



ABRIR RESULTADOS

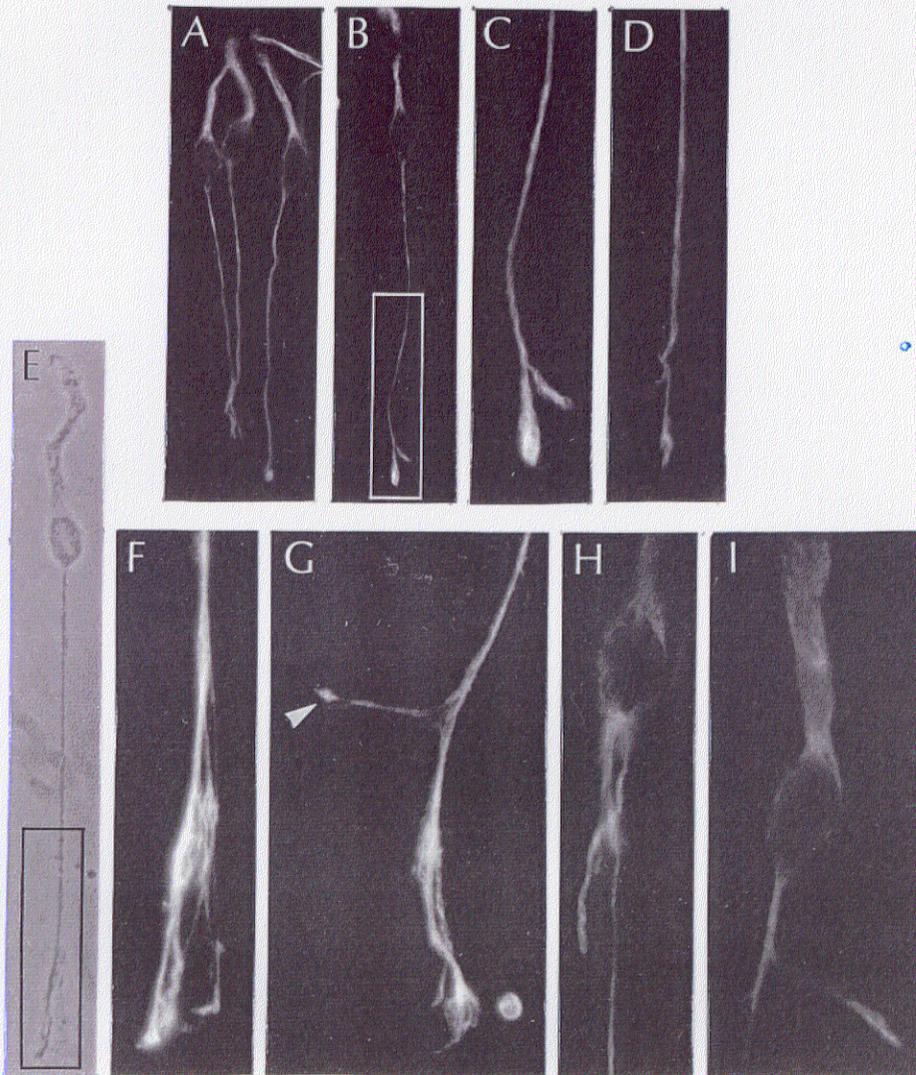


Figura 4.15

Algunos ejemplos de células de Müller marcadas con 3CB2 en E12 (A-D) y E15 (E-I). A: grupo de células de Müller con morfología bipolar simple, en fase 1 de diferenciación, con su prolongación vítrea sin ramificar. No aparece marcado ni se aprecia por contraste de fases (no mostrado) el *sprouting* generalizado característico de esta fase; B: célula de Müller en fase 2 de diferenciación. Una ampliación de la prolongación vítrea ramificada (zona en el recuadro) se muestra en C; D: detalle de la porción distal de la prolongación vítrea de una célula de Müller en fase 2; E: fotografía en contraste de fases de célula de Müller en fase 2. Una ampliación de la parte distal de la prolongación vítrea (zona en el recuadro) se muestra en F, marcada con 3CB2; G: porción distal de la prolongación vítrea de una célula de Müller en fase 2; la **cabeza de flecha** señala una estructura con claro aspecto de cono de crecimiento en el extremo de una prolongación; H e I: células de Müller en fase 3 de diferenciación mostrando la emisión de prolongaciones a partir del polo vítreo del soma (H) o de zonas de la prolongación vítrea próximas a él (I). En I se observa, también, la prolongación ventricular, marcada con 3CB2. Aumentos: A, B y E: 650x; C, D, F, G, H e I: 1625x.

En la figura 4.15 B-D mostramos células en fase 2 de diferenciación del estadio E12 que indican que la primera prolongación lateral que emite la célula a nivel de CCG o CFNO está marcada con 3CB2. A menudo estas prolongaciones terminan en pequeños abultamientos, similares a conos de crecimiento, indicativos de que crecen por algún mecanismo que involucra a estas estructuras. La figura 4.15 E-G indica claramente que no sólo la primera prolongación, sino también otras que salen de la porción distal de la prolongación vítrea más proximales al soma, también se marcan con 3CB2 y crecen mediante conos de crecimiento (figura 4.15, cabeza de flecha en G). Las ilustraciones B-G muestran, por lo tanto, que las ramificaciones formadas en la porción distal de la prolongación vítrea en la fase 2 de diferenciación ya contienen 3CB2 desde que comienzan a emitirse. Las ilustraciones H e I muestran que las prolongaciones que emite la célula en la zona de la prolongación vítrea más cercana al soma también están marcadas, hecho que ilustramos más ampliamente en la figura 4.16 A-G. Aunque en el ápice de alguna de estas prolongaciones se puede observar un ligero engrosamiento, la mayoría de ellas suelen acabar filiformes, sin ninguna estructura que se asemeje a conos de crecimiento. Es frecuente encontrar que la zona de la que parten estas prolongaciones es ancha y de aspecto lameliforme.

En las inmunofluorescencias de pedazos de retina semidisgregados de estadios posteriores a E12 se comprueba que 3CB2 marca sólo células de Müller. La mayoría de células que aparecen en las disociaciones de retinas de E17 (figura 4.16 A-G) tienen la morfología característica de las células en la fase 3 de diferenciación. En estas células la distribución de la molécula marcada por 3CB2 es la misma que en estadios anteriores. En las ilustraciones A y B de esta figura se muestra un grupo de células en fase 3 cuyo marcaje es especialmente llamativo en los pies terminales vítreos y, en general, en la parte distal de la prolongación vítrea. La imagen en A se correlaciona estrechamente con el marcaje en secciones (Prada, F. y col., 1995), en las cuales la intensidad de marcaje de la célula es mayor en la CCG y CFNO que en el resto de las capas de la retina. Algunas de las prolongaciones de la parte distal de la prolongación vítrea no llegan a la MLI y terminan en estructuras similares a conos de crecimiento (figura 4.16, cabeza de flecha en A, B). Las ilustraciones C-G muestran células en fase 3, en las cuales se observa que las prolongaciones que se originan en el polo vítreo del soma de la célula (flecha en C, D, E), o en la porción de la prolongación vítrea proximal al soma (flecha en F) contienen 3CB2 desde el inicio de su formación, y son mayoritariamente filiformes, dando una imagen muy diferente a la de

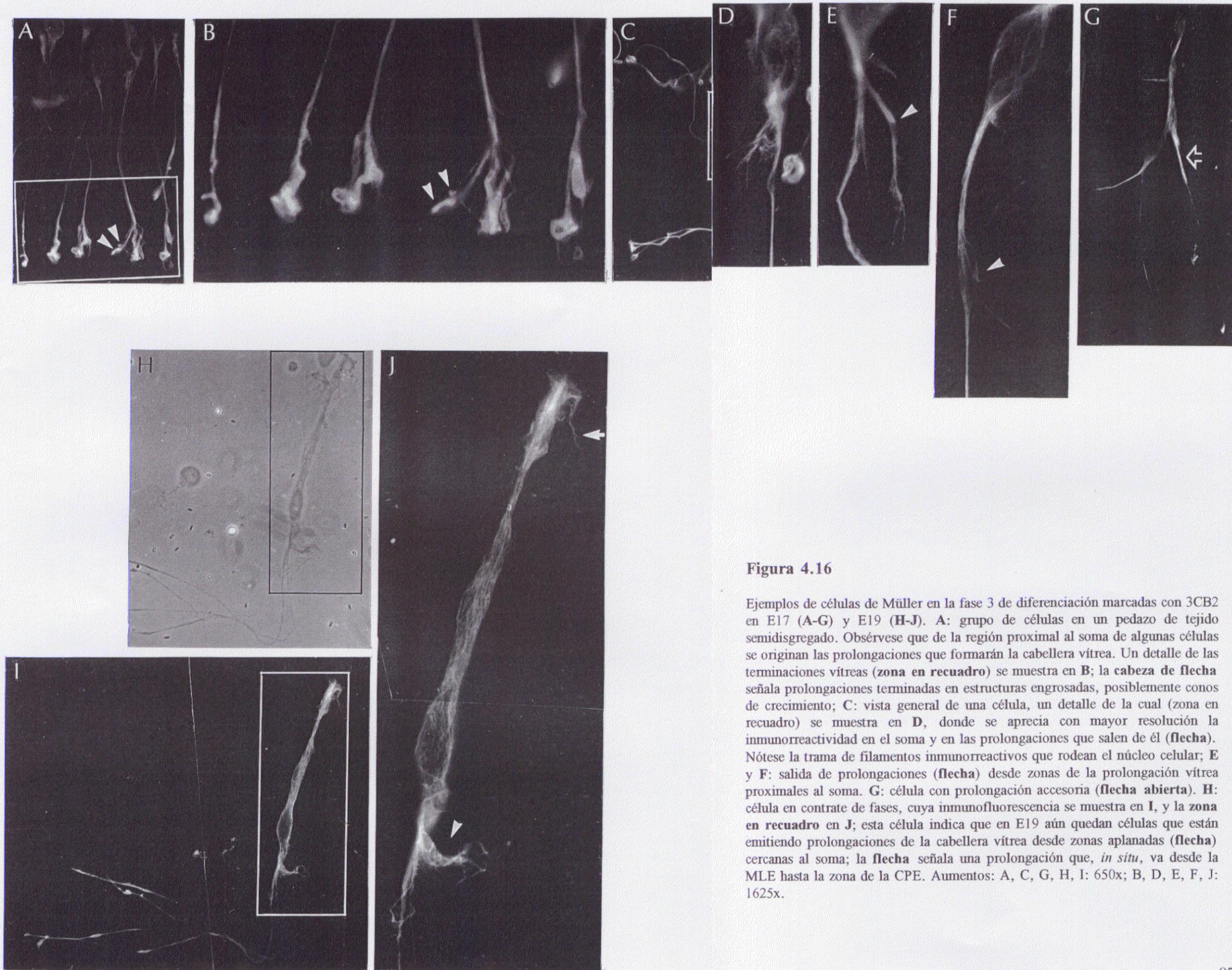


Figura 4.16

Ejemplos de células de Müller en la fase 3 de diferenciación marcadas con 3CB2 en E17 (A-G) y E19 (H-J). **A:** grupo de células en un pedazo de tejido semidisgregado. Obsérvese que de la región proximal al soma de algunas células se originan las prolongaciones que formarán la cabellera vítrea. Un detalle de las terminaciones vítreas (**zona en recuadro**) se muestra en **B**; la **cabeza de flecha** señala prolongaciones terminadas en estructuras engrosadas, posiblemente conos de crecimiento; **C:** vista general de una célula, un detalle de la cual (**zona en recuadro**) se muestra en **D**, donde se aprecia con mayor resolución la inmunoreactividad en el soma y en las prolongaciones que salen de él (**flecha**). Nótese la trama de filamentos inmunoreactivos que rodean el núcleo celular; **E** y **F:** salida de prolongaciones (**flecha**) desde zonas de la prolongación vítrea proximales al soma. **G:** célula con prolongación accesoria (**flecha abierta**). **H:** célula en contraste de fases, cuya inmunofluorescencia se muestra en **I**, y la **zona en recuadro** en **J**; esta célula indica que en E19 aún quedan células que están emitiendo prolongaciones de la cabellera vítrea desde zonas aplanadas (**flecha**) cercanas al soma; la **flecha** señala una prolongación que, *in situ*, va desde la MLE hasta la zona de la CPE. Aumentos: A, C, G, H, I: 650x; B, D, E, F, J: 1625x.

las prolongaciones que crecen en la porción distal de la prolongación vítrea.

También se observa marcaje con 3CB2 en la estructura en "T" de la porción distal de la prolongación ventricular de las células en fase 3 (no mostrado), así como en la prolongación accesoria que se observa en algunas células (figura 4.16, flecha abierta en G), la cual se origina en la prolongación ventricular.

La disgregación de retinas de E19 proporciona una mezcla de células en fase 3 avanzada y de células con formas adultas. El estudio de las formas en fase 3 en este estadio (figura 4.16 H-J) corrobora las observaciones en estadios anteriores. 3CB2 marca las prolongaciones en crecimiento que se originan en el polo vítreo del soma o en la porción proximal a él de la prolongación vítrea, así como el extremo ventricular, e incluso prolongaciones que parten de la MLE hacia la CPE (4.15, flecha fina en J). En este estadio el marcaje de 3CB2 se observa formando una trama de filamentos dispuestos longitudinalmente por toda la prolongación ventricular, el soma, las prolongaciones lameliformes de la porción proximal al soma de la prolongación vítrea, de las que se

originan prolongaciones de la cabellera (figura 4.16, cabeza de flecha en J), y en pequeños engrosamientos de las prolongaciones de la cabellera (no mostrado).

En las células adultas 3CB2 marca el soma (con excepción del núcleo) y todas las prolongaciones de la célula, incluidas las ramificaciones de la prolongación ventricular (figura 4.17), con la excepción de los *microvilli* del extremo ventricular de la célula.



Figura 4.17

Células de Müller adultas marcadas con 3CB2. **A:** célula de Müller completa; **B:** extremo distal de la prolongación ventricular de otra célula; **C:** región del soma de otra diferente. Obsérvese que toda la célula está marcada, con excepción del microvilli ventricular. Nótese que en la región ventricular y en el soma se pueden identificar los filamentos. Aumentos: A: 650x; B y C: 1650x.

4.4.3 Expresión de α -tubulina y β -actina

La mayoría de preparaciones que hemos utilizado para el estudio de la expresión de α -tubulina y β -actina han sido dobles marcajes, pues nos interesaba la colocación de ambas moléculas.

En los primeros estadios, en E6 y E8, se observa un marcaje débil y generalizado en todo el neuroepitelio, que hace difícil identificar con certeza los glioblastos jóvenes. A partir de E10 ya se distinguen claramente células en fase 2 (figura 4.18), en las cuales el marcaje con anti α -tubulina presenta a la célula con un grosor menor que el marcaje con anti β -actina.

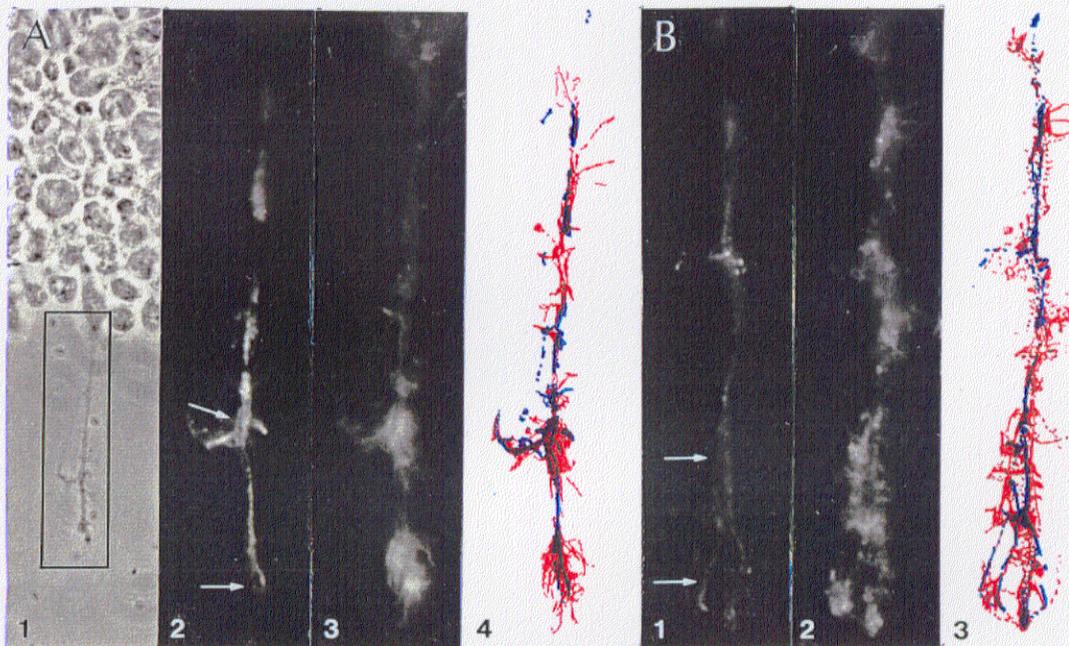


Figura 4.18

Células de Müller doblemente marcadas con anti α -tubulina y anti β -actina en E10 (A) y E12 (B). **A:** célula en E10 fotografiada por contraste de fases (1), marcada con anti α -tubulina (2) y anti β -actina (3), así como la imagen de la colocación de ambas moléculas (3) obtenida por superposición de ambos marcajes, en la cual el color azul representa la α -tubulina y el rojo la β -actina; **B:** célula de E12 marcada con anti α -tubulina (1) y anti- β -actina (2) y la colocación de ambas moléculas (3). Las flechas señalan haces longitudinales de α -tubulina en la parte distal de la prolongación vítrea. Aumentos: A1: 650x; todas las demás: 1625x.

