-GLIALES . . . . .	161
<b>5.- DISCUSIÓN.</b> . . . . .	<b>208</b>
5.1.- LOCALIZACIÓN DE LOS ASTROCITOS EN EL N.O. HUMANO . . . . .	208
5.2.- MORFOLOGÍA Y ULTRAESTRUCTURA DE LOS ASTROCITOS DEL NERVIO ÓPTICO. . . . .	214
5.3.- DISTRIBUCIÓN DE LOS ASTROCITOS: GLIOARQUITECTURA DEL NERVIO ÓPTICO. . . . .	228
5.3.1.- CAPA SUPERFICIAL DE FIBRAS NERVIOSAS . . . . .	228
5.3.2.- REGIÓN PRELAMINAR. . . . .	233
5.3.3.- REGIÓN LAMINAR. . . . .	241
5.3.4.- REGIÓN RETROLAMINAR. . . . .	244
<b>6.- CONCLUSIONES.</b> . . . . .	<b>250</b>
<b>7.- BIBLIOGRAFÍA.-</b> . . . . .	<b>254</b>

# ***1.- INTRODUCCIÓN***

## **1.- INTRODUCCIÓN.**

### **1.1.- CONCEPTOS GENERALES ANATÓMICO-HISTOLÓGICOS DEL NERVIÓ ÓPTICO.**

El nervio óptico (N.O.) es la estructura encargada de transmitir la información, obtenida y elaborada en las capas externas e internas de la retina, hacia el cerebro para su futuro procesamiento final (JONAS, 1993b)<sup>145</sup>. Es una proyección de sustancia blanca del cerebro, por lo que podemos considerarlo como una parte del Sistema Nervioso Central (S.N.C.) y no como un nervio periférico (RAYNAUD, 1992<sup>283</sup>).

Esta última afirmación queda claramente puesta de manifiesto si tenemos en cuenta dos características del N.O.: que sus fibras, al igual que las del cerebro y médula espinal, están mielinizadas por oligodendrocitos y no por células de Schwann como sucede en los nervios periféricos (REEH, 1981<sup>284</sup>), y que se encuentra rodeado por tres vainas que son continuación directa de las meninges del cerebro, razón por la cual se designan con idéntico nombre: duramadre, aracnoides y piamadre (WOLF-HEIDEGGER, 1954<sup>361</sup>).

El N.O. humano tiene una longitud que varía entre 35-55 mm., y un diámetro que se incrementa desde 1,5 mm. (en la zona más próxima a la retina) hasta 3-4 mm. (pasada la estructura de la lámina cribosa) (DUKE-ELDER, 1961<sup>68</sup>; KESTENBAUM, 1963<sup>149</sup>; SARAUX, 1985<sup>297</sup>; RAYNAUD, 1992<sup>283</sup>); estando constituido por:

- fibras nerviosas: los axones de las células ganglionares retinianas,
- células gliales: astrocitos, oligodendrocitos y microglia,
- vasos sanguíneos: pertenecientes a dos sistemas; por un lado, los vasos dependientes de la arteria central de la retina (A.C.R.); y por otro los derivados del sistema ciliar,
- y tejido conectivo: que constituye la lámina cribosa, y los septos o tabiques que compartimentan el N.O. en fascículos.

Desde principios de este siglo, clásicamente se han distinguido cuatro porciones en el N.O. de los mamíferos (GREEF, 1914<sup>108</sup>):

- Porción intraocular o intraescleral (0,5-1 mm.)
- Porción intraorbitaria u orbitaria (25 mm.)
- Porción intracanalicular (6-7,5 mm.)
- Porción intracraneal (10-12 mm.)

División que es aceptada por la mayoría de los autores actuales (DUKE-

ELDER, 1961<sup>68</sup>; WOLFF, 1961<sup>360</sup>; KESTENBAUM, 1963<sup>149</sup>; HOGAN, 1971<sup>133</sup>; ORTIZ, 1977<sup>218</sup>; REEH, 1981<sup>284</sup>; WIRTSCHAFTER, 1981<sup>358</sup>; JONAS, 1993b<sup>145</sup>).

### **1.1.1.- LA CABEZA DEL NERVIO ÓPTICO.**

En este trabajo nos vamos a centrar únicamente en el estudio de la porción intraocular y parte anterior de la porción intraorbitaria del N.O., zona que es denominada por diversos autores como "CABEZA DEL NERVIO ÓPTICO" (HAYREH, 1966, 1974a, 1978, 1987, 1989, 1994<sup>113,114,116,118-120</sup>; RAMÍREZ, 1983, 1984<sup>267,268</sup>; MORRISON, 1989c<sup>205</sup>; JONAS, 1993b<sup>145</sup>).

Siguiendo los criterios establecidos por HAYREH (1974a<sup>114</sup>) dividimos la cabeza del N.O. en cuatro regiones:

- A) Capa superficial de fibras nerviosas.
- B) Región prelaminar.
- C) Región de la lámina cribosa.
- D) Región retrolaminar.

Las tres primeras regiones constituyen la porción intraocular del N.O.,

mientras que la región retrolaminar pertenece a la porción intraorbitaria anterior (RAMÍREZ, 1983,1984<sup>267,268</sup>).

**A) Capa superficial de fibras nerviosas (C.S.F.N.).**

Esta formada, por un lado, por los axones de las células ganglionares que se reúnen a este nivel para constituir el N.O., y por otro, por una serie de limitantes astrogliales.

Teniendo en cuenta las variaciones individuales, el número de axones que constituyen el N.O. humano está comprendido entre 770.000 y 1.700.000 (MIKELBERG, 1989<sup>191</sup>; JONAS, 1992<sup>143</sup>); siendo en esta región amielínicos.

Los axones de las células ganglionares, siguen en la retina una trayectoria rectilínea dirigiéndose hacia el disco óptico formando la capa de fibras nerviosas. Estas fibras se pueden entremezclar a lo largo de su curso intrarretinal (RADIUS, 1979b,c<sup>248,249</sup>), pero según se van acercando al disco adquieren una ordenación concreta, de tal forma, que las fibras de la retina periférica se disponen más cercanas a la capa de células ganglionares; mientras que, las más centrales y las cercanas al disco se disponen cerca de la membrana limitante interna y de la

superficie del vítreo (HOYT, 1963<sup>136</sup>; GARCÍA-SÁNCHEZ, 1979<sup>87</sup>; RADIUS, 1979c<sup>249</sup>).

Al alcanzar el disco óptico, las fibras periféricas penetran por los márgenes de la papila; y las más cercanas a la cabeza del N.O. pasan a través de la superficie del disco para abandonar el globo ocular situadas en el centro del N.O. (HOYT, 1963<sup>136</sup>; GARCÍA-SÁNCHEZ, 1979<sup>87</sup>; SENELICK, 1982<sup>301</sup>; JONAS, 1993b<sup>145</sup>).

Las células astrogliales fundamentalmente constituyen en esta región varias limitantes que separan el tejido nervioso del tejido de naturaleza mesodérmica, que se denominan (ANDERSON, 1969a,1973<sup>11,15</sup>; HOGAN, 1971<sup>133</sup>; BÜSSOW, 1980<sup>37</sup>; RAMÍREZ, 1989a,b<sup>271,272</sup>):

- **Limitante interna de Elschnig**, que actúa aislando los axones ganglionares de la superficie del vítreo.
- **Menisco central de Kuhnt**, situado por debajo del tejido anterior, ocupando la excavación central del disco óptico, rodeando a la arteria y vena central de la retina.

La C.S.F.N. va a estar vascularizada fundamentalmente por ramas de las

arteriolas retinianas principales (HENKIND, 1969<sup>121</sup>; ANDERSON, 1976<sup>17</sup>; LIEBERMANN, 1976<sup>172</sup>; RAMÍREZ, 1984<sup>268</sup>), continuándose los capilares del disco con los capilares peripapilares retinianos, así como con la malla capilar radial peripapilar (HAYREH, 1978<sup>116</sup>; RAMÍREZ, 1989b<sup>272</sup>). Esta región también puede estar irrigada por vasos derivados del sistema ciliar de la región prelaminar (RAMÍREZ, 1984<sup>268</sup>). Asimismo, también pueden colaborar a la suplencia sanguínea de esta zona las arterias cilio-retinianas (LIEBERMANN, 1976<sup>172</sup>; HAYREH, 1978<sup>116</sup>; RAMÍREZ, 1983,1984,1989b<sup>267,268,272</sup>).

#### **B) Región prelaminar.**

Este término define la porción del N.O. conocida por muchos autores como parte coroidea o anterior de la lámina cribosa (SALZMANN, 1912<sup>296</sup>; WOLTER, 1957<sup>365</sup>; BLUNT, 1965<sup>29</sup>; LEVITZKY, 1969<sup>170</sup>; ELKINGTON, 1990<sup>71</sup>).

Los axones de las células ganglionares cuando se introducen en el canal escleral realizan un cambio de trayectoria de 90°, agrupándose en haces o fascículos rodeados por prolongaciones astrogiales que los envuelven constituyendo estructuras similares a tubos. Estos astrocitos forman una malla o

"cesta" que se conecta por su base con la lámina cribosa (WOLTER, 1957, 1961<sup>365,366</sup>; ANDERSON, 1969a,b<sup>11,12</sup>); adoptando sus cuerpos celulares una disposición columnar (LISS, 1956<sup>178</sup>; ORTIZ-MITTERER, 1974<sup>219</sup>; SKOFF, 1986<sup>311</sup>).

Como ocurría en la C.S.F.N., las fibras nerviosas, todavía amielínicas, se encuentran aisladas de los tejidos adyacentes mediante limitantes gliales, constituyéndose periféricamente:

- a nivel retiniano, el **Tejido intermediario de Kuhnt** (ANDERSON, 1970<sup>14</sup>; HOGAN, 1971<sup>133</sup>; OKINAMI, 1976<sup>215</sup>; SENELICK, 1982<sup>301</sup>);
- a nivel coroideo, el **Tejido de Jacoby** (ANDERSON, 1969a, 1973<sup>11,15</sup>).

Con respecto a su vascularización, esta región va a estar irrigada principalmente por los vasos derivados del sistema ciliar que forman la denominada precoriocapilar coroidea peripapilar (RAMÍREZ, 1984, 1989b<sup>268,272</sup>; HAYREH, 1978, 1989<sup>116,119</sup>). También la región laminar vecina, puede contribuir con vasos centrípetos originados en el círculo de Zinn-Haller (HAYREH, 1978<sup>116</sup>; RAMÍREZ, 1984<sup>268</sup>; ZHAO, 1987<sup>370</sup>).

**C) Región laminar.**

Esta región del N.O. engloba lo que muchos autores han denominado como parte posterior o escleral de la lámina cribosa (WOLTER, 1957<sup>365</sup>; ANDERSON, 1969b, 1973<sup>12,15</sup>; ELKINGTON, 1990<sup>71</sup>).

La lámina cribosa esta constituida por expansiones esclerales de densas fibras colágenas de 600 Å de diámetro (ANDERSON, 1969b<sup>12</sup>; SARAUX, 1985<sup>297</sup>) y tejido elástico, que dejan orificios a través de los cuales los axones ganglionares atraviesan este sector (WILCZEK, 1947<sup>355</sup>; WOLFF, 1961<sup>360</sup>; MORRISON, 1989a,b<sup>203,204</sup>).

El número de poros u orificios varía en el hombre desde unos 230 (JONAS, 1991, 1992<sup>142,143</sup>) hasta 540 (OGDEN, 1988<sup>214</sup>); y su diámetro entre 10-220  $\mu\text{m}$ . (OGDEN, 1988<sup>214</sup>; ELKINGTON, 1990<sup>71</sup>).

Asimismo, también se ha descrito la existencia de variaciones regionales, de tal forma que en los cuadrantes nasal y temporal del disco, los elementos estructurales (tejido conectivo y células gliales) están más desarrollados que en los sectores superior e inferior (RADIUS, 1981a,c<sup>250,252</sup>; QUIGLEY, 1981a<sup>240</sup>); de tal forma, que en estos últimos sectores (superior e inferior), nos encontramos con la mayor cantidad de poros, siendo estos además los de mayor tamaño (JONAS,

1990,1991, 1993a<sup>141,142,144</sup>).

En esta región los astrocitos se disponen tapizando los orificios de la estructura colágena cribiforme, rodeando y protegiendo los axones, algunos de los cuales comienzan a mielinizarse en la parte final de la lámina (ANDERSON, 1969b,1973<sup>12,15</sup>; HOGAN, 1971<sup>133</sup>; ELKINGTON, 1990<sup>71</sup>).

Periféricamente nos encontramos con un tejido de reborde, constituido por tejido conectivo y glial, denominado: **Tejido limitante de Elschmig** (SALZMANN, 1912<sup>296</sup>; WOLFF, 1961<sup>360</sup>; KESTEBaum, 1963).

En los últimos años, trabajos inmunohistoquímicos han puesto de manifiesto la composición de las fibras colágenas de la lámina, así como de las numerosas membranas basales existentes a este nivel pertenecientes a las células endoteliales de los vasos sanguíneos y a las células astrogliales. Gracias a estos estudios, se sabe en la actualidad que el colágeno tipo I, junto con el colágeno fibrilar tipo III y VI, es el constituyente principal de los núcleos de tejido conectivo de las laminillas o "lamellas" cribiformes (MORRISON, 1988,1989a,b<sup>202-204</sup>; GOLDBAUM, 1989<sup>99</sup>; YANG, 1993<sup>368</sup>). Por el contrario, el colágeno IV, la laminina y los proteoglicanos (queratan-sulfato y condroitin-sulfato) están presentes en las membranas basales de los vasos y de los astrocitos (REHNBERG, 1987<sup>285</sup>;

SAWAGUCHI, 1992<sup>298</sup>; THALE, 1993<sup>330</sup>).

La nutrición de esta zona se realiza a expensas de ramas centrípetas procedentes de las arterias ciliares cortas posteriores, así como por vasos derivados del círculo de Zinn-Haller (LEVITZKY, 1969<sup>170</sup>; RAMÍREZ, 1983, 1984, 1989b<sup>267, 268, 272</sup>); mientras que, la contribución de la A.C.R. es escasa (HAYREH, 1978<sup>116</sup>).

**D) Región retrolaminar.**

La región retrolaminar se considera comprendida desde el final de la lámina cribosa hasta el punto de entrada de la A.C.R. en el N.O. (RAMÍREZ, 1984<sup>268</sup>).

Esta región del N.O. esta constituida por los axones de las células ganglionares fasciculados en haces por las prolongaciones astrogliales. Además aparecen los oligodendrocitos, dispuestos en columnas y rodeando a las fibras nerviosas con una vaina de mielina. Esta mielinización de las fibras, provoca el aumento del diámetro del N.O. a más del doble (DUKE-ELDER, 1961<sup>68</sup>; KESTENBAUM, 1963<sup>149</sup>).

El N.O. se encuentra rodeado por las tres vainas meningeas: duramadre, aracnoides y piamadre; que dejan entre ellas dos espacios: subdural (entre la duramadre y la aracnoides) y subaracnoideo (entre la aracnoides y la piamadre) (SALZMANN, 1912<sup>296</sup>; WOLFF, 1961<sup>360</sup>; ANDERSON, 1969b<sup>12</sup>; SARAUX, 1985<sup>297</sup>; HAYREH, 1984<sup>117</sup>). Desde la piamadre se introducen hacia el tejido del N.O. tabiques conectivos que se van a orientar paralelos al eje del nervio.

Separando la piamadre de los axones ganglionares hay un tejido constituido por prolongaciones y somas astrocitarios denominado: **Manto glial periférico de Fuchs o de Greef** (ANDERSON, 1969a,1970,1973<sup>11,14,15</sup>; HOGAN, 1971<sup>133</sup>; HAYREH, 1984<sup>117</sup>).

Finalmente, con respecto a la vascularización de la región retrolaminar, hay que distinguir entre la zona axial y la periférica.

La zona axial esta nutrida por las ramas de la A.C.R. que emite durante su trayecto intraneural (RAMÍREZ, 1983,1984,1989b<sup>267,268,272</sup>; HAYREH, 1989<sup>119</sup>).

La zona periférica recibe vasos procedentes de ramas piales recurrentes del círculo de Zinn-Haller y de la coroides peripapilar, de ramas piales de la A.C.R. emitidas en su curso intravaginal, y de ramas piales de la arteria oftálmica y sus colaterales (HAYREH, 1974a,1978,1987<sup>114,116,118</sup>; FRANÇOIS, 1977<sup>82</sup>; OLVER,

1990<sup>215</sup>). Esta zona también va a estar irrigada por ramas de la A.C.R. que se van a dirigir hacia las fibras periféricas del N.O. para nutrirlas (RAMÍREZ, 1983,1984<sup>267,268</sup>).

## **1.2- ESTUDIOS SOBRE LAS CÉLULAS GLIALES.**

### **1.2.1- HISTORIA DE LA DESCRIPCIÓN DE LOS DISTINTOS TIPOS GLIALES.**

Aunque la neuroglia fue descrita en 1846 por VIRCHOW<sup>349</sup>, no es hasta principios del presente siglo cuando se describen detalladamente las distintas estirpes que la constituyen: astroglia, oligodendroglia y microglia.

En un principio, los autores de finales del siglo XIX, como Andriezen, Golgi o Weigert, solo distinguieron entre neuroglia intersticial y neuroglia endimiaria (RAMÓN Y CAJAL, 1899<sup>277</sup>).

RAMÓN y CAJAL (1899,1911<sup>277,279</sup>) da un impulso en el conocimiento de estas células llegando a distinguir tres categorías:

- neuroglia fibrosa o astrocitos de radiaciones largas, propio de la sustancia blanca;
- neuroglia protoplásmica o astrocito de radiaciones cortas y vellosas, propio de la sustancia gris;
- y el tercer elemento, el corpúsculo adendrítico o indiferenciado.

Es DEL RÍO-HORTEGA, con sus trabajos realizados entre 1919-1932<sup>63-65</sup>, quien va a desenmascarar que bajo el nombre de Tercer Elemento de Cajal, se ocultan en realidad dos estirpes celulares completamente distintas: la microglia y la oligodendroglia. Esta distinción fue debida al perfeccionamiento de las técnicas de impregnación, al poner en práctica un nuevo método: la tinción al carbonato de plata. Utilizando esta tinción, en un primer momento, DEL RÍO-HORTEGA (1919<sup>63</sup>) diferencia entre microglia y glia interfascicular. Justifica el término microglia por el tamaño considerablemente menor que presentan respecto a los astrocitos fibrosos y protoplásmicos, pero su posible origen mesodérmico le inclina a designarlas como "mesoglia".

La descripción de la oligodendroglia, tiene lugar en 1921<sup>64</sup>, al analizar, DEL RIO-HORTEGA, con más detenimiento la glia interfascicular, denominándola en este momento con el termino de oligodendroglia o glia de escasa radiaciones.

Estos nuevos descubrimientos son rápidamente confirmados por PENFIELD (1924<sup>224</sup>) y LÓPEZ ENRIQUEZ (1926, 1927<sup>180,181</sup>), y posteriormente completados por el propio DEL RÍO-HORTEGA (1932<sup>65</sup>).

Estos primeros estudios permitieron describir las características de estas células a microscopía óptica; sin embargo, el desarrollo a partir de 1930 de la

microscopía electrónica, permitió ampliar el conocimiento sobre las células, al poder estudiar sus características ultraestructurales (ZINN, 1973<sup>373</sup>).

Los criterios para clasificar las células gliales a microscopía electrónica comienzan a ser determinados por LUSE (1956<sup>182</sup>) en secciones de cerebro y médula de varias especies de mamíferos; pero no es hasta 1962, momento en que PALAY y col.<sup>220</sup> perfeccionan los métodos de fijación, cuando se comienza a encontrar diferencias más acusadas entre las distintas células del tejido nervioso.

De esta forma, y gracias a los estudios de los diferentes autores, se han podido establecer una serie de características diferenciadoras de cada tipo glial:

- **Astroglia:** la característica propia de un astrocito es la presencia de filamentos de ~10 nm. en su citoplasma. Estos filamentos se encuentran agrupados dentro del citoplasma de las prolongaciones y orientados paralelos respecto a su eje; mientras que, en el pericarion su distribución es más al azar alrededor del núcleo. Otras características ultraestructurales son la presencia de gránulos de glucógeno y en ocasiones un cilio, así como de un citoplasma mucho más claro que el de los oligodendrocitos, además de numerosos cuerpos densos similares a condensaciones de lipofuchsina (PETERS, 1967<sup>229</sup>; VAUGHN,

1967a,b<sup>340,341</sup>; ANDERSON, 1969a,b,1973<sup>11,12,15</sup>; HOGAN, 1971<sup>133</sup>;  
PRIVAT, 1986<sup>235</sup>; ALVAREZ, 1991<sup>7</sup>)

- **Oligodendroglia:** Se diferencia fundamentalmente de las células anteriores, por no presentar filamentos en su citoplasma, que es mucho más denso a los electrones debido a la gran cantidad de retículo endoplásmico rugoso y ribosomas libres que posee en su interior (WENDELL-SMITH, 1966<sup>354</sup>; VAUGHN, 1968<sup>342</sup>; HOGAN, 1971<sup>133</sup>).
  
- **Microglia:** Su citoplasma se caracteriza por poseer grandes cisternas de R.E.R., mientras que el núcleo presenta acúmulos de cromatina condensada (SKOFF, 1975<sup>307</sup>; FULCRAND, 1977<sup>85</sup>).

Sin embargo, la distinción entre estas estirpes celulares no siempre ha sido considerada tan fácil por los autores que se han dedicado al estudio de las células gliales, tanto con el empleo de impregnaciones argénticas como con microscopía electrónica. Así RAMÓN MOLINER (1958<sup>275</sup>) describe la existencia de formas transicionales entre los astrocitos y la oligodendroglia; encontrando en su estudio dos tipos celulares de difícil clasificación: células indiferenciadas, y células transicionales hacia la oligodendroglia. La presencia de células indiferenciadas que

presentan un espectro de variaciones morfológicas entre estas dos células también ha sido indicada por FERNÁNDEZ (1969<sup>75</sup>), HOGAN (1971<sup>133</sup>), y CAMPOS (1976<sup>39</sup>).

Finalmente, el desarrollo de las técnicas "inmunohistoquímicas" por NAKANE (1966<sup>209</sup>) y STERNBERGER (1970<sup>319</sup>), basadas en las reacciones específicas antígeno-anticuerpo, ha permitido marcar selectivamente determinados antígenos celulares, pudiéndose reconocer, con mayor fiabilidad, tipos celulares concretos.

Con respecto a los *astrocitos*, el marcador más específico es el anticuerpo contra la proteína gliofibrilar ácida (PGFA) que es el mayor componente de los filamentos intermedios gliales (BIGNAMI, 1972<sup>21</sup>; DAHL, 1985, 1986<sup>59,60</sup>).

Aunque también otros anticuerpos pueden marcar estas células como:

- la vimentina (DAHL, 1981b, 1986<sup>58,60</sup>; QUITSCHKE, 1985a,b<sup>245,246</sup>; CALVO, 1990<sup>40</sup>),
- la proteína S-100 (DAHL, 1986<sup>60</sup>),
- los anticuerpos contra las proteínas asociadas a microtúbulos MAP-2 y MAP-4 (PARYSEK, 1985<sup>223</sup>; PAPASOZOMENOS, 1986<sup>222</sup>),
- anticuerpos contra la desmina (DAHL, 1989<sup>61</sup>),
- contra la apolipoproteína E (BOYLES, 1985<sup>36</sup>),

- así como una serie de anticuerpos contra enzimas implicadas en el metabolismo de neurotransmisores, como por ejemplo, la glutamato sintetasa y la monoamino oxidasa (NORENBERG, 1979<sup>213</sup>; LEVITT, 1982<sup>169</sup>).
- por último, se está empleando el anticuerpo monoclonal A2B5 que se une a antígenos similares a gangliósidos (MILLER, 1984,1985, 1989a<sup>192,193,195</sup>; RAFF, 1983a,b,1987,1989<sup>255,256,261,263</sup>).

Los marcadores principales para los *oligodendrocitos*, son los anticuerpos contra los constituyentes de la mielina: la proteína básica de la mielina (MBP) y el galactocerebrósido (GC) (un glucósido de la mielina) (LIN, 1989<sup>176</sup>; RAFF, 1989<sup>263</sup>; MILLER, 1989a<sup>195</sup>; GOLDMAN, 1992<sup>100</sup>). Asimismo, también se ha usado el anticuerpo contra la anhidrasa carbónica isoenzima C (anti CA-C) (KUMPULAINEN, 1983<sup>160</sup>), al igual que el anti- MAP-4, aunque este último, como ya hemos indicado, también tiñe los astrocitos (PARYSEK, 1985<sup>225</sup>).

Las células *microgliales*, se pueden marcar con anticuerpos que se unen a receptores del complemento CR-3: OX-42 y MAC-1 (GRAEBER, 1988<sup>104</sup>), al complejo mayor de histocompatibilidad (MHC-I y MHC-II) (THOMAS, 1992<sup>332</sup>); y a una serie de anticuerpos cuyo sitio de unión es desconocido y que se

denominan: OX-41, ED1, ED2, ED3 (THOMAS, 1992<sup>332</sup>). El grupo de marcadores identificado más recientemente son las lectinas que parecen reconocer la D-galactosa, utilizándose anticuerpos contra la isolectina B4 (STREIT, 1990<sup>321</sup>; BOYA, 1991a,b<sup>34,35</sup>).

### **1.2.2.- ESTUDIOS SOBRE LA ASTROGLIA DEL NERVIO OPTICO EN LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN**

#### **A.- DESCRIPCIONES MORFOLÓGICAS CON LAS TÉCNICAS DE IMPREGNACIÓN ARGÉNTICA.**

La mayoría de los estudios realizados sobre las distintos tipos gliales del N.O., han sido realizados en roedores (rata, ratón), conejos, gatos y primates

Estos estudios, en un primer momento, se realizaron empleando las tinciones de plata para confirmar la existencia en el nervio de estas células, descritas anteriormente en otras zonas del sistema nervioso.

El conocimiento de la neuroglia del N.O., se inicia con los trabajos de LEBER (1868<sup>165</sup>), y KUHNT (1879<sup>159</sup>), quienes observaron la existencia de

células asteriformes situadas entre los haces de fibras nerviosas, clasificándolos dentro de la variedad fibrosa propia de la sustancia blanca del S.N.C.

RAMÓN Y CAJAL (1892, 1904<sup>276,278</sup>), en sus estudios clásicos sobre la retina de los mamíferos, llama la atención sobre el notable incremento en el número de células de la neuroglia fibrosa a nivel del disco óptico.

Posteriormente, MARCHESANI (1926<sup>185</sup>), al estudiar la neuroglia del nervio óptico del conejo, aplicando las técnicas de impregnación argéntica de Del Río-Hortega y el oro sublimado de Cajal, va a señalar la existencia de oligodendrocitos, además de los ya descritos astrocitos fibrosos a los que por su especial morfología los denomina "células araña".

La existencia de oligodendroglia, en primates y conejos, es confirmada por LÓPEZ ENRIQUEZ (1926, 1927<sup>180,181</sup>), quien además llama la atención sobre la presencia en la retina y vías ópticas de células microgliales, a las que denomina en honor a su maestro como "células de Hortega". Sobre estos dos tipos celulares (oligodendroglia y microglia) se han realizado numerosos trabajos (PETERS, 1960,64<sup>227,228</sup>; BLUNT, 1965<sup>29</sup>; HIROSE, 1973<sup>131</sup>; TENNEKOON, 1980<sup>328</sup>; STURROCK, 1984<sup>323</sup>; SKOFF, 1986<sup>311</sup>; BUTT, 1989<sup>38</sup>; RANSOM, 1991<sup>280</sup>),

pero es un tema en el que no vamos a profundizar, ya que sólo nos dedicaremos a revisar los estudios que han aportado datos al conocimiento actual de la morfología y disposición de los astrocitos del N.O.

BLUNT y col. (1965<sup>29</sup>), empleando una modificación al proceder rápido de Golgi, estudian el N.O. de dos especies animales con una clara diferencia: la presencia (gato) o no (conejo) de lámina cribosa.

En el gato localizan astrocitos a lo largo de todo el nervio. En la parte postlaminar los encuentran dispuestos en los fascículos nerviosos entre los septos conectivos. En la región laminar, los astrocitos se van a encontrar tanto entre las fibras nerviosas, como entre los septos conectivos, siendo la única diferencia entre los de la parte coroidal con respecto a los de la parte escleral, su localización septal más frecuente así como la disminución en esta región de los fibroblastos y fibras colágenas. En la zona de la papila son muy numerosos, pero de tamaño más pequeño que los postlaminares. Con respecto a su morfología, estos autores señalan que presentan núcleos pleomórficos que se impregnan con plata más fuertemente que las otras células gliales del N.O. En este animal, los oligodendrocitos se organizan en columnas, pero únicamente a partir de la zona posterior de la lámina cribosa.

En el conejo, BLUNT encuentra que, al no existir lámina cribosa (TANSLEY,

1956<sup>326</sup>), los oligodendrocitos pueden alcanzar libremente la retina, de tal forma que las bandas de fibras nerviosas mielinizadas invaden el disco óptico sobre los lados temporal y nasal introduciéndose en la retina en los denominados "radios medulares". En este animal, los astrocitos forman una malla con sus prolongaciones alrededor de las fibras.

El estudio de la citoarquitectura astrogliar de la cabeza del N.O., de este último animal es completado por RAMÍREZ (1989a<sup>271</sup>), y SALAZAR (1989<sup>295</sup>). Estos autores encuentran condensaciones gliales equivalentes a las limitantes: tejido de Elschnig, tejido intermediario de Kuhnt y Jacoby, y manto periférico de Greef. Además, en la zona más rostral los astrocitos forman celdillas y gracias a sus prolongaciones, orientadas tanto radial como transversalmente, forman verdaderos tubos fibrilares gliales que fasciculan a las fibras nerviosas. Todos los astrocitos del N.O. del conejo presentan una morfología fibrosa que varía entre dos patrones morfológicos distintos: astrocitos de cuyo soma parten prolongaciones primarias largas paralelas a los axones y que constituyen parte del tabique glial, así como expansiones largas perpendiculares al eje de los axones; y un segundo tipo, constituido por astrocitos más pequeños con mayor número de ramificaciones pero más cortas que parten en todas las direcciones y que le dan un aspecto más estrellado.

Similares resultados son obtenidos por MILLER (1989b<sup>196</sup>) en N.O. de ratas, al encontrar que con la impregnación de Golgi los astrocitos se pueden dividir en dos tipos: unos cuyas prolongaciones orientadas radialmente en todas las direcciones terminan sobre la superficie pial y los vasos sanguíneos; y otros, con las prolongaciones orientadas mayoritariamente longitudinalmente y que se asocian con los nodos de Ranvier.

Es, sin embargo, la glioarquitectura de la cabeza del N.O. de los primates la que ha sido descrita de forma más completa gracias a los trabajos de HAYREH (1966,1974a,1978<sup>113,114,116</sup>), y ANDERSON (1969a,b,c<sup>11-13</sup>). Esto se explica fácilmente si tenemos en cuenta que las diferencias en cuanto a vascularización y disposición de las células gliales son importantes entre el hombre y los animales de experimentación no primates (WIRTSCHAFTER, 1975<sup>357</sup>); por tanto, los trabajos sobre neuroanatomía y los problemas de vascularización del disco óptico han sido realizados en monos, ya que presentan una mayor semejanza con el hombre.

Estos estudios permiten demostrar que la glioarquitectura de la cabeza del nervio de los primates es similar a la que presenta el N.O. humano, descrita en los trabajos realizados por WOLTER (1957,1961<sup>365,366</sup>) y ANDERSON (1967,1969a,b,c,<sup>10-13</sup>) (que analizaremos posteriormente con más detalle).

HAYREH (1966,1974a,1978<sup>113,114,116</sup>), encuentra que en la región retrolaminar, las fibras nerviosas se disponen en fascículos delimitados por septos de tejido conectivo. Estos septos contienen los capilares, estando unidos en la periferia con las vainas piales y centralmente con la envoltura de tejido que rodea a los vasos retinianos centrales, además cerca de los vasos centrales las fibras conectivas se disponen longitudinalmente al eje del nervio. Las fibras nerviosas están separadas de los tabiques conectivos por membranas gliales, que se diferencian de las fibras conectivas fácilmente por el carácter tosco y sinuoso de estas últimas. Estas membranas gliales están constituidas por astrocitos fibrosos que se conectan con los septos conectivos y los capilares gracias a sus prolongaciones.

En la lámina cribosa, HAYREH en un principio (1966<sup>113</sup>), distingue dos zonas. La parte posterior presenta un predominio de tejido conectivo que se ordena en lamelas compactas que cruzan el nervio. En secciones transversales se aprecia como presenta numerosas aberturas para permitir el paso de las fibras nerviosas; siendo estos poros más pequeños que los espacios interseptales de la región retrolaminar al no existir aquí vainas de mielina. Todos estos orificios de la región laminar están recubiertos por tejido glial que presentan un aspecto aplanado, pudiéndose observar como se dirigen hacia el interior de las aberturas e incluso núcleos de astrocitos fibrosos dentro de ellas. Este autor, considera que existe una

transición entre la parte posterior de la lamina cribosa y la zona anterior que es predominantemente glial, debido a que el incremento de los elementos astrogliales se va haciendo de una forma progresiva. La parte glial de la lámina presenta una morfología en "cesta" (descrita por WOLTER [1957, 1961<sup>365,366</sup>] en el hombre), constituida por astrocitos con núcleo oval y prolongaciones muy finas.

Posteriormente, HAYREH (1974a, 1978<sup>114,116</sup>), se refiere a la zona anterior de la lámina incluyéndola dentro de la región prelaminar; además en esta región según nos acercamos a los bordes del disco, los astrocitos se encuentran más dispersos y menos compactos perdiéndose la disposición regular de las vainas gliales.

Estas descripciones son confirmadas por ANDERSON (1969a,b,c<sup>11-13</sup>), WIRTSCHAFTER (1975<sup>357</sup>) y MINCKLER (1976<sup>197</sup>), quienes además señalan la existencia en el mono, de todas las limitantes astrogliales definidas en el hombre.

## **B) ESTUDIOS CON MICROSCOPIA ELECTRÓNICA.**

A partir de los años 60 entramos en una década en la que los trabajos se centran fundamentalmente en la descripción con microscopía electrónica de la

ultraestructura astrocitaria.

Estos estudios se inician con MALMFORS (1963<sup>183</sup>), quien al estudiar el N.O. de la rata encuentra oligodendroglia y astroglia. Este autor, demuestra que, los oligodendrocitos aparecen con el citoplasma relativamente oscuro y abundantes organelas; mientras que, los astrocitos presentan un citoplasma relleno con abundantes filamentos de 100 Å de diámetro.

WENDELL-SMITH, BLUNT, y col. (1966<sup>354</sup>) completan con microscopía electrónica sus primeras observaciones realizadas en plata, sobre las células gliales del nervio óptico del gato (BLUNT, 1965<sup>29</sup>). Describen en la región prelaminar un tipo de astrocito pequeño (célula araña), que está asociado con las fibras amielínicas de esta región y que presenta abundantes fibrillas finas densamente empaquetadas en su citoplasma. En la restantes zonas: región laminar y post-laminar, los astrocitos son de mayor tamaño y se corresponden con los astrocitos fibrosos típicos. Estos autores concluyen sus estudios considerando que las características diferenciadoras ultraestructuralmente de los astrocitos son: la presencia de filamentos y glucógeno.

Un año después, VAUGHN Y PETERS (1967a,b<sup>340,341</sup>), centran su estudio en la ultraestructura de los astrocitos fibrosos del N.O. de la rata, describiendo

como éstos poseen numerosas prolongaciones que se extienden entre los axones mielínicos uniéndose con los procedentes de células próximas para formar láminas gliales que corren paralelas en ángulo recto a los axones. También describen la existencia de expansiones astrogiales que separan completamente los axones de las paredes de los vasos que penetran desde la piamadre. En los astrocitos maduros raramente se observan microtúbulos, siendo su característica principal la presencia en su citoplasma, de una masa de filamentos de 80-90 Å de diámetro empaquetados en haces.

Estos autores creen que los filamentos podrían estar formados por la ruptura de microtúbulos. Esta hipótesis proviene de las conclusiones que obtienen al estudiar los cambios que suceden en el citoplasma del astrocito durante el desarrollo postnatal (PETERS, VAUGH, 1967<sup>229</sup>). En el momento del nacimiento las prolongaciones de los astrocitos sólo contienen microtúbulos, pero durante el desarrollo empiezan a aparecer filamentos a la vez que disminuyen en número los microtúbulos, proceso que continua hasta que finalmente en los astrocitos maduros los filamentos van a llenar todo el citoplasma, siendo los microtúbulos muy escasos.

BÜSSOW (1980<sup>37</sup>), estudia la disposición de las células astrogiales en la retina y N.O. de monos y gatos. Este autor describe cómo es la astroglia, la

responsable del establecimiento de la membrana glial perivascular, comprobando las descripciones de COOK (1973a<sup>49</sup>), y cómo las prolongaciones astrocitarias presentan haces de filamentos gliales densamente empaquetados.

Los trabajos de COHEN (1973<sup>45</sup>) en los que se demuestra como el tejido conectivo de la membrana de Bruch se introduce en la limitante astroglial que recubre los axones del N.O. a nivel de la coroides, van a generar una serie de trabajos enfocados en el estudio ultraestructural del tejido intermediario de Kuhnt que demuestran la existencia de uniones estrechas (tipo tight) y uniones tipo Gap entre los astrocitos que constituyen esta limitante en nervios de monos y ratas (TSO, 1975<sup>337</sup>; TSUKAHARA, 1975<sup>338</sup>; OKINAMI, 1976<sup>215</sup>). Asimismo, también se han encontrado uniones estrechas entre los astrocitos del tejido intermediario de Kuhnt y las células del epitelio pigmentario de la retina, que se continúan con las uniones adherentes de la membrana limitante interna; constituyendo, por tanto, este tejido una barrera que impide el paso de moléculas entre el N.O. y el tejido retiniano (OKINAMI, 1976<sup>215</sup>). Por último, HIRATA (1991<sup>130</sup>) ha indicado también, la presencia de la glia de Müller como elemento constitucional del tejido intermediario de Kuhnt, además de los astrocitos, en N.O. de cobayas.

SUÁREZ y RAFF (1989<sup>325</sup>) estudian los astrocitos subpiales y perivascuales

en N.O. de ratas, encontrando como ambos, en ocasiones, pueden estar asociados con los nodos de Ranvier. Los astrocitos son claramente diferenciables por poseer un núcleo con una capa periférica densa de heterocromatina, y un citoplasma con numerosas mitocondrias alargadas, gránulos densos y filamentos gliales; además los astrocitos subpiales poseen el cuerpo celular en contacto con la lámina basal que envuelve el nervio, y mandan prolongaciones primarias que se extienden hacia el interior del nervio pudiendo dividirse en múltiples prolongaciones secundarias.

Otros estudios realizados a microscopía electrónica han ido encaminados a determinar el origen y características de las distintas estirpes macrogliales.

Así, SKOFF y col. (1976a,b,1980,1986<sup>308-311</sup>), han demostrado que en el período prenatal las células ventriculares dan astroblastos y glioblastos, pudiendo en este momento diferenciarse algunas células en astrocitos. En el período postnatal, los astroblastos siguen diferenciándose en astrocitos; mientras que, los glioblastos dan lugar a oligodendroblastos que se diferencian finalmente en oligodendrocitos.

De igual forma se ha determinado que la proliferación de las células macrogliales ocurre mayoritariamente entre el final de la gestación y las dos primeras semanas del desarrollo postnatal, coincidiendo con el punto álgido de la mielinización y el desarrollo axonal (HIROSE, 1973<sup>131</sup>; SKOFF,

1976b, 1990<sup>309,312</sup>; PINAZO-DURÁN, 1992<sup>231</sup>).

Finalmente, con la técnica de criofractura, se han puesto de manifiesto una serie de especializaciones de membrana en los astrocitos que constituyen las limitantes gliales.

Así MASSA (1982<sup>187</sup>) describe la existencia de invaginaciones de la membrana plasmática de los astrocitos fibrosos, en forma de frasco (vesículas plasmalesmas o "caveolae"). Las membranas plasmáticas orientadas hacia las láminas basales poseen pocas vesículas y un elevado número de partículas ortogonales asociadas a membrana (confirmado posteriormente por GOTOW, 1988<sup>103</sup>); mientras que, las membranas en contacto con las membranas de otros astrocitos presentan una situación inversa: pocas partículas ortogonales y mayor número de vesículas "caveolae". Este autor sugiere que en los astrocitos subpiales existe una malla de microfilamentos contráctiles, siendo la función de las vesículas iniciar la contracción en respuesta a tensiones en las vainas del N.O.

La presencia de especializaciones regionales de membrana en los astrocitos de las limitantes gliales, también es indicada por BLACK (1985<sup>22</sup>), pero refiriéndose en este caso, a las partículas ortogonales intramembranas, que se pueden considerar como una de las características diferenciales de la membrana de los

astrocitos al ser estudiada con la técnica de criofractura (ROOTS, 1986<sup>292</sup>). Este autor encuentra que las prolongaciones en pie de los astrocitos subpiales pueden dividirse en dos grupos: las que presentan una disposición de las partículas ortogonales al azar, y las que presentan una disposición organizada en columnas.

### **C) ESTUDIOS MEDIANTE LAS TÉCNICAS INMUNOHISTOQUÍMICAS.**

El aislamiento de la proteína gliofibrilar ácida (PGFA) en los astrocitos fibrosos (ENG, 1971<sup>73</sup>), la producción de anticuerpos específicos contra ella y su empleo para localizarla con inmunofluorescencia en astrocitos de diversos tejidos nerviosos (BIGNAMI, 1972<sup>21</sup>), la demostración de su conservación en la línea evolutiva de los vertebrados (DAHL, 1973<sup>56</sup>), así como de su especificidad como marcador astrogial (GHANDOUR, 1979<sup>94</sup>), van a producir un giro, a principios de los años 80, en los estudios sobre las células astrogiales del N.O. :

De esta forma, DIXON y ENG (1981<sup>66</sup>), considerando que la presencia de los filamentos gliales de 10 nm. de diámetro había sido ampliamente señalada en el N.O. (PETERS, 1967<sup>229</sup>; SKOFF, 1976a,b<sup>308,309</sup>); OMLIN, 1978<sup>217</sup>), y que la proteína GFA es el componente principal de estos filamentos gliales

(LAZARIDES, 1980<sup>164</sup>), analizan la presencia de PGFA en el desarrollo del N.O. de la rata.

En el momento del nacimiento existe inmunorreactividad PGFA(+) esta reacción es detectada en la membrana limitante de Elschnig, así como a nivel de un débil plexo que aísla los axones del N.O. del tejido retiniano circundante, lo que interpretan como un tejido intermediario de Kuhnt poco desarrollado. A nivel de la lámina cribosa observan como los astrocitos se agrupan en columnas orientándose sus prolongaciones de forma mayoritariamente transversal al eje del nervio. En la región retrobulbar, las prolongaciones gliales fasciculan los axones subdividiéndolos en fascículos, existiendo acumulaciones de producto de reacción a nivel de las limitantes gliales externas.

SKOFF (1986<sup>311</sup>) comprueba que el tiempo entre el final de la división celular de la astroglia y la aparición de la tinción PGFA(+) es similar, lo que indica que el tiempo requerido para la maduración de los astrocitos es parecido al de la creación de la cantidad suficiente de filamentos gliales. Estos estudios son confirmados posteriormente por BOVOLENTA (1987<sup>33</sup>) al estudiar la expresión de la PGFA durante la maduración astrogliar; y por LAKE (1992c<sup>163</sup>) quien encuentra astrocitos PGFA(+) en el N.O. de embriones de ratas adultas y en animales recién nacidos.

SKOFF<sup>311</sup> también describe, en N.O. de la rata, cómo los astrocitos marcados con anti-PGFA presentan prolongaciones radiales primarias gruesas que parten del pericarion, dividiéndose en prolongaciones secundarias más finas que corren paralelas a las fibras nerviosas, fasciculándolas en haces regulares. Por último, concluye afirmando que existen cambios en la forma de los astrocitos, el grado de fasciculación y el contenido de filamentos gliales, motivados por un lado por los axones de las células ganglionares, y por otro, por las variaciones de la vascularización a lo largo del N.O.

Esta descripción de la morfología de los astrocitos del N.O. de la rata es completada por BUTT (1989<sup>38</sup>) tras inyectar intracelularmente amarillo lucifer y peroxidasa de rábano, y observar como los astrocitos poseen 50-60 prolongaciones finas con una longitud de 400-500 $\mu$ m., que se extienden radialmente desde el cuerpo celular hacia la superficie subpial o hacia los vasos sanguíneos; poniéndose claramente de manifiesto la existencia de uniones tipo gap entre astrocitos, así como entre astrocitos y oligodendrocitos como ya había señalado MUGNAINI (1986<sup>207</sup>). La morfología de los astrocitos parece depender de su posición en el N.O., y así, los astrocitos cercanos a la superficie pial tienen, prolongaciones radiales cortas (< 100 $\mu$ m.) y gruesas que se dirigen directamente a la superficie pial, prolongaciones más largas que atraviesan el nervio hasta la superficie pial

opuesta; y además, de todas estas ramificaciones, cerca del cuerpo celular, nacen ramificaciones secundarias que se orientan longitudinalmente a lo largo del eje del nervio con terminaciones perivasculares. Los astrocitos localizados cerca del centro del nervio tienen, sin embargo, las prolongaciones muy finas y largas (300-400 $\mu$ m.), no ramificadas y orientadas radialmente dirigiéndose hacia la pia desde el cuerpo celular central como los radios de una bicicleta.

La inyección de peroxidasa de rábano también es utilizada por MILLER (1989b<sup>196</sup>) quien describe como hay astrocitos con prolongaciones radiales relacionados fundamentalmente con los vasos y las envueltas meníngeas, y astrocitos con prolongaciones longitudinales relacionados con los nodos de Ranvier.

A su vez, resultados similares con respecto a la distribución y morfología de los astrocitos, son obtenidos con anticuerpo contra la PGFA en otro animal de experimentación, el conejo, por SALAZAR (1989<sup>295</sup>). En este animal los astrocitos que forman las limitantes gliales presentan una fuerte inmunorreactividad PGFA(+), estando además, los astrocitos del N.O. de este animal, implicados tanto en la fasciculación de los haces axonales, como en la formación de las envueltas perivasculares.

Finalmente, CALVO y col. (1990<sup>40</sup>) estudiaron los astrocitos del N.O. en ratas adultas utilizando anti-PGFA y anti-vimentina (anticuerpo que marca los astrocitos fundamentalmente en período embrionario (QUITSCHKE, 1985a,b<sup>245,246</sup>), observando la existencia de una coexpresión de vimentina y PGFA en los astrocitos por lo que sugieren que esta coexpresión refleja una adaptación fenotípica de los astrocitos a condiciones ambientales particulares tales como contactos en las envueltas piales o relaciones con fibras mielínicas. Esta idea estaría en la línea del concepto de "heterogeneidad regional" astrocítica sugerido por WILKIN y col. (1992<sup>356</sup>), quienes consideran que esta heterogeneidad (tanto en la expresión de receptores, como en las propiedades antigénicas, fenotípicas y morfológicas), podría permitir a los astrocitos interactuar y responder específicamente a poblaciones particulares de neuronas en las distintas regiones del S.N.C.

En los últimos años, también se ha encontrado la existencia de otros antígenos en los astrocitos del N.O. de la rata como: las proteínas asociadas a microtúbulos (MAP) (PAPASOZOMENOS, 1986<sup>222</sup>); la proteína glial unida a hialuronato (PGHA) (PERIDES, 1990<sup>225</sup>), el ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) (LAKE, 1992c<sup>163</sup>, proteoglucanos queratan-sulfatos específicos del S.N.C. identificados con el anticuerpo monoclonal TED15 (GEISERT, 1992<sup>92</sup>), y taurina (LAKE,

1992c<sup>163</sup>).

Sin embargo, la mayor controversia con respecto a las células macrogliales del N.O., ha surgido tras la aparición en 1979 del anticuerpo monoclonal A2B5 que se une a una serie de gangliósidos, y que marca astrocitos y oligodendrocitos en cultivos (SCHNITZER, 1982<sup>299</sup>).

Utilizando este anticuerpo, en un primer momento, RAFF y col. (1983a,b<sup>255,256</sup>), observan la existencia, en cultivos, de células precursoras A2B5(+), que en presencia de suero fetal de ternera producen astrocitos fibrosos, y en su ausencia, se diferencian en oligodendrocitos, lo que les hace sugerir la hipótesis de que los astrocitos fibrosos y los oligodendrocitos pueden derivar de un progenitor común.

Con el empleo de anticuerpos contra la PGFA, los GC (galactocerebrósidos), el RAN-2 (antígeno de superficie celular neuronal de rata) y el A2B5, se ha demostrado la existencia de tres tipos de células gliales con diferentes tiempos de aparición, en cultivos de células procedentes de N.O. de rata (RAFF, 1984a,b<sup>258,259</sup>):

- Astrocito tipo 1: GC(-), PGFA(+), RAN-2(+), A2B5(-), que aparece en embriones de 16 días (E-16)
- Astrocito tipo 2: GC(-), PGFA(+), RAN-2(-), A2B5(+), que aparece en

cultivos de extractos de nervio de animales con dos semanas postnatales (P-14)

- Oligodendrocito: GC(+), PGFA(-), RAN-2(-), que aparece en embriones de 21 días (E-21)

Considerándose la existencia "in vitro" de dos estirpes de células macrogliales: las células O-2A precursoras de oligodendrocitos y astrocitos tipo-2, y las células A-1 precursoras de los astrocitos tipo-1. (RAFF, 1983a,b,c,1985,1987,1988, 1989<sup>255-257,261-263</sup>; MILLER, 1985,1989a<sup>193,195</sup>).

Con respecto a los estudios "in vivo", MILLER y RAFF (1984<sup>192</sup>), en un primer momento, al estudiar cortes semifinos, consideran que existen dos tipos distintos de astrocitos en el N.O., que se corresponden con las clásicas descripciones de astrocitos fibrosos y protoplásmicos. Por un lado, los astrocitos más periféricos con una tinción PGFA(+) no muy intensa serían astrocitos protoplásmicos, correspondiéndose con los astrocitos tipo-1 de cultivo al ser A2B5(-); y por otro, lado los astrocitos de localización central, que presentaban una intensa inmunoreactividad PGFA(+) serían astrocitos fibrosos, correspondiéndose con los astrocitos tipo-2 de cultivo al ser A2B5(+). Además, los datos obtenidos con microscopía electrónica en los que se demuestra que los astrocitos fibrosos tienen más cantidad de filamentos gliales, les permite considerar

que los astrocitos A2B5(+) (astrocito tipo-2) se tiñen más intensamente con anti-PGFA al ser fibrosos y poseer más filamentos intermedios que los A2B5(-) (astrocito tipo-1) que serían protoplásmicos.

Sin embargo, estos mismos autores, años después, (MILLER, 1989a,b<sup>195,196</sup>; RAFF, 1989<sup>263</sup>), consideran que no es posible mantener esta división, ya que los datos obtenidos tras el uso de nuevos anticuerpos (HNK-1, L2, NSP-4, J1, (FFRENCH-CONSTANT, 1986a,b<sup>76,77</sup>), además de los estudios con inyección de peroxidasa (HRP) (MILLER, 1989b<sup>196</sup>), sugieren que el anticuerpo A2B5 no es un marcador real de los astrocitos tipo-2 en secciones de tejido. Una posible razón, es que el A2B5 marca la superficie de las células en cultivo (RAFF, 1983a,b<sup>255,256</sup>), mientras que, en secciones histológicas la inmunoreactividad es intracelular (MILLER, 1984<sup>192</sup>). Por lo tanto, su nuevo modelo implica que los astrocitos tipo-1 son fibrosos, y los astrocitos tipo-2 representan un nuevo tipo de célula glial (MILLER, 1989a,b<sup>195,196</sup>; RAFF, 1989<sup>262</sup>).

Tras examinar el tiempo y la secuencia de desarrollo de los tres tipos de células macrogliales de N.O. de rata de diferentes edades, se ha comprobado que: los astrocitos tipo-1 son los primeros en aparecer, haciéndolo en el día embrionario 16 (E16), después le siguen los oligodendrocitos en el día E-21, y por último los astrocitos tipo-2 entre los días postnatales 7 y 10 (P7 a P10) (MILLER,

1985<sup>193</sup>). Además, los astrocitos tipo-1 son los que forman la membrana limitante glial periférica y las envueltas perivasculares; mientras que los astrocitos tipo-2 están especializados en la construcción de las vainas mielínicas al contribuir en la estructura del nodo de Ranvier (FRENCH-CONSTANT, 1986b,c<sup>77,78</sup>; RAFF, 1987,1989<sup>262,263</sup>; MILLER, 1989a,b<sup>195,196</sup>).

### **1.3.- LAS CÉLULAS ASTROGLIALES DE LA CABEZA DEL NERVIO ÓPTICO HUMANO.**

#### **A) ESTUDIOS CON IMPREGNACIONES ARGÉNTICAS.**

El estudio de las células neurogliales en el N.O. humano se inicia a finales del siglo XIX, con los estudios de LEBER (1868<sup>165</sup>), limitándose los primeros trabajos a describir una serie de condensaciones celulares, que los autores consideraron limitantes de naturaleza glial ya que se teñían con los métodos de plata específicos para la neuroglia y respondían a las descripciones realizadas en el tejido cerebral.

Es KUHNT (1879<sup>159</sup>), el primero en llamar la atención sobre una condensación glial situada en el centro de la excavación del disco óptico, que rodeando a la arteria y vena central de la retina, las separa del vítreo, denominándola **menisco central de Kuhnt**. Además, observa otro tejido glial que se extiende a nivel de los elementos retinianos separándolos del N.O., llamándolo **tejido intermediario de Kuhnt**.

FUCHS (1885<sup>83</sup>) encuentra una nueva acumulación glial que separa los bordes

del N.O. de las vainas meníngeas, creyendo que se trata del resultado de una atrofia periférica. Sin embargo, cuatro años más tarde, en 1899, GREEF<sup>106</sup>, demuestra que esta malla de fibras y núcleos neurogliales entre la vaina pial y los haces nerviosos periféricos, no es una condición patológica sino que es una situación que se da en los nervios ópticos normales; razón por la cual es denominada a partir de este momento, por los diferentes autores, como **manto periférico neuroglial de Fuchs o Greef**. Aunque el propio GREEF (1913)<sup>107</sup> al referirse a él, lo denomina como manto periférico de Fuchs.

ELSCHNIG (1901<sup>72</sup>) describe otras dos limitantes astrogliales existentes en el N.O., demostrando la existencia de un tejido constituido por prolongaciones astrocitarias, que a modo de continuación de la membrana limitante interna de la retina, se extiende entre el tejido nervioso y el vítreo; este tejido es la **membrana limitante interna de Elschmig**. Asimismo describe en la región de la lámina cribosa, un tejido formado por fibras colágenas al que llama: **tejido limitante marginal o borde de Elschmig**.

Por último, JACOBY (1905<sup>138</sup>) señala la existencia de un tejido glial interpuesto entre la coroides y el N.O.: el **tejido de Jacoby**.

La existencia de todas estas limitantes de naturaleza glial es confirmada por SALZMANN en 1912<sup>296</sup>, quien además al referirse a la lámina cribosa señala la existencia de una transición entre su parte escleral, en la que la malla es de origen mesodérmico (fibras de colágeno y elementos elásticos), y la parte coroidea puramente ectodérmica (glial). Estas observaciones sobre la lámina cribosa serán confirmadas, años más tarde, por HADEN (1946<sup>109</sup>) y WILCZEK (1947<sup>355</sup>).

COLLIN (1920<sup>46</sup>) divide a las células astrogiales del nervio en dos tipos: la neuroglia astrocitaria perifascicular y la neuroglia astrocitaria intrafascicular; MARCHESANI (1926<sup>185</sup>) los describe como células fibrilares con aspecto de "araña"; y finalmente CONE (1932<sup>47</sup>), describe a los astrocitos como células de soporte que forman una malla regular con sus prolongaciones celulares en ángulo recto a las fibras nerviosas.

DAVIS en 1940<sup>52</sup>, al hacer un extenso estudio sobre los tumores del N.O., realiza una descripción morfológica de las células gliales para poder después conocer sus cambios en los gliomas y poder así clasificarlos. Con el empleo de las impregnaciones argénticas, describe la presencia de tres tipos gliales: astrocitos, oligodendrocitos y microglia. Los astrocitos son fibrosos, extendiéndose las prolongaciones citoplasmáticas en varias direcciones formando una malla

interpuesta entre las fibras nerviosas, presentando también prolongaciones subpiales. Los cuerpos celulares de los astrocitos se encuentran dispuestos dentro de los haces, y las prolongaciones que derivan de ellos se entrecruzan en todas las direcciones pudiendo, incluso, recorrer grandes distancias a través de los haces.

ZIMMERMAN (1956<sup>371</sup>) describe el N.O. como una estructura relativamente simple compuesta de tres elementos: fibras nerviosas mielinizadas, células intersticiales (astrocitos, oligodendrocitos y microglia) y septos fibrovasculares que se introducen desde la piamadre subdividiendo el nervio en haces axonales. Los astrocitos son fibrosos y forman membranas limitantes que separan el tejido neuroectodérmico del mesodérmico, siendo más numerosos en el segmento ocular del N.O. Con respecto a las otras células gliales señala que los oligodendrocitos están relacionados con la mielina, mientras que la microglia está presente en un pequeño número y es difícil de demostrar en nervios ópticos normales.

Sin embargo, los estudios más importantes sobre la morfología y organización astroglial del N.O., empleando impregnaciones argénticas, son realizados a partir de los trabajos de LISS en 1956<sup>178</sup>.

Este autor considera que la técnica clásica de Del Río-Hortega, que se estaba empleando hasta entonces, tiñe con dificultad la astroglia del N.O. y el quiasma,

no siendo un método adecuado para el estudio de las relaciones que presentan estas células con las fibras nerviosas en esta parte del S.N.C. Para solucionar este problema aplica, al estudio de los nervios ópticos humanos, cinco variantes al método del carbonato de plata de Del Río-Hortega. Utilizando estas tinciones describe la existencia de numerosos tipos de astroglia con diferentes formas según las zonas del N.O., lo que demuestra que el patrón astrogliar se ajusta al curso que siguen las fibras nerviosas.

Así en la zona central y rostral del N.O., distingue cuatro astrocitos morfológicamente distintos:

- Astrocitos fibrilares
- Astrocitos gigantes con numerosas prolongaciones largas y gruesas.
- Astrocitos con una prolongación larga y varias en forma de V.
- Astrocitos pequeños con prolongaciones finas que forman una malla.

WOLTER (1957, 1961<sup>365,366</sup>), aplicando las modificaciones a las técnicas del carbonado de plata descritas por LISS (1956<sup>178</sup>), realiza un completo trabajo sobre la astroglia de la papila óptica. Con el término papila, engloba toda la cabeza del N.O., desde la capa de fibras hasta inclusive la lámina cribosa, y su arquitectura da protección a todas las neuritas de la capa de fibras del nervio óptico de la retina al entrar a formar el N.O.

La parte anterior de esta estructura tiene forma de "cesta de mimbre", estando compuesta por una astroglia especial que protege y soporta los axones ganglionares en el punto de inflexión (donde realizan un giro de 90°). Estos astrocitos a los que denomina "células araña" (recogiendo el término empleado en 1926 por MARCHESANI<sup>185</sup>), tienen un cuerpo celular pequeño del que parten largas prolongaciones radiales que forman una malla densa rodeando las fibras nerviosas, además también se dirigen hacia los capilares que contiene la "cesta" formando una malla tupida a su alrededor. La base de este tejido astrogliar se conecta estrechamente con la lámina cribosa.

La parte posterior de la papila está constituida por la lámina cribosa, estructura en forma de cedazo constituida por fibras de tejido conectivo, procedentes de la esclera, que se encuentran entrelazadas dejando canales para el paso de axones; las fibras nerviosas al atravesar la lámina llevan, no obstante, un sistema astrogliar que las separa y protege del tejido conectivo.

La astroglia de la papila óptica cambia gradualmente sus características hacia la parte posterior del nervio, de tal forma que a partir de la lámina cribosa las células astrogliales son similares a la de la sustancia blanca del cerebro.

WOLTER<sup>365,366</sup> concluye su estudio, considerando que la elasticidad de la estructura glial de la "cesta" podría evitar el daño irreversible de las neuritas en situaciones de tensión; mientras que, la rigidez escleral sería la responsable de los

daños irreparables que se producen, por ejemplo, en la situación del papiledema.

Las relaciones que se establecen entre estas células astrogliales y los vasos sanguíneos son analizadas por ERSKINE en 1958<sup>74</sup>. Para este autor, los vasos que se introducen desde la piamadre presentan terminaciones astrogliales "en pie vascular", pero cuando pierden su envuelta conjuntiva, carecen también de la envoltura glial.

A partir de esta fecha, los estudios sobre los astrocitos del N.O. humano empleando las tinciones de plata se van haciendo cada vez más escasos, aunque podemos resaltar los realizados por: ORTIZ-MITTERER (1974<sup>219</sup>) y CAMPOS (1976<sup>39</sup>).

ORTIZ-MITTERER (1974<sup>219</sup>) nuevamente describe la existencia de los tres tipos gliales en el N.O.: astrocitos, oligodendrocitos y microglia. Resaltando, con respecto a los astrocitos, su naturaleza fibrosa, así como la función de protección y aislamiento de las fibras, sin olvidarse del papel trófico puesto de manifiesto por las numerosas prolongaciones que realizan contactos con los vasos intraseptales.

Morfológicamente estas células astrogliales se caracterizan por poseer largas expansiones filamentosas que se entrecruzan entre las fibras nerviosas, formando

un plexo glial entre las mismas.

Por último, CAMPOS y col. (1976<sup>39</sup>), siguiendo la línea de los trabajos de LISS (1956<sup>178</sup>), llegan a describir hasta siete tipos astrogliales, denominándolos como:

- Tipo I: Perivascular aplanado; caracterizado por un soma plano del que parten numerosas prolongaciones que se dirigen hacia los vasos, en forma de pie vascular, mientras que las restantes se dirigen hacia el interior de los fascículos nerviosos.
- Tipo II: En horquilla; célula con un soma aplanado triangular, del que parten una o varias prolongaciones, alguna de las cuales se bifurca en forma de horquilla.
- Tipo III: Astrocito intermedio; célula con caracteres de astrocito fibroso y oligodendrocito, ya que de un soma pequeño y redondeado, parten radialmente varias prolongaciones de distinto grosor.
- Tipo IV: Estrellado gigante; presentan un cuerpo celular triangular del que nacen largas y abundantes prolongaciones multidireccionales
- Tipo V: Estrellado pequeño; parecido al anterior pero con un soma delgado y más pequeño.
- Tipo VI: Monofasciculado; se distingue por emitir una única prolongación

que se ramifica a lo largo de su recorrido.

- Tipo VII: Bifasciculado; célula de cuerpo aplanado y fusiforme, cuyas prolongaciones parten de polos opuestos y forman manojos paralelos a los fascículos nerviosos.

Estos tipos astrogiales presentan una diferente disposición en el N.O., de tal forma, que los que forman la capa de Jacoby, el tejido intermediario de Kuhnt, y la vaina periférica glial son del tipo V. Los perivasculares (tipo I) se disponen en todas las zonas del nervio en las que existen vasos sanguíneos, con el soma, en ocasiones, en íntimo contacto con la adventicia del vaso. Los astrocitos bifasciculados o tipo VII, son escasos y se localizan en las inmediaciones de los septos conectivos-vasculares paralelos a éstos; y por último, para estos autores el resto de los tipos son muy escasos en todas las zonas del nervio.

## **B) ESTUDIOS A MICROSCOPIA ELECTRÓNICA.**

Han sido los trabajos realizados con el empleo del microscopio electrónico, los más completos e importantes de los efectuados sobre este tema.

Uno de los primeros estudios sobre los aspectos ultraestructurales del N.O. humano fue realizado por COHEN en 1967<sup>44</sup>. A nivel de la lámina cribosa y la

zona precibiforme, encuentra que las células subpiales y las localizadas en la superficie de los fascículos, poseen un citoplasma con masas de elementos fibrosos, razón por la cual, para este autor se trata de astrocitos fibrosos.

Los astrocitos serían la especie glial predominante en estas regiones del N.O., a juzgar por el alto porcentaje ocupado en secciones transversales de nervio, por las prolongaciones fibrosas no neuronales. Sin embargo, justo en la zona donde comienza la mielinización aparecen líneas de somas celulares de oligodendrocitos que se caracterizan por un citoplasma rico en ribosomas y mitocondrias.

ANDERSON (1967, 1969a,b,c, 1970<sup>10-14</sup>), realiza una extensa recopilación de todo lo publicado con anterioridad (empleando las tinciones clásicas de plata) sobre las células astrogliales del N.O. y tras añadirle los datos de sus observaciones ultraestructurales, realiza unas reconstrucciones tridimensionales de la disposición arquitectónica astrogliar de la cabeza del N.O., de la lámina cribosa, y de las cubiertas meníngeas.

En primer lugar, confirma la existencia de todas las limitantes definidas clásicamente: el manto glial periférico de Fuchs o Greef; el tejido de Jacoby, el tejido intermediario de Kuhnt, el intercalar de Elschnig, la membrana limitante de Elschnig y, el menisco de Kuhnt; demostrando ultraestructuralmente que están constituidas por prolongaciones y núcleos de células astrogliales.

Describe las diferencias ultraestructurales de los astrocitos en cada región del nervio. Así, en la porción orbital, los astrocitos fibrosos poseen múltiples prolongaciones derivadas de su cuerpo celular. El núcleo es oval con apariencia clara y acúmulos de cromatina; mientras que, el citoplasma es pálido, con mitocondrias irregulares, ribosomas libres y retículo endoplásmico rugoso; también encuentran vacuolas con vesículas en su interior: cuerpos multivesiculares. Pero su característica más específica son las numerosas fibrillas de 60-75 Å de diámetro que corren longitudinalmente a través de las prolongaciones astrocitarias, dispersándose en el pericarion donde se observan en pequeños haces.

Al estudiar los astrocitos de la lámina cribosa, diferencia los de la parte anterior o coroidea, de los de la parte posterior o escleral. Los astrocitos de la zona anterior poseen un núcleo con cromatina más condensada que los de la porción orbitaria, estando la circunferencia del núcleo rodeada por una fina capa de citoplasma; sus prolongaciones son muy largas y están constituidas casi enteramente por fibrillas, observándose desmosomas uniendo astrocitos vecinos. Los astrocitos de la zona posterior son similares a los anteriores, pero se disponen emparedados entre las capas del tejido conectivo que constituyen la densa estructura laminar, su núcleo es alargado y de él parten largos brazos en ángulo recto al curso de las fibras nerviosas.

En la zona de transición entre retina y disco, describe la presencia de "células

pálidas" que se corresponderían con astrocitos similares a los de la lámina cribosa pero más pequeños y menos fibrosos. Estos astrocitos rodean a los capilares siendo equivalentes a los astrocitos que rodean a los capilares retinianos.

Con respecto a los astrocitos que forman las diferentes limitantes que separan el tejido neuroectodérmico del mesodérmico, ultraestructuralmente encuentra que son similares a los de la región laminar.

También describe como todos los vasos sanguíneos existentes en el N.O. están rodeados por una capa ininterrumpida de tejido glial, no encontrando diferencias ultraestructurales con el resto de los astrocitos descritos anteriormente.

Finalmente, en el citoplasma de todos los astrocitos del nervio se pueden encontrar abundantes gránulos de glucogeno, así como inclusiones densas que se corresponden con acúmulos de lipofuchsina que se van acumulando con la edad en el citoplasma astroglial; y ocasionalmente pueden poseer un cilio. También se pueden encontrar uniones tipo desmosomas entre las prolongaciones de astrocitos vecinos.

Aunque, como hemos visto, mantienen un patrón morfológico común, para ANDERSON<sup>10-14</sup>, los astrocitos se modifican en las diferentes regiones del N.O. para dar el soporte estructural adecuado a las fibras nerviosas; y así, en la región orbitaria sus prolongaciones son multidireccionales; en la zona de la retina peripapilar sus prolongaciones están orientadas en un plano paralelo al curso de

las fibras nerviosas; en la región anterior de la lámina cribosa (zona coroidea) están entrecruzados formando una estructura en cesta con prolongaciones orientadas mayoritariamente perpendiculares a los axones de las células ganglionares; y por último, en la lámina cribosa, los núcleos se disponen en columnas altamente organizadas recubriendo los canales colágenos que atraviesan las fibras.

Los resultados de estos trabajos son rápidamente aceptados y recogidos por HOGAN (1971<sup>133</sup>), y tras ser revisados nuevamente por ANDERSON (1973<sup>15</sup>), han constituido la base de todos los textos que se han publicado hasta la actualidad sobre la morfología de las células gliales del N.O. (WIRTSCHAFTER, 1975<sup>357</sup>; SARAUX, 1985<sup>297</sup>; RAMÍREZ, 1989b<sup>272</sup>; RAYNAUD, 1992<sup>283</sup>; JONAS, 1993b<sup>145</sup>).