La superposición de las imágenes obtenidas con ambos marcadores indica que la α -tubulina forma un esqueleto interno en las prolongaciones de la célula, mientras que la β -actina se distribuye por fuera de ese esqueleto. La figura 4.18 A muestra que la prolongación vítrea no está completamente marcada con α -tubulina, ya que algunas de las espículas que bordean esta prolongación no se marcan, y en las zonas en las que hay engrosamientos, sobre todo

en la parte más distal, la α -tubulina penetra en ellas formando haces longitudinales, pero no las rellena (figura 4.18, flechas). La β -actina, sin embargo, está en todas las espículas que podemos observar en contraste de fases y además revela algunas que por su pequeño grosor son difícilmente observables en contraste de fases. Ambas moléculas marcan con intensidad similar en estos estadios jóvenes.

El doble marcaje de células en fase 3 indica que la α -tubulina forma también una especie de esqueleto interno en algunas de las prolongaciones en fase de crecimiento que se originan en la porción proximal de la prolongación vítrea, mientras que la β -actina se distribuye por fuera de este esqueleto y distalmente (figura 4.19 A, B). La α -tubulina forma en estas prolongaciones haces longitudinales, al igual que hemos visto que ocurre en las prolongaciones que se originan de la porción distal de la prolongación vítrea (compárese la figura 4.19 A2 con la 4.18 B1). Esta molécula no se visualiza en las zonas lameliformes o velamentosas (figura 4.19, flechas en A y B) que hay entre las numerosas prolongaciones en crecimiento; sin embargo, la β -actina sí se encuentra en ellas. Ninguna de las dos moléculas se visualiza en la prolongación vítrea primitiva fuera de la zona proximal al soma (figura 4.19 B) ni en las prolongaciones definitivas de la cabellera vítrea (4.20 A). Sin embargo, ambas moléculas están distribuidas por la prolongación ventricular de las células en fase 3, aunque de manera diferente: mientras la α -tubulina rellena toda la prolongación ventricular con cierta intensidad, la β -actina sólo marca significativamente el extremo distal de esta prolongación (figura 4.19 C y 4.20).

En las células más diferenciadas de E19, y en adulto, ambas moléculas están distribuidas por la prolongación ventricular de las células en fase 3, pero mientras la α -tubulina rellena toda la prolongación ventricular como ocurría en E17, la β -actina sólo marca significativamente el *microvilli* del extremo distal de esta prolongación (figura 4.20, cabeza de flecha en B y C). La α -tubulina también se observa formando filamentos en torno al soma y en las prolongaciones vítreas más gruesas, entre el soma y el punto de emisión de la cabellera. La observación de la porción distal de la prolongación ventricular de células de animales adultos, por contraste de fases y marcadas con anti α -tubulina, indica que la ramificación observada en esta región de la célula por contraste de fases podría no ser tal, ya que la molécula aparece distribuida por los espacios que aparentemente se encuentran entre las prolongaciones. Esto nos indica que estas prolongaciones deben de estar comunicadas entre sí por laminaciones, al menos parcialmente, de modo que formarían un sistema de

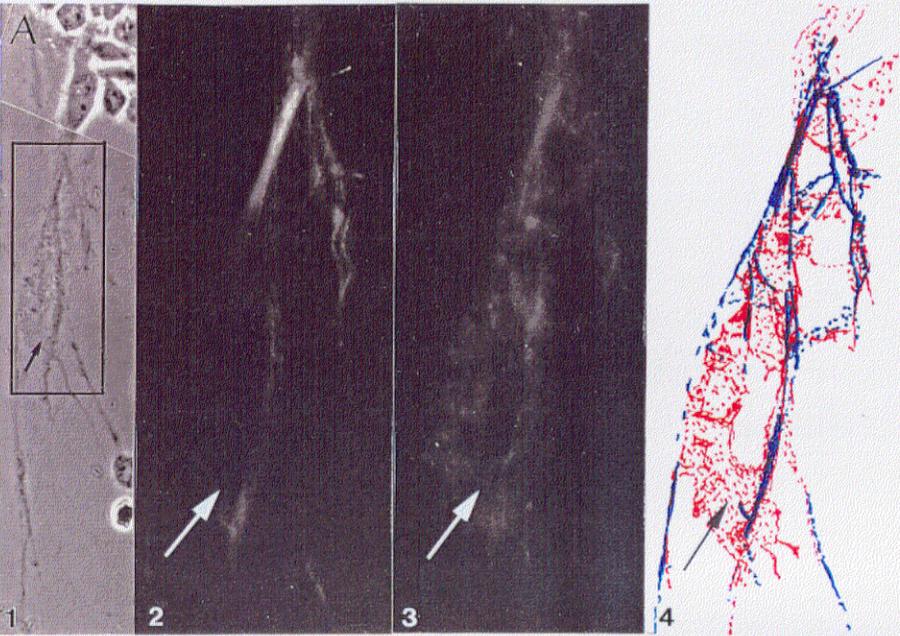


Figura 4.19
 Células de Müller doblemente marcadas con anti α -tubulina y anti β -actina E17. Los marcajes en A y corresponden a las zonas en el recuadro en A1 y B1, es decir, la región de prolongación vítrea proximal al som. A: célula fotografiada por contraste de fases (1), marcada con anti α -tubulina (2) y anti β -actina (3), así como imagen de la colocación de ambas moléculas (4), obtenida por superposición de ambos marcajes, en cual el color azul representa la tubulina y el rojo la β -actina; B: otro ejemplo con contraste de fases (1) marcaje con anti α -tubulina (2), anti-actina (3) y colocación de ambas (4). En estas dos series, las flechas señalan zonas de aspecto velamento positivo para β -actina; C: extremo distal de una prolongación ventricular marcada con anti- α -tubulina (1) y anti- β -actina (2). Aumentos: A1: 650 resto de figuras: 1625x.

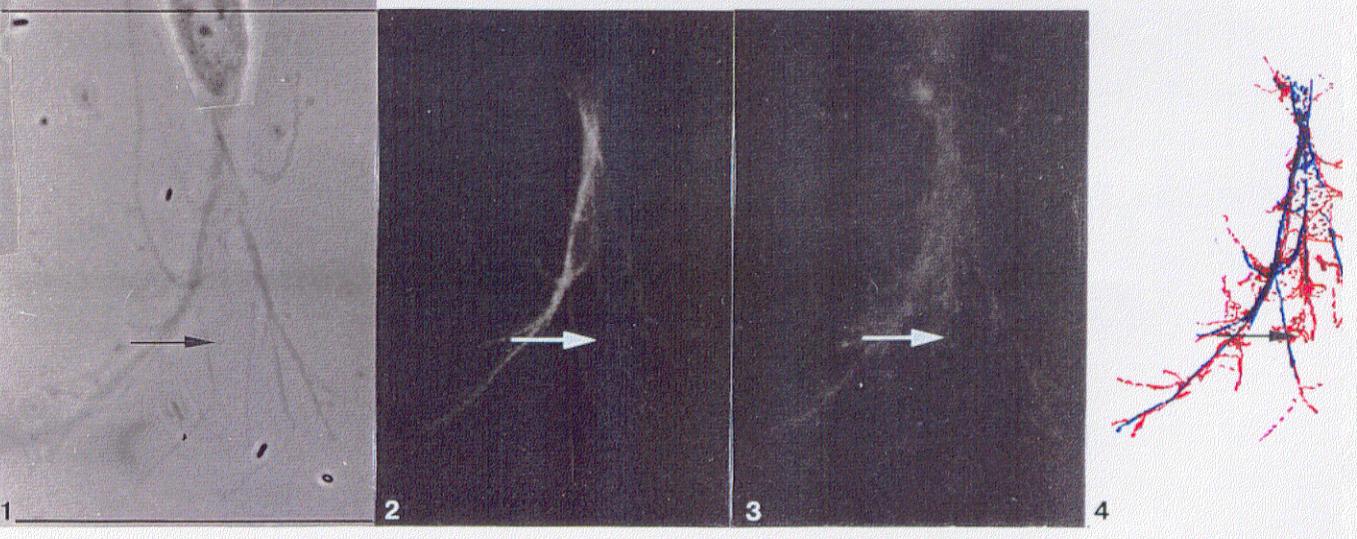
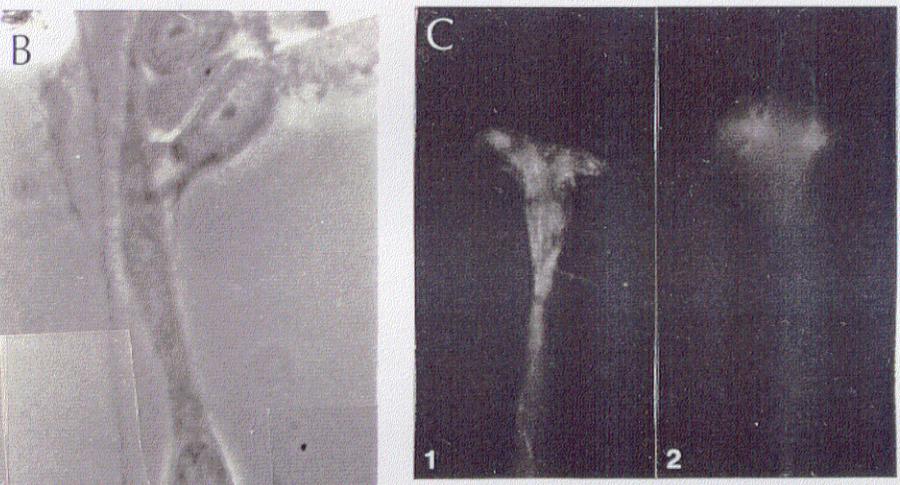
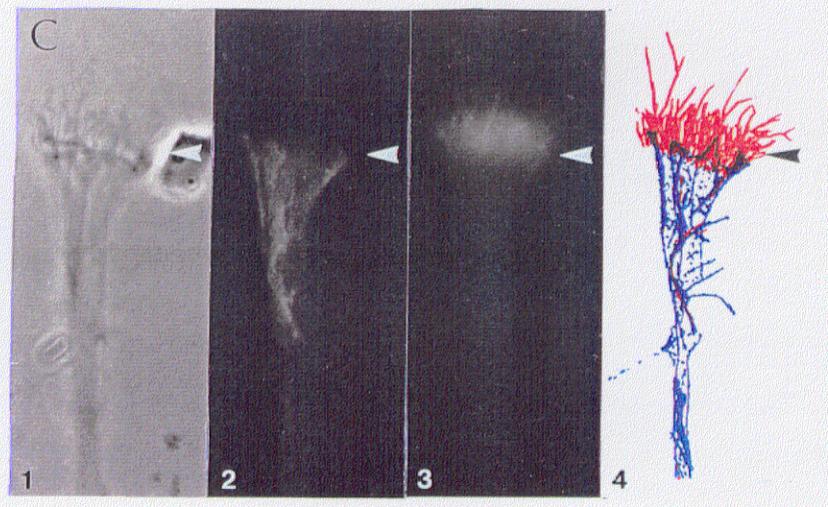
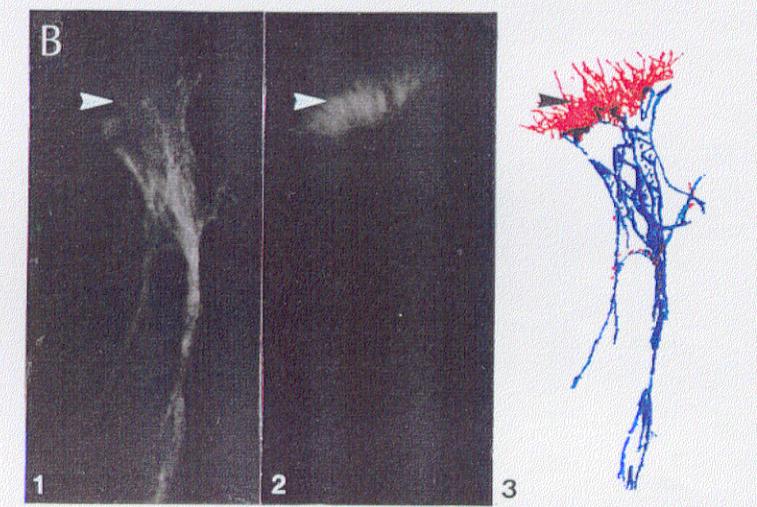
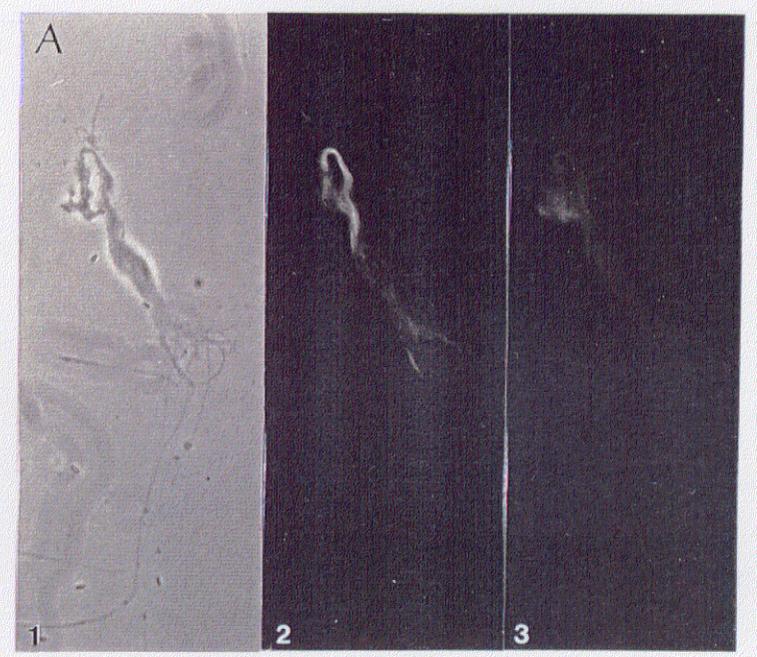


Figura 4.20
 Ejemplos de células de Müller doblemente marcadas con anti α -tubulina y anti β -actina en E19 (A y B) y en animal adulto (C). A: célula de Müller de E19, aún en fase 3, vista por contraste de fases (1) y por inmunofluorescencia para α -tubulina (2) y β -actina (3); a estos pocos aumentos el marcaje es pobre, por la poca intensidad de la luz de excitación; B: extremo de la prolongación ventricular, ya diferenciada, de una célula en E19, marcada con anti- α -tubulina (1) y anti- β -actina (2), y su superposición (3); La flecha en 1 señala una prolongación muy fina que se orienta hacia la CPE; la cabeza de flecha señala la zona donde se sitúa el microvilli, que no se marca con anti- α -tubulina; C: otro ejemplo, de una célula adulta, mostrada por contraste de fases (1), marcada con anti- α -tubulina (2) y con anti- β -actina (3) y su superposición (4). Nótese que el contraste de fases revela el microvilli (cabeza de flecha), no marcado con anti- α -tubulina y sí con anti- β -actina; la aparente ramificación que se aprecia en el contraste de fases podría no ser tal, como indica 2. Aumentos: A: 650x; B y C: 1625x.



cavidades en la zona de la CNE.

4.4.4 Resumen

Hemos estudiado por inmunocitoquímica la expresión de tres moléculas de citoesqueleto, 3CB2, α -tubulina y β -actina, en la célula de Müller en diferenciación y adulta. La expresión de 3CB2 es muy intensa durante todo el período de diferenciación de la célula, ya desde su inicio en el estadio E8, y en el adulto. La expresión de α -tubulina y β -actina, sin embargo, es débil comparativamente a lo largo de todo el desarrollo. Estas moléculas se distribuyen por la célula de diferente manera. Durante todo el período de diferenciación de la célula 3CB2 la rellena por completo, incluyendo todas las prolongaciones en formación y sus conos de crecimiento. La α -tubulina forma en las fases 1 y 2 un esqueleto interno en todas las prolongaciones de la célula, excepto en las prolongaciones transitorias cortas y finas (*sprouting*) que surgen de la prolongación vítrea primitiva y en los conos de crecimiento. La β -actina, en cambio, está distribuida por fuera de la α -tubulina en toda la célula, incluyendo el *sprouting* y los conos de crecimiento. En la fase 3 de diferenciación la α -tubulina está distribuida por la prolongación ventricular, soma y porción proximal de las prolongaciones en crecimiento que surgen del polo vítreo del soma o de la porción proximal al soma de la prolongación vítrea primitiva. En cambio, no se encuentra en las porciones velamentosas de las que surgen también prolongaciones. Es notoria la mayor concentración de α -tubulina en la prolongación ventricular que en el resto de zonas por las que se distribuye. La β -actina presenta una expresión muy débil si comparamos con 3CB2 y α -tubulina. Se distribuye por las mismas zonas que α -tubulina, concentrándose más en la porción distal de la prolongación ventricular. Además, marca las porciones velamentosas de la región de la prolongación vítrea proximal al soma, así como la mayor parte de las prolongaciones en crecimiento que parten de esta zona. En adulto, la α -tubulina está en toda la prolongación ventricular, excepto el *microvilli*, así como en el soma y las prolongaciones más gruesas de la prolongación vítrea, mientras que la β -actina sólo está en el *microvilli* que surge del extremo distal de la prolongación ventricular.

5. DISCUSSION

5.1 METODO DE DISOCIACION CELULAR

Para el estudio de la morfogénesis de un tipo celular en concreto es muy importante el número de células que se puede estudiar, puesto que la morfogénesis es un proceso que se caracteriza por el cambio constante de la forma desde que las células abandonan el ciclo celular hasta que adquieren la forma adulta. Por ésto nos pareció que la puesta a punto de una técnica de disociación que fuese eficaz disgregando neuronas y glía del SNC embrionario y adulto, preservando las formas que presentan *in situ*, sería de gran utilidad para el estudio de los distintos tipos de células del Sistema Nervioso y su morfogénesis. El método que hemos desarrollado para disgregar eficazmente las células de Müller adultas y embrionarias es una variación del utilizado por Prada, C. y col. (1991) para disgregar células de la retina del pollo fácilmente reconocibles por su morfología, y permite la observación de mucho mayor número de células que los métodos hasta ahora utilizados para el estudio de la forma celular.

El aislamiento de células del Sistema Nervioso, sobre todo de neuronas, sin alteración de la morfología que presentan *in situ*, ha sido un objetivo permanente para los neurocientíficos. Sin embargo, los métodos convencionales de disociación, tanto mecánicos como químicos o enzimáticos, pueden ser muy traumáticos (Waymouth, 1974). Estos métodos han sido utilizados principalmente como fuente de células aisladas para su posterior cultivo. Las células embrionarias que se aíslan por los métodos convencionales son redondeadas y sin prolongaciones, aunque conservan, al menos parcialmente, la capacidad de dividirse, crecer y diferenciarse en la placa de cultivo (Freshney, 1987; Banker y Goslin, 1991). Estas células no sólo no son adecuadas para estudiar la morfogénesis, sino que han de ser identificadas una vez en cultivo por medios inmunocitoquímicos. Así, Murphy y Pearce (1987), explican que "*in vitro*, el término astrocito es sinónimo de una célula del Sistema Nervioso Central que se marca con anticuerpos contra la proteína fibrilar ácida glial". Otros métodos de disociación se usan para conseguir células susceptibles de ser registradas electrofisiológicamente (entre muchos otros: Kay y Wong, 1986; Kaneda y col., 1988; Turner y col., 1995; en retina: Lam, 1972; Bader y col., 1979; Tachibana, 1981).

Aunque la mayor parte de las técnicas de disociación publicadas están dirigidas al aislamiento de neuronas, también se han publicado diversos procedimientos para aislar células de glía (Booher y Sesenbrenner, 1972; McCarthy y De Vellis, 1980; Hatten, 1981; Meller, 1987; Baorto y col., 1992, entre muchos otros), y más concretamente células de Müller de

diversos vertebrados. Algunos de estos métodos se han utilizado para obtener células de Müller para su cultivo (Moscona, 1961; Burke y Foster, 1984; Li y Sheffield, 1984; Sarthy, 1985; Drazba y Lemmon, 1990; Hicks y Courtois, 1990), para registro electrofisiológico (Reichenbach y Birkenmeyer, 1984 en conejo; Newman, 1985a en salamandra; Malchow y col., 1989 en raya, entre los métodos más empleados), para estudios bioquímicos (Sarthy y Lam, 1978 en tortuga; Trachtenberg y Packey, 1983 en conejo; Poitry-Yamate y Tsacopoulos, 1992 en cobaya) y para estudios sobre su morfología y/o ultraestructura (Sarthy y Bunt, 1982 en tortuga; Reichenbach y Birkenmeyer, 1984 y Harstad y Ringvold, 1985 en conejo). Los métodos empleados para cultivo, en general utilizan como enzima lítica la tripsina y obtienen células con una mala preservación morfológica, aunque viables. La mayoría de los otros métodos citados usan la papaína, a veces en combinación con colagenasa y hialuronidasa, y son los que consiguen células con la mejor preservación morfológica, aunque el grado de preservación dista mucho del conseguido por nuestro método, a juzgar por los resultados y las ilustraciones de los artículos publicados. Harstad y Ringvold (1985) realizaron un estudio en el que compararon la preservación morfológica de células de Müller disgregadas de retina de conejo mediante tripsina y papaína. Concluyeron que la preservación es mejor usando papaína, tanto a nivel de microscopía óptica como electrónica. Todos los métodos basados en la utilización de papaína para aislar células de Müller son modificaciones más o menos complejas del método establecido por Lam (1972) para aislar fotorreceptores de tortuga, o del de Bader y col. (1979), desarrollado para aislar fotorreceptores de salamandra. Uno de los métodos que hemos citado, el de Reichenbach y Birkenmeyer (1984), ha sido utilizado para estudiar la morfología adulta de las células de Müller (Reichenbach y col., 1985, 1988b, 1989; Reichenbach y Wohlrab, 1986; Reichenbach, 1987), su morfogénesis postnatal (Reichenbach y Reichelt, 1986) y determinados aspectos de la fisiología de su membrana (Reichenbach y col., 1985; Reichenbach y Eberhardt, 1986; Nilius y Reichenbach, 1988; Chao y col., 1993; Chao y col., 1994). Este grupo ha obtenido, a nuestro juicio, las células de Müller morfológicamente mejor preservadas de las que se encuentran en las ilustraciones de la literatura. Presentan, además, evidencias de que la ultraestructura de la célula también está bien preservada (Reichenbach y col., 1988b, 1990), aunque observan una ligera pérdida de forma en el pie de anclaje al vítreo. Es difícil comparar los resultados obtenidos con nuestro método en retina de pollo con los obtenidos por el método de Reichenbach y Birkenmeyer (1984) en retina de conejo, dado que se trata

de proteasas y especies distintas y que la morfología de la célula de Müller del pollo es mucho más compleja que la de conejo. Sin embargo, es un hecho objetivo que la variedad de formas embrionarias y adultas de células de Müller que hemos obtenido en este trabajo, así como la de otros tipos celulares de las retinas de pollo y rata obtenidas en otros trabajos realizados por mis colegas de laboratorio (Prada, C. y col., 1991; López-López, 1991; Morón, 1992) es muy superior a la obtenida por Reichenbach y Birkenmeyer (1984) y Reichenbach y Reichelt (1986) en retina de conejo. Además, tomando como referencia el *microvilli* (prolongaciones finísimas) que presenta la célula adulta en su extremo ventricular tanto en pollo (Prada, F. y col., 1989b) como en conejo (Reichenbach y col., 1989), éste sólo queda bien conservado en las células disgregadas por nuestro método. Sarthy y Lam (1978) y Sarthy y Bunt (1982) extrajeron, utilizando también papaína, células de Müller de la retina adulta de tortuga, las cuales son más complejas que las de mamíferos aunque menos que las de las aves (Ramón y Cajal, 1892). Nos es difícil nuevamente comparar la preservación de estas células con las obtenidas por nuestro método, ya que en esos trabajos se presenta una sola fotografía de microscopía óptica y otra de microscopía electrónica de barrido, respectivamente. No hay descritos métodos de disociación de retina de pollo que extraigan células de Müller embrionarias o adultas preservando su morfología, con las que poder comparar nuestros resultados. Los métodos actualmente usados para cultivos no liberan células morfológicamente reconocibles, y es tras el cultivo y la eliminación de las neuronas cuando se identifican las células de Müller por medio de marcadores (Li y Sheffield, 1984), ya que estas células cultivadas forman una monocapa de células aplanadas que en nada recuerdan por su morfología a las células de Müller. Por lo tanto, nuestro método es el primero que presenta utilidad para el estudio de la diferenciación, estructura y función de una de las células estructuralmente más complejas del SNC.

Dos ventajas importantes de nuestro método respecto a los publicados son la sencillez y la rapidez con la que se obtienen las células. No hay un método de disociación estándar sencillo que permita disociar las células del SNC, aunque la mayoría de los métodos incluyen los mismos procesos básicos, como la trituración mecánica del tejido y la incubación con proteasa y/o otras enzimas líticas, usadas en todo tipo de medios. Generalmente, el tejido pasa por medios diferentes antes de concluir la disociación y son muchas las variables, incluyendo la osmolaridad, el pH, el tiempo de incubación, la temperatura y quizás la presencia de nutrientes como la glucosa, que pueden modificar el resultado de la disociación

(Waymouth, 1974, 1982; Bashor, 1979; Kay y Wong, 1986; Freshney, 1987; Kaneda y col., 1988; Banker y Goslin, 1991). En el método de Reichenbach y Birkenmeyer (1984) para obtener la célula de Müller del conejo se emplean cuatro soluciones distintas (tabla 5.1). Una solución A se emplea para el aislamiento de la retina bajo luz roja. Después la retina se transfiere a una solución B, que contiene papaína. Esta solución se retira y se añade una solución C, en la cual se procede a realizar la disociación mecánica. Tras 5 minutos en los que se deja sedimentar el tejido, se guarda el sobrenadante y se repite el proceso de disociación para el tejido no disociado. Los dos últimos sobrenadantes son referidos por los

Tabla 5.1

Soluciones empleadas en el método de disociación descrito por Reicheichenbach y Birkenmeyer (1984).

Composición	Soluciones			
	A	B	C	D
Na ⁺ (mM/l)	150	150	150	150
K ⁺ (mM/l)	2	2	2	2
Ca ²⁺ (mM/l)	-	-	2	2
Mg ²⁺ (mM/l)	1	1	1	1
Cl ⁻ (mM/l)	126	126	132	132
SO ₄ ²⁻ (mM/l)	1	1	1	1
HCO ₃ ⁻ (mM/l)	-	-	24	24
H ₂ PO ₄ ⁻ (mM/l)	2.2	2.2	-	-
HPO ₄ ²⁻ (mM/l)	11.8	11.8	-	-
EDTA (mM/l)	-	1	-	-
Glucosa (mM/l)	34	34	8.3	8.3
BSA (%)	-	-	-	1...3
Plasma de caballo (%)	-	-	10	-
Papaína (mg/ml)	-	1	-	-

autores como los más ricos en células de Müller y por ésto se centrifugan en una solución D si se desea purificar las células de Müller. Se realizan en total 4 ciclos de disociación, lo cual, realizando una estimación optimista del tiempo empleado en la disociación, requiere al menos 4 horas y media desde que el tejido es extraído hasta que se obtienen las células

purificadas. Un procedimiento más rápido fue descrito por Trachtenberg y Packey (1983), el cual dura en torno a 150 minutos, según nuestros cálculos. En cambio, una extracción de células de Müller usando nuestro método no requiere más de 60 minutos desde que la retina es extraída, lo cual es una ventaja obvia. Además, aparte de la solución stock de proteasa, que se prepara en el momento, sólo empleamos soluciones de sacarosa al 6 ó al 10% en agua, muy sencillas de preparar y que se pueden conservar a 4°C durante bastante tiempo.

Una modificación interesante de los métodos de disociación del tejido nervioso que hemos comentado en este apartado es la desarrollada por Dreher y col. (1992), quienes disociaron con tripsina (1mg/ml) retinas de varias especies de mamíferos después de fijadas en PFA al 4%. La morfología de las células obtenidas es comparable a la que presentan las células recién disgregadas empleando papaína. Nuestro método no es compatible con la fijación previa. El inconveniente que tienen las células disgregadas tras la fijación es que no son útiles para estudios *in vivo*.

Nuestro método presenta diferencias notables respecto a los anteriormente utilizados para la disgregación del SNC. La concentración de proteasa que utilizamos (0.035-0.1 mg/ml) es mucho menor que la empleada en los otros métodos (0.3-2 mg/ml si se emplea papaína y 1.25-10mg/ml si se emplea tripsina; datos extraídos de la bibliografía citada), y varía según el estadio de desarrollo, el tipo de tejido, el tipo celular que se desea disgregar, y la especie. Sin embargo, Reichenbach y Birkenmeyer (1984) disocian células de retina de conejo desde P0 hasta adulto manteniendo la concentración de proteasa independientemente del estadio de desarrollo. Asumiendo que las proteasas actúan digiriendo moléculas de la matriz extracelular para liberar las células (Sarchy y Bunt, 1982), este cambio de concentración dependiente del estadio de desarrollo podría estar relacionado con cambios cuantitativos y/o cualitativos en la composición de la matriz. La baja concentración de proteasa SF utilizada en todos los estadios indica que es mucho más activa digiriendo las moléculas de la matriz extracelular que las otras proteasas.

La diferencia más llamativa entre nuestro método de disociación y los convencionales está en el medio de incubación. La proteasa SF sólo funciona en una solución de sacarosa 175-300 mM en agua destilada, o en tampón fosfato 1mM, o en HEPES 5 mM (resultados obtenidos en nuestro laboratorio). No funciona con ninguna de las soluciones salinas tamponadas utilizadas normalmente, lo que nos hace pensar que, o bien la fuerza iónica, o bien algún o algunos iones en particular, afectan negativamente al funcionamiento de la

proteasa SF. Mientras que las soluciones empleadas en otros métodos tienen una osmolalidad que ronda la del plasma, nosotros obtenemos las mejores disociaciones de células adultas con una osmolalidad de 175 mOsm/Kg. Además, el volumen de medio de disociación que empleamos es relativamente pequeño si lo comparamos con otros autores (empleamos de 300 a 800 μ l por retina, dependiendo de la edad). Este volumen varía también con el estadio de desarrollo, lo cual es distinto a lo que ocurre con otros métodos. A este respecto hay que señalar que Chad y col. (1991) también encuentran que la relación entre la masa del tejido y el volumen de disociación es importante a la hora de obtener una buena preservación morfológica de neuronas hipocampales.

Células del SNC disociadas por nuestro método ya han sido utilizadas para estudios de desarrollo, empleando técnicas de autorradiografía (Prada, C. y col., 1991), inmunohistoquímica (Prada, F. y col., 1995) y citofotometría (López-López, 1991; Morón, 1992; López-Gallardo, 1995). Además, han sido cultivadas en nuestro laboratorio (López-Gallardo, resultados preliminares no publicados). La experimentación *in vivo*, seguida de la utilización de técnicas como las de electrofisiología, inyección intracelular de moléculas, o hibridación *in situ* aplicadas a células de Müller disgregadas y bien preservadas estructuralmente ofrece la posibilidad de nuevos abordajes para el estudio de la diferenciación y función de la célula de Müller.

5.2 ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS FORMAS CELULARES OBSERVADAS EN LOS DISGREGADOS Y EN PREPARACIONES DE GOLGI: MORFOGENESIS Y ESTRUCTURA ADULTA

Nuestro método de disgregación nos ha permitido conocer la variedad de formas de la porción ventricular de la célula de Müller adulta y distinguir tres fases en el proceso de morfogénesis de la célula, cuestiones ambas que no habían sido reveladas por las técnicas disponibles hasta ahora. Sin embargo, no hemos encontrado en nuestras células disgregadas las laminaciones que se observan con el método de Golgi en la parte de la prolongación vítrea que atraviesa la CNI. Esto puede ser debido a que en medio líquido estas estructuras laminares se colapsan o bien pierden su visibilidad. Ciertas discrepancias entre las formas de células de Müller adultas de conejo observadas *in situ* en preparaciones de Golgi y con microscopía electrónica y las observadas en células disgregadas, también han sido encontradas por Reichenbach y col. (1988b), quienes las explican por las restricciones espaciales que existen en el tejido intacto y no en el medio de disgregación. Las células disgregadas están en un medio líquido, sin impedimentos espaciales, por lo que sus prolongaciones pueden extenderse y observarse de manera diferente.