HOGAN (1971<sup>133</sup>), señala cómo, además de los desmosomas indicados por ANDERSON<sup>10-13</sup>, también pueden existir uniones estrechas entre los astrocitos; y cómo también raramente puede encontrarse un cilio en el citoplasma de estas células. Asimismo, los astrocitos de la membrana limitante de Elschnig poseen en su parte más interna una membrana basal dirigida hacia el vítreo con un grosor uniforme de aproximadamente 200 Å (más fina que la que hay junto a la glia de

Müller en la membrana limitante interna de la retina). Sobre el tercio lateral del disco esta limitante está constituida por gruesas prolongaciones procedentes de una capa de 3-4 células, mientras que centralmente son pequeñas prolongaciones de 2-3 células.

Los astrocitos que se localizan entre los márgenes retinianos y coroideos (tejido intermediario de Kuhnt y Jacoby) poseen la misma ultraestructura que el resto, pero su cuerpo celular es aplanado y sus prolongaciones más finas. Estas células forman una columna alrededor de la circunferencia del canal del N.O. mandando prolongaciones internamente entre los haces de axones.

Este autor vuelve a describir la presencia de una membrana basal entre los septos conectivos, los vasos sanguíneos, y los astrocitos.

La proliferación y maduración de los astrocitos fibrosos en el N.O. humano, es analizada por STURROCK (1975<sup>322</sup>), quien llega a la conclusión de que existe una correlación entre la población glial y el tanto por ciento de zona vascularizada. Durante el desarrollo describe cómo los astrocitos fibrosos pasan por una serie de estadios con cambios en su ultraestructura, de tal forma, que los astrocitos precursores (glioblastos) poseen un citoplasma lleno de organelas adquiriendo progresivamente gránulos de glucógeno y microfibrillas que se van extendiendo desde las prolongaciones hacia el pericarion. En los estadios

posteriores, el citoplasma comienza a ser menos denso, disminuyendo el número de organelas en las prolongaciones astrocitarias que se hacen más finas, estando rellenas de filamentos densamente empaquetados. Al igual que ANDERSON (1967-1973<sup>10-15</sup>) y HOGAN (1971<sup>133</sup>), también señala la existencia de un cilio intracitoplasmático.

QUIGLEY (1977<sup>237</sup>), demuestra la existencia de uniones tipo Gap entre los astrocitos presentes en la cabeza del N.O. humano (confirmando la observación realizada por COOK [1973a<sup>49</sup>] en monos); sin embargo, no encuentra desmosomas o uniones tipo "zonulae adherentes". Estas uniones Gap podrían jugar un importante papel en el mantenimiento de la malla astrogliar a través de la cual pasan los axones, así como producir un acoplamiento eléctrico y metabólico entre estos astrocitos.

Por último, ELKINGTON (1990<sup>71</sup>) estudia a microscopía electrónica la estructura de la lámina cribosa del N.O. humano, confirmando la estrecha relación existente entre las prolongaciones astrogliales, las fibras nerviosas y el tejido conectivo. En la parte coroidea de la región laminar, las prolongaciones de los astrocitos fibrosos forman los bordes de los canales de la lámina, conteniendo numerosos haces de filamentos intermedios. Además, prolongaciones similares se

extienden dentro de los canales formando una malla que separa los axones no mielinizados en haces de diámetro variable; estas prolongaciones se ramifican insinuándose entre los pequeños grupos de axones. En esta parte también se pueden encontrar algunas fibras de colágeno.

En la zona escleral de la lámina, todavía existe mezcla entre los axones y las prolongaciones astrocitarias, pero ya se hace más prominente los elementos colágenos de las trabéculas. Vuelve a describir (al igual que ANDERSON, 1967-1973<sup>10-15</sup>; HOGAN, 1971<sup>133</sup>) la presencia de la membrana basal entre las ramificaciones de los astrocitos y las trabéculas de colágeno.

### **C.- ESTUDIOS INMUNOHISTOQUÍMICOS EMPLEANDO ANTI-PGFA.**

Al revisar los trabajos realizados sobre los astrocitos del N.O. humano, sorprende el escaso número de estudios publicados sobre este tema empleando las técnicas inmunohistoquímicas, y más concretamente los trabajos utilizando como marcador la proteína gliofibrilar ácida.

Estos trabajos se han enfocado fundamentalmente al estudio de las variaciones de los astrocitos durante el desarrollo, siendo mínimos los puramente morfológicos.

Así, anticuerpos contra esta proteína son utilizados por RHODES en 1982<sup>287</sup> para estudiar el desarrollo del N.O., analizando detenidamente los cambios en la expresión de esta proteína glial. Este autor observa cómo ya en los embriones de 14 semanas se expresa inmunoreactividad PGFA(+), aumentando la reacción paralelamente a la edad del embrión, de tal forma, que en el adulto, las columnas gliales de la lámina escleral así como las células neurogliales del disco, presentan una inmunoreactividad de ligera a moderada, mientras que en la cara que mira hacia el disco la inmunotinción es muy alta. El incremento de la reacción anti-PGFA en los fetos mayores podría indicar un incremento en el número de filamentos astrocitarios con el desarrollo, o cambios en el tipo de subunidad proteica constituyente de los filamentos.

Este estudio es completado en 1985 por QUITSCHKE y col.<sup>245,246</sup>, cuando analizan la composición de los filamentos intermedios durante el desarrollo embrionario. Estos autores encuentran que en la diferenciación de los astrocitos hay una transición en la expresión de proteínas de los filamentos desde vimentina hasta PGFA, de tal forma que en embriones de 15 semanas, la vimentina es predominante, existiendo pequeñas trazas de PGFA; mientras que, en nervios ópticos adultos, hay dos veces más PGFA que vimentina. Además, la expresión PGFA parece preceder varias semanas al proceso de mielinización.

ELKINGTON (1990<sup>71</sup>) completa sus estudios de la región laminar realizados con microscopía electrónica, con el empleo de las técnicas inmunohistoquímicas (con anti-PGFA, anti-NF). Con estas técnicas ven claramente cómo la trabécula fibrosa de la lámina está formada por madejas de colágeno entretrejidas dispuestas muchas de ellas tangencialmente a los canales; mientras que, las prolongaciones de los astrocitos forman una malla que rodea íntimamente a los axones estando asimismo asociadas estrechamente con las superficies interiores de la estructura trabecular fibrosa.

La reactividad PGFA(+) permite observar como cada canal de la lámina está subdividido en compartimentos de 2,5 a 5  $\mu\text{m}$ . por prolongaciones astrogliales finas, disponiéndose los núcleos alrededor de los ejes de los canales, e incluso en los de mayor diámetro se pueden encontrar algunos dentro del canal.

Por último, LAKE (1992a,b<sup>161,162</sup>) estudia la distribución de la taurina en el N.O. humano, y al sospechar por su patrón de inmunorreactividad que éste podría tener un origen astrogliar, lo compara con el que presenta la PGFA.

Las prolongaciones astrocitarias en el manto glial y en los septos presentaban inmunorreactividad PGFA(+)/taurina(+); mientras que, las regiones nucleares de los astrocitos eran PGFA(-)/taurina(+); confirmando el origen astrocitario de la expresión de taurina. La inmunoreacción PGFA es más fibrilar comparada con la

más difusa de la taurina.

Gracias a la fuerte reacción frente al anti-PGFA, esta autora describe como el manto periférico de Greef está constituido por astrocitos y sus prolongaciones que separan la periferia del nervio de las meninges externas. Además observa una compleja malla de prolongaciones PGFA(+) que se disponen entre los haces nerviosos y que derivan de astrocitos fibrosos.

## **1.4.- PAPEL FUNCIONAL DE LOS ASTROCITOS EN EL NERVIÓ ÓPTICO**

Los estudios realizados durante los últimos años han demostrado que el funcionamiento global del S.N.C. es el resultado de una colaboración, estrecha y permanente, entre las neuronas y los astrocitos.

Estos trabajos han permitido reconocer la importancia funcional de la célula astrogliar, que ha pasado de ser una mera célula de soporte con una función pasiva estructural, a ser una célula que desempeña misiones fundamentales en la fisiología normal del S.N.C., así como en su desarrollo y en los procesos patológicos, al estar implicadas en: la regulación del metabolismo neuronal, el mantenimiento del equilibrio iónico, la inducción de la barrera hemato-encefálica, los procesos de cicatrización, etc. (KIMELBERG, 1989<sup>151</sup>; DYAN, 1991<sup>70</sup>).

Por otra parte, el N.O. reúne una serie de propiedades que le hacen ser un tejido idóneo para el estudio de muchas de estas funciones astrogliales. Entre estas características podemos citar: la ausencia de cuerpos neuronales, así como presentar una zona anterior a la lámina cribosa sólo con astrocitos, y una zona posterior a la lámina con los tres tipos de células gliales (astroglia, oligodendroglia, y microglia [SKOFF, 1986<sup>311</sup>; RAYNAUD, 1992<sup>283</sup>]).

#### **1.4.1.- LOS ASTROCITOS EN LOS PROCESOS DE MIELINIZACIÓN DEL NERVIO ÓPTICO: FUNCIÓN DE LAS PROLONGACIONES ASTROGLIALES PERINODALES.**

La mielinización de los axones del N.O. corre a cargo de los oligodendrocitos. Estudios a microscopía electrónica, con técnicas inmunohistoquímicas, así como con inyección de colorantes intracelulares (amarillo lucifer, peroxidasa), han puesto de manifiesto cómo un único oligodendrocito puede llegar a mielinizar hasta 20-30 axones al poseer 20-30 largas prolongaciones de 150-200  $\mu\text{m}$ . de longitud que partiendo del cuerpo celular se disponen paralelas al eje del nervio envolviendo a los axones (PETERS, 1960, 1964<sup>227,228</sup>; BUTT, 1989<sup>32</sup>; RANSOM, 1991<sup>280</sup>).

Sin embargo, en la actualidad se ha demostrado que los astrocitos juegan un papel importante, por un lado, en los procesos de mielinización al intervenir en la regulación de la diferenciación de los oligodendrocitos (RAFF, 1989<sup>263</sup>; GOLDMAN, 1992<sup>100</sup>); y por otro en la formación y mantenimiento de una parte de la vaina mielínica como es el nodo de Ranvier (HIDELBRAND, 1984, 1993<sup>128,129</sup>; RAINE, 1984<sup>264</sup>; FRENCH-CONSTANT, 1986b,c<sup>77,78</sup>), contribuyendo por tanto a la transmisión del impulso nervioso.

Los trabajos realizados fundamentalmente en cultivos de N.O. de rata han demostrado la existencia de tres tipos de células macrogliales: los astrocitos tipo-1, los astrocitos tipo-2, y los oligodendrocitos (RAFF, 1983a, 1984a, b<sup>255,258,259</sup>). Estas células proceden de dos estirpes diferentes, por un lado, de la célula precursora A-1 que da lugar a los astrocitos tipo-1; y por otro, de la célula precursora O-2A, que origina los astrocitos tipo-2 y los oligodendrocitos (RAFF, 1983a, b<sup>255,256</sup> MILLER, 1985<sup>193</sup>).

La diferenciación de la célula O-2A en astrocito u oligodendrocito viene determinada por la influencia de una serie de factores. Así, la secreción del factor neurotrófico ciliar (CNFT) por parte de los astrocitos tipo-1 produce la proliferación de las células O-2A y su diferenciación en astrocitos tipo-2 (NOBLE, 1984<sup>211</sup>; RAFF, 1985<sup>260</sup>; FRENCH-CONSTANT, 1986a<sup>76</sup>; ANDERSON, 1989<sup>9</sup>); mientras que, la presencia del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), secretado también por los astrocitos tipo-1, produce la diferenciación de las células O-2A en oligodendrocitos (RAFF, 1988, 1989<sup>262,263</sup>; ANDERSON, 1989<sup>9</sup>; WOLSWIJK, 1989, 1991<sup>363,364</sup>; DUTLY, 1991<sup>69</sup>) al existir receptores de PDGF en estas células (HART, 1989a, b<sup>111,112</sup>; PRINGLE, 1989, 1992<sup>233,234</sup>).

Todos estos datos, han llevado a sugerir que el origen común de los astrocitos tipo-2 y los oligodendrocitos a partir del progenitor celular O-2A se podría

explicar al estar ambos tipos celulares implicados en funciones relacionadas con la mielinización de los axones (RAFF, 1987, 1989<sup>261,263</sup>; FFRENCH-CONSTANT, 1986b,c<sup>77,78</sup>; MILLER, 1989b<sup>196</sup>): los oligodendrocitos formando las vainas mielínicas; y los astrocitos tipo-2 manteniendo la funcionalidad de los nodos de Ranvier (controlando la  $[K^+]$ , y proviniendo de nutrientes al axón nodal), así como manteniendo la estructura del nodo.

Los nodos de Ranvier son funcionalmente las partes más importantes del axón mielinizado, ya que la propagación de los potenciales de acción tiene lugar mediante saltos de nodo a nodo, al ser éstos las zonas donde la vaina de mielina se interrumpe. Este tipo de propagación produce un incremento en la velocidad y eficacia de la conducción nerviosa (WAXMAN, 1985<sup>351</sup>).

En el S.N.C. los astrocitos contribuyen a la estructura de los nodos al extender finas prolongaciones que rodean a la membrana plasmática axonal que queda expuesta sin vaina mielínica (RAINE, 1984<sup>264</sup>; WAXMAN, 1986<sup>352</sup>; HIDELBRAND, 1993<sup>129</sup>), demostrándose también la existencia de estas prolongaciones perinodales en el N.O. de la rata, tanto con microscopía electrónica (HIDELBRAND, 1984<sup>128</sup>; WAXMAN, 1984<sup>350</sup>), como con inmunohistoquímica (FFRENCH-CONSTANT, 1986b,c<sup>77,78</sup>; MILLER, 1989b<sup>196</sup>).

En secciones de N.O. de rata, FFRENCH-CONSTANT y col. (1986c<sup>78</sup>) han

marcado perfectamente prolongaciones astrogliales perinodales (FFRENCH-CONSTANT, 1986c<sup>78</sup>) empleando anticuerpos contra: la glucoproteína J-1 que se concentra sobre y alrededor de las zonas perinodales, así como con los anticuerpos monoclonales HNK-1 y L-2, que reconocen moléculas de carbohidratos presentes en estas prolongaciones (KRUSE, 1985<sup>185</sup>); lo que demuestra que la membrana plasmática de estas prolongaciones esta bioquímicamente especializada.

Existen una serie de evidencias que inducen a pensar que son los astrocitos tipo-2 los responsables de emitir estas prolongaciones perinodales. Así los resultados obtenidos en cultivos indican que los astrocitos tipo-2 aparecen en la segunda semana postnatal un poco antes de que las prolongaciones perinodales sean observadas por primera vez (FFRENCH-CONSTANT, 1986c<sup>78</sup>); además dobles inmunotinciones PGFA(+), NSP-4(+) (anticuerpo que reacciona contra glucoproteínas del tipo J-1) se incrementan en los días postnatales 21 a 28, fechas en las que está aumentando el número de astrocitos tipo-2 (MILLER, 1985<sup>193</sup>). También en secciones de N.O., con impregnaciones de Golgi e inyección intracelular de peroxidasa (MILLER, 1989b<sup>196</sup>) se ha encontrado la existencia de dos astrocitos morfológicamente distintos, uno de los cuales presentan prolongaciones paralelas a los axones y terminaciones nodales, y que por su tiempo de aparición (se tiñen a partir de los 10 días postnatales) se podrían

corresponder con los astrocitos tipo-2. Datos que parecen apoyar la idea inicial de que las prolongaciones perinodales derivan más de los astrocitos tipo-2 que de los astrocitos tipo-1.

Por lo tanto, la íntima asociación entre las prolongaciones astrogliales perinodales y la membrana axonal nodal, sugiere que los astrocitos juegan un importante papel en la fisiología nodal, creando las condiciones necesarias para la regeneración de los potenciales de acción (BERWALD-NETTER, 1986<sup>20</sup>). Para esclarecer este papel, han sido decisivos los trabajos de los últimos años en los que se han localizado altas densidades de canales de  $\text{Na}^+$  en los nodos de Ranvier y en las prolongaciones perinodales (BLACK, 1989a,b<sup>24,25</sup>; MINTURN, 1990<sup>201</sup>), empleando el anticuerpo monoclonal 7493 que reacciona específicamente contra los canales de  $\text{Na}^+$  purificados del cerebro de rata adulta (BLACK, 1989a<sup>24</sup>).

El que la inmunotinción 7493(+) esté presente tanto en el interior del citoplasma astrocitario como en regiones de la membrana plasmática de la prolongación perinodal (BLACK, 1989a,b<sup>24,25</sup>) ha permitido postular que:

- Los astrocitos son un sitio extraneuronal para la síntesis de canales iónicos, que se transfieren posteriormente a la membrana axonal del nodo de Ranvier (GRAY, 1985<sup>105</sup>); lo cual es posible ya que anteriormente se ha demostrado que pueden existir transferencias de moléculas protéicas

entre las células gliales y los axones que envuelven (KRIEGLER, 1981<sup>157</sup>);

- Alternativamente, los canales de  $\text{Na}^+$  de los astrocitos perinodales están implicados en la homeostasis iónica del espacio extracelular perinodal (BLACK, 1989a<sup>24</sup>). La actividad eléctrica en los nodos incrementa la  $[\text{K}^+]$  del espacio perinodal provocando la despolarización de la célula glial (KONNERTH, 1988<sup>154</sup>), pudiendo activarse los canales de  $\text{Na}^+$  en estas condiciones, produciéndose un potencial de acción que genera una señal que regularía la actividad de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATP}_{\text{asa}}$  (al igual que se ha demostrado sucede en el músculo esquelético [WOLITZKY, 1986<sup>362</sup>]). Además, en favor de esta idea, se ha demostrado que las prolongaciones perinodales exhiben inmunoreactividad cuando se las expone a anticuerpos contra  $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATP}_{\text{asa}}$  (ARIYASU, 1985<sup>18</sup>), así como una alta actividad  $\text{ATP}_{\text{asa}}$  en los astrocitos del N.O. (LESSELL, 1972, 1977<sup>166,167</sup>). Por lo tanto, el tamponamiento iónico del espacio perinodal es dependiente de la actividad eléctrica del nodo.
- Por último, también se ha sugerido que los astrocitos juegan un papel importante en la renovación de los canales iónicos de las membranas axonales nodales, al encontrarse en su citoplasma productos de degradación de dichos canales (BLACK, 1989a<sup>24</sup>).

Relacionado con los canales de  $\text{Na}^+$ , hay una última prueba en favor de los astrocitos tipo-2 como las células que emiten las prolongaciones perinodales. Se ha demostrado que existen diferencias funcionales entre los canales de  $\text{Na}^+$ , de tal forma que existe un tipo de canal exclusivo de las células gliales, y otro presente en las células neuronales (BARRES, 1989<sup>19</sup>; SONTHEIMER, 1991<sup>314</sup>). Mientras que los astrocitos tipo-1 sólo expresan la forma glial del canal de  $\text{Na}^+$  (BLACK, 1989b<sup>25</sup>; MINTURN, 1990<sup>201</sup>), los cultivos de astrocitos tipo-2 presentan las dos formas, predominando en un 85% la neuronal (BARRES, 1989<sup>19</sup>; MINTURN, 1990<sup>201</sup>); lo que parece ser lógico si tenemos en cuenta que se supone que estos astrocitos son los encargados de sintetizar los canales de  $\text{Na}^+$  que posteriormente se transfieren a los axones neuronales a nivel de los nodos de Ranvier.

Por último, sin embargo, debemos señalar que la división de funciones entre los astrocitos, que implica que los astrocitos tipo-2, como hemos estado viendo, se especializan al servicio de los nodos de Ranvier, mientras que los astrocitos tipo-1 son los encargados de formar las limitantes gliales y las membranas perivasculares que envuelven los vasos sanguíneos (MILLER, 1989a<sup>195</sup>; RAFF, 1989<sup>263</sup>), no es tan estricta como se asumió en un principio ya que SUÁREZ y RAFF (1989<sup>325</sup>) han demostrado con microscopía electrónica, cómo los astrocitos subpiales y los perivasculares (considerados presumiblemente como los astrocitos

tipo-1 de cultivo), pueden en ocasiones emitir prolongaciones que terminan en contacto con los nodos de Ranvier, es decir, también estos astrocitos pueden presentar prolongaciones perinodales.

#### **1.4.2.- PARTICIPACIÓN DE LOS ASTROCITOS EN LA FORMACIÓN DE CICATRICES GLIALES Y REPARACIÓN DEL NERVIÓ OPTICO.**

Cuando tiene lugar una lesión a nivel del S.N.C., hay una degeneración tanto de los cuerpos neuronales como de las prolongaciones axónicas, produciéndose como consecuencia una gliosis, es decir, un incremento del número de células neuronales (PERRY, 1993<sup>226</sup>). Los astrocitos van a reaccionar ante este daño mediante proliferación e hipertrofia celular (LINDSAY, 1986<sup>177</sup>),

En el N.O., estas alteraciones se han estudiado fundamentalmente en relación con los procesos desencadenados por una degeneración Walleriana (VAUGHN, 1970a,b<sup>343,344</sup>; COOK, 1973b<sup>50</sup>; SKOFF, 1975<sup>307</sup>; DAHL, 1981a,b<sup>57,58</sup>; CARROL, 1987<sup>42</sup>; CARBONELL, 1991<sup>41</sup>). Experimentalmente, al seccionar los axones, se produce la degeneración de los segmentos distales que se van a

encontrar aislados del soma neuronal: el axón degenera así como su vaina de mielina (PERRY, 1993<sup>226</sup>).

Como consecuencia de esta agresión, se van a producir una serie de modificaciones en los astrocitos, que van a tender a rellenar los espacios vacíos dejados por las fibras nerviosas degeneradas. Estas células, denominadas "astrocitos reactivos" (AL-ALI, 1982<sup>5</sup>) van a presentar una serie de cambios morfológicos, fisiológicos y metabólicos, sin que se conozca en la actualidad los factores que inducen a que estos astrocitos se vuelvan reactivos (TRIMMER, 1990<sup>333</sup>), aunque se ha postulado que la función de ciertos canales iónicos en las células gliales podrían estar relacionada con la inducción de la proliferación glial (PURO, 1990<sup>236</sup>), e incluso, que esta proliferación se debería a una serie de factores liberados por la microglia (GIULIAN, 1985<sup>98</sup>).

Entre los cambios morfológicos que se producen, se ha destacado: el incremento en el tamaño celular (tanto del citoplasma perinuclear como de las prolongaciones); la presencia de un núcleo grande e irregular con un nucléolo prominente; así como la abundancia en el citoplasma de lisosomas, aparato de Golgi, retículo endoplásmico rugoso y numerosos microtúbulos. (VAUGHN, 1970a,b<sup>342,343</sup>; SKOFF, 1975<sup>307</sup>).

Asimismo, se ha demostrado que existe un incremento en el contenido de los

filamentos intermedios del citoplasma de estos astrocitos reactivos, tanto de la vimentina como de la proteína GFA (DAHL, 1981a,b<sup>57,58</sup>).

Además, también se han observado cambios en la disposición de las partículas intermembranas ortogonales (ANDERS, 1979<sup>8</sup>; WUJEK, 1984<sup>367</sup>), y un incremento en el contenido de enzimas oxidativas (AL-ALI, 1982<sup>5</sup>).

Una vez que los astrocitos se han vuelto reactivos, se produce su proliferación para constituir la cicatriz glial (SKOFF, 1971,1975<sup>306,307</sup>), considerándose en la actualidad, tras la distinción en astrocitos tipo-1 y astrocitos tipo-2 realizada por el equipo de Raff y Miller (RAFF, 1983b,1987,1989<sup>256,261,263</sup>; MILLER, 1989a<sup>195</sup>), que son los astrocitos tipo-1 los encargados de formar la cicatriz glial (MILLER, 1986<sup>194</sup>).

Aparte de su implicación directa en la formación de la cicatriz glial, los astrocitos ayudan a la eliminación de los restos que se están produciendo como consecuencia de la degeneración axonal, realizando por tanto también funciones fagocíticas (VAUGHN, 1970b<sup>344</sup>; COOK, 1973b<sup>50</sup>; SKOFF, 1975<sup>307</sup>; FULCRAND, 1977<sup>85</sup>).

Este papel fagocítico ha sido apoyado por los resultados de los trabajos de TERR (1983<sup>329</sup>) quien encuentra inclusiones en el citoplasma astrocitario con una

alta actividad de peroxidasa endogena, enzima característica de los procesos de fagocitosis; demostrándose, en cultivos, como además, los astrocitos pueden presentar una alta actividad de las hidrolasas lisosomales  $\beta$ -glucosidasa y  $\beta$ -galactosidasa (HOF, 1985<sup>132</sup>). Por último, CARROLL (1987<sup>42</sup>), indica cómo los astrocitos reactivos PGFA(+) poseen inmunorreactividad positiva además para el anticuerpo contra los galactocerebrósidos (GC), que es un marcador propio de los oligodendrocitos, por lo que estos autores postulan que la presencia de GC en los astrocitos se debe a que estas células están fagocitando restos de las vainas miélicas.

Sin embargo, CARBONELL (1991<sup>41</sup>), pone en duda este papel de los astrocitos en los procesos degenerativos, al considerar que la fagocitosis que realizan estas células no es tan importante como se había señalado, estando implicados únicamente en el metabolismo de algunos productos resultantes de la degeneración del tejido.

La formación de las cicatrices gliales y la presencia de los astrocitos reactivos, ha sido considerada como uno de los factores limitantes de la regeneración del S.N.C. (TRIMMER, 1990<sup>333</sup>), ya que van a formar una barrera física que se interpone impidiendo el crecimiento de los axones (REIER, 1986<sup>286</sup>).

Sin embargo, se ha demostrado que en peces y anfibios, los axones del S.N.C.

y S.N.P. vuelven a crecer tras una lesión, teniendo, por tanto, los vertebrados inferiores una alta capacidad de regeneración (SPERRY, 1944<sup>317</sup>; GAZE, 1960<sup>90</sup>; BLAUGRUND, 1990<sup>26</sup>), comparada con la limitada capacidad regenerativa del S.N.C. de los mamíferos (RICHARDSON, 1982<sup>288</sup>; ALLCUT, 1984<sup>6</sup>); lo que explica que la mayoría de los trabajos sobre la regeneración del N.O. se hayan realizado en vertebrados inferiores.

El crecimiento axonal observado en peces, puede ser debido a que estos animales presentan un continuo incremento en el número de células ganglionares así como un crecimiento del techo óptico durante toda la vida, que hace que los terminales de los axones cambien continuamente su posición para mantener las proyecciones retinotálamicas (RAYMOND, 1983<sup>282</sup>); pudiendo ser las especializaciones funcionales y los requerimientos de plasticidad, que esta situación necesita, los que expliquen esta capacidad regenerativa (QUITSCHKE, 1985a,b<sup>245,246</sup>).

Por el contrario, en los mamíferos la baja capacidad regenerativa del S.N.C. se ha atribuido, como ya dijimos, a las características de sus células gliales (GIFTOCHRISTOS, 1988a,b<sup>95,96</sup>), que van a presentar una serie de diferencias con respecto a las células gliales de los vertebrados inferiores, que asimismo podrían explicar la mayor capacidad regenerativa de estos animales.

Estas características diferenciales son:

- la ausencia de partículas ortogonales en los astrocitos de los peces (WOLBURG, 1984<sup>359</sup>) y anuros (WUJEK, 1984<sup>367</sup>)
- la expresión de laminina (molécula que soporta el crecimiento axonal "in vitro" (MANTHORPE, 1983<sup>184</sup>) en los astrocitos maduros, mientras que los del S.N.C. de los mamíferos la expresan mayoritariamente en las células inmaduras (LIESI, 1985, 1988<sup>173,174</sup>).
- la expresión de proteínas de filamentos intermedios distintas a las de los astrocitos de los vertebrados (QUITSCHKE, 1985a,b<sup>245,246</sup>; JONES, 1986<sup>146</sup>; RUNGGER-BRÄNDLE, 1989<sup>294</sup>; GIORDANO, 1990<sup>97</sup>).

Es sin duda este último punto, la composición del citoesqueleto, en el que más se diferencian las células gliales de peces, anfibios y reptiles, con respecto a las del N.O. de mamíferos. En un primer momento QUITSCHKE y col. (QUITSCHKE, 1985a,b<sup>245,246</sup>; JONES, 1986<sup>146</sup>) determinaron la existencia de cuatro proteínas predominantes en los filamentos de N.O. del pez dorado, a las que denominaron ON<sub>1</sub>-ON<sub>4</sub>. Las ON<sub>1</sub>-ON<sub>2</sub> eran de origen neuronal, mientras que las ON<sub>3</sub>-ON<sub>4</sub> serían nuevas proteínas de filamentos intermedios gliales, distintas de la proteína GFA y de la vimentina de los mamíferos, pero con sus características funcionales y estructurales. Posteriormente se descubrió que la mayor parte de las proteínas de los filamentos intermedios eran de origen

citoqueratinoso (RUNGGER-BRÄNDLE, 1989<sup>294</sup>), para finalmente identificar a la ON<sub>3</sub> como equivalente a la proteína queratina-8 (tipo II) (GIORDANO, 1990<sup>97</sup>). La presencia de esta proteína en las células gliales del N.O. se explicaría ya que estas células necesitan proteínas estructurales que ayuden a mantener el crecimiento, plasticidad y capacidad regenerativa.

Estudios empleando anti-PGFA, han demostrado que existe una heterogeneidad en los astrocitos del pez con respecto a esta proteína, ya que hay inmunoreactividad PGFA(+) en la vía óptica a partir del quiasma (LEVINE, 1989<sup>168</sup>; NONA, 1989<sup>212</sup>) así como en la médula espinal (DAHL, 1985<sup>59</sup>; BODEGA, 1993<sup>30</sup>); mientras que, el N.O. es PGFA(-) y sólo expresa PGFA tras ser lesionado (STAFFORD, 1990<sup>318</sup>; BLAUGRUND, 1991<sup>27</sup>). Esta inmunoreactividad del N.O. tras la lesión, podría indicar la aparición transitoria de astrocitos reactivos localizados en las proximidades del sitio lesionado, ya que al poco tiempo desaparece la reactividad y se produce la regeneración del tejido (STAFFORD, 1990<sup>318</sup>).

No obstante, en la actualidad se ha dado un nuevo impulso al estudio de la regeneración del S.N.C. de mamíferos al ponerse de manifiesto la existencia de una serie de factores de crecimiento que son secretados por los astrocitos o sus precursores celulares, y que ayudan al crecimiento y diferenciación axonal

(THANOS, 1990<sup>331</sup>). Entre estos factores podemos señalar: el factor de crecimiento neuronal (VACA, 1992<sup>339</sup>), así como la laminina y la fibronectina (constituyentes de la matriz extracelular que favorecen y aceleran el crecimiento axonal) (LIESI, 1988<sup>174</sup>). Sin embargo, por el contrario, parece ser que los oligodendrocitos secretan factores que inhiben el crecimiento axonal, y que por lo tanto sólo se producirían en el S.N.C., estando ausentes en el S.N.P. (SCHWAB, 1989<sup>300</sup>; BLAUGRUND, 1992<sup>28</sup>).

Esto ha llevado a la realización de injertos de S.N.P. en N.O. lesionados, observándose que se produce un recrecimiento de los axones de las células ganglionares a través del segmento nervioso periférico (AGUAYO, 1985, 1986<sup>3,4</sup>; SO, 1985<sup>313</sup>; CIVELTI, 1990<sup>43</sup>). Este crecimiento se ha demostrado inmunohistoquímicamente mediante anticuerpos contra neurofilamentos, describiéndose como existe una tinción continua entre el muñón del N.O. y el segmento de tejido periférico injertado, al igual que un incremento en la tinción de las células ganglionares retinianas (VILLEGAS-PÉREZ, 1986, 1988<sup>347,348</sup>; VIDAL-SANZ, 1987<sup>346</sup>); pudiendo los axones regenerados formar sinapsis a nivel central que son sensibles a los cambios de luz y oscuridad que se producen al iluminar la retina (AGUAYO, 1986<sup>4</sup>). Esta capacidad regenerativa de los axones de las células ganglionares de la retina también ha sido demostrada "in vitro" por

THANOS (1990<sup>331</sup>) en cultivos de retinas humanas que habían sufrido daño a nivel del N.O.

Por último, se ha observado que los N.O. de rata pueden mantener una capacidad regenerativa considerable, siempre y cuando los daños producidos en el nervio no hayan sido muy severos, manteniéndose la membrana basal de las limitantes gliales y los vasos sanguíneos (MURAKAMI, 1989<sup>208</sup>).

#### **1.4.3.- INTERACCIONES ASTROCITO-NEURONA DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO DEL NERVIO ÓPTICO.**

Los clásicos trabajos de RAKIC (1981<sup>265</sup>) han demostrado que los astrocitos guían a las neuronas durante las etapas del desarrollo, al describir cómo las fibras alargadas de la glia radial sirven para dirigir a las neuronas a sus emplazamientos definitivos en la corteza cerebral y cerebelar.

En un principio se postuló la existencia de moléculas de adhesión del Sistema Nervioso que servirían como mediadores a la hora de orientar a los axones durante el desarrollo embrionario (SIDMAN, 1975<sup>305</sup>), identificándose a la laminina como una de ellas (LIESI, 1985, 1988<sup>173,174</sup>).

Posteriormente se demostró su presencia a lo largo de las fibras radiales gliales que dirigen la migración neuronal (LIESI, 1985<sup>173</sup>), estando implicada también en los procesos de regeneración "in vivo" de los nervios (HOPKINS, 1985<sup>135</sup>).

Durante el desarrollo del N.O., cuando los axones de las células ganglionares atraviesan el pedúnculo óptico, están acompañados por células neurogliales alargadas que constituyen "túneles" que guían su trayecto hacia el cerebro (RHODES, 1982<sup>287</sup>); estas células gliales radiales se transforman en astrocitos maduros cuando se llega al fin de la migración neuronal (RAYNAUD, 1992<sup>283</sup>).

Con respecto a las sustancias extracelulares que ayudan al desarrollo de los axones, los trabajos de LIESI (1988<sup>174</sup>) han evidenciado como aparecen depósitos de laminina sobre las células gliales inmaduras precediendo a la entrada de los primeros axones dentro del N.O., y cómo estos depósitos permanecen en estrecha asociación con los conos de crecimiento de los axones durante su desarrollo, desapareciendo posteriormente cuando el N.O. madura.

#### **1.4.4.- LA FUNCIÓN DE BARRERA DE LOS ASTROCITOS DEL NERVIO ÓPTICO.**

La idea de *barrera hemato-encefálica* se debe en primer lugar a Ehrlich en 1855, pero la concepción de la existencia de un espacio restrictivo al paso de moléculas entre el torrente sanguíneo y el tejido nervioso del cerebro, tiene su origen en los experimentos realizados por Godmann en 1909 (CUNHA-VAZ, 1979<sup>53</sup>).

En un primer momento, la íntima relación entre las células endoteliales de los vasos y las terminaciones en pie de los astrocitos llevaron a especular sobre el posible papel de estas células en la barrera hemato-encefálica, llegando a considerarlos incluso como el "sitio físico" de esta barrera (GERSCHENFELD, 1959<sup>93</sup>). Sin embargo, posteriores estudios demostraron que son las uniones estrechas entre las células endoteliales de los vasos las responsables de las propiedades de la barrera (SHAKIB, 1966<sup>302</sup>; CUNHA-VAZ, 1966, 1979<sup>52,53</sup>; GOLDSTEIN, 1986<sup>102</sup>); atribuyendo, en la actualidad, a los astrocitos un papel "*inductor*" en la formación de barrera (STEWART, 1986<sup>320</sup>; ABBOTT, 1987, 1992<sup>1,2</sup>; RISAU, 1990<sup>289</sup>; DYAN, 1991<sup>70</sup>).

Este papel se ha visto confirmado al comprobarse como células endoteliales

de origen no neural, adquieren propiedades de barrera al ser expuestas a medios con astrocitos, formulándose la hipótesis de que los astrocitos secretan factores solubles que inducen las propiedades específicas de barrera en las células endoteliales vasculares (JANZER, 1987<sup>139</sup>; LOBRINUS, 1992<sup>179</sup>); señalando las últimas evidencias a los astrocitos tipo-1 como las células productoras de estos factores (JANZER, 1993<sup>140</sup>).

En el globo ocular, la existencia de una barrera similar ha sido descrita, tanto en la retina (SHAKIB, 1966<sup>302</sup>; CUNHA-VAZ, 1966<sup>52</sup>), como en el N.O. (RODRÍGUEZ-PERALTA, 1966<sup>290</sup>); lo cual no sorprende ya que ambos tejidos forman parte del S.N.C.

En la retina se ha definido el concepto de "barrera hemato-retiniana", que está formada por un lado, por las uniones estrechas entre las células endoteliales de los capilares retinianos, y por otro, por las uniones existentes entre las caras internas de las células del epitelio pigmentario de la retina (RAVIOLA, 1977<sup>281</sup>; CUNHA-VAZ, 1979<sup>53</sup>). Pero, el hecho de que algunos trazadores (como la fluoresceína sódica, la peroxidasa de rábano, etc.) puedan difundir desde la coroides hacia el N.O. (COHEN, 1973<sup>45</sup>), ha puesto de manifiesto la existencia de pequeños defectos en esta barrera, que se han localizado a nivel del tejido de borde de Elschnig (TSO, 1975<sup>337</sup>).

Sin embargo, el tejido intermediario de Kuhnt previene el paso de estas sustancias desde el N.O. hacia las regiones próximas de la retina, realizando funciones de barrera (RODRÍGUEZ-PERALTA, 1966<sup>290</sup>; TSUKAHARA, 1975<sup>338</sup>). Esta barrera está constituida por las uniones estrechas entre las células astrogliales del tejido de Kuhnt, que se continúan con las uniones estrechas del epitelio pigmentario de la retina y con las zonulas adherentes de la membrana limitante externa de la retina (TSO, 1975<sup>337</sup>; OKINAMI, 1976<sup>215</sup>).

Por lo tanto, estos estudios han demostrado la importante función que realizan los astrocitos que constituyen el tejido de Kuhnt al actuar como una barrera entre el nervio óptico y la retina; aunque en los últimos años, FLAGE (1977, 1980a, b<sup>79-81</sup>) ha indicado la posible existencia de pequeños defectos localizados a nivel de las uniones entre el epitelio pigmentario de la retina y los astrocitos del tejido de Kuhnt.

#### **1.4.5.- IMPLICACIÓN DE LOS ASTROCITOS EN LAS ALTERACIONES ISQUÉMICAS DE LA CABEZA DEL N.O.: NEUROPATÍA OPTICA ISQUÉMICA (N.O.I.) Y GLAUCOMA.**

La patología vascular isquémica, juega un papel primordial en el desarrollo de la degeneración y atrofia de las estructuras de la cabeza del N.O. en diversas

enfermedades oculares. Además de por las diversas causas clínicas que provocan edema del disco óptico y que se reúnen bajo el término de neuropatías ópticas (HAYREH, 1974b<sup>115</sup>; BORREGO, 1992<sup>32</sup>), la vascularización del N.O. puede sufrir fenómenos isquémicos por un mecanismo local como el aumento de la presión intraocular que se produce en el glaucoma (HAYREH, 1978,1987, 1994<sup>116,118,120</sup>; TRIVIÑO, 1984<sup>334</sup>; RAMÍREZ, 1985<sup>269</sup>; GARCÍA-SÁNCHEZ, 1986,1992<sup>88,89</sup>). Por ambos mecanismos se va a ver dificultada la extracción de oxígeno arterial provocándose una hipoxia, de graves consecuencias, ya que el aporte continuo de oxígeno es necesario para salvaguardar la funcionalidad e integridad del S.N.C. (DYAN, 1991<sup>70</sup>).

Como consecuencia de las lesiones isquémicas, múltiples autores han demostrado cómo a nivel del N.O. se va a producir degeneración cavernosa, con disminución del número de fibras nerviosas y sufrimiento axonal por bloqueo del transporte axonal (ZIMMERMAN, 1967<sup>372</sup>; ANDERSON, 1974<sup>16</sup>; QUIGLEY, 1979a,b,1981b,1985<sup>238,239,241,242</sup>; GEIJER, 1979<sup>91</sup>; McLEOD, 1980<sup>189</sup>; RADIUS, 1981b,1982<sup>251,253</sup>; MINCKLER, 1987,1993<sup>199,200</sup>). Sin embargo, es de esperar que el primer nivel de afectación en los tejidos del N.O. se sitúe en las células astrogliales (GOLDMANN, 1959<sup>101</sup>; SHAFFER, 1969a,b<sup>303,304</sup>), ya que son éstas las intermediarias entre el sistema vascular y las neuronas (VIBULSRETH,

1987<sup>345</sup>; KIMELBERG, 1989<sup>151</sup>; DYAN, 1991<sup>70</sup>).

Experimentalmente se ha demostrado cómo tras un proceso isquémico, las células astrogliales sufren un hinchamiento precoz (edema) (KIMELBERG, 1986<sup>150</sup>), produciéndose importantes alteraciones como: aumento del número de células, aumento del volumen nuclear, del retículo endoplásmico y de las mitocondrias, y desaparición de partículas intermembranosas (CUEVAS, 1985<sup>51</sup>; WAXMAN, 1992<sup>353</sup>).

Paralelamente a estas alteraciones morfológicas se encuentran cambios bioquímicos: modificación de las concentraciones extracelulares del  $K^+$ , del ácido láctico, del amonio, de una serie de factores que afectan a los movimientos de electrólitos entre el medio inter e intracelular, así como de los aminoácidos neurotransmisores excitadores (ROTHMAN, 1985<sup>293</sup>; KIMELBERG, 1986<sup>150</sup>; KRAIG, 1990<sup>156</sup>; DYAN, 1991<sup>70</sup>). En este sentido, la inhibición de la entrada de glutamato en el astrocito es un claro indicador de la pérdida de una de las funciones bioquímicas más importantes de la célula astrogliar (HENN, 1974<sup>123</sup>; CURRIE, 1981<sup>54</sup>; DREJER, 1985<sup>67</sup>). Esta ruptura de la ruta bioquímica puede estar ligada a una falta energética en los astrocitos hipóxicos o a una interrupción de la integridad de la membrana celular (KRAIG, 1990<sup>156</sup>). La consecuencia de

este defecto en la recogida del glutamato por parte de los astrocitos produce su acumulación en el medio extracelular y la muerte de las neuronas receptoras de este mediador debido a los efectos excito-tóxicos de este aminoácido (JORGENSEN, 1982<sup>147</sup>).

Además, como ya hemos señalado anteriormente, la alteración de los mecanismos de transporte en la membrana del astrocito edematoso, provoca que aumente en el espacio extracelular las concentraciones de  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}^+$ , al no poder ser retirados por estas células (HANSEN, 1985<sup>110</sup>). El incremento de los niveles de  $\text{CO}_2$  tiene una acción negativa, por un lado, al abolir el acoplamiento célula-célula que exhiben los astrocitos (CONNORS, 1984<sup>48</sup>), y por otro, al favorecer el edema de las prolongaciones perivasculares (MATAKAS, 1978<sup>188</sup>; PALJARVI, 1983<sup>221</sup>). Este edema perivascular puede producir el estrechamiento del diámetro de la luz capilar, pero aunque no llegue en ningún caso a producir su obliteración (MATAKAS, 1978<sup>188</sup>), sí que aumenta la resistencia capilar a la circulación vascular, en adición a la disminución del flujo vascular que tiene ya de por sí una situación isquémica (KLATZO, 1980<sup>153</sup>). Por otra parte, al ser los astrocitos las células que inducen la formación de las uniones entre las células endoteliales (ABBOTT, 1987<sup>1</sup>; JANZER, 1987<sup>139</sup>), el edema de las prolongaciones perivasculares puede generar la ruptura de la barrera hemato-encefálica (PETITO,

1982<sup>230</sup>) lo que explicaría el por qué se observa un edema vasogénico después de que se produzca edema astrocitario (KLATZO, 1980<sup>153</sup>).

A nivel ocular, como consecuencia de la patología vascular, también se producirían todas estas alteraciones en las funciones astrogiales.

Tras la provocación experimental de una N.O.I. con edema del disco óptico, mediante diversos métodos como pueden ser la sección o cauterización vascular (LEVY 1976<sup>171</sup>; KORTE, 1986<sup>155</sup>) o el empleo de microesférulas (TRIVIÑO, 1985<sup>335</sup>; RAMÍREZ, 1991<sup>273</sup>), se ha observado como inicialmente se produce un edema astrocitario (ISAYAMA, 1983<sup>137</sup>; RAMÍREZ, 1991<sup>273</sup>; BORREGO, 1992<sup>32</sup>), seguido de desestructuración y pérdida de las células astrogiales en los estadios subagudos (ISAYAMA, 1983<sup>137</sup>; KISHI, 1985<sup>152</sup>), para producirse finalmente en los estadios crónicos cicatriciales una gliosis con proliferación astrogial (ZIMMERMANN, 1956<sup>371</sup>; HENKIND, 1970<sup>122</sup>; LEVY, 1976<sup>171</sup>; ISAYAMA, 1983<sup>137</sup>; RAMÍREZ, 1991<sup>273</sup>, TRIVIÑO, en prensa<sup>336</sup>).

Además también se ha observado cómo son los astrocitos próximos a los vasos afectados los que primeramente muestran mayor sufrimiento, coincidiendo con las zonas donde se producen alteraciones axonales precoces (BORREGO, 1992<sup>32</sup>); e incluso, puede existir pérdida de células astrocitarias en las zonas necróticas (ROOTMAN, 1980<sup>291</sup>; ISAYAMA, 1983<sup>137</sup>; TRIVIÑO, en prensa<sup>336</sup>).

Con respecto al glaucoma, las hipótesis tradicionales sobre las causas de los cambios glaucomatosos de la cabeza del N.O. incluyen (HAYREH, 1978,1987, 1994<sup>116,118,120</sup>; GARCÍA-SÁNCHEZ, 1979<sup>87</sup>; QUIGLEY, 1985<sup>242</sup>), además de los cambios degenerativos por disminución de la perfusión vascular, alteraciones mecánicas producidas por la compresión de los tejidos.

Dentro del papel que las células astrogiales desempeñan tras el daño glaucomatoso por la isquemia, en el desarrollo de la excavación del disco óptico se ha podido comprobar que las fibras nerviosas desaparecen, así como algunos de los astrocitos de la región prelaminar (SHAFFER, 1969a,b<sup>303,304</sup>) teniendo lugar una desorganización de las células astrocitarias que permanecen como consecuencia de la ocupación de los espacios degenerados (RADIUS, 1979a,1984<sup>247,254</sup>; RAMÍREZ, 1986<sup>270</sup>), produciéndose finalmente una hiperplasia glial (MINCKLER, 1982<sup>198</sup>; FURUTA, 1988<sup>86</sup>; OGDEN, 1988<sup>214</sup>).

La hiperplasia podría explicarse si en esta situación extrapolamos los datos obtenidos en cultivos de N.O. de rata que demuestran como los astrocitos tipo-1 secretan PDGF, CNFT y FGF, factores que estimulan la proliferación de las células precursoras O-2A y su diferenciación en oligodendrocitos y astrocitos tipo-2 (LILLIEN, 1988<sup>175</sup>; RAFF, 1988,1989<sup>262,263</sup>; BOGLER, 1990<sup>31</sup>; CHAN, 1990<sup>55</sup>), de tal forma, que esta hiperplasia glial podría estar regulada por la secreción de estas sustancias. Esta cicatriz glial impide, como efecto secundario,

la posible regeneración de los axones afectados (REIER, 1986<sup>286</sup>; TRIMMER, 1990<sup>333</sup>), por lo que la reversibilidad de la excavación observada ocasionalmente en algunos casos clínicos, se debería a la proliferación y regeneración de astrocitos y a un aumento del volumen intravascular asociado a la mejoría del flujo sanguíneo (NEUMANN, 1973<sup>210</sup>; SPAETH, 1978,1994<sup>315,316</sup>; KATZ, 1989<sup>148</sup>).

También, hay que tener en cuenta que en la lámina cribosa afectada por glaucoma se produce una remodelación de la matriz extracelular (TENGROTH, 1984<sup>327</sup>; FUKUCHI, 1992<sup>84</sup>; ZEIMER, 1992<sup>369</sup>). Se ha comprobado como células de la lámina cribosa humana cultivadas a presión sintetizan y liberan colágeno tipo I (HERNANDEZ, 1988,1991<sup>124,127</sup>; YANG, 1993<sup>368</sup>), lo que coincide con los cambios que se observan en las láminas cribosas durante los procesos de envejecimiento (HERNANDEZ, 1989<sup>125</sup>). A nivel funcional este aumento en la cantidad de una forma más rígida de colágeno, junto a los cambios observados en la elastina (QUIGLEY, 1991a,b<sup>243,244</sup>; FUKUCHI, 1992<sup>84</sup>), puede dar lugar a placas cribiformes menos flexibles en el nervio, contribuyendo por tanto también en los procesos glaucomatosos de la cabeza del N.O. (HERNANDEZ, 1989<sup>125</sup>).

Además hay que tener en cuenta que en los N.O. glaucomatosos, en la lámina cribosa se produce igualmente una proliferación glial, lo que parece demostrarse también por el incremento del colágeno tipo IV, constituyente de las membranas basales de los vasos y astrocitos (HERNANDEZ, 1990<sup>126</sup>; MORRISON, 1990<sup>206</sup>;

FUKUCHI, 1992<sup>84</sup>). Esta remodelación de los componentes de la matriz extracelular, puede también impedir el recrecimiento axónico en los nervios afectados..

Por último en las últimas fases del glaucoma, esta matriz extracelular, sintetizada por los astrocitos, puede elevar artificialmente la presión intraaxonal conduciendo al cese de las funciones nerviosas normales (QUIGLEY, 1979b<sup>239</sup>).

## **2.- JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS**

## **2.- JUSTIFICACIÓN E HIPOTESIS.**

El nervio óptico es una proyección de la sustancia blanca del cerebro, encargada de conducir hacia el cerebro la información obtenida en la retina. Está constituido fundamentalmente por los axones de las células ganglionares retinianas, por células gliales, así como por una importante y compleja red vascular.

Dentro de las células gliales, los astrocitos, van a tener un gran papel en el funcionamiento del N.O., ya que van a realizar una gran variedad de funciones indispensables para la supervivencia axonal, entre las que destacan: el mantenimiento del equilibrio iónico, la regulación del metabolismo neuronal, la inducción de la barrera hemato-nervio óptico, así como su implicación en los procesos de cicatrización y reparación del nervio.

Los estudios sobre los astrocitos del N.O. han sido realizados fundamentalmente en animales de experimentación, centrándose la mayoría de ellos en intentar aclarar el origen y características de las distintas estirpes macrogliales.

En el hombre, los primeros trabajos morfológicos fueron realizados mediante el empleo de las impregnaciones argénticas, demostrándose con estas técnicas una gran variedad de tipos morfológicos astrogliales, sin que se llegase a un acuerdo por los diferentes autores. Son, sin embargo, los trabajos realizados a nivel ultraestructural, los más importantes de los efectuados hasta la fecha y los que han servido para establecer las bases fundamentales del conocimiento actual sobre la astroglia del N.O.

Por contra, los trabajos realizados empleando las técnicas inmunohistoquímicas, y en concreto usando el anticuerpo contra la proteína gliofibrilar ácida (PGFA), que permite el marcaje selectivo de estas células, son muy escasos. Además, éstos están enfocados en el estudio de las variaciones de los astrocitos durante el desarrollo del nervio, siendo mínimos los puramente morfológicos que además se centran sólo en el estudio de una de las regiones del N.O.: la lámina cribosa.

Esta escasez de trabajos no concuerda sin embargo con la importancia de la citoarquitectura del N.O. humano y su implicación en diversas patologías entre las que cabe destacar las patologías vasculares de origen isquémico, como las neuropatías ópticas isquémicas y el glaucoma.

En estas patologías isquémicas, los astrocitos van a jugar un papel primordial,

ya que al ser los intermediarios entre el sistema vascular y las neuronas, ante un proceso isquémico son las primeras células afectadas. Estas células van a sufrir un edema que va a desencadenar una serie de alteraciones, tanto morfológicas como bioquímicas, que van a provocar la muerte neuronal. Los astrocitos entonces formarán cicatrices gliales, rellenando los espacios dejados por los axones degenerados, que van a impedir en un principio la regeneración de los axones afectados.

Por tanto, debido a la escasez de estudios morfológicos inmunohistoquímicos sobre los astrocitos del N.O. humano, y dada la importancia funcional que estas células van a tener en las distintas patologías del N.O., pretendemos realizar un estudio inmunohistoquímico, utilizando el anti-PGFA como marcador astrogial, para determinar con exactitud la morfología de los astrocitos en las diferentes regiones de la cabeza del N.O., así como su distribución.

Además utilizaremos el apoyo de la microscopía electrónica para determinar los rasgos ultraestructurales de estas células así como las diversas relaciones que mantienen con otras estructuras del nervio, como los axones, los vasos sanguíneos y los tabiques conectivos.

Creemos que el conocimiento del patrón normal de distribución y morfología

de las células astrogiales del N.O. humano normal, es fundamental para poder establecer las oportunas comparaciones con los nervios afectados por patologías vasculares en los que el componente isquémico juega un papel importante, intentando aportar nuevos datos que contribuyan a aclarar los procesos que rigen los cambios degenerativos que tienen lugar en estas enfermedades.

### **3.- MATERIAL Y MÉTODOS**

### **3.- MATERIAL Y MÉTODOS.**

#### **3.1.- CASUÍSTICA.**

Para la realización de este estudio hemos empleado 45 ojos humanos enucleados por personal del Banco Español de Ojos con el fin de obtener sus córneas para que posteriormente pudiesen ser utilizadas en la realización de trasplantes.

Las edades de los donantes estaban comprendidas entre los 20 y los 60 años; habiéndose eliminado previamente todos aquellos ojos que presentaban algún tipo de patología que pudiese afectar la morfología normal del nervio óptico.

Del total de los globos oculares, 42 fueron empleados para su estudio a microscopía óptica mediante técnicas inmunohistoquímica, mientras que los 3 restantes se procesaron para su estudio ultraestructural con microscopía electrónica.

Los ojos usados en microscopía óptica se procesaron de la siguiente manera:

- 22 para cortes por congelación:
  - \* 8 seccionados en un plano transversal
  - \* 14 seccionados en un plano longitudinal
- 20 para cortes en parafina:
  - \* 10 seccionados transversalmente
  - \* 10 seccionados longitudinalmente

## **3.2.- DESCRIPCIÓN DE LAS TÉCNICAS EMPLEADAS EN MICROSCOPIA ÓPTICA.**

### **3.2.1.- FIJACIÓN Y OBTENCIÓN DEL TEJIDO.**

La extracción del globo ocular se llevó a cabo de 2 a 4 horas después del fallecimiento, manteniéndose en frío (4°C), durante 1-3 horas hasta que se realizó el tallado corneal. Una vez retirada la córnea, los ojos fueron inmediatamente fijados por inmersión en: paraformaldehído al 4% en tampón fosfato (0,1M) a pH 7,4, manteniéndose en el líquido fijador a 4°C durante 4-8 horas.

Antes de proceder a su inmersión en el líquido fijador se procedió a seccionar el globo ocular por su ecuador dividiéndolo en dos partes: anterior y posterior. En este estudio únicamente se utilizó la porción posterior (retina y N.O.).

### **3.2.2.- REALIZACIÓN DE LOS CORTES HISTOLÓGICOS DEL N.O.**

Los cortes histológicos se realizaron, tanto en planos perpendiculares (secciones transversales), como en planos paralelos (secciones horizontales) al eje del N.O.; en parafina y por congelación.

Los nervios que iban a ser empleados para la obtención de cortes por congelación han sido sometidos, después de la fijación y lavado en tampón fosfato salino (P.B.S.), a una crioprotección en sacarosa al 30% en tampón fosfato durante 12 horas a 4°C. Para evitar la formación de cristales de hielo, durante el proceso de congelación, que pudiesen destrozar las estructuras, los N.O. fueron embebidos en Cyo-M-Bed (Bright), sumergidos en freon e inmediatamente en nitrógeno líquido, con lo que se consigue una congelación rápida.

Los cortes de congelación se efectuaron en un criostato Bright Starlet 2212 con un grosor de 12, 20 y 30  $\mu\text{m}$ ., recogiendo las secciones en portas bañados previamente en alumbre de cromo-geletina (PRIESTLEY, 1987<sup>232</sup>).

Para la realización de cortes en parafina, el tejido una vez fijado y lavado, fue incluido en parafina plástica PARAPLAST (Sherwood Medical), siguiendo los pasos marcados en el siguiente protocolo:

1) DESHIDRATACIÓN.

\* Inmersión en alcohol etílico de 60°:

- 1° paso: 1 hora.
- 2° paso: 1/2 hora.

\* Inmersión en alcohol etílico de 70°:

- 1° paso: 1 hora.
- 2° paso: 1/2 hora.

\* Inmersión en alcohol etílico de 80°:

- 1º paso: 1 hora.
- 2º paso: 1/2 hora.

\* Inmersión en alcohol etílico de 96°:

- 1º paso: 1 hora.
- 2º paso: 1/2 hora.

\* Inmersión en alcohol absoluto:

- 1º paso: 1 hora.
- 2º paso: 1/2 hora.

## 2) INMERSIÓN EN LÍQUIDO INTERMEDIO.

Como líquido intermedio, hemos empleado tolueno, substancia miscible tanto en alcohol como en parafina, realizándose tres pasos:

- 1º paso: 10 min.
- 2º paso: 10 min.
- 3º paso: 5 min.

## 3) INCLUSIÓN EN PARAFINA.

\* Inmersión en parafina en estufa a 57-58°C:

- 1º paso: 1-2 horas.
- 2º paso: 1/2-1 hora.

\* Inclusión en el bloque de parafina.

Las piezas así obtenidas fueron talladas y montadas en soportes, realizándose cortes seriados a 4, 6, 8 y 20  $\mu\text{m}$  de espesor, en un microtomo de rotación Reichert-Jung 1130/Biocut.

Una vez obtenida la serie de cortes, éstos se retiraban de la platina del microtomo estirándolos en un baño de agua a 35°C, recogiendo finalmente en portaobjetos que previamente habían sido bañados en alumbre de cromo-gelatina.

### **3.2.2.- TINCIONES HISTOLÓGICAS EMPLEADAS.**

#### **A) Hematoxilina-eosina.**

Esta tinción se realizó inicialmente de forma rutinaria, como control, en secciones histológicas procedentes de todos los N.O. estudiados, con el fin de determinar entre que cortes estaban comprendidas las diferentes zonas del N.O., y poder así seleccionarlos para su procesamiento inmunohistoquímico.

El protocolo seguido fue (McMANUS, 1968<sup>190</sup>)<sup>a</sup>:

- 1.- Desparafinado de los cortes en xilol durante 1/2-1 hora.
- 2.- Hidratación de los cortes mediante baños en alcohol de concentración descendiente (Absoluto, 96°)
- 3.- Lavado en H<sub>2</sub>O.
- 4.- Tinción con hematoxilina, durante 5-6 min., aumentando este tiempo

---

<sup>a</sup> Cuando los cortes se habían obtenido por congelación, las tinciones se iniciaban en el punto n° 3 del protocolo, realizándose después de igual forma que los de parafina.

- hasta los 10 min. para los cortes de 20 y 30  $\mu\text{m}$ .
- 5.- Lavado en  $\text{H}_2\text{O}$  (Dos pasos de 10 min. cada uno).
  - 6.- Tinción con eosina, durante 1-1½ min, aumentando este tiempo hasta los 2-2½ min. en los cortes de 20 y 30  $\mu\text{m}$ .
  - 7.- Lavado en  $\text{H}_2\text{O}$  (Dos pasos de 5 min. cada uno).
  - 8.- Deshidratación de los cortes en una serie de alcoholes de concentración creciente (96°, Absoluto).
  - 9.- Aclaramiento en xilol.
  - 10- Montaje en DpX.

El reactivo hematoxilina tiñe de color morado-azul la cromatina nuclear; mientras que, la eosina tiñe de rosa el citoplasma, los fascículos conectivos y los glóbulos rojos.

#### **B) Tinción de Unna-Tänzer (Orceina-picrocarmín índigo).**

Esta tinción se realizó para demostrar el entramado de fibras existente en la región de la lámina cribosa así como los septos conectivos de la región retrolaminar, y junto con la hematoxilina-eosina, sirvió para seleccionar con mayor precisión las preparaciones a teñir con anti-PGFA.

El protocolo seguido para su realización fue el siguiente (MARTOJA, 1970<sup>186</sup>):

- 1°.- Desparafinar.
- 2°.- Hidratar
- 3°.- Colorear con orceina durante 25 min.
- 4°.- Aclarar con agua destilada (2 lavados de 5 min.).
- 5°.- Colorear con picro-indigocarmín<sup>b</sup> durante 30 seg. a 1 min. (dependiendo del grosor del corte).
- 6°.- Deshidratar, y diferenciar el exceso de orceina con una deshidratación prolongada en alcohol absoluto).
- 7°.- Xilol
- 8°.- Montar en DpX.

Con esta tinción las fibras elásticas quedan de color pardo por la acción de la orceina, y las fibras colágenas de azul-verdoso por el picrocarmín de índigo.

### **C) Tinción inmunohistoquímica.**

Para la demostración del papel desempeñado, en la glioarquitectura de la cabeza del N.O., por las células astrogliales, hemos realizado tinciones

---

<sup>b</sup> La forma de preparar el picroindigocarmín, también denominado líquido de Calleja, es la siguiente:  
\* mezclar 0,25-0,4 grs. de carmín de índigo con 100 ml. de solución acuosa saturada de ácido pícrico.  
\* dejar sedimentar y filtrar.

inmunohistoquímicas empleando como marcador el anticuerpo contra la proteína gliofibrilar ácida (PGFA); poniéndolo de manifiesto mediante la técnica de la peroxidasa anti-peroxidasa (P.A.P.) (STERNBERGER, 1970<sup>319</sup>), así como mediante inmunofluorescencia indirecta (PRIESTLEY, 1987<sup>232</sup>).

Los anticuerpos que hemos utilizado han sido:

- Anti-PGFA (clon GA-5):, desarrollado en ratón, perteneciente a dos casas comerciales, Sigma (U.S.A.) y Biomakor (Israel), obteniéndose resultados similares con ambos.
- Anti-IgG Ratón, desarrollado en cabra (Sigma).
- FICT-Anti-IgG Ratón, anticuerpo contra la IgG de ratón conjugado a fluoresceína, desarrollado en cabra (Sigma).
- P.A.P., complejo peroxidasa anti-peroxidasa desarrollado en ratón (Sigma).

El protocolo seguido para la realización de la inmunotinción por el método de la P.A.P., fue:<sup>c</sup>

- 1º.- Desparafinado de los cortes.
- 2º.- Hidratación en una serie sucesiva de alcoholes de concentración decreciente (Absoluto, 96°).
- 3º.- Lavado en tampón fosfato salino (P.B.S.) durante 5 minutos.

---

<sup>c</sup> Para los cortes obtenidos en congelación, el protocolo se inició en el punto número 3.

- 4°.- Bloqueo de la peroxidasa endógena con  $H_2O_2$  al 0,03% en P.B.S., durante 30 minutos (los cortes a 4, 6, 8 y 12  $\mu m.$ ), ó 1 hora (los cortes a 20 y 30  $\mu m.$ ).
- 5°.- Lavado en P.B.S. (3 pasos x 5 minutos).
- 6°.- Eliminación de la señal de fondo (background), incubando en suero normal de cabra (N.G.S.) al 10%, durante 1 hora (cortes a 4, 6, 8 y 12  $\mu m.$ ) ó 3 horas (cortes a 20 y 30  $\mu m.$ ).
- 7°.- Incubación en anti-PGFA (dilución 1/250) durante 12 horas a 4°C.
- 8°.- Lavado en P.B.S. (3 pasos x 5 minutos).
- 9°.- Incubación en anti-IgG de ratón (dilución 1/100), durante 6 horas a 4°C (cortes a 4, 6, 8 y 12  $\mu m.$ ), ó 12 horas (cortes a 20 y 30  $\mu m.$ ).
- 10°.- Lavado en P.B.S. (3 pasos x 5 minutos).
- 11°.- Incubación en P.A.P. de ratón (dilución 1/500) durante 6 horas a 4°C (cortes a 4, 6, 8  $\mu m.$ ), ó 12 horas (cortes a 20 y 30  $\mu m.$ ).
- 12°.- Lavado en P.B.S. (3 pasos x 5 minutos).
- 13°.- Revelado en 3,3'-diaminobencidina (D.A.B.) al 0,03% y  $H_2O_2$  al 0,01% en P.B.S., durante 7-10 minutos.
- 14°.- Lavado en P.B.S. (2 pasos x 5 minutos).
- 15°.- Lavado en  $H_2O$ , durante 5 minutos.
- 16°.- Deshidratar y montar en DpX.

En algunas ocasiones se realizaron tinciones de contraste, para lo cual una vez revelado con D.A.B. se procedió a:

- contraste nuclear tñiendo durante 5 minutos con hematoxilina
- tinción de contraste del tejido conectivo; en estos casos, las preparaciones

eran bañadas en picroindigocarmín o líquido de Calleja (MARTOJA, 1970<sup>186</sup>) en un tiempo que variaba de 30 segundos a 1 minuto dependiendo del grosor de la sección histológica. Este colorante tiñe las fibras colágenas en un tono azul-verdoso.

El protocolo seguido en el método de inmunofluorescencia indirecta fue<sup>d</sup>:

- 1°.- Desparafinado.
- 2°.- Lavado en P.B.S., durante 5 minutos.
- 3°.- Eliminación de la señal de fondo incubando en N.G.S. al 10% durante 1 hora.
- 4°.- Incubación en anti-PGFA (dilución 1/100) durante 12 horas (cortes a 4, 6, 8 y 12  $\mu\text{m}.$ ) ó 24 horas (cortes a 20 y 30  $\mu\text{m}.$ ), a 4°C
- 5°.- Lavado en P.B.S. (3 pasos x 5 minutos).
- 6°.- Incubación en FITC-anti IgG de ratón (dilución 1/20) durante 2 horas (cortes a 4, 6, 8 y 12  $\mu\text{m}.$ ) ó 4 horas (cortes a 20 y 30  $\mu\text{m}.$ ), a temperatura ambiente en oscuridad<sup>e</sup>.
- 7°.- Lavado en P.B.S. (3 pasos x 5 minutos) en oscuridad.
- 8°.- Montar con Citifluor (Agar Scientific Ltd.).

En ambas técnicas los sueros fueron diluidos en P.B.S. con N.G.S. al 1% y

---

<sup>d</sup> La tinción de los cortes por congelación se inició a partir del lavado en P.B.S. (punto n° 2).

<sup>e</sup> El anticuerpo conjugado con el fluorocromo fue incubado previamente en polvo de cerebro de conejo a 37°C, después centrifugado a 3.000 rpm., utilizándose para la incubación únicamente el sobrenadante así obtenido. Estos pasos se realizaron para eliminar inmunofluorescencia de fondo.

Triton-X-100 al 0,2%; excepto el complejo P.A.P. que fue diluido únicamente en P.B.S.

Finalmente se realizaron los correspondientes controles negativos eliminando la primera capa (anti-PGFA) que era sustituida por N.G.S. al 10%, para demostrar que el anticuerpo secundario se une solamente a su correspondiente anticuerpo primario.

### **3.2.3.- OBSERVACIÓN DE LAS PREPARACIONES Y OBTENCIÓN DE LOS REGISTROS FOTOGRÁFICOS.**

Para el estudio de las preparaciones teñidas con las técnicas de hematoxilina-eosina, Unna-Tänzer y anti-PGFA (P.A.P.) se empleó un microscopio JENALUMAR (Carl Zeiss Jena), dotado de contraste de fase interferencial (óptica de Nomarski), contraste de fase en campo claro y oscuro, y equipo automático de fotografía.

Para la obtención de todo el material fotográfico se emplearon las siguientes películas: Ektachrome 100 y 200 ASA, Ektar 25 y 50 ASA e Ilfor Pan-F (50

ASA).

Las inmunofluorescencias se analizaron empleando el mismo microscopio, que está dotado igualmente de equipo de fluorescencia. Se utilizaron los filtros adecuados para el fluorocromo (el isocianato de fluoresceína se excita mediante irradiación de luz con longitudes de onda de 450-500 nm.): filtro de excitación BG 12 y vidrio amarillo 50 (filtro de supresión) [fuente de luz: lámpara de halógeno de 12V-100W; filtro de excitación KP 490 + LP 450; filtro de suspensión LP 520.].

La película utilizada fue: Tri-X Pan 400 ASA, Ektachrome 800 ASA.

### **3.3.- PROCESAMIENTO DE LOS N.O. PARA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA.**

Los N.O. que iban a ser procesados para microscopía electrónica fueron separados del globo ocular y cortados en pequeñas piezas para proceder a su fijación..

El procesamiento usado para la preparación de las piezas de microscopía electrónica fue:

A).- Fijación y postfijación:

- 1.- Fijación de las piezas durante 4-5 horas en paraformaldehído al 2,5% con glutaraldehído al 0,1%, en tampón fosfato a 4°C.
- 2.- Lavado en Milloning-glucosa y renovación cada media hora (4 pasos).
- 3.- Postfijación en tetróxido de osmio al 2% en agua. a temperatura ambiente, bajo campana, durante 1-3 horas.