Una crítica a los estudios de las formas de las células en disgregaciones podría referirse a la posible pérdida de prolongaciones durante el proceso de disociación. Desde nuestro punto de vista la utilidad de las células disgregadas por nuestro método no radica en poder describir exactamente el número de prolongaciones de una célula determinada, sino en la información que hemos obtenido sobre los cambios globales de la forma de la célula de Müller y la distribución intracelular de moléculas. El gran número de células que se obtienen en el disgregado de una retina y la comparación de sus formas con las ya conocidas por otros métodos, nos permite distinguir qué células han perdido un número sustancial de prolongaciones, cuales no han perdido prolongaciones aparentemente y cuales son formas no descritas. Es obvio que algunas de las células disociadas que hemos utilizado en nuestro estudio pueden carecer de alguna prolongación, pero esto no es relevante para el estudio de la morfogénesis si la célula conserva la forma global conocida y tiene las características de una célula sana, es decir, no presenta signos de vacuolización o hinchamiento y posee un soma refringente (Cooper y Smith, 1992). El hecho de que en las células menos diferenciadas (fases 1-3) se conserven prolongaciones tan delicadas como son las que forman el *sprouting*,

o los filopodios y lamelipodios de los conos de crecimiento y las zonas de la célula con capacidad para emitir prolongaciones, y que en las células adultas se conserve el *microvilli*, son evidencias de que la proteasa SF actúa a través de la matriz extracelular sin hacer daño a las células. Pensamos que puede ser mayor el daño causado a las células por el proceso mecánico que por la digestión enzimática. Esta idea se basa en que al incrementar voluntariamente la ayuda mecánica en una disgregación realizada con un protocolo probadamente idóneo para obtener células intactas, el número de células deterioradas aumenta llamativamente.

El trabajo de Prada, F. y col. (1989b) en retina de pollo, realizado con el método de Golgi, describe y documenta que el proceso básico de diferenciación de la forma de la célula de Müller consiste en la formación secuencial de nuevas prolongaciones. Nuestro estudio corrobora estos resultados y además añade otros nuevos, que son desde nuestro punto de vista relevantes para avanzar en el entendimiento de cómo se diferencia esta célula. Hemos encontrado que en el inicio de su morfogénesis (E8) toda la superficie de la célula tiene capacidad de emitir prolongaciones transitorias pequeñas y numerosas (*sprouting*). Esta capacidad queda restringida secuencialmente a tres porciones de la célula, los extremos distal y proximal (al soma) de la prolongación vítrea y el extremo distal de la prolongación ventricular. Además hemos identificado tipos distintos de prolongaciones en base al momento y al modo en que se emiten. La célula emite primero las prolongaciones del extremo distal de la prolongación vítrea, en la CCG o en la CFNO. Después continúa formando la cabellera vítrea a base de prolongaciones que surgen en las proximidades del soma, en la CNI. En último lugar forma las prolongaciones del extremo distal de la prolongación ventricular, las cuales se extienden en la CNE. Es evidente que cada una de estas prolongaciones se emite en determinadas capas de la retina y no en otras. Por lo tanto, estos resultados indican que la restricción de la capacidad de emisión de prolongaciones definitivas podría deberse a la interacción de la célula de Müller con células (probablemente sólo con determinadas) de las diferentes capas de la retina. La interacción de las células de glía radial con el medio ambiente como determinante de la citotopografía de la célula adulta ha sido considerada por otros autores (Reichenbach, 1989; Reichenbach y col., 1989; Reichenbach y Robinson, 1995). Reichenbach (1989) clasifica las distintas formas de prolongaciones gliales en base al entorno celular en que se hallan y elabora una clasificación de los distintos tipos de células de glía en base al tipo de prolongaciones que presentan. Uno de los ejemplos citados por el

autor son las células endoteliales o relacionadas (las células de Müller entre ellas), que contactan con los espacios ventriculares o con espacios derivados de ellos, las cuales emiten *microvilli* hacia estos espacios en todas las especies de vertebrados estudiadas (Reichenbach y Robinson, 1995). Este punto de vista, que supone una fuerte influencia del ambiente sobre la diferenciación de las células de glía en general y sobre la célula de Müller en particular es razonable, pues resulta difícil por el momento aceptar que sólo el programa genético, sin interacción con el microambiente, es capaz de originar la diferenciación de la forma de la célula de Müller y la distribución de sus prolongaciones en estrecha relación con las capas de la retina que atraviesan. Además, no sólo las prolongaciones de la célula se distribuyen heterogéneamente en las distintas capas de la retina; también ocurre ésto con los orgánulos y con elementos del citoesqueleto (Meller y Glees, 1965; Rasmussen, 1972, 1974; Uga y Smelser, 1973a; Reichenbach y col., 1989a). En apoyo de este punto de vista está el hecho de que las células de Müller cultivadas sin interacción con otras células de la retina, forman una monocapa de células poligonales planas sin el menor parecido a las células de Müller *in situ* (Li y Sheffield, 1984) y que además expresan algunas características bioquímicas distintas de las que presentan *in situ*, quizás porque las neuronas en la retina intacta suprimen la expresión de algunas proteínas (Wolburg y col., 1990; Dabin y Barnstable, 1995). La interacción localizada de la célula de Müller con las células de su entorno durante el desarrollo, podría actuar reprimiendo la emisión de prolongaciones en determinadas zonas de la célula (nos referimos a las del *sprouting*) o induciendo la formación de prolongaciones en zonas concretas, lo que quizás podría ocurrir por conversión del *sprouting* en prolongaciones estables. Queda por determinar la naturaleza de las interacciones celulares que hacen que la célula de Müller emita sus prolongaciones siguiendo un patrón tan estereotipado, así como la contribución del programa genético específico de estas células. El avance en esta dirección nos parece importante no sólo para entender la morfogénesis de esta célula, sino para conocer procesos básicos de la Biología del Desarrollo del SNC. Sin embargo, la interacción celular no parece jugar el mismo papel en la diferenciación de todos los tipos de células de la retina. Así, los fotorreceptores siguen su desarrollo en cultivo, sin interacciones con otras células, de forma muy similar a como lo hacen *in situ* (Adler, 1987), lo cual sugiere que es principalmente el programa genético el que dirige la morfogénesis de los fotorreceptores.

La emisión de prolongaciones y los cambios de forma de células de glía se han estudiado sobre todo *in vitro*, en cultivos celulares de astrocitos. En cultivo, el microambiente

se puede modificar añadiendo o retirando del medio determinadas sustancias, así como variando el sustrato empleado y los tipos celulares que crecen en el cultivo. Cuando los astrocitos se ponen en cultivo en ausencia de neuronas, o a baja concentración de células sembradas, son células con apariencia epitelial, poligonales y extendidas; como hemos dicho a las células de Müller les ocurre lo mismo. Sin embargo, hay varios factores que hacen que los astrocitos emitan prolongaciones y adopten formas que recuerdan a las que presentan *in situ*. Uno de ellos es precisamente el contacto con neuronas (Hatten y Liem, 1981; Mason y col., 1988; Torres-Alemán y col., 1992). Este contacto promueve crecimiento de prolongaciones. Por otra parte, también se han descrito ejemplos de crecimiento de prolongaciones gliales en respuesta a cambios en la actividad neuronal *in situ*, como ocurre por ejemplo en el núcleo supraóptico de rata durante la lactancia (Salm y col., 1985), por deshidratación (Chapman y col., 1986) o por bloqueo reversible de la actividad aferente en el núcleo coclear del pollo (Canady y Rubel, 1992). Así pues, tanto *in vitro* como *in situ*, la presencia de neuronas y la actividad neuronal se ha visto que modifican la morfología de células gliales y las inducen a formar prolongaciones. Nuestro estudio es el primero en estudiar *in vivo/ex vivo* la emisión de prolongaciones de las células de Müller y ofrece nuevas perspectivas para diseñar experimentos *in vivo* y *ex vivo* encaminados a profundizar en el estudio de la interacción neurona-glía durante el desarrollo de la retina, a nivel celular y molecular.

El término "cono de crecimiento" se utiliza principalmente en referencia al cono de crecimiento axónico, una estructura que va en el ápice del axon y le hace crecer, así como "navegar", es decir, dirigirse a su diana. Algunos axones viajan a distancias considerables y es el cono el que guía al axon a través de microambientes que contienen señales atrayentes o repelentes para el cono (Kater y Rehder, 1995). Sin embargo, también se habla de conos de crecimiento de dendritas de neuronas en cultivo e *in situ* (Banker y Cowan, 1979), de conos de crecimiento de células neuroepiteliales en fase G₁ del ciclo (Hinds y Ruffet, 1971; Prada, C. y Ramírez, 1983) o de conos de crecimiento de las "prolongaciones guía" (*leading processes*) de neuroblastos en migración (Book y Morest, 1990). Por lo tanto, cono de crecimiento es cualquier estructura abultada situada en el ápice de una prolongación en crecimiento. También en el extremo de las prolongaciones de los astrocitos que experimentan un crecimiento neto en cultivo, se han encontrado ciertos engrosamientos denominados ápices de crecimiento que en cierto modo se parecen a los conos de crecimiento axonales (Mason

y col., 1988; Baorto y col., 1992), y que por lo dicho anteriormente son considerados conos de crecimiento gliales (Hatten, 1987). Nosotros describimos por vez primera en las células de Müller disgregadas prolongaciones que surgen de la porción distal de la prolongación vítrea y van rematadas por pequeños abultamientos o conos de crecimiento. Sin embargo, las prolongaciones vítreas que surgen de la porción proximal al soma no presentan abultamientos en sus extremos de crecimiento y, por tanto, podrían no crecer por mecanismos mediados por conos de crecimiento.

El crecimiento neto no es el único sistema por el que los astrocitos forman sus prolongaciones en cultivo. En ausencia de neuronas, determinados factores que aumentan la concentración de cAMP intracelular (proceso al parecer mediado por receptores β -adrenérgicos) inducen un fenómeno que se ha denominado "cavitación" (Pollenz y McCarthy, 1986; Shain y col., 1987, 1992; Goldman y Abramson, 1990). El borde de la célula se retrae hacia la zona central, dejando tras la retracción porciones de citoplasma más condensado y con un citoesqueleto más organizado, de modo que se establecen complejas prolongaciones, a veces comunicadas por zonas laminares, las cuales no superan el espacio que ocupaba la célula en reposo. Hay autores que sugieren que este proceso de cavitación es el primer paso, no imprescindible, antes del crecimiento neto de prolongaciones (Baorto y col., 1992). Este proceso es inhibido por glutamato (Shao y col., 1994) y endotelinas (Koyama y Baba, 1994), por lo que, si realmente ocurre *in situ*, puede también estar regulado por la actividad neuronal o por factores ambientales. Por último, se ha observado en estudios *in vivo* que prolongaciones de astrocitos sometidas a estiramiento pueden elongarse (Jaeger, 1988). Esto, que parece obvio, no lo es tanto, pues las prolongaciones podrían no ser capaces de elongarse en respuesta al estiramiento. El hecho de que se elonguen implica que existe una cierta plasticidad en la prolongación, y que hay síntesis y/o reordenamiento de moléculas del citoesqueleto y de la membrana plasmática en respuesta a ese estímulo. Estos resultados apoyan la posibilidad de que existan mecanismos de crecimiento en determinadas prolongaciones de las células de Müller diferentes a los conocidos mediados por conos de crecimiento.

La ramificación del extremo distal de la prolongación ventricular tampoco parece ocurrir por crecimiento mediante conos, y podría no haber crecimiento neto de prolongaciones, dado que este extremo de la célula permanece fijo, siempre en la posición de la MLE. Así pues, no es posible que haya prolongaciones creciendo en contacto con la

zona diana. Nuestras observaciones en células embrionarias disgregadas revelan la existencia de una bifurcación que se hace más marcada a medida que progresa el desarrollo. Esta bifurcación podría surgir por un proceso similar al de cavitación antes mencionado para astrocitos en cultivo. La membrana se retraería en torno a elementos del citoesqueleto y se formarían las estructuras en "T" y en "Y" que hemos descrito en las disociaciones. Este fenómeno podría potenciarse por un proceso de elongación de la célula en esta zona, debido al aumento de grosor de la CNE por el crecimiento de los fotorreceptores dentro de esta capa (López-López, 1991). La parte de la célula de Müller comprendida en la CNE se vería sometida a un estiramiento, ya que tiene uniones con los fotorreceptores a nivel de la MLE. El estiramiento en esta zona nos parece más probablemente motivado por los fotorreceptores que por las células de Müller, que parecen más susceptibles de ser influidas por su entorno (Reichenbach, 1989) que los fotorreceptores (Adler, 1987). Las observaciones en las que nos basamos para sugerir este posible mecanismo son puramente morfológicas, y no pretendemos sugerir que el mecanismo o las señales implicadas en la cavitación de astrocitos en cultivo y en la diferenciación de esta zona de la célula de Müller sean los mismos, pues no sabemos siquiera si la cavitación de los astrocitos ocurre *in situ*. Aunque se ha descrito aumento de la concentración intracelular de cAMP en células de Müller de pollo cultivadas expuestas a glucagón y péptido intestinal vasoactivo (Koh y col., 1984), no se ha relacionado con cambios de morfología. Lo que sí parece probable es que, cualquiera que sea el mecanismo implicado, los fotorreceptores jueguen un papel destacado, dado que las prolongaciones y laminaciones de las Müller rodean, al menos parcialmente, los somas de estas células (Meller y Glees, 1965). Un proceso de bifurcación de prolongaciones sin mediar conos de crecimiento ha sido también descrito por López-Gallardo (1995) en un estudio del desarrollo de la dendrita apical de las células piramidales del hipocampo *in situ*. En este caso, el punto de bifurcación de dicha dendrita se aproxima al soma a medida que progresa el desarrollo y no se han observado conos de crecimiento que puedan explicar el proceso de bifurcación.

Las finas prolongaciones que crecen desde el extremo de la prolongación ventricular y aparentemente se orientan hacia la CPE son posiblemente las descritas por Meller y Glees (1965), las cuales rodean los contactos sinápticos entre los fotorreceptores y las células bipolares. No hemos podido seguir en detalle el desarrollo de estas prolongaciones, pues son extremadamente finas, lo que dificulta su observación. Es evidente que estas prolongaciones experimentan un proceso de crecimiento neto sobre el cual no podemos decir si está mediado

o no por conos de crecimiento. La presencia en las células disgregadas de estas prolongaciones tan sumamente finas nos da confianza sobre la falta de agresividad de nuestro método de disociación.

El fenómeno de emisión de *sprouting* generalizado, hasta donde nosotros sabemos, no ha sido previamente descrito para las células de Müller. Nuestros resultados muestran que la emisión de prolongaciones transitorias sólo ocurre durante una etapa del desarrollo (E8-E13, aproximadamente) y presenta un patrón espacial en la célula que varía con el estadio del desarrollo. Aparece por toda la célula en los estadios más jóvenes y, a partir de E12, se restringe a zonas concretas de la célula en las cuales surgen prolongaciones estables. Dado que el *sprouting* no ha sido observado por el método de Golgi, cabría la posibilidad de que se tratase de un resultado artefactual del método de disociación. Sin embargo, el patrón espacio-temporal que manifiesta no es compatible con esta posibilidad. Tampoco es compatible con la posibilidad de que el *sprouting* sea emitido por la célula en el medio de disociación, inducido por algún factor presente en éste. En el caso de que se tratara de un fenómeno provocado por el proceso de disgregación, implicaría una distinta susceptibilidad a la emisión de *sprouting* según el estadio y la porción de la célula, lo que tendría en cualquier caso un significado biológico. Por otra parte, es ya conocido que otras células de la retina, como las ganglionares desplazadas (Prada, C. y col., 1992), las amacrinas colinérgicas (Génis-Gálvez y col., 1977; López-Gallardo y col., 1995) y los fotorreceptores (López-Lopez, 1991), emiten *sprouting* en estadios iniciales de su diferenciación. En las ganglionares desplazadas la aparición de *sprouting* a nivel de la CPI es, de hecho, el criterio utilizado para la identificación temprana de estas células. En neuronas cultivadas la emisión de múltiples prolongaciones transitorias es un fenómeno general previo a la emisión de prolongaciones definitivas, principalmente el axon (Dotti y col., 1988). También hay emisión de espículas en la superficie de los astrocitos en estadios previos a la emisión de prolongaciones inducidas por contacto con neuronas (Mason y col., 1988). Se ha descrito también la emisión de *sprouting* en astrocitos cultivados y expuestos a glutamato en ausencia de contacto con neuronas y en astrocitos que están en contacto con conos de crecimiento axonal (Cornell-Bell y col., 1990). Es evidente, pues, que nos encontramos ante un fenómeno común a múltiples tipos de células del SNC, previo a la emisión de prolongaciones definitivas. ¿Qué puede motivar la emisión de este *sprouting* en el caso de la célula de Müller? Cualquier hipótesis que formulemos no deja de ser una conjetura, pero podemos apuntar alguna

posibilidad. Una de ellas sería que ciertas señales extracelulares o el programa interno de la célula podrían inducir la formación generalizada de prolongaciones transitorias, de las cuales se establecerían como definitivas sólo aquellas que, por algún motivo, fuesen favorecidas. Dado que la emisión focalizada de *sprouting* ocurre en la zona de la prolongación vítrea más cercana al soma y en determinadas prolongaciones de la cabellera en formación, las más cortas, y que estas zonas se encuentran dentro de la CNI, podemos especular con que algún componente de esta capa podría ser el inductor de ese proceso, bien por contacto directo o por medio de señales extracelulares.

Las prolongaciones que hemos observado en las células de Müller adultas a nivel de la CNE y que constituyen las aparentes ramificaciones del extremo distal de la prolongación ventricular, son similares a las que aparecen en células disgregadas de conejo (Reichenbach y Reichelt, 1986), especie en la que se ha descrito que los somas de los fotorreceptores están totalmente recubiertos de expansiones laminares de las células de Müller, tanto en preparaciones de Golgi (Reichenbach y col., 1989, véase la figura 1.8) como inmunohistoquímicas (Robinson y Dreher, 1990, figura 1.9). Esta parece ser una característica común a todas las especies de mamíferos estudiadas (Dreher y col., 1992, figura 1.10; Reichenbach y Robinson, 1995). Sin embargo, en pollo estas expansiones laminares no aparecen claramente definidas en tinciones de Golgi (Ramón y Cajal, 1892, figura 1.5; Prada, F. y col., 1989b, figura 1.11). En cambio, en estudios ultraestructurales sí se ha observado que los somas de los fotorreceptores están bordeados por expansiones de las células de Müller (Meller y Glees, 1965). El estudio de la disposición espacial de las aparentes ramificaciones del extremo ventricular de la célula descritas en este trabajo requeriría la reconstrucción de cortes seriados ultrafinos.

Los trabajos de Ramón y Cajal (1892) y Prada, F. y col. (1989b) en pollo utilizando secciones impregnadas por el método de Golgi, muestran expansiones de la célula de Müller a nivel de la CNI que rodean parcialmente los somas de las neuronas situadas en esta capa. Meller y Glees (1965), en un estudio de microscopía electrónica corroboran este hecho, e indican que el recubrimiento es prácticamente total, debido al solapamiento de estas expansiones entre células de Müller vecinas. Este aislamiento de las neuronas de la CNI se ha observado en todas las especies estudiadas ultraestructuralmente (Reichenbach y Robinson, 1995; Reichenbach y col., 1995). En nuestras células disgregadas no hemos observado estas expansiones, como tampoco se han observado en células de Müller disociadas de otras

especies (Sarthy y Lam, 1978; Sarthy y Bunt, 1982; Reichenbach y col., 1988b), lo cual podría deberse a que o bien se retraen, o bien adquieren otra disposición espacial que hace imposible su observación.

En nuestro estudio no hemos encontrado las células de Müller tipo II descritas por Prada, F. y col. (1989b), sino que hemos encontrado variaciones de la forma básica de la célula tipo I descrita por estos autores, que es también el tipo descrito por Ramón y Cajal (1892). Una posibilidad es que no hayamos encontrado las células tipo II por ser menos abundantes y además localizarse en mayor proporción en la retina periférica, de la cual nosotros desechamos buena parte. Otra posibilidad es que en estas células las prolongaciones de la cabellera se agrupen o fasciculen de modo que den en preparaciones de Golgi la impresión de poseer menos prolongaciones de las que en realidad poseen. Por último, dado que las ilustraciones que estos autores presentan son de E19, y que indican que este tipo es más frecuente en retina periférica, las formas tipo II podrían corresponder a células en la fase 3 de diferenciación, con morfología global similar a la del adulto, pero que todavía carecen de alguna de las prolongaciones de la cabellera.

5.3 ESTUDIO DE LA SUPERFICIE DE MEMBRANA DE LAS CELULAS DE MULLER

Los métodos usados corrientemente para calcular superficie celular se distinguen en base a la utilización de técnicas electrofisiológicas o geométricas. Las técnicas electrofisiológicas consisten en hallar, bajo condiciones de fijación de voltaje, la capacidad eléctrica total de la membrana de la célula en estudio. Dado que la capacidad específica de las membranas biológicas es bastante constante (alrededor de $1\mu\text{F}/\text{cm}^2$), a partir de este dato se puede calcular la superficie de la célula. La precisión de la medida depende fundamentalmente del tamaño y la geometría de la célula. Cuanto mayor y más irregular sea ésta, menor será la superficie de membrana sometida a la fijación de voltaje, que es precisamente la que estamos midiendo. Dada la compleja morfología de la célula de Müller, esta técnica no es adecuada para medir su superficie.

Las técnicas geométricas usadas para medir superficie de células de Müller se diferencian en base a la utilización de microscopía electrónica u óptica. La medición de áreas mediante microscopía electrónica (expuesto por Rasmussen, 1972, 1973, 1975) resulta compleja debido a la complejidad de las células de Müller. Se realiza utilizando microfotografías en las que se identifican todos los perfiles de las células en estudio y se determina la **densidad de superficie**, es decir, la superficie de membrana de la población de células por unidad de volumen de tejido. Si se conoce qué cantidad de superficie de membrana de células de Müller hay por unidad de volumen de retina, y se conoce también el número de células que hay en el mismo volumen (se puede determinar contando los núcleos), se puede averiguar la superficie media de membrana de una célula, simplemente dividiendo la superficie total obtenida en las microfotografías entre el número de células. El uso este método requiere medir siempre en la misma zona de la retina, puesto que la longitud y la forma de las células de Müller varía según su localización en retina central o periférica. Por otra parte, como la célula de Müller atraviesa todas las capas de la retina, hay que hallar el valor de la densidad de superficie en todas las capas de la retina. Conociendo el grosor que ocupa cada capa dentro de la retina, podemos averiguar la densidad de superficie de la célula en todas las capas de la retina consideradas en conjunto. Los resultados obtenidos por este método son fiables siempre que se cumplan los requisitos expuestos, aunque el efecto del fijador empleado es difícilmente cuantificable y puede afectar de distinta forma a diferentes

partes de la célula.

Utilizando microscopía óptica y por un método similar al empleado por nosotros, Newman (1985a) midió el área de células de Müller disgregadas de retina de salamandra considerándolas formadas por fragmentos cilíndricos. Para ello dibujó a mano, de la pantalla de un monitor de vídeo, células individuales vivas en su medio de disociación. Dividió cada célula en fragmentos cilíndricos de $3.5 \mu\text{m}$ de longitud y sumó las áreas laterales de cada uno de estos fragmentos, junto con el área de los dos extremos de la célula. Este tipo de aproximación es tanto más exacta cuanto menores son los segmentos cilíndricos considerados. Dada la morfología de las células, este método debe proporcionar valores muy aproximados a los reales para la prolongación vítrea, pero pensamos que infraestima la superficie del soma y del pie de anclaje vítreo, los cuales tienen una contribución alta a la superficie celular total.

Nosotros hemos modelizado la célula de Müller como un cuerpo geométrico formado por cilindros y por troncos de cono, un modelo que desde nuestro punto de vista se ajusta más a la realidad. Para simplificar los cálculos hemos desarrollado una fórmula que nos proporciona el área de este tipo de cuerpos. Aun cuando nuestro método podría ajustarse bastante a la realidad, debido a la complejidad de la forma de la célula de Müller y a las limitaciones inherentes a la propia metodología, los valores absolutos del área de la célula que hemos obtenido son una aproximación, pero que resulta útil para conocer el incremento en superficie de membrana que tiene lugar en las distintas fases de diferenciación morfológica de la célula.

El tamaño de determinadas prolongaciones de la célula son un factor limitante para la aplicación del método usado. Por esto, no hemos podido calcular la superficie de los *microvilli* que presenta la célula adulta, pues su grosor está en el límite del poder de resolución del microscopio óptico, y ni siquiera se puede contar su número. Igualmente, algunas de las espículas y prolongaciones transitorias que presentan las células en desarrollo son demasiado finas para poder ser medidas con precisión. Por esto, hemos comenzado a medir la superficie a partir de E13, estadio en el que el *sprouting* que presenta la célula tiene un tamaño medible. Por otra parte, como ya hemos señalado anteriormente, no podemos descartar que la célula pierda alguna de sus prolongaciones durante el proceso de disociación. El área de las células de Müller de conejo medida por microscopía electrónica de células *in situ* (Reichenbach y col., 1988b) es un 13% mayor que la de las mismas células disgregadas y medidas con una combinación de microscopía electrónica y óptica (Reichenbach y col.,

1988a), quizá porque estas últimas pierdan prolongaciones. Para intentar minimizar este factor, sólo medimos células sin ningún signo aparente de deterioro. Además, tanto las células embrionarias (trabajo de Tesina) como las adultas (Prada, F. y col., 1989b) presentan en las preparaciones de Golgi porciones aparentemente velamentosas que no aparecen en las disgregadas, bien porque se pierden, o bien porque no son visualizables. Todos estos factores conducen a una estimación a la baja de la superficie celular.

En nuestra modelización hemos asumido que las células quedan adheridas al porta sin perder su forma. Sin embargo, las células se adhieren a éste en grado variable, lo que puede inducir un cierto grado de deformación en las células. Así, si la adhesión es excesiva, las medidas de grosor que tomemos serán mayores de lo que son en la realidad. El caso extremo se daría si las células quedaran totalmente aplastadas contra el porta, en cuyo caso el grosor que mediríamos para una prolongación sería 1,57 veces ($\pi/2$) su valor real, ya que lo que tomaríamos como diámetro sería en realidad la mitad de la longitud de la circunferencia que rodea a dicha prolongación. En nuestras preparaciones las células no están exageradamente adheridas, ya que a grandes aumentos se distinguen claramente varios planos de foco en ellas. Por tanto, el factor de error debido al grado variable de adhesión es menor de 1.57.

La modelización que hemos realizado se ha desarrollado para cuerpos geométricos de simetría bilateral. Este requisito no es completamente cumplido por las células de Müller, ni siquiera *in situ*, ya que algunas porciones de las prolongaciones de las células presentan un curso tortuoso en preparaciones de Golgi. Además, en el proceso de disgregación y extensión sobre portas las células sufren tensiones que hacen que se flexionen las prolongaciones y se pierda el eje de simetría, observándose que la longitud lateral no es la misma en ambos lados de la célula. Esto lo hemos compensado tomando como longitud lateral la mitad del perímetro, con lo que estamos promediando las longitudes laterales de ambos lados de la célula. El efecto esperado de la flexión es una disminución en la longitud observada, lo que se determinaría una disminución del área calculada con respecto al área real. Aunque no podemos cuantificar este efecto, que dependerá de las propiedades físicas de la célula y su membrana, como la flexibilidad, podemos apreciar intuitivamente que este efecto será tanto menor cuanto menor sea el grosor de las prolongaciones. Como son precisamente las prolongaciones más delgadas las que más se flexionan, podemos asumir que el efecto debe ser pequeño. Este problema también se plantea en el antes mencionado estudio de Newman (1985a), quien asume la simetría bilateral de las células como una exigencia del modelo, sin

plantear esta cuestión en la discusión.

Si bien la complejidad morfológica de la célula de Müller del pollo hace particularmente difícil abordar el estudio de su superficie de membrana, nuestro abordaje constituye el primer desafío a esta complejidad. Hemos hecho una modelización meticulosa de cada célula y hemos obtenido unas medidas que, considerando la existencia de factores que contribuyen de manera opuesta (sobreestimación e infraestimación) al error en la medida, pensamos que podrían ser bastantes próximas a las reales.

Al no haber en la literatura medidas de superficie de la célula de Müller del pollo, no podemos comparar con otros estudios. Sin embargo, podemos comparar nuestros resultados en células adultas con los obtenidos en otras especies de vertebrados, en relación a los cuales podemos especular. En la tabla D.2 resumimos los resultados obtenidos por los diferentes

Tabla D.2

Valores de la superficie de membrana de las células de Müller adultas en varias especies estudiadas.

ESPECIE	SUPERFICIE (μm^2)	AUTOR
Rata (<i>Rattus norvegicus</i>)	2759	Rasmussen, 1973
Ardilla coreana (<i>Eutamias sciurus</i>)	2378	Rasmussen, 1975
Salamanquesa (<i>Gecko eublipharis macularis</i>)	20325	
Culebra de collar (<i>Natrix natrix</i>)	2038	
Salamandra (<i>Ambistoma tigrinum mavortium</i>)	5540	Newman, 1985a
Conejo, células <i>in situ</i>	10557 (región mielinizada) 7834 (región periférica)	Reichenbach y col, 1988b
Conejo, células disgregadas	6823 (región periférica)	Reichenbach y col, 1988a
Pollo (<i>Gallus domesticus</i>)	2948	Resultados de este trabajo

autores, en los que se observa que en casi todas las especies estudiadas la célula de Müller tiene entre 2000 y 7000 μm^2 de superficie, excepto en la salamanquesa, que tiene una superficie mucho mayor. Este valor tan alto puede entenderse si consideramos que la morfología de las células de Müller de reptiles puede ser tremendamente compleja (véase, en

la figura 1.7, la célula de Müller del camaleón). El valor que hemos obtenido para la superficie de las células de Müller de pollo estaría entre los valores medios, lo que confirma que el método de estimación puede ser adecuado. Al valor que hemos obtenido habría que añadirle la superficie del *microvilli*, que no hemos podido calcular. En el conejo el *microvilli* aporta una superficie de $220-360\mu\text{m}^2$ por célula (Reichenbach y col., 1988b). Añadiendo este valor a la superficie obtenida en pollo, tenemos $3168-3308\mu\text{m}^2$ para la célula de Müller en esta especie.

La superficie de membrana de una célula depende de su longitud, del grosor de sus prolongaciones y del grado de ramificación de las mismas. No tenemos ilustraciones de las células de Müller en las especies estudiadas por Rasmussen (1973, 1975), salvo en el caso de la rata, por lo que no podemos evaluar su complejidad morfológica sino indirectamente, a través de los datos de superficie de membrana que presentan. La célula de Müller de la salamandra (Newman, 1985a), pese a no estar ramificada, presenta una gran superficie de membrana, lo cual es atribuible al grosor de sus prolongaciones, como hemos comprobado gráficamente sobre una de las ilustraciones que presenta el autor. La célula de Müller del conejo, sin embargo, plantea un resultado sorprendente, pues hemos medido la superficie de alguna de las células de conejo disociadas por el grupo de Reichenbach y hemos obtenido una superficie de aproximadamente $1500\mu^2$, lo cual es bastante menor que los valores que presentan los autores ($6823\mu\text{m}^2$). Este valor es más cercano al esperable intuitivamente, por comparación de células de Müller digregadas de pollo y conejo fotografiadas a los mismos aumentos. Es posible que la disparidad entre sus resultados y nuestros cálculos sea debida al método de medida empleado, ya que estos autores miden la superficie de las células digregadas usando microscopía electrónica, un enfoque muy distinto al que empleamos nosotros. Al microscopio electrónico se contabilizan las zonas laminares que no se observan al microscopio óptico, obteniendo por nuestro método una estimación a la baja del área de las células. Queremos señalar, por último, que la superficie de membrana de la célula de Müller de rata, que fue calculada por microscopía electrónica *in situ* por Rasmussen (1973), es bastante menor que la de conejo, pese a tener una longitud mayor (observaciones propias) que la del conejo y tener una forma general muy similar a la de éste. De momento, no sabemos explicar estas discrepancias. El cálculo de la superficie de membrana de células de Müller de rata y de conejo con nuestro método podría proporcionar una explicación.

Las diferencias entre la superficie de membrana plasmática en unas especies y otras

han intentado ser explicadas por las diferencias de vascularización de la retina en las distintas especies estudiadas, así como por la distinta proporción de conos y bastones (Rasmussen, 1975), pero desde nuestro punto de vista, esta relación está aún lejos de ser demostrada.

Si bien los valores absolutos obtenidos en nuestro estudio podrían tomarse con cierta cautela, al no poder ser cotejados con otros estudios, no ocurre así con los resultados relativos al crecimiento en superficie a lo largo del desarrollo, ya que todas las células han sido sometidas al mismo proceso y están sujetas a los mismos errores de medida. Así pues, el crecimiento en superficie que observamos es real y los factores de incremento observados entre estadios podrían ser bastante aproximados a los que ocurren *in situ*. Que sepamos, ningún estudio ha cuantificado el aumento de la superficie de membrana de estas células a lo largo del desarrollo en ninguna especie. Lo más interesante, desde nuestro punto de vista, es la diferencia en el ritmo de crecimiento de la porción ventricular de la célula y de la vítrea, y el considerable incremento de superficie de membrana que experimenta la célula en su porción vítrea, el cual indica una polarización en el crecimiento de la célula que implica polarización del tráfico molecular intracelular. Los mecanismos que controlan la polarización de las células están empezando a investigarse. La célula de Müller se perfila como un buen modelo a investigar, para avanzar en este conocimiento.