B).- Deshidratación e inclusión<sup>f</sup>:

- 1.- Lavado de las piezas postfijadas en tetróxido de osmio, en agua

---

<sup>f</sup> Todos los pasos de este apartado se realizaron en oscuridad.

destilada.

2.- Deshidratación en una serie de acetonas de concentración creciente:

- acetona al 30%, durante 15 min.
- acetona al 50%, durante 15 min.
- acetona al 70%, durante 15 min.
- acetona al 90%, durante 15 min.
- acetona absoluta, dos pasos de 15 min.

3.- Pasos por la mezcla acetona/araldita:

- acetona absoluta/araldita (3:1), durante 1 hora.
- acetona absoluta/araldita (2:1), durante 1 hora.
- acetona absoluta/araldita (1:1), durante 1 hora.

4.- Introducción en araldita, durante toda la noche.

5.- Inclusión de las piezas en araldita usando moldes de gelatina, procurando orientarlas adecuadamente para posteriormente facilitar el tallado del bloque.

C).- Obtención de cortes semifinos y finos.

Los bloques una vez tallados se procesaron para la realización de cortes semifinos y finos mediante un ultramicrotomo Reichert OM-V3.

D).- Tinción de los cortes semifinos y contrastado de los cortes finos.

Los cortes semifinos obtenidos, se tiñeron con azul de toluidina (al 1 % en borax), utilizándose para la observación y selección de las diferentes regiones en que fue subdividido el N.O.

El protocolo seguido para realizar la tinción fue:

- 1.- Introducción de los cortes semifinos en azul de toluidina al 1 % en borax precalentado a 60°, durante 1 min.
- 2.- Lavado en H<sub>2</sub>O corriente, durante 1-2 min.
- 3.- Deshidratación de los cortes y montaje en DpX.

Una vez seleccionada la zona apropiada, se realizaron los cortes finos que fueron recogidos en rejillas de cobre. Seguidamente se contrastaron con acetato de uranilo al 1 % en agua destilada y con citrato de plomo.

E).- Observación microscópica.

Los cortes finos fueron observados y estudiados en el Microscopio Electrónico ZEISS 902 del Centro de Microscopía Electrónica de la Universidad Complutense de Madrid.

## **4.- RESULTADOS**

## **4.- RESULTADOS.**

Para poder comprender mejor la glioarquitectura de la parte del nervio óptico estudiada en este trabajo, hemos creído conveniente seguir la división en cuatro regiones descrita anteriormente en la Introducción. Estas regiones son:

- Capa Superficial de Fibras Nerviosas (C.S.F.N.)
- Región Prelaminar
- Región Laminar
- Región Retrolaminar

Como ya vimos, las tres primeras regiones (C.S.F.N., Prelaminar y Laminar) pertenecen a la porción intraocular del nervio; mientras que, la cuarta (Retrolaminar) se corresponde con la parte anterior de la región intraorbitaria.

La Figura 1 nos muestra, en sección longitudinal, estas divisiones.

## **4.1.- OBSERVACIONES A MICROSCOPIA ÓPTICA.**

### **4.1.1.- LOCALIZACIÓN DE LA INMUNORREACTIVIDAD ANTI-PGFA EN LA CABEZA DEL NERVIO ÓPTICO HUMANO.**

Para poder determinar la localización de las células astrogiales presentes en la cabeza del N.O. humano hemos utilizado secciones histológicas de 4, 6, 8, 12, 20 y 30  $\mu\text{m.}$ , marcadas con anticuerpos contra la PGFA, puestos de manifiesto con las técnicas indirectas de inmunofluorescencia y de la peroxidasa-antiperoxidasa (P.A.P.).

El estudio de todas las preparaciones nos ha permitido constatar que todas las regiones del N.O.: C.S.F.N., región prelaminar, laminar y retrolaminar, van a presentar inmunorreactividad PGFA(+) en mayor o menor intensidad (Fig. 1).

Además, la reacción PGFA(+) se localiza a nivel de las prolongaciones así como en el citoplasma que rodea al núcleo astrogial, siendo este último, por tanto, PGFA(-); aunque sin embargo, éste puede ser identificado al observarse como una formación globular o redondeada carente de tinción pero remarcada por

la reacción positiva del pericarion (Fig. 2).

**\* Capa Superficial de Fibras Nerviosas.**

A nivel de la C.S.F.N., observamos una estrecha banda fuertemente PGFA(+) de disposición paralela a la superficie del disco óptico y que es una continuación directa de la membrana limitante interna de la retina. Esta estructura separa el tejido más superficial del disco, de la superficie del vítreo adyacente (Fig. 1 y 3).

Esta banda de reacción positiva, a nivel de la porción más central del disco óptico, va a presentar un engrosamiento similar a una cuña (Fig. 4), que se introduce hacia el interior del N.O. bordeando al tejido conectivo que recubre los vasos centrales (A.C.R. y V.C.R.) en el momento de su división en las ramas que se dirigen a irrigar los territorios retinianos. Al igual que la banda superficial, esta estructura presenta una inmunorreactividad PGFA(+) muy intensa.

Estos territorios se corresponden con la *membrana limitante de Eschnig* (Fig. 3), en el primer caso; y con el *menisco central de Kuhnt* (Fig. 4), en el segundo; y van a estar constituidas por astrocitos PGFA(+) que se disponen empaquetados, dando el aspecto de una banda continua.

Por debajo de estas limitantes nos vamos a encontrar con una zona estrecha, en la que la inmunorreactividad frente al anticuerpo es menos intensa. Esta reacción procede de los astrocitos que se distribuyen por esta zona, además de por la señal de sus prolongaciones (Fig. 3).

Sin embargo, podemos destacar que alrededor de los vasos sanguíneos presentes en esta región, tanto en los vasos centrales como en las arteriolas y vénulas retinianas derivados de ellos, existe una intensa inmunorreactividad PGFA(+). Esta señal se encuentra alrededor de las paredes de estos vasos, delimitándolos y haciendo posible su visualización. Por lo tanto, esta inmunotinción viene determinada por la disposición sobre las paredes de los vasos sanguíneos, de prolongaciones perivasculares procedentes de los astrocitos de esta región (Fig. 3).

**\* Región Preliminar.**

En esta región se aprecia una elevada reacción positiva frente al anti-PGFA, aunque la existencia de variaciones en la proporción de tejido marcado, nos ha permitido distinguir dos áreas, subdividiendo, por tanto, a esta región en una zona

anterior y otra posterior (Fig. 1 y 5a,b).

La **región prelaminar anterior**, se corresponde con la zona del N.O. rodeada periféricamente por tejido retiniano (Fig. 1), y presenta una alta señal PGFA(+) (Fig. 5a,b);

En esta zona anterior podemos observar como separando, por un lado el tejido del N.O., y por otro el tejido retiniano, existe una zona intensamente PGFA(+), que se continua en la porción prelaminar posterior, pero separando, en este caso, el tejido del nervio del tejido coroideo circundante. Estas densas zonas de inmunorreacción positiva, se corresponden con el *tejido intermediario de Kuhnt*, y con la *membrana limitante de Jacoby*, respectivamente; estando ambas constituidas por astrocitos fuertemente PGFA(+) que se disponen muy próximos entre sí. En cortes longitudinales, la reunión de estas limitantes constituye un territorio con forma elipsoidal con su eje mayor paralelo al curso del N.O. (Fig. 6).

En la región prelaminar anterior la distribución de la señal no es homogénea, ya que al estudiar las secciones longitudinales, podemos comprobar como aparecen columnas o hileras con reacción PGFA(+) intensa, que alternan con bandas más anchas en las que la inmunoreactividad es mucho más débil (Fig. 5b y 7). Esta disposición explica que al observar cortes transversales se observen imágenes en

celdillas, con la mayor inmunorreactividad positiva localizada en las paredes de las mismas (Fig. 8).

También cabe destacar que, como ocurría en la región anterior (C.S.F.N.), los vasos sanguíneos, independientemente de cual sea su tamaño (grande, mediano o simplemente capilares), van a estar delimitados por una señal PGFA(+), procedente de las prolongaciones y/o cuerpos celulares de los astrocitos de esta parte del nervio (Fig. 8).

**La región prelaminar posterior**, es la zona del N.O. rodeada por tejido coroideo (Fig. 1). En ella, la intensidad de la reacción es similar al área anterior, observándose, sin embargo, una mayor señal PGFA(+) debido a un incremento en el porcentaje de tejido marcado con intensa inmunorreactividad (Fig. 5a,b).

Así, en las inmunotinciones realizadas en secciones longitudinales del N.O., la señal positiva ya no aparece en columnas como en la prelaminar anterior, sino que ahora se aprecia como anchas bandas perpendiculares a la superficie del N.O. (Fig. 5a,b y 9), que constituyen estructuras a modo de tubos, como se puede comprobar al observar las preparaciones realizadas a 20-30  $\mu\text{m}$ . (Fig. 10). Estas bandas están alternando con espacios con menor señal PGFA(+), siendo el grosor de estos inferior al de los de la zona anterior.

Además, al igual que en la zona prelaminar anterior, todos los vasos

sanguíneos de la prelaminar posterior, presentan alta inmunorreactividad en sus paredes (Fig. 11).

Por último, con respecto a esta zona prelaminar posterior, señalar que al observar las secciones longitudinales, se aprecia como esta zona con fuerte señal PGFA(+) presenta una forma curvada en el borde posterior al adaptarse la región prelaminar posterior a la concavidad que posee la estructura de la lámina cribosa; dando, por tanto lugar, a que la parte central termine más caudalmente que los bordes laterales (Fig. 1).

**\* Región laminar.**

En esta parte del N.O., y con respecto a la señal PGFA(+), llama la atención la disminución de inmunorreacción que presenta con respecto a las regiones anteriormente descritas (Fig. 1,5a,12).

No hemos observado la existencia de una zona densamente PGFA(+) que separe el N.O. del tejido escleral adyacente, apreciando en las preparaciones inmunoteñidas y contrastadas con picrocarmín índigo (que tiñe de color azulado el tejido conectivo), cómo el tejido colágeno de la esclerótica se introduce dentro

del tejido nervioso para constituir la estructura denominada lámina cribosa (Fig. 12).

Todos los tabiques de colágeno que forman la lámina cribosa están recubiertos de una fina señal PGFA(+) , aunque su reacción es de intensidad fuerte. En imágenes obtenidas de cortes longitudinales, teñidos con anti-PGFA, revelados con la técnica de la P.A.P., y sin ninguna tinción de contraste, podemos observar la existencia de hileras anchas paralelas a la superficie del nervio en las que están alternando bandas de color pardo con otras más o menos claras. Las bandas pardas se corresponden con el producto de reacción de la DAB y por tanto son las zonas PGFA(+). Estas hileras están delimitando entre sí espacios con una inmunorreactividad más débil (Fig. 1).

Al igual que ocurre en las otras regiones del N.O., los vasos sanguíneos presentes en esta región, van a tener sus paredes rodeadas por una zona con reacción fuertemente PGFA(+).

**\* Región retrolaminar.**

Aparece en esta última región del N.O. estudiada, una banda de reacción

PGFA(+) intensa, separando el tejido del N.O. de las vainas meníngeas que lo rodean. Esta banda inmunorreactiva se corresponden con el denominado *manto periférico glial de Greef*, y va a estar constituida por 3-4 hileras de células astrogiales densamente empaquetadas (Fig. 13).

Hacia el interior del nervio, en las secciones longitudinales, se observa como la señal positiva frente al anti-PGFA se va a distribuir en hileras estrechas que delimitan bandas longitudinales paralelas a la dirección del N.O.

En secciones transversales se aprecia como esta señal se dispone bordeando todos los tabiques de colágeno, tanto los que se introducen desde la piamadre, como los que se originan desde el tejido conectivo que rodea los vasos centrales; pudiéndose demostrar también reacción en el interior de las celdillas delimitadas por estos septos (Fig. 13 y 14).

Los vasos sanguíneos de esta región, independientemente de su origen derivado del sistema ciliar o del sistema central, van a presentar prolongaciones astrogiales perivasculares que, junto a los cuerpos celulares que se disponen en las proximidades de ellos, delimitan una película PGFA(+) alrededor de sus paredes. Esta envuelta astrogial los separa del tejido nervioso circundante (Fig. 13 y 14).

**4.1.2.- ANÁLISIS DE LA MORFOLOGÍA DE LOS ASTROCITOS Y DE SU DISTRIBUCIÓN EN LA CABEZA DEL NERVIO ÓPTICO HUMANO.**

**4.1.2.1.- MORFOLOGÍA ASTROGLIAL.**

El análisis de las secciones, tanto transversales como longitudinales, de los nervios ópticos humanos teñidos con anti-PGFA, nos demuestra la existencia de astrocitos fibrosos, aunque con variaciones morfológicas, desde la C.S.F.N. hasta la región retrolaminar, al adaptarse estas células al entorno específico en el que se encuentran.

En base al tamaño y robustez del pericarion, al grosor y longitud de sus prolongaciones, y a la intensidad de su inmunorreactividad, hemos clasificado los astrocitos presentes en la cabeza del N.O. humano en tres grandes grupos:

- astrocitos con cuerpo celular grueso
- astrocitos con cuerpo celular delgado
- astrocitos con baja inmunorreactividad PGFA(+)

**A) Astrocitos con cuerpo celular grueso.**

Todos los astrocitos englobados en este patrón morfológico, son células que se caracterizan por presentar una inmunorreactividad PGFA(+) muy alta. Estos astrocitos presentan un cuerpo celular grueso en el que resalta un núcleo esférico PGFA(-), que se puede disponer tanto central como periféricamente. Del pericarion se origina un número variable de gruesas prolongaciones primarias, generalmente de 6 a 8, que parten de forma más o menos radial dependiendo de su localización en el nervio; estas ramificaciones generalmente se van subdividiendo dicotómicamente en otras secundarias de menor calibre (Fig. 15, 16,17,18,19,20,21,69).

Como podemos comprobar, estos astrocitos se van a distribuir por todo el N.O., desde la C.S.F.N. hasta la región retrolaminar, con diversas modificaciones motivadas por las características propias y concretas de cada una de estas regiones.

En primer lugar, vemos cómo astrocitos de este tipo forman densas agrupaciones celulares que se disponen aislando y/o separando el tejido del N.O. de todos los tejidos circundantes, constituyendo las distintas limitantes gliales del nervio: la membrana limitante de Elschnig, el menisco central de Kunht, el tejido

intermediario de Kuhnt, el tejido de Jacoby, y el manto periférico de Greef. En estas limitantes, las células más internas, es decir, las más próximas al tejido del N.O., presentan un aspecto más estrellado al partir las prolongaciones radialmente en todas las direcciones (Fig. 15, 16 y 69); pero según vamos profundizando hacia la parte externa de la limitante, estos astrocitos se van volviendo más aplanados al disponer sus prolongaciones con trayectorias más paralelas entre sí (Fig. 6, 13).

Por otra parte, nos vamos a encontrar con astrocitos de cuerpo celular grueso, por un lado en la región prelamina posterior, donde van a formar los tubos gliales por donde pasan los axones (Fig. 17); y por otro, en la región laminar, donde tapizan los poros dejados por el colágeno que forma la lámina cribosa (Fig. 18). Por lo tanto, como podemos ver, estas células también aislan las fibras nerviosas, del tejido mesodérmico cercano, ayudando a realizar su fasciculación a lo largo del trayecto del nervio.

En ambos casos, tanto en la región prelamina posterior como en la laminar, estos astrocitos de cuerpo celular grueso se van a adaptar para formar o recubrir estructuras tubulares, por lo que presentan un aspecto curvado similar al de una media luna. El cuerpo celular se hace más aplanado, con el núcleo en posición central, partiendo las prolongaciones primarias más gruesas fundamentalmente de los polos celulares con una trayectoria curvada y paralelas entre sí (Fig. 17, 18,

y 69). Asimismo, también hemos observado como del pericarion de estas células también derivan prolongaciones más finas y cortas que se extienden en todas las direcciones del espacio (Fig. 17, 18, 69).

Finalmente, los astrocitos de cuerpo celular grueso, también se encuentran en la región retrolaminar del N.O. En este caso pueden tener una disposición intraseptal, sobre los septos piales que se introducen en el N.O., tapizándolos e interponiéndose entre el esqueleto conectivo de los mismos y los axones que engloban. Pero también pueden tener una localización intrafascicular, dentro de los haces axonales (Fig. 19, 20, 21, 69).

En el primer caso, los astrocitos poseen un pericarion con morfología más o menos triangular, con un núcleo normalmente oval, aunque en ocasiones adquiera un aspecto más irregular, del que parten las gruesas prolongaciones primarias para formar parte del componente glial de las paredes de los tabiques, introduciéndose prolongaciones más finas hacia el interior de los haces axonales (Fig. 19,20). En el segundo caso, cuando el núcleo está localizado intrafascicularmente, son más estrellados ya que mandan sus prolongaciones, entre los axones nerviosos, en todas las direcciones del espacio (Fig. 21, 69).

**B.- Astrocitos con cuerpo celular delgado.**

Son células con tinción PGFA(+) alta, que poseen un cuerpo celular delgado, de pequeño tamaño y apariencia oval, en el que destaca un núcleo prominente y redondeado (Fig. 22, 23,70).

Del pericarion van a partir de 2 a 4 prolongaciones primarias, que se caracterizan por tener una gran longitud y un diámetro no muy grueso. Estas prolongaciones pueden subdividirse, abriéndose a modo de horquilla, en otras secundarias con un diámetro de menor calibre, aunque la cantidad de ramificaciones secundarias que poseen estos astrocitos no es muy grande. Sin embargo, hemos encontrado que de su cuerpo celular también pueden partir prolongaciones primarias más finas, de calibre similar a las secundarias, que se distribuyen de una forma radial alrededor del núcleo (Fig. 22, 23, 70).

Dependiendo de su localización en el nervio, estas células van a poder tener un aspecto que va a variar desde alargado a estrellado.

En las células con apariencia más alargada, de cada polo de su soma parten dos prolongaciones primarias gruesas, que en las proximidades del pericarion se subdividen en dos ramificaciones secundarias más finas, pero de gran longitud, que van a seguir la misma dirección que tenían las primarias de las que se

originan, teniendo un trayecto rectilíneo paralelo al de los axones de las células ganglionares (Fig. 22, 70).

Las células que poseen una morfología más estrellada, se van a caracterizar porque sus prolongaciones salen del soma orientándose de una forma más radial. Esta forma más estrellada viene determinada por su colocación entre vasos sanguíneos hacia los que se dirigen las prolongaciones que se originan de su pericarion (Fig. 23,70).

Los astrocitos de cuerpo celular delgado están presentes, tanto en la C.S.F.N., como en la región prelamina anterior.

#### **C.- Astrocitos con baja inmunorreactividad PGFA(+).**

Si comparamos la inmunorreactividad de estas células con la que presentan el resto de los astrocitos encontrados en el nervio, podemos observar claramente como la característica principal de estos astrocitos es su baja inmunoreactividad PGFA(+).

Son células con un cuerpo celular muy pequeño, de forma ovoide, con un núcleo redondeado y excéntrico. De su pericarion van a originarse 7 u 8 prolongaciones muy delgadas; una de ellas es muy larga, rectilínea, y no suele dividirse en ramificaciones secundarias, presentando una trayectoria paralela a la de las fibras nerviosas; por el contrario, el resto de las prolongaciones son muy cortas y se disponen a modo de corona rodeando el citoplasma perinuclear (Fig. 24, 70).

Su perfecta identificación e individualización sólo ha sido posible en las secciones longitudinales de 20 y 30  $\mu\text{m.}$ , siendo imposible identificarlos en las secciones transversales al quedar enmascarados por la mayor inmunoreactividad positiva de las prolongaciones del resto de las células astrogiales del nervio.

Hemos observado la presencia de estos astrocitos en las regiones prelamina, lamina y retrolamina; localizados en el interior de los haces axonales, próximos a las paredes que los delimitan, y con una orientación paralela al eje longitudinal del N.O.

**4.1.2.2.- DISTRIBUCIÓN DE LOS ASTROCITOS: GLIOARQUITECTURA DE LA CABEZA DEL NERVIO ÓPTICO.**

**A) CAPA SUPERFICIAL DE FIBRAS NERVIOSAS.**

Es la zona del nervio situada inmediatamente adyacente al humor vítreo; área donde convergen todas las fibras nerviosas procedentes de los axones de las células ganglionares de la retina, para abandonar el globo ocular constituyendo el N.O. (Fig. 1).

Inicialmente, en esta región llama la atención la banda fuertemente PGFA(+) que separa el humor vítreo del tejido más superficial del disco óptico, y que como ya hemos mencionado se corresponde con la denominada membrana limitante de Elschnig (Fig. 3,25,26,27). Esta limitante está constituida por 2-3 capas de astrocitos de cuerpo celular grueso, que disponen sus prolongaciones en una dirección más o menos paralela a la superficie del vítreo, partiendo de cada uno de sus polos de 4-6 prolongaciones gruesas con trayecto rectilíneo, que se disponen paralelas a las prolongaciones de los astrocitos vecinos; de esta forma, se constituye un tejido que aísla el N.O. del humor vítreo (Fig. 3,25,26,27). Sin embargo, los astrocitos que se sitúan en la capa más interna de la limitante, en

contacto con el parénquima del nervio, también pueden mandar prolongaciones perpendiculares a la superficie de éste, que se introducen en la C.S.F.N., entremezclándose con las prolongaciones de otros astrocitos, ayudando a la fasciculación de los axones de esa zona, además de poder realizar contactos vasculares.

Los astrocitos que forman la membrana limitante de Elschnig tienden a encontrarse agrupados en sectores, por lo que observamos áreas con grupos de 4-5 núcleos de astrocitos, y al lado zonas en las que únicamente aparecen sus prolongaciones, para a continuación volver a encontrarnos con otra acumulación de núcleos (Fig. 25,27).

El citoplasma de todas estas prolongaciones está constituido por densos paquetes de filamentos intermedios como queda puesto de manifiesto en las inmunotinciones de los cortes histológicos a 4-6  $\mu\text{m.}$ , en las que podemos observar como estos filamentos junto con los procedentes de prolongaciones paralelas, al quedar seccionados dan un aspecto característico en borde de cepillo desflechado (Fig. 25,27).

Los vasos sanguíneos que abandonan el N.O. para irrigar la retina, van a discurrir entre el tejido de esta limitante. Estos vasos, realizan protusión hacia el vítreo, estando recubiertos por los astrocitos que constituyen esta limitante.

Cuando esto ocurre, los cuerpos celulares de los astrocitos se disponen formando acúmulos de núcleos a cada lado de la pared del vaso, enviando prolongaciones hacia la superficie del mismo, que recubren externamente su pared y que se cruzan con las derivadas de los astrocitos del otro lado, dando imágenes en forma de huso en las secciones longitudinales a 30  $\mu\text{m}$ . (Fig. 25), pero en secciones más transversales se aprecia una desorganización de las prolongaciones, no observándose la disposición paralela de las prolongaciones, sino que aparece una estructura en forma de red debido a la superposición de dichas prolongaciones (Fig. 25).

En el centro del disco óptico, los astrocitos de cuerpo grueso que forman la membrana limitante de Elschnig, se agrupan en 8-10 capas, densamente empaquetados, formando una estructura en forma de cuña que recubre a los vasos centrales (A.C.R. y V.C.R.) y al grueso tejido conectivo que los rodea, separándolos del vítreo. Esta formación recibe el nombre de menisco central de Kuhnt (Fig. 4, 28).

Los astrocitos de cuerpo celular grueso que rodean a estos vasos centrales, se van a introducir en el parénquima del N.O. para formar una envuelta astrogliol continua de varias capas celulares, que va a recubrir todo el trayecto de los grandes vasos centrales desde que éstos penetran en el N.O. en la región

retrolaminar hasta su llegada a la excavación central del disco óptico (Fig. 28).

Por debajo de la membrana limitante de Elschnig, nos vamos a encontrar con la existencia de astrocitos de cuerpo celular delgado.

En primer lugar vemos que estas células se disponen mayoritariamente paralelos a la membrana limitante de Elschnig, presentando un aspecto alargado (Fig. 29,30). Esta morfología es debida a que estos astrocitos siguen la trayectoria de los axones de las células ganglionares que desde la retina llegan a la papila para después incurvarse realizando un giro de  $90^\circ$ , y constituir la región prelaminar del nervio.

Estos astrocitos alargados además de acompañar a los axones van a poder realizar contactos con los capilares derivados de las arteriolas retinianas del sistema vascular central. Así, las prolongaciones largas y rectilíneas derivadas de su pericarion, se dirigen hacia un capilar abrazando sus paredes junto con prolongaciones procedentes de otros astrocitos, quedando la circunferencia del capilar totalmente rodeada por prolongaciones perivasculares de naturaleza astroglial (Fig. 22).

En los bordes del disco, cuando ya no se aprecian las prolongaciones de la glía de Müller que se dirigen hacia el vítreo para constituir la membrana

limitante interna de la retina, observamos como existe una intensa señal PGFA(+) perteneciente a células astrogliales. Esta señal esta constituida por la superposición de astrocitos con cuerpo celular delgado y morfología alargada, tal como podemos observar en secciones longitudinales. Por lo tanto estas células se encargan de separar al N.O. del vítreo, en la zona de transición entre retina y nervio (Fig. 29).

En las zonas en las que ya existe la membrana limitante de Eslchning estas células se disponen por debajo de la misma y paralelas a ella; aunque, también hemos podido comprobar como las prolongaciones de las células más próximas a la limitante terminan fusionándose y formando parte de ella (Fig. 26, 29).

Cuando se encuentran en la zona central de la C.S.F.N., los astrocitos de cuerpo delgado, se van a dirigir hacia todos los vasos sanguíneos existentes a ese nivel, contactando con ellos y recubriéndolos; observándose en las secciones histológicas como se introducen separando el tejido conectivo que separa vasos situados muy próximos entre sí.

En esta zona central, coincidiendo con una mayor densidad de vasos, estos astrocitos cambian su morfología alargada y se vuelven más estrellados, emitiendo, desde la fina banda de citoplasma perinuclear, sus prolongaciones en todas las direcciones. Es tal la cantidad de fibras gliales existentes a este nivel, que cuando

se observan preparaciones con inmunofluorescencia se aprecian multitud de finas ramificaciones cortadas en diferentes planos y dispuestas en todas las direcciones del espacio (Fig. 3, 26).

Asimismo, estos astrocitos también mandan prolongaciones que se unen a la envuelta astrogial de los vasos centrales, ayudando a separarlos del resto del parenquima nervioso (Fig. 3, 26).

#### **B.- REGIÓN PRELAMINAR.**

En esta región, todas las fibras nerviosas realizan un cambio de trayectoria curvándose 90° para dirigirse hacia el quiasma óptico, agrupándose en haces o fascículos (Fig. 1).

Como mencionamos con anterioridad hemos dividido la región prelamina en dos zonas en las cuales, tanto la morfología como la distribución de los astrocitos sufren una serie de modificaciones.

##### **\* Región prelamina anterior.**

En los márgenes del disco, nos encontramos con astrocitos de cuerpo celular grueso que se disponen separando el N.O. del tejido retiniano circundante,

agrupándose para constituir una membrana limitante conocida como tejido intermediario de Kuhnt, que está constituido por 4-5 capas de células (Fig. 6).

Las células que forman la capa más interna tienen una morfología más estrellada, introduciéndose algunas de sus prolongaciones hacia el centro del nervio; mientras que, las células que forman las capas más externas (próximas al tejido retiniano), presentan un aspecto más aplanado, disponiéndose sus prolongaciones hacia ambos lados del cuerpo; estando muy empaquetadas entre sí, por lo que resulta difícil su individualización. Este agrupamiento hace que en las preparaciones se observe una zona fuertemente PGFA(+) en la que resaltan pequeñas áreas redondeadas sin reacción, que se corresponden con los núcleos PGFA(-) (Fig. 6).

Del área ocupada por el tejido limitante de Kuhnt, parten prolongaciones radiales PGFA(+), con una trayectoria rectilínea perpendicular al eje del nervio, que se abren en abanico desde el tejido limitante. Estas fibras PGFA(+), pertenecen a astrocitos de cuerpo celular delgado que acompañan a los vasos que penetran en el nervio desde la coroides, para constituir el plexo capilar que irriga la región prelaminar (Fig. 6, 29).

El soma de estos astrocitos se dispone directamente sobre la pared del vaso, mandando dos prolongaciones gruesas primarias que siguen el curso del vaso (Fig.

30). La longitud de estas prolongaciones es tal, que es frecuente observar cómo algunas de ellas, pertenecientes a las células de disposición más rostral, llegan hasta los bordes de la membrana limitante de Elschnig contribuyendo en la formación de este tejido limitante entre vítreo y nervio (Fig. 29).

Con esta disposición, estos astrocitos alargados, están a su vez acompañando, de forma paralela, el curso de algunos axones ayudando a su fasciculación. Estos axones proceden de la retina peripapilar y se introducen de forma radial hacia el centro del nervio, para posteriormente realizar el giro de 90° constituyendo los fascículos axonales centrales del N.O. (Fig. 29). Sin embargo, la disposición de estos astrocitos es mayoritariamente perpendicular al trayecto de los axones que penetran por las zonas más periféricas del disco para realizar en este punto el giro de 90° ordenándose paralelos al eje longitudinal del N.O.; aunque estos astrocitos también pueden enviar algunas prolongaciones que contribuyen en la fasciculación de estos axones de las porciones más periféricas del nervio (Fig. 29).

En el resto de la región prelaminar anterior, las células predominantes son astrocitos de cuerpo celular delgado con aspecto estrellado. Su disposición va a estar muy relacionada con el patrón de distribución que presenta el sistema vascular. Los vasos de esta zona son fundamentalmente ramas procedentes de la precoriocapilar coroidea peripapilar, derivada del sistema ciliar, y penetran en el

N.O. con una trayectoria rectilínea, cruzándolo perpendiculares a las fibras nerviosas; aunque también pueden existir, en ocasiones, vasos en el área central con trayectos verticales, derivados de la A.C.R.

Los núcleos de los astrocitos se disponen mayoritariamente sobre las paredes de estos vasos sanguíneos (Fig. 31,32,33), enviando sus prolongaciones radiales en todas las direcciones del espacio para formar una malla astrogliar en forma de cesta que comienza a reagrupar y fascicular a los axones que están penetrando desde la retina (Fig. 5a,b, 8).

Al analizar esta zona vemos como aparecen hileras de núcleos de astrocitos que siguen el trayecto de los vasos, lo cual se aprecia claramente en las secciones contrastadas con hematoxilina-eosina (Fig. 5b,7). Asimismo, también podemos comprobar como se produce un incremento del número de células astrogliales desde las zonas próximas a la C.S.F.N. hacia la zona prelamina posterior; reuniéndose los cuerpos celulares sobre los vasos sanguíneos formándose agrupaciones de núcleos, en las que el número de células oscila entre cinco y diez (Fig. 31,32,33).

La agrupación de los cuerpos celulares, sobre los vasos sanguíneos, y las prolongaciones primarias que parten de ellos formando la envuelta astrogliar perivascular de los mismos, van a formar estructuras, que en cortes transversales,

aparecen como celdillas que rodean a los axones de las células ganglionares, fasciculándolos en haces (Fig. 5a,8,31,32,33,34). La disposición espacial de estas celdillas hace que el aspecto tridimensional del armazón glial de esta zona sea similar al de una cesta de mimbre (fig. 8,34). Además, en estas secciones, se aprecia claramente como todas estas células también emiten prolongaciones primarias de menor calibre que se dirigen hacia el interior de las celdillas, donde se subdividen en otras secundarias (Fig. 31,32,33,34).

Los vasos sanguíneos discurren por el interior de las paredes gliales de las celdillas llevando un recorrido sinuoso y serpentiforme (Fig. 34), pues lo mismo toman inicialmente una dirección rostral para girar a continuación y dirigirse hacia el lado caudal, o viceversa; estos vasos van dando capilares para constituir finalmente un plexo o red capilar de trazado irregular. Asimismo, generalmente, coincidiendo con el territorio de transición entre la zona anterior y posterior de la región prelaminar, nos encontramos con la presencia de un vaso de calibre medio que recorre la circunferencia del nervio; estos vasos son ramas derivadas del círculo de Zinn-Haller, que partiendo de él de forma centrípeta y con un trayecto ligeramente inclinado, llegan hasta la región prelaminar (Fig. 35).

En secciones longitudinales no se observan las celdillas, excepto cuando el corte es oblicuo o corresponde a las zonas periféricas del nervio. En estas

preparaciones los acúmulos de núcleos aparecen ordenados en hileras, que dejan franjas más anchas hacia las que se introducen las prolongaciones gliales. Por el interior de estas celdillas se disponen los axones de las células ganglionares, que se encuentran agrupados en haces por la acción de los astrocitos. Estos haces de axones están, a su vez, subdivididos en grupos más pequeños gracias a la acción de la gran cantidad de prolongaciones astrogliales que cruzan en todas las direcciones por el interior de las celdillas (Fig. 5b).

Al observar la estructura de la cesta glial, vemos que existen variaciones en ella en sentido rostro-caudal, motivadas fundamentalmente tanto por la distribución de los axones ganglionares como por la morfología del plexo capilar. Así, en la zona prelaminar más próxima a la C.S.F.N., donde los axones llevan un recorrido más o menos paralelo a la superficie vítrea, los tabiques gliales presentan un diámetro relativamente amplio, al encontrarse los astrocitos más alejados los unos de los otros; esto motiva, a su vez, que los espacios entre los capilares del plexo sanguíneo a este nivel sean mayores, ya que éstos se disponen entre las paredes de los tabiques gliales (Fig. 31).

Pero, en las porciones más posteriores, cuando los axones de las células ganglionares retinianas giran 90° para constituir los haces paralelos al eje del N.O., el diámetro de las celdillas va a ir disminuyendo progresivamente, ya que

van apareciendo astrocitos de cuerpo celular delgado y aspecto estrellado, que disponen su soma en el interior de las celdillas y mediante sus prolongaciones radiales las van subdividiéndolas en otras de diámetro menor, lo que origina a su vez, que los vasos que forman el plexo capilar están más próximos entre sí (Fig. 32, 33).

Debemos señalar aquí, que en las secciones longitudinales de N.O. más gruesas (30  $\mu\text{m.}$ ), hemos detectado la presencia de fibras, largas y finas, debilmente PGFA(+), con un trazado rectilíneo antero-posterior paralelo al de los axones, y que raramente se ramifican. Estas fibras se disponen en el interior de las celdillas, es decir, dentro de los haces axonales, y se originan de células clasificadas dentro del grupo de astrocitos con baja inmunorreactividad PGFA(+) (Fig. 36).

Finalmente, con respecto a esta zona prelaminar anterior, nos queda por indicar que está atravesada centralmente por la A.C.R. y V.C.R.. Estos vasos centrales se encuentran aislados del resto del nervio por una envuelta constituida por tejido conectivo rodeado completamente por prolongaciones y somas astrogliales densamente empaquetados, por lo que van a adquirir un aspecto alargado, observándose en secciones transversales como varias capas o vainas

longitudinales que rodean al nervio, y que como ya dijimos, son la continuación, por el interior del nervio, de los astrocitos que constituían el menisco central de Kuhnt en la C.S.F.N. (Fig. 1, 28). Además, los astrocitos de cuerpo celular delgado que forman los tabiques de la cesta glial más próximos a esta limitante de la A.C.R. y V.C.R., también mandan prolongaciones que se entremezclan y contribuyen a formar parte de su superficie en contacto con el tejido del N.O. (Fig. 26).

**\* Región prelaminar posterior:**

En los bordes de esta zona se produce una acumulación de astrocitos de cuerpo celular grueso, que se disponen separando el tejido del nervio del de la coroides circundante. En muchas ocasiones, la alta densidad celular no nos permite apreciar la morfología individual, pero si que se puede afirmar que estos astrocitos se disponen en 4 ó 5 capas para formar una limitante astrogliar. Esta limitante, denominada tejido de Jacoby, es continuación del tejido intermediario de Kuhnt situado en la prelaminar anterior, por lo que posee sus mismas características (Fig. 6). Además, las células de esta limitante más próximas al parenquima del nervio pueden mandar prolongaciones perpendiculares que se introducen hacia el centro

del N.O., entremezclándose con las pertenecientes a los astrocitos que fasciculan a los axones.

La fasciculación de los axones de esta zona posterior de la región prelaminar, se va a deber a la acción de astrocitos de cuerpo celular grueso (Fig. 17). Estos astrocitos se disponen de una forma muy precisa en el N.O., de manera que constituyen auténticos tubos gliales cilíndricos, por cuyo interior van las fibras nerviosas (Fig. 9,10); mientras que, los vasos sanguíneos discurren por entre los gruesos tabiques gliales que conforman las paredes de estos tubos (Fig. 37). Los vasos de esta zona, derivados del sistema ciliar, penetran desde la coroides y se introducen en el N.O. dirigiéndose inicialmente hacia la parte caudal con un trayecto rectilíneo paralelo al eje del N.O., para seguidamente, al igual que ocurría en la prelaminar anterior, tener un trayecto muy sinuoso, dando lugar a la red capilar irregular que se distribuye por el interior de las paredes gliales de los tubos (Fig. 9, 10, 38).

La disposición que adoptan los astrocitos para constituir los tubos gliales ha podido ser puesta de manifiesto gracias a los cortes histológicos realizados a 30  $\mu\text{m}$ .. Así, de ambos lados del pericarion de estas células parten varias prolongaciones (3 a 4) primarias muy gruesas para constituir el armazón principal

del tubo; estas prolongaciones son curvadas, por lo que confieren a la célula un aspecto de media luna con la concavidad hacia el interior del tubo glial. Estas prolongaciones primarias se van subdividiendo a lo largo de su recorrido en otras secundarias que se entremezclan con las procedentes de los astrocitos vecinos para constituir la pared del tubo glial. Además, también poseen otra serie de prolongaciones de menor calibre que se extienden radialmente desde su pericarion, dirigiéndose tanto hacia el interior del tubo glial disponiéndose perpendiculares a los axones, fasciculándolos aún más; como hacia los vasos sanguíneos que discurren por el interior de las paredes de los mismos, colocándose sobre ellos y contribuyendo a su envuelta perivascular astrogial (Fig. 17, 38).

En secciones transversales se aprecia claramente como la pared de estos tubos está formada por la superposición de dos o tres células de este tipo; que tienden a agrupar sus núcleos en zonas concretas, pudiendo estar formado el perímetro de la circunferencia del tubo por un número variable de estas células, dependiendo del diámetro del mismo (Fig. 37,39).

En secciones longitudinales, vemos en muchas ocasiones, cómo estos tubos cilíndricos siguen un trayecto rectilíneo muy regular. Cuando el corte longitudinal ha seccionado la luz de un tubo, la imagen que se obtiene de la pared que permanece, es la de una hilera, de dos o tres filas de núcleos situadas

aproximadamente a la misma altura, generalmente sobre o cerca de un vaso sanguíneo. Esta hilera de núcleos recorre el tubo en su eje longitudinal, y de ella parten gruesas prolongaciones hacia ambos lados de los somas para delimitar la pared del tubo, a la vez que otras se dirigen hacia el vaso. La sumación de las reacciones PGFA(+) de las prolongaciones de los dos o tres astrocitos dispuestos al mismo nivel, produce un aspecto general desflechado (Fig. 9,10,17,35,39,40).

Estos tubos gliales corren paralelos al eje del N.O., en sentido rostro-caudal, disponiéndose paralelos entre sí, y en contacto unos con otros.

Finalmente, también hemos encontrado astrocitos que disponen su pericarion en el interior de la luz del tubo glial, mandando sus prolongaciones radialmente hacia las paredes del mismo. Esta situación tiene lugar cuando se está produciendo la subdivisión del tubo glial en otros dos de menor diámetro, lo que ocurre con mayor frecuencia según nos vamos aproximando hacia la región laminar. Esto hace que se produzca un aumento en el número de tubos gliales en sentido rostro-caudal (antero-posterior), a la vez que tiene lugar como consecuencia, la disminución del diámetro de los mismos (Fig. 39,40).

En la zona de transición entre esta zona y la región laminar, podemos ver como las aperturas de los tubos gliales prelaminares quedan perfectamente enfrentadas a los orificios laminares, de tal forma, que los haces de fibras nerviosas son conducidos por los tubos gliales introduciéndose en los poros de la

lámina cribosa (Fig. 41).

Los vasos centrales al atravesar esta zona prelaminar, siguen estando rodeados por la limitante derivada del menisco central de Kuhnt, constituida por astrocitos de cuerpo celular grueso, que se disponen rodeándolos, constituyendo varias capas. Es esta parte del N.O. donde los vasos centrales poseen mayor cantidad de tejido astroglial envolviéndolos, pudiéndose incluso llegar a distinguir hasta 11 ó 12 capas de astrocitos dispuestos de forma tan compacta que adquieren un aspecto aplanado; y así, en secciones transversales (a 6  $\mu\text{m}$ .), contrastadas con hematoxilina, aparecen como bandas concéntricas a los vasos y con numerosos núcleos teñidos de morado (Fig. 42). Los astrocitos más cercanos al parénquima del N.O. presentan un aspecto más estrellado con 5-6 gruesas prolongaciones primarias que se introducen, por un lado hacia la limitante, y por otro hacia los tubos gliales cercanos, contribuyendo a su formación. A su vez, los astrocitos que forman las paredes de estos tubos gliales, también mandan ramificaciones que se dirigen hacia la limitante que separa los vasos centrales, interviniendo en la constitución de sus capas más externas (Fig. 43).

Por último, indicar, que en el interior de los tubos gliales, en las preparaciones a 20-30  $\mu\text{m}$ ., se distinguen con frecuencia astrocitos con baja

inmunoreactividad PGFA(+) y cuerpo celular pequeño, que presentan todas sus características morfológicas ya descritas anteriormente.

Estas células se sitúan muy cercanas a la superficie interna de la pared del tubo glial, enviando parte de sus prolongaciones radiales pequeñas hacia estas paredes; mientras que, la prolongación rectilínea de gran longitud, adopta un trayecto paralelo a dicha pared y por lo tanto, al de los axones.

Hay que resaltar aquí, que hemos observado como dos astrocitos de este tipo situados en el interior de un mismo tubo glial, orientaban su prolongación larga y rectilínea en sentidos opuestos. Así, mientras que una presentaba un sentido rostral, la derivada del otro astrocito se orientaba en sentido contrario, es decir, hacia la parte caudal del N.O.; por lo que podemos afirmar que las prolongaciones largas se pueden dirigir indistintamente hacia la parte anterior o posterior del N.O.

(Fig. 24)

### **C.- REGIÓN LAMINAR.**

En esta región, el N.O. atraviesa la túnica externa o fibrosa del ojo, a través de una serie de orificios redondo-ovales que la esclerótica deja para el paso de las fibras en la estructura denominada lámina cribosa (Fig. 1).

En los cortes transversales contrastados con picroindigocarmín, se aprecia claramente cómo es tejido colágeno el que va a constituir el armazón principal de la lámina cribosa. Este tejido colágeno se origina de expansiones de los 2/3 posteriores de la esclera, que se introducen en el N.O., atravesándolo perpendicularmente para dirigirse hacia el tabique conectivo que rodea los vasos centrales. Las fibras colágenas se disponen en forma de hojas o "lamellas" que presentan numerosas perforaciones que se alinean entre sí para formar canales que permiten el paso de los haces nerviosos (Fig. 12).

Por el interior de estas lamínillas colágenas se introducen, desde los territorios periféricos, los vasos derivados del sistema ciliar y del Círculo de Zinn-Haller.

Con respecto a la glioarquitectura de esta región, llama la atención la disminución acusada del tejido glial, que queda únicamente recubriendo la cara interna de las laminillas cribosas. Esto se observa con nitidez en las preparaciones contrastadas con picroindigocarmín, en las que las lamellas de colágeno teñidas de azul presentan en su interior una fina banda de color pardo, que se corresponde con la tinción PGFA(+) (Fig. 12).

Esta inmunorreactividad positiva procede de astrocitos de cuerpo celular grueso, que se disponen en una única capa sobre la cara interna del poro criboso, siendo de tres a cinco células astrogliales las que recubren toda la circunferencia

del poro, dependiendo del diámetro de éste (Fig. 18, 41).

El cuerpo celular de estos astrocitos es aplanado, y se encuentra adosado sobre la cara interna del orificio laminar, partiendo de cada lado 3-5 gruesas prolongaciones que bordean el contorno del poro, juntándose con las prolongaciones de los otros astrocitos, para recubrirlo totalmente, y separar el tejido colágeno de naturaleza mesodérmica, del tejido neuronal que constituye el fascículo axonal (Fig. 18). Del soma de estos astrocitos parten radialmente prolongaciones primarias más finas que se introducen en el fascículo axonal subdividiéndolo en compartimentos más pequeños.

En algunas ocasiones, el cuerpo celular de estos astrocitos hace protusión hacia el interior del poro, adquiriendo estas células el aspecto de "astrocitos que cuelgan" del tejido conectivo (Fig. 44).

En los canales de mayor diámetro, es frecuente encontrarnos con astrocitos similares a los que recubren sus paredes internas, pero situados centralmente en el interior de los canales. En estos casos, estas células adquieren un aspecto más estrellado enviando sus prolongaciones gruesas de forma radial hacia las paredes del canal, dividiéndolo en otros dos más pequeños.

Los vasos centrales cuando atraviesan esta región del N.O., al igual que

ocurría en la región prelaminar y C.S.F.N., se encuentran rodeados por astrocitos de cuerpo celular grueso que se agrupan formando varias capas concéntricas a la A.C.R. y V.C.R.; aunque este recubrimiento glial de los vasos centrales empieza a perder importancia en esta región del nervio y ya no está constituido por tantas capas como nos encontrábamos en la prelaminar.

Asimismo, estas capas de células astrogliales que disponen sus prolongaciones formando bandas concéntricas a los vasos centrales, se encuentran interrumpidas por la salida desde el tejido conectivo perivascular, de trabéculas de tejido colágeno que se dirigen para contactar y entremezclarse con las hojas de la lámina cribosa (Fig. 45).

Para terminar las observaciones referidas a esta región, volvemos a detectar la presencia de los astrocitos de baja inmunoreactividad PGFA(+), que se disponen en el interior de los canales cribosos, llevando su prolongación larga un trayecto paralelo al de los axones.

#### **D. REGIÓN RETROLAMINAR.**

Esta región del N.O. se extiende desde el final de la lámina cribosa, hasta la zona en la que los vasos centrales entran en el nervio, y en ella se produce un

incremento en el diámetro como consecuencia de la mielinización de los axones (Fig. 1).

En imágenes sagitales del N.O. con pocos aumentos, podemos observar la organización general de esta zona. Así vemos como el N.O. se encuentra dividido en fascículos que están separados entre sí por septos o tabiques conectivos (Fig. 2, 13, 14, 16).

Estos tabiques provienen, por un lado del tejido conectivo de la piamadre que se introduce hacia el N.O. desde los bordes, acompañando a las arteriolas piales del sistema ciliar, que van a vascularizar las zonas periféricas del nervio (Fig. 13). Y por otro lado, son septos derivados de la vaina conectiva de los vasos centrales que emite ramificaciones, recubriendo la salida de arteriolas procedentes de la A.C.R. que van a vascularizar todo el área axial del N.O. (Fig. 14).

Además, la forma cóncava de la lámina cribosa hace que en la parte más central, los tabiques que constituyen el final de la lámina se entremezclen con los que parten de los vasos centrales; esto va a producir una mayor desorganización del tejido en esta zona con respecto al que lo rodea más periféricamente (Fig. 46).

En esta parte del N.O., observamos como se produce un incremento en el número de núcleos y por lo tanto en el de células existentes, lo que se aprecia

claramente en las preparaciones teñidas con hematoxilina-eosina. Este incremento celular se debe a la aparición, en la región retrolaminar, de las células oligodendrogiales, que van a ser las encargadas de mielinizar los axones procedentes de las células ganglionares retinianas.

La distinción entre astrocitos y oligodendrocitos no presenta gran dificultad, ya que el marcador utilizado, el anti-PGFA no marca a los oligodendrocitos. En las secciones contrastadas con tinción nuclear, estas últimas células, los oligodendrocitos, se aprecian con un núcleo pequeño y redondo más fuertemente teñido con la hematoxilina y rodeado por una zona clara que se corresponde con su citoplasma (Fig. 47).

Estos oligodendrocitos se van a disponer generalmente en columnas alternando con los astrocitos, situándose tanto dentro de los haces nerviosos entre los axones, como dentro de las paredes de los tabiques que delimitan los fascículos.

En esta región nos volvemos a encontrar con una nueva limitante glial separando el N.O. del tejido circundante. Esta membrana limitante esta compuesta por la acumulación de 4 a 6 capas de astrocitos de cuerpo celular grueso que se disponen entre el parénquima nervioso y las vainas meníngeas que lo recubren, correspondiéndose con el manto periférico glial de Greef (Fig. 13, 16).

La acumulación de células en esta zona y su fuerte señal PGFA(+) hace que

en cortes transversales únicamente se pueda distinguir los núcleos astrogiales que resaltan entre un tejido con una inmunorreactividad muy intensa. No obstante, en ocasiones, se ha podido individualizar alguna de las células que constituyen este manto periférico y que estaba situada más hacia el interior, próxima al tejido del N.O., apreciándose como su morfología coincide con la de los otros astrocitos que constituyen las otras limitantes ya descritas, es decir, son células con un núcleo oval, rodeado por un pericarion fuertemente PGFA(+) del que parten 4-5 prolongaciones primarias gruesas (Fig. 16).

Los astrocitos de esta limitante más próximos al parénquima del nervio participan tanto en la formación del manto periférico, como en la fasciculación de los axones nerviosos, e incluso pueden mandar prolongaciones perivasculares. Por el contrario, según nos vamos introduciendo en la membrana limitante hacia la piamadre, estos astrocitos adquieren un aspecto más aplanado emitiendo sus prolongaciones más paralelas entre sí (Fig. 13, 16).

Cuando se produce la entrada de un vaso sanguíneo pial hacia el interior del N.O., los astrocitos que constituyen la limitante se introducen también hacia el nervio bordeando el tabique conectivo del vaso, constituyendo la primera parte de su envuelta astrogial, para ser después sustituidos progresivamente por los astrocitos situados en el interior del N.O. (Fig. 13, 16).

Las células astrogliales de la región retrolaminar, presentes en el interior del N.O., son mayoritariamente astrocitos de cuerpo celular grueso, con un patrón morfológico estrellado. Estas células poseen un núcleo de forma irregular, que se dispone desplazado hacia un lateral, rodeado de un citoplasma con alta reactividad PGFA(+), y del que parten de 5 a 8 gruesas prolongaciones primarias (Fig. 19, 20, 21).

Sin embargo, dependiendo de que el astrocito este formando parte de la pared del tabique que delimita el haz axonal (en íntimo contacto con los septos conectivos), o bien, este situado más o menos en el interior del fascículo; el patrón de orientación de sus prolongaciones varia, para adaptarse a las condiciones específicas de su localización.

Los astrocitos intrafasciculares, con una morfología menos estrellada, presentan el núcleo sobre las paredes de los tabiques, en contacto con el tejido conectivo, y sus prolongaciones primarias gruesas forman, junto con las que proceden de otros astrocitos similares, una pared glial que recubre todo el perímetro del septo conectivo separándolo del tejido nervioso. Además, estas prolongaciones primarias gruesas se subdividen en otras secundarias más finas que se dirigen hacia el interior del fascículo. Los somas de estos astrocitos no tienen una disposición concreta, pudiendo aparecer tanto aislados como en grupos de tres

o cuatro (fig. 14, 47).

Los astrocitos con el cuerpo celular situado interfascicularmente presentan una disposición de sus prolongaciones primarias más radial, lo que les confiere una apariencia más estrellada.. Estas prolongaciones parten del soma extendiéndose en todas las direcciones, subdividiéndose en ramificaciones secundarias de menor calibre que se interponen entre los axones que constituyen el haz, formando un denso entramado de finas fibras que subdivide totalmente el interior de los fascículos (Fig. 13, 48).

Las prolongaciones de estas células pueden dirigirse, hacia las paredes gliales contribuyendo en su formación; hacia los capilares para formar parte de su envuelta astrogial; y asimismo, también pueden rodear el citoplasma de un oligodendrocito (Fig. 49).

También es frecuente observar, como dos de estos astrocitos disponen sus núcleos muy próximos entre sí, juntando su pericarion, y enviando todas sus prolongaciones en sentido contrario uno respecto del otro, presentando estos astrocitos el aspecto de "células gemelas" (Fig. 50).

Como ocurre en el resto del N.O., y ya hemos indicado en otras ocasiones, todos los vasos sanguíneos existentes en esta región están completamente rodeados

por prolongaciones astrogliales perivasculares; y así, cuando un capilar se introduce dentro de un fascículo axonal, se encuentra rodeado por varias células astrogliales que sitúan sus somas, o directamente sobre la pared del vaso, o a cierta distancia enviando prolongaciones perivasculares que lo rodean completamente (Fig. 13, 14, 51).

Con respecto a los vasos centrales, observamos que están rodeados por una banda PGFA(+) que los separa de las fibras nerviosas. Esta envuelta astrogliar está constituida por astrocitos de cuerpo celular grueso. Estos astrocitos se van a ir agrupando para constituir, con sus núcleos y prolongaciones, de dos a tres capas concéntricas a los grandes vasos centrales (Fig. 52).

Los astrocitos situados en la capa más externa, participan con sus prolongaciones tanto en la formación de la envuelta de los vasos, como en la fasciculación axonal; y del mismo modo, los astrocitos de los tabiques conectivos más cercanos, también envían prolongaciones hacia esta limitante (Fig. 53).

Además, como indicábamos en un principio, el contacto entre los paquetes conectivos del final de la lámina cribosa y los septos que parten desde los vasos centrales, hace que los fascículos de posición central, próximos a la A.C.R. y V.C.R., se organicen de forma especial.

Así, tenemos que, mientras los fascículos superiores e inferiores son más o menos esféricos, los laterales (nasales y temporales) presentan una morfología irregular, tendiendo a ser ovalados. En estos fascículos, las prolongaciones astrogliales interfasciculares se orientan de forma más paralela y alargada entre sí, de como lo hacen en los otros fascículos de las otras áreas de esta región. (Fig. 14, 46, 53)

Finalmente, en esta región retrolaminar, también hemos podido constatar la existencia de los astrocitos de cuerpo celular pequeño y baja inmunoreactividad PGFA(+), que se disponen interfascicularmente entre las fibras nerviosas.

En las secciones longitudinales de 20-30  $\mu\text{m}$ . se aprecia como son similares a los descritos en las regiones prelaminar y laminar, presentando un soma pequeño del que salen, a modo de corona radial, varias prolongaciones finas y cortas; partiendo de uno de los polos una larga, fina y rectilínea prolongación que se dispone paralela al curso de los axones (Fig. 54). Sin embargo, en secciones transversales, su baja inmunoreactividad hace que sea muy difícil su diferenciación ya que quedan completamente enmascarados entre la red de ramificaciones procedentes de las otras células astrogliales, que son más fuertemente PGFA(+).

Los resultados de las observaciones a microscopía óptica se encuentran representados de forma esquemática en las figuras 71,72,73,74 y 75, en las cuales se ha realizado una reconstrucción tridimensional de la diferente organización de los astrocitos en cada una de las regiones del nervio estudiadas:

Fig. 71: Resconstrucción de la cabeza del N.O.

Fig. 72: Capa Superficial de Fibras Nerviosas

Fig. 73: Región Prelaminar anterior

Fig. 74: Región Prelaminar posterior

Fig. 75: Región Laminar

## **4.2.- OBSERVACIONES A MICROSCOPIA ELECTRÓNICA.**

Para completar nuestros resultados obtenidos con las técnicas inmunohistoquímicas, hemos realizado un estudio ultraestructural de los astrocitos en las diferentes regiones del nervio.

Además, debemos tener en cuenta que el anticuerpo empleado como marcador, el anti-PGFA, se une a los filamentos intermedios gliales, siendo por tanto de interés determinar su abundancia así como su localización en estas células astrogliales.

### **4.2.1.- ULTRAESTRUCTURA DE LOS ASTROCITOS QUE CONSTITUYEN LAS LIMITANTES GLIALES DEL NERVIO ÓPTICO.**

Todas las limitantes del N.O.: membrana limitante de Elschnig, menisco central de Kuhnt, tejido intermediario de Kuhnt, tejido de Jacoby, y manto periférico de Greef, están constituidos por células astrogliales que presentan los mismos rasgos ultraestructurales.

Son células con un núcleo de forma oval, aunque podemos encontrarnos formas más aplanadas; con un aspecto pálido, y en el que se distinguen acúmulos de heterocromatina localizados próximos a la membrana nuclear.

El citoplasma perinuclear es amplio y en él se pueden distinguir diversas organelas: mitocondrias de tamaño grande, retículo endoplásmico rugoso, ribosomas libres, aparato de Golgi. Además, poseen gránulos de glucógeno y gran abundancia de cuerpos densos que aparecen también incluso dentro de las prolongaciones (Fig. 55). Aquí, debemos señalar, que en los astrocitos que forman el tejido intermediario de Kuhnt y el de Jacoby, hemos encontrado gran abundancia de gránulos de melanina fagocitados (Fig. 55).

Pero, el rasgo más característico de estas células, y del resto de los astrocitos del nervio como veremos posteriormente, es la gran cantidad de filamentos intermedios gliales que se encuentran agrupados en densos paquetes tanto en su pericarion como en las prolongaciones. La abundancia de estos filamentos, facilita enormemente el reconocimiento e identificación de los astrocitos a microscopía electrónica.

Estos filamentos se distribuyen por el interior de las prolongaciones astrogliales formando haces paralelos entre sí, que van a rellenar casi completamente toda la prolongación, aunque también podemos encontrarnos con

algunas mitocondrias y cuerpos densos.

Las prolongaciones de los astrocitos de las limitantes se disponen muy empaquetadas, corriendo paralelas entre sí, y contactando sus membranas sin dejar prácticamente un espacio de separación entre ellas (Fig. 56).

#### **4.2.2.- CAPA SUPERFICIAL DE FIBRAS NERVIOSAS.**

Los astrocitos que constituyen el armazón astrogial de esta región poseen un núcleo oval con abundante cromatina y acúmulos de heterocromatina, y se encuentra rodeado por una fina banda de citoplasma (Fig. 57).

En este citoplasma también nos encontramos con la existencia de: mitocondrias de tamaño mediano o pequeño, retículo endoplásmico rugoso, ribosomas libres, y aparato de Golgi; apareciendo también los cuerpos densos, y abundantes filamentos intermedios gliales que se van a extender por sus todas sus prolongaciones (Fig. 57).

*De cada polo del pericarion parten una o dos prolongaciones rectilneas que se interponen entre los axones de las células ganglionares, que en esta región son*

amielínicos, siguiendo una trayectoria paralela a su curso. Estas prolongaciones no tienen un diámetro excesivamente grueso (Fig. 57).

#### **4.2.3.- REGIÓN PRELAMINAR.**

##### **A.- Región prelaminar anterior.**

La ultraestructura de estos astrocitos es semejante a la que presentaban los astrocitos de la C.S.F.N., con un núcleo oval con abundante cromatina y heterocromatina. El citoplasma perinuclear es escaso, limitándose a una fina banda que rodea la membrana nuclear, estando las organelas citoplasmáticas (mitocondrias, ribosomas libres, retículo endoplásmico rugoso, aparato de Golgi) concentradas hacia los polos celulares (fig. 58).

Las prolongaciones, de estos astrocitos parten de este citoplasma en varias direcciones, dando a la célula un aspecto más radial. Estas ramificaciones se distribuyen interponiéndose entre los axones, comenzando a agruparlos, para formar los haces o fascículos del N.O. Con respecto a su diámetro, éste es equivalente al de las de los astrocitos de la C.S.F.N., aunque al ramificarse más, pueden aparecer prolongaciones secundarias más finas separando individualmente

a un axón con respecto a los vecinos (Fig. 58).

Tanto el pericarion como las prolongaciones, contienen abundantes filamentos intermedios gliales.

#### **B.- Región prelaminar posterior.**

Nos encontramos aquí, con astrocitos con un núcleo ovoideo más o menos alargado y con abundante cromatina, estando la heterocromatina dispuesta fundamentalmente sobre la membrana nuclear (Fig. 59).

El citoplasma perinuclear no es muy voluminoso, y en él volvemos a observar todas las organelas típicas: ribosomas libres, retículo endoplásmico rugoso, abundante aparato de Golgi, y mitocondrias de tamaño mediano o grande. Asimismo también hay inclusiones intercitoplásmicas como son los gránulos de glucógeno, lipofuchsina, cuerpos densos, y abundantes filamentos intermedios. Todos estos elementos, debido a la morfología más o menos alargada de estos astrocitos, se van a concentrar en los dos polos de la célula (Fig. 59).

De estos polos se observa como parten las prolongaciones que se disponen perpendiculares al curso axonal, siendo las fibras nerviosas todavía amiélinicas. El interior de estas prolongaciones astrogliales se encuentra ocupado por abundantes y gruesos paquetes de filamentos gliales que rellenan la mayor parte del espacio de estas ramificaciones (Fig. 60).

Con respecto a su diámetro, las prolongaciones de los astrocitos de la zona posterior prelaminar son más gruesas que las que presentan los astrocitos de la región prelaminar anterior (Fig. 60).

En muchas ocasiones estas prolongaciones se disponen paralelas entre sí, unas sobre otras, rodeando y agrupando en fascículos a los axones de las células ganglionares; pudiendo observar como forman las paredes de las estructuras que delimitan estos fascículos, y como también se pueden dirigir hacia el interior de los haces nerviosos (Fig. 61).

#### **4.2.4.- REGIÓN LAMINAR.**

Los astrocitos que se localizan en esta región son similares a los que se encuentran en la prelaminar posterior. Poseen un núcleo alargado con cromatina

y acúmulos de heterocromatina; y en el citoplasma que lo rodea nos volvemos a encontrar con retículo endoplásmico rugoso, ribosomas libres, aparato de Golgi, mitocondrias, cuerpos densos, lipofuchsina, y abundantes filamentos intermedios gliales formando paquetes (fig. 62).

Estas células se disponen adosadas internamente al colágeno que constituye las laminillas cribosas, dispuestas en una única capa, interponiéndose entre éste y el tejido nervioso del interior de los fascículos (Fig. 62).

Además aparece una banda menos densa a los electrones, que se corresponde con una membrana basal que se sitúa, a modo de línea de separación, entre los astrocitos y el colágeno (Fig. 62).

También, se puede observar con frecuencia como prolongaciones astrogliales más finas se introducen radialmente hacia las fibras nerviosas subdividiendo los fascículos en grupos de axones más pequeños (Fig. 62).

#### **4.2.5.- REGIÓN RETROLAMINAR.**

Ultraestructuralmente, los astrocitos de esta región se caracterizan por presentar un núcleo con morfología oval o irregular, con aspecto más claro que

los de las otras regiones del N.O., y con acúmulos de heterocromatina de disposición fundamentalmente perinuclear (Fig. 63).

El citoplasma que rodea a este núcleo es muy voluminoso, con abundantes organillos distribuidas en todo su interior, destacándose la gran cantidad de ribosomas libres, retículo endoplásmico rugoso, aparato de Golgi, y pequeñas mitocondrias, detectándose también e estos astrocitos, la presencia de glucógeno, cuerpos densos, y acúmulos de lipofuchsina. Este citoplasma contiene filamentos intermedios orientados de forma paralela entre sí, que son muy abundantes tanto en la región perinuclear como en las prolongaciones (Fig. 63).

Además, en esta región los axones ya están mielinizados, y por eso en alguna ocasión hemos podido observar fragmentos de mielina en el interior del citoplasma de estas células, que están siendo digeridos (Fig. 64).

Estos astrocitos se disponen tanto en el interior de los fascículos nerviosos como en la periferia de éstos, interponiéndose entre los axones y los septos conectivos presentes en esta región.

Cuando están próximos a los septos se encuentran sobre una membrana basal, de aspecto más claro, insertándose en ella los filamentos gliales, dando imágenes semejantes a hemidesmosomas (Fig. 63).

Estos astrocitos intrafasciculares pueden situarse de forma más o menos aislada, o muy próximos entre sí, formando agrupaciones de dos o tres células (Fig. 68). Las prolongaciones que se originan de estos astrocitos forman una capa que envuelve a los axones separándolos del tejido conectivo; pudiéndose observar asimismo numerosas prolongaciones que cruzan por el interior de los fascículos subdividiéndolos.

#### **4.2.6.- RELACIONES ENTRE LOS ASTROCITOS: UNIONES INTERASTROCITARIAS.**

En todas las regiones del N.O. humano estudiadas hemos observado la existencia de dos tipos de uniones entre los astrocitos: uniones tipo "Gap" (Fig. 65) y desmosomas (Fig. 66).

Los astrocitos que fasciculan los axones en las regiones prelaminar, laminar y retrolaminar; así como, los que constituyen las distintas limitantes, son los que presentan el mayor número de estas uniones. Esto es debido a que disponen frecuentemente sus prolongaciones de forma paralela durante largos trayectos, a la vez que también están generalmente más agrupados.

#### **4.2.7.- RELACIONES VASO-GLIALES.**

Los astrocitos en el nervio, además de aislar los axones, también contactan y rodean a los vasos sanguíneos presentes en estas regiones estudiadas; de manera que, todos los vasos sanguíneos presentes en el nervio, desde los grandes vasos centrales como la A.C.R. y la V.C.R., hasta los más pequeños capilares, están completamente rodeados por prolongaciones y somas astrogliales.

En los capilares, las prolongaciones perivasculares astrogliales terminan directamente sobre la membrana basal que rodea a las células endoteliales y pericitos, rodeando todo su perímetro (Fig. 67).

En los vasos de mayor calibre, podemos diferenciar varias capas, encontrándonos primeramente con las células endoteliales separadas de las células musculares lisas que las rodean, por su membrana basal; a continuación, está la adventicia del vaso, constituida por fibras de colágeno, sobre la que se dispone una nueva basal. Es a esta basal donde van a llegar las prolongaciones, procedentes de varios astrocitos, que se disponen unas a continuación de las otras, para formar una envuelta perfecta y continua (Fig. 68).

Asimismo, y por último, señalar que también hemos observado, en ocasiones, cuerpos celulares de astrocitos dispuestos sobre, o muy próximos, a las paredes de los vasos sanguíneos, contribuyendo en la formación de la limitante vascular glial.

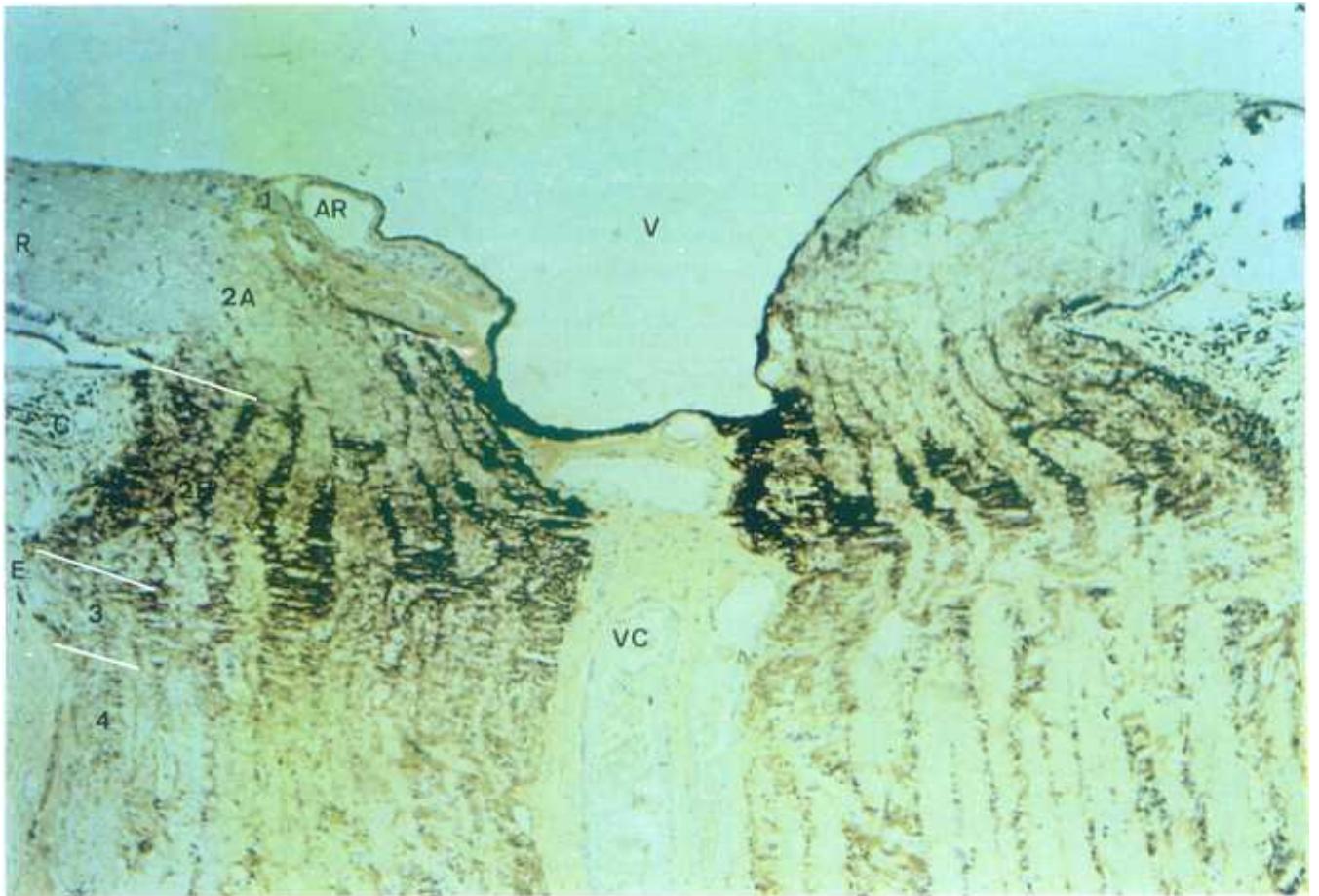
#### **4.- RESULTADOS: Figuras**

**Fig. 1:** Sección histológica (6  $\mu\text{m}$ .) teñida con anti-PGFA, en la que se muestran las diferentes regiones que constituyen la cabeza del N.O. humano: C.S.F.N. (1), región prelaminar (anterior [2A], posterior [2B]), región laminar (3), y región retrolaminar (4). (63x).

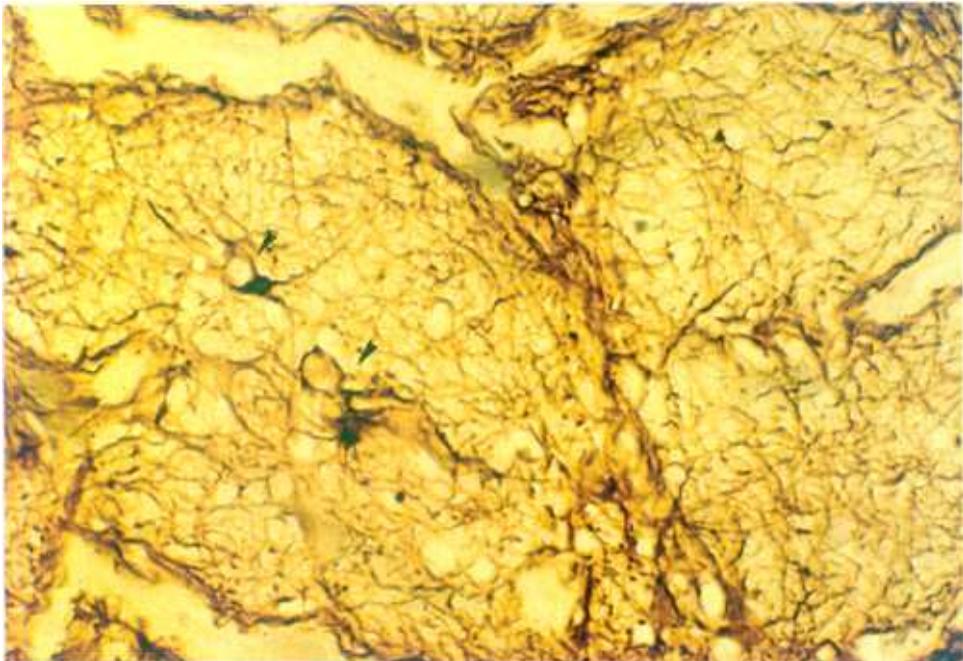
(A.R.: arteriolas retinianas; C: coroides; E: esclera; R: retina; V: vítreo; V.C.: vasos centrales).

**Fig. 2:** Astrocitos PGFA(+) ( $\blacktriangleright$ ). Se aprecia la fuerte reacción positiva tanto en el citoplasma perinuclear como en las prolongaciones, delimitándose los núcleos sin reacción.

(Región retrolaminar; sección transversal, 6  $\mu\text{m}$ .; Inmunoperoxidasa con anti-PGFA; 500x)



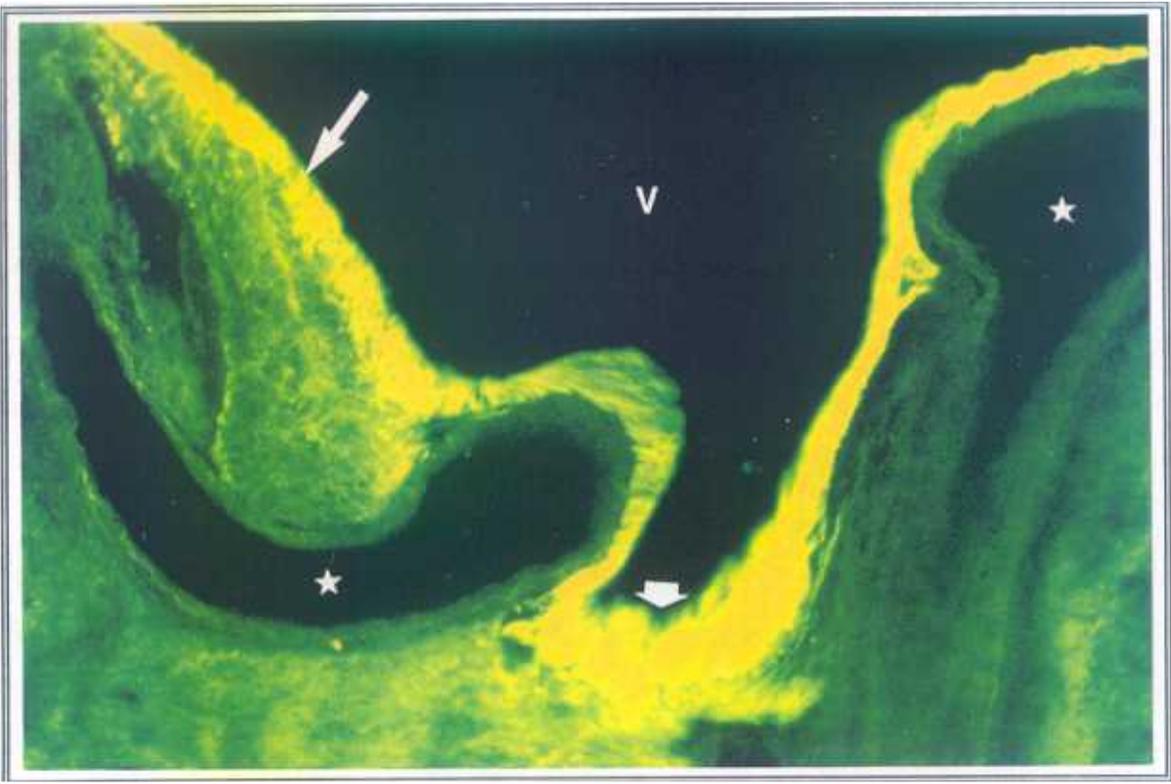
**FIG.**



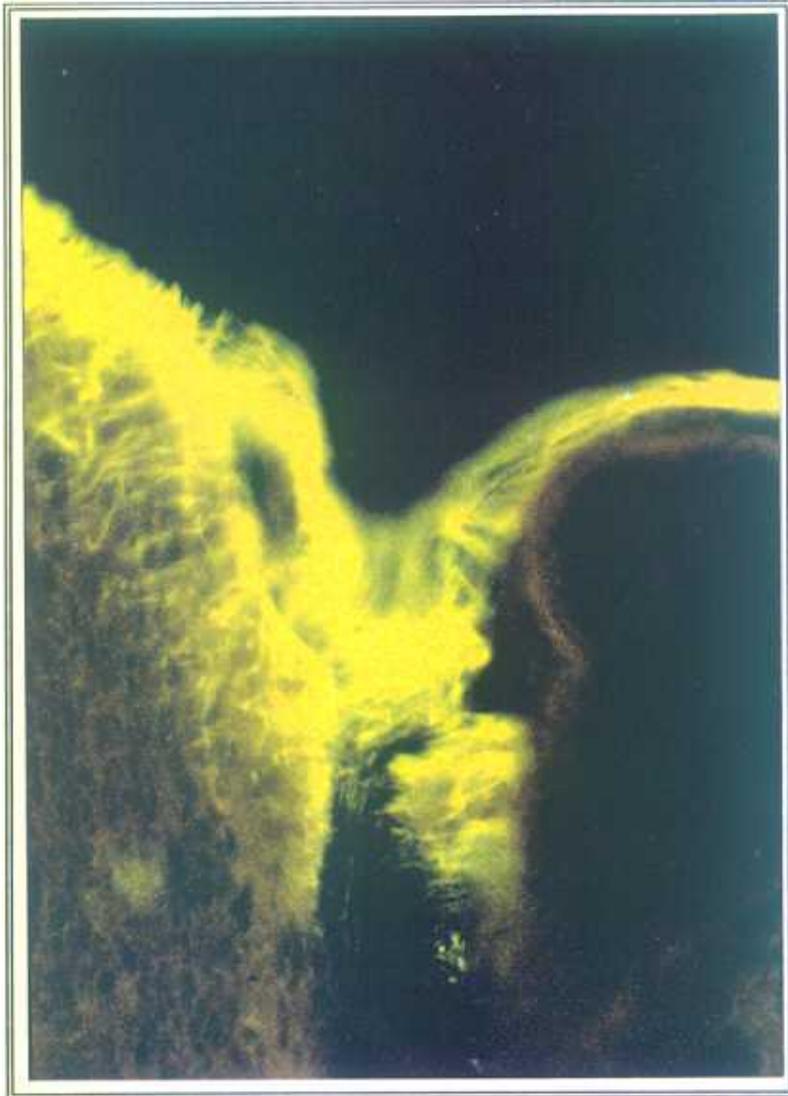
**FIG. 2**

**Fig. 3:** C.S.F.N.: Limitante de Elschnig (→) y Menisco central de Kuhnt (▲).  
Sección longitudinal (6 $\mu$ m.) en la que se aprecia la fuerte inmunofluorescencia que presentan las limitantes que separan el tejido del N.O. del vítreo.  
(Inmunofluorescencia-(FITC) con anti-PGFA; 400x).  
(V: vítreo; \*: vasos centrales).

**Fig. 4:** Menisco central de Kuhnt.  
(Sección longitudinal, 6  $\mu$ m.; inmunofluorescencia (FITC) con anti-PGFA; 500x)



**FIG. 3**



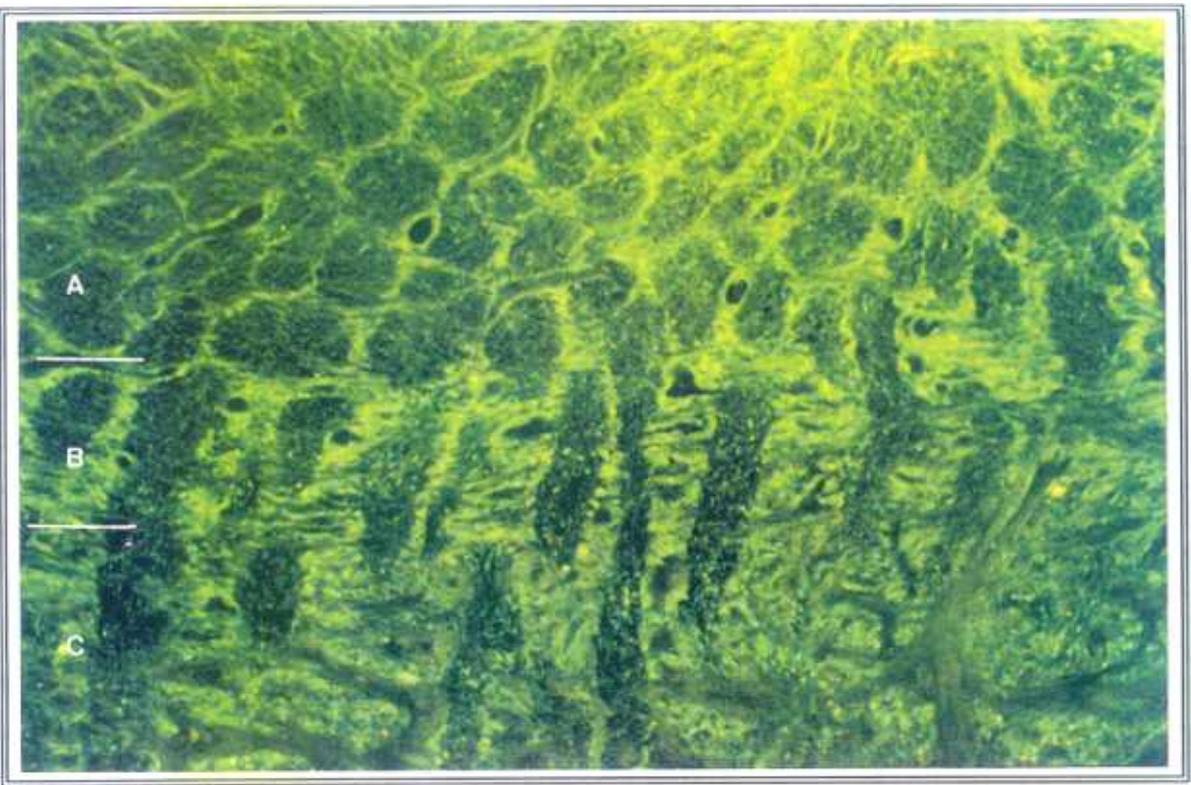
**FIG. 4**

**Fig. 5A, B: Región prelaminar.** Secciones longitudinales de N.O. (12  $\mu$ m.) en las que se observan las regiones prelaminar anterior y posterior. En la región prelaminar anterior (A), la cantidad de tejido marcado con el anti-PGFA es menor que en la zona posterior (B).

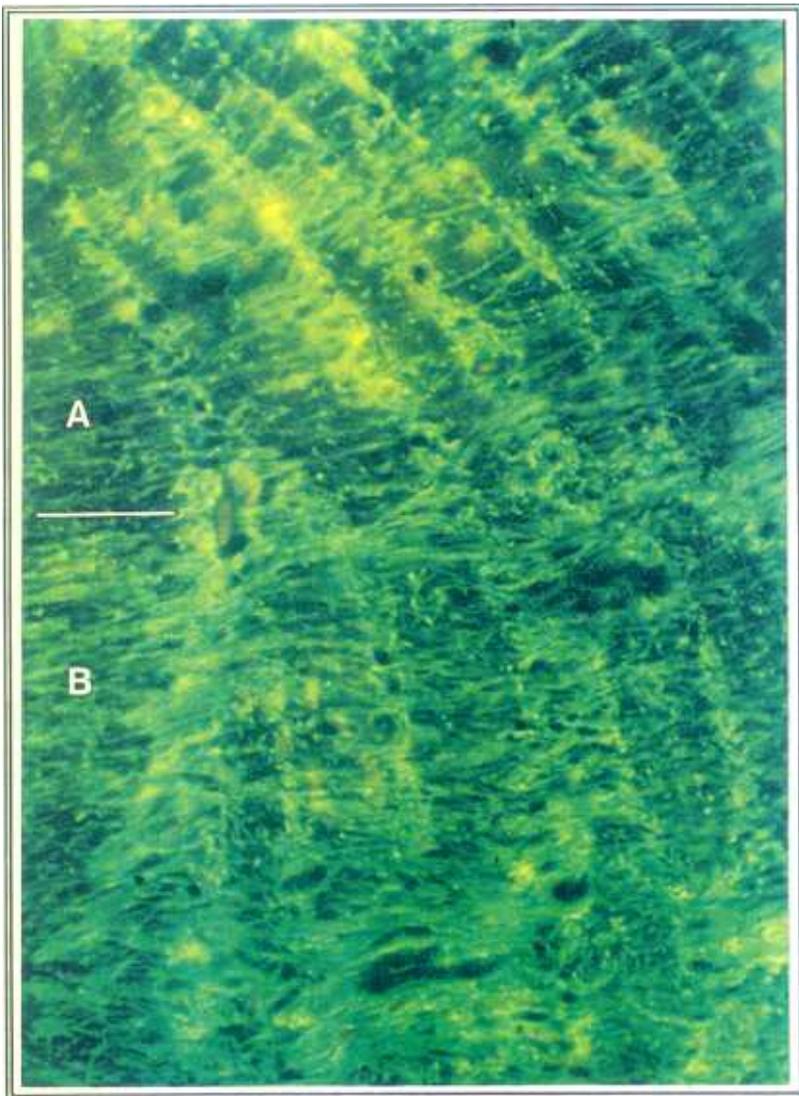
En la región prelaminar anterior, los astrocitos se disponen en columnas, que alternan con bandas de menor inmunorreactividad. En la región prelaminar posterior, los astrocitos se disponen formando bandas anchas que se alternan con bandas debilmente PGFA(+).

En la Fig. 5A, el corte es oblicuo, apreciándose la disposición en celdillas de los astrocitos en la reg. prelaminar anterior.

También se observa la región laminar (C), con inmunorreactividad PGFA(+) menos intensa que en la región prelaminar. (Inmunofluorescencia-FITC con anti-PGFA; 156 $\times$ ).



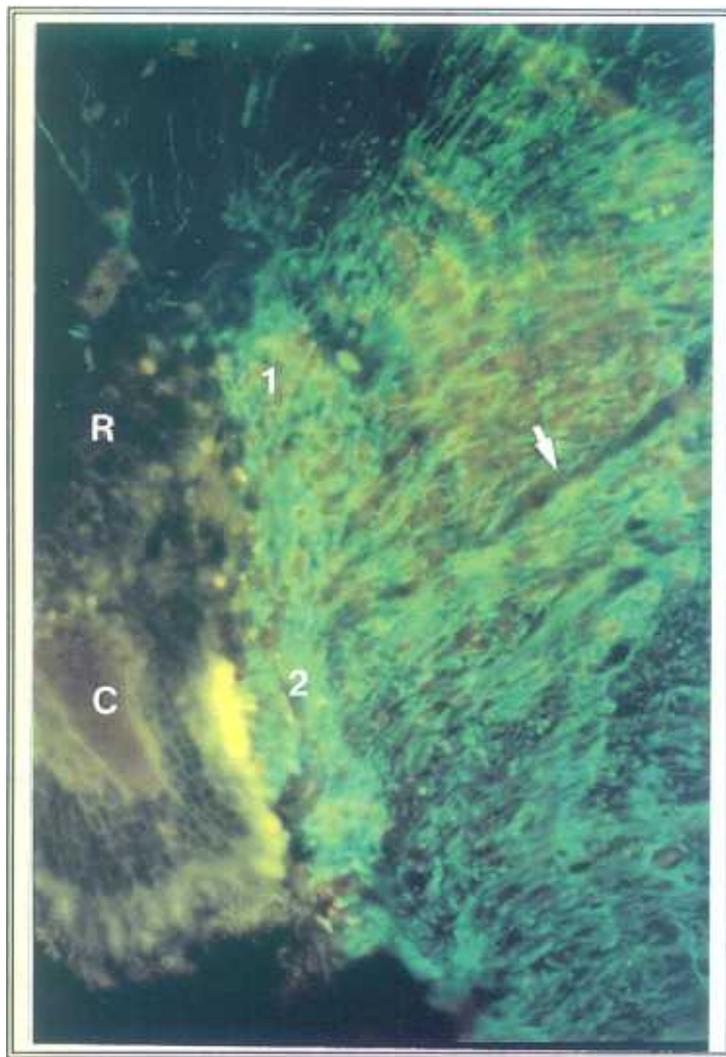
**FIG. 5A**



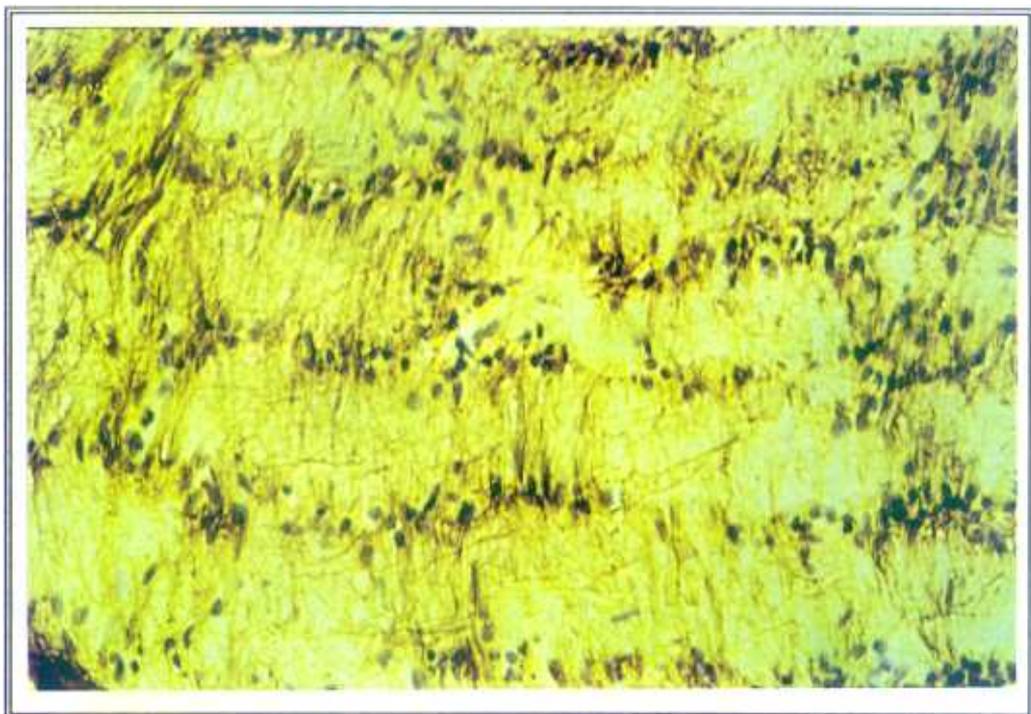
**FIG. 5B**

**Fig. 6: Región prelaminar:** Area con forma elipsoideal, fuertemente PGFA(+) entre el N.O. y los tejidos oculares circundantes: retina y coroides. Esta zona se corresponde con el tejido intermediario de Kuhnt (1) (entre N.O. - retina), y con la membrana limitante de Jacoby (2) (entre N.O. - coroides). Ambas limitantes están constituidas por astrocitos de cuerpo celular grueso, y de ellas parten prolongaciones radiales PGFA(+) con trayectoria rectilínea, que acompañan a los vasos que penetran en el nervio desde la coroides [→]  
(Sección longitudinal (12 $\mu$ m.); Inmunofluorescencia-FITC con anti-PGFA; 312 $\times$ ).  
(C: coroides; R: retina)

**Fig. 7: Región prelaminar.** Los núcleos de los astrocitos se disponen formando columnas emitiendo prolongaciones perpendiculares al eje del N.O. para ayudar a la fasciculación axonal.  
(Sección longitudinal (12 $\mu$ m.) Inmunoperoxidasa con anti-PGFA contrastada con hematoxilina; 156 $\times$ ).



**FIG. 6**

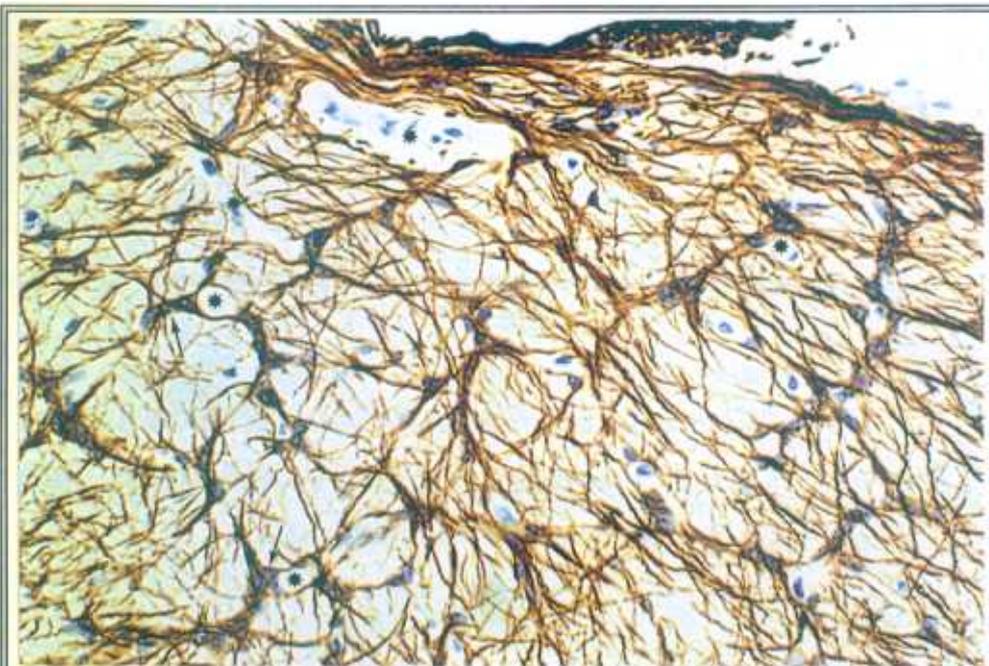


**FIG. 7**

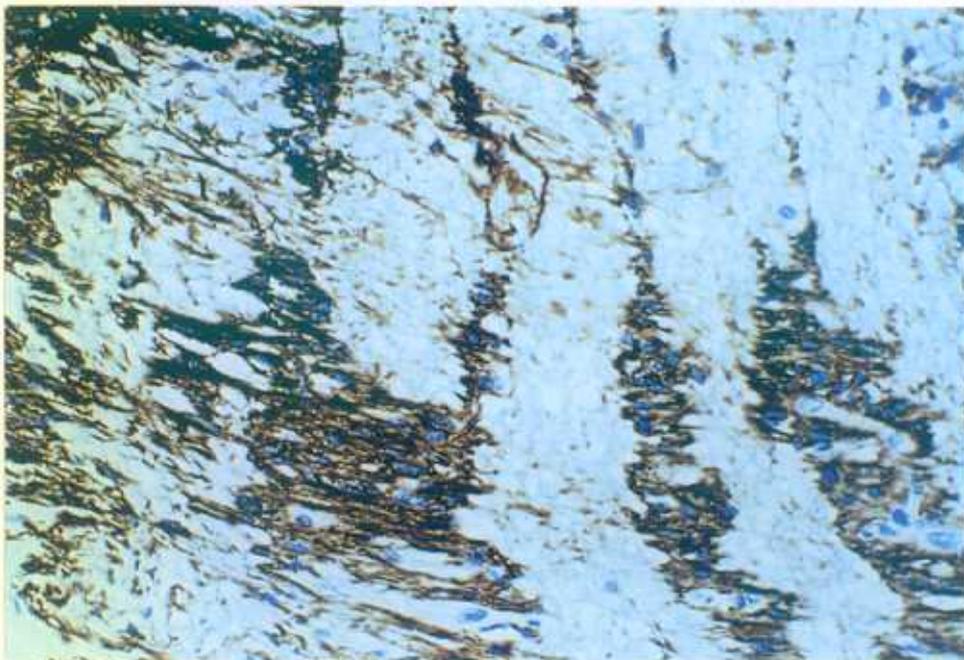
**Fig. 8: Región prelaminar anterior.** En la micrografía se observa la disposición de los astrocitos constituyendo celdillas, por cuyo interior viajan los axones de las células ganglionares. Los cuerpos celulares de los astrocitos (→) se disponen en la proximidades o sobre los vasos sanguíneos (\*). (Sección transversal [6 $\mu$ m.]. Inmunoperoxidasa con anti-PGFA contrastada con hematoxilina; 200 $\times$ ).

**Fig. 9: Región prelaminar posterior.** Se observan bandas anchas intensamente PGFA(+), alterando con bandas cuya inmunorreactividad es menor. En las zonas de mayor inmunorreactividad, se aprecian los núcleos de los astrocitos contrastados con hematoxilina. (Sección longitudinal [6 $\mu$ m.]. Inmunoperoxidasa con anti-PGFA contrastada con hematoxilina; 200 $\times$ ).

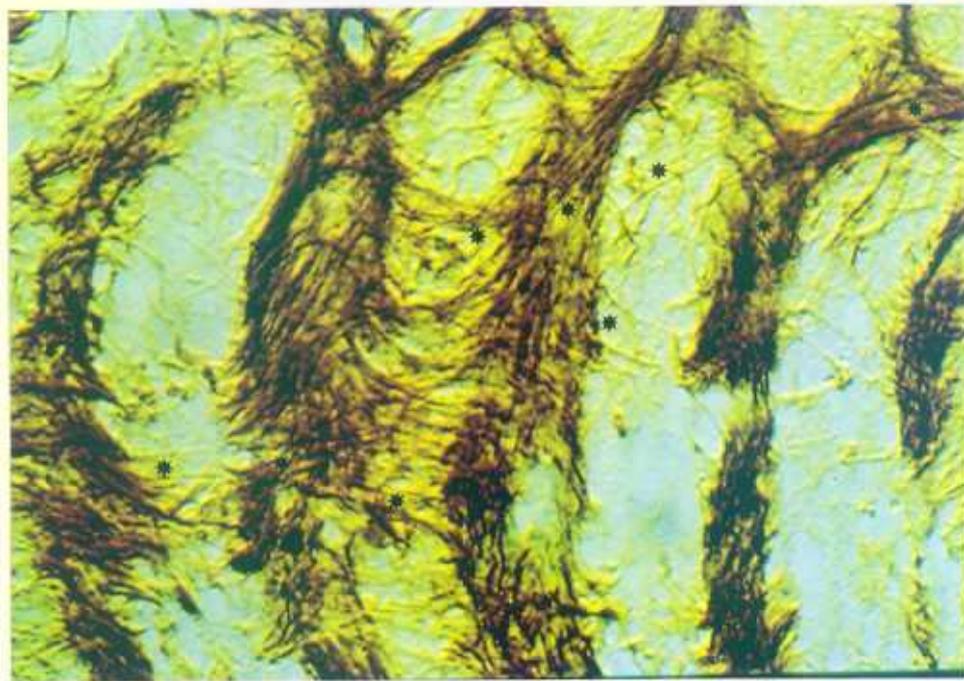
**Fig. 10: Región prelaminar posterior.** Estructuras tubulares constituidas por astrocitos. (Sección longitudinal [30 $\mu$ m.]. Inmunoperoxidasa con anti-PGFA.; óptica de Nomarski; 312 $\times$ ). (\*: vaso sanguíneo).



**FIG. 8**



**FIG. 9**



**IG. 10**

**Fig. 11: Región prelaminar posterior.** Los vasos sanguíneos (\*) discurren por el interior de las paredes que constituyen los tubos gliales.  
(Sección transversal [6 $\mu$ m.]. Inmunoperoxidasa con anti-PGFA contrastada con hematoxilina; 400 $\times$ ).

**Fig. 12: Región laminar.** Disminución de la señal PGFA(+). Los astrocitos (►) se disponen recubriendo el tejido colágeno de los poros cribosos (\*).  
(Sección transversal [4 $\mu$ m.]. Inmunoperoxidasa con anti-PGFA contrastada con hematoxilina y con picroindigocarmín; 400 $\times$ ).

**Fig. 13: Región retrolaminar.** Se aprecia una zona intensamente PGFA(+) que se corresponde con el manto periférico de Greef (\*). Esta limitante está constituida por tres o cuatro hileras de astrocitos muy empaquetados. En la imagen se aprecia como se introducen tabiques conectivos desde la piamadre (P) rodeados por tejido astrogial.  
(Sección transversal [6 $\mu$ m.]. Inmunoperoxidasa con anti-PGFA contrastada con hematoxilina; 400 $\times$ ).

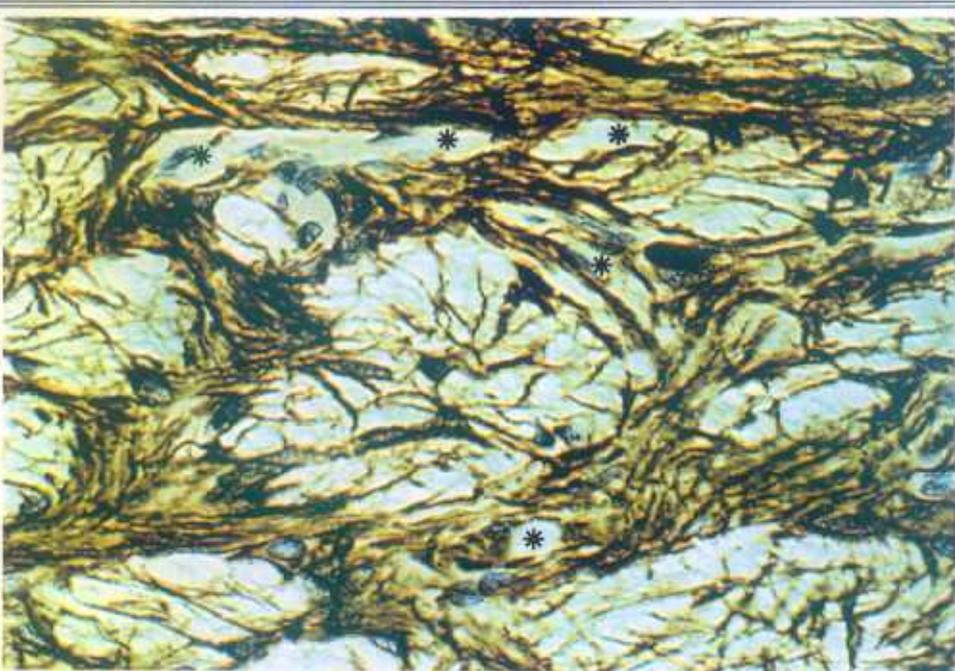


FIG. 11

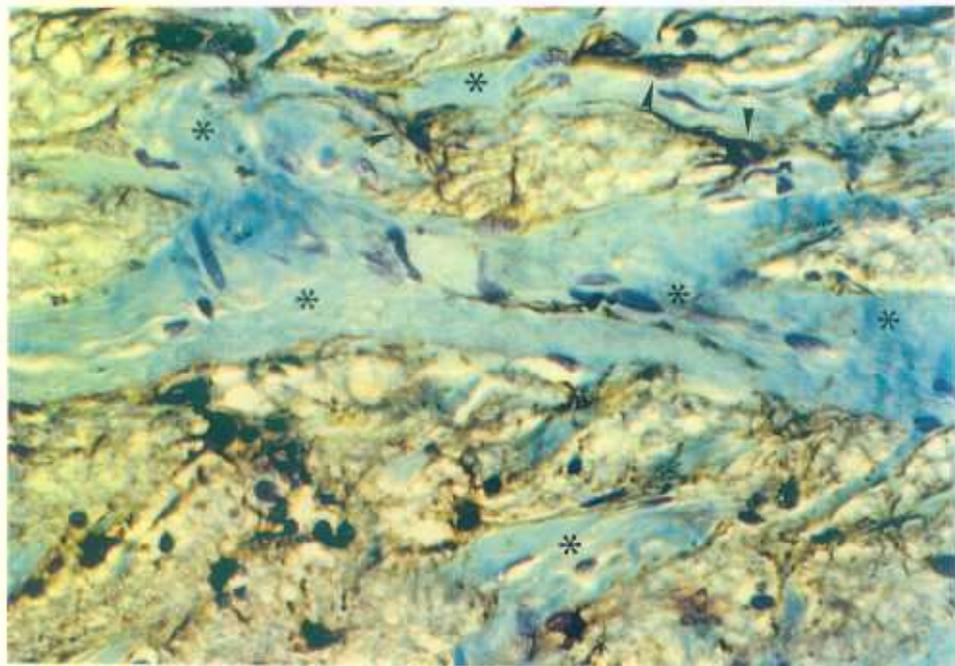


FIG. 12

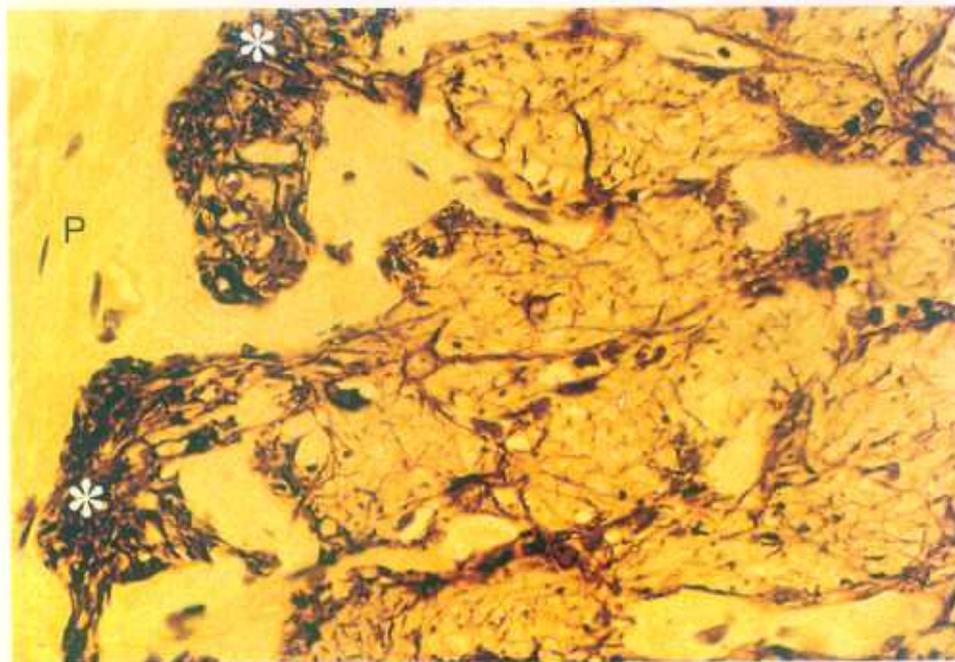


FIG. 13

**Fig. 14: Región retrolaminar.** El tejido conectivo de los vasos sanguíneos (\*) se encuentra totalmente rodeado tanto por cuerpos como por prolongaciones de astrocitos (→), que los separan del resto del tejido nervioso.

(Sección transversal [4 $\mu$ m.]. Inmunoperoxidasa con anti-PGFA contrastada con hematoxilina y pícroindigocarmín; 500 $\times$ ).

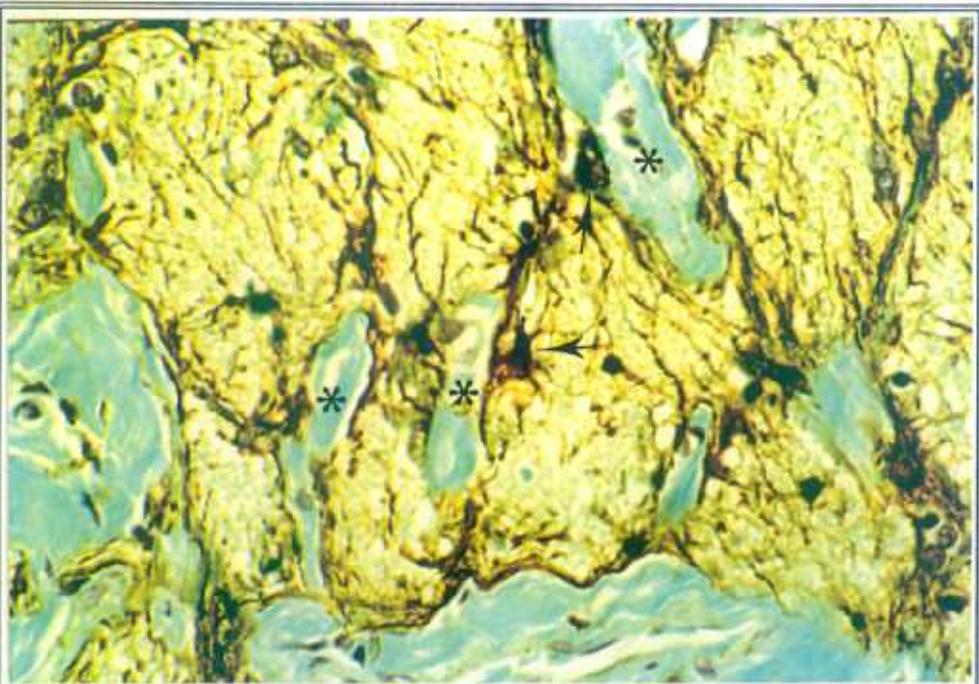
**Fig. 15: Región retrolaminar.** Astrocito de cuerpo celular grueso (→) localizado en la limitante glial que recubre a los vasos centrales (\*). Esta célula presenta un pericarion redondeado del que parten 6 prolongaciones radiales, 3 de ellas forman parte de la limitante del vaso; mientras que las restantes se entremezclan entre los haces axonales para ayudar a su fasciculación.

(Sección longitudinal-oblicua [20 $\mu$ m.]. Inmunoperoxidasa con anti-PGFA; 625 $\times$ ).

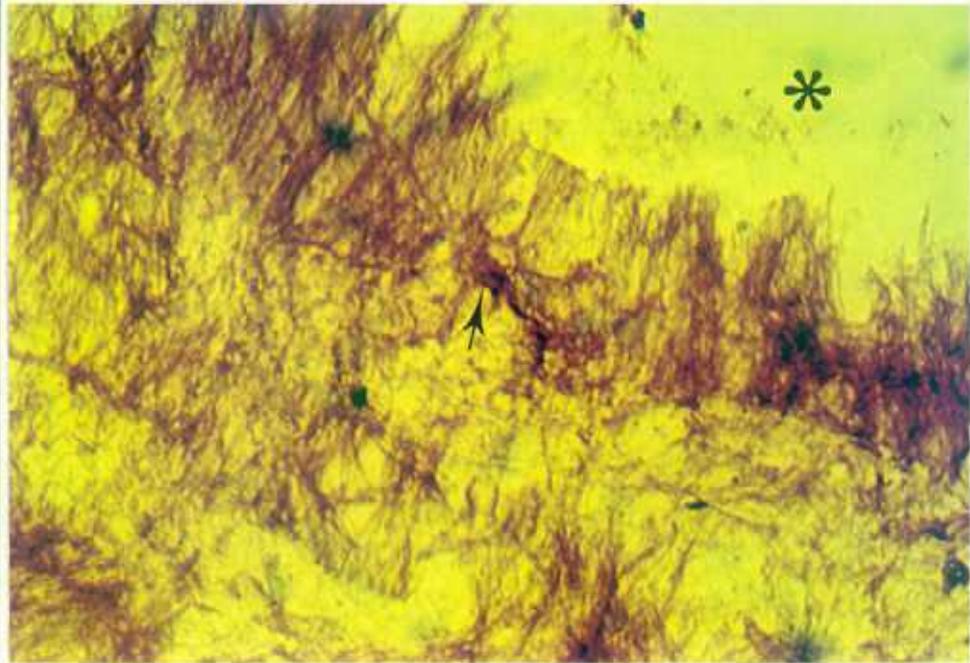
**Fig. 16: Región retrolaminar.** Astrocito de cuerpo celular grueso (→) con una alta inmunorreactividad PGFA(+), que forma parte del manto periférico de Greif.

(Sección transversal [4 $\mu$ m.]. Inmunoperoxidasa anti-PGFA contrastada con hematoxilina; 625 $\times$ ).

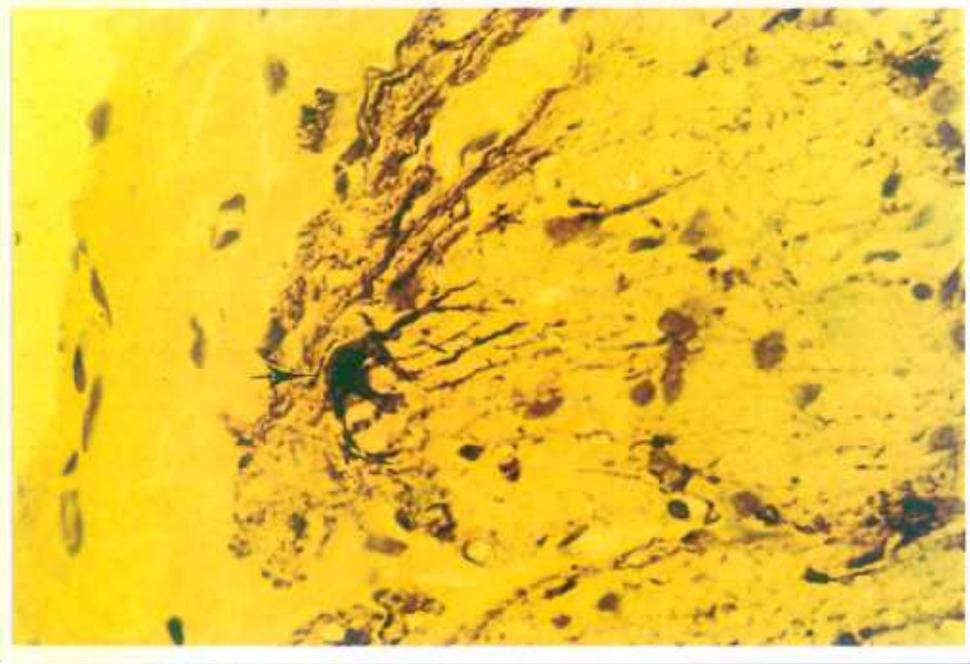
(P: piamadre)



**IG. 14**



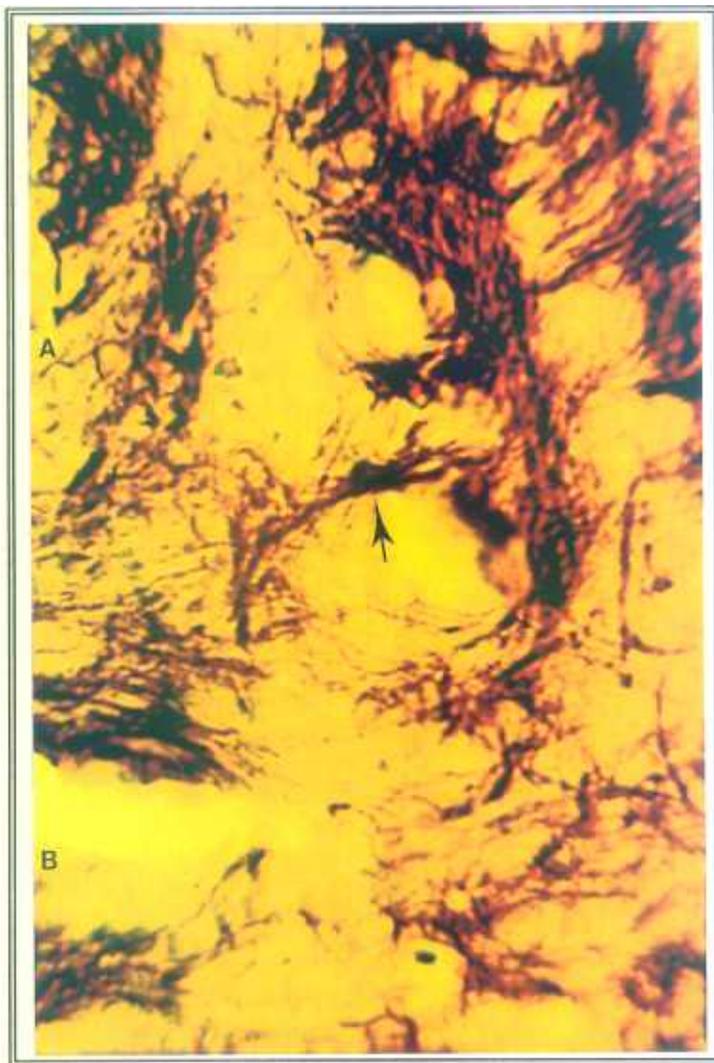
**IG. 15**



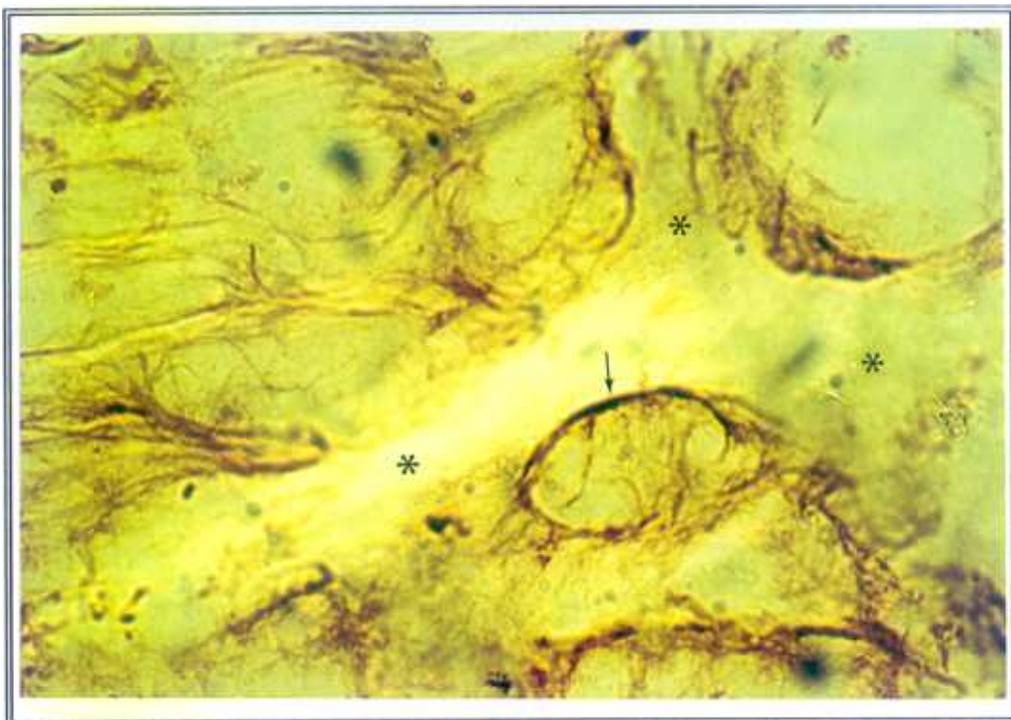
**IG. 16**

**Fig. 17: Región prelaminar posterior.** Astrocito de cuerpo celular grueso. El cuerpo celular tiene forma de media luna (→) y de él parten de 6 a 8 prolongaciones primarias de cada polo que constituyen las paredes del tubo glial. También parten prolongaciones secundarias cortas que se introducen hacia el interior del tubo, o van a contactar-recubrir los vasos sanguíneos que discurren por el interior de la pared glial. (Sección longitudinal [30 $\mu$ m.]. Inmunoperoxidasa anti-PGFA.; óptica de Nomarski; 500 $\times$ ).  
(A: región prelaminar posterior; B: región laminar)

**Fig.18: Región laminar.** Astrocito de cuerpo celular grueso. El cuerpo celular tiene forma de media luna (→) y de él parten prolongaciones primarias que se adaptan a los poros de la lámina cribosa. También parten prolongaciones secundarias que se introducen al interior del poro. Se observa claramente el núcleo PGFA(-). (Sección longitudinal [30 $\mu$ m.]. Inmunoperoxidasa anti-PGFA; óptica de Nomarski; 500 $\times$ ).  
(\*: laminilla cribosa).



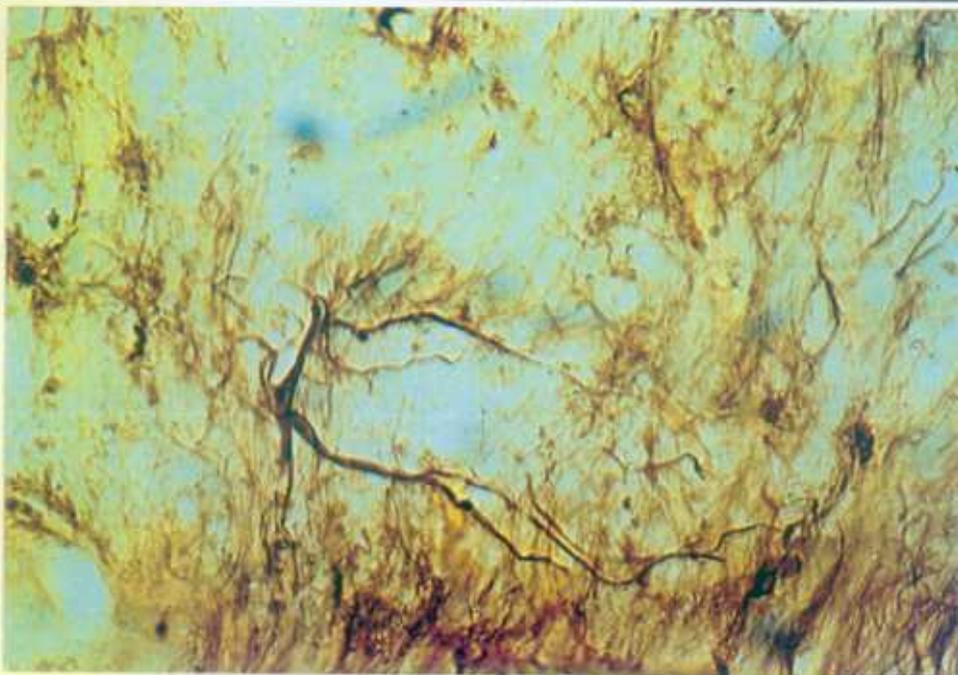
**FIG. 17**



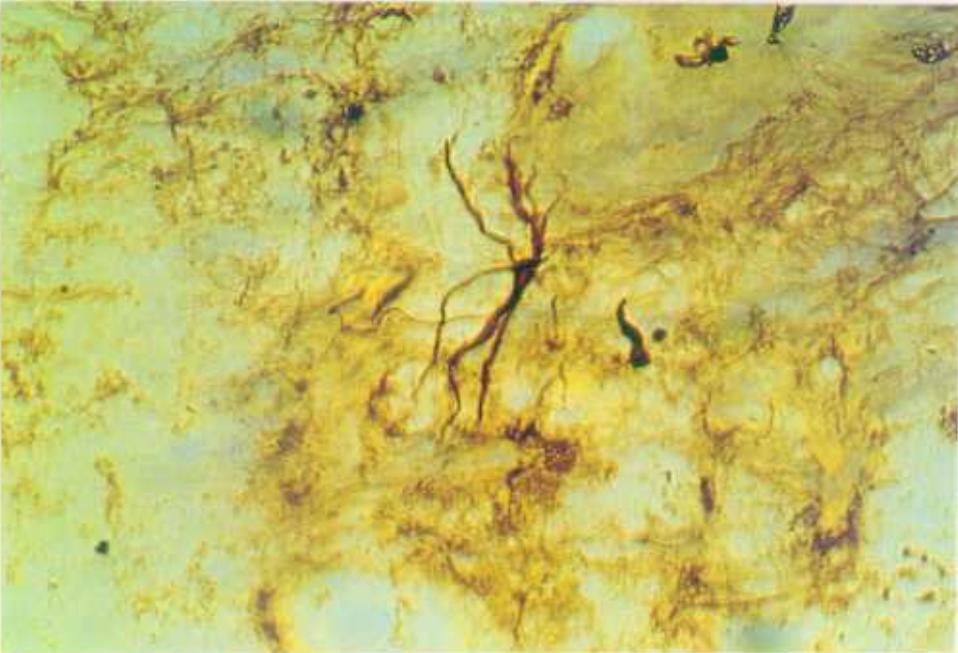
**FIG. 18**

**Fig. 19 y 20: Región retrolaminar.** Astrocitos de cuerpo celular grueso de disposición intraseptal. Del pericarion parten prolongaciones gruesas que van a revestir las paredes de los septos, así como prolongaciones que se introducen hacia los fascículos axonales. (Sección longitudinal [30 $\mu$ m.]. Inmunoperoxidasa con anti-PGFA.; óptica de Nomarski; Fig. 19: 625x; Fig. 20: 500x).

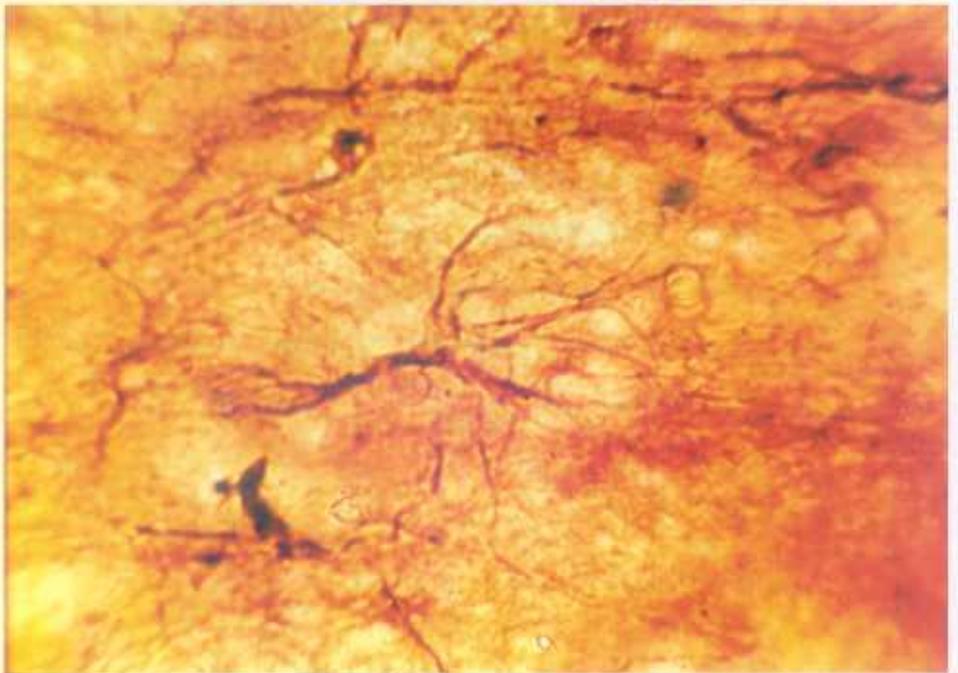
**Fig. 21: Región retrolaminar.** Astrocito de cuerpo celular grueso disposición intrafascicular. Del cuerpo celular parten de 6 a 8 prolongaciones, por lo que la célula adquiere un aspecto muy estrellado. (Sección longitudinal [30 $\mu$ m.]; Inmunoperoxidasa con anti-PGFA.; 625x).



**IG. 19**



**IG. 20**



**IG. 21**

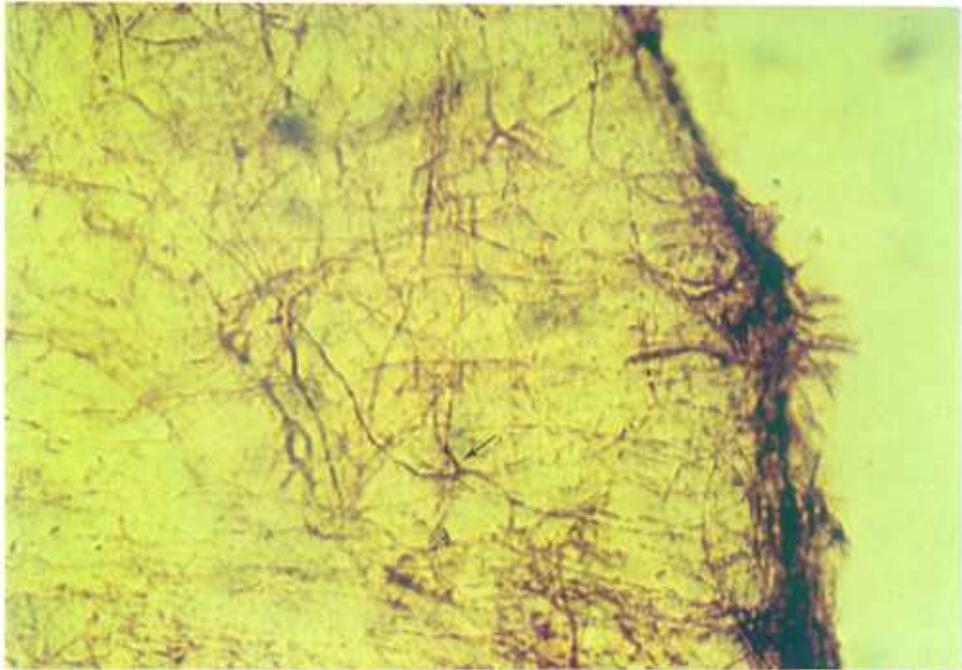
**Fig. 22:** C.S.F.N. Astrocito con cuerpo celular delgado (→) con morfología alargada. De cada polo del cuerpo celular parten 2 prolongaciones primarias que se dividen en 2 secundarias en las proximidades del pericarion y que siguen una trayectoria rectilínea. Puede observarse como una de las prolongaciones rodea un capilar (\*).  
(Sección longitudinal [12 $\mu$ m.]. Inmunofluorescencia-(FITC) con anti-PGFA; 500 $\times$ ).

**Fig. 23:** **Región prelamina anterior.** Astrocito con cuerpo celular delgado (→) con morfología estrellada. Del cuerpo celular parten 5 prolongaciones radiales primarias que se dividen en otras secundarias.  
(Sección longitudinal [30 $\mu$ m.]. Inmunoperoxidasa con anti-PGFA; 400 $\times$ ).

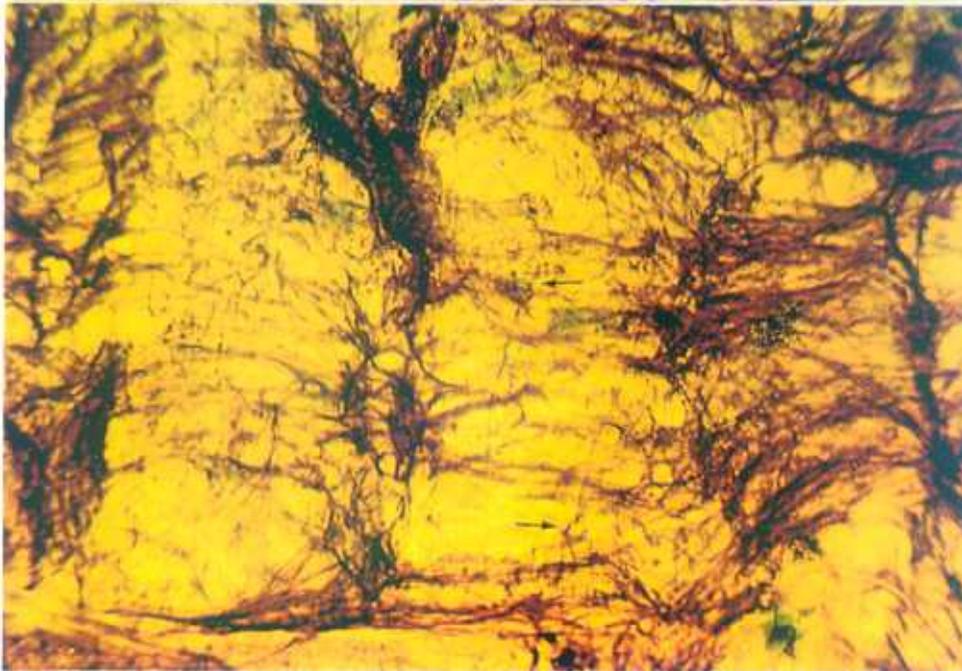
**Fig. 24:** **Región prelamina posterior.** Astrocitos con baja inmunorreactividad PGFA (+) (→). Células que presentan un soma ovoide pequeño del que parten varias prolongaciones radiales cortas y una larga prolongación rectilínea con un trayecto paralelo al de los axones.  
(Sección longitudinal [30 $\mu$ m.]. Inmunoperoxidasa con anti-PGFA; óptica de Nomarski; 312 $\times$ ).



**FIG. 22**



**FIG. 23**



**FIG. 24**

**Fig. 25:** C.S.F.N. Membrana limitante de Elschnig. Los astrocitos se disponen con sus prolongaciones orientadas de forma paralela (►) formando una superficie que separa el tejido del N.O. del vítreo. Cuando aparece un vaso sanguíneo (\*) los cuerpos celulares (→) se disponen a ambos lados recubriéndolo con sus prolongaciones.  
(Sección longitudinal [20µm.]. Inmunoperoxidasa con anti-PGFA; 400x).

**Fig. 26 y 27:** C.S.F.N. y Región prelaminar anterior. Los astrocitos de la C.S.F.N. se disponen agrupados formando la membrana limitante de Elschnig (◆), enviando prolongaciones hacia la región prelaminar que junto con las procedentes de los astrocitos de esta zona contribuyen a envolver las paredes de los vasos sanguíneos. Las prolongaciones de los astrocitos que forman la limitante de Elschnig aparecen, al ser seccionadas, con un aspecto desflecado (►) debido su disposición paralela.

Fig. 26: (Sección longitudinal [12µm.]. Inmunofluorescencia-FITC con anti-PGFA; 500x).

Fig. 27: (Sección longitudinal [4µm.]; Inmunoperoxidasa con anti-PGFA; 250x).

(A: C.S.F.N.; B: región prelaminar; V: vítreo).



FIG. 25

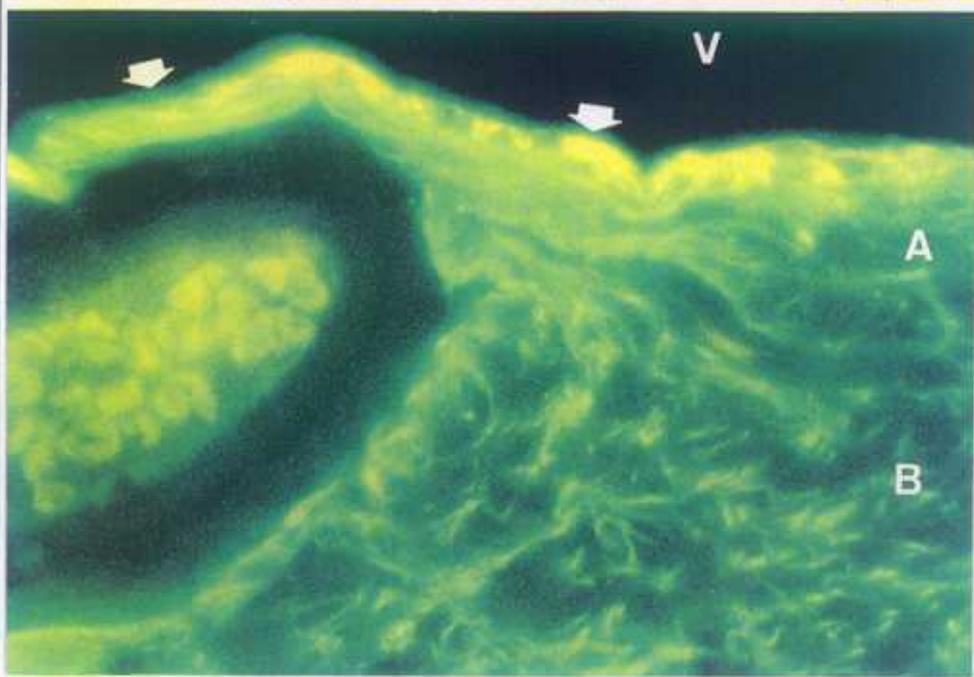


FIG. 26

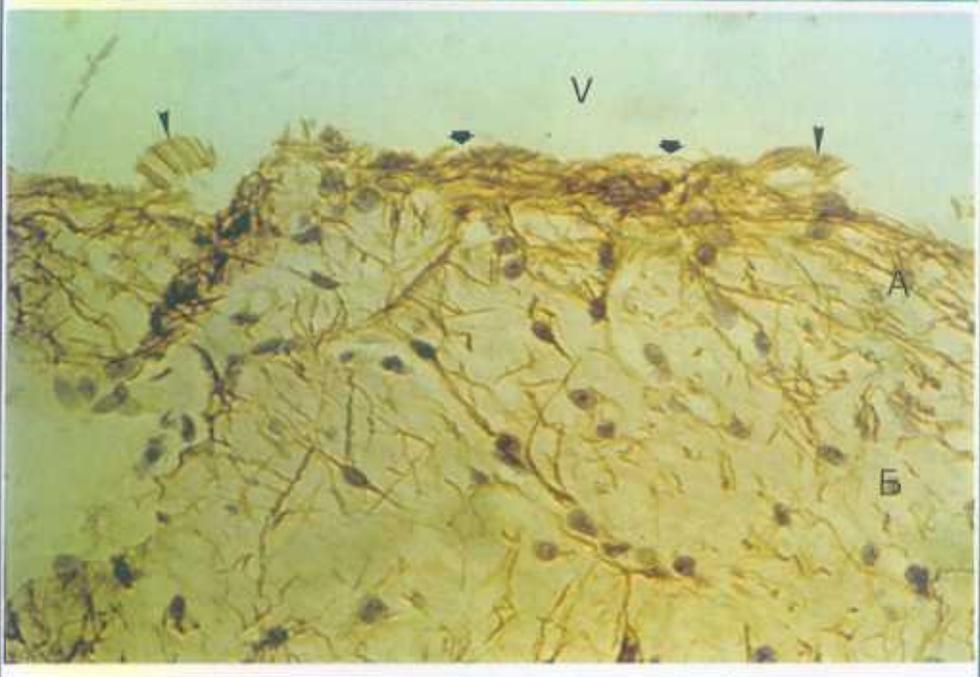
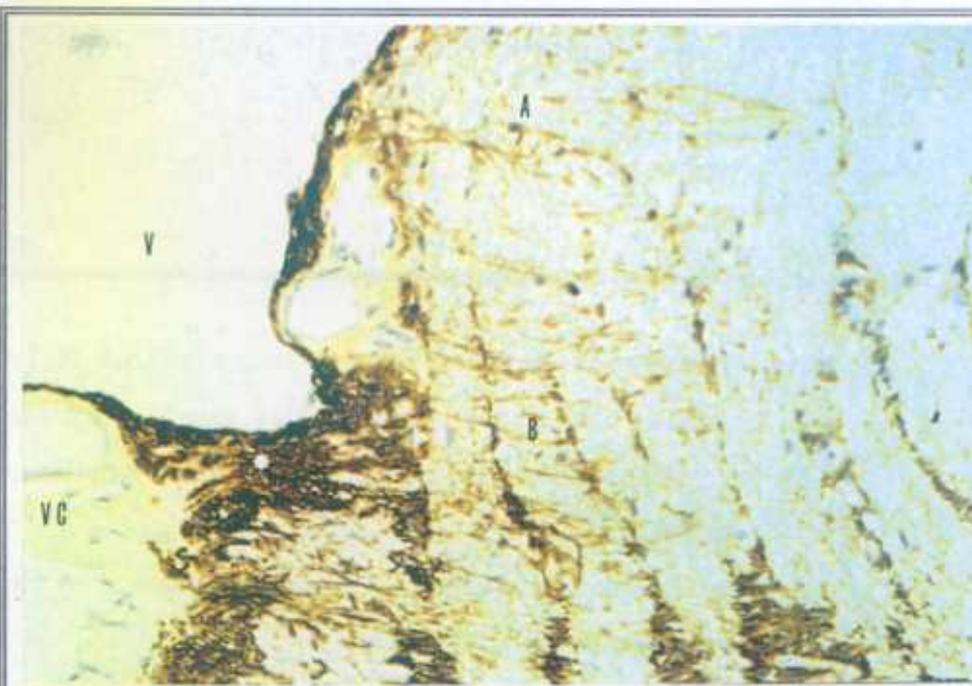


FIG. 27

**Fig. 28: C.S.F.N. y Región prelaminar anterior.** Detalle del menisco central de Kuhnt (\*) constituido por la acumulación de astrocitos de cuerpo celular grueso, y que separa los vasos centrales (V.C.) del vítreo (V). Además, este tejido glial limitante se introduce en el parénquima del N.O. acompañando a los vasos centrales en su recorrido intraneural separándolos del tejido nervioso.  
(Sección longitudinal [ $6\mu\text{m}$ ]. Inmunoperoxidasa con anti-PGFA;  $156\times$ ).  
(A: C.S.F.N.; B: región prelaminar anterior)

**Fig. 29: C.S.F.N. y Región prelaminar anterior.** Astrocitos de cuerpo celular delgado situados por debajo y paralelos a la membrana limitante de Elschnig ( $\rightarrow$ ). En las zonas de transición entre N.O. y retina, al desaparecer la limitante de Elschnig; estas células son las encargadas de separar el tejido nervioso del vítreo. En la micrografía se observa como del tejido limitante de Kuhnt (\*) parten prolongaciones radiales PGFA(+) que se abren en abanico, algunas de las cuales pueden alcanzar la membrana limitante de Elschnig ( $\blacktriangleright$ ).  
(Sección longitudinal [ $12\mu\text{m}$ ]. Inmunoperoxidasa con anti-PGFA;  $100\times$ ).  
(R: retina)

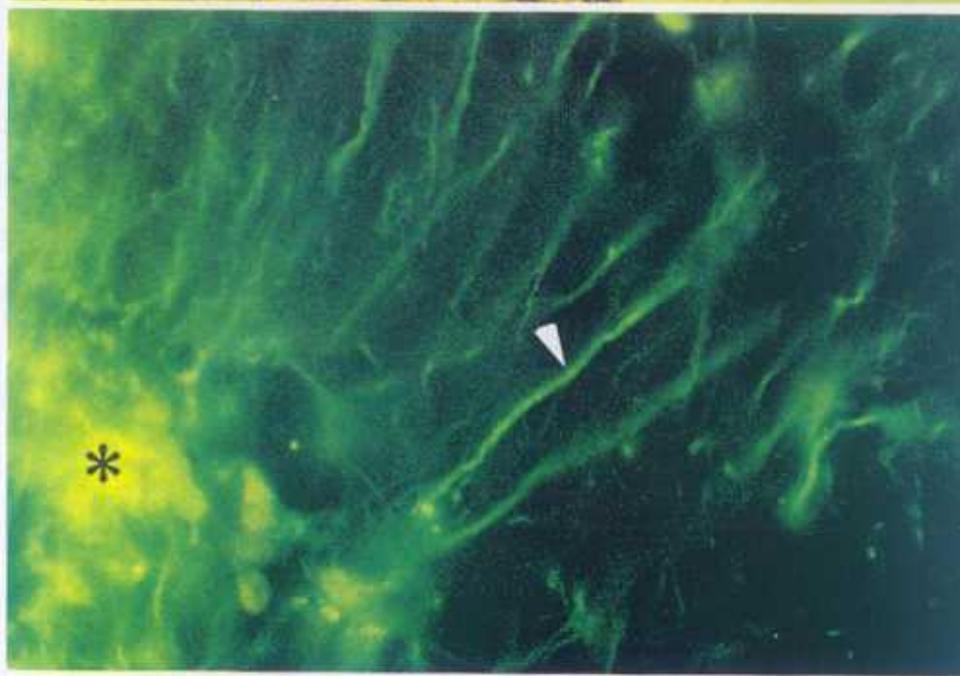
**Fig. 30: Región prelaminar.** Prolongaciones PGFA(+) de trayectoria rectilínea ( $\blacktriangleright$ ) que parten de forma radial de la membrana limitante de Kuhnt (\*).  
(Sección longitudinal [ $12\mu\text{m}$ ]. Inmunofluorescencia-(FITC) con anti-PGFA;  $500\times$ ).