5.4 EXPRESION DE MOLECULAS DE CITOESQUELETO

Es bien conocido que el citoesqueleto está formado, en las células no musculares, por tres sistemas de proteínas filamentosas: los microtúbulos, formados por dímeros de α - y β -tubulina, los microfilamentos, formados por monómeros de actina, y los filamentos intermedios, que pueden estar formados por monómeros de diferentes familias de proteínas. Cada uno de estos componentes del citoesqueleto une determinadas proteínas que se denominan "asociadas". La composición del citoesqueleto y la distribución de moléculas del mismo varía de célula a célula. Así, hay isotipos tanto de tubulina (Banerjee y Luduena, 1992) como de actina (Vanderkeckhove y Weber, 1978), los cuales se presentan en determinados tejidos y no en otros. Esto es aún más notable en los filamentos intermedios, los cuales se agrupan en 6 ó 7 familias, con varios componentes cada una, que también se localizan en determinados tejidos y no en otros (Hemmati-Brivanlou y col., 1992; Duprey y Paulin, 1995). La composición y estructuración del citoesqueleto también varía dentro de una misma célula. En las neuronas, por ejemplo, es muy distinta en el soma y en el axon (Braun y col., 1993). También varía a lo largo del desarrollo de una célula, como ocurre, por ejemplo, con la expresión de diferentes tipos de filamentos intermedios (Duprey y Paulin, 1995). La variabilidad del citoesqueleto no afecta solamente a los componentes principales, sino también a las proteínas asociadas, que igualmente se distribuyen de diferente manera según el tipo celular, la localización subcelular y el momento del desarrollo (una revisión interesante sobre proteínas asociadas a microtúbulos fue hecha por Bates y col., 1993, y sobre proteínas asociadas a microfilamentos por Way y Weeds, 1990).

La mayor parte de los estudios realizados *in vivo* sobre el citoesqueleto de las células de glía en general y de las células de Müller en particular, tratan sobre la expresión y distribución de determinados tipos de filamentos intermedios (véase el apartado 1.3.3.3 de la introducción). La utilización en los últimos años de anticuerpos monoclonales específicos contra filamentos intermedios o moléculas asociadas, los cuales marcan exclusivamente células de glía y no neuronas, han permitido conocer no sólo la expresión de estas moléculas en regiones diferentes del SNC, sino también la distribución de las células de glía en el mismo. Uno de nuestros objetivos era estudiar la expresión y distribución intracelular de tres moléculas del citoesqueleto en la célula de Müller a lo largo del desarrollo, prestando especial atención a su posible distribución en prolongaciones en proceso de crecimiento o en las zonas

donde se originan dichas prolongaciones, así como en los posibles conos de crecimiento. Hemos empleado un enfoque novedoso, consistente en utilizar células recién disgregadas, las cuales mantienen las formas que presentan *in situ* después de la disgregación y extensión en cubres. Con nuestro método hemos conseguido mantener la organización del citoesqueleto reduciendo al mínimo el tiempo transcurrido desde la disociación hasta que las células son fijadas. Podemos decir, por lo tanto, que se trata de un estudio *ex-vivo/in vivo*, puesto que tras la disociación no sustituimos el medio natural en el que están las células en el tejido por ningún medio de cultivo artificial. Queremos destacar que con nuestro método las células no se adhieren a la matriz extracelular que disponemos sobre el cobre por uniones como las que se establecen en cultivo, pues esto implicaría una reorganización del citoesqueleto, sino que se adhieren a sustratos adhesivos ayudadas por la centrifugación. Un enfoque parecido ha sido empleado por Weiler y Janssen-Bienhold (1993) para estudiar la distribución de actina en células horizontales de retina de carpa, aunque estos autores dejaron adherir las células a poli-L-lisina durante una hora. Hay algunos trabajos en los que se han aplicado técnicas de inmunocitoquímica a células de Müller disociadas, pero en ninguno se ha estudiado la distribución de actina ni de tubulina (Pfeiffer y col., 1994: glucógeno fosforilasa y vimentina en conejo; Biedermann y col., 1995: receptor D₂ para dopamina en rata; Grosche y col., 1995: glutamina sintetasa, GFAP y producto del oncogén Bcl-2 en conejo). El fijador que hemos empleado para marcar actina y tubulina contiene el detergente triton X-100, con lo que nos aseguramos de que la actina y la tubulina que se encuentran en forma soluble, sin formar parte de microtúbulos o microfilamentos, se lavan (Letourneau, 1983; Gordon-Weeks, 1993). De este modo, marcamos la actina y la tubulina que se encuentran polimerizadas, es decir, formando parte del citoesqueleto.

Hemos elegido el monoclonal MAS 077, del clon YL 1/2, para marcar tubulina, porque reconoce la subunidad α de la tubulina tirosinada. La α -tubulina se sintetiza con una tirosina en el extremo C-terminal. Esta tirosina se elimina poco después de que la α -tubulina se incorpore a un microtúbulo. Así, la forma tirosinizada es la que se ha sintetizado más recientemente, y se asume que los microtúbulos formados exclusiva o mayoritariamente por ella son los más recientemente polimerizados y los más inestables. Ahora bien, sabemos por otros trabajos que la forma tirosinizada se distribuye en mayor o menor medida por todos los microtúbulos (Baas y Black, 1990) y que su distribución coincide con la de la tubulina total. No ocurre así con anticuerpos que marcan la forma destirosinizada, pues se ha descrito que

esta última no marca, por ejemplo, la tubulina que se encuentra en los conos de crecimiento axónicos (Fan y col., 1993). Puesto que la distribución de α -tubulina y tubulina total coinciden, en esta discusión usaremos tubulina y α -tubulina indistintamente.

En la célula de Müller embrionaria el monoclonal MAS 077 marca un citoesqueleto de tubulina por toda la célula, menos en los conos de crecimiento. En la célula adulta marca solamente la prolongación ventricular, resultado éste que es acorde con lo descrito en conejo por Magalhães y Coimbra (1972) por microscopía electrónica; no marca las prolongaciones de la cabellera vítrea, ni los *microvilli*, en los que se sabe por estudios en otras células, como las del tracto digestivo, que no contienen citoesqueleto de tubulina (Alberts y col., 1992).

Para marcar la actina hemos usado el anticuerpo A 5441, del clon AC-15, el cual marca la isoforma β , de la cual se sabe que está presente en los conos de crecimiento axonales (Ulloa y Avila, 1996), y que esperábamos que se encontrara en los conos de crecimiento de las células de Müller. El marcaje intenso en los *microvilli* de la célula de Müller adulta, así como en las prolongaciones de las células pigmentarias y su peculiar distribución en los fotorreceptores, concordante con las observaciones de otros autores (Philp y Nachmias, 1985; Madreperla y Adler, 1989), indican que estamos marcando específicamente actina.

La célula de Müller del pollo contiene tres tipos de moléculas constituyentes de filamentos intermedios, vimentina, GFAP y desmina. Prada, F. y col., 1995 encontraron una molécula nueva del citoesqueleto de esta célula, reconocida por el anticuerpo monoclonal 3CB2, que podría ser un filamento intermedio o una proteína asociada. Estos autores descartan que sea cualquiera de los filamentos intermedios descritos en células de Müller. Nos interesó este monoclonal por ser un marcador muy específico de células de Müller y el que más temprano las marca en el tejido, y porque se había realizado con éxito la tinción de células disgregadas de estadios avanzados del desarrollo (Prada, F. y col., 1995). El hecho de que se trata de una molécula de citoesqueleto queda de nuevo confirmado por nuestros propios resultados, ya que mostramos claramente la tinción de filamentos discretos y redes de filamentos en las células disociadas.

Otro de nuestros objetivos era caracterizar molecularmente los conos de crecimiento de las células de Müller. Anteriormente hemos dicho que los conos de crecimiento mejor estudiados son los axonales, las estructuras por medio de las cuales crecen y navegan los axones. Estas estructuras presentan dos dominios; el central es rico en microtúbulos y

contiene orgánulos, el periférico o lamelar es rico en microfilamentos y carece de orgánulos. De la zona periférica se emiten abundantes espículas o filopodios que contienen también microfilamentos (Goldberg y Burmeister, 1989). Se han descrito diversos marcadores de conos de crecimiento axonales, quizás el más empleado la proteína GAP-43 (Skene y col., 1986), los cuales no han sido empleados en este trabajo, y que merecería la pena conocer si son constitutivos de los conos de crecimiento de las células de Müller. Uno de los ejemplos de cono de crecimiento axonal estudiado en la literatura es el de las células ganglionares de la retina. En nuestras preparaciones de células disgregadas y semidisgregadas hemos identificado estos conos de crecimiento en estadios en los que son especialmente abundantes (E6-E10), cuando las células ganglionares están en fase inicial de diferenciación y emiten su axon (Prada, C. y col., 1991). En ellos se observa que hay un núcleo marcado con anti-tubulina, distalmente al cual hay marcaje de β -actina. Estos conos también se marcan con el monoclonal 3CB2. Por otra parte, se acepta que el citoesqueleto de los conos de crecimiento axónicos es altamente inestable (Baas y Black, 1990; en general, todos los autores que trabajan con conos de crecimiento resaltan lo fácilmente que se desorganiza su citoesqueleto), y sin embargo con nuestro método de disgregación y preparación de las células no parece desorganizarse, al menos en los conos de las células ganglionares y de las células horizontales de la retina. Estos también han sido identificados y mantienen en las células disgregadas sus formas y la distribución de 3CB2 conocidas por estudios *in vivo*. Así pues, estos resultados también evidencian que el citoesqueleto no se desorganiza tras la disociación. La visualización de conos de crecimiento en células disgregadas del SNC es un hecho nuevo, interesante en sí mismo, puesto que permite su estudio sin necesidad de poner las células *in vitro*, situación en la que, como es bien sabido, las células varían la organización de su citoesqueleto en función del sustrato elegido para su cultivo.

Nuestros resultados indican que la expresión de los componentes del citoesqueleto varía a lo largo del desarrollo. Así, mientras la expresión de 3CB2 aumenta a medida que progresa el desarrollo, la expresión de α -tubulina y β -actina disminuye claramente y su distribución intracelular varía. Dado que las células han seguido el mismo procesamiento en todos los estadios de desarrollo estudiados, tenemos que descartar que el método de prepararlas sea la causa de las diferencias observadas en la intensidad del marcaje. Sin embargo, estos resultados han de ser analizados con cierta cautela, pues las diferencias en intensidad de marcaje pueden estar relacionadas con otros factores, como la exposición de los

epítomos que reconocen los anticuerpos, la estabilidad de los elementos del citoesqueleto en distintas zonas de la célula o la diferente concentración de las moléculas en partes concretas de la célula para realizar funciones localizadas. Asumiendo que los microtúbulos y microfilamentos no tienen por qué ser igualmente estables en todas las zonas de la célula, podría ocurrir, por ejemplo, que sólo detectásemos los que no se despolimerizan, es decir, los más resistentes a la disgregación y manipulación posterior de las células. Sin embargo, el grado de preservación de la forma de los conos de crecimiento axónicos de las células ganglionares y horizontales, y de los conos de crecimiento de las células de Müller, así como la distribución de las tres moléculas en ellos, junto con la distribución y estructuración de 3CB2, β -actina y tubulina en la célula de Müller adulta (y en otras células de la retina), nos hacen pensar que el patrón de marcaje que observamos se corresponde con la distribución real de las moléculas *in situ*. Baorto y col. (1992) han descrito que la formación de prolongaciones por los astrocitos en cultivo conlleva una redistribución de la actina, que desaparece en gran medida del soma celular y se concentra principalmente en las prolongaciones en crecimiento, donde podría jugar un papel similar al que juega en los conos de crecimiento axonales. Nuestros resultados, al mostrar marcaje diferencialmente intenso de β -actina y α -tubulina en las prolongaciones y zonas de crecimiento de la célula en desarrollo indican que estas moléculas también *in vivo* juegan un papel en la emisión de prolongaciones. A favor de esta interpretación están también los resultados de Goldman y Abramson (1990), quienes indican que las estructuras de actina que aparecen más patentes en astrocitos cultivados, las llamadas fibras de stress, desaparecen cuando comienza la emisión de prolongaciones. En estos estudios el marcador empleado para la actina es la faloidina, que se une a F-actina. El monoclonal que empleamos nosotros sólo se une a β -actina. Está en nuestro proyecto de futuro inmediato emplear faloidina en nuestras preparaciones, pues en las células de Müller podría haber también γ -actina, dado que es una de las formas encontradas por Flanagan y Lin (1979) en el SNC. Una vez que las prolongaciones definitivas se establecen, la cantidad de microfilamentos y microtúbulos distribuidos por toda la célula podría disminuir, quedando localizados en los lugares donde ejercen determinadas funciones.

La identidad de la molécula marcada por 3CB2 no está definitivamente aclarada, por lo que es difícil dar un significado biológico al aumento en intensidad de marcaje que observamos a lo largo del desarrollo. Prada, F. y col. (1995), indican que podría tratarse de una proteína asociada a filamentos intermedios (IFAP), ya que aunque su distribución es

distinta de la de los filamentos intermedios descritos hasta el momento, marca estructuras filamentosas y se expresa en muchas de las células en las que se ha descrito la presencia de vimentina. Sin embargo, no se puede descartar que se trate de un nuevo filamento intermedio o de una modificación post-transcripcional de la vimentina que tuviese un epítipo no reconocido por los anticuerpos disponibles actualmente contra vimentina. En principio no parece probable que se trate de un filamento intermedio, pues se acepta que éstos no están presentes en los conos de crecimiento; sin embargo, Hemmati-Brivanlou y col. (1992) han descrito un nuevo filamento intermedio, la tanabina, presente en determinados conos de crecimiento del SNC de *Xenopus laevis*; coincidentemente, 3CB2 marca intensamente (con mayor intensidad que los anticuerpos contra β -actina y α -tubulina) los conos de crecimiento axónico de células ganglionares y los conos de crecimiento de las células de Müller. Como hemos visto en los resultados, 3CB2 marca absolutamente toda la célula, excepto el *microvilli*, en células adultas. En las células fijadas con PFA, las usadas para testar 3CB2, no se observa por contraste de fases el *sprouting* generalizado que las células presentan *in vivo* o procesadas con otros fijadores. Es probable que el *sprouting* no se observe como consecuencia de la fijación con PFA, y que 3CB2 no esté en él. Cornell-Bell y col (1990) señalan que las espículas que forman el *sprouting* que emiten los astrocitos en cultivo expuestos a glutamato contienen actina, pero no filamentos intermedios ni microtúbulos.

En el ápice de la prolongación vítrea de determinadas células de Müller embrionarias hemos observado que la β -actina rodea un núcleo central de tubulina. Aquí podría la prolongación estar creciendo, dado que sabemos por las preparaciones de Golgi que, al menos hasta E11, aunque posiblemente también en estadios posteriores, existen células de Müller que no llegan a la limitante vítrea, pero que crecen hasta alcanzarla. En esta zona de crecimiento la β -actina siempre se sitúa externa y distalmente a la tubulina, como ocurre en los conos de crecimiento axónicos. También en la zona de emisión de la cabellera y en las prolongaciones en crecimiento se observa abundante marcaje de β -actina con el mismo patrón de distribución. Es interesante señalar que en los conos de crecimiento axónicos la actina parece implicada en la respuesta a señales y la tubulina en el crecimiento neto de la prolongación (Bentley y Toroion-Raymond, 1986; Forscher y Smith, 1988; Davenport y col., 1993), y que la actina se suele organizar en espículas, como ocurre en toda la prolongación vítrea de la célula de Müller al inicio de su diferenciación. En un sentido amplio, podríamos considerar toda la prolongación vítrea de la célula de Müller o porciones de la misma como

"regiones de crecimiento", es decir, zonas con la distribución de actina y tubulina propia de los conos de crecimiento, pero implicadas en la emisión de numerosas prolongaciones, no en el crecimiento de una prolongación preexistente.

En los conos de crecimiento de la parte distal de la prolongación vítrea de las células de Müller se observa un marcaje intenso de 3CB2, al igual que en todas las prolongaciones en crecimiento que formarán la cabellera vítrea. Así pues, es posible que la proteína reconocida por 3CB2 esté implicada en la emisión y/o el crecimiento de las prolongaciones de la célula de Müller. Tanto si se trata de un filamento intermedio como de una IFAP, esta observación es coincidente con la realizada por Mason y col. (1988) en células de glía de cerebelo cultivadas, quienes señalan que en los conos de crecimiento gliales hay acúmulo de filamentos intermedios, lo cual no se observa en los axonales. Por otra parte, Weinstein y col. (1991) han demostrado que un filamento intermedio (GFAP) es necesario para la emisión de prolongaciones de astrocitos cultivados en respuesta al contacto con neuronas.

Son muchos los estudios que se pueden realizar sobre el citoesqueleto de las células de Müller con la metodología que hemos puesto a punto, la cual ofrece el interés de combinar experimentos *in vivo* con la manipulación de las células *ex-vivo*. En este trabajo de Tesis Doctoral hemos estudiado la expresión y localización de 3CB2, β -actina y α -tubulina. Sin embargo, quedan muchas moléculas del citoesqueleto por estudiar, primero para conocer si las células de Müller las expresan *in situ*, y segundo para obtener información sobre su función *in vivo*. La célula de Müller del pollo, por su compleja arquitectura y la emisión de diferentes tipos de prolongaciones, se presenta como un excelente modelo para el estudio a nivel molecular de procesos morfogénéticos básicos.