**FIG. 28**



**FIG. 29**



**FIG. 30**

**Fig. 31: Región prelaminar anterior.** Zona próxima a la C.S.F.N. La densidad de las células astrogliales (►) no es muy grande y los astrocitos se disponen más alejados entre sí; formando celdillas amplias que rodean a los axones.

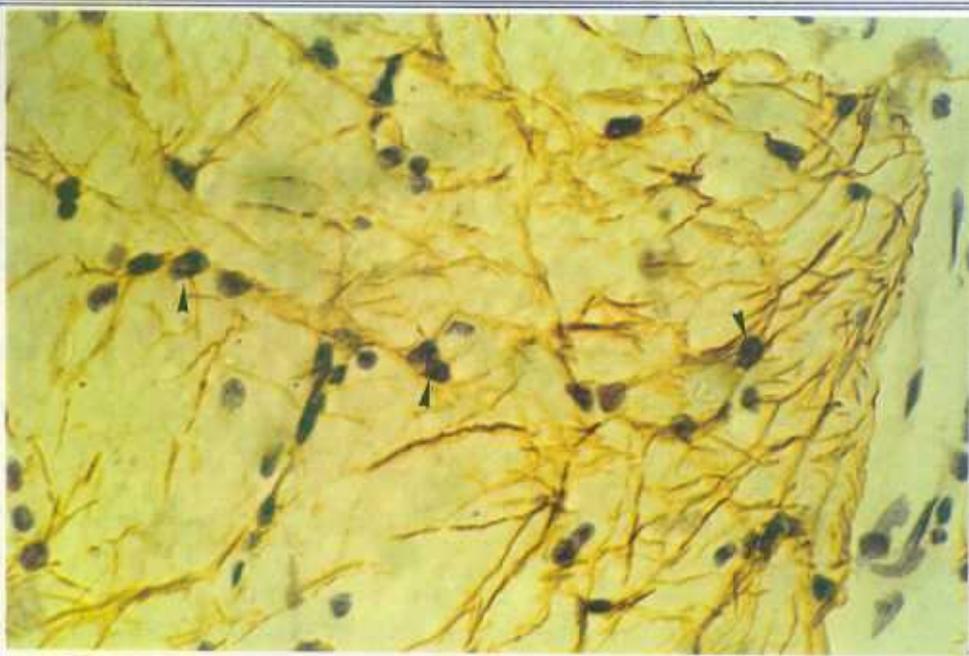
(Sección transversal [6µm.]. Inmunoperoxidasa con anti-PGFA contrastada con hematoxilina; 400×)

**Fig. 32: Región prelaminar anterior.** A medida que nos aproximamos a la región prelaminar posterior, aumenta el número de astrocitos (►) que se agrupan sobre los vasos sanguíneos (\*). El diámetro de las celdillas es menor, observándose en el interior de éstas, abundantes prolongaciones astrogliales.

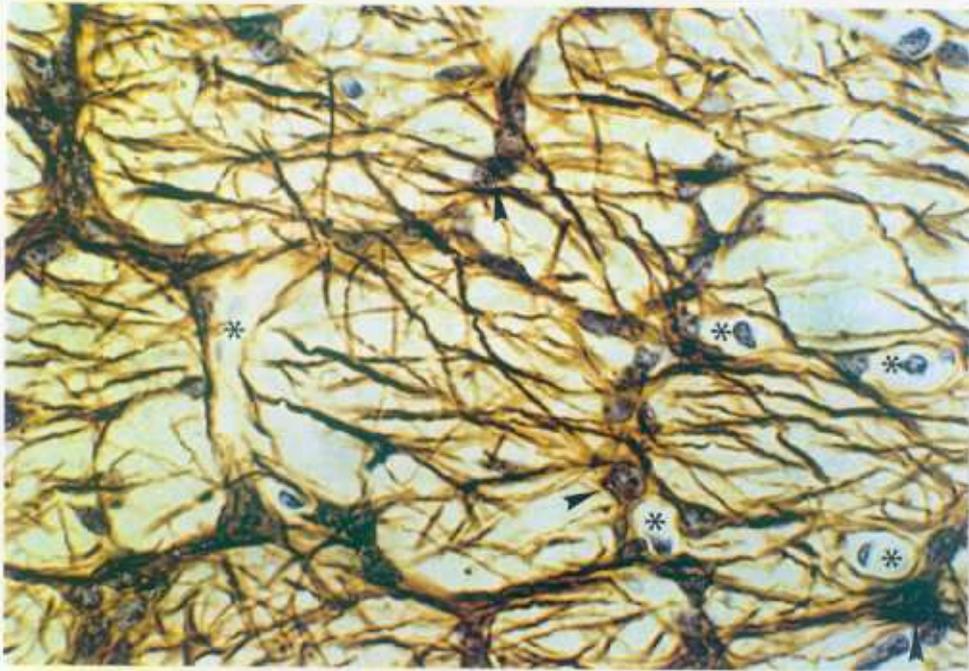
(Sección transversal [6µm.]. Inmunoperoxidasa con anti-PGFA contrastada con hematoxilina; 500×).

**Fig. 33: Región prelaminar anterior.** Zona próxima a la región prelaminar posterior. El número de astrocitos es muy grande y sus núcleos (►) se agrupan en áreas determinadas sobre los vasos sanguíneos. Estas células van a delimitar celdillas de pequeño tamaño que están atravesadas por abundantes prolongaciones astrogliales.

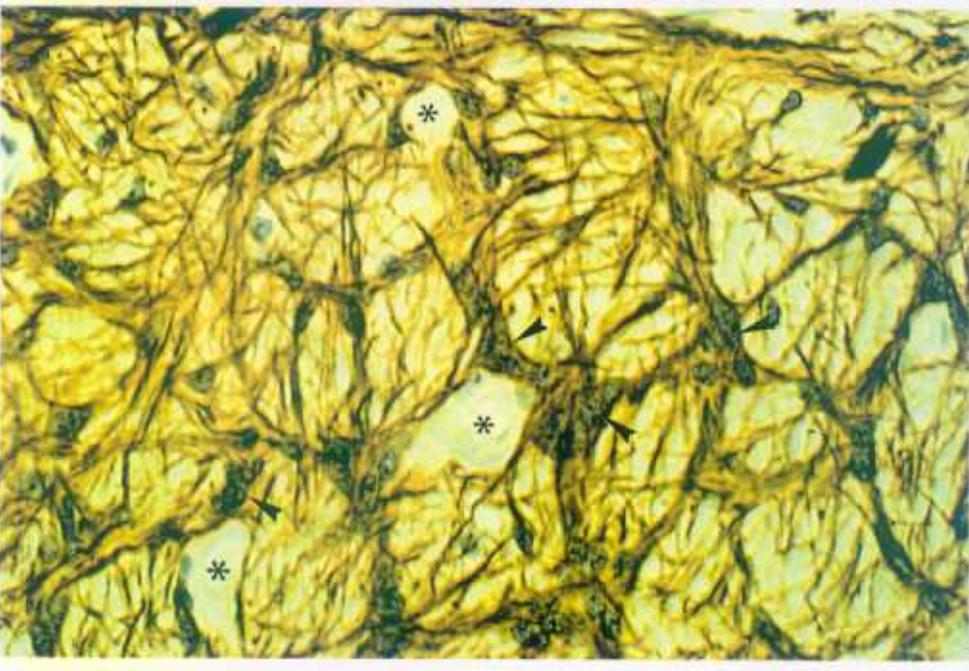
(Sección transversal [6µm.]. Inmunoperoxidasa con anti-PGFA contrastada con hematoxilina; 500×).



**FIG. 31**



**FIG. 32**



**FIG. 33**

**Fig. 34: Región prelaminar anterior.** Los cuerpos celulares de los astrocitos se disponen principalmente sobre los vasos sanguíneos (\*), mandando prolongaciones radiales en las distintas direcciones del espacio, formando celdillas que constituyen una malla astrogial en forma de cesta.

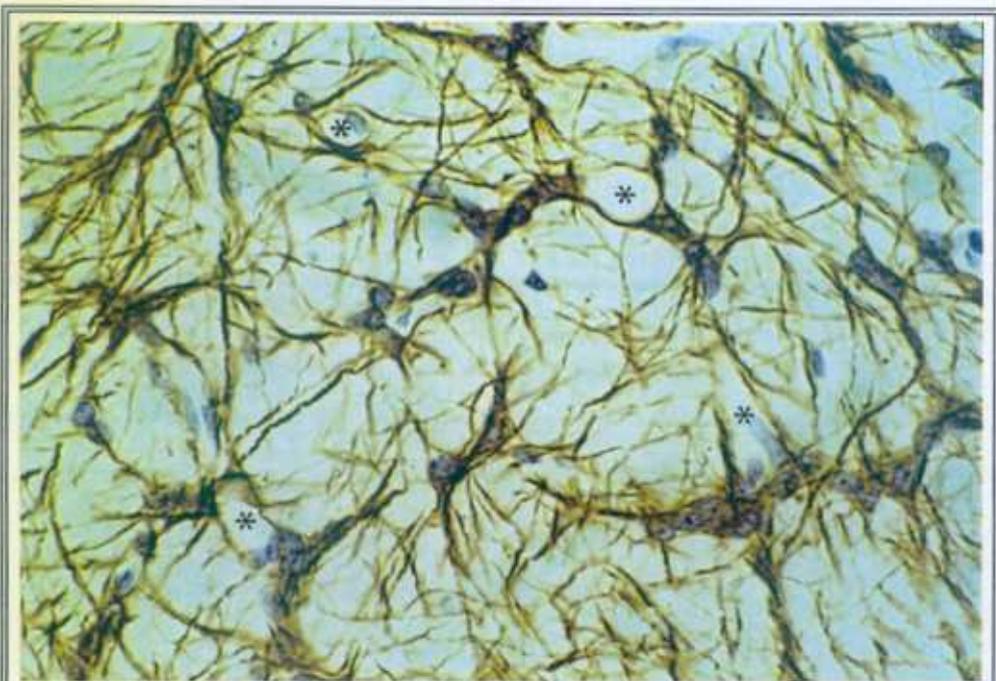
(Sección transversal [ $6\mu\text{m.}$ ]. Inmunoperoxidasa anti-PGFA contrastada con hematoxilina;  $500\times$ ).

**Fig. 35:** Zona de transición entre las regiones prelaminar anterior y posterior. Se observa un vaso sanguíneo de calibre mediano (\*) (rodeado completamente por prolongaciones astrogiales) que recorre la circunferencia del N.O.

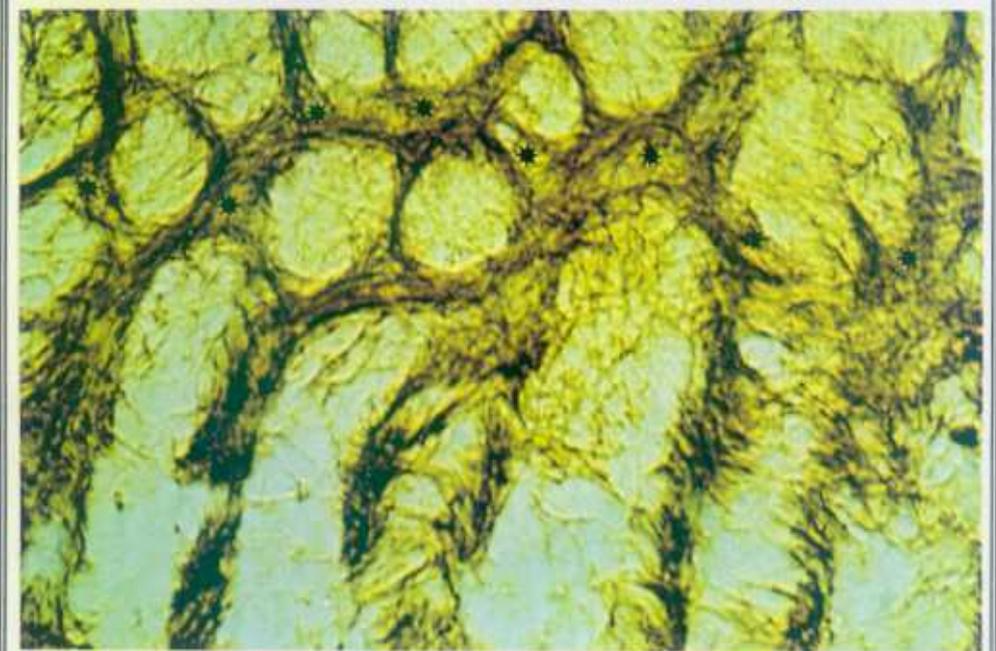
(Sección longitudinal [ $30\mu\text{m.}$ ]. Inmunoperoxidasa con anti-PGFA;  $312\times$ ).

**Fig. 36: Región prelaminar.** Microfotografía en la que se observan abundantes fibras, largas y finas, debilmente PGFA(+) ( $\rightarrow$ ) dispuestas en el interior de los haces axonales con un trayecto paralelo al de los axones.

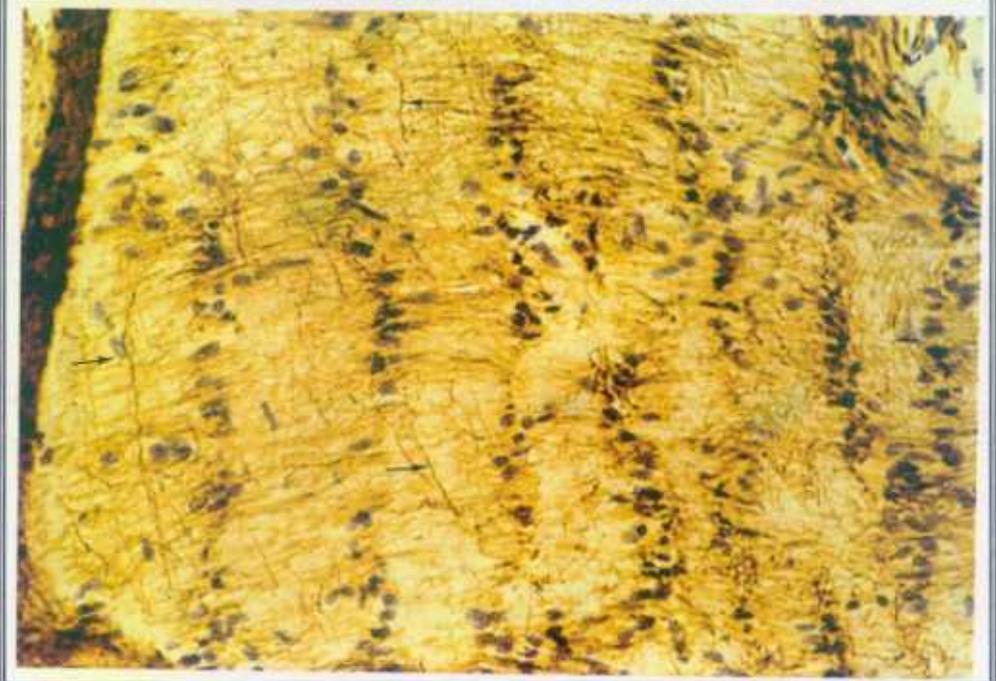
(Sección longitudinal [ $12\mu\text{m.}$ ]. Inmunoperoxidasa con anti-PGFA contrastada con hematoxilina;  $156\times$ ).



**FIG. 34**



**FIG. 35**



**FIG. 36**

**Fig. 37: Región prelaminar posterior.** Los astrocitos de cuerpo celular grueso se agrupan, superponiéndose en varias capas, y constituyendo tubos gliales por cuyo interior discurren los axones. Los vasos sanguíneos (\*) discurren entre las paredes gliales de los tubos.

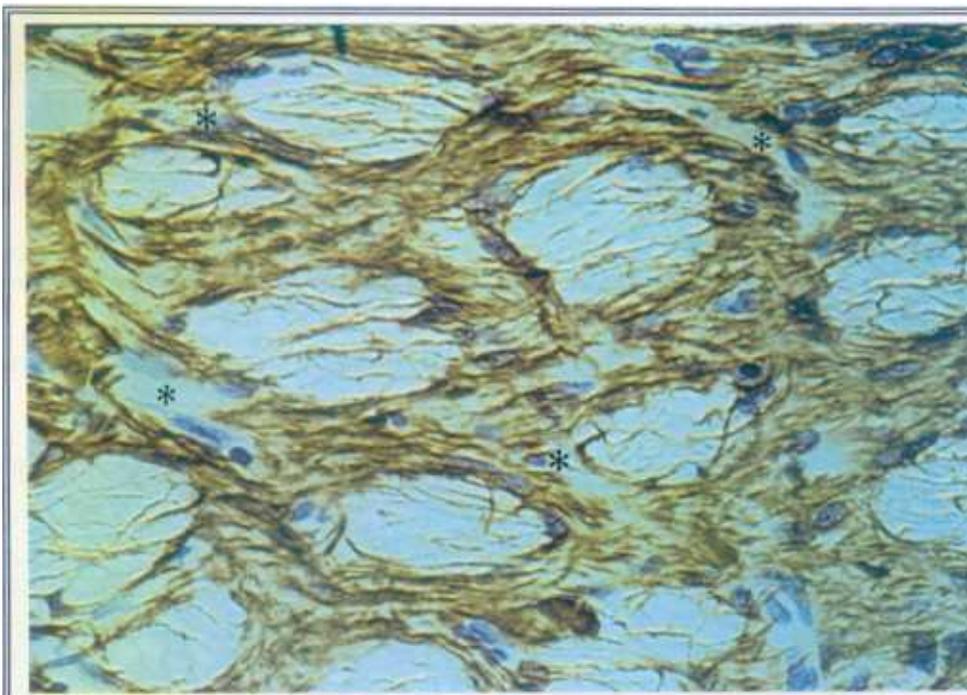
(Sección transversal [6 $\mu$ m]. Inmunoperoxidasa con anti-PGFA contrastada con hematoxilina; 500 $\times$ ).

**Fig. 38: Región prelaminar posterior.** Vasos sanguíneos (\*) con trayecto perpendicular al eje del N.O., con sus paredes rodeadas completamente por prolongaciones astrogliales.

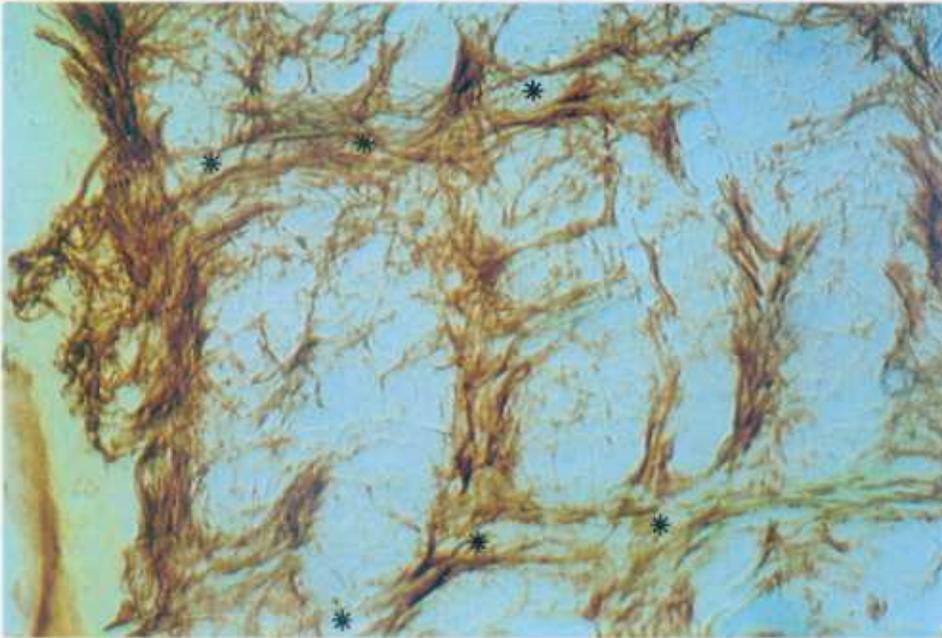
(Sección longitudinal [30 $\mu$ m]. Inmunoperoxidasa con anti-PGFA; 312 $\times$ ).

**Fig. 39: Región prelaminar posterior.** Astrocito de cuerpo celular grueso ( $\rightarrow$ ) con el pericarion en el interior de un tubo astrogliar, mandando prolongaciones tanto hacia las paredes del tubo como hacia el interior del mismo.

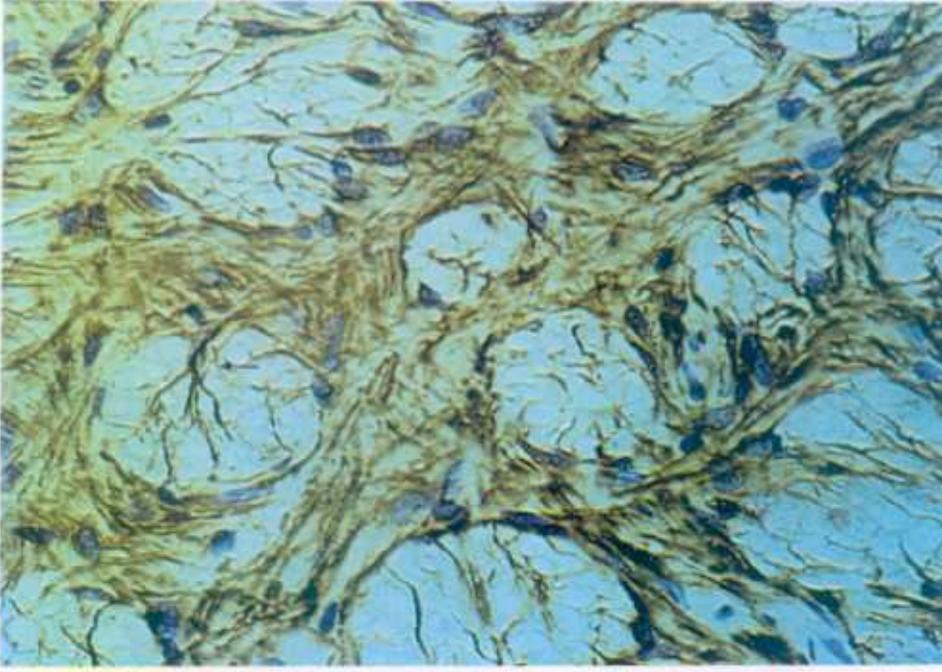
(Sección transversal [6 $\mu$ m]. Inmunoperoxidasa con anti-PGFA contrastada con hematoxilina; 500 $\times$ ).



**FIG. 37**



**FIG. 38**

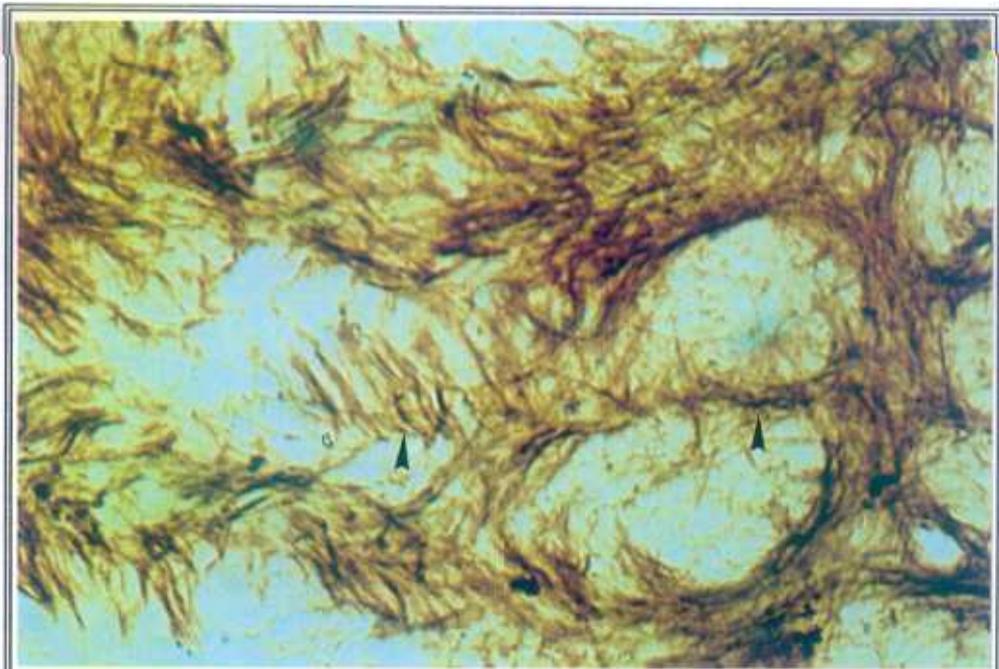


**FIG. 39**

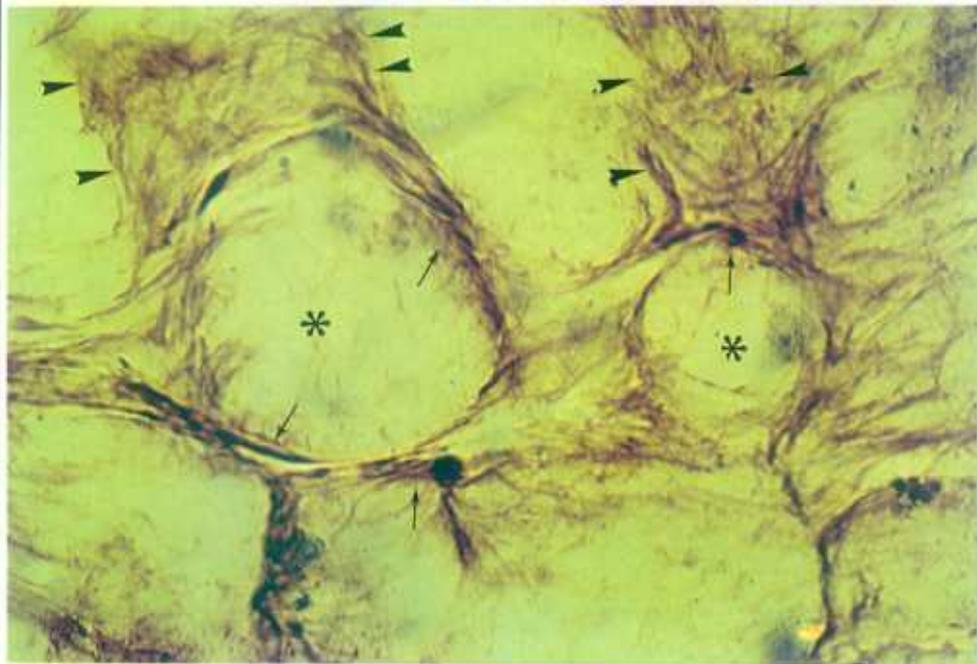
**Fig. 40: Región prelaminar posterior.** Subdivisión de un tubo astrogial (▶) en dos de diámetro más pequeño.  
(Sección longitudinal [30 $\mu$ m.]. Inmunoperoxidasa con anti-PGFA; óptica de Nomarski; 400 $\times$ ).

**Fig. 41:** Zona de transición entre la región prelaminar posterior y la región laminar. Los tubos gliales de la prelaminar posterior (▶) desembocan en los orificios de la lámina cribosa (\*), que se encuentran tapizados por astrocitos (→).  
(Sección longitudinal-oblicua [30 $\mu$ m.]. Inmunoperoxidasa con anti-PGFA; óptica de Nomarski; 500 $\times$ ).

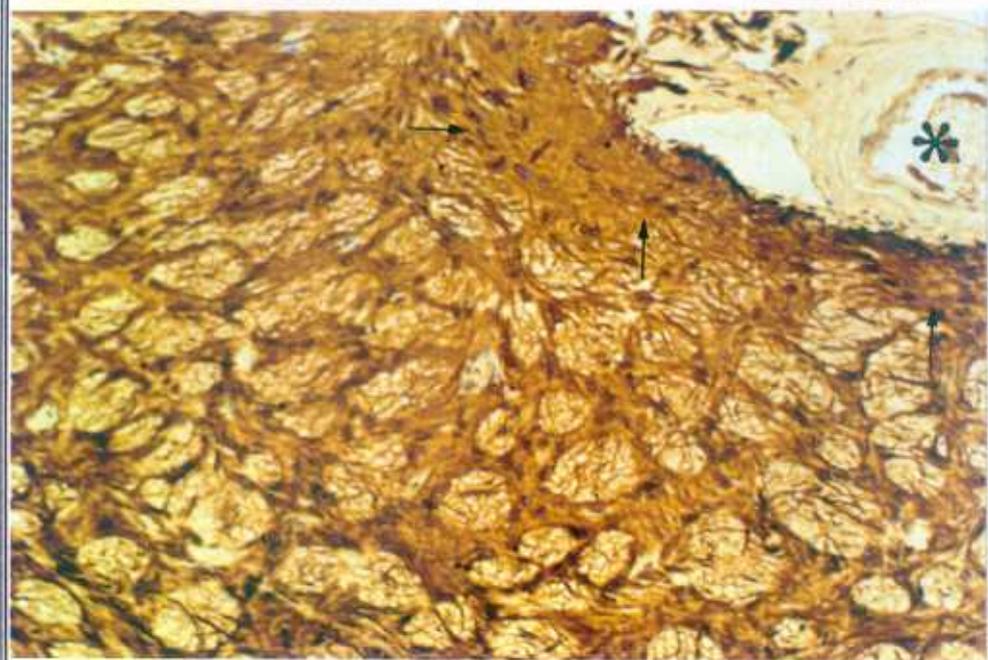
**Fig. 42: Región prelaminar posterior.** En la micrografía, se observa como los vasos centrales (\*) se encuentran rodeados por abundantes células astrogiales que se disponen de forma compacta (→).  
(Sección transversal [6 $\mu$ m.]. Inmunoperoxidasa con anti-PGFA contrastada con hematoxilina; 156 $\times$ ).



**FIG. 40**



**FIG. 41**



**FIG. 42**

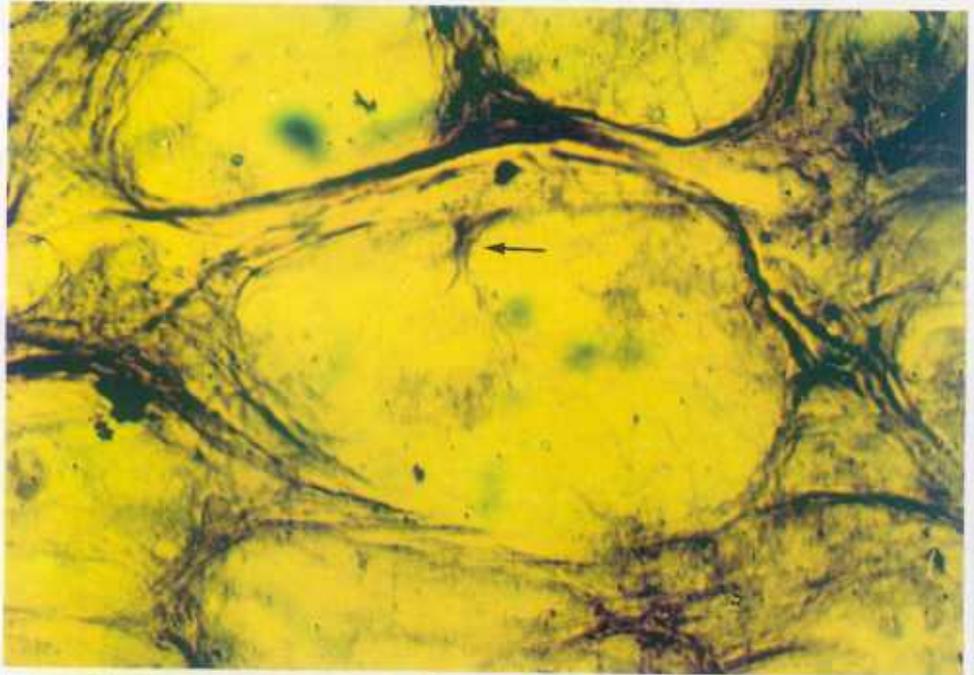
**Fig. 43:** Zona de transición entre la región prelliminar anterior y posterior. En la imagen, se observan un vaso sanguíneo central (\*) con sus paredes recubiertas por células astrogliales. Los astrocitos que forman la limitante vascular también pueden mandar prolongaciones hacia los tubos gliales; y de la misma forma, los astrocitos que forman parte de los tubos próximos al vaso mandan prolongaciones hacia éste. (Sección longitudinal-oblicua [30 $\mu$ m.]. Inmunoperoxidasa con anti-PGFA; 312 $\times$ ).

**Fig. 44:** **Región laminar.** Poro laminar recubierto en su interior por una fina banda PGFA(+). En la imagen se aprecia el cuerpo celular de un astrocito que hace protrusión hacia en interior del orificio ( $\rightarrow$ ). (Sección longitudinal-oblicua [30 $\mu$ m.]. Inmunoperoxidasa con anti-PGFA; 625 $\times$ ).

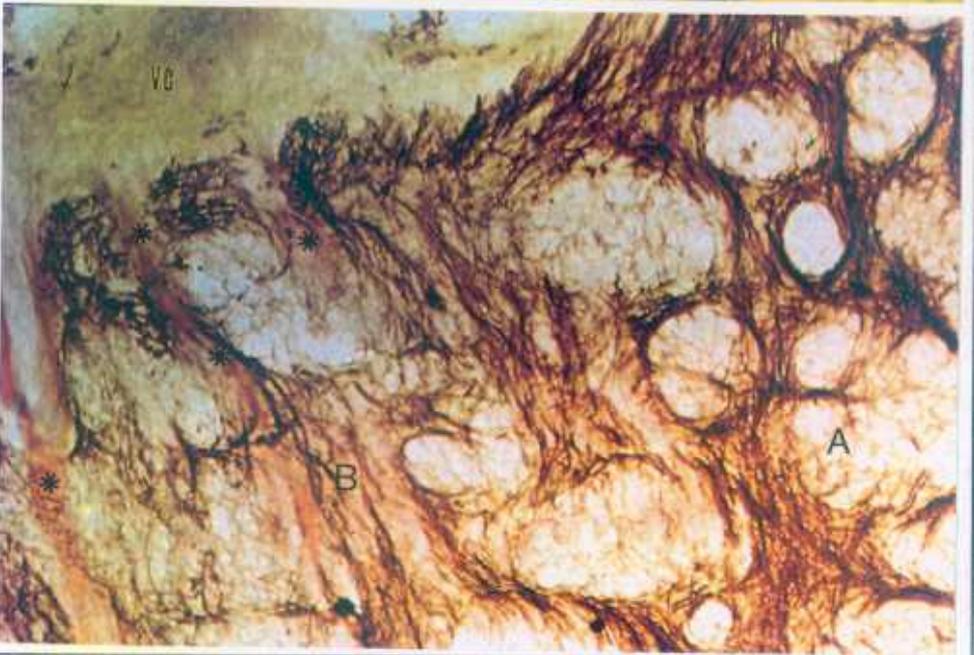
**Fig. 45:** **Regiones prelamina (A) y laminar (B).** Limitante astrogliar rodeando los vasos centrales (V.C.) en su recorrido por el N.O. En la región laminar se encuentra interrumpida por la salida de tejido conectivo que se entremezcla con el de las laminillas cribosas (\*). (Sección longitudinal-oblicua [30 $\mu$ m.]. Inmunoperoxidasa con anti-PGFA; 312 $\times$ ).



**FIG. 43**



**FIG. 44**

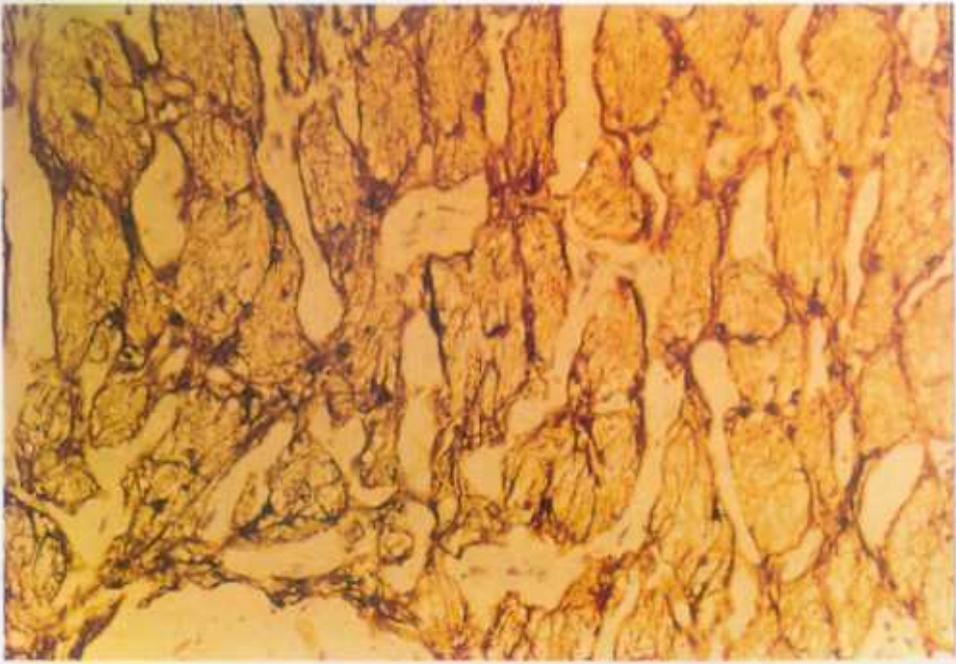


**FIG. 45**

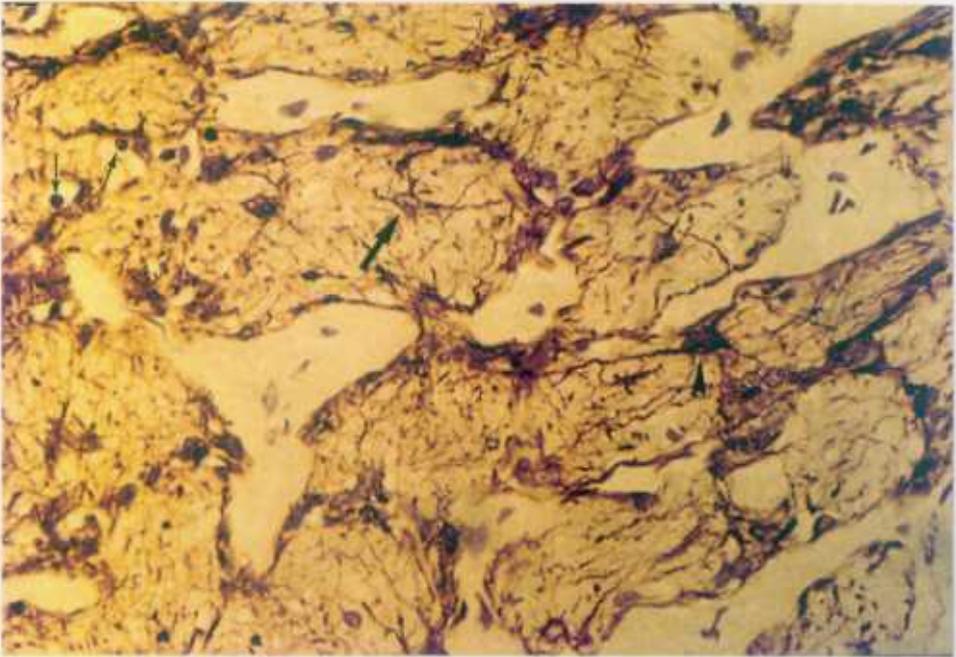
**Fig. 46: Región retrolaminar.** Zona próxima a la región laminar. Se observa la desorganización de los septos conectivos provocada al entremezclarse el tejido colágeno con el de los vasos centrales.  
(Sección transversal [4 $\mu$ m.] Inmunoperoxidasa con anti-PGFA; 250 $\times$ ).

**Fig. 47: Región retrolaminar.** Los astrocitos disponen su cuerpo celular sobre las paredes de los tabiques ( $\blacktriangleright$ ) o bien en el interior de los fascículos axonales ( $\rightarrow$ ).  
(Sección transversal [4 $\mu$ m.] Inmunoperoxidasa con anti-PGFA contrastada con hematoxilina; 312 $\times$ ).  
( $\rightarrow$ : Oligodendrocito).

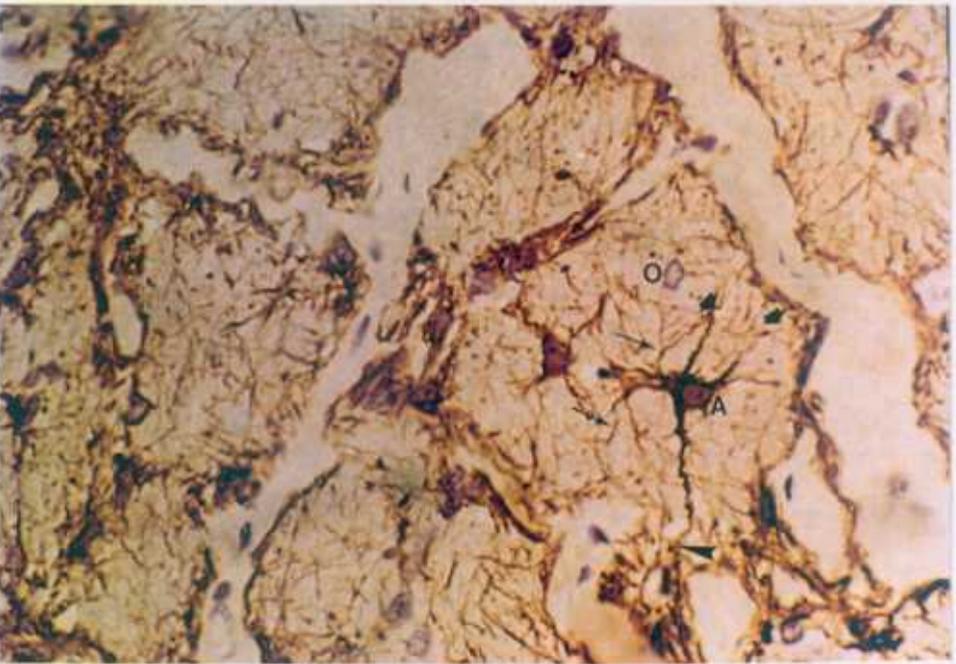
**Fig. 48: Región retrolaminar.** En la micrografía observamos un astrocito de cuerpo celular grueso (A) de localización intrafascicular que manda sus prolongaciones radiales en todas las direcciones en el interior de los fascículos ( $\rightarrow$ ); otras prolongaciones pueden dirigirse hacia las paredes de los tabiques conectivos ( $\blacktriangle$ ); así, como también hacia los vasos sanguíneos ( $\blacktriangleright$ ).  
(Sección transversal [4 $\mu$ m.] Inmunoperoxidasa con anti-PGFA contrastada con hematoxilina; 400 $\times$ ).  
(O: oligodendrocito)



**IG. 46**



**IG. 47**

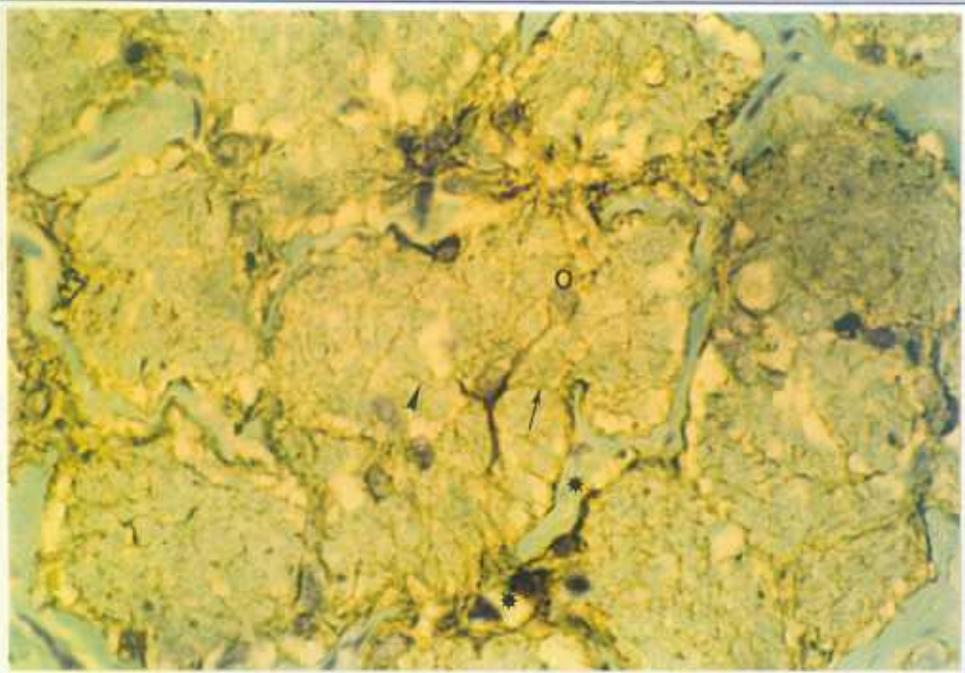


**IG. 48**

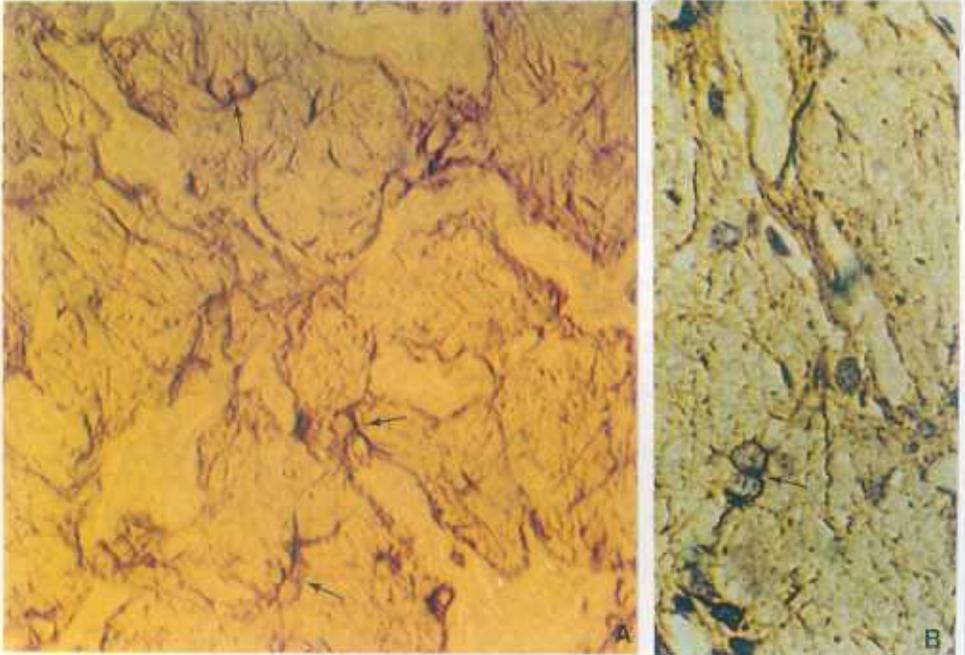
**Fig. 49: Región retrolaminar.** Astrocito que manda una prolongación hacia un oligodendrocito (O), mientras que otras prolongaciones se dirigen hacia los tabiques conectivos (→), hacia los vasos sanguíneos (\*), o se disponen entre los axones en el interior de los fascículos (▶).  
(Sección transversal [4μm.]. Inmunoperoxidasa con anti-PGFA contrastada con hematoxilina y con picroindocarmín; 400×).

**Fig. 50A,B:: Región retrolaminar.** "Astrocitos gemelos" (→).  
(Secciones transversales [6μm.]. Inmunoperoxidasa con anti-PGFA. A: óptica de Nomarski, 312×; B: contrastada con hematoxilina, 400×).

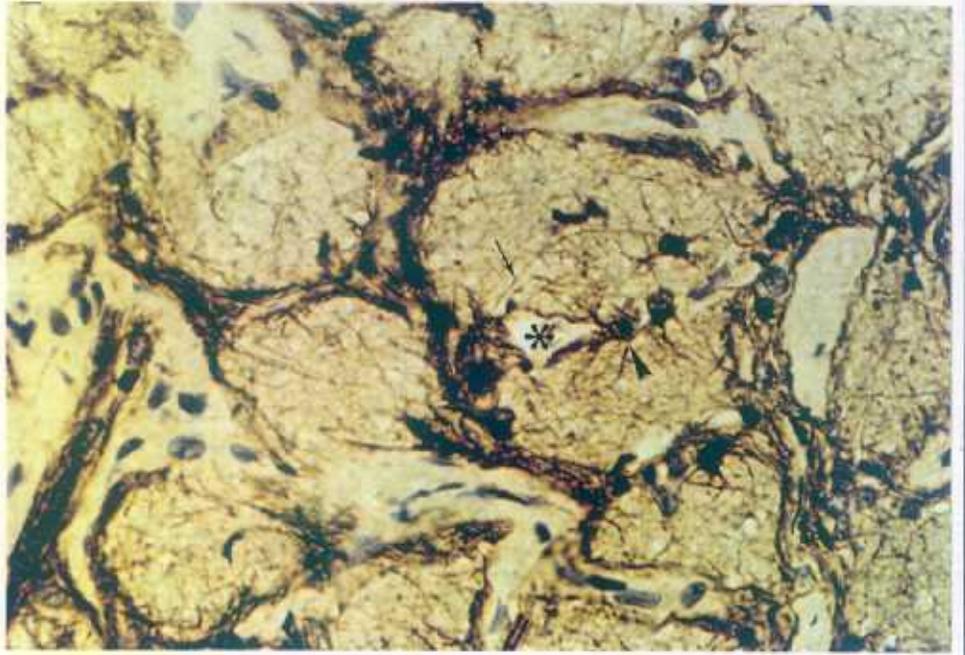
**Fig. 51: Región retrolaminar.** En la imagen se observa un capilar en el interior de un fascículo axonal (\*). El vaso se encuentra rodeado tanto por cuerpos calulares (▶), como por prolongaciones de astrocitos (→), que lo aíslan completamente de los axones.  
(Sección transversal [6μm.]. Inmunoperoxidasa con anti-PGFA; 312×).



**FIG. 49**



**FIG. 50**



**FIG. 51**

**Fig. 52: Región retrolaminar.** Micrografía en la que se observa como la envuelta conectiva de los vasos centrales (\*) se encuentra rodeada por una banda PGFA(+) (→) constituida por astrocitos de cuerpo celular grueso.

(Sección transversal [6 $\mu$ m.]. Inmunoperoxidasa con anti-PGFA; óptica de Nomarski; (250 $\times$ ).

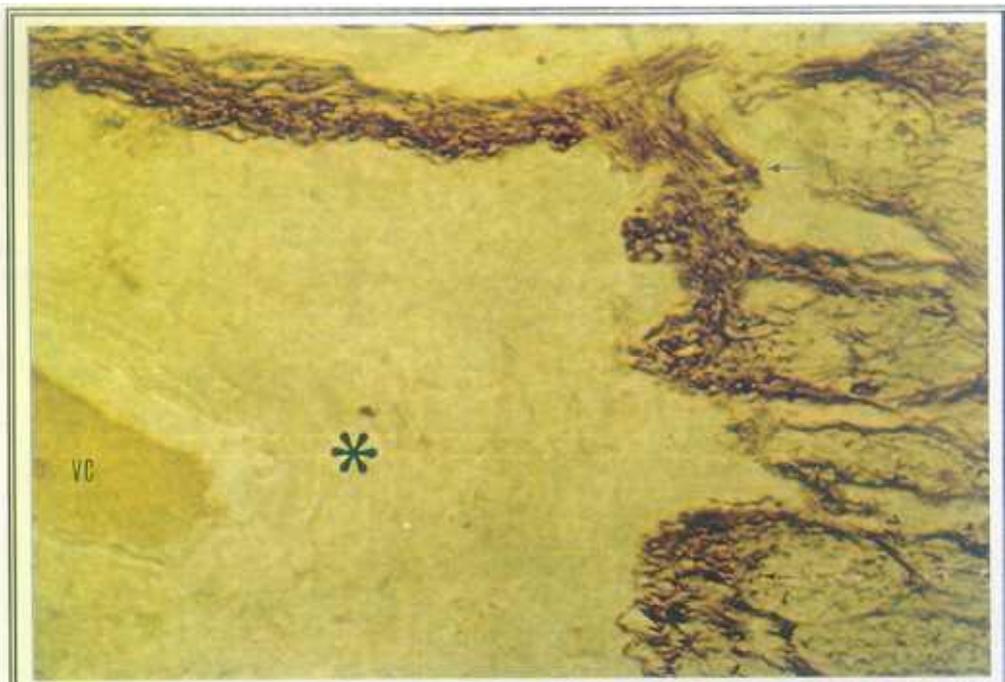
(V.C.: vasos centrales).

**Fig. 53: Región retrolaminar.** Los astrocitos más externos de la limitante glial vascular pueden participar en la fasciculación axonal mandando prolongaciones a los septos conectivos; además, los astrocitos que forman parte de los septos próximos a los vasos centrales, también pueden mandar prolongaciones a éstos.

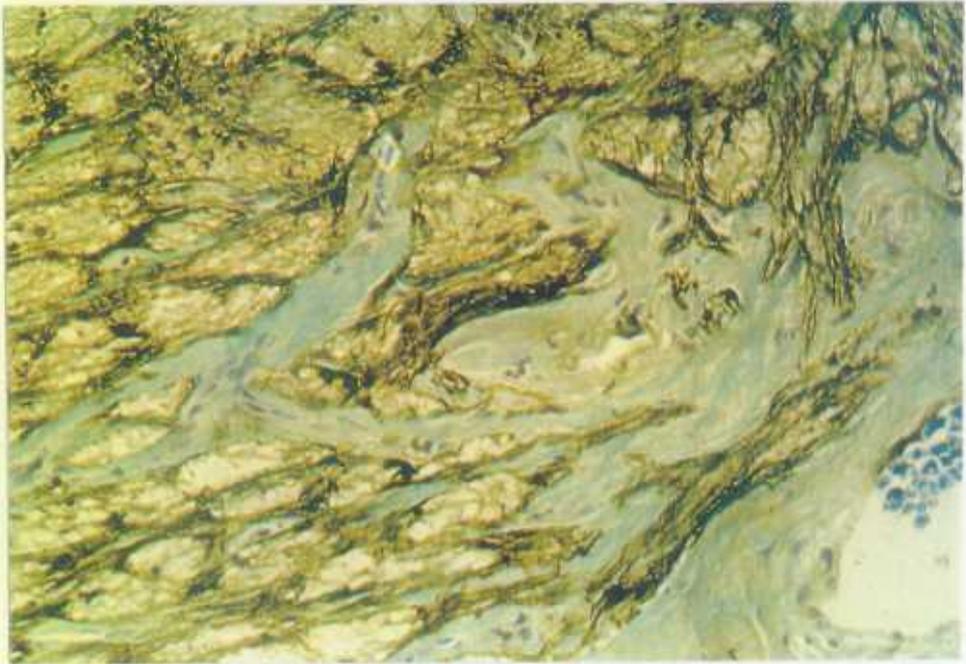
(Sección transversal [6 $\mu$ m.]. Inmunoperoxidasa con anti-PGFA contrastada con hematoxilina y picroindigocarmín; 250 $\times$ ).

**Fig. 54: Región retrolaminar.** Astrocito de baja inmunorreactividad PGFA(+) (→).

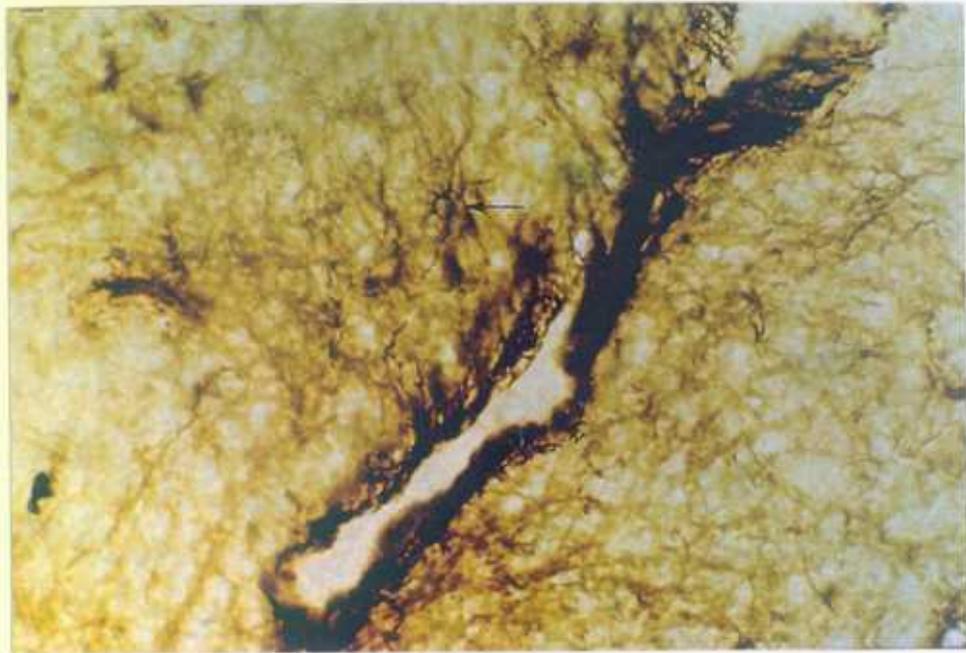
(Sección longitudinal [20 $\mu$ m.]. Inmunoperoxidasa con anti-PGFA; 312 $\times$ ).



**FIG. 52**



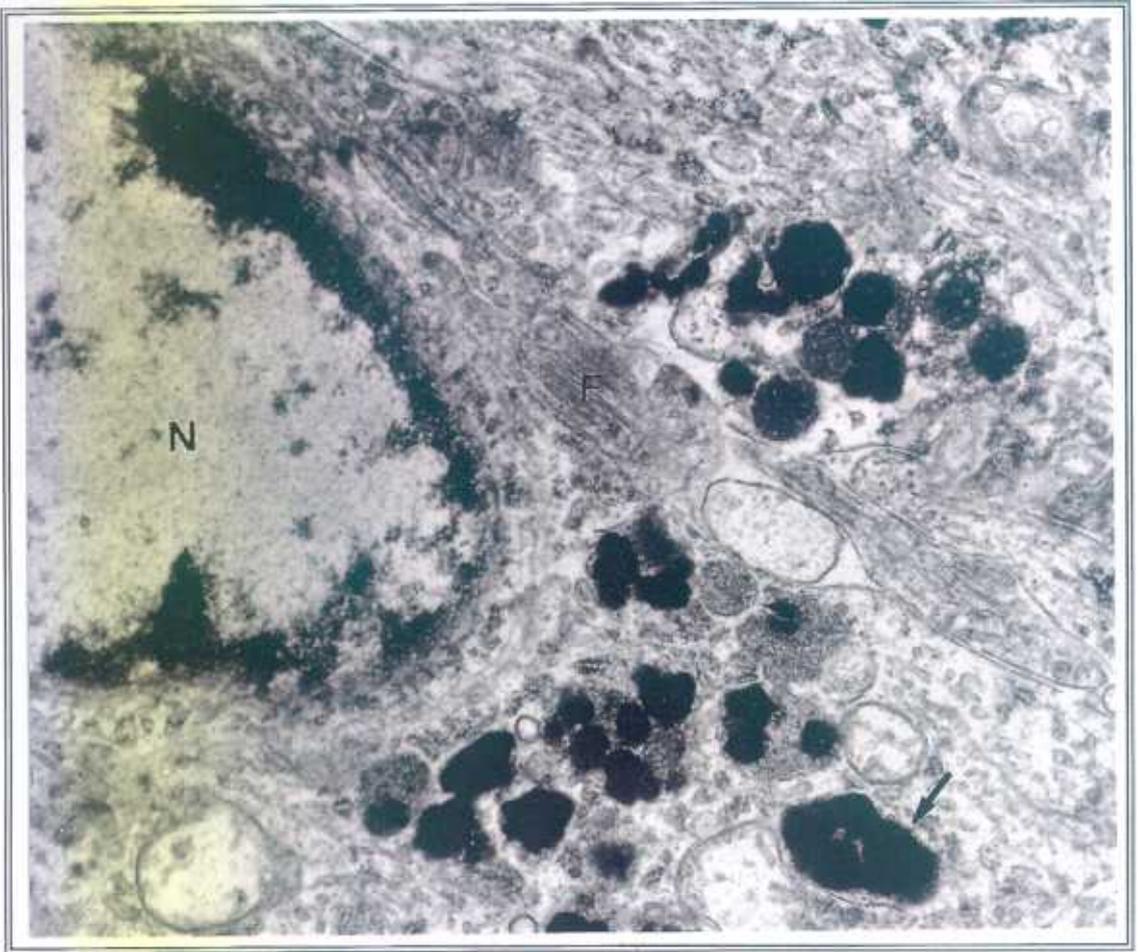
**FIG. 53**



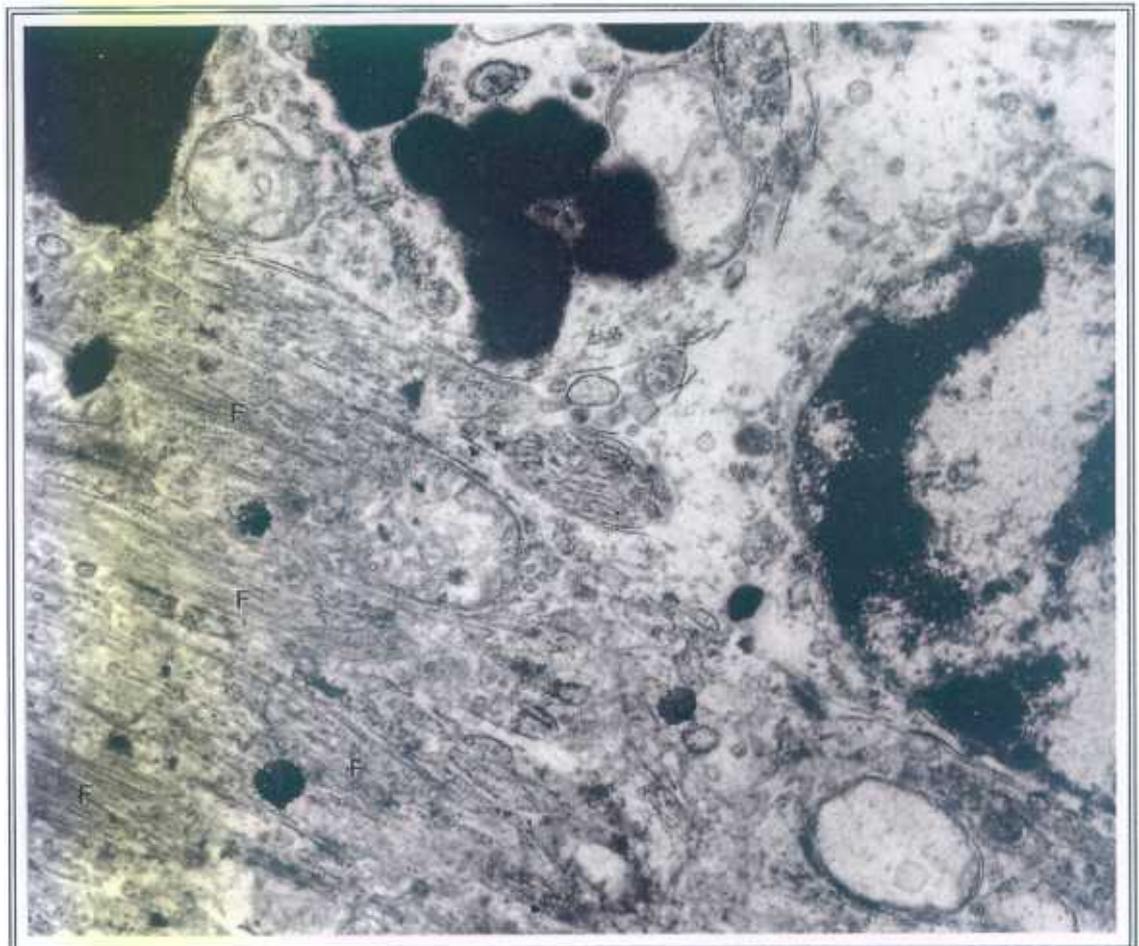
**FIG. 54**

**Fig. 55:** Astrocito de la membrana limitante de Kuhnt: Núcleo (N) pálido con acúmulo de heterocromatina. El citoplasma perinuclear se caracteriza por la abundancia de cuerpos densos (◄), gránulos de melanina fagocitados (→), y filamentos gliales (F). (12.000×).

**Fig. 56:** Detalle de la membrana limitante de Kuhnt: Las prolongaciones de los astrocitos se disponen de forma empaquetada. En su interior abundan los filamentos gliales (F). (12.000×)



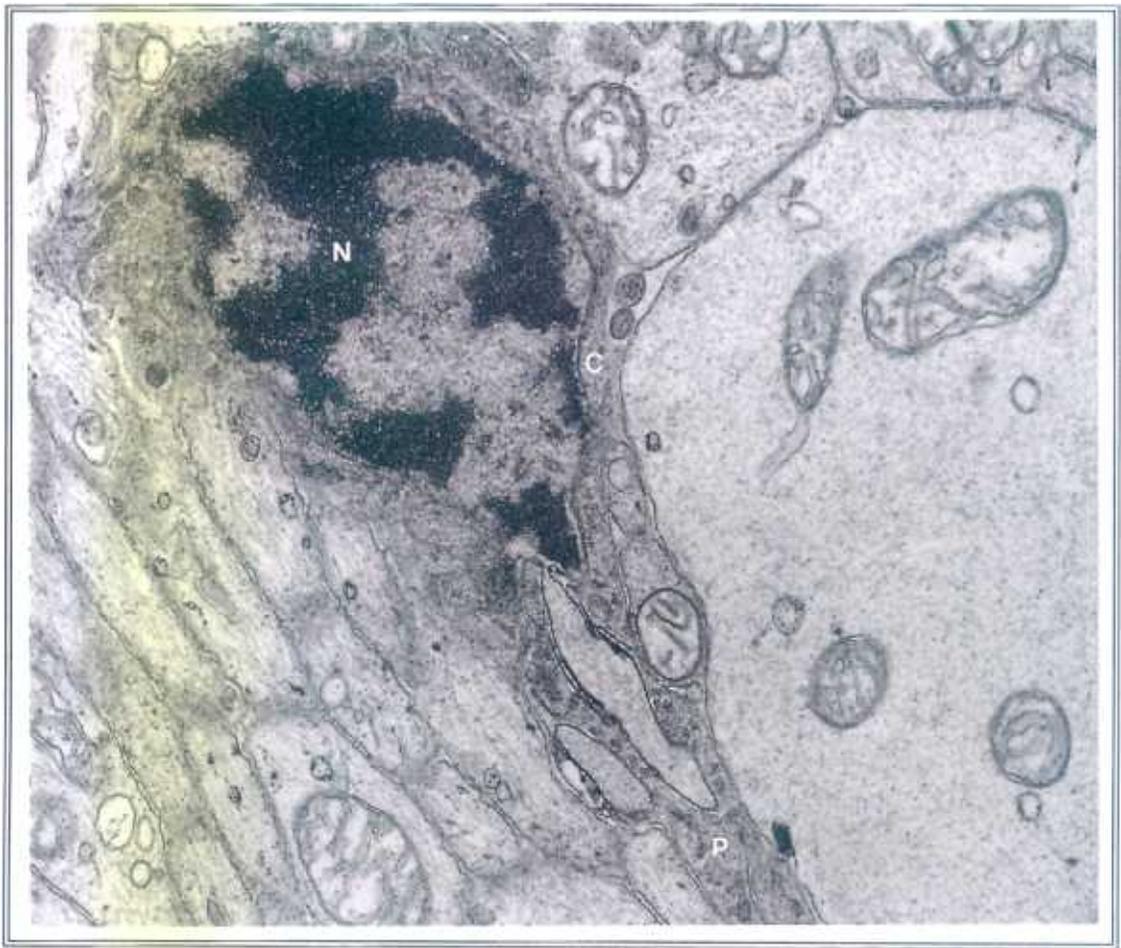
**FIG.**



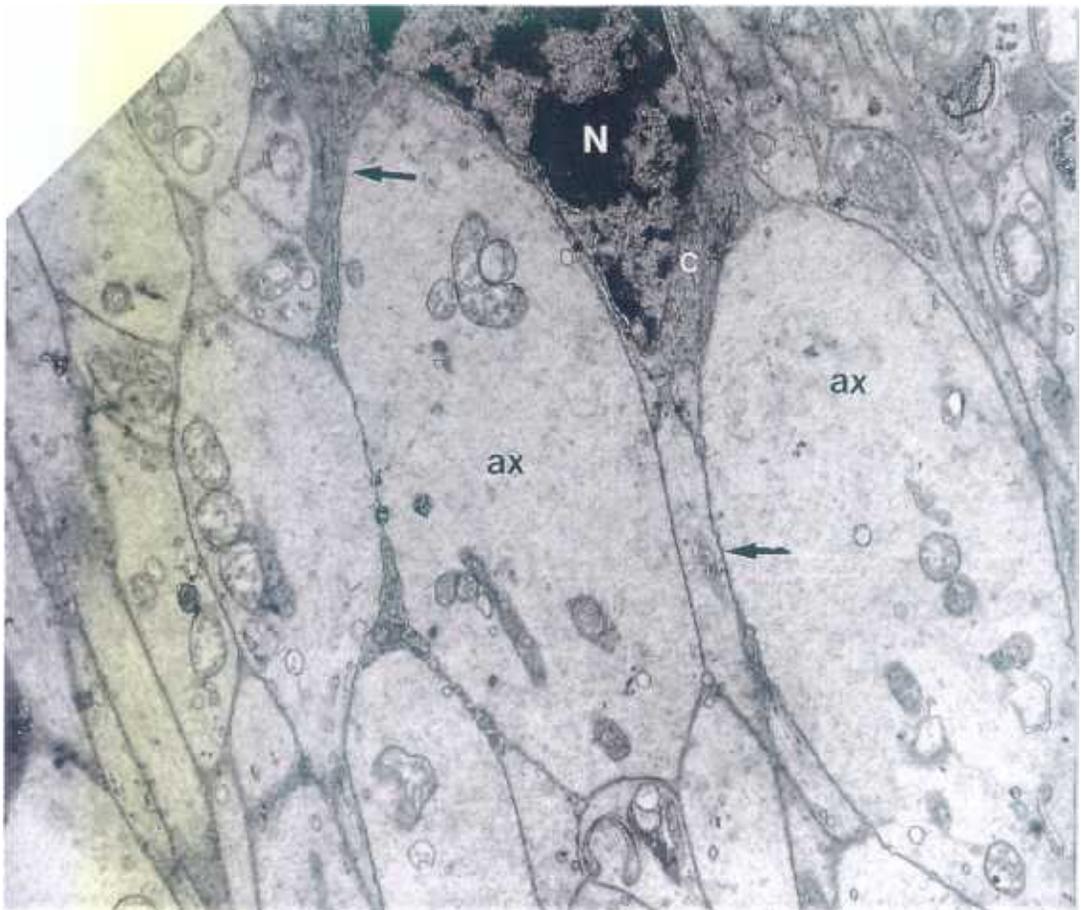
**FIG. 56**

**Fig. 57:** Astrocito de la capa superficial de fibras nerviosas (C.S.F.N.): Presenta un núcleo (N) oval con abundante cromatina y heterocromatina. El citoplasma perinuclear es escaso (C). Se aprecia una prolongación fina (P) que parte de un polo celular. (12.000×).

**Fig. 58:** Astrocito de la región prelamina anterior: Presenta un núcleo (N) oval con cromatina y heterocromatina abundante. El citoplasma perinuclear (C) es escaso. Las prolongaciones (→) parten radialmente del pericarion disponiéndose entre los axones (ax) (7.000×).



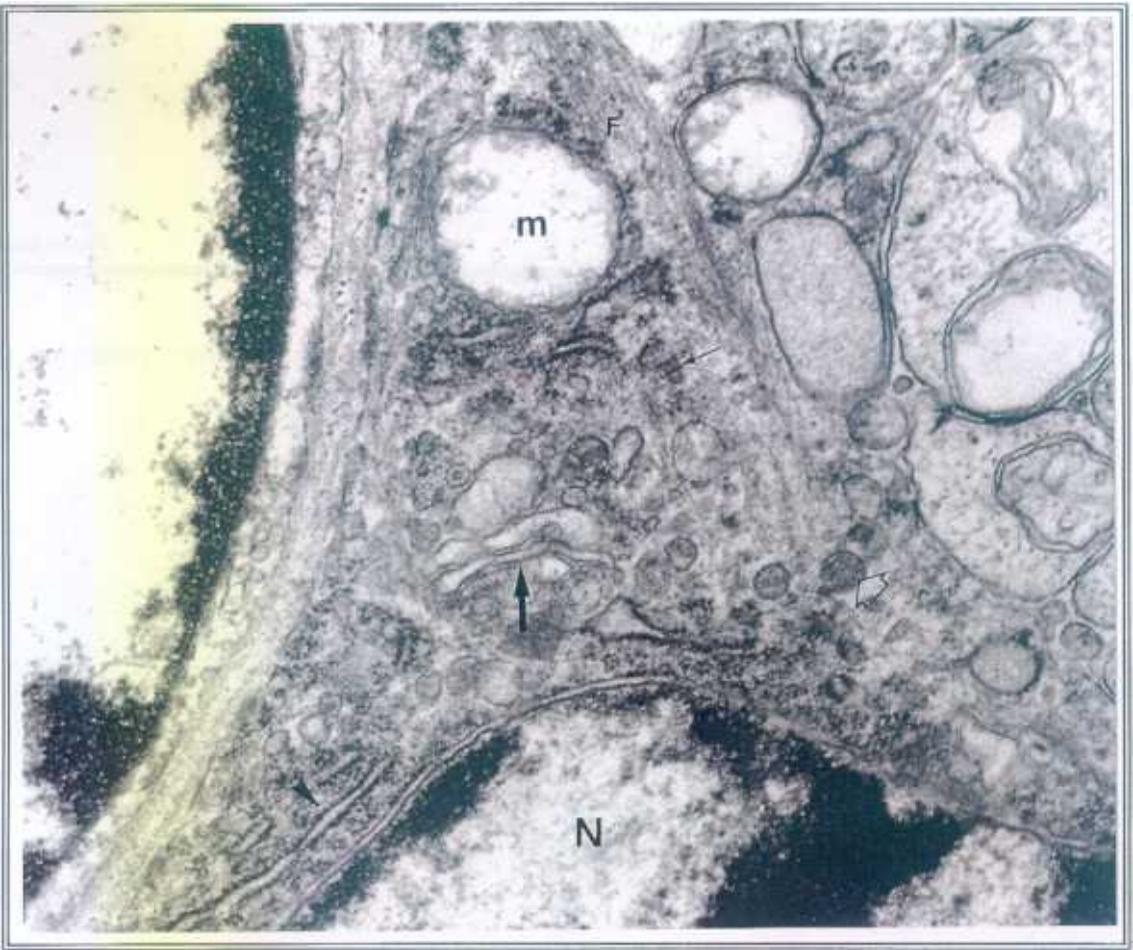
**FIG. 57**



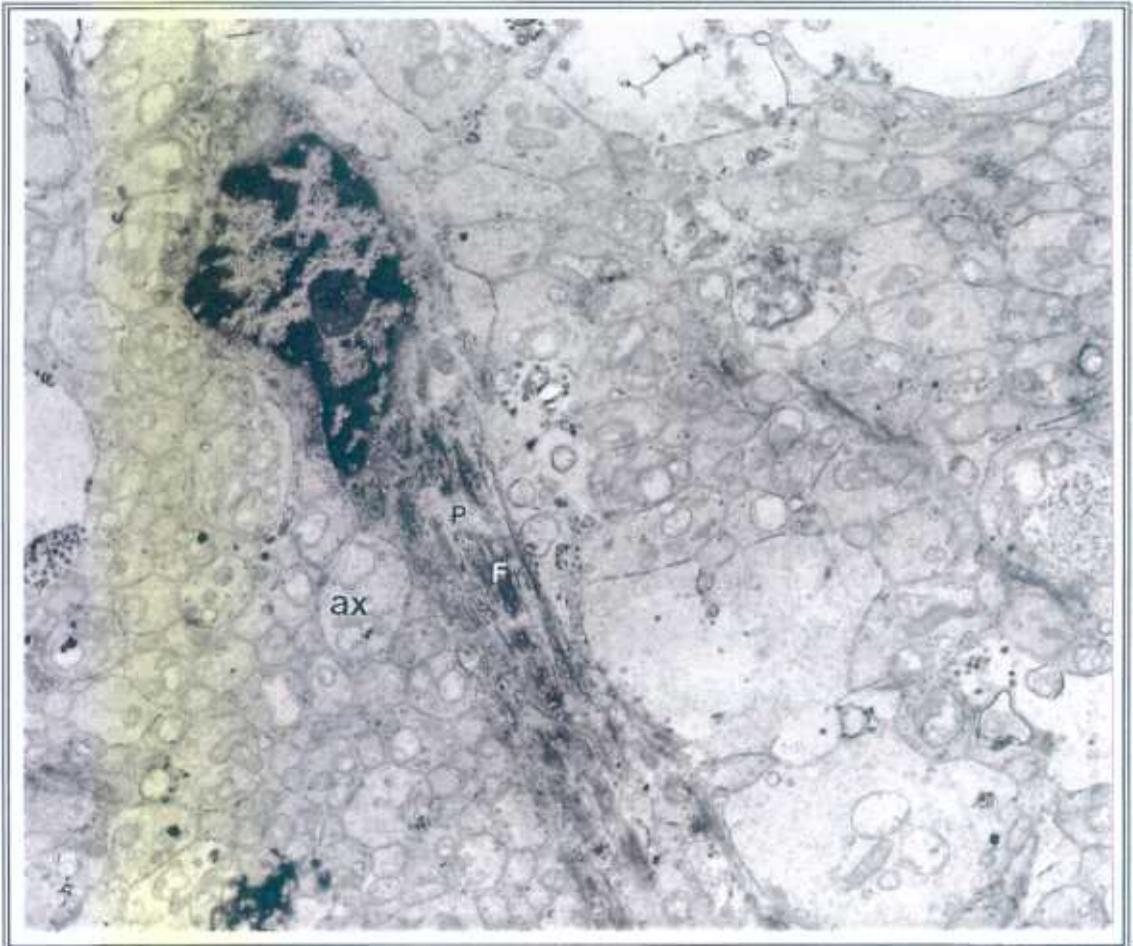
**FIG. 58**

**Fig. 59:** Características ultraestructurales de los astrocitos de la región prelamina posterior: Núcleo (N) con cromatina abundante y heterocromatina. Citoplasma perinuclear con diferentes orgánulos citoplasmáticos [mitocondrias (m), retículo endoplasmático rugoso (▲), aparato de Golgi (↑), ribosomas libres (†), filamentos gliales (F) y cuerpos densos (⊕)]. (20.000×).

**Fig. 60:** Astrocito de la región prelamina posterior: De los polos celulares parten prolongaciones robustas (P) con abundantes filamentos gliales (F) que se disponen perpendiculares a los axones (ax) (4.400×).



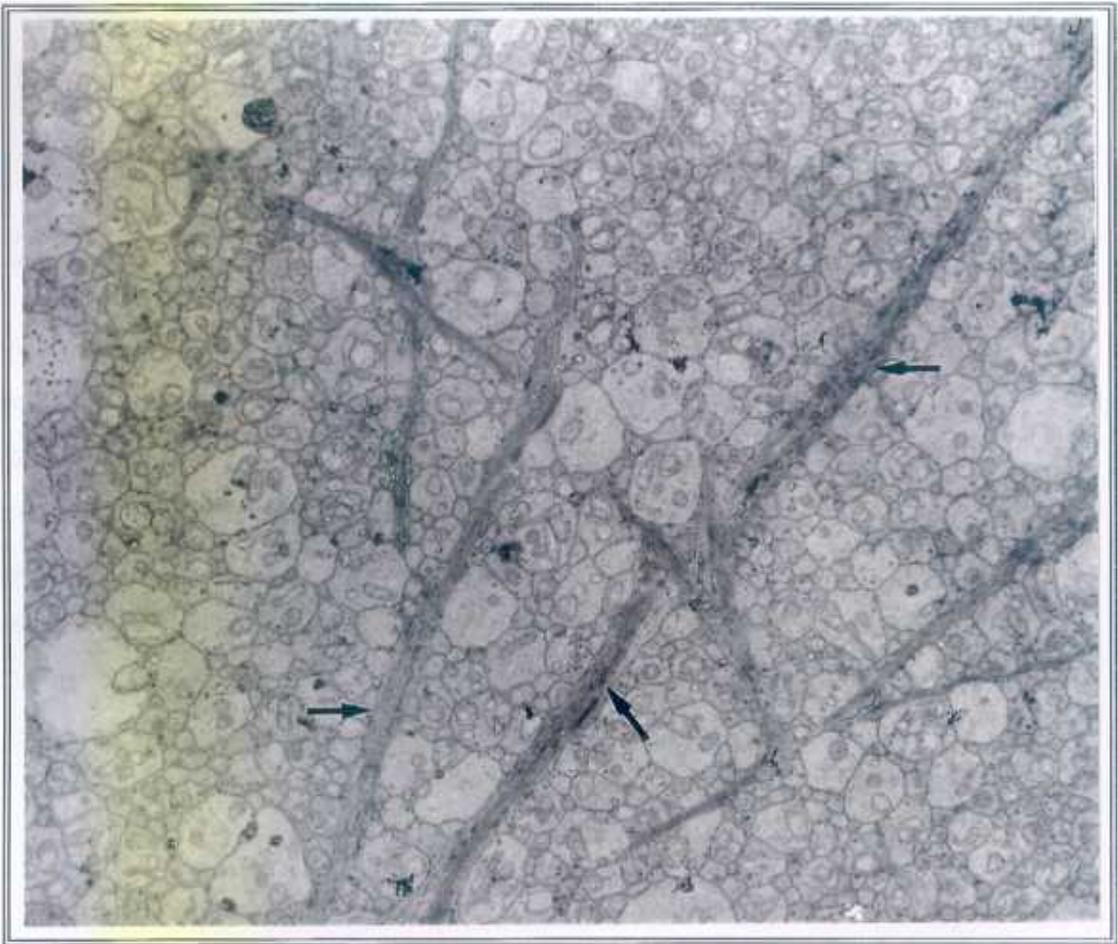
**FIG. 59**



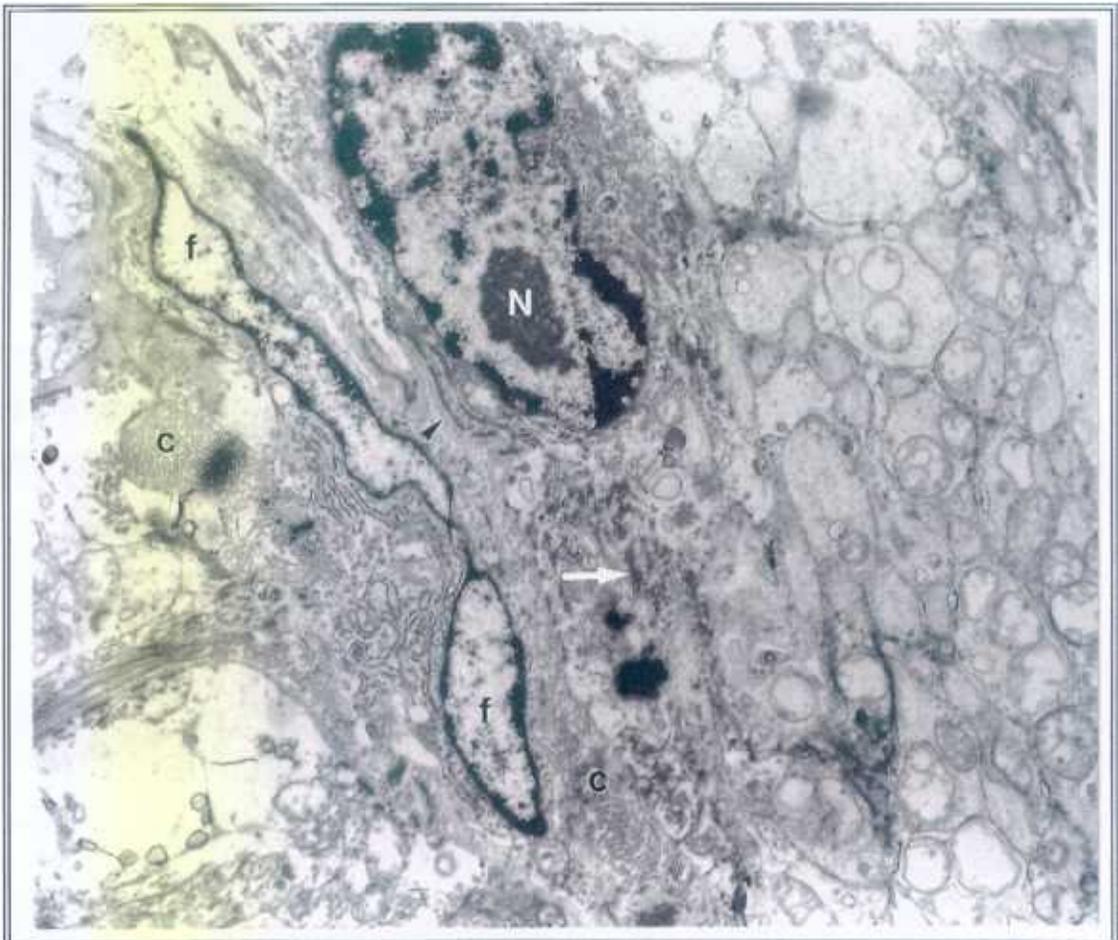
**FIG. 60**

**Fig. 61:** Prolongaciones de astrocito de la región prelaminar posterior (→) rodeando y agrupando a los axones. (7.000×).

**Fig. 62:** Astrocito de la región laminar. Presentan un núcleo (N) alargado con abundante cromatina y heterocromatina. En el citoplasma y en las prolongaciones se observan abundantes filamentos gliales (→) que forman densos paquetes. El astrocito se encuentra adosado a una lamela de las laminillas cribosas, constituidas por colágeno (c) y fibroblastos (f). Se aprecia una membrana basal (►) separando los astrocitos del colágeno. (7.000x)



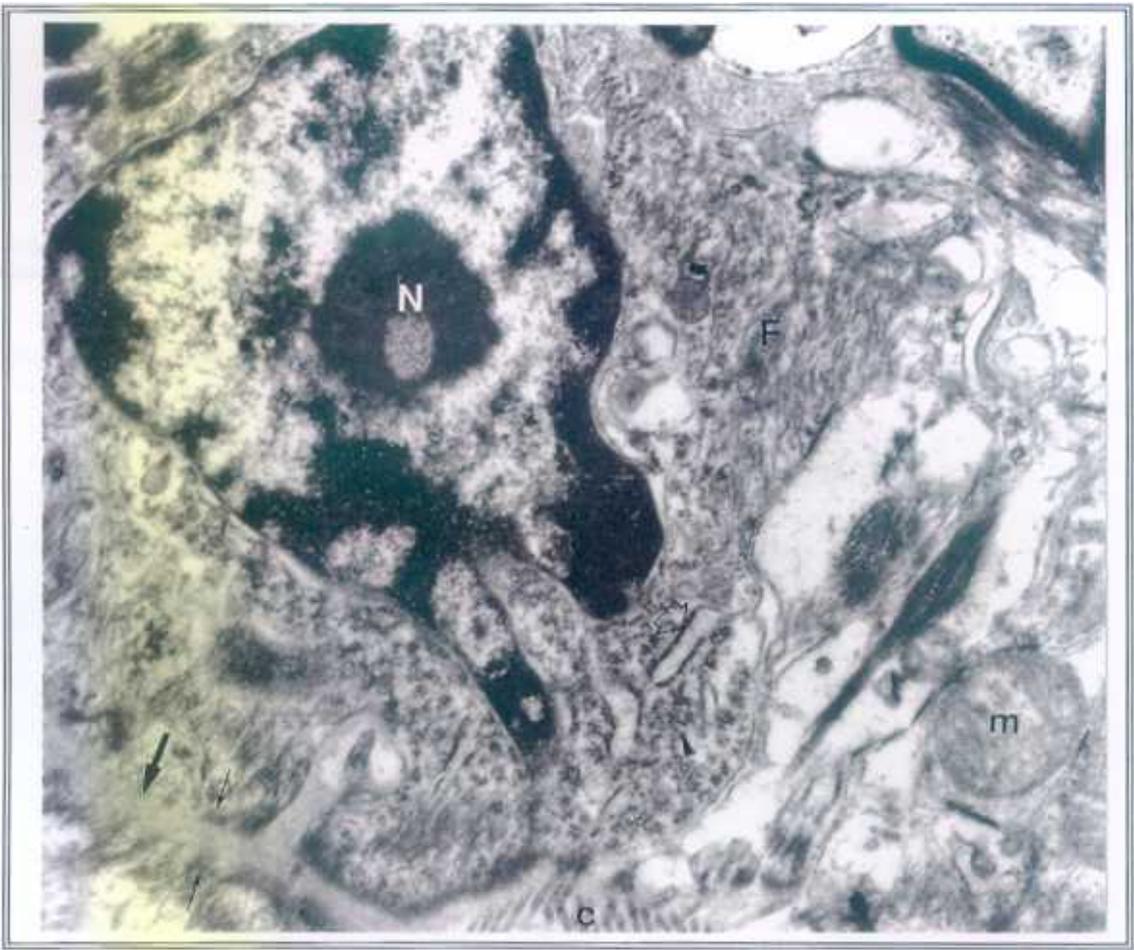
**FIG. 61**



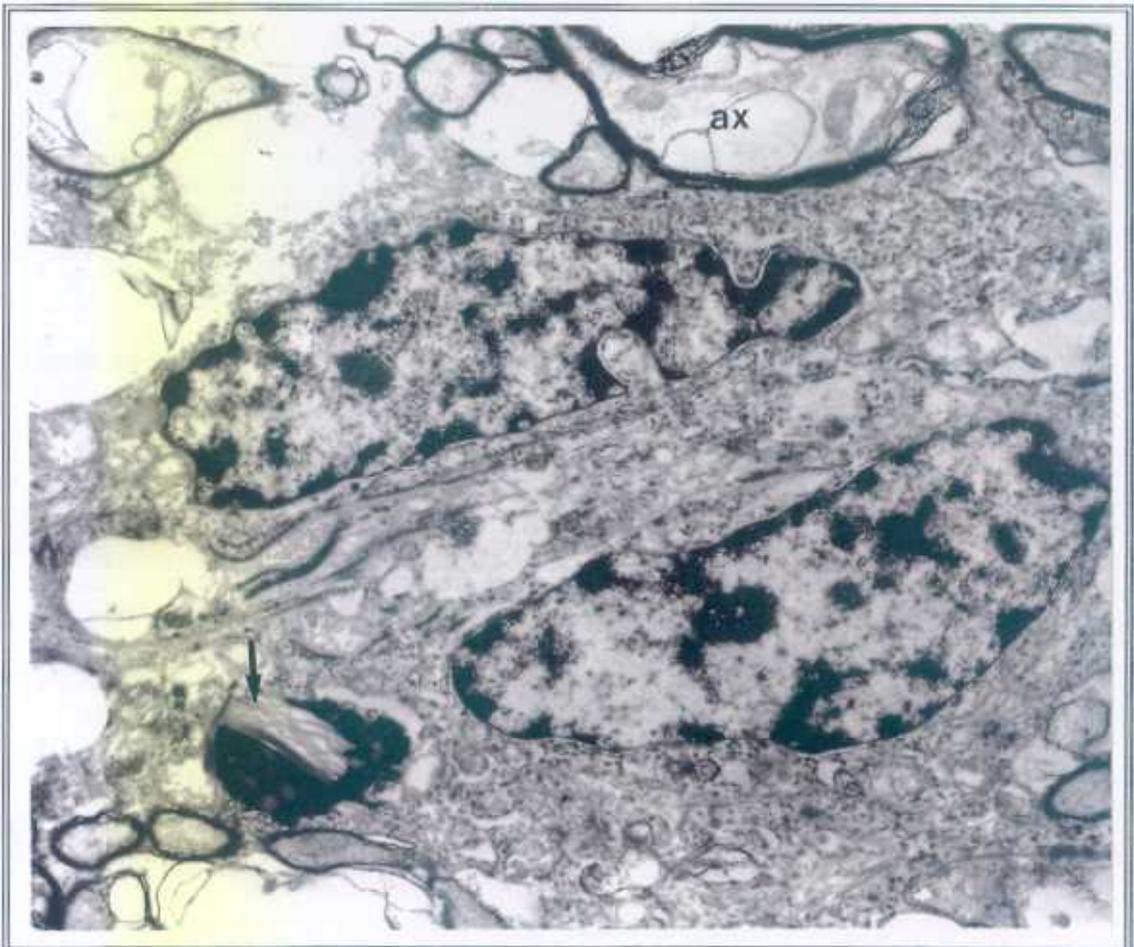
**FIG. 62**

**Fig. 63:** Rasgos ultraestructurales de los astrocitos de la región retrolaminar: Núcleo (N) oval con acúmulos de heterocromatina. Citoplasma perinuclear voluminoso con diferentes orgánulos citoplasmáticos [mitocondrias (m), ribosomas libres (▲), retículo endoplasmático rugoso (△), filamentos gliales muy abundantes (F) y cuerpo denso (◆)]. Se observa una membrana basal (↑) separando el astrocito de los septos conectivos. Los filamentos gliales se insertan en la membrana basal dando imágenes semejantes a hemidesmosomas (↑). (c: Colágeno). (12.000×).

**Fig. 64:** Astrocitos de la región retrolaminar dispuestos adyacentes entre sí, localizados entre los axones miélnicos (ax). En el interior de un astrocito, se aprecia un fragmento de mielina fagocitado (→) (7.000×)



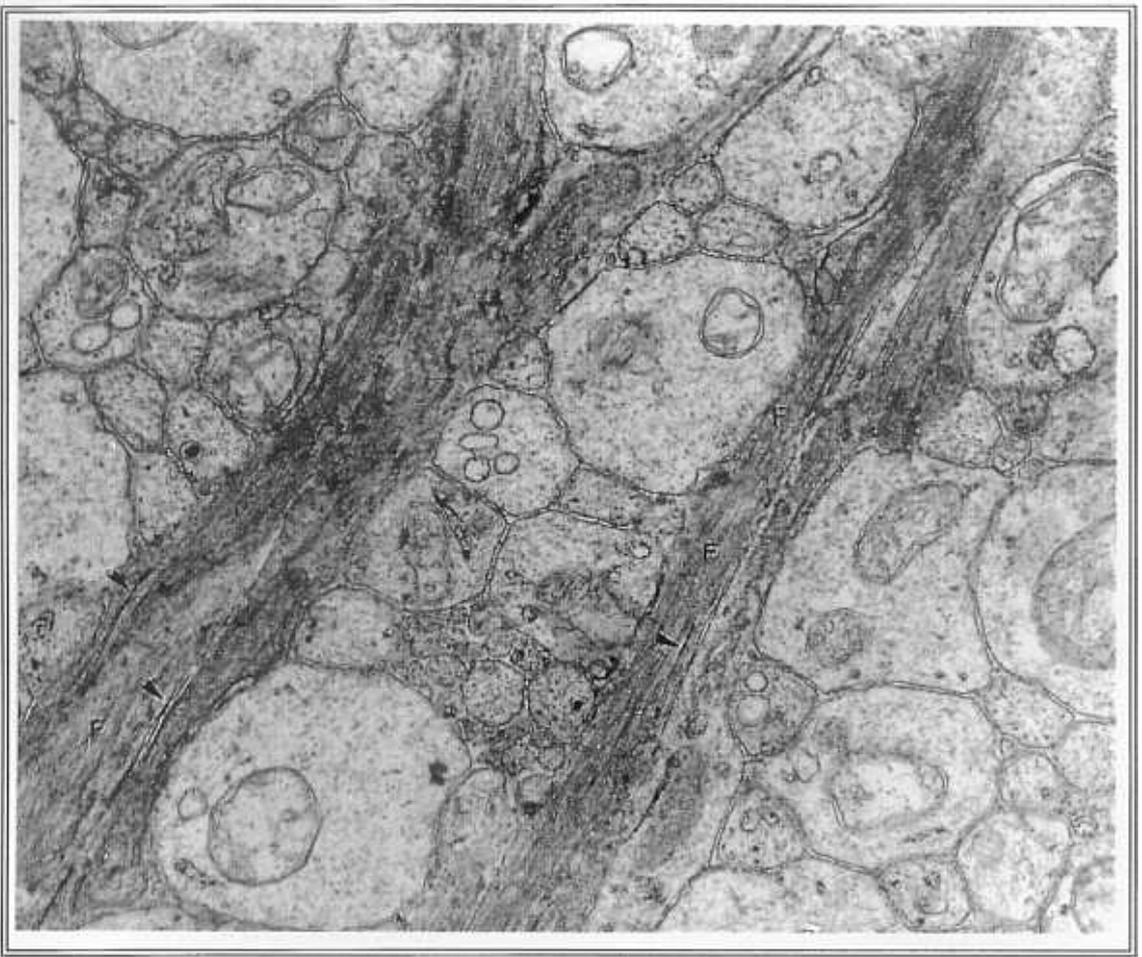
**FIG. 63**



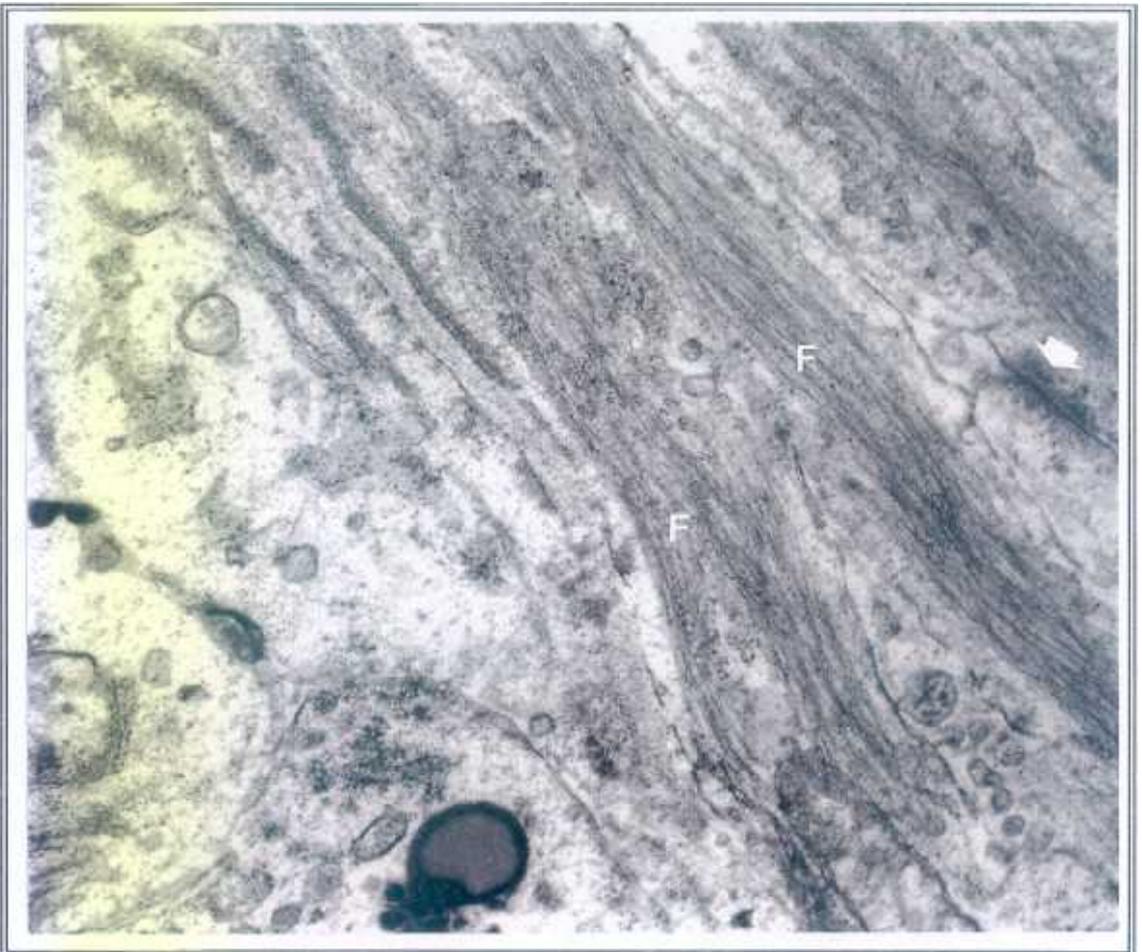
**FIG. 64**

**Fig. 65:** Detalle de prolongaciones de astrocitos en las que se pueden apreciar uniones Gap (↔). Filamentos gliales (F). (12.000×).

**Fig. 66:** Detalle de las prolongaciones astrogliales entre las que se observa un desmosoma (▲). Filamentos gliales (F). (20.000×).



**FIG. 65**

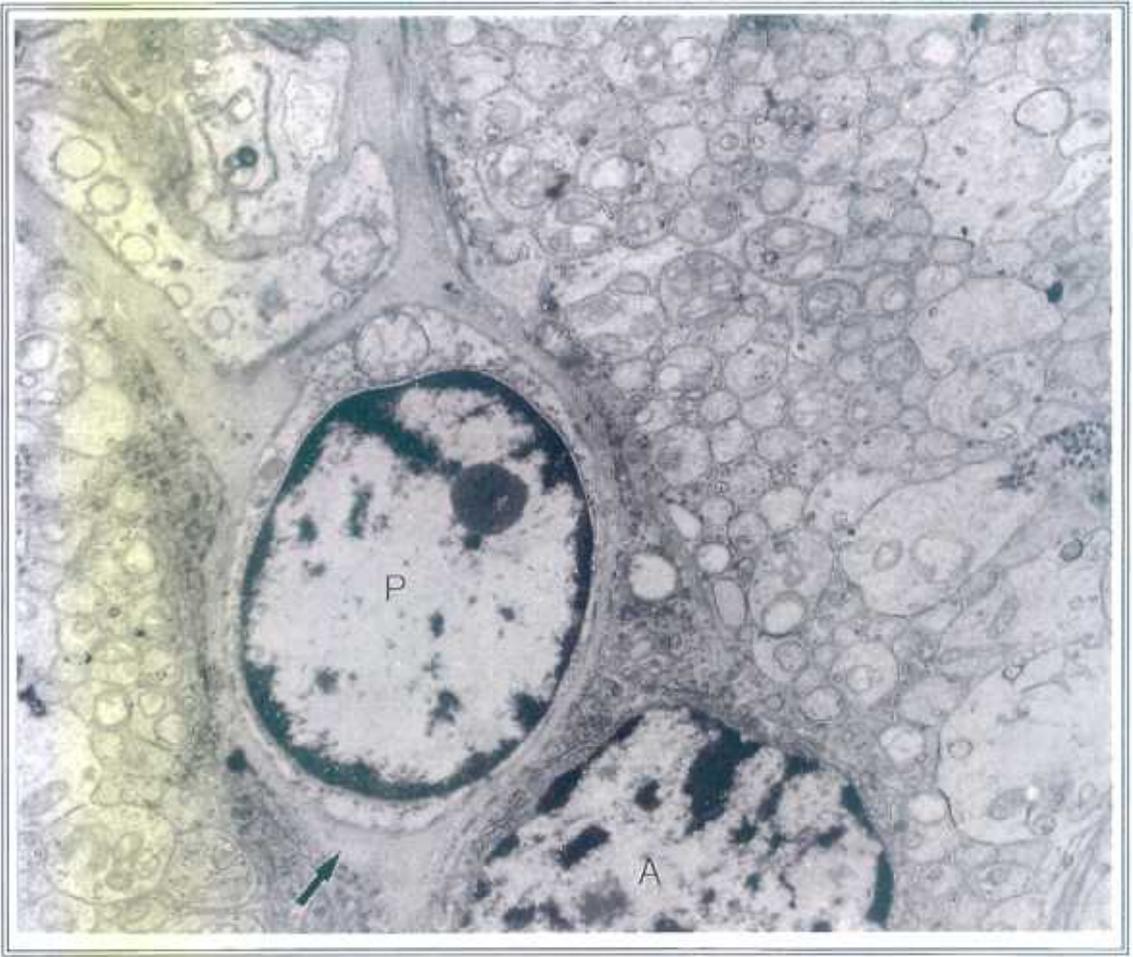


**FIG. 66**

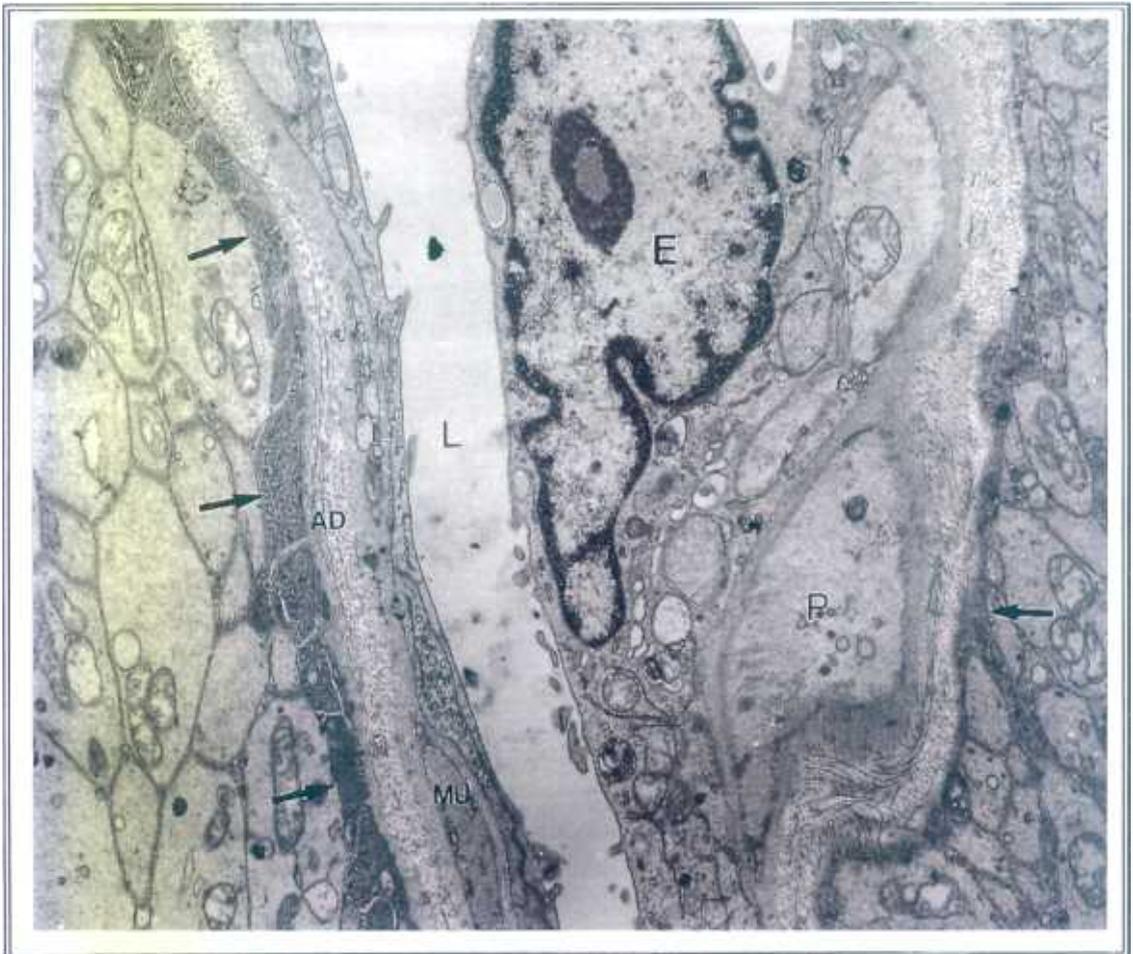
**Fig. 67:** Capilar del nervio óptico a nivel de la prelaminar anterior: Sobre la membrana basal (→) del capilar se dispone el cuerpo celular y las prolongaciones de un astrocito (A). La membrana basal se encuentra desdoblada rodeando a un pericito (P). (7.000×).

**Fig. 68:** Vaso de mediano calibre del nervio óptico rodeado completamente por prolongaciones astrogliales (→) que se disponen sobre la adventicia del vaso (AD).

(E: célula endotelial; L: Lumen; MU: célula muscular; P: pericito).  
(7.000×).



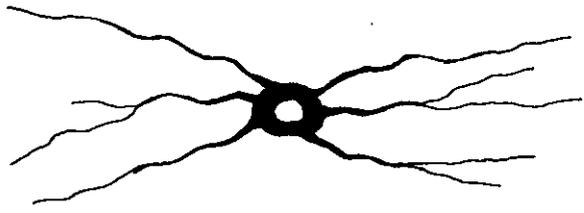
**FIG. 67**



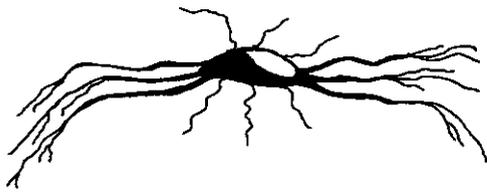
**FIG. 68**

**Fig. 69:** Dibujo representativo de la morfología que presentan los astrocitos de cuerpo celular grueso.

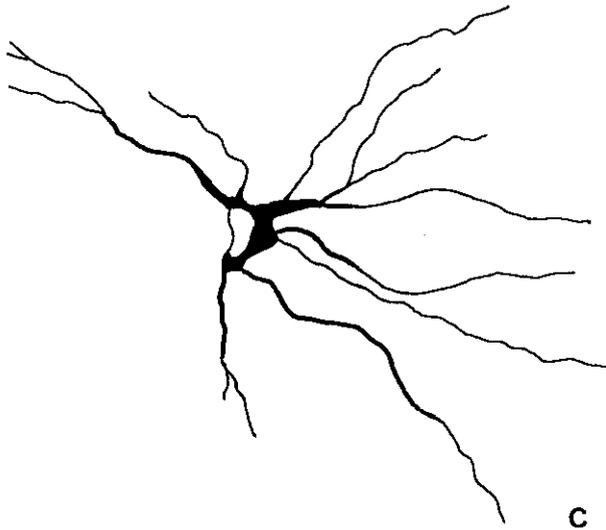
(A: astrocito de las limitantes; B: astrocito de la región prelaminar posterior y región laminar; C: astrocito de la región retrolaminar)



A



B



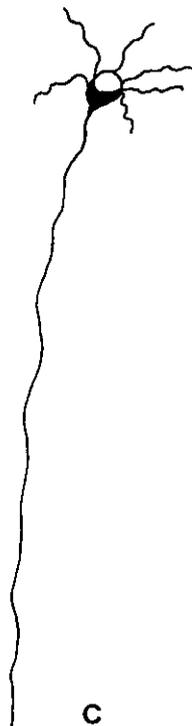
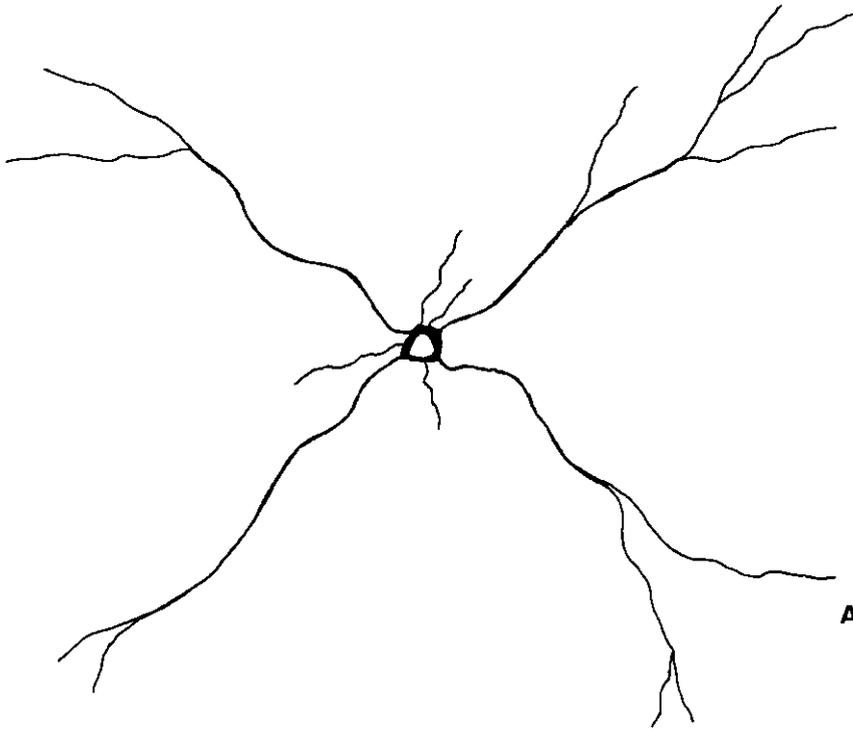
C

**Fig. 70:** Dibujo representativo de la morfología astrogial:

**A:** Astrocito de cuerpo celular delgado y morfología estrellada de la región prelamina anterior;

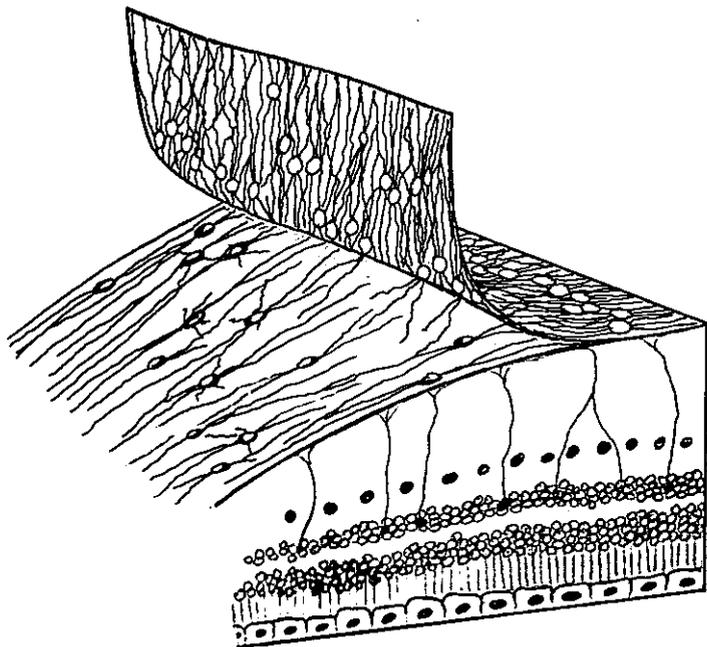
**B:** Astrocito de cuerpo celular delgado y morfología alargada de la C.S.F.N.

**C:** Astrocito con baja inmunorreactividad PGFA(+)

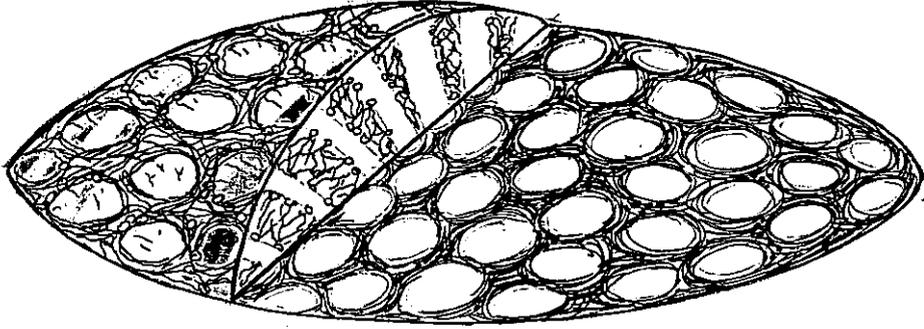


**Fig. 71:** Reconstrucción tridimensional de la cabeza del N.O. humano en la que se representa la ordenación y disposición que adoptan los astrocitos para proteger y fascicular a las fibras nerviosas procedentes de la retina. (C: coroides; R: retina; S: esclera)

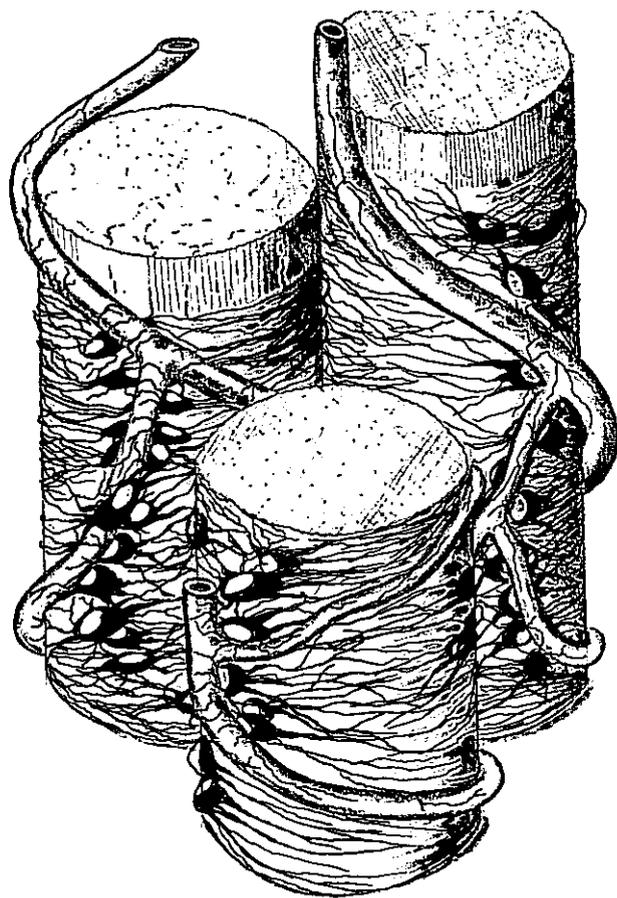
- 1.- Capa Superficial de Fibras Nerviosas
- 2.- Región prelaminar anterior
- 3.- Región prelaminar posterior
- 4.- Región laminar
- 5.- Región retrolaminar



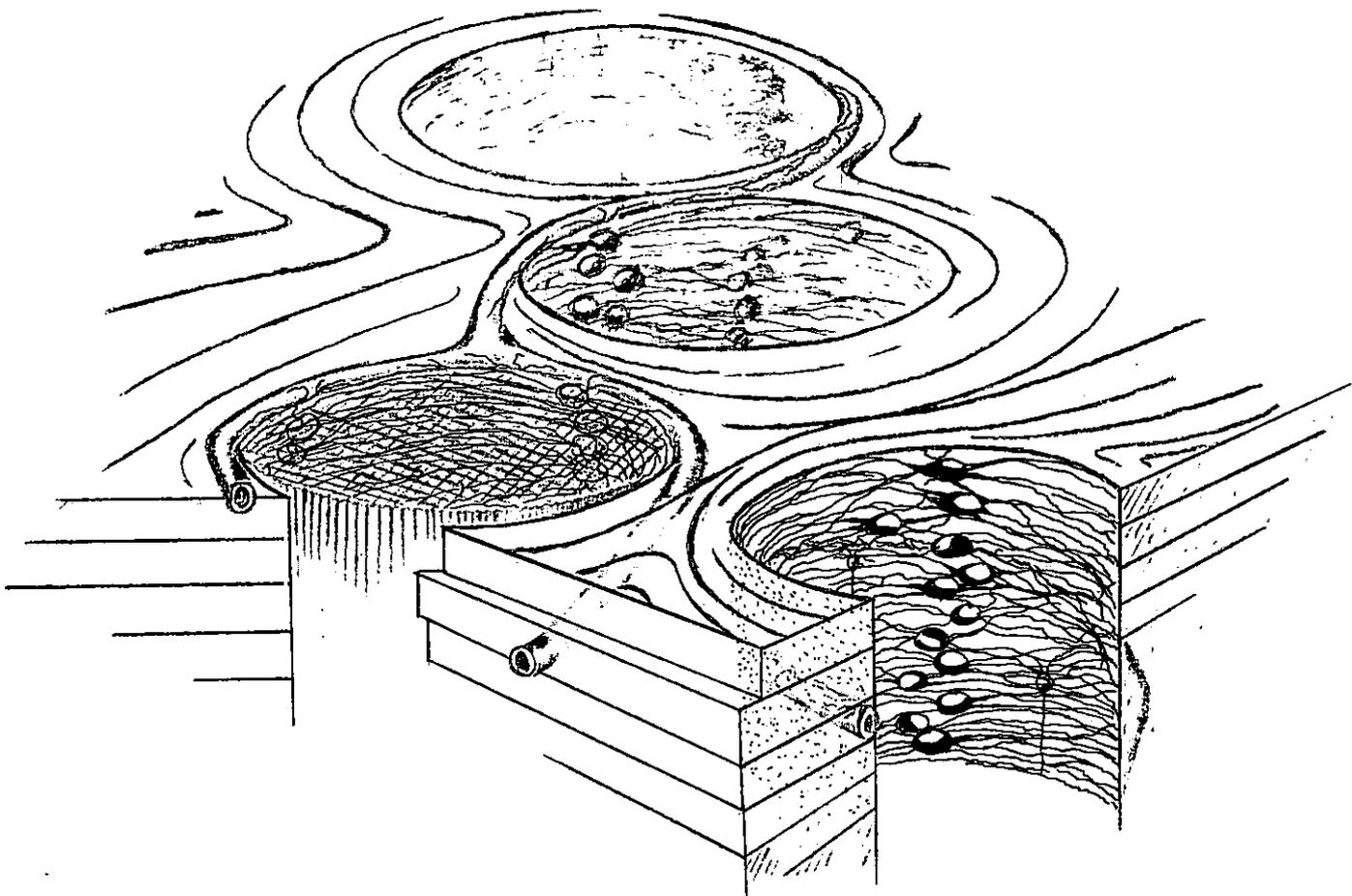
**Fig. 73:** Esquema tridimensional de la glioarquitectura de la región prelaminar anterior. Estructura en forma de cesta formada por astrocitos de cuerpo celular delgado muy estrellados que constituyen tabiques que comienzan a fascicular a los axones.



**Fig. 74:** Esquema tridimensional de tres tubos astrogiales de la región prelamina posterior. Los astrocitos de cuerpo celular delgado adoptan forma de media luna para constituir las paredes de tubos por cuyo interior circulan los axones. Los vasos, con un trayecto muy sinuoso, van por el interior de estas paredes gliales estando recubiertos por cuerpos y prolongaciones astrogiales.



**Fig: 75:** Esquema que muestra la disposición de los astrocitos recubriendo la pared interna de los poros de las lamellas cribosas en la región laminar. Estos astrocitos son similares a los que forman los tubos gliales de la prelaminar posterior; también se ha representado dentro de los fascículos nerviosos, pero cercanos a la envuelta astrogliar, la disposición de los astrocitos de baja inmunorreactividad con su larga prolongación paralela a los axones. Los vasos discurren por el interior del tejido colágeno que constituyen las lamellas cribosas, presentando una trayectoria sinuosa



## 5.- *DISCUSIÓN*

## **5.- DISCUSIÓN.**

### **5.1.- LOCALIZACIÓN DE LOS ASTROCITOS EN EL N.O. HUMANO.**

Los estudios empleando anticuerpos contra la proteína gliofibrilar ácida (PGFA) en nervios ópticos humanos son muy escasos, limitándose a los trabajos de RHODES (1982<sup>287</sup>), QUITSCHKE (1985b<sup>246</sup>), ELKINGTON (1990<sup>71</sup>) y LAKE (1992a,b<sup>161,162</sup>).

RHODES (1982<sup>287</sup>) señala que en el N.O. adulto se produce una disminución de la tinción PGFA, obteniéndose una inmunorreacción débil en comparación con la observada durante el desarrollo embrionario. Sin embargo, nosotros, en todas nuestras preparaciones hemos obtenido una señal PGFA(+) alta, variando únicamente, como veremos a continuación, la densidad de la inmunorreacción en

las diferentes regiones del N.O.

En primer lugar nos encontramos con que existe una fuerte y homogénea reacción PGFA(+), en los territorios de contacto del N.O. con otros tejidos como el vítreo, la retina, la coroides y las vainas meningeas, que es puesta de manifiesto tanto con inmunofluorescencia como con P.A.P. Por su tinción con anti-PGFA comprobamos, al igual que RHODES (1982<sup>287</sup>), la naturaleza astrogial de estas limitantes que, inicialmente habían sido denominadas como: membrana limitante de Elschnig (ELSCHNIG, 1901<sup>72</sup>) (separando el vítreo del N.O.), menisco central de Kuhnt (KUHNT, 1879<sup>159</sup>) (separando el vítreo de los vasos centrales), tejido intermediario de Kuhnt (KUHNT, 1879<sup>159</sup>) (entre retina y nervio), tejido de Jacoby (JACOBY, 1905<sup>138</sup>) (entre coroides y nervio), y manto periférico de Fuchs o Greef (FUCHS, 1885<sup>83</sup>; GREEF, 1889<sup>106</sup>) (separando la piamadre del N.O.).

Estas observaciones inmunohistoquímicas concuerdan con las observaciones realizadas, tanto con plata como con microscopía electrónica, en diversas especies animales, incluidos los primates, por SALZMANN (1912<sup>296</sup>), HAYREH (1966<sup>113</sup>), ANDERSON (1967,1969a,b,c<sup>10-13</sup>), HOGAN (1971<sup>133</sup>), WIRTSCHAFTER (1975<sup>357</sup>), MINCKLER (1976<sup>197</sup>), RAMÍREZ (1989a<sup>271</sup>) y SALAZAR (1989<sup>295</sup>).

Además, en todas las regiones del N.O. observamos la existencia de una banda PGFA(+) rodeando todos los vasos sanguíneos. Esta banda puede ser de mayor o menor grosor, dependiendo del diámetro del vaso, y así vemos desde finas prolongaciones astrocitarias que terminan envolviendo un capilar, hasta varias capas de prolongaciones y cuerpos celulares rodeando la envuelta de tejido conectivo de los grandes vasos centrales. Esta banda PGFA(+) también ha sido puesta de manifiesto en el hombre por RHODES (1982<sup>287</sup>) y LAKE (1992a,b<sup>161,162</sup>); en la rata por DIXON (1981<sup>66</sup>) y SKOFF (1986<sup>311</sup>), y en el conejo por SALAZAR (1989<sup>295</sup>).

Las relaciones de los vasos sanguíneos y los astrocitos fueron descritas inicialmente en el S.N.C. por RAMÓN Y CAJAL (1911<sup>279</sup>) al describir como los astrocitos presentaban terminaciones vasculares en pie.

En el N.O. estas relaciones vaso-gliales han sido puestas de relieve por ERSKINE (1958<sup>74</sup>), y demostradas tanto con impregnaciones argénticas como con microscopía electrónica (MILLER, 1984,1989b<sup>192,196</sup>; HAYREH, 1966,1974a, 1978<sup>113,114,116</sup>; LISS, 1956<sup>178</sup>; WOLTER, 1956,1961<sup>365,366</sup>; ANDERSON, 1967-1973<sup>10-15</sup>; VAUGHN, 1967a,b<sup>340,341</sup>; ORTIZ-MITTERER, 1974<sup>219</sup>; CAMPOS, 1976<sup>39</sup>; SKOFF, 1976a,b,1980,1986<sup>308-311</sup>; BÜSSOW, 1980<sup>37</sup>; BUTT, 1989<sup>38</sup>; SUÁREZ, 1989<sup>325</sup>; RAMÍREZ, 1989a,b<sup>271,272</sup>); llegando a afirmar STURROCK (1975<sup>322</sup>) la existencia de una correlación entre la población glial y el tanto por

ciento de zona vascularizada del N.O.

Excepto en estas zonas limitantes y cuando recubren a los vasos sanguíneos, la inmunorreactividad PGFA(+) revela un alto grado de organización en la disposición de los somas y las prolongaciones astrogliales. Según indica SKOFF (1986<sup>311</sup>), la organización de los astrocitos en el N.O. no es al azar, ya que sus prolongaciones no se cruzan en todas las direcciones.

Estas prolongaciones PGFA(+) están interconectadas unas con otras para constituir una estructura en la cual las fibras axonales están canalizadas, por lo que en secciones longitudinales de nervio se observan columnas PGFA(+) que alternan con bandas de reacción más débil.

Sin embargo, hemos observado cómo existe una diversidad citoarquitectural de los astrocitos en cuanto a su número y forma de agrupar (fascicular) a las fibras nerviosas. Así, en la región prelaminar nos encontramos con un incremento del número de astrocitos desde la zona anterior (en la que forman cestas) hasta la posterior (donde crean tubos gliales). Después se produce una disminución brusca en el número de estas células a nivel de la lámina cribosa, donde la inmunorreactividad se observa como una hilera longitudinal en sentido antero-posterior recubriendo internamente los canales esclerales. Finalmente, en la zona

retrolaminar vuelve a incrementarse el grosor de las bandas PGFA(+), observándose columnas de núcleos de astrocitos alternando con oligodendrocitos. Esta diversidad en la fasciculación astrocítica también es citada por SKOFF (1986<sup>311</sup>) al estudiar la citoarquitectura del N.O. de la rata con anti-PGFA.

La disposición en columnas de las células astrogliales, así como la segmentación de las fibras nerviosas en fascículos por la acción de prolongaciones astrogliales orientadas radial y transversalmente rodeando a los axones ha sido descrita igualmente en los estudios del N.O. de diferentes especies animales empleando tinciones de plata y microscopía electrónica (CONE, 1932<sup>47</sup>; DAVIS, 1940<sup>62</sup>; LISS, 1956<sup>178</sup>, ZIMERMANN, 1956; DUKE-ELDER, 1961<sup>68</sup>; KESTENBAUM, 1963<sup>149</sup>; MALMFORS, 1963<sup>183</sup>; BLUNT, 1965<sup>29</sup>; ANDERSON, 1973<sup>15</sup>; ORTIZ-MITTERER, 1974<sup>219</sup>; CAMPOS, 1976<sup>39</sup>; SKOFF, 1976a,b<sup>308.309</sup>; OGDEN, 1978<sup>214</sup>; DIXON, 1981<sup>66</sup>; SARAUX, 1985<sup>297</sup>; RAMÍREZ, 1989a,b<sup>271.272</sup>, JONAS, 1993b<sup>145</sup>); pero excepto HOGAN (1971<sup>133</sup>) nadie había señalado el importante incremento en el número y densidad de células astrogliales que encontramos en la región prelaminar posterior.

No ocurre lo mismo con la disposición alternante de los astrocitos y oligodendrocitos formando columnas a lo largo del eje del N.O. en la región

retrolaminar, que ha sido señalada reiteradamente en todos los trabajos realizados sobre el N.O. (MARCHESANI, 1926<sup>185</sup>; LISS, 1956<sup>178</sup>; HAYREH, 1966, 1974a, 1978, 1989<sup>113, 114, 116, 119</sup>; COHEN, 1967<sup>44</sup>; ANDERSON, 1967, 1969c, 1970, 1973<sup>10, 13-15</sup>; ORTIZ-MITTERER, 1974<sup>219</sup>; CAMPOS, 1976<sup>39</sup>; SKOFF, 1986<sup>311</sup>).

Por último, ultraestructuralmente se ha demostrado la existencia siempre, de tejido astrogliar, interpuesto entre el tejido de naturaleza neuroectodérmica (axones de las células ganglionares) y el tejido de origen mesodérmico (colágeno de la lámina cribosa, septos conectivos piales, paredes vasculares) (COHEN, 1967<sup>44</sup>; ANDERSON, 1967-1973<sup>10-15</sup>; HOGAN, 1971<sup>133</sup>; RHODES, 1982<sup>287</sup>), lo que coincide con nuestras observaciones tanto con las técnicas inmunohistoquímicas como con microscopía electrónica.

## **5.2.- MORFOLOGÍA Y ULTRAESTRUCTURA DE LOS ASTROCITOS DEL NERVIO ÓPTICO.**

Al igual que se ha descrito en otras partes del S.N.C. (LUSE, 1956<sup>182</sup>; SCHULTZ, 1964; VAUGHN, 1967a,b<sup>340,341</sup>; SUÁREZ, 1983<sup>324</sup>; ROOTS, 1986<sup>292</sup>), los astrocitos del N.O. humano (COHEN, 1967<sup>44</sup>; ANDERSON, 1967-1973<sup>10-15</sup>; HOGAN, 1971<sup>133</sup>; ELKINGTON, 1990<sup>71</sup>), y primates no homínidos (ANDERSON, 1969a,c<sup>11,13</sup>; COOK, 1973a<sup>49</sup>; QUIGLEY, 1977<sup>237</sup>; BÜSSOW, 1980<sup>37</sup>), se caracterizan ultraestructuralmente por presentar un citoplasma en el que pueden distinguirse mitocondrias, ribosomas libres, retículo endoplásmico rugoso, aparato de Golgi, gránulos de glucógeno, así como gran cantidad de filamentos de 8-10 nm. de diámetro que se han denominado como "filamentos intermedios gliales" (LAZARIDES, 1980<sup>164</sup>).

Estos filamentos gliales están compuestos por subunidades protéicas (proteína gliofibrilar ácida [PGFA]) de 50 Kd de peso molecular (LIEM, 1978), considerándose al anticuerpo desarrollado contra la PGFA como el marcador más específico para identificar a las células astrogliales (BIGNAMI, 1972<sup>21</sup>; DAHL, 1973,1985<sup>56,59</sup>; GHANDAUR, 1979).

Para el estudio de la morfología de los astrocitos del nervio, hemos empleado, por tanto, este anticuerpo como marcador. Además, como hemos podido observar con la microscopía electrónica, al igual que ANDERSON (1973<sup>15</sup>), BÜSSOW (1980<sup>37</sup>) y ELKINGTON (1990<sup>71</sup>), los filamentos gliales son tan abundantes, tanto en el pericarion como en las prolongaciones, que las inmunodetecciones con el anti-PGFA en las secciones a 30  $\mu\text{m}$ . nos permiten obtener imágenes semejantes a la morfología tridimensional que adoptan estas células en las diferentes zonas del nervio.