6. CONCLUSIONES

1.- El método que hemos desarrollado para disociar células de Müller de retina de pollo, permite obtener un gran número de células con la morfología que presentan *in situ* y con su citoesqueleto preservados.

2.- La célula de Müller, durante su diferenciación morfológica, pasa por tres fases, caracterizadas por: 1) emisión de *sprouting* generalizado, 2) emisión de prolongaciones desde el extremo distal de la prolongación vítrea mediante conos de crecimiento, y 3) emisión de prolongaciones desde la porción proximal de la prolongación vítrea y formación de prolongaciones en el extremo distal de la prolongación ventricular, sin conos de crecimiento aparentes.

3.- La variedad de formas de ramificación de las prolongaciones primitivas ventricular y vítrea originan una variedad de formas adultas que eran desconocidas hasta ahora, y cuyo significado biológico queda por desvelar.

4.- La célula de Müller incrementa su superficie de membrana más de 10 veces desde E13 hasta el adulto. Aunque el área de la prolongación ventricular experimenta un incremento considerable (4 veces), el incremento que experimenta la prolongación vítrea es muy superior (30 veces), debido a la formación de las múltiples prolongaciones de la cabellera vítrea. Quedan por estudiar los mecanismos subyacentes a esta polarización del crecimiento de la célula hacia la porción vítrea de la misma.

5.- La proteína 3CB2 se expresa en todas las células neuroepiteliales hasta E8, estadio en el que su expresión queda restringida a las células de Müller hasta E14, momento a partir del cual se expresa también en células horizontales. 3CB2 marca toda la célula de Müller durante el período de diferenciación, incluyendo los conos de crecimiento y las prolongaciones en crecimiento, excepto el *sprouting* de las células en las fases 1 y 2. En el adulto 3CB2 rellena toda la célula con la excepción del *microvilli*.

6.- La distribución de α -tubulina y β -actina en la célula de Müller varía a lo largo del desarrollo y está claramente compartimentalizada en la célula adulta, sugiriendo que estas moléculas podrían servir a funciones diferentes a lo largo del desarrollo.

7.- En las fases 1 y 2 la α -tubulina forma un esqueleto interno en todas las prolongaciones de la célula y en los conos de crecimiento, y no se encuentra en el *sprouting* que surge de la prolongación vítrea. La β -actina se distribuye por fuera de la α -tubulina en toda la célula, incluyendo el *sprouting* y los conos de crecimiento. Esta distribución de ambas moléculas en las prolongaciones iniciales de la célula es muy probablemente característica de cualquier prolongación en crecimiento de las células del SNC, dado que una distribución semejante se encuentra también en las prolongaciones en crecimiento de neuronas y glía en cultivo.

8.- En la fase 3 de diferenciación la α -tubulina está distribuida por la prolongación ventricular, soma y porción proximal de las prolongaciones en crecimiento que formarán la cabellera vítrea. Esta distribución concuerda sólo en parte con la idea generalmente admitida de que los microtúbulos estabilizan las prolongaciones definitivas, al no encontrarse en las prolongaciones definitivas de la prolongación vítrea. La β -actina se distribuye por las mismas zonas que la α -tubulina, concentrándose más en la porción distal de la prolongación ventricular. Además, marca zonas velamentosas de la región de la prolongación vítrea proximal al soma, así como la mayor parte de las prolongaciones en crecimiento que parten de esta zona. Esta distribución sugiere un papel de la β -actina en la prolongación ventricular diferente al conocido en los conos de crecimiento.

9.- En adulto, la α -tubulina está en toda la prolongación ventricular, excepto el *microvilli*, así como en el soma y las porciones más gruesas de la prolongación vítrea, mientras que la β -actina sólo se encuentra en el *microvilli* que surge del extremo distal de la prolongación ventricular. Estos resultados muestran una compartimentalización de ambas moléculas y una distribución polarizada hacia la porción ventricular de la célula, cuyo significado funcional será sin duda el objetivo de investigaciones futuras.

7. BIBLIOGRAFIA

- Abd-El-Basset, E.M.; Ahmed, I.; Kalnins, V.I. y Fedoroff, S. (1992). Immuno-electron microscopical localization of vimentin and glial fibrillary acidic protein in mouse astrocytes and their precursor cells in culture. *Glia* 6:149-153.
- Adler, R. (1987). Nature and nurture in the differentiation of retinal photoreceptors and neurons. *Cell Differ.* 20:183-188.
- Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K. y Watson, J.D. (1992). *Biología molecular de la célula*. Ediciones Omega, S.A., Barcelona.
- Amato, A.; Barbour, B.; Szatkowski, M. y Attwell, D. (1994). Counter-transport of potassium by the glutamate uptake carrier in glial cells isolated from the tiger salamander retina. *J. Physiol.* 479:371-380.
- Anchan, R.M.; Reh, T.A.; Angello, J.; Balliet, A. y Walker, M. (1991). EGF and TGF- α stimulate retinal neuroepithelial cell proliferation *in vitro*. *Neuron* 6:923-936.
- Ashwell, K. (1989). Development of microglia in the albino rabbit retina. *J. Comp. Neurol.* 287:286-301.
- Baas, P.W. y Black, M.M. (1990). Individual microtubules in the axon consist of domains that differ in both composition and stability. *J. Cell Biol.* 111:495-509.
- Bader, C.R.; MacLeish, P.R. y Schwartz, E.A. (1979). A voltage clamp study of the light response in solitary rods of the tiger salamander. *J. Physiol. (Lond.)* 296:1-26.
- Banerjee, A. y Luduena, R.F. (1992). Kinetics of colchicine binding to purified β -tubulin isotypes from bovine brain. *J. Biol. Chem.* 267:13335-13339.
- Banker, G.A. y Cowan, W.M. (1979). Further observations on hippocampal neurons in dispersed cell culture. *J. Comp. Neurol.* 187:469-494.
- Banker, G.A. y Goslin, K. (Eds.). (1991). Primary dissociated cell cultures of neural tissue. In *Culturing nerve cells*. pp 41-51. MIT Press, Cambridge, Massachusetts, London, England.
- Baorto, D.M.; Mellado, W. y Shelanski, M.L. (1992). Astrocyte process growth induction by actin breakdown. *J. Cell Biol.* 117:357-367.
- Barbour, B.; Brew, H. y Attwell, D. (1988). Electrogenic glutamate uptake in glial cells is activated by intracellular potassium. *Nature* 335:433-435.
- Barbour, B.; Brew, H. y Attwell, D. (1991). Electrogenic uptake of glutamate and aspartate into glial cells isolated from the salamander (*Ambystoma*) retina. *J. Physiol.* 436:169-193.
- Barnstable, C.J. (1980). Monoclonal antibodies which recognize different cell types in the rat retina. *Nature* 286:231-235.

- Barnstable, C.J.; Hofstein, R. y Akagawa, K. (1985). A marker of early amacrine cell development in rat retina. *Dev. Brain Res.* **20**:286-290.
- Bashor, M.M. (1979). Dispersion and disruption of tissues. In *Methods in enzymology* (W. B. Jakoby and I. H. Pastan eds.) Vol. LVIII, pp. 119-131. Academic Press, Inc. New York.
- Bates, C.A.; Trinh, N. y Meyer, R.L. (1993). Distribution of microtubule-associated proteins (MAPs) in adult and embryonic mouse retinal explants: Presence of the embryonic Map, MAP5/1B, in regenerating adult retinal axons. *Dev. Biol.* **155**:533-544.
- Bentley, D. y Toroion-Raymond, A. (1986). Disordered pathfinding by pioneer neurone growth cones deprived of filopodia by cytochalasin treatment. *Nature (Lond.)* **323**:712-715.
- Berg, K. y Wolburg, H. (1989). Müller (glial) cells but not astrocytes in the retina of the goldfish possess orthogonal arrays of particles. *Glia* **2**:458-469.
- Berkow, J.W. y Patz, A. (1964). Developmental histochemistry of the rat eye. *Invest. Ophthalmol.* **3**:22-33.
- Berliner, M.L. (1931). Cytologic studies on the retina: I. Normal coexistence of oligodendroglia and myelinated nerve fibers. *Arch. Ophthalmol.* **6**:740-751.
- Bhattacharjee, J. y Sanyal, S. (1975). Developmental origin and early differentiation of retinal Müller cells in mice. *J. Anat.* **2**:367-372.
- Biedermann, B.; Fröhlich, E.; Grosche, J.; Wagner, H.J. y Reichenbach, A. (1995). Mammalian Müller (glial) cells express functional D₂ dopamine receptors. *Neuroreport* **6**:609-612.
- Bignami, A. (1984). Glial fibrillary acidic (GFA) protein in Müller glia. Immunofluorescence study of the goldfish retina. *Brain Res.* **300**:175-178.
- Bignami, A. y Dahl, D. (1979). The radial glia of Müller in the rat retina and their response to injury. An immunofluorescence study with antibodies to the glial fibrillary acidic (GFA) protein. *Exp. Eye Res.* **28**:63-69.
- Bignami, A.; Raju, T. y Dahl, D. (1982). Localization of vimentin, the nonspecific intermediate filament protein, in embryonal glia and in early differentiating neurons. *In vivo* and *in vitro* immunofluorescence study of the rat embryo with vimentin and neurofilament antisera. *Dev. Biol.* **91**:286-295.
- Björklund, H.; Bignami, A. y Dahl, D. (1985). Immunohistochemical demonstration of glial fibrillary acidic protein in normal rat Müller glia and retinal astrocytes. *Neurosci. Lett.* **54**:363-368.
- Bok, D.; Ong, D.E. y Chytil, F. (1984). Immunocytochemical localization of cellular retinol binding protein in the rat retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **25**:877-883.

- Booher, J. y Sensenbrenner, M. (1972). Growth and cultivation of dissociated neurons and glial cells from embryonic chick, rat and human brain in flask cultures. *Neurobiol.* **2**:97-105.
- Book, K.J. y Morest, D.K. (1990). Migration of neuroblasts by perikaryal translocation: role of cellular elongation and axonal outgrowth in the acoustic nuclei of the chick embryo medulla. *J. Comp. Neurol.* **297**:55-76.
- Bouvier, M.; Szatkowski, M.; Amato, A. y Attwell, D. (1992). The glial cell glutamate uptake carrier countertransports pH-changing anions. *Nature* **360**:471-474.
- Boya, J.; Calvo, J.; Carbonell, A.L. y García-Mauriño, E. (1986). Nature of macrophages in rat brain. *Acta anat.* **127**:142-145.
- Boya, J.; Carbonell, A.L.; Calvo, J. y Borregón, A. (1987). Ultrastructural study on the origin of rat microglia cells. *Acta anat.* **130**:329-335.
- Boya, J.; Carbonell, A.L.; Calvo, J. y Borregón, A. (1991). Microglial cells in the central nervous system of the rabbit and rat: cytochemical identification using different lectins. *Acta anat.* **140**:250-253.
- Brandon, C. y Lam, D.M.-K. (1983). L-glutamic acid: A neurotransmitter candidate for cone photoreceptors in human and rat retinas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **80**:5117-5121.
- Braun, N.; Schikorski, Th. y Zimmermann, H. (1993). Cytoplasmic segregation and cytoskeletal organization in the electric catfish giant electromotoneuron with special reference to the axon hillock region. *Neurosci.* **52**:745-756.
- Brew, H. y Attwell, D. (1987). Electrogenic glutamate uptake is a major current carrier in the membrane of axolotl retinal glial cells. *Nature* **327**:707-709.
- Brew, H.; Gray, P.T.A; Mobbs, P. y Attwell, D. (1986). Endfeet of retinal glial cells have higher densities of ion channels that mediate K⁺ buffering. *Nature* **324**:466-468.
- Bunt-Milam, A.H. y Saari, J.C. (1983). Immunocytochemical localization of two retinoid-binding proteins in vertebrate retina. *J. Cell Biol.* **97**:703-712.
- Burke, J.M. y Foster, S.J. (1984). Culture of adult retinal glial cells: methods of cellular origin of explant outgrowth. *Curr. Eye Res.* **3**:1169-1178.
- Canady, K.S. y Rubel, E.W. (1992). Rapid and reversible astrocytic reaction to afferent activity blockade in chick cochlear nucleus. *J. Neurosci.* **12**:1001-1009.
- Casper, D.S.; Trelstad, R.L. y Reif-Lehrer, L. (1982). Glutamate-induced cellular damage in isolated chick embryo retina: Müller cell localization of initial effects. *J. Comp. Neurol.* **209**:79-90.

- Chad, J.E.; Stanford, I.; Wheal, H.V.; Williamson, R. y Woodhall, G. (1991). Dissociated neurons from adult rat hippocampus. In *Cellular Neurobiology. A Practical Approach*. (Ed. Chad J. and Wheal H.) pp. 19-37. IRL Press at Oxford University Press.
- Chan, C.-C.; Rozenszajn, L.A.; Nussenblatt, R.B.; Muellenberg-Coulombre, C.; Hsu, S.-M.; Palestine, A.G.; Lando, Z. y BenEzra, D. (1984). Monoclonal antibodies to Müller's cells of the retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **25**:1007-1012.
- Chao, T.I.; Panicke, T.; Reichelt, W. y Reichenbach, A. (1993). Na⁺ channels are expressed by mammalian retinal glial (Müller) cells. *Neuroreport* **4**: 575-578.
- Chao, T.I.; Skachkov, S.N.; Eberhardt, W. y Reichenbach, A. (1994). Na⁺ channels of Müller (glial) cells isolated from retinæ of various mammalian species including man. *Glia* **10**:173-185.
- Chapman, D.B.; Theodosis, D.T.; Montagnese, C.; Poulain, D.A. y Morris, J.F. (1986). Osmotic stimulation causes structural plasticity of neurone-glia relationships of the oxytocin but no vasopressin secreting neurones in the hypothalamic supraoptic nucleus. *Neurosci.* **17**: 679-686.
- Cocchia, D.; Polak, J.M.; Terenghi, G.; Battaglia, F.; Stolfi, V.; Gangitano, C. y Michetti, F. (1983). Localization of S-100 protein in Müller cells of the retina - 2. Electron Microscopical Immunocytochemistry. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **24**:980-984.
- Conner, J.D.; Detwiler, P.B. y Sarthy, P.V. (1985). Ionic and electrophysiological properties of retinal Müller (glial) cells of the turtle. *J. Physiol.* **362**:79-92
- Cooper, M.W. y Smith, S.J. (1992). A real time analysis of growth cone-target cell interactions during the formation of stable contacts between hippocampal neurons in culture. *J. Neurobiol.* **23**:814-828.
- Cornell-Bell, A.H.; Thomas, P.G. y Smith, S.J. (1990). The excitatory neurotransmitter glutamate causes filopodia formation in cultured hippocampal astrocytes. *Glia* **3**:322-334.
- Dabin, I. y Barnstable, C.J. (1995). Rat retinal cells express Thy-1 following neuronal cell death. *Glia* **3**:23-32.
- Dahl, D. y Bignami, O. (1982). Immunohistological localization of desmin, the muscle-type 100 A filament protein, in rat astrocytes and Müller glia. *J. Histochem. Cytochem.* **30**:207-213.
- Davenport, R.W.; Dou, P.; Rehder, V. y Kater, S.B. (1993). A sensory role for neuronal growth cone filopodia. *Nature* **361**:721-723.
- Distler, C.; Weigel, H. y Hoffmann, K.-P. (1993). Glia cells of the monkey retina. I. Astrocytes. *J. Comp. Neurol.* **333**:134-147.

- Dotti, C.G.; Sullivan, C.A. y Banker, G.A. (1988). The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *J. Neurosci.* **8**:1454-1466.
- Dräger, U.C. (1983). Coexistence of neurofilaments and vimentin in a neurone of adult mouse retina. *Nature* **303**:169-172.
- Dräger, U.C.; Edwards, D.L. y Barnstable, C.J. (1984). Antibodies against filamentous components in discrete cell types of the mouse retina. *J. Neurosci.* **4**:2025-2042.
- Drazba, J. y Lemon, V. (1990). The role of cell adhesion molecules in neurite outgrowth on Müller cells. *Dev. Biol.* **138**:82-93.
- Dreher, Z.; Robinson, S.R. y Distler, C. (1992). Müller cells in vascular and avascular retinae: a survey of seven mammals. *J. Comp. Neurol.* **323**:59-80.
- Duprey, P. y Paulin, D. (1995). What can be learned from intermediate filament gene regulation in the mouse embryo. *Int. J. Dev. Biol.* **39**:443-457.
- Ehinger, B. (1973). Glial uptake of taurine in the rabbit retina. *Brain Res.* **60**:512-516.
- Ehinger, B. (1977). Glial and neuronal uptake of GABA, glutamic acid, glutamine and glutathione in the rabbit retina. *Exp. Eye Res.* **25**:221-234.
- Ehinger, B.; Zucker, C.L.; Bruun, A. y Adolph, A. (1994). *In vivo* staining of oligodendroglia in the rabbit retina. *Glia* **10**:40-48.
- Ehrlich, D. (1981). Regional specialization of the chick retina as revealed by the size and density of neurons in the ganglion cell layer. *J. Comp. Neurol.* **195**:643-657.
- Faff-Michalak, L.; Reichenbach, A.; Dettmer, D.; Kellner, K. y Albercht, J. (1994). K⁺-, hypoosmolarity-, and NH₄⁺-induced taurine release from cultured rabbit Müller cells: role of Na⁺ and Cl⁻ ions and relation to cell volume changes. *Glia* **10**:114-120.
- Fan, J.; Mansfield, S.G.; Redmon, T.; Gordon-Weeks, P.R. y Raper, A. (1993). The organization of F-Actin and microtubules in growth cones exposed to a brain derived collapsing factor. *J. Cell Biol.* **121**:867-878.
- Fernández, E.; Cuenca, N.; García, M. y De Juan, J. (1995). Two types of mitochondria are evidenced by protein kinase C immunoreactivity in the Müller cells of the carp retina. *Neurosci. Lett.* **183**:202-205.
- Fine, B.S. y Zimmerman, L.E. (1962). Müller's cells and the "middle limiting membrane" of the human retina. *Invest. Ophthalmol.* **1**:304-326.
- Flanagan, M.D. y Lin, S. (1979). Comparative studies on the characteristic properties of two forms of brain actin separable by isoelectric focussing. *J. Neurochem.* **32**:1037-1046.