Observamos, al igual que LAKE (1992a,b<sup>161,162</sup>), la ausencia de inmunorreactividad en los núcleos astrogliales, siendo alta en las prolongaciones. Sin embargo, el núcleo de los astrocitos destaca y puede ser localizado sin dificultad debido a la reacción positiva circundante procedente de los paquetes de filamentos gliales presentes en su pericarion, y que se pueden observar normalmente en las preparaciones de microscopía electrónica.

En todos los N.O. humanos estudiados, hemos podido diferenciar tres grupos de astrocitos PGFA(+) con características y localización diferente: astrocitos con cuerpo celular grueso, astrocitos con cuerpo celular delgado, y astrocitos con baja inmunorreactividad.

Estos grupos celulares no habían sido caracterizados anteriormente empleando inmunodetecciones, ya que los trabajos existentes empleando estas técnicas en nervios ópticos humanos son muy escasos, estando además enfocados, o en la determinación de la existencia de señal PGFA(+) (ELKINGTON, 1990<sup>71</sup>; LAKE, 1992a,b<sup>161,162</sup>), o en su diferente expresión durante el desarrollo embrionario (RHODES, 1982<sup>287</sup>; QUITSCHKE, 1985b<sup>246</sup>).

Los trabajos sobre la morfología de los astrocitos del N.O., fundamentalmente se han basado en el empleo de las impregnaciones metálicas. Tanto con estas técnicas como con microscopía electrónica, todos los autores han estado de acuerdo en considerar a los astrocitos del N.O. de los primates dentro de la variedad fibrosa (LEBER, 1868<sup>165</sup>; GREEF, 1899<sup>106</sup>; RAMÓN Y CAJAL, 1892,1904,1911<sup>276,278,279</sup>; COLLIN, 1920<sup>46</sup>; DAVIS, 1940<sup>62</sup>; ZIMMERMAN, 1956<sup>371</sup>; WOLTER, 1957,1961<sup>365,366</sup>; ANDERSON, 1967-1973<sup>10-15</sup>; HOGAN, 1971<sup>133</sup>; STURROCK, 1975<sup>322</sup>; BÜSSOW, 1980<sup>37</sup>; ELKINGTON, 1990<sup>71</sup>).

Inicialmente MARCHESANI (1926<sup>185</sup>) sólo distinguió un tipo astrogliar con múltiples prolongaciones que le daban un aspecto de "araña", término que es recogido por WOLTER (1957,1961<sup>365,366</sup>) y ANDERSON (1969c<sup>13</sup>) para describir a los astrocitos presentes en la papila humana; así como por HAYREH

(1966,1974a, 1978<sup>113,114,116</sup>) en monos, y WENDELL-SMITH (1966<sup>354</sup>) en gatos.

Estos astrocitos "araña" se caracterizan por poseer un soma pequeño con un núcleo oval del que parten largas prolongaciones en varias direcciones que le dan un aspecto estrellado, y se encuentran localizados formando una estructura en cesta en el área del N.O. comprendida entre el vítreo y las lamellas colágenas cribosas, (WOLTER, 1957,1961<sup>365,366</sup>; HAYREH, 1966,1974a,1978<sup>113,114,116</sup>). Estas células, por su morfología, se corresponden perfectamente con las descritas por nosotros como astrocitos de cuerpo celular delgado presentes en la C.S.F.N. y región prelaminar anterior.

No obstante, no coincidimos en su localización, al observarlos nosotros, ocupando únicamente una parte de la zona indicada por estos autores, ya que la glioarquitectura de la zona posterior de la región prelaminar, nosotros la describimos constituida por un tipo celular diferente, por astrocitos de cuerpo celular grueso, situación que no es descrita en ningún momento por estos autores empleando las técnicas de plata.

Sin embargo, otros autores como LISS (1956<sup>178</sup>) y CAMPOS (1976<sup>39</sup>) han realizado clasificaciones amplias, empleando tinciones de plata, describiendo diversos tipos celulares que se distribuyen de forma diferente a lo largo del N.O.

humano.

Así, LISS (1956<sup>178</sup>) define cuatro tipos de astrocitos en el N.O. humano: fibrosos típicos; gigantes; con una prolongación larga y varias en V; y finalmente células más pequeñas con numerosas expansiones radiales finas.

CAMPOS (1973<sup>39</sup>), amplia estos tipos gliales hasta un total de siete: el tipo I o aplanado perivascular; el tipo II o en horquilla; el tipo III, que es una forma intermedia entre astrocito y oligodendrocito; el tipo IV o estrellado gigante; el tipo V de tamaño pequeño; el tipo VI que es monofasciculado; y el tipo VII que se caracteriza por ser bifasciculado.

Intentando hacer una correspondencia entre las clasificaciones de estos autores y nuestras descripciones, los astrocitos fibrosos típicos de LISS<sup>178</sup> (tipo II), así como los definidos por CAMPOS<sup>39</sup>, como aplanados perivasculares (tipo I) y estrellado gigante (tipo IV), podrían englobarse dentro de los astrocitos de cuerpo celular grueso. Las células con ramificaciones en horquilla (Tipo III de LISS<sup>178</sup> y II de CAMPOS<sup>39</sup>), y los descritos por CAMPOS<sup>39</sup> como monofasciculados (tipo VI), bifasciculados (VII), o estrellados pequeños (tipo V) ; se englobarían dentro de los astrocitos de cuerpo celular delgado, que como vimos podían tener un aspecto desde bipolar a más o menos estrellado. Por último, CAMPOS<sup>39</sup>, indica la existencia de unas células pequeñas con varias prolongaciones radiales cortas y otra rectilínea más larga, a las que define como astrocitos intermedios (tipo III),

que nos recuerdan a nuestras descripciones de los astrocitos con baja inmunorreactividad PGFA(+).

Aunque, como vemos, en un principio la mayoría de estos tipos celulares se podrían agrupar, englobándolos dentro de alguno de los dos grupos definidos por nosotros con el empleo de la inmunohistoquímica; sin embargo, debemos de tener en cuenta, que nuestra clasificación se ha elaborado en base a células individualizadas y teñidas en su totalidad con anti-PGFA, en cortes de 30  $\mu\text{m}$ ., mientras que los estudios anteriores se basaron en cortes a 10-15  $\mu\text{m}$ . teñidos con plata. Estos cortes no son lo suficientemente gruesos como para obtener imágenes completas de estos astrocitos, y por lo tanto, muchos de estos subtipos pueden ser en realidad astrocitos con morfología semejante que han sido seccionados a distinto nivel por lo que se aprecian con más o menos prolongaciones partiendo de su citoplasma; e incluso, como señala ORTIZ-MITTERER (1974<sup>219</sup>), alguna de las células consideradas como astrocitos por LISS<sup>178</sup> se corresponderían en realidad a oligodendrocitos.

Sobre la morfología y características ultraestructurales de los astrocitos en las diferentes regiones del N.O., en primer lugar, nuestras observaciones sobre la ultraestructura de los astrocitos de la C.S.F.N. y prelaminar anterior, coinciden completamente con las de ANDERSON (1967-1973<sup>10-15</sup>), al encontrar como estas

células tienen un núcleo oval rodeado por una fina capa de citoplasma del que parten prolongaciones más o menos delgadas llenas de filamentos intermedios; razón por la cual al ser marcadas con anti-PGFA presentan un cuerpo celular delgado. Como HOGAN (1971<sup>133</sup>) hemos visto la existencia de desmosomas uniendo las prolongaciones de astrocitos próximos; encontrando nosotros, además, uniones Gap entre las prolongaciones de estos astrocitos.

Con el empleo tanto de microscopía electrónica, como con el uso de anticuerpos contra la PGFA, ELKINGTON (1990<sup>71</sup>) estudia la estructura de la lámina cribosa humana, definiendo también a los astrocitos de la parte anterior o coroidea de la lámina cribosa, que como ya hemos discutido anteriormente, se corresponde con la región prelaminar posterior considerada por nosotros. Los rasgos ultraestructurales observados por este autor, como son la disposición de las prolongaciones rodeando a los haces axonales en dos o tres capas formando las paredes de los fascículos y la disposición del núcleo adosado a estas paredes, se corresponde en un alto porcentaje con las características de los astrocitos definidos por nosotros como de cuerpo celular grueso, que forman los tubos gliales en la prelaminar posterior. Además, este autor (ELKINGTON, 1990<sup>71</sup>) encuentra, al igual que nosotros, como en la región laminar se produce una disminución de la tinción PGFA(+) que se encuentra únicamente bordeando los poros,

observando con microscopía electrónica de transmisión el núcleo aplanado de estas células que está adosado a la pared interna de los poros.

Estos hallazgos se corresponden perfectamente con los nuestros, tanto inmunohistoquímicos como ultraestructurales, en base a los cuales, consideramos que los astrocitos presentes en esta región laminar siguen mostrando una morfología similar a los de la prelaminar posterior, es decir, son astrocitos de cuerpo celular grueso.

Los astrocitos de la región retrolaminar engloban tanto a la neuroglia perifascicular como a la intrafascicular descritas por COLLIN (1920<sup>46</sup>), y presentan una morfología similar a los de la sustancia blanca del cerebro (DAVIS, 1940<sup>62</sup>; ZIMMERMAN, 1956<sup>371</sup>; WOLTER, 1957,1961<sup>365,366</sup>; ORTIZ-MITTERER, 1974<sup>219</sup>). Estas células son astrocitos de cuerpo celular grueso del que parten fuertes prolongaciones primarias.

Ultraestructuralmente, al igual que ANDERSON (1969a,b,1970,1973<sup>11,12,14,15</sup>) y HOGAN (1971<sup>133</sup>), observamos que tienen un núcleo claro con menos acúmulos de cromatina rodeado por una zona de citoplasma más amplia con abundantes filamentos intermedios, y con prolongaciones gruesas más o menos multidireccionales dependiendo de su localización inter o intrafascicular. Esta amplitud del pericarion unida a la abundancia de filamentos gliales en él y en las

prolongaciones, determina la robustez de estas células cuando se observan a microscopía óptica teñidas con el anti-PGFA, al unirse éste a los filamentos.

Debemos recalcar que la única diferencia ultraestructural que hemos observado entre los astrocitos considerados como de cuerpo celular grueso y los de cuerpo celular delgado, es en la cantidad de citoplasma que rodea el núcleo, así como en la densidad de los haces de filamentos presentes en su citoplasma.

El pericarion más grande de los astrocitos localizados en las limitantes, en la región prelaminar posterior, y en la retrolaminar (todos ellos considerados de cuerpo celular grueso); en comparación con la fina banda citoplasmática perinuclear que se observa en los astrocitos de la C.S.F.N. y región prelaminar anterior (considerados como de cuerpo celular delgado); explica el por qué los primeros se observan con un cuerpo celular PGFA(+) mayor.

Además la fuerte inmunoreactividad mostrada por las prolongaciones de los astrocitos de la región prelaminar posterior y región laminar, ambos pertenecientes a los astrocitos de cuerpo celular grueso, se debe a la gran densidad de haces de filamentos dispuestos de forma paralela dentro de ellas, lo que hace que las prolongaciones de estos astrocitos presenten un aspecto más oscuro y denso al ser observadas a microscopía electrónica.

Excepto en estos rasgos, y coincidiendo con ANDERSON (1967-1973<sup>10-15</sup>),

en la mayor o menor claridad del núcleo, diámetro de las prolongaciones, y orientación más o menos radial, perpendicular o paralela a las fibras nerviosas; no hemos encontrado ninguna diferencia significativa en cuanto al número y tipo de organelos citoplasmáticos, presentando además todos ellos inclusiones de lipofuchsina y cuerpos densos (COHEN, 1967<sup>44</sup>; ANDERSON, 1967<sup>10</sup>; HOGAN, 1971<sup>133</sup>).

Por lo tanto, estas pequeñas diferencias encontradas entre los astrocitos del N.O. vienen motivadas por su diferente localización; por lo que la clasificación en grupos que hemos realizado no quiere reflejar la existencia de astrocitos diferentes, sino más bien, la adaptabilidad de estas células a las características específicas del entorno en el que se encuentran, así como con las posibles funciones que pueden estar desempeñando como veremos posteriormente.

No hemos podido realizar una correspondencia entre nuestras observaciones a microscopía óptica, en las que apreciábamos la existencia de astrocitos con baja inmunorreactividad, con los resultados obtenidos a microscopía electrónica.

Con respecto a otros animales de experimentación, se ha encontrado que ultraestructuralmente los astrocitos del N.O. de primates son similares a los de rata (MALFORS, 1963; VAUGH, 1967; SKOFF, 1980, 1986<sup>310,311</sup>; SUÁREZ, 1989<sup>325</sup>) y gato (WENDELL-SMITH, 1966<sup>354</sup>; BÜSSOW, 1980<sup>37</sup>). En el conejo

y la rata, BLUNT (1965<sup>29</sup>), VAUGHN (1967a,b<sup>340,341</sup>), BÜSSOW (1980<sup>37</sup>), DIXON (1981<sup>66</sup>), y SKOFF (1986<sup>311</sup>), han puesto de manifiesto la existencia de astrocitos de cuyos cuerpos celulares parten prolongaciones astrogliales que cruzan el nervio tanto en sentido horizontal como vertical, pero sin llegar a considerar la existencia de distintas clases de astrocitos (MILLER, 1989b<sup>196</sup>).

Sin embargo, tanto con las impregnaciones metálicas (MILLER, 1989b<sup>196</sup>; RAMÍREZ, 1989a<sup>272</sup>; SALAZAR, 1989<sup>295</sup>), la microscopía electrónica (FRENCH-CONSTANT, 1986c<sup>78</sup>; MILLER, 1989b<sup>196</sup>), las técnicas inmunohistoquímicas con el uso de diferentes anticuerpos (MILLER, 1984, 1985<sup>192,194</sup>; SALAZAR, 1989<sup>295</sup>), y la inyección de diversos colorantes intracelulares (BUTT, 1989<sup>38</sup>; MILLER, 1989b<sup>196</sup>), se ha demostrado que los astrocitos en el conejo y la rata, responden a dos patrones morfológicos distintos, dependiendo de cómo tengan orientadas la mayoría de sus prolongaciones. Así tenemos, por un lado astrocitos con numerosas ramificaciones que parten radialmente en todas las direcciones dándole a las células un aspecto estrellado; y por otro lado, astrocitos con prolongaciones orientadas paralelas entre sí y longitudinalmente al eje del nervio (BUTT, 1989<sup>38</sup>; MILLER, 1989b<sup>196</sup>; RAMÍREZ, 1989a<sup>271</sup>).

No obstante, en la actualidad, la mayor controversia se centra en demostrar de forma inequívoca la correlación existente entre las dos estirpes astrogliales (astrocitos tipo-1 y astrocitos tipo-2) definidas en cultivos de N.O. de rata por RAFF y col. (RAFF, 1983a,b,1984a,b,1989<sup>255,256,258,259,263</sup>; MILLER, 1989a<sup>195</sup>), y los astrocitos presentes en N.O. intactos.

En un principio, con el uso del anticuerpo A2B5, MILLER y RAFF (1984<sup>192</sup>) diferenciaron dentro de los astrocitos PGFA(+) del nervio de la rata, astrocitos A2B5(+) y A2B5(-). Para estos autores, los astrocitos PGFA(+)/A2B5(-) que se encontraban formando las limitantes gliales y en contacto con los vasos, se corresponderían con los astrocito tipo-1, pudiendo considerarse como astrocitos protoplásmicos; mientras que, las células PGFA(+)/A2B5(+), relacionadas con las fibras nerviosas, eran los astrocitos tipo-2, correspondiéndose con astrocitos fibrosos. Con el empleo de nuevos anticuerpos (FFRENCH-CONSTANT, 1986a,b), esta hipótesis inicial no ha podido ser mantenida, y estos autores consideran en la actualidad a los astrocitos tipo-1 como fibrosos y a los astrocitos tipo-2 como un nuevo tipo de célula glial (FFRENCH-CONSTANT, 1986c<sup>78</sup>; MILLER, 1989a,b<sup>195,196</sup>; RAFF, 1989<sup>263</sup>).

Se ha hecho corresponder a los astrocitos tipo-1 con los astrocitos descritos anteriormente como con múltiples prolongaciones radiales, siendo los responsables

de la formación de la membrana limitante subpial y de la envuelta perivascular; mientras que, los astrocitos tipo-2 serían las células descritas con prolongaciones orientadas paralelamente a las fibras nerviosas (MILLER, 1989b<sup>196</sup>), partiendo de ellos las prolongaciones paranodales observadas a microscopía electrónica (HILDEBRAND, 1984; WAXMAN, 1984<sup>350</sup>; BLACK, 1985<sup>22</sup>; FFRENCH-CONSTAN, 1988b) e inmunohistoquímica (FFRENCH-CONSTAN, 1986c; BLACK, 1988, 1989a,b<sup>23-25</sup>; MILLER, 1989b<sup>196</sup>).

Al igual que BOVOLENTA (1987<sup>33</sup>) en el ratón, y SALAZAR (1989<sup>295</sup>) en el conejo, no podemos realizar en los nervios ópticos humanos, la distinción entre astrocitos tipo-1 y tipo-2, ya que sólo hemos utilizado anti-PGFA, que como indica MILLER (1984<sup>192</sup>) está presente en ambos tipos celulares.

Finalmente, los datos aportados por SUAREZ (1989), quien indicó como la división de funciones entre los astrocitos tipo-1 y los tipo-2, no es tan estricta como se pensó en un principio, ya que los astrocitos subpiales y perivasculares (supuestamente astrocitos tipo-1) también pueden presentar, en ocasiones, prolongaciones paranodales (SUÁREZ, 1989<sup>325</sup>); se pueden corresponder con nuestras observaciones en la región retrolaminar. En esta región hemos visto con relativa frecuencia como los astrocitos de cuerpo celular grueso, con una morfología más o menos estrellada que les hace encajar dentro de los astrocitos

tipo-1, se relacionan indistintamente tanto con las paredes de los tabiques que fasciculan a los axones, con el manto limitante periférico, con los vasos sanguíneos, y emiten prolongaciones que se dirigen hacia las fibras nerviosas e incluso hacia los oligodendrocitos.

### **5.3.- DISTRIBUCIÓN DE LOS ASTROCITOS: GLIOARQUITECTURA DEL NERVIÓ ÓPTICO.**

#### **5.3.1.- CAPA SUPERFICIAL DE FIBRAS NERVIOSAS.**

HAYREH (1974a<sup>116</sup>) es uno de los primeros autores en sugerir que esta zona del N.O. puede ser considerada como una región con identidad propia ya que los vasos sanguíneos que la nutren derivan mayoritariamente de las arteriolas retinianas (ANDERSON, 1976<sup>17</sup>; LIEBERMANN, 1976<sup>172</sup>; HAYREH, 1978<sup>116</sup>; RAMÍREZ, 1984,1989a<sup>268,272</sup>); mientras que, las siguientes regiones que constituyen la porción intraocular (prelaminar y laminar) están nutridas fundamentalmente por vasos dependientes del sistema ciliar (LEVITZKY, 1969<sup>170</sup>; HAYREH, 1978,1989<sup>116,119</sup>; RAMÍREZ, 1983,1984, 1989b<sup>267,268,272</sup>).

Sin embargo, la mayor parte de los autores que han estudiado las células macrogliales del N.O., han englobado a esta región bajo el termino de papila y/o disco óptico conjuntamente con el resto del tejido nervioso hasta inclusive los límites de la lámina cribosa (WOLTER, 1957,1961<sup>365,366</sup>; BLUNT, 1965<sup>29</sup>; ANDERSON, 1967,1969a<sup>10,11</sup>; LEVITZKY, 1969<sup>170</sup>), o dentro de la región

prelaminar (HOGAN, 1971<sup>133</sup>; SARAUX, 1985<sup>297</sup>); haciendo referencia, con respecto a su glioarquitectura, únicamente a la membrana limitante de Elschnig y al menisco central de Kuhnt; no diferenciando el resto de las células de esta región de las de la región prelaminar.

Inmunohistoquímicamente, hemos observado en este trabajo, como las células astrogliales se organizan, por un lado agrupándose para separar la superficie del N.O. de la del vítreo (constituyendo la membrana limitante de Elschnig y el menisco central de Kuhnt); y por otro lado, como se encontraban astrocitos de cuerpo celular delgado y apariencia fundamentalmente bipolar entre los axones procedentes de la capa de fibras nerviosas de la retina.

La existencia de la membrana limitante de Elschnig ha sido comprobada en el hombre (SALZMANN, 1912<sup>296</sup>; ANDERSON, 1967, 1969a, 1970, 1973<sup>10,11,14,15</sup>; HOGAN, 1971<sup>133</sup>; ORTIZ-MITTERER, 1974<sup>219</sup>; RHODES, 1982<sup>287</sup>), así como en diversas especies animales como el mono (ANDERSON, 1969a<sup>11</sup>; HAYREH, 1966, 1974a, 1978<sup>113,114,116</sup>; WIRTSCHAFTER, 1975<sup>357</sup>, BÜSSOW, 1980<sup>37</sup>), la rata (DIXON, 1981<sup>66</sup>), el conejo (RAMÍREZ, 1989a<sup>271</sup>; SALAZAR, 1989<sup>295</sup>), y el gato (BÜSSOW, 1980<sup>37</sup>).

Ultraestructuralmente ANDERSON (1967, 1969a<sup>10,11</sup>) observa, al igual que

nosotros, cómo esta limitante está constituida tanto por prolongaciones como por cuerpos celulares, estando separados del vítreo por una membrana basal, que es de menor grosor que la existente en la membrana limitante interna de la retina (ANDERSON, 1970<sup>14</sup>; HOGAN, 1971<sup>133</sup>). Estos autores (ANDERSON, 1969a, 1971, 1973<sup>11,14,15</sup>; HOGAN, 1971<sup>133</sup>) la consideran como una continuación de la membrana limitante interna de la retina, en la que las terminaciones de la glia de Müller son sustituidas por las procedentes de los astrocitos del nervio; lo cual no nos debe de extrañar si tenemos en cuenta que en los últimos años también se ha demostrado que las células astrogliales pueden participar en la formación de la membrana limitante interna de la retina (HOGAN, 1971<sup>133</sup>; BÜSSOW, 1980<sup>37</sup>; HOLLÄNDER, 1991<sup>134</sup>; RAMÍREZ, 1994<sup>274</sup>).

El complejo entramado de esta limitante debido al ordenamiento espacial de las prolongaciones astrogliales, no había sido puesto de manifiesto en los estudios anteriores con ninguna de las técnicas utilizadas. En el presente estudio hemos observado como los astrocitos que forman la membrana limitante de Elschnig poseen el cuerpo celular grueso, disponiendo sus prolongaciones paralelas entre sí para constituir una estructura que recubre toda la superficie del nervio en contacto con el vítreo.

Cuando observamos las prolongaciones paralelas, que han sido seccionadas al realizar cortes a 4-6  $\mu\text{m}$ ., obtenemos imágenes en las que aparecen con un aspecto

en borde de cepillo desflecado, lo que se explica tanto por su ordenación paralela como por la gran cantidad de filamentos intermedios que poseen, como ha sido demostrado ultraestructuralmente por ANDERSON (1970<sup>14</sup>) y HOGAN (1971<sup>133</sup>).

Estos mismos autores (ANDERSON, 1967,1970<sup>10,14</sup>; HOGAN, 1971<sup>133</sup>) describen como el grosor de esta membrana limitante puede variar desde zonas en las que esta formada por 3-4 capas de cuerpos celulares y prolongaciones, hasta regiones en la que está constituida por una única banda de citoplasma astroglial interpuesta entre el nervio y el vítreo. En nuestras preparaciones, la membrana limitante de Elschnig incrementa su grosor desde los bordes del disco hacia el centro, pero no hemos observado esas variaciones regionales en su espesor; únicamente vemos que los astrocitos tienden a reunirse en grupos de 4-5 núcleos, que se disponen horizontalmente a la superficie del disco en 2 ó 3 capas.

Al igual que ANDERSON (1969a<sup>11</sup>), observamos como la parte central de esta membrana limitante se engruesa para recubrir la pequeña depresión central del disco (copa fisiológica) originada por la presencia de la A.C.R. y V.C.R., formando el menisco central de Kuhnt; cuya existencia ha sido también indicada por HAYREH (1966,1974a,1978<sup>113,114,116</sup>), HOGAN (1971<sup>133</sup>) y WIRTSCHAFTER (1975<sup>357</sup>).

Sin embargo, la presencia de astrocitos acompañando a la entrada de las fibras nerviosas desde los bordes del disco, situados por debajo de la membrana limitante de Elschnig, ha pasado desapercibida para la mayoría de los autores, al englobar esta región fundamentalmente en la prelaminar.

No obstante, RAMÓN Y CAJAL (1892,1904,1911<sup>276,278,279</sup>) ya indicó la existencia en los bordes del disco, de células astrogliales similares a las presentes en la retina, que son descritas por BLUNT (1965<sup>29</sup>) como astrocitos de tamaño más pequeño que los del resto del nervio. ANDERSON (1967<sup>10</sup>) indicó como el número de astrocitos disminuía hacia la retina disponiéndose finalmente de forma aislada entre los axones con el eje longitudinal de su núcleo paralelo al de las fibras nerviosas, describiéndolos como células pálidas.

En nuestras preparaciones, estos astrocitos poseen un cuerpo celular delgado y morfología alargada, disponiéndose fundamentalmente paralelos a la membrana limitante de Elschnig. Estos astrocitos acompañan por un lado a los axones de las células ganglionares, y por otro recubren los capilares presentes en esta región. Estas relaciones vaso-gliales también son indicadas por ANDERSON (1967<sup>10</sup>) y HOGAN (1971<sup>133</sup>), quienes describen como los capilares presentes en esta zona del nervio están rodeados completamente por una envuelta de prolongaciones astrogliales.

Estas células son similares a los astrocitos alargados de la retina humana

localizados en la capa de fibras del nervio óptico, descritos por RAMÍREZ (1994<sup>266,274</sup>) empleando el mismo anticuerpo monoclonal contra la PGFA.

### **5.3.2.- REGIÓN PRELAMINAR.**

Independientemente de que los autores cuando describen esta región del N.O. de los primates, se refieran a ella como región prelaminar (HOGAN, 1971<sup>133</sup>; HAYREH, 1974a,1978<sup>114,116</sup>; SARAUX, 1985<sup>297</sup>; RAMÍREZ, 1989b<sup>172</sup>; JONAS, 1993b<sup>145</sup>), o como parte anterior o glial de la lámina cribosa (SALZMANN, 1912<sup>296</sup>; CONE, 1932<sup>47</sup>; HADEN, 1946<sup>109</sup>; WOLTER, 1957,1961<sup>365,366</sup>; LEVITZKY, 1969<sup>170</sup>; ANDERSON, 1967,1969a,1973<sup>10,11,15</sup>; ELKINGTON, 1990<sup>71</sup>); es sin duda, con respecto a la disposición de las células astrogliales, la zona del N.O. que más atención ha acaparado desde que WOLTER (1957<sup>365</sup>) describiese cómo los astrocitos se organizan constituyendo una estructura en forma de "cesta".

WOLTER (1957,1961<sup>365,366</sup>) describe como esta cesta es completamente de naturaleza astrogliar, estando constituida por las prolongaciones perpendiculares al curso de los axones, originadas de astrocitos especializados (células araña); y que como indica ANDERSON (1967<sup>10</sup>), en secciones transversales aparece como

círculos que contienen en su interior las fibras nerviosas, mientras que, en secciones longitudinales se observa como los núcleos se disponen en columnas. Para todos estos autores (WOLTER, 1957,1961<sup>365,366</sup>; ANDERSON, 1967,1969a,b; 1970,1973<sup>10-12,14,15</sup>; HOGAN, 1971<sup>133</sup>) esta cesta glial esta organizando en fascículos los axones de las células ganglionares.

Esta organización también ha sido puesta de manifiesto inmunohistoquímicamente por ELKINGTON (1990<sup>71</sup>) usando anti-PGFA, quien ha indicado la estrecha relación entre las prolongaciones astrogiales y las fibras nerviosas.

Sin embargo, hemos podido observar como en esta región prelaminar hay dos zonas claramente diferenciables en cuanto a la organización, disposición, densidad y morfología de los astrocitos. Por un lado, nos encontramos con la región prelaminar anterior, con astrocitos de cuerpo celular delgado y que coincide plenamente con la estructura en cesta de WOLTER (WOLTER, 1957,1961<sup>365,366</sup>; ANDERSON, 1967<sup>10</sup>; HAYREH, 1974a<sup>114</sup>); y por otro lado, la región prelaminar posterior, constituida por astrocitos de cuerpo celular grueso que se disponen formando tubos gliales, y cuya diferenciación en este sentido no había sido referida anteriormente.

En la zona prelaminar anterior, las células de cuerpo celular delgado forman las celdillas de la cesta que fascicula a los axones; encontrando, al igual que ELKINGTON (1990<sup>71</sup>) que los astrocitos se disponen formando los bordes de las celdillas extendiendo prolongaciones dentro de los fascículos para separar a los axones amielínicos en haces de menor tamaño.

La disposición espacial de estos tabiques coincide con el patrón de distribución de los vasos que nutren esta región. Los vasos penetran desde la precoriocapilar coroidea peripapilar (HAYREH, 1978, 1989<sup>116,119</sup>; RAMÍREZ, 1984, 1989a<sup>268,272</sup>) perpendiculares al eje del N.O., dividiéndose en ramas con un recorrido sinuoso que va a constituir un plexo o red capilar que HAYREH (1987, 1989<sup>118,119</sup>) definió con morfología pentagonal o redondeada, y que nosotros lo observamos con aspecto más irregular.

La estrecha relación entre los vasos sanguíneos que atraviesan la cesta había sido observada igualmente por WOLTER (1957, 1961<sup>365,366</sup>), quien describe como los astrocitos que forman la cesta mandan numerosas prolongaciones hacia los capilares contenidos en ella formando una densa malla alrededor de ellos. Además ANDERSON (1969a,c<sup>11,13</sup>) y BÜSSOW (1980<sup>37</sup>) consideran a los astrocitos los responsables del establecimiento de una envuelta glial perivascular en la porción intraocular del N.O.

La disposición de los astrocitos a este nivel refleja su función de soporte y protección de las fibras no mielinizadas en el momento en el que están girando 90° (ANDERSON, 1969a,c<sup>11,13</sup>). También puede tener un importante papel mecánico al evitar posibles compresiones y rozamientos entre los axones nerviosos ya que, como indica WOLTER (1957<sup>365</sup>) esta estructura presenta cierta elasticidad si se compara con la rigidez de la lámina cribosa escleral; elasticidad que puede evitar y prevenir daños irreparables en las fibras nerviosas cuando se produce el hinchamiento del disco en la situación de papiledema o de neuritis.

Además hay una serie de datos que parecen apoyar esta funcionalidad de la cesta glial prelamina anterior:

- por un lado, la riqueza de proteína GFA que proporciona cierta fuerza tensional a las prolongaciones astrogliales (ELKINGTON, 1990<sup>71</sup>);
  - y por otro lado, la existencia de desmosomas (ANDERSON, 1967, 1973<sup>10,15</sup>; HOGAN, 1971<sup>133</sup>) y uniones gap (COOK, 1973a<sup>49</sup>; QUIGLEY, 1977<sup>237</sup>).
- Ambas uniones pueden jugar un papel importante en el mantenimiento de la malla astrogliale a través de la cual pasan los axones, ya que incluso bajo severas fuerzas osmóticas las uniones gap se mantienen intactas (QUIGLEY, 1977<sup>237</sup>).

Las células astrogliales de cuerpo celular delgado de la prelamina anterior,

van a ser sustituidas en la prelamina posterior por astrocitos de cuerpo celular grueso, que van a disponerse constituyendo auténticos tubos gliales por cuyo interior discurren las fibras nerviosas.

Al igual que ocurría en la prelamina anterior, estas células van a formar un armazón por el que van a discurrir los vasos que penetran perpendicularmente desde el tejido coroideo adyacente (HAYREH, 1978,1989<sup>116,119</sup>; RAMÍREZ, 1984,1989b<sup>268,272</sup>), formando una red capilar de morfología irregular.

Las paredes de estos tubos gliales están constituidas por la superposición de 2-3 astrocitos, formando sus prolongaciones haces astrogliales que van delimitando la circunferencia de los tubos; discurriendo los vasos sanguíneos por el interior de las paredes gliales. Como hemos podido observar en las inmunotinciones, es ésta una de las zonas del N.O. con mayor densidad astroglial, siendo tal la cantidad de astrocitos y sus prolongaciones que enmascaran incluso la coloración azul del colágeno acompañante de los vasos, en las preparaciones contrastadas para poner de manifiesto el tejido conectivo.

Esta estructura había pasado desapercibida ya que la descripción clásica de la cesta realizada por WOLTER (1957,1961<sup>365,366</sup>), consideraba que los astrocitos araña que la constituían llegaban justo hasta el borde de la lámina cribosa; y únicamente HOGAN (1971<sup>133</sup>) había señalado cómo cerca de la lámina cribosa los septos gliales se hacían más gruesos.

Estos tubos gliales pueden realizar una función mecánica soportando las tensiones que se originan a este nivel cuando tienen lugar los movimientos oculares, ya que los tubos están envolviendo completamente a las fibras nerviosas a modo de funda.

Además la glioarquitectura en esta zona prelaminar posterior está organizando los fascículos axonales preparándolos para su entrada en la región laminar; apreciándose claramente en los cortes realizados a nivel de la zona de transición entre las regiones prelaminar y laminar, como los tubos gliales quedan enfrentados perfectamente con los poros cribosos.

La región prelaminar está atravesada en su interior por los vasos centrales (A.C.R. y V.C.R.) que la cruzan longitudinalmente para dirigirse hacia la C.S.F.N., estando rodeados por una cubierta conectiva durante todo su trayecto.

En nuestras preparaciones, hemos observado, tanto a microscopía óptica como electrónica, al igual que ANDERSON (1967,1969c;1970<sup>10,13,14</sup>) y HOGAN (1971<sup>133</sup>), que la A.C.R. y V.C.R. están recubiertos, en su recorrido por esta región, por una envoltura astrogial constituida tanto por núcleos como por prolongaciones astrogiales, que los están separando de los fascículos nerviosos, pudiendo observar en ocasiones (en la zona prelaminar posterior) hasta 11-12 capas de astrocitos a su alrededor.

Finalmente también hemos observado como los tejidos que rodean periféricamente el N.O. en esta región (retina y coroides), se encuentran separados de él por acumulaciones de astrocitos de cuerpo celular grueso y aspecto más o menos aplanado, que se disponen en dos o tres capas (ANDERSON, 1969c<sup>13</sup>). Estas limitantes, como ya hemos indicado anteriormente, son el tejido intermediario de kuhnt (KUHNT, 1879<sup>159</sup>) entre retina y N.O., y el tejido de Jacoby (JACOBY, 1905<sup>138</sup>) entre la coroides y el N.O.

Estas limitantes han sido puestas de manifiesto en varias especies animales, tanto con impregnaciones argénticas (SALZMAN, 1912; HAYREH, 1966,1974a, 1878<sup>113,114,116</sup>; CAMPOS, 1976<sup>39</sup>; SALAZAR, 1989<sup>295</sup>; RAMÍREZ, 1989a<sup>271</sup>), como con microscopía electrónica (ANDERSON, 1969a,c,1971,1973<sup>11,13-15</sup>; HOGAN, 1971<sup>133</sup>; COHEN, 1973<sup>45</sup>; TSO, 1975<sup>337</sup>; TSUKAHARA, 1975<sup>338</sup>; OKINAMI, 1976<sup>215</sup>; FLAGE, 1977,1980a,b<sup>79-81</sup>; HIRATA, 1991<sup>130</sup>) e inmunohistoquímica con anti-PGFA (DIXON, 1981<sup>66</sup>; RHODES, 1982<sup>287</sup>; SALAZAR, 1989<sup>295</sup>).

CAMPOS (1976<sup>39</sup>) describe a las células que forman estas limitantes como astrocitos estrellados pequeños, que poseen un soma alargado del que parten prolongaciones onnidireccionales. Esto no concuerda con nuestras observaciones con anti-PGFA(+), ya que, aunque los astrocitos más próximos al N.O. pueden presentar un aspecto estrellado, estos astrocitos según se van acercando a la retina

o a la coroides, van siendo cada vez más aplanados, disponiéndose unos sobre otros de forma muy empaquetada, coincidiendo con las observaciones a microscopía electrónica de HOGAN (1971<sup>133</sup>); además todos estos astrocitos presentan un cuerpo celular grueso.

También hemos encontrado, que las prolongaciones de estos astrocitos se encuentran unidas por desmosomas y uniones gap, lo que había sido indicado anteriormente por TSO (1975<sup>337</sup>), TSUKAHARA (1975<sup>338</sup>) y OKINAMI (1976<sup>215</sup>), quienes además también describen uniones estrechas (tight junctions) entre los astrocitos que constituyen estas limitantes.

El principal papel atribuido a estas limitantes de la región prelaminar ha sido el de constituir una barrera que impida el paso de moléculas entre el N.O. y los tejidos adyacentes, función que ha sido estudiada fundamentalmente en el tejido intermediario de Kuhnt (TSO, 1975<sup>337</sup>; TSUKAHARA, 1975<sup>338</sup>; OKINAMI, 1976<sup>215</sup>; FLAGE, 1977, 1980a,b<sup>79-81</sup>). Para TSO (1975<sup>337</sup>) y OKINAMI (1976<sup>215</sup>) esta función esta respaldada además por la existencia de uniones estrechas entre los astrocitos del tejido intermediario de Kuhnt y las células del epitelio pigmentario de la retina, así como por las zonulas adherentes entre los astrocitos y la membrana limitante externa. Este papel de barrera podría explicar la gran cantidad de fragmentos de melanina fagocitados que hemos encontrado en el

interior del citoplasma de los astrocitos que forman estas limitantes, y que podrían estar siendo degradados.

Además estas limitantes podrían actuar como cojinetes que amortiguasen los rozamientos que tienen lugar en los pequeños desplazamientos del N.O. cuando se están produciendo los movimientos del globo ocular, evitando de este modo el sufrimiento de las fibras nerviosas que se están introduciendo por las zonas periféricas del N.O.; interviniendo también las prolongaciones que se originan de los astrocitos de la superficie interna de estas limitantes, en la fasciculación de los axones periféricos.

### **5.3.3.- REGIÓN LAMINAR.**

En esta región la gruesa envuelta astroglial que rodeaba las fibras nerviosas en la zona posterior prelaminar, queda reducida a una capa de células astrogliales que recubre la cara interna de los orificios cribosos. Estos astrocitos siguen siendo del mismo tipo que los que constituían los tubos gliales de la región prelaminar posterior, es decir, astrocitos de cuerpo celular grueso.

Todos los autores, cuando se refieren a esta región del N.O. de los primates están de acuerdo en considerar que el armazón de la lámina cribosa está constituido mayoritariamente por tejido conectivo (RADIUS, 1981a,c<sup>250,252</sup>; QUIGLEY, 1981a,b<sup>240,241</sup>; MORRISON, 1988,1989a,b<sup>202-204</sup>; GOLDBAUM, 1989<sup>99</sup>; YANG, 1993<sup>368</sup>), quedando los astrocitos reducidos a una fina capa que recubre la cara interna de los poros cribosos (WOLTER, 1957,1961<sup>365,366</sup>; HAYREH, 1966<sup>113</sup>; ANDERSON, 1967,1969c,1973<sup>10,13,15</sup>; HOGAN, 1971<sup>133</sup>; MINCKLER, 1976<sup>197</sup>; ELKINGTON, 1990<sup>71</sup>).

Con las técnicas inmunohistoquímicas, hemos encontrado, al igual que ELKINGTON (1990<sup>71</sup>), que estos astrocitos son aplanados y disponen sus núcleos adosados a las paredes colágenas de los orificios de las laminillas cribosas, enviando prolongaciones hacia el interior que subdividen los haces nerviosos; además en los canales de mayor diámetro también podemos encontrarnos con astrocitos dentro de ellos. Estas observaciones coinciden plenamente con las descripciones realizadas tanto con impregnaciones argénticas como con microscopía electrónica (WOLTER, 1957<sup>365</sup>; HAYREH, 1966<sup>113</sup>; ANDERSON, 1967,1969c,1973<sup>10,13,15</sup>; HOGAN,1971<sup>133</sup>; ORTIZ-MITTERER, 1973<sup>219</sup>).

Esta disminución en el número de células gliales puede explicarse debido a la existencia de las lamellas conectivas de la lámina cribosa, que va a constituir el

armazón que separa a los axones en haces, función que estaban realizando los astrocitos en la región prelaminar posterior, y a este nivel, por tanto, sólo es necesario la presencia de una capa de células astrogiales encargada únicamente del aislamiento de las fibras nerviosas para separarlas del colágeno de las paredes de los poros laminares.

Esta región está atravesada centralmente por la A.C.R. y V.C.R., que al igual que en las regiones anteriores se encuentra recubierta por un tejido de naturaleza astrogial (ANDERSON, 1967<sup>10</sup>, HOGAN, 1971<sup>133</sup>); además hay una red de capilares derivados del Círculo de Zinn-Haller que penetran desde los bordes del N.O. cruzándolo transversalmente (HAYREH, 1966,1978,1989<sup>113,116,119</sup>; LEVITZKY, 1969<sup>170</sup>; RAMÍREZ, 1983,1984,1989b<sup>267,268,272</sup>) y que también presentan una envuelta astrogial (HAYREH, 1966<sup>113</sup>).

Sin embargo en todas las especies de mamíferos, la lámina cribosa no está tan desarrollada como en los primates, y así nos podemos encontrar desde animales con un desarrollo de la lamina cribosa similar al de los primates, como el gato (BLUNT, 1965<sup>29</sup>; WENDELL-SMITH, 1966<sup>354</sup>); especies con la lámina poco desarrollada como la rata albina (SKOFF, 1980<sup>310</sup>; DIXON, 1981<sup>66</sup>), e incluso animales en los que no existe como el conejo (TANSLEY, 1956<sup>326</sup>; WENDELL-

SMITH, 1966<sup>354</sup>; RAMÍREZ, 1986<sup>270</sup>; SALAZAR, 1989<sup>295</sup>). Esto puede explicar por qué DIXON (1981<sup>66</sup>) en esta región de la rata albina sólo refiere la presencia de astrocitos alineados en columnas con las prolongaciones orientadas transversalmente; y por qué en el conejo al no tener lámina, los astrocitos son similares a lo largo de todo el nervio (BLUNT, 1965<sup>29</sup>; RAMÍREZ, 1989a<sup>271</sup>; SALAZAR, 1989<sup>291</sup>).

#### **5.3.4.- REGIÓN RETROLAMINAR.**

En esta región los astrocitos se distribuyen fundamentalmente, por un lado agrupándose periféricamente en toda la circunferencia del N.O. constituyendo el denominado manto glial periférico de Fuchs o Greef; y por otro lado, se disponen en columnas contribuyendo en la fasciculación de los axones al recubrir los septos o tabiques conectivos.

El manto periférico de Greef está constituido por astrocitos de cuerpo celular grueso que se disponen en 4-6 capas entre el N.O. y las vainas meningeas. Su fuerte inmunofluorescencia, debido tanto a la presencia de somas como prolongaciones astrogliales ha sido puesta de manifiesto en el hombre (RHODES,

1982<sup>287</sup>; LAKE, 1992a,b<sup>161,162</sup>), en el conejo (SALAZAR, 1989<sup>295</sup>), y en la rata (DIXON, 1981<sup>66</sup>). En este último animal, DIXON (1981<sup>66</sup>), encontró como el grosor del manto periférico variaba de una zona a otra, observación que no coincide con las nuestras en el N.O. humano, donde el grosor del manto glial de Greef se mantiene constante.

Al igual que HOGAN (1971<sup>133</sup>), ANDERSON (1973<sup>15</sup>) y SUÁREZ (1989<sup>325</sup>) con microscopía electrónica, nosotros con microscopía óptica y anti-PGFA, hemos observado como los astrocitos de este manto glial situados hacia los axones del N.O., emiten prolongaciones acompañando a los vasos sanguíneos que penetran desde la piamadre.

Como indica ANDERSON (1969b,1973<sup>12,15</sup>), ultraestructuralmente los astrocitos que forman el manto de Greef son similares a los de las otras limitantes; lo que coincide con nuestras observaciones inmunohistoquímicas, ya que como hemos ido viendo a lo largo de las regiones del nervio, todas las membranas limitantes están constituidas por astrocitos de cuerpo celular grueso, que presentan prolongaciones gruesas con densos paquetes de filamentos gliales en su interior, lo que va a proporcionar una mayor protección al N.O.

MASSA (1982<sup>187</sup>) señala la existencia de una especialización de membrana en los astrocitos subpiales que viene a confirmar aún más la función mecánica

desempeñada por las limitantes astrogliales. Este autor describe la existencia de invaginaciones en la membrana plasmática de los astrocitos subpiales (vesículas caveolares), sugiriendo que en estas células existen microfilamentos contráctiles, siendo la función de las vesículas iniciar la contracción del manto limitante periférico como respuesta a tensiones que se produzcan en las vainas meningeas del N.O.

El resto de los astrocitos de esta región van a contribuir a la tabicación del N.O. Son astrocitos estrellados con el cuerpo celular grueso, que se pueden situar tanto intra como interfascicularmente; aspectos en los que están de acuerdo todos los autores, tanto con tinciones de plata como con microscopía electrónica e inmunohistoquímica, en el hombre y el resto de las especies animales estudiadas (COLLIN, 1920<sup>46</sup>; WOLTER, 1957<sup>365</sup>; BLUNT, 1965<sup>29</sup>; WENDELL-SMITH, 1966<sup>354</sup>; VAUGHN, 1967a,b<sup>340,341</sup>; HAYREH, 1966<sup>113</sup>; ANDERSON, 1969b,1973<sup>12,15</sup>; HOGAN, 1971<sup>133</sup>; ORTIZ-MITTERER, 1973<sup>219</sup>; CAMPOS, 1976<sup>39</sup>; SKOFF, 1986<sup>311</sup>; RAMÍREZ, 1989a,b<sup>271,272</sup>; SALAZAR, 1989<sup>295</sup>).

Los astrocitos situados intrafascicularmente recubren con sus prolongaciones los septos conectivos evitando que contacten directamente con los axones de las células ganglionares, pudiendo emitir además prolongaciones que se introducen

dentro de los haces de fibras nerviosas. Esta disposición de los astrocitos ha sido demostrada en el hombre (COLLIN, 1920<sup>46</sup>; DAVIS, 1940<sup>62</sup>; ZIMERMANN, 1956; COHEN, 1967<sup>44</sup>; ANDERSON, 1967,1969a<sup>10,11</sup>, HOGAN, 1971<sup>133</sup>; ORTIZ-MITTERER, 1974<sup>219</sup>; STURROCK, 1975<sup>322</sup>; SARAUX, 1985<sup>297</sup>), en el mono (HAYREH, 1966<sup>113</sup>; ANDERSON, 1969a<sup>11</sup>), en la rata (VAUGHN, 1967a,b<sup>340,341</sup>; SKOFF, 1976a,1986<sup>308,311</sup>; BOVOLENTA, 1987<sup>33</sup>; BUTT, 1989<sup>38</sup>; MILLER, 1989a,b<sup>195,196</sup>), en el conejo (BLUNT, 1965<sup>29</sup>; RAMÍREZ, 1989a<sup>271</sup>), y en el gato (BLUNT, 1965<sup>29</sup>; WENDELL-SMITH, 1966<sup>354</sup>).

Cuando estas células de cuerpo celular grueso se encuentran dentro de los fascículos axonales hemos observado al igual que ANDERSON (1969c<sup>13</sup>) con microscopía electrónica, y BUTT (1989<sup>38</sup>) con inmunohistoquímica; como su aspecto es mucho más estrellado, enviando prolongaciones multidireccionales que cruzan los haces axonales para dirigirse hacia las paredes gliales de los tabiques; realizando por tanto estas células la función de aislar y reagrupar en paquetes de fibras nerviosas a los axones que constituyen un fascículo.

Con respecto a las relaciones vasogliales existentes a este nivel, hemos observado que todos los vasos presentes en esta región, tanto los derivados del sistema pial, como de la A.C.R, así como los grandes vasos centrales; están

rodeados completamente por una fuerte señal PGFA(+). Esta banda PGFA(+) ha sido descrita también en el N.O. de la rata (DIXON, 1981<sup>66</sup>; SKOFF, 1986<sup>311</sup>); y se corresponde como indica ERSKINE (1958<sup>74</sup>) y ORTIZ-MITTERER (1973<sup>219</sup>) con terminaciones astrogliales en pie vascular sobre la envuelta conectiva de los vasos sanguíneos, terminaciones perivasculares que han sido demostradas ultraestructuralmente por ANDERSON (1969c, 1973<sup>13,15</sup>), HOGAN (1971<sup>133</sup>) y SUÁREZ (1989<sup>325</sup>). Además cuando uno de los vasos que discurren por el interior de los septos conectivos, envía una ramificación que se introduce para vascularizar el fascículo axonal, se observa cómo desde uno o varios astrocitos, de localización interfascicular, se envían prolongaciones más o menos gruesas que contactan con su pared rodeándola completamente, encontrándonos también con el soma de algún astrocito dispuesto sobre el vaso (ORTIZ-MITTERER, 1974<sup>219</sup>); esta última situación es descrita en el N.O. humano y del conejo por CAMPOS (1976<sup>39</sup>) quien llega a denominar a estos astrocitos como aplanados perivasculares.

Por último, aunque varios autores han descrito la concavidad que presenta la estructura de la lámina cribosa introduciéndose en la zona central de la región retrolaminar (WOLTER, 1957, 1961<sup>365,366</sup>; HAYREH, 1966<sup>113</sup>; ANDERSON, 1969c<sup>13</sup>; MORRISON, 1989c<sup>205</sup>), sin embargo, no hemos encontrado que se halla mencionado la organización especial de los fascículos, en la zona de transición

entre la región laminar y la retrolaminar, motivada por el contacto de los paquetes conectivos del final de la lámina y los septos que parten desde los vasos centrales. Esta situación hace que los septos superiores presenten una forma esférica, mientras que los situados nasal y temporalmente son más irregulares. Además, en estos septos laterales hemos podido apreciar como la tendencia de las prolongaciones astrogliales es a disponerse de forma más alargada y paralela a como lo hacen normalmente en los septos de zonas más posteriores de esta región.

## **6.- CONCLUSIONES**

## **6.- CONCLUSIONES.**

- I.- Todas las regiones del N.O. (C:S.F.N., prelaminar, laminar y retrolaminar) presentan alta inmunorreactividad PGFA(+), aunque varíe la proporción de tejido marcado en cada una de ellas.
  
- II.- Teniendo en cuenta la proporción de tejido marcado, en la región prelaminar se distinguen dos zonas:
  - La región prelaminar anterior (que se corresponde con la parte del N.O. rodeada por la retina), que presenta una menor cantidad de tejido PGFA(+);
  - Y la región prelaminar posterior (que se corresponde con la parte del N.O. rodeada por la coroides), que presenta gran cantidad de tejido marcado.
  
- III.- La región del N.O. con menor proporción de tejido astrogial marcado PGFA(+) es la laminar; frente a la región prelaminar posterior que muestra la mayor cantidad de tejido astrogial PGFA(+).
  
- IV.- Separando el N.O. del tejido circundante, aparecen bandas intensamente PGFA(+), que constituyen las distintas limitantes descritas en el N.O.: la membrana limitante de Eslchnig, el menisco central de Kuhnt, el tejido intermediario de Kuhnt, el tejido de Jacoby, el manto periférico de Greef; y una envuelta que rodea los vasos centrales durante todo su recorrido intraneural.

- V.- Dependiendo del tamaño y robustez del pericarión, así como de su mayor o menor inmunorreactividad, los astrocitos del N.O. humano pueden clasificarse en: astrocitos de cuerpo celular grueso, de cuerpo celular delgado, y astrocitos con baja inmunorreactividad PGFA(+).
- VI.- Los astrocitos de cuerpo celular grueso presentan alta inmunorreactividad PGFA(+), y de su soma parten 6-8 prolongaciones primarias radiales. Estos astrocitos son los encargados de formar las limitantes gliales, los tubos gliales de la prelaminar posterior, así como la envuelta glial interpuesta entre el N.O. y el tejido conectivo de las regiones laminar y retrolaminar.
- VII.- Los astrocitos de cuerpo celular delgado presentan alta reactividad PGFA(+), y de su pericarión parten de 2 a 4 prolongaciones primarias finas y largas. Estas células se localizan en la C.S.F.N. y en la región prelaminar anterior, contribuyendo a fascicular los axones que penetran en el N.O. desde la retina.
- VIII.- Los astrocitos con baja inmunorreactividad PGFA(+) poseen un cuerpo celular pequeño del que parten varias prolongaciones radiales cortas, y una larga de recorrido rectilíneo y paralelo al curso axonal. Estas células se encuentran desde la región prelaminar hasta la retrolaminar, dentro de los fascículos axonales pero próximas a las paredes gliales que los delimitan.

- IX.- En la C.S.F.N., los astrocitos se disponen fundamentalmente constituyendo las limitantes que separan el N.O. del vítreo; encontrándonos también con astrocitos de cuerpo celular delgado dispuestos por debajo de ellas que están acompañando a los axones que proceden de la retina.
- X.- En la región prelaminar anterior los astrocitos de cuerpo celular delgado disponen sus somas sobre los vasos sanguíneos, enviando sus prolongaciones en todas las direcciones para constituir una malla astrogial en forma de cesta.
- En la región prelaminar posterior, los astrocitos de cuerpo celular grueso, forman tubos gliales por cuyo interior van las fibras nerviosas; mientras que los vasos sanguíneos discurren por dentro de las paredes astrogiales de estos tubos. Estas estructuras tubulares conducen a los axones hacia los poros de la lamina cribosa.
- XI.- En la región laminar, los astrocitos de cuerpo celular grueso, se distribuyen únicamente recubriendo la cara interna de los poros de la lamina cribosa, formando una envuelta glial que aísla a los axones.
- XII.- En la región retrolaminar, los astrocitos de cuerpo celular grueso separan los axones del tejido conectivo de los septos que penetran desde la piamadre, situándose tanto intraseptal como intrafascicularmente.
- XIII.- Todos los vasos sanguíneos presentes en el interior del N.O. se encuentran totalmente rodeados por prolongaciones astrogiales perivasculares.

XIV.- La única diferencia ultraestructural entre los diferentes astrocitos del N.O., es a nivel del contenido en filamentos intermedios gliales. Los astrocitos de las limitantes, y los de las regiones prelaminar posterior, laminar y retrolaminar presentan una mayor abundancia de filamentos, que los de la C.S.F.N. y prelaminar anterior.

Además, se han observado uniones gap y desmosomas entre los astrocitos, en todas las regiones del N.O.

## **7.- BIBLIOGRAFÍA**

## 7.- BIBLIOGRAFÍA.-

- 1.- ABBOTT N.J. (1987): "*Glia and the blood-brain barrier*". Nature, 325: 195.
- 2.- ABBOTT N.J., REVEST P.A., ROMERO I.A. (1992): "*Astrocyte-endothelial interaction: physiology and pathology*". Neuropathology and Applied Neurobiology, 18: 424-433.
- 3.- AGUAYO A.J. (1985): "*Axonal regeneration from injured neurons in the adult mammalian central nervous system*". En: Synaptic plasticity (C.W. Cotman); págs: 457-484. Guilford Press. New York.
- 4.- AGUAYO A.J., VIDAL-SANZ M., VILLEGAS-PÉREZ M.P., KEIRSTEAD S.A., RASMINSKY M., BRAY G.M. (1986): "*Axonal regrowth and connectivity from neurons in the adult rat retina*". En: Retinal signal systems, degenerations and transplants (E. Agardh, B. Ehinger, Eds.); vol. 9, págs: 257-270. Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
- 5.- AL-ALI S.Y.A., ROBINSON N. (1982): "*Ultrastructural study of enzymes in reactive astrocytes: clarification of astrocytic activity*". Histochemical Journal, 14: 311-321.
- 6.- ALLCUT D., BERRY M., SIEVERS J. (1984): "*A qualitative comparison of the reactions of retinal ganglion cell axons to optic nerve crush in neonatal and adult mice*". Developmental Brain Research, 16: 231-240.
- 7.- ALVAREZ M.P., SOLAS M.T., SUÁREZ I., FERNÁNDEZ B. (1991): "*Variaciones morfológicas del citoesqueleto en la diferenciación de astrocitos en cultivo*". Boletín de la Real Sociedad Española de Historia Natural (Sección Biología), 87: 267-275.
- 8.- ANDERS J.J., BRIGHTMAN (1979): "*Assemblies of particles in the cell membranes of developing, mature and reactive astrocytes*". Journal of Neurocytology, 8: 777-795.

- 9.- ANDERSON D.J. (1989): "*New roles for PDGF and CNTF in controlling the timing of glial cell differentiation in the optic nerve*". Trends in Neuroscience, 12: 83-85.
- 10.- ANDERSON D.R., HOYT W.F., HOGAN M.J. (1967): "*The fine structure of the astroglia in the human optic nerve and optic nerve head*". Transactions of the American Ophthalmological Society, 65: 274-305.
- 11.- ANDERSON D.R., HOYT W.F. (1969a): "*Ultrastructure of intraorbital portion of human and monkey optic nerve*". Archives of Ophthalmology, 82: 506-530.
- 12.- ANDERSON D.R. (1969b): "*Ultrastructure of meningeal sheaths: normal human and monkey optic nerves*". Archives of Ophthalmology, 82: 659-674.
- 13.- ANDERSON D.R. (1969c): "*Ultrastructure of human and monkey lamina cribosa and optic nerve head*". Archives of Ophthalmology, 82: 800-814.
- 14.- ANDERSON D.R. (1970): "*Ultrastructure of the optic nerve head*". Archives of Ophthalmology, 83: 63-73.
- 15.- ANDERSON D.R. (1973): "*Fine structure and function of ocular tissues: The optic nerve*". En: Ocular fine structure for the clinician (K.M. Zinn, Ed.), International Ophthalmology Clinics, 13: 229-242. Little, Brown and Company, Boston.
- 16.- ANDERSON D.R., HENDRICKSON A. (1974): "*Effect of intraocular pressure on rapid axoplasmic transport in monkey optic nerve*". Investigative Ophthalmology, 13: 771-783.
- 17.- ANDERSON D.R., BRAVERMAN S. (1976): "*Revaluation of the optic disc vasculature*". American Journal of Ophthalmology, 82: 165-174.
- 18.- ARIYASU R.G., NICHOL J.A., ELLISMAN M.H. (1985): "*Localization of sodium/potassium adenosine triphosphatase in multiple cell types of the murine nervous system with antibodies raised against the enzyme from kidney*". Journal of Neuroscience, 5: 2581-2596.

- 19.- BARRES B.A., CHUN L.L., COREY D.P. (1989): "*Glial and neuronal forms of the voltage-dependent sodium channel: characteristics and cell-type distribution*". *Neuron*, 2: 1375-1388.
- 20.- BERWALD-NETTER Y., KOULAKOFF A., NOWAK L., ASCHER P. (1986): "*Tonic channels in glial cells*". En: *Astrocytes* (S. Fedoroff, A. Vernadakis, Eds.). Vol. 2: Biochemistry, physiology, and pharmacology of astrocytes; págs: 51-75. Academic Press, INC. Orlando.
- 21.- BIGNAMI A., ENG L.F., DAHL D., UYEDA (1972): "*Localization of the glial fibrillary acidic protein in astrocytes by immunofluorescence*". *Brain Research*, 43: 429-435.
- 22.- BLACK J.A., WAXMAN S.G. (1985): "*Specialization of astrocytic membrane at glia limitans in rat optic nerve: freeze-fracture observations*". *Neuroscience Letters*, 55: 371-378.
- 23.- BLACK J.A., WAXMAN S.G. (1988): "*The perinodal astrocyte*". *Glia*, 1: 169-183.
- 24.- BLACK J.A., FRIEDMAN B., WAXMAN S.G., ELMER L.W., ANGELIDES K.J. (1989a): "*Immuno-ultrastructural localization of sodium channels at nodes of Ranvier and perinodal astrocytes in rat optic nerve*". *Proceedings of the Royal Society of Medicine, London (B)*, 238: 39-51.
- 25.- BLACK J.A., WAXMAN S.G., FRIEDMAN B., ELMER L.W., ANGELIDES K.J. (1989b): "*Sodium channels in astrocytes of rat optic nerve in situ: immuno-electron microscopic studies*". *Glia*, 2: 353-369.
- 26.- BLAUGRUND E., BARTSCH U., MARTINI R., SCHACHNER M., SCHWARTZ M. (1990): "*Immunological evidence that the neural adhesion molecule L1 is expressed in fish brain and optic nerve: possible association with optic nerve regeneration*". *Brain Research*, 530: 239-244.
- 27.- BLAUGRUND E., COHEN I., SHANI Y., SCHWARTZ M. (1991): "*Glial fibrillary acidic protein in the fish optic nerve*". *Glia*, 4: 393-399.

- 28.- BLAUGRUND E., DUVDEVANI R., LAVIE V., SOLOMON A., SCHWARTZ M. (1992): "*Disappearance of astrocytes and invasion of macrophages following crush injury of adult rodent optic nerves: implications for regeneration*". *Experimental Neurology*, 118: 105-115.
- 29.- BLUNT M.J., WENDELL-SMITH C.P., BALDWIN F. (1965): "*Glia-nerve fibre relationships in mammalian optic nerve*". *Journal of Anatomy*, 99: 1-11.
- 30.- BODEGA G., SUÁREZ I., RUBIO M., VILLALBA R.M., FERNÁNDEZ B. (1993): "*Astroglial pattern in the spinal cord of the adult barbel (Barbus comiza)*". *Anatomy and Embryology*, 187: 385-395.
- 31.- BOGLER O., WREN D., BARNETT S.C., LAND H., NOBLE M. (1990): "*Cooperation between two growth factors promotes extended self-renewal and inhibits differentiation of oligodendrocyte-type-2 astrocyte (O-2A) progenitor cells*". *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 87: 6368-6372.
- 32.- BORREGO R. (1992): "*Estudio experimental del edema isquémico de la cabeza del nervio óptico*". Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
- 33.- BOVOLENTA P., LIEM R.K., MASON C.A. (1987): "*Glial filament protein expression in astroglia in the mouse visual pathway*". *Developmental Brain Research*, 430: 113-126.
- 34.- BOYA J., CALVO J.L., CARBONELL A.L., BORREGON A. (1991a): "*A lectin histochemistry study on the development of rat microglial cells*". *Journal of Anatomy*, 75: 229-236.
- 35.- BOYA J., CARBONELL A.L., BORREGON A. (1991b): "*Microglial cells in the central nervous system of the rabbit and rat: cytochemical identification using two different lectins*". *Acta Anatomica*, 140: 250-268.
- 36.- BOYLES J.K., PITAS R.E., WILSON E., MAHLEY R.W., TAYLOR J.M. (1985): "*Apolipoprotein e associated with astrocytic glia of the central nervous system and with nonmyelinating glia of the peripheral nervous system*". *Journal of Clinical Investigation*, 76: 1501-1513.

- 37.- BÜSSOW H: (1980): *"The astrocytes in the retina and optic nerve head of mammals: A spacial glia for the ganglion cell axons"*. Cell Tissue Research, 206: 367-378.
- 38.- BUTT A.M.; RANSOM B.R. (1989): *"Visualization of oligodendrocytes and astrocytes in the intact rat optic nerve by intracellular injection of lucifer yellow and horseradish peroxidase"*. Glia, 2: 470-475.
- 39.- CAMPOS G., COCA S., ZAMORANO L. (1976): *"Citoarquitectura astrogliosa del nervio óptico, quiasma y cintillas ópticas"*. Archivos de la Facultad de Medicina de Madrid, 29: 329-341.
- 40.- CALVO J.L., CARBONELL A.L., BOYA J. (1990): *"Coexpression of vimentin and glial fibrillary acidic protein in astrocytes of the adult rat optic nerve"*. Brain Research, 532: 355-357.
- 41.- CARBONELL A.L.; BOYA J.; CALVO J.L.; MARIN J.F. (1991): *"Ultrastructural study of the neuroglial and macrophagic reaction in Wallerian degeneration of the adult rat optic nerve"*. Histology and Histopathology, 6: 443-451.
- 42.- CARROLL W.M., JENNINGS A.R., MASTAGLIA F.L. (1987): *"Reactive glial cells in CNS demyelination contain both GC and GFAP"*. Brain Research, 411: 364-369.
- 43.- CIVELTI A., LAPEIRA M., CABARGA C, GARCÍA J. (1990): *"Aportación personal a las técnicas de reconstrucción experimental del nervio óptico (un estudio en la rata Wistar)"*. Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología, Invest, 4: 25-30.
- 44.- COHEN A.I. (1967): *"Ultrastructural aspects of human optic nerve"*. Investigative Ophthalmology, 6: 294-308.
- 45.- COHEN A.I. (1973): *"Is there a potential defect in the blood-retinal barrier at the choroidal level of the optic nerve canal?"*. Investigative Ophthalmology, 12: 513-519.
- 46.- COLLIN R. (1920): *"Sur la néuroglie du nerf optique chez l'homme"*. Comptes Rendus des Séances de la Société de Biologie, 83: 156.

- 47.- CONE W., McMILLAN J.A. (1932): "*The optic nerve and papila*" En: Cytology and cellular pathology of the nervous system (W. Penfield, Ed.) Vol. II; Pags: 839-901. Paul B. Hoeber Inc., New York.
- 48.- CONNORS B.W., BENARDO L.S., PRINCE D.A. (1984): "*Carbon dioxide sensitivity of dye coupling among glia and neurons of the neocortex*". Journal of Neuroscience, 4: 1324-1330.
- 49.- COOK R.D., RAINE C.S., WISNIEWSKI H.M. (1973a): "*On perivascular astrocytic membrane specializations in monkey optic nerve*". Brain Research, 57: 491-497.
- 50.- COOK R.D., WISNIEWSKI H.M. (1973b): "*The role of oligodendroglia and astroglia in Wallerian degeneration of the optic nerve*". Brain Research, 61: 191-206.
- 51.- CUEVAS P., GUTIERREZ J.A., DUJOVNY M., DIAZ F.G., AUSMAN J.I. (1985): "*Disturbance of plasmalemmal astrocytic assemblies in focal and selective cerebral ischemia*". Anatomy and Embryology, 172: 171-175.
- 52.- CUNHA-VAZ J. (1966): "*Studies on the permeability of the blood-retinal barrier. I. On the existence, development and site of a blood-retinal barrier*". British Journal of Ophthalmology, 50: 441-453.
- 53.- CUNHA-VAZ J. (1979): "*The blood-ocular barriers*". Survey of Ophthalmology, 23: 279-296.
- 54.- CURRIE D.N., KELLY J.S. (1981): "*Glial versus neuronal uptake of glutamate*". Journal of Experimental Biology, 95: 181-193.
- 55.- CHAN C.L., WIGLEY C.B., BERRY M. (1990): "*Oligodendrocyte-type 2 astrocyte (O-2A) progenitor cells from neonatal and adult rat optic nerve differ in their responsiveness to platelet-derived growth factor*". Developmental Brain Research, 55: 275-282.
- 56.- DAHL D., BIGNAMI A. (1973): "*Immunochemical and immunofluorescence studies of the glial fibrillary acidic protein in vertebrates*". Brain Research, 61:279-293.

- 57.- DAHL D., CROSBY C.J., BIGNAMI A. (1981a): "*Filament proteins in rat optic nerves undergoing Wallerian degeneration*". Experimental Neurology, 71: 421-430.
- 58.- DAHL D., BIGNAMI A., WEBER K., OSBORN M. (1981b): "*Filament proteins in rat optic nerves undergoing Wallerian degeneration: localization of vimentin, the fibroblastic 100-Å filament protein, in normal and reactive astrocytes*". Experimental Neurology, 73: 496-506.
- 59.- DAHL D., CROSBY C.J., SETHI J.S., BIGNAMI A. (1985): "*Glial fibrillary acidic (GFA) protein in vertebrates: Immunofluorescence and immunoblotting study with monoclonal and polyclonal antibodies*". Journal of Comparative Neurology, 239: 75-88.
- 60.- DAHL D., BJÖRKLUND H., BIGNAMI A. (1986): "*Immunological markers in astrocytes*". En: Astrocytes (S. Federoff, A. Vernadakis, Eds.); Vol.III: Cell biology and pathology of astrocytes; pags: 1-19. Academic Press, Inc. London.
- 61.- DAHL D., CROSBY C.J., BIGNAMI A. (1989): "*Intermediate filament protein immunologically related to desmin in astrocytes: A study of chicken spinal cord by two-dimensional gel electrophoresis and immunoblotting*". Neurochemistry Research, 14: 1013-1016.
- 62.- DAVIS F.A. (1940): "*Glial cells of the normal optic nerve*". En: Primary tumors of the optic nerve (a phenomenon of Recklinghausen's disease); pags: 106-116. American Medical Association. Chicago (Reprinted from Archives of Ophthalmology, 23: 735-821; 957-1018)
- 63.- DEL RÍO-HORTEGA P. (1919): "*El tercer elemento de los centros nerviosos. 1.- La microglia en estado normal*". Boletín de la Sociedad Española de Biología, 8-9: 68-82.
- 64.- DEL RÍO-HORTEGA P. (1921): "*Estudios sobre la neuroglia: La glia de escasas radiaciones (oligodendroglia)*". Boletín de la Sociedad Española de Historia Natural, 21: 63-92.
- 65.- DEL RÍO-HORTEGA P. (1932): "*Microglia*". En: Cytology and cellular pathology of the Nervous System (W. Penfield, Ed.); Vol. 2; págs: 481-584. Hoeber, New York.