Forscher, P. y Smith, S.J. (1988). Actions of cytochalasins on the organization of actin filaments and microtubules in a neuronal growth cone. *J. Cell. Biol.* **107**:1505-1516.

Freshney, R.I. (1987). *Culture of animal cells. A Manual of Basic Technique*. Alan. R. Liss, Inc, New York.

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

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

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

Goldberg, D.J. y Burmeister, D.W. (1989). Looking into growth cones. *TINS.* **12**:503-506.

Goldman, J.E. y Abramson, B. (1990). Cyclic AMP-induced shape changes of astrocytes are accompanied by rapid depolymerization of actin. *Brain Res.* **528**:189-196.

Gordon-Weeks, P.R. (1993). Organization of microtubules in axonal growth cones: a role for microtubule-associated protein MAP 1B. *J. Neurocytol.* **22**:717-725.

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

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

Grosche, J.; Härtig, W. y Reichenbach, A. (1995). Expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP), glutamine synthetase (GS), and Bcl-2 protooncogene protein by Müller (glial) cells in retinal light damage of rats. *Neurosci. Lett.* **185**:119-122.

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

Hamburger, V. y Hamilton, H. (1951). A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morphol.* **88**:49-92.

Harman, A.M. y Beazley, L.D. (1987). Patterns of cytogenesis in the retina of the wallaby, *Setonix brachyurus*. *Anat. Embryol.* **177**:123-130.

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

- Harman, A.M.; Sanderson, K.J. y Beazley, L.D. (1992). Biphasic retinal neurogenesis in the brush-tailed possum, *Trichosurus vulpecula*: further evidence for the mechanisms involved in formation of ganglion cell density gradients. *J. Comp. Neurol.* **325**:595-606.
- Harris, W.A. y Messersmith, S.L. (1992). Two cellular inductions involved in photoreceptor determination in the *Xenopus* retina. *Neuron* **9**:357-372.
- Harstad, H.Kr. y Ringvold, A. (1985). Scanning and transmission electron microscopy of Müller cells isolated from rabbit retina. *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* **223**:29-34.
- Hatten, M.E. (1981). Cell assembly patterns of embryonic mouse cerebellar cells on carbohydrate-derivatized polylysine culture substrata. *J. Cell Biol.* **89**:54-61.
- Hatten, M.E. (1987). Neuronal inhibition of astroglial cell proliferation is membrane mediated. *J. Cell Biol.* **104**:1353-1360.
- Hatten, M.E. y Liem, R.K.H. (1981). Astroglia provide a template for the positioning of developing cerebellar neurons *in vitro*. *J. Cell Biol.* **90**: 622-630.
- Hatton, J.D. y Ellisman, M.H. (1982). The distribution of orthogonal arrays in freeze-fractured rat median eminence. *J. Neurocytol.* **11**:335-349.
- Hemmati-Brivanlou, A.; Mann, R.W. y Harland, R.M. (1992). A protein expressed in the growth cones of embryonic vertebrate neurons defines a new class of intermediate filament protein. *Neuron* **9**:417-428.
- Henshel, D.S. y Miller, R.F. (1992). Catecholamine effects on dissociated tiger salamander Müller (glial) cells. *Brain Res.* **575**:208-214.
- Hernández-Sánchez, C.; Frade, J.M. y de la Rosa, E.J. (1994). Heterogeneity among neuroepithelial cells in the chick retina revealed by immunostaining with monoclonal antibody PM1. *Eur. J. Neurosci.* **6**:105-114.
- Hickey, W.F. y Kimura, H. (1988). Perivascular microglial cells of the CNS are bone marrow-derived and present antigen *in vivo*. *Science* **239**:290-292.
- Hicks, D. y Courtois, Y. (1990). The growth and behaviour of retinal Müller cells *in vitro*: an improved method for isolation and culture. *Exp. Eye Res.* **51**:119-129.
- Hildebrand, C. y Waxman, S.G. (1983). Regional node-like membrane specializations in non-myelinated axons of rat retinal nerve fiber layer. *Brain Res.* **258**:23-32.
- Hinds, J.W. y Hinds, P.L. (1974). Early ganglion cell differentiation in the mouse retina: an electron microscopic analysis utilizing serial sections. *Dev. Biol.* **37**:381-416.
- Hinds, J.W. and Ruffet, T.L. (1971). Cell proliferation in the neural tube: an electron microscopic and Golgi analysis in the mouse cerebral vesicle. *Z. Zellforsch.* **115**:226-264.

- Holländer, H.; Makarov, F.; Dreher, Z.; Van Driel, D.; Chan-Ling, T. y Stone, J. (1991). Structure of the macroglia of the retina: sharing and division of labour between astrocytes and Müller cells. *J. Comp. Neurol.* **313**:587-603.
- Holt, C.E.; Bertsch, T.W.; Ellis, H.M. y Harris, W.A. (1988). Cellular determination in the *Xenopus* retina is independent of lineage and birth date. *Neuron.* **1**:15-26.
- Hughes, W.F. y La Velle, A. (1975). The effects of early tectal lesions on development in the retinal ganglion cell layer of chick embryos. *J. Comp. Neurol.* **163**:256-284.
- Hume, D.A.; Perry, V.H. y Gordon, S. (1983). Immunohistochemical localization of a macrophage-specific antigen in developing mouse retina: Phagocytosis of dying neurons and differentiation of microglial cells to form a regular array in the plexiform layers. *J. Cell Biol.* **97**:253-257.
- Humphrey, M.F.; Constable, I.J.; Chu, Y. y Wiffen, S. (1993) A quantitative study of the lateral spread of Müller cell responses to retinal lesions in the rabbit. *J. Comp. Neurol.* **334**:545-558.
- Hunter, D.D.; Murphy, M.D.; Olsson, C.V. y Brunken, W.J. (1992). S-Laminin expression in adult and developing retinae: a potential cue for photoreceptor morphogenesis. *Neuron* **8**:399-413.
- Huxlin, K.R.; Dreher, Z.; Schulz, M. y Dreher, B. (1995) Glial reactivity in the retina of adult rats. *Glia* **15**:105-118.
- Hyde, J.C. y Robinson, N. (1974). Localization of sites of GABA catabolism in the rat retina. *Nature (London)* **248**:432-433.
- Ikeda, T. y Puro, D.G. (1994). Nerve growth factor: a mitogenic signal for retinal Müller glial cells. *Brain Res.* **649**:260-264.
- Jaeger, C.B. (1988). Plasticity of astroglia: evidence supporting process elongation by "stretch". *Glia* **1**:31-38.
- Jiang, B.; Bezhadian, M.A. y Caldwell, R.B. (1995). Astrocytes modulate retinal vasculogenesis: Effects on endothelial cell differentiation. *Glia* **15**:1-10.
- Jones, P.S. y Schechter, N. (1987). Distribution of specific intermediate-filament proteins in the goldfish retina. *J. Comp. Neurol.* **266**:112-121.
- Jordan, F.L. y Thomas, W.E. (1988). Brain macrophages: questions of origin and interrelationship. *Brain Res. Rev.* **13**:165-178.
- Kahn, A.J. (1974). An autoradiographic analysis of the time and appearance of neurons in the developing chick neural retina. *Dev. Biol.* **38**: 30-40.

- Kaneda, M.; Nakamura, H. y Akaike, N. (1988). Mechanical and enzymatic isolation of mammalian CNS neurons. *Neurosci. Res.* **5**:299-315.
- Karschin, A.; Wässle, H. y Schnitzer, J. (1986). Immunocytochemical studies on astroglia of the cat retina under normal and pathological conditions. *J. Comp. Neurol.* **249**:564-576.
- Karwoski, C.J.; Lu, H.-K. y Newman, E.A. (1989). Spatial buffering of light-evoked potassium increases by retinal Müller (glial) cells. *Science* **244**:578-580.
- Kater, S.B. y Rehder, V. (1995). The sensory-motor role of growth cone filopodia. *Curr. Opin. Neurobiol.* **5**:68-74.
- Kay, A.R. y Wong, R.K.S. (1986). Isolation of neurons suitable for patch-clamping from adult mammalian central nervous system. *J. Neurosci. Methods* **16**:227-238.
- Keirstead, S.A. y Miller, R.F. (1995). Calcium waves in dissociated retinal glial (Müller) cells are evoked by release of calcium from intracellular stores. *Glia* **14**:14-22.
- Kelley, M.V.V.; Turner, J.K. y Reh, T.A. (1994). Retinoic acid promotes differentiation of photoreceptors *in vitro*. *Development* **120**:2091-2102.
- Kljavin, I.J. y Reh, T.A. (1991). Müller cells are a preferred substrate for *in vitro* neurite extension by rod photoreceptor cells. *J. Neurosci.* **11**:2985-2994.
- Koh, S.-W.M.; Kyritsis, A. y Chader, G.J. (1984). Interaction of neuropeptides and cultured glial (Müller) cells of the chick retina: Elevation of intracellular cyclic AMP by vasoactive intestinal peptide and glucagon. *J. Neurochem.* **43**:199-203.
- Kondo, H.; Iwanaga, T. y Nakajima, T. (1983). An immunocytochemical study of the localization of S-100 protein in the retina of rats. *Cell Tissue Res.* **231**:527-532.
- Koyama, Y. y Baba, A. (1994). Endothelins are extracellular signals modulating cytoskeletal actin organization in rat cultured astrocytes. *Neuroscience* **61**:1007-1016.
- Kreutzberg, G.W. y Hussain, S.T. (1982). Cytochemical heterogeneity of the glial plasma membrane: 5'-nucleotidase in retinal Müller cells. *J. Neurocytol.* **11**:53-64.
- Kuwabara, T. y Weidman, T.A. (1974). Development of the prenatal rat retina. *Invest. Ophthalmol.* **13**:725-739.
- Ladman, A.J. y Soper, E.H. (1962). Preliminary observations on the fine structure of Müller cell of the avian retina. *5th Congr. Electron Microsc. Academic Press.* pp R6.
- Lake, N.; Marshall, J. y Voaden, M.J. (1978). High affinity uptake sites for taurine in the retina. *Exp. Eye Res.* **27**:713-718.

- Lam, D.M.K. (1972). Biosynthesis of acetylcholine in turtle photoreceptors. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **69**:1987-1991.
- Landis, D.M.D. y Reese, T.S. (1974). Arrays of particles in freeze-fractured astrocytic membranes. *J. Cell Biol.* **60**:316-320.
- Legrand, C.; Ferranz, C.; Clavel, M.-C. y Rabié, A. (1991). Distribution of gelsolin in the retina of the developing rabbit. *Cell Tissue Res.* **264**:335-338.
- Lemmon, V. (1985). Monoclonal antibodies specific for glia in the chick nervous system. *Dev. Brain Res.* **23**:111-120.
- Lemmon, V. (1986). Localization of a filamin-like protein in glia of the chick central nervous system. *J. Neurosci.* **6**:43-51.
- Lemmon, V. y Rieser, G. (1983). The developmental distribution of vimentin in the chick retina. *Dev. Brain Res.* **11**:191-197.
- Leong, S.-K. y Ling, E.-A. (1992). Amoeboid and ramified microglia: their interrelationship and response to brain injury. *Glia* **6**:39-47.
- Letourneau, P.C. (1983). Differences in the organization of actin in the growth cones compared with the neurites of cultured neurons from chick embryos. *J. Cell Biol.* **97**:963-973.
- Lewis, G.P.; Erickson, P.A.; Guérin, C.J.; Anderson, D.H. y Fisher, S.K. (1989). Changes in the expression of specific Müller cell proteins during long-term retinal detachment. *Exp. Eye Res.* **49**:93-111.
- Li, H. y Sheffield, J. D. (1984). Isolation and characterization of flat cells, a subpopulation of the embryonic chick retina. *Cell Tissue Res.* **16**:843-857.
- Liepe, B.A.; Stone, C.; Koistinaho, J. y Copenhagen, D.R. (1994). Nitric oxide synthase in Müller cells and neurons of salamander and fish retina. *J. Neurosci.* **14**:7641-7654.
- Lillien, L. y Cepko, C. (1992). Control of proliferation in the retina: temporal changes in responsiveness to FGF and TGF α . *Development* **115**:253-266.
- Ling, E.-A. y Wong, W.-C. (1993). The origin and nature of ramified and amoeboid microglia: a historical review and current concepts. *Glia* **7**:9-18.
- Linser, P. y Moscona, A.A. (1979). Induction of glutamine synthetase in embryonic neural retina: localization in Müller fibers and dependence on cell interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **76**:6476-6480.

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

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

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

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

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

López-Gallardo, M.; Prada, F.; Quesada, A.; Medina, J.I.; Spira, A. y Prada, C. (1995). Co-localization of GABA and Choline acetyltransferase immunoreactivity in displaced amacrine cells in the early developing retina. *Proc. of the Congress of the European Developmental Biology Organization (EDBC 95)*, pág. 55.

López-Gallardo, M. (1995) Desarrollo de las células piramidales del hipocampo de rata y estudio de su contenido en ADN. *Ediciones Universidad Complutense. Tesis Doctoral.* En prensa.

López-López, M.R. (1991). Neurogénesis y diferenciación de los fotorreceptores de la retina. Estudio en el embrión de pollo. *Ediciones Universidad Complutense. Tesis Doctoral.* 1991, pp:1-229.

Madreperla, S.A. y Adler, R. (1989). Opposing microtubule- and actin-dependent forces in the development and maintenance of structural polarity in retinal photoreceptors. *Dev. Biol.* **131**:149-160.

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

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

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

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

- Mantyck, G.J.; Hageman, G.S. y Devaskar, S.U. (1993). Characterization of glucose transporter isoforms in the adult and developing human eye. *Endocrinology* **133**:600-607.
- Mason, C.A.; Edmondson, J.C. y Hatten, M.E. (1988) The extending astroglial process: development of glial cell shape, the growing tip, and interactions with neurons. *J. Neurosci.* **8**:3124-3134.
- McCabe, C.F. y Cole, G.J. (1992). Expression of the barrier-associated proteins EAP-300 and claustrin in the developing central nervous system. *Dev. Brain Res.* **70**:9-24.
- McCarthy, K.D. y De Vellis, J. (1980). Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cells cultured from rat cerebral tissue. *J. Cell Biol.* **85**:890-902.
- McLoon, S.C. y Barnes, R.B. (1989). Early differentiation of retinal ganglion cells: An axonal protein expressed by premigratory and migrating retinal ganglion cells. *J. Neurosci.* **9**:1424-1432.
- Meller, K. (1987). Gradient isolation of glial cells: Evidence that flat epithelial cells are astroglial cell precursors. *Cell Tissue Res.* **249**:79-88.
- Meller, K. y Glees, P. (1965). The differentiation of neuroglia -Müller- cells in the retina of chick. *Z. Zellforsch.* **66**:321-332.
- Meller, K. y Tetzlaff, W. (1976). Scanning electron microscopic studies on the development of the chick retina. *Cell Tissue Res.* **170**:145-159.
- Miller, R.F. y Dowling, J.E. (1970). Intracellular responses of the Müller (glial) cells of the mudpuppy retina: Their relation to b-wave of the electroretinogram. *J. Neurophysiol.* **33**:323-341.
- Moore, C.L. y Gruberg, E.R. (1974). The distribution of succinic semialdehyde dehydrogenase in the brain and retina of the tiger salamander (*Ambystoma tigrinum*). *Brain Res.* **67**:467-478.
- Morest, D.K. (1970). The pattern of neurogenesis in the retina of the rat. *Z. Anat. Entwickl.-Gesch.* **131**:45-67.
- Morón, A. (1992). Diferenciación de la retina de los vertebrados: ciclo celular, morfogénesis y determinación del contenido de DNA de los fotorreceptores. Estudio en la rata. *