- 66.- DIXON R.G., ENG L.F. (1981): "*Glial fibrillary acidic protein in the optic nerve of the developing albino rat: an immunoperoxidase study of paraffin-embedded tissue*". Journal of Comparative Neurology, 201: 15-24.
- 67.- DREJER J., BENVENISTE H., DIEMER N.H., SCHOUSBOE A. (1985): "*Cellular origin of ischemia-induced glutamate release from brain tissue in vivo and in vitro*". Journal of Neurochemistry, 45: 145-151.
- 68.- DUKE-ELDER S., WYBAR K.C. (1961): "*The optic nerve*". En: System of Ophthalmology (S. Duke-Elder, Ed). Vol. II: The anatomy of the visual system; págs: 273-294. Henry Kimpton, London.
- 69.- DUTLY F., SCHWAB M.E. (1991): "*Neurons and astrocytes influence the development of purified O-2A progenitor cells*". Glia, 4: 559-571.
- 70.- DYAN A. (1991): "*Pour la pratique l'astrocyte cerebral*". En: Pratique quotidienne en neurologie, n° 14. Publication médicale des Laboratoires Servier. Artem 27 Ed. Paris.
- 71.- ELKINGTON A.R., INMAN C.B., STEART P.V., WELLER R.O. (1990): "*The structure of the lamina cribosa of the human eye: an immunocytochemical and electron microscopical study*". Eye, 4: 42-57.
- 72.- ELSCHNIG A. (1901): "*Der normale sehnerveneintritt des menschlichen auges*". Naturwissenschaftliche classe der kaiserselichen akademie in Wein. 70: 219-303. (Citado por Anderson 1969 y Salzmann 1912).
- 73.- ENG L.F., VANDERHAEGHEN J.J., BIGNAMI A., GERSTL B. (1971): "*An acidic protein isolated from fibrous astrocytes*". Brain Research, 28: 351-354.
- 74.- ERSKINE C.A. (1958): "*Capillary-glia relationships in the human optic nerve, chiasma, and tract, as shown by phase-colour contrast and microdissection*". British Journal of Ophthalmology, 42: 81-90.
- 75.- FERNÁNDEZ B., GONZALEZ G. (1969): "*Astrocytes in the tectum opticum of the chicken*". Trabajos del Instituto Cajal, 61: 1-19.

- 76.- FFRENCH-CONSTANT C., RAFF M.C. (1986a): "*Proliferating bipotential glial progenitor cells in adult rat optic nerve*". *Nature*, 319: 499-502.
- 77.- FFRENCH-CONSTANT C., RAFF M.C. (1986b): "*The oligodendrocyte-type-2 astrocyte cell lineage is specialized for myelination*". *Nature*, 323: 335-338.
- 78.- FFRENCH-CONSTANT C., MILLER R.H., KRUSE J., SCHACHNER M., RAFF MC. (1986c): "*Molecular specialization of astrocyte processes at nodes of Ranvier in rat optic nerve*". *Journal of Cell Biology*, 102: 844-852.
- 79.- FLAGE T. (1977): "*Permeability properties of the tissues in the optic nerve head region in the rabbit and the monkey. An ultrastructural study*". *Acta Ophthalmologica*, 55: 652-664.
- 80.- FLAGE T. (1980a): "*A defect in the blood-retina barrier in the optic nerve head region in the rabbit and the monkey*". *Acta Ophthalmologica*, 58: 645-651.
- 81.- FLAGE T., RINGVOLD A. (1980b): "*Demonstration of a diffusional pathway between the subretinal space and the juxtapapillary connective tissue. An in vitro experiment using horseradish peroxidase as a tracer*". *Acta Ophthalmologica*, 58: 899-907.
- 82.- FRANÇOIS J., FRICZKOWSKI A. (1977): "*Microcirculation of the anterior part of the optic nerve*". *Ophthalmologica*, 175: 222-229.
- 83.- FUCHS E. (1885): "*Die periphäre atrophie des sehnerven*". *Graefe's Archives for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 31: 177-200. (Citado por Anderson, 1969).
- 84.- FUKUCHI T., SAWAGUCHI S., HARA H., SHIRAKASHI M., IWATA K. (1992): "*Extracellular matrix changes of the optic nerve lamina cribosa in monkey eyes with experimentally chronic glaucoma*". *Graefe's Archives for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 230: 421-427.

- 85.- FULCRAND J., PRIVAT A. (1977): "*Neuroglial reactions secondary to Wallerian degeneration in the optic nerve of the postnatal rat: ultrastructural and quantitative study*". Journal of Comparative Neurology, 176: 189-224.
- 86.- FURUTA M., TSUKAHARA S., KOBAYASHI M. (1988): "*Glial cell changes of the rabbit optic disc in experimental glaucoma*". Acta Society Ophthalmologica Japanesse, 92: 1450-1455.<sup>8</sup>
- 87.- GARCÍA-SÁNCHEZ J. (1979): "*Tratamiento del glaucoma*". Ponencia Oficial del LVI Congreso de la Sociedad Española de Oftalmología. Talleres Gráficos Vda. de Bermejo. Madrid.
- 88.- GARCÍA-SÁNCHEZ J.; RAMÍREZ J.M., TRIVIÑO A. (1986): "*Análisis de un modelo vascular de disco óptico y su respuesta ante distintas agresiones*". Glaucoma, 1: 3-9.
- 89.- GARCÍA-SÁNCHEZ J., RAMÍREZ J.M., TRIVIÑO A., SALAZAR J.J., RAMÍREZ A.I. (1992): "*Optic disc and choroid circulatory behavior in experimental glaucoma in rabbits and human choroid dynamics*". En: International Symposium on Glaucoma, ocular blood flow, and drug treatment (S.M. Drance, Ed.); págs: 42-48. Williams & Wilkins, Baltimore.
- 90.- GAZE R.M. (1960): "*Regeneration of the optic nerve in amphibians*". International Reviews Neurobiology, 2: 1-40.
- 91.- GEIJER C., BILL A. (1979): "*Effects of raised intraocular pressure on retinal, prelaminar, laminar, and retrolaminar optic nerve blood flow in monkeys*". Investigative Ophthalmology and Visual Science, 18: 1030-1042.
- 92.- GEISERT E.E. Jr., WILLIAMS R.C., BIDANSET D.J. (1992): "*A CNS specific proteoglycan associated with astrocytes in rat optic nerve*". Brain Research, 571: 165-168.

---

<sup>8</sup> El idioma original del artículo es el japonés pero posee abstract en inglés.

- 93.- GERSCHENFELD H.M., WALD F., ZADUNAISKY T.A (1959): *"Function of astroglia in the water-ion metabolism of the central nervous system: an electron microscopic study"*. Neurology, 9: 412-425.
- 94.- GHANDOUR M.S., LANGLEY O.K., VICENDON G., GOMBOS G. (1979): *"Double labelling immunohistochemical technique provides evidence of the specificity of glial cell markers"*. Journal of Histochemistry and Cytochemistry.; 27: 1634-1637.
- 95.- GIFTOCHRISTOS N., DAVID S. (1988a): *"Laminin and heparan sulphate proteoglycan in the lesioned adult mammalian central nervous system and their possible relationship to axonal sprouting"*. Journal of Neurocytology, 17: 385-397.
- 96.- GIFTOCHRISTOS N., DAVID S. (1988b): *"Immature optic nerve glia of rat do not promote axonal regeneration when transplanted into a peripheral nerve"*. Brain Research, 467: 149-153.
- 97.- GIORDANO S., HALL C., QUITSCHE W., GLASGOW E., SCHECHTER N. (1990): *"Keratin 8 of simple epithelia is expressed in glia of the goldfish nervous system"*. Differentiation, 44: 163-172.
- 98.- GIULIAN D., BAKER T.J. (1985): *"Peptides released by ameboid microglia regulate astroglial proliferation"*. Journal of Cell Biology, 101: 2411-2415.
- 99.- GOLDBAUM M.H., JENG S.Y., LOGEMANN R., WEINREB R.N. (1989): *"The extracellular matrix of the human optic nerve"*. Archives of Ophthalmology, 107: 1225-1231.
- 100.- GOLDMAN J.E. (1992): *"Regulation of oligodendrocyte differentiation"*. Trends in Neuroscience, 15: 359-362.
- 101.- GOLDMANN H. (1959): *"Some basic problems of simple glaucoma"*. American Journal of Ophthalmology, 48 (Pt. II): 213-220.
- 102.- GOLDSTEIN G.W., BETZ A.L. (1986): *"La barrera hematoencefálica"*. Investigación y Ciencia, 122: 46-55.

- 103.- GOTOW T., HASHIMOTO P.H. (1988): "*Deep-etch structure of astrocytes at the superficial glia limitans, with special emphasis on the internal and external organization of their plasma membranes*". Journal of Neurocytology; 17: 399-413.
- 104.- GRAEBER M.B., STREIT W.J., KREUTZBERG G.W. (1988): "*Axotomy of the rat facial nerve leads to increased CR3 complement receptor expression by activated microglial cells*". Journal of Neuroscience Research, 21: 18-24.
- 105.- GRAY P.T.A., RITCHIE J.M. (1985): "*Ion channels in Schwann and glial cells*". Trends in Neuroscience, 8: 211-215.
- 106.- GREEF R. (1899): "*Das wesen der sogenannten fuchsschen atrophie des shnerven*". IX International Ophthalmologicum Kongress. Utrecht; págs: 273-341. (Citado por Salzmann, 1912).
- 107.- GREEF R. (1913): "*Guide to the microscopic examination of the eye*" (Third Edition). The ophthalmoscope Press. London.
- 108.- GREEF R. (1914): "*Enfermedades de los nervios ópticos y de las vías de igual nombre*". En: Tratado de Oftalmología (T. Axenfeld, Ed.). (Traducción de la tercera edición alemana por P. Gonzalez). Págs: 614-645. Casa Editorial Saturnino Calleja Fernández, Madrid.
- 109.- HADEN H.C. (1946): "*The development of the ectodermal framework of the optic nerve, with especial reference to the glial lamina cribosa*". Transactions of the American Academy of Ophthalmology, 44: 61-64.
- 110.- HANSEN A.J. (1985): "*Effect of anoxia on ion distribution in the brain*". Physiological Reviews, 65: 101-148.
- 111.- HART I.K., RICHARDSON W.D., HELDIN C.H., WESTERMARK B., RAFF MC. (1989a): "*PDGF receptors on cells of the oligodendrocyte-type-2 astrocyte (O-2A) cell lineage*". Development, 105: 595-603.
- 112.- HART I.K., RICHARDSON W.D., BOLSOVER S.R., RAFF M.C. (1989b): "*PDGF and intracellular signalling in the timing of oligodendrocyte differentiation*". Journal of Cell Biology, 109: 3411-3417.

- 113.- HAYREH S.S., VRABEC Fr. (1966): "*The structure of the head of the optic nerve in Rhesus monkey*". American Journal of Ophthalmology, 61: 136-150.
- 114.- HAYREH S.S. (1974a): "*Anatomy and physiology of the optic nerve head*". Transactions American Academy of Ophthalmology and Otolaryngology, 78: 240-274.
- 115.- HAYREH S.S. (1974b): "*Anterior ischemic optic neuropathy. I. Terminology and pathogenesis*". British Journal of Ophthalmology, 58: 955-963.
- 116.- HAYREH S.S. (1978): "*Structure and blood supply of the optic nerve*". En: Glaucoma: Conceptions of a disease. Pathogenesis, diagnosis, therapy (K. Heilmann, K.T. Richardson, Eds.); págs: 78-96. Georg Thieme Publishers. Stuttgart.
- 117.- HAYREH S.S. (1984): "*The sheath of the optic nerve*". Ophthalmologica, 189: 54-63.
- 118.- HAYREH S.S. (1987): "*Factors determining the glaucomatous optic nerve head damage*". En: Glaucoma Update III (G.K. Kriegelstein, Ed.); págs: 40-46. Springer-Verlag. Berlin.
- 119.- HAYREH S.S. (1989): "*Blood supply of the optic nerve head in health and disease*". En: Ocular blood flow in glaucoma: means, methods and measurements" (G.N. Lambrou; E.L. Greve, Eds.); págs: 3-54. Kugler & Ghedini, Amstelveen.
- 120.- HAYREH S.S. (1994): "*Progress in the understanding of the vascular etiology of glaucoma*". Current Opinion in Ophthalmology, 5(II): 26-35.
- 121.- HENKIND P., LEVITZKY M. (1969): "*Angioarchitecture of the optic nerve. I: The papilla*". American Journal of Ophthalmology, 68: 979-986.
- 122.- HENKIND P., CHARLES C., PEARSON J. (1970): "*Histopathology of ischemic optic neuropathy*". American Journal of Ophthalmology, 69: 78-90.

- 123.- HENN F.A., GOLDSTEIN M.N., HAMBERGER A. (1974): "*Uptake of the neurotransmitter candidate glutamate by glial*". *Nature*, 249: 663-664.
- 124.- HERNANDEZ (1988): "*Cell culture of the human lamina cribosa*". *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 29: 78-89.
- 125.- HERNANDEZ M.R., LUO X.X., ANDRZEJEWSKA W., NEUFELD A.H. (1989): "*Age-related changes in the extracellular matrix of the human optic nerve head*". *American Journal of Ophthalmology*, 107: 476-484.
- 126.- HERNANDEZ M.R., ANDRZEJEWSKA W., NEUFELD A.H. (1990): "*Changes in the extracellular matrix of the human optic nerve head in primary open-angle glaucoma*". *American Journal of Ophthalmology*, 109: 180-188.
- 127.- HERNANDEZ M.R., WANG N., HANLEY N.M., NEUFELD A.H. (1991): "*Localization of collagen types I and mRNAs in human optic nerve head by in situ hybridization*". *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 32: 2169-2177.
- 128.- HIDELBRAND C., WAXMAN S.G. (1984): "*Postnatal differentiation of rat optic nerve fibers: electron microscopic observations on the development of nodes of Ranvier and axoglial relations*". *Journal of Comparative Neurology*, 224: 25-37.
- 129.- HIDELBRAND C., REMAHL S., PERSSON H., BJARTMAR C. (1993): "*Myelinated nerve fibres in the CNS*". *Progress in Neurobiology*, 40: 319-384.
- 130.- HIRATA A., KITOAKA T., ISHIGOOKA H., UENO S. (1991): "*Cytochemical studies of transitional area between retina and optic nerve*". *Acta Ophthalmologica*, 69: 71-75.
- 131.- HIROSE G., BASS N.H. (1973): "*Maturation of oligodendroglia and myeliogenesis in rat optic nerve: a quantitative histochemical study*". *Journal of Comparative Neurology*, 152: 201-209.

- 132.- HOF L., KIMELBERG H.K. (1985): " *$\beta$ -glucosidase and  $\beta$ -galactosidase in primary cultures of rat astrocytes. Comparison to the brain enzymes*". Journal of Neurochemistry, 44: 274-277.
- 133.- HOGAN M.J., ALVARADO J.A., WEDDELL J.E. (1971): "*Histology of the human eye. An atlas and textbook*". Chapter 10: Optic nerve; págs: 523-606. W.B. Saunders Company, Philadelphia.
- 134.- HOLLÄNDER H., MAKAROV F., DREHER Z., van DRIEL D., CHAN-LING T.L., STONE J. (1991): "*Structure of the macroglia of the retina: sharing and division of labour between astrocytes and Müller cells*". Journal of Comparative Neurology, 313: 587-603.
- 135.- HOPKINS J.M., FORD-HOLEVINSKI T.S., McCOY J.P., AGRANOFF B.W. (1985): "*Laminin and optic nerve regeneration in the goldfish*". Journal of Neuroscience, 5: 3030-3038.
- 136.- HOYT W.F., TUDOR R.C. (1963): "*The course of peripapillary temporal retinal axons through the anterior optic nerve*". Archives of Ophthalmology, 69: 503-507.
- 137.- ISAYAMA Y., TAKAHASHI T. (1983): "*Posterior ischemic optic neuropathy. II. Histopathology of the idiopathic form*". Ophthalmologica, 14: 146-148.
- 138.- JACOBY E. (1905): "*Über die neuroglia des sehnerven*". Klin. Monatsbl. Augenh., 43: 129-137. (Citado por Anderson, 1969).
- 139.- JANZER R.C., RAFF M.C. (1987): "*Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cells*". Nature, 325: 253-257.
- 140.- JANZER R.C., LOBRINUS J.A., DAREKAR P., JULLERAT L. (1993): "*Astrocytes secrete a factor inducing the expression of HT7-protein and neurothelin in endothelial cells of chorioallantoic vessels*". Advances in Experimental Medicine and Biology, 331: 217-221.
- 141.- JONAS J.B., MÜLLER-BERGH J.A., SCHLÖTZER-SCHREHARDT U.M., NAUMANN G.O.H. (1990): "*Histomorphometry of the human optic nerve*". Investigative Ophthalmology and Visual Science, 31: 736-744.

- 142.- JONAS J.B., MARDIN C.Y., SCHLOTZER-SCHREHARDT U.M., NAUMANN G.O. (1991): "*Morphometry of the human lamina cribosa surface*". Investigative Ophthalmology and Visual Science, 32: 401-405
- 143.- JONAS J.B., SCHMIDT A.M., MÜLLER-BERGH J.A., SCHLÖTZER-SCHREHARDT U.M., NAUMANN G.O.H. (1992): "*Human optic nerve fiber count and optic disc size*". Investigative Ophthalmology and Visual Science, 33: 2012-2018.
- 144.- JONAS J.B. (1993a): "*Estudio de la papila y de la capa de las fibras nerviosas en el ojo normal y glaucomatoso*". En: Club Español del Glaucoma (F.M. Honrubia, Ed.), Reunión Anual, nº 1, págs: 65-79. International Marketing and Communications, Madrid.
- 145.- JONAS J.B., NAUMANN G.O.H. (1993b): "*The optic nerve: Its embryology, histology, and morphology*". En: The Optic Nerve in Glaucoma (R. Varma, G.L. Spaeth, K.W. Parker, Eds.); págs: 3-26. J.B. Lippincott Company. Philadelphia.
- 146.- JONES P.S., TESSER P., KEYSER K.T., QUITSCHKE W., SAMADI R., KARTEN H.J., SCHECHTER N. (1986): "*Immunohistochemical localization of intermediate filament proteins of neuronal and nonneuronal origin in the goldfish optic nerve: specific molecular markers for optic nerve structures*". Journal of Neurochemistry, 47: 1226-1234.
- 147.- JORGENSEN M.B., DIEMER N.H. (1982): "*Selective neuron loss after cerebral ischemia in the rat: possible role of transmitter glutamate*". Acta Neurologica Scandinavica, 66: 536-546.
- 148.- KATZ L.J., SPAETH G.L., CANTHOR L.B., PORYZEES E.M., STEINMANN W.C. (1989): "*Reversible optic disc cupping and visual field improvement in adults with glaucoma*". American Journal of Ophthalmology, 107: 485-492.
- 149.- KESTENBAUM A. (1963): "*Applied anatomy of the eye*". Chapter 5: The optic nerve; págs: 129-147. Grune & Stratton, New York.

- 150.- KIMELBERG H.K., RANSOM B.R. (1986): "*Physiological and pathological aspects of astrocytic swelling*". En: Astrocytes (S. Fedoroff, A. Vernadakis, Eds.); Vol. 3: Cell biology and pathology of astrocytes; págs: 129-166. Academic Press INC, Orlando.
- 151.- KIMELBERG H.K., NOREMBERG M. (1989): "*Astrocytes*". Scientific American, 260: 44-52.<sup>h</sup>
- 152.- KISHI S, TSO M., HAYREH H.H. (1985): "*Fundus lesions in malignant hypertension. II. A pathologic study of experimental hypertensive optic neuropathy*". Archives of Ophthalmology, 103: 1198-1206.
- 153.- KLATZO I., CHUI E., FUJIWARA K., SPATZ M (1980): "*Resolution of vasogenic brain edema (VBE)*". Advances in Neurology, 28: 359-374.
- 154.- KONNERTH A., ORKAND P.M., ORKAND R.K. (1988): "*Optical recording of electrical activity from axons and glia of frog optic nerve: potentiometric dye responses and morphometrics*". Glia, 1. 225-232.
- 155.- KORTE G.E., HENKIND P. (1986): "*Vascular permeability and the optic disc. Changes after bilateral common ligation in the rat*". Archives of Ophthalmology, 104: 273-276.
- 156.- KRAIG R.P., CHESLER M. (1990): "*Astrocytic acidosis in hyperglycemic and complete ischemia*". Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism, 10: 104-114.
- 157.- KRIEGLER J.S., KRISHNAN N., SINGER M. (1981): "*Trophic interactions of neurons and glia*". Advances in Neurology, 31: 479-504.
- 158.- KRUSE J., KEILHAUER G., FAISSNER A., TIMPL R., SCHACHNER M. (1985): "*The J1 glycoprotein-a novel nervous system cell adhesion molecule of the L2/HNK-1 family*". Nature, 316: 146-148.

---

<sup>h</sup> Publicado también en la Ed. española de la revista: Investigación y Ciencia, 153 (1989); 44-55. También puede consultarse en la recopilación: Función Cerebral. Libros de Investigación y Ciencia, págs: 18-27. Prensa Científica, Barcelona (1991).

- 159.- KUHNT H. (1879): *"Zur Kenntnis der Sehnerven und der Netzhaut"*. Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology, 25: 179-288.
- 160.- KUMPULAINEN T., DAHL D., KORHONEN L.K., NYSTRÖM H.M. (1983): *"Immunolabelin of carbonic anhydrase isoenzyme C and glial fibrillary acidic protein in paraffin-embedded tissue sections of human brain and retina"*. Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 31: 879-886.
- 161.- LAKE N., VERDONE-SMITH C., BROWNSTEIN S. (1992a): *"Immunocytochemical localization of taurine and glial fibrillary acidic protein in human optic nerve"*. Visual Neuroscience, 8: 251-255.
- 162.- LAKE N. (1992b): *"Localization of taurine and glial fibrillary acidic protein in human optic nerve using immunocytochemical techniques"*. Advances in Experimental Medicine and Biology, 315: 303-307.
- 163.- LAKE N. (1992c): *"Taurine, GABA and GFAP immunoreactivity in the developing and adult rat optic nerve"*. Brain Research, 596: 124-132.
- 164.- LAZARIDES E. (1980). *"Intermediate filaments as mechanical integrators of cellular space"*. Nature, 283: 249-256.
- 165.- LEBER T.H. (1868): *"Beiträge zur kenntnis der atropischen veränderungen des sehnerven nebst bemerkungen über die normale struktur"*. Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology, 14: 164-194.
- 166.- LESSELL S., HOROVITZ B. (1972): *"Histochemical study of enzymes of optic nerve of monkey and rat"*. American Journal of Ophthalmology, 74: 118-126.
- 167.- LESSELL S. (1977): *"The histology and histochemistry of the rat's optic nerve and chiasm"*. American Journal of Ophthalmology, 84: 681-688.
- 168.- LEVINE R.L. (1989): *"Organization of astrocytes in the visual pathways of the goldfish: an immunohistochemical study"*. Journal of Comparative Neurology, 285: 231-245.

- 169.- LEVITT P., PINTAR J.E., BREAKFIELD X.O. (1982): "*Immunocytochemical demonstration of monoamine oxidase B in brain astrocytes and serotonergic neurons*". Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, 79: 6385-6389.
- 170.- LEVITZKY M., HENKIND P. (1969): "*Angioarchitecture of the optic nerve II: Lamina cribosa*". American Journal of Ophthalmology, 68: 986-996.
- 171.- LEVY N.S. (1976): "*The effect of interruption of the short posterior ciliary arteries on slow axoplasmic transport and histology within the optic nerve of the Rhesus monkey*". Investigative Ophthalmology, 115: 495-499.
- 172.- LIEBERMAN M., MAUMENEE A., GREEN W. (1976): "*Histologic studies of the vasculature of the anterior optic nerve*". American Journal of Ophthalmology, 82: 405-423.
- 173.- LIESI P. (1985): "*Do neurons in the vertebrate CNS migrate on laminin?*". EMBO Journal, 4: 1163-1170.
- 174.- LIESI P., SILVER J. (1988): "*Is astrocyte laminin involved in axon guidance in the mammalian CNS?*". Developmental Biology, 130: 774-785.
- 175.- LILLIEN L.E., SENDTNER M., ROHRER H., HUGHES S.M., RAFF M.C. (1988): "*Type-2 astrocyte development in rat brain cultures is initiated by a CNTF-like protein produced by type-1 astrocytes*". Neuron, 1: 485-494.
- 176.- LIN H.H., CONNOR J.R. (1989): "*The development of the transferrin-transferrin receptor system in relation to astrocytes, MBP and galactocerebroside in normal and myelin-deficient rat optic nerves*". Developmental Brain Research, 49: 281-293.
- 177.- LINDSAY R.M. (1986): "*Reactive gliosis*". En: Astrocytes (S. Fedoroff, A. Vernadakis, Eds.); Vol. 3: Cell biology and pathology of astrocytes; págs: 231-262. Orlando.
- 178.- LISS L. (1956): "*The astroglia of the human optic nerve, chiasma and tract. A study with silver-carbonate*". Journal of Neurology, 105: 151-160.

- 179.- LOBRINUS J.A., JUILLERAT J.L., DAREKAR P., SCHLOSSHAUER B., JANZER R.C. (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."* Developmental Brain Research, 70: 207-211.
- 180.- LÓPEZ ENRIQUEZ M. (1926): *"Existencia de células de Hortega "microglia" en la retina y vías ópticas"*. Boletín de la Real Sociedad Española de Historia Natural, 26: 294-301.
- 181.- LÓPEZ ENRIQUEZ M. (1927): *"Las células de Hortega de la retina y vías ópticas en estado normal y patológico"*. Archivos de Oftalmología Hispano-Americana, 27: 322-349.
- 182.- LUSE S.A. (1956): *"Electron microscopic observations of the central nervous system"*. Journal of Biochemistry and Cytology, 2: 531-541.
- 183.- MALMFORS L. (1963): *"Electron microscopic description of the glial cells in the nervus opticus in mice."* Journal of Ultrastructural Research, 8: 193.
- 184.- MANTHORPE M., ENGVALL E., RUOSLATHI E., LONGO F.M., DANS G.E., VARON S. (1983): *"Laminin promotes neuritic regeneration from cultured peripheral and central neurons"*. Journal of Cell Biology, 97: 1882-1890.
- 185.- MARCHESANI O. (1926): *"Die morphologie der glia im nervus opticus und in der retina, dargestellt nach den neuesten untersuchungsmethoden untersuchungsergebniseen"*. Graefe's Archives for Clinical and Experimental Ophthalmology, 117: 575-605.
- 186.- MARTOJA R., MARTOJA-PIERSON M. (1970): *"Técnicas de histología animal"*. Toray-Masson S.A., Barcelona.
- 187.- MASSA P.T. (1982): *"Plasmalemmal vesicles (caveolae) of fibrous astrocytes of the cat optic nerve"*. American Journal of Anatomy, 165: 69-81.

- 188.- MATAKAS F., BIRKLE J., CERVÓS-NAVARRO J. (1978): "*The effect of prolonged experimental hypercapnia on the brain*". Acta Neurophatological, 41: 207-210.
- 189.- McLEOD D., MARSHALL J., KOHNER E.M. (1980): "*Role of axoplasmic transport in the pathophysiology of ischemic disc swelling*". British Journal of Ophthalmology, 64: 247-261.
- 190.- McMANUS J.F.A., MOWRY R.W. (1968): "*Técnica histológica*". Atika S.A. Madrid.
- 191.- MIKELBERG F.S., DRANCE S.M., SCHULZER M., YIDEGILIGNE H.M., WEIS M.M. (1989): "*The normal human optic nerve. Axon count and axon diameter distribution*". Ophthalmology, 96: 1325-1328.
- 192.- MILLER R.H., RAFF M.C. (1984): "*Fibrous and protoplasmic astrocytes are biochemically and developmental distinct*". Journal of Neuroscience, 4: 585-592.
- 193.- MILLER R.H., DAVID S., PATEL R., ABNEY E.R., RAFF M.C. (1985): "*A quantitative immunohistochemical study of macroglial cell development in the rat optic nerve: in vivo evidence for two distinct astrocyte lineages*". Developmental Biology, 111: 35-41.
- 194.- MILLER R.H., ABNEY E.R., DAVID S., FFRENCH-CONSTANT C., LINDSAY R., PATEL R., STONE J., RAFF M.C. (1986): "*Is reactive gliosis a property of a distinct subpopulation of astrocytes*". Journal of Neuroscience, 6: 22-29.
- 195.- MILLER R.H., FFRENCH-CONSTANT C., RAFF M.C. (1989a): "*The macroglial cells of the rat optic nerve*". Annals Review of Neuroscience, 12: 517-534.
- 196.- MILLER R.H., FULTON B.P., RAFF M.C. (1989b): "*A novel type of glial cell associated with nodes of Ranvier in rat optic nerve*". European Journal of Neuroscience, 1: 172-180.
- 197.- MINCKLER D.S., McLEAN I.W., TSO M.O.M. (1976): "*Distribution of axonal and glial elements in the Rhesus optic nerve head studied by electron microscopy*". American Journal of Ophthalmology, 82: 179-187.

- 198.- MINCKLER (1982): "*Optic nerve axonal transport: clinical aspects*". En: Ocular anatomy, embriology and teratology (F.A. Jakobiec, Ed.); págs: 650-675. Harper & Row, Publishers. Philadelphia.
- 199.- MINCKLER D.S., XU S., OGDEN T. (1987): "*Distribution of axonal transport injury in the lamina in experimental glaucoma in the monkey*". En: Glaucoma Update III (G.K. Krieglstein, Ed.); págs: 27-35. Springer-Verlag. Berlin.
- 200.- MINCKLER D.S. (1993): "*Neuronal damage in glaucoma*". En: The optic nerve in glaucoma (R. Varma, G.L. Spaeth, K.W. Parker, Eds.); págs: 51-59. J.B. Lippincott Company. Philadelphia.
- 201.- MINTURN J.E.; BLACK J.A.; ANGELIDES K.J.; WAXMAN S.G. (1990): "*Sodium channel expression detected with antibody 7493 in A2B5+ and A2B5- astrocytes from rat optic nerve in vitro*". *Glia*, 3: 358-367.
- 202.- MORRISON J.C., JERDAN J.A., L'HERNAULT N.L., QUIGLEY H.A. (1988): "*The extracellular matrix composition of the monkey optic nerve head*". *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 29: 1141-1150.
- 203.- MORRISON J.C., L'HERNAULT N.L., JERDAN J.A., QUIGLEY H.A. (1989a): "*Ultrastructural location of extracellular matrix components in the optic nerve head*". *Archives of Ophthalmology*, 107: 123-129.
- 204.- MORRISON J.C., JERDAN J.A., DORMAN-PEASE M.E., QUIGLEY H.A. (1989b): "*Structural proteins of the neonatal and adult lamina cribosa*". *Archives of Ophthalmology*, 107: 1220-1224.
- 205.- MORRISON J.C. (1989c): "*Anatomía de la porción intraocular del nervio óptico (nervio óptico anterior)*". En: Atlas clínico del glaucoma (E.M. Van Burskirk, Ed.), págs: 22-23. Ediciones Doyma, Barcelona.
- 206.- MORRISON J.C., DORMAN-PEASE M.E., DUNKELBERGER G.R., QUIGLEY H.A. (1990): "*Optic nerve head extracellular matrix in primary optic atrophy and experimental glaucoma*". *Archives of Ophthalmology*, 108: 1020-1024.

- 207.- MUGNAINI E. (1986): "*Cell junctions of astrocytes, ependyma, and related cells in the mammalian central nervous system, with emphasis on the hypothesis of a generalized functional syncytium of supporting cells*". En: Astrocytes: development, morphology, and regional specialization of astrocytes (S. Fedoroff, A. Vernadakis, Eds.); Vol. 1; págs 229-371. Academic Press Inc. Orlando.
- 208.- MURAKAMI M., IDE C., KANAYA H. (1989): "*Regeneration in the rat optic nerve after cold injury*". Journal of Neurosurgery, 71: 254-265.
- 209.- NAKANE P.K., PIERCE G.B. (1966): "*Enzyme labeled antibodies for the light and electron microscopic localization of tissue antigens*". Journal of Cell Biology, 33: 307.
- 210.- NEUMANN E., HYAMS S.W. (1973): "*Intermittent glaucomatous excavation*". Archives of Ophthalmology, 90: 64-66.
- 211.- NOBLE M., MURRAY K. (1984): "*Purified astrocytes promote the in vitro division of a bipotential glial progenitor cell*". EMBO Journal, 3: 2243-2247.
- 212.- NONA S.M., SEHAB S.A.S, STAFFORD C.A, CRONLY-DILLON J.R. (1989): "*Glial fibrillary acidic protein (GFAP) from the goldfish: its localization in the visual pathways*". Glia, 2: 189-200.
- 213.- NORENBERG M., MARTINEZ-HERNANDEZ A. (1979): "*Fine structural localization of glutamine synthetase in astrocytes of rat brain*". Brain Research, 161: 303-310.
- 214.- OGDEN T.E., DUGGAN J., DANLEY K., WILCOX M., MINCKLER D.S. (1988): "*Morphometry of nerve fiber bundle pores in the optic nerve head of the human*". Experimental Eye Research, 46: 559-568.
- 215.- OKINAMI S., OHKUMA M., TSUKAHARA T. (1976): "*Kuhnt intermediary tissue as a barrier between the optic nerve and retina*". Graefe's Archives for Clinical and Experimental Ophthalmology, 201: 57-67.

- 216.- OLVER J.M., SPALTON D.J., McCARTNEY A.C.E. (1990): *"Microvascular study of the retrolaminar optic nerve in man: the possible significance in anterior ischaemic optic neuropathy"*. Eye, 4: 7-24.
- 217.- OMLIN FX. BISCHOFF A. SPYCHER MA. (1978): Filaments in astrocytes and axons of mice optic nerve. A freeze-etching study. Experimental Cell Biology, 46: 199-209.
- 218.- ORTIZ G., DIAZ-FLOREZ L., VALLE A., RIERA P., SÁNCHEZ G., RODRIGUEZ M.L., GAYOSO M. (1977): *"Histología del ojo y sus anexos"*. A. G. Cuscó, Barcelona.
- 219.- ORTIZ-MITERRER G. (1974): *"Contribución al estudio de la neuroglia del nervio óptico humano"*. Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología, 34: 105-128.
- 220.- PALAY S.L., McGEE-RUSSELL S.M., GORDON S., GRILLO M.A. (1962): *"Fixation of neural tissues for electron microscopy by perfusion with solutions of osmium tetroxide"*. Journal of Cell Biology, 12: 385-410.
- 221.- PALJARVI L., REHCORONA S., SODERFELDT B., OLSSON Y., KALIMO H. (1983): *"Brain lactin acidosis and ischemic cell damage: quantitative ultrastructural changes in capillaries of rat cerebral cortex"*. Acta Neuropathologica, 60: 232-240.
- 222.- PAPASOZOMENOS S. Ch., BINDER L.I. (1986): *"Microtubule-associated protein 2 (MAP2) is present in astrocytes of the optic nerve but absent from astrocytes of the optic tract"*. Journal of Neuroscience, 6: 1748-1756.
- 223.- PARYSEK L.M., DEL CERRO M., OLMSTED J.B. (1985): *"Microtubule-associated protein 4 antibody a new marker for astroglia and oligodendroglia"*. Neuroscience, 15: 869-875.
- 224.- PENFIELD W. (1924): *"Oligodendroglia and its relation to classical neuroglia"*. Brain, 47: 430-452.
- 225.- PERIDES G., ASHER R., DAHL D., BIGNAMI A. (1990): *"Glial hyaluronate-binding protein (GHAP) in optic nerve and retina"*. Brain Research, 512: 309-316.

- 226.- PERRY V.H., ANDERSON P.B., GORDON S. (1993): "*Macrophages and inflammation in the central nervous system*". Trends in Neuroscience, 16: 268-273.
- 227.- PETERS A. (1960): "*The formation and structure of myelin sheaths in the Central Nervous System*". Journal of Biophysical and Biochemical Cytology, 8: 431-446.
- 228.- PETERS A. (1964): "*Observations on the conexions between myelin sheaths and glial cells in the optic nerves of young rats*". Journal of Anatomy, 98: 125-134.
- 229.- PETERS A., VAUGHN J.E. (1967): "*Microtubules and filaments in the axons and astrocytes of early postnatal rat optic nerves*". Journal of Cell Biology, 32: 113-119.
- 230.- PETITO C.K., PULSINELLI W.A., JACOBSON G., PLUM F. (1982): "*Edema and vascular permeability in cerebral ischemia: comparison between ischemic neuronal damage and infarction*". Journal of Neuropathology and Experimental Neurology, 41: 423-436.
- 231.- PINAZO-DURÁN M.D., RENAU-PIQUERAS J., GUERRI C. (1992): "*Análisis morfológico y estereológico de la macrogliogénesis y mielinogénesis en el nervio óptico de la rata wistar*". Studium Ophthalmologicum., 11(1): 31-34.
- 232.- PRIESTLEY J. (1987): "*Immunocytochemical techniques for the localization of neurochemically characterized nerve pathways*". En: Neurochemistry a practical approach (A.J. Turner, H.S. Bachelard, Eds.); págs: 65-112. IRL Press Limited. Oxford.
- 233.- PRINGLE N.P., COLLARINI E.J., MOSLEY M.J., HELDIN C.H., WESTERMARK B., RICHARDSON W.D. (1989): "*PDGF A chain homodimers drive proliferation of bipotential (O-2A) glial progenitor cells in the developing rat optic nerve*". EMBO Journal, 8: 1049-1056.
- 234.- PRINGLE N.P., MUDHAR H.S., COLLARINI E.J., RICHARDSON W.D. (1992): "*PDGF receptors in the rat CNS: during late neurogenesis, PDGF alpha-receptor expression appears to be restricted to glial cells in the oligodendrocyte lineage*". Development, 115: 535-551.

- 235.- PRIVAT A., RATABOUL P. (1986): "*Fibrous and protoplasmic astrocytes*". En: *Astrocytes: development, morphology, and regional specialization of astrocytes* (S. Fedoroff, A. Vernadakis, Eds.); vol. 1, págs: 105-129. Academic Press Inc. Orlando.
- 236.- PURO D.G., MANO T., CHAN C.C., FUKUDA M., SHIMIDA H. (1990): "*Thrombin stimulates the proliferation of human retinal glial cells*". *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 228: 169-173.
- 237.- QUIGLEY H.A. (1977): "*Gap junctions between optic nerve head astrocytes*". *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 16: 582-585.
- 238.- QUIGLEY H.A., GUY J., ANDERSON D.R. (1979a): "*Blockade of rapid axonal transport. Effect of intraocular pressure elevation in primate optic nerve*". *Archives of Ophthalmology*, 97: 525-531.
- 239.- QUIGLEY H.A., GREEN W.R. (1979b): "*The histology of human glaucoma cupping and optic nerve damage: clinicopathologic correlation in 21 eyes*". *Transactions of American Academy of Ophthalmology and Otolaryngology*, 10: 1803-1830.
- 240.- QUIGLEY H.A., ADDICKS E.M. (1981a): "*Regional differences in the structure of the lamina cribosa and their relation to glaucomatous optic nerve damage*". *Archives of Ophthalmology*, 99: 137-143.
- 241.- QUIGLEY H.A., ADDICKS E.M., GREEN W.R., MAUMENEE A.E. (1981b): "*Optic nerve damage in human glaucoma. II. The site of injury and susceptibility to damage*". *Archives of Ophthalmology*, 99: 635-649.
- 242.- QUIGLEY H.A. (1985): "*The pathogenesis of optic nerve damage in glaucoma*". En: *Symposium on the laser in ophthalmology and glaucoma update* (H. Beckman; D.G. Campbell; F.A.Jr. L'Esperance, M.A. Mainster; H.A. Quigley; R.N. Shaffer; R.J. Simmons; R.C. Watzke, J. Wise, Eds.); págs: 111-128. The C.V. Mosby Company. St. Louis.
- 243.- QUIGLEY H.A., BROWN A.E., DORMAN-PEASE M.E. (1991a): "*Alterations in elastin of the optic nerve head in human and experimental glaucoma*". *British Journal of Ophthalmology*, 75: 552-557.

- 244.- QUIGLEY H.A., DORMAN-PEASE M.E., BROWN A.E. (1991b): *"Quantitative study of collagen and elastin of the optic nerve head and sclera in human and experimental monkey glaucoma"*. Current Eye Research, 10: 877-888.
- 245.- QUITSCHKE W., JONES P.S., SCHECHTER N. (1985a): *"Survey of intermediate filament proteins in optic nerve and spinal cord: evidence for differential expression"*. Journal of Neurochemistry, 44: 1465-1476.
- 246.- QUITSCHKE W., SIBONY P., SCHECHTER N. (1985b): *"Variable expression of intermediate filament proteins during embryonic development of human optic nerve"*. Experimental of Neurology, 90: 204-214.
- 247.- RADIUS R.L., ANDERSON D.R. (1979a): *"The mechanism of disc pallor in experimental optic atrophy. A fluorescein angiographic study"*. Archives of Ophthalmology, 97: 532-535.
- 248.- RADIUS R.L., ANDERSON D.R. (1979b): *"The histology of retinal nerve fiber layer bundles and bundle defects"*. Archives of Ophthalmology, 97: 948-950
- 249.- RADIUS R.L., ANDERSON D.R. (1979c): *"The course of axons through the retina and optic nerve head"*. Archives of Ophthalmology, 97: 1154-1158.
- 250.- RADIUS R.L. (1981a): *"Regional specificity in anatomy at the lamina cribosa"*. Archives of Ophthalmology, 99: 478-480.
- 251.- RADIUS R.L., ANDERSON D.R. (1981b): *"Rapid axonal transport in primate optic nerve. Distribution of pressure-induced interruption"*. Archives of Ophthalmology, 99: 650-654.
- 252.- RADIUS R.L., GONZALES M. (1981c): *"Anatomy of the lamina cribosa in human eyes"*. Archives of Ophthalmology, 99: 2159-2162.
- 253.- RADIUS R.L., BADE B. (1982): *"Axonal transport interruption and anatomy at the lamina cribosa"*. Archives of Ophthalmology, 100: 1661-1664.

- 254.- RADIUS R.L., PEDERSON J.E. (1984): "*Laser-induced primate glaucoma. II. Histopathology*". Archives of Ophthalmology, 102: 1693-1698.
- 255.- RAFF M.C., ABNEY E.R., COHEN J., LINDSAY R., NOBLE M. (1983a): "*Two types of astrocytes in cultures of developing rat white matter: differences in morphology, surface gangliosides, and growth characteristics*". Journal of Neuroscience, 3: 1289-1300.
- 256.- RAFF M.C., MILLER R.H., NOBLE M. (1983b): "*Glial cell lineages in the rat optic nerve*". Colds Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, 48: 569-572.
- 257.- RAFF M.C., MILLER R.H., NOBLE M. (1983c): "*A glial progenitor cell that develops in vitro into an astrocyte or an oligodendrocyte depending on culture medium*". Nature, 303: 390-396.
- 258.- RAFF M.C., ABNEY E.R., MILLER R.H. (1984a): "*Two glial cell lineages diverge prenatally in rat optic nerve*". Developmental Biology, 106: 53-60.
- 259.- RAFF M.C., WILLIAMS B.P., MILLER R.H. (1984b): "*The in vitro differentiation of a bipotential glial progenitor cell*". EMBO Journal, 3: 1857-1864.
- 260.- RAFF M.C., ABNEY E.R., FOK-SEANG J. (1985): "*Reconstitution of a developmental clock in vitro: a critical role for astrocytes in the timing of oligodendrocyte differentiation*". Cell, 42: 61-69.
- 261.- RAFF M.C., TEMPLE S., FFRENCH-CONSTANT C. (1987): "*Glial cell development and function in the rat optic nerve*". Progress in Brain Research, 71: 435-438.
- 262.- RAFF M.C., LILLIEN L.E., RICHARDSON W.D., BURNE J.F., NOBLE M.D. (1988): "*Platelet-derived growth factor from astrocytes drives the clock that times oligodendrocyte development in culture*". Nature, 333: 562-565.
- 263.- RAFF M.C. (1989): "*Glial cell diversification in the rat optic nerve*". Science, 243: 1450-1455.

- 264.- RAINE C.S. (1984): "*On the association between perinodal astrocyte processes and the node of Ranvier in the CNS*". Journal of Neurocytology, 13: 21-27.
- 265.- RAKIC P. (1981): "*Neuronal-glia interaction during brain development*". Trends in Neuroscience, 4: 184-187.
- 266.- RAMÍREZ A.I. (1994): "*Estudio inmunohistoquímico de los astrocitos de la retina humana*". Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
- 267.- RAMÍREZ J.M. (1983): "*Estudio de la vascularización de la papila del nervio óptico por el método de diafanización y relleno con polímeros de baja densidad*". Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
- 268.- RAMÍREZ J.M., TRIVIÑO A., GARCÍA-SÁNCHEZ J. (1984): "*Vascularización de la cabeza del nervio óptico en el hombre*". Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología, 46: 413-426.
- 269.- RAMÍREZ J.M., TRIVIÑO A., GARCÍA-SÁNCHEZ J. (1985): "*Análisis morfológico y cuantitativo de las alteraciones vasculares del disco óptico en el glaucoma experimental*". Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología, 49: 81-86.
- 270.- RAMÍREZ J.M., TRIVIÑO A., GARCÍA-SÁNCHEZ J. (1986): "*Análisis de las alteraciones producidas en el glaucoma experimental a nivel de la cabeza del nervio óptico: estudio histológico*". Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología, 51: 291-296.
- 271.- RAMÍREZ J.M., SALAZAR J.J., TRIVIÑO A., RAMÍREZ A.I., GARCÍA-SÁNCHEZ J. (1989a): "*Membranas limitantes gliales y fasciculación axonal en la cabeza del nervio óptico en el conejo*". Glaucoma, 3: 111-119.
- 272.- RAMÍREZ J.M., TRIVIÑO A. (1989b): "*Anatomofisiología del nervio óptico*". En: La circulación coroidea (F. Gómez-Ulla; F. Marín; J.M. Ramírez, A. Triviño, Eds); págs: 31-40. Edika-Med, Barcelona.

- 273.- RAMÍREZ J.M., BORREGO R., TRIVIÑO A., SALAZAR J.J., RAMÍREZ A.I., RIVERA M., GARCÍA-SÁNCHEZ J. (1991): "*Alteraciones estructurales en el edema isquémico del disco óptico*". Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología, 60: 729-734.
- 274.- RAMÍREZ J.M., TRIVIÑO A., RAMÍREZ A.I., SALAZAR J.J., GARCÍA-SÁNCHEZ J. (1994): "*Immunohistochemical study of human retinal astroglia*". Vision Research, 34: 1935-1946.
- 275.- RAMÓN MOLINER E. (1958): "*A study on neuroglia: the problem of transitional forms*". Journal of Comparative Neurology, 110: 157-171.
- 276.- RAMÓN Y CAJAL S. (1892): "*La rétine des vertébrés*". La Cellule, 9: 121-225.
- 277.- RAMÓN Y CAJAL S. (1899): "*Textura del Sistema Nervioso del hombre y de los vertebrados. Estudios sobre el plan estructural y composición histológica de los centros nerviosos adicionados de consideraciones fisiológicas fundadas en los nuevos descubrimientos*". Tomo I, Capítulo VIII: Neuroglía; págs: 174-195. Imprenta y Librería de Nicolás Moya, Madrid.<sup>1</sup>
- 278.- RAMÓN Y CAJAL S. (1904): "*Textura del Sistema Nervioso del hombre y de los vertebrados. Estudios sobre el plan estructural y composición histológica de los centros nerviosos adicionados de consideraciones fisiológicas fundadas en los nuevos descubrimientos*". Tomo II, Primera Parte, Capítulo XXIX: Sistema Visual. Órgano receptor de la excitación visual o retina, págs: 582-608. Imprenta y Librería de Nicolás Moya, Madrid.
- 279.- RAMÓN Y CAJAL S. (1911): "*Histologie du Système Nerveux de l'homme et des vertébrés*". Vol. II; Chapitre XV: Appareil visuel. Rétine ou organe récepteur de l'excitation visuelle; págs: 296-325. A. Maloine. Paris.

---

<sup>1</sup> La obra consultada para la realización de este estudio fue la Edición Fascimil publicada en 1993 por el Instituto de Neurociencias de la Universidad de Alicante, Gráficas Vidal-Leuka, Alicante.

- 280.- RANSOM B.R., BUTT A.M., BLACK J.A. (1991): "*Ultrastructural identification of HRP-injected oligodendrocytes in the intact rat optic nerve*". *Glia*, 4: 37-45.
- 281.- RAVIOLA G. (1977): "*The structural basis of the blood-ocular barriers*". *Experimental Eye Research*, 25 (Suppl.): 27-64.
- 282.- RAYMOND P.A., EASTER S.S. (1983): "*Postembryonic growth of the optic tectum in the goldfish. I. Localization of germinal cells and numbers of neuron produced*". *Journal of Neuroscience*, 3: 1077-1091.
- 283.- RAYNAUD C., MILIN-CIONI A.V. (1992): "*La cellule retino-thalamique*". En: *Biophtalmologie* (P. Sole, H. Dalens, C. Gentou, Eds.). Livre VI, Le Systeme Nerveux, Chapitre IV, págs: 135-172. Masson. Paris.
- 284.- REEH M.J. (1981): "*The optic nerve: definition and description*". En: *Ophthalmic anatomy. A manual with some clinical applications* (M.J. Reeh, J.L. Wobig, J.D. Wirtschafter, Eds.), Part 2: The globe; págs: 146-151. American Academy of Ophthalmology, California.
- 285.- REHNBERG M., AMMITZBÖLL T., TENGROTH B. (1987): "*Collagen distribution in the lamina cribosa and the trabecular meshwork of the human eyes*". *British Journal of Ophthalmology*, 71: 886-892.
- 286.- REIER P.J. (1986): "*Gliosis following CNS injury: the anatomy of astrocytic scars and their influences on axonal elongation*". En: *Astrocytes* (S. Fedoroff, A. Vernadakis, Eds.); Vol. 3: Cell biology and pathology of astrocytes; págs: 263-324. Academic Press INC. Orlando.
- 287.- RHODES R.H. (1982): "*Development of the optic nerve*". En: *Ocular anatomy, embriology and teratology* (F.A. Jakobiec, Eds.), págs: 601-638. Harper and Row, Publishers, Philadelphia.
- 288.- RICHARDSON P.M., ISSA W.M.K., SHEMIE S. (1982): "*Regeneration and retrograde degeneration of axons in the rat optic nerve*". *Journal of Neurocytology*, 11: 949-966.

- 289.- RISAU W., WOLBURG H. (1990): "*Development of the blood-brain barrier*". Trends in Neuroscience, 13. 174-178.
- 290.- RODRÍGUEZ-PERALTA L.A. (1966): "*Hematic and fluid barriers in the optic nerve*". Journal of Comparative Neurology, 126: 109-118.
- 291.- ROOTMAN J., BUTLER D. (1980): "*Ischemic optic neuropathy. A combined mechanism*". British Journal of Ophthalmology, 64: 826-831.
- 292.- ROOTS B.I. (1986): "*Phylogenetic development of astrocytes*". En: Astrocytes (S. fedoroff, A. Vernadakis, Eds.); vol. 1: Development, morphology, and regional specialization of astrocytes; págs: 1-34. Academic Press. Orlando.
- 293.- ROTHMAN S.M. (1985): "*The neurotoxicity of excitatory aminoacids is produced by passive chloride influx*". Journal of Neuroscience, 4: 1884-1891.
- 294.- RUNGGER-BRÄNDLE E., ACHTSTATTER T., FRANKE W.W. (1989): "*An epithelium-type cytoskeleton in a glial cell: astrocytes of amphibian optic nerves contain cytokeratin filaments and are connected by desmosomes*". Journal of Cell Biology, 109: 705-716.
- 295.- SALAZAR J.J. (1989): "*Estudio de las relaciones vaso-gliales en el nervio óptico del conejo albino (Oryctolagus cuniculus)*". Tesina de Licenciatura. Universidad Complutense de Madrid.
- 296.- SALZMANN M. (1912): "*The anatomy and histology of the human eyeball in the normal state its development and senescence*". (Translation by E.V.L. Brown). Chapter VIII: The optic nerve (nervus opticus); págs: 88-107. The University of Chicaco Press, Chicago.
- 297.- SARAUX H., LEMASSON C., OFFRET H., RENARD G. (1985): "*Anatomía e histología del ojo*". Masson S.A., Barcelona.
- 298.- SAWAGUCHI S., YUE B.Y.J.T., FURUCHI T., IWATA K., KAIYA T. (1992): "*Sulfated proteoglycans in the human lamina cribosa*". Investigative Ophthalmology and Visual Science, 33: 2388-2398.

- 299.- SCHNITZER J., SCHACHNER M. (1982): "*Cell type specificity of neural cell surface antigen recognized by monoclonal antibody A2B5*". Cell Tissue Research, 224: 625-636.
- 300.- SCHWAB M. (1989): "*Neurite growth inhibitors in the mammalian central nervous system*". International Brain Research Organization NEWS, 17: 7.
- 301.- SENELICK R.C. (1982): "*Optic nerve*". En: Biomedical Foundations of Ophthalmology (T.D. Duane, E.A. Jaeger, Eds.); Vol. II, págs: 1-34. Harper & Row Publishers, Philadelphia.
- 302.- SHAKIB M. CUNHA-VAZ J.G. (1966): "*Studies on the permeability of the blood-retinal barrier. IV. Junctional complexes of the retina vessels and their role in their permeability of blood-retinal barrier*". Experimental Eye Research, 5: 229-234.
- 303.- SHAFFER R.N., (1969a): "*The role of the astroglial cells in glaucomatous disc cupping*". Documenta Ophthalmologica, 26: 516-525.
- 304.- SHAFFER R.N., HETHERINGTON J. (1969b): "*The glaucomatous disc in infants. A suggested hypothesis for disc cupping*". Transactions of the American Academy of Ophthalmology and Otolaryngology, 73: 929-935.
- 305.- SIDMAN R.L., WESSELS N.K. (1975): "*Control of direction of growth during elongation of neurites*". Experimental Neurology, 48: 237-251.
- 306.- SKOFF R.P., VAUGHN J.E. (1971): "*An autoradiographic study of cellular proliferation in degenerating rat optic nerve*". Journal of Comparative Neurology, 141: 133-156.
- 307.- SKOFF R.P. (1975): "*The fine structure of pulse labeled (3-H-thymidine cells) in degenerating rat optic nerve*". Journal of Comparative Neurology, 161: 595-611.
- 308.- SKOFF R.P., PRICE D.L., STOCKS A. (1976a): "*Electron microscopic autoradiographic studies of gliogenesis in rat optic nerve. I. Cell proliferation*". Journal of Comparative Neurology, 169: 291-312.

- 309.- SKOFF R.P., PRICE D.L., STOCKS A. (1976b): "*Electron microscopic autoradiographic studies of gliogenesis in rat optic nerve. II. Time of origin*". Journal of Comparative Neurology, 169: 313-334.
- 310.- SKOFF R.P., TOLAND D., NAST E. (1980): "*Pattern of myelination and distribution of neuroglial cells along the developing optic system of the rat and rabbit*". Journal of Comparative Neurology, 191: 237-253.
- 311.- SKOFF R.P., KNAPP P.E., BARTLETT W.P. (1986): "*Astrocytic diversity in the optic nerve: a cytoarchitectural study*". En: Astrocytes (S. Fedoroff, A. Vernadakis, Eds.). Vol. 1: Development, morphology, and regional specialization of astrocytes; págs: 269-291. Academic Press, INC. Orlando.
- 312.- SKOFF R.P. (1990): "*Gliogenesis in rat optic nerve: astrocytes are generated in a single wave before oligodendrocytes*". Developmental Biology, 139: 149-168.
- 313.- SO K.F., AGUAYO A.J. (1985): "*Lengthy regrowth of cut axons from ganglion cells after peripheral nerve transplantation into the retina of adults rats*". Brain Research, 328: 349-354.
- 314.- SONTHEIMER H., MINTURN J.E., BLACK J.A., RANSOM B.R., WAXMAN S.G. (1991): "*Two types of Na(+)-currents in cultured rat optic nerve astrocytes: changes with time in culture and with age of culture derivation*". Journal of Neuroscience Research, 30: 275-287.
- 315.- SPAETH G.L. (1978): "*Morphological damage of the optic nerve*". En: Glaucoma: Conceptions of a disease. Pathogenesis, diagnosis, therapy (K. Heilmann, K.T. Richardson, Eds.); págs: 138-156. Georg Thieme Publishers. Stuttgart.
- 316.- SPAETH G.L. (1994): "*Reversible changes in the optic disc and visual field in glaucoma*". Current Opinion in Ophthalmology, 5(II): 36-45.
- 317.- SPERRY R.W. (1944): "*Optic nerve regeneration with recovery of vision in anurans*". Journal of Neurophysiology, 7: 57-69.

- 318.- STAFFORD C.A.; SHEHAB SA., NONA S.M., CRONLY-DILLON J.R. (1990): "*Expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in goldfish optic nerve following injury*". *Glia*, 3: 33-42.
- 319.- STERNBERGER L.A., HARDY P.H., CUCULIS J.J., MEYER H.G. (1970): "*The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry. Preparation and properties of soluble antigen antibody complex (horseradish peroxidase-antihorseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes*". *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 18: 315-333.
- 320.- STEWART P.A., COOMBER B.L. (1986): "*Astrocytes and the blood-brain barrier*". En: *Astrocytes* (S. Fedoroff, A. Vernadakis, Eds.); Vol. 1: Development, morphology and regional specialization of astrocytes; págs: 311-328. Academic Press INC, Orlando.
- 321.- STREIT W.J. (1990): "*An improved staining method for rat microglial cells using the lectin from Griffonia simplicifolia (GSA I-B<sub>4</sub>)*". *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 38: 1683-1686.
- 322.- STURROCK R.R. (1975): "*A light and electron microscopic study of proliferation and maturation of fibrous astrocytes in the optic nerve of the human embryo*". *Journal of Anatomy*, 119: 223-234.
- 323.- STURROCK R.R. (1984): "*Microglia in the human embryonic optic nerve*". *Journal of Anatomy*, 139: 81-91.
- 324.- SUÁREZ I., FERNÁNDEZ B. (1983): "*Structure and Ultrastructure of the external glial layer in the hypothalamus*". *Journal für Hirnforschung*, 24: 99-109.
- 325.- SUÁREZ I., RAFF M.C. (1989): "*Subpial and perivascular astrocytes associated with nodes of Ranvier in the rat optic nerve*". *Journal of Neurocytology*, 18: 577-582.
- 326.- TANSLEY K. (1956): "*Comparison of the lamina cribosa in mammalian species with good and with indifferent vision*". *British Journal of Ophthalmology*, 40: 178-182.

- 327.- TENGROTH B., AMMITZBOLL T. (1984): "*Changes in the content and composition of collagen in the glaucomatous eye - basis for a new hypothesis for the genesis of chronic open angle glaucoma. A preliminary report*". Acta Ophthalmologica, 62: 999-1008.
- 328.- TENNEKOON G.I.; KISHIMOTO Y., SINGH I., NONAKA G., BOURRE J.M. (1980): "*The differentiation of oligodendrocytes in the rat optic nerve*". Developmental Biology, 79: 149-158.
- 329.- TERR L.I., WEINER L.P. (1983): "*Light-microscopic and microspectrofluorometric characterization of porphyrin-containing astrocytes in mouse optic nerve*". Anatomical Record, 205: 355-361.
- 330.- THALE A., TILLMANN B. (1993): "*The collagen architecture of the sclera SEM and immunohistochemical studies*". Annals of Anatomy, 175: 215-220.
- 331.- THANOS S., THIEL H.J. (1990): "*Regenerative and proliferative capacity of adult human retinal cells in vitro*". Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology, 228: 369-376.
- 332.- THOMAS W.E. (1992): "*Brain macrophages: evaluation of microglia and their functions*". Brain Research Review, 17: 61-74.
- 333.- TRIMMER P.A.; WUNDERLICH R.E. (1990): "*Changes in astroglial scar formation in rat optic nerve as a function of development*". Journal of Comparative Neurology, 296: 359-378.
- 334.- TRIVIÑO A., RAMÍREZ J.M., GARCÍA-SÁNCHEZ J. (1984): "*Primeras aportaciones sobre las modificaciones vasculares en el disco óptico del conejo, tras la provocación de glaucoma experimental con alfa-quimotripsina*". Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología, 46: 427-432.
- 335.- TRIVIÑO A., RAMÍREZ J.M., GARCÍA-SÁNCHEZ J. (1985): "*Oclusiones arteriales experimentales con microesférulas de Ballotini a nivel del disco óptico. Primeras aportaciones*". Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología, 48: 221-224.

- 336.- TRIVIÑO A., BORREGO R., RAMÍREZ J.M., RAMÍREZ A.I., ANDRES M.A., SALAZAR J.J., GARCÍA-SÁNCHEZ J.: "*Evolución en el tiempo de las alteraciones morfológicas en la neuropatía óptica isquémica experimental*". Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología (en prensa).
- 337.- TSO M.O.M., SHIH C.Y., McLEAN M.I.W. (1975): "*Is there a blood-brain barrier at the optic nerve head?*". Archives of Ophthalmology, 93: 815-825.
- 338.- TSUKAHARA I., YAMASHITA H. (1975). "*An electron microscopic study of the blood-optic nerve and fluid-optic nerve barrier*". Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology, 196: 239-246.
- 339.- VACA K., WENDST E. (1992): "*Divergent effects of astroglial and microglial secretions on neuron growth and survival*". Experimental Neurology, 118: 62-72.
- 340.- VAUGHN J.E., PETERS A. (1967a): "*Electron microscopy of classically stained astrocytes*". Journal of Comparative Neurology, 131: 143-154.
- 341.- VAUGHN J.E., PETERS A. (1967b): "*Electron microscopy of the early postnatal development of fibrous astrocytes*". American Journal of Anatomy, 121: 131-152.
- 342.- VAUGHN J.E. (1968): "*A third neuroglial cell type. An electron microscopic study*". Journal of Comparative Neurology, 133: 269-288.
- 343.- VAUGHN J.E., HINDS P.L., SKOFF R.P. (1970a): "*Electron microscopic studies of Wallerian degeneration in rat optic nerves. I. The multipotential glia*". Journal of Comparative Neurology, 140: 175-206.
- 344.- VAUGHN J.E., PEASE D.C. (1970b): "*Electron microscopic studies of Wallerian degeneration in rat optic nerves. II. Astrocytes, oligodendrocytes and adventitial cells*". Journal of Comparative Neurology, 140: 207-226.
- 345.- VIBULSRETH S., HEFTI F., GINSBERG M.D., DIETRICH W.D., BUSTO R. (1987): "*Astrocytes protect cultured neurons from degeneration induced by anoxia*". Brain Research, 422: 303-311.

- 346.- VIDAL-SANZ M., BRAY G.M., VILLEGAS-PÉREZ M.P., THANOS S., AGUAYO A.J. (1987): "*Axonal regeneration and synapse formation in the superior colliculus by retinal cells in the adult rat*". Journal of Neuroscience, 7: 2894-2909.
- 347.- VILLEGAS-PÉREZ, M.P (1986): "*Efectos de la axotomía y de los injertos de Sistema Nervioso Periférico sobre las células ganglionares de la retina de la rata adulta*". Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
- 348.- VILLEGAS-PÉREZ M.P., VIDAL-SANZ M., BRAY G.M., AGUAYO A.J. (1988): "*Influences of peripheral nerve grafts on the survival and regrowth of axotomized retinal ganglion cells in adult rats*". Journal of Neuroscience, 8: 265-280.
- 349.- VIRCHOW R. (1846): "*Über der Granulierte ansehen der Wanderungen der Gehirnaventrikel*". Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und ihre Grenzgebiete, 3: 242-250. (Citado por Wendell-Smith, 1966).
- 350.- WAXMAN S.G., BLACK J.A. (1984): "*Freeze-fracture ultrastructure of the perinodal astrocyte and associated glial junctions.*" Brain Research, 308: 77-87.
- 351.- WAXMAN S.G., RITCHIE J.M. (1985): "*Organization of ion channels in the myelinated fiber*". Science, 228: 1502-1507.
- 352.- WAXMAN S.G. (1986): "*The astrocyte as a component of the node of Ranvier*". Trends in Neuroscience, 9: 250-253.
- 353.- WAXMAN S.G., BLACK J.A., STYS P.K., RANSOM B.R. (1992): "*Ultrastructural concomitants of axonic injury and early post-anoxic recovery in rat optic nerve*". Brain Research, 574: 105-119.
- 354.- WENDELL-SMITH C.P., BLUNT M.J., BALDWIN F. (1966): "*The ultrastructural characterization of macroglial cell types*". Journal of Comparative Neurology, 127: 219-240.
- 355.- WILCZEK M. (1947): "*The lamina cribosa and its nature*". British Journal of Ophthalmology, 31: 551-565.

- 356.- WILKIN G.P., MARRIOTT D.R., CHOLEWINSKI A.J. (1992): "*Astrocyte heterogeneity*". Trends in Neuroscience, 13: 43-46.
- 357.- WIRTSCHAFTER J.D. (1975): "*Review: Optic nerve axoplasm and papilledema*". Survey of Ophthalmology, 20: 157-189.
- 358.- WIRTSCHAFTER J.D. (1981): "*The visual pathway*". En: Ophthalmic anatomy. A manual with some clinical applications (M.J. Reeh, J.L. Wobic, J.D. Wirtschafter, Eds.), Part 3: Ophthalmic neuroanatomy; págs: 155-186. American Academy of Ophthalmology, California.
- 359.- WOLBURG H., KASTNER R. (1984): "*Astroglial-axonal interrelationship during regeneration of the optic nerve in goldfish. A freeze-fracture study.*" Journal für Hirnforschung, 25: 493-504.
- 360.- WOLFF E. (1961): "*Anatomy of the eye and orbit. Including the central connections, development, and comparative anatomy of the visual apparatus*". (Fifth Ed., Revised by R.J. Last); Chater VII: The visual pathway; págs: 295-315. W.B. Saunders Company, Philadelphia.
- 361.- WOLF-HEIDEGGER G. (1954): "*Anatomía de las formaciones extrabulbares del órgano de la visión*". En: Oftalmología (M. Amsler, A. Brückner, A. Franceschetti, H. Goldmann, E.B. Streiff, Eds.), págs: 197-218. Salvat Editores S.A., Barcelona.
- 362.- WOLITZKY B.A., FAMBROUGH D.M. (1986): "*Regulation of the (Na<sup>+</sup>+K<sup>+</sup>)-ATPase in cultured chick skeletal muscle. Modulation of expression by the demand for ion transport*". Journal of Biological Chemistry, 261: 9900-9999.
- 363.- WOLSWIJK G., NOBLE M. (1989): "*Identification of an adult-specific glial progenitor cell*". Development, 105: 387-400.
- 364.- WOLSWIJK G., RIDDLE P.N., NOBLE M. (1991): "*Platelet-derived growth factor is mitogenic for O-2Adult progenitor cells*". Glia, 4: 495-503.
- 365.- WOLTER J.R. (1957): "*The human optic papilla. A demonstration of new anatomic and pathologic findings*". American Journal of Ophthalmology, 44 (Pt. II): 48-64.

- 366.- WOLTER J.R. (1961): "*Silver carbonate techniques for the demonstration of ocular histology*". En: *The structure of the eye* (G.K. Smelser, Ed.); págs: 117-138. Academic Press, New York.
- 367.- WUJEK J.R., REIER P.J. (1984): "*Astrocytic membrane morphology: differences between mammalian and amphibian astrocytes after axotomy*". *Journal of Comparative Neurology*, 222: 607-619.
- 368.- YANG J.L., NEUFELD A.H., ZORN M.B., HERNANDEZ M.R. (1993): "*Collagen Type I mRNA levels in cultured human lamina cribosa cells: effects of elevated hydrostatic pressure*". *Experimental Eye Research*, 56: 567-574.
- 369.- ZEIMER R.C., EDWARD D.P. (1992): "*Structural changes in the lamina cribosa associated with glaucoma*". *Glaucoma*, 14: 182-186.
- 370.- ZHAO (1987): "*Microangioarchitecture of optic papilla*". *Jpn. J. Ophthalmol.*, 31: 147-159.
- 371.- ZIMMERMAN L.E. (1956): "*Histology and general pathology of the optic nerve*". *Transactions of the American Academy of Ophthalmology and Otolaryngology*, 60: 14-30.
- 372.- ZIMMERMAN L.E., DE VENECIA G., HAMASAKID.I. (1967): "*Pathology of the optic nerve in experimental acute glaucoma*". *Investigative Ophthalmology*, 6: 109-125.
- 373.- ZINN K.M. (1973): "*Transmission electron microscopy*". En: *Ocular fine structure for the clinician* (K.M. Zinn, Ed.), *International Ophthalmology Clinics*, 13: 3-17. Little, Brown and Company, Boston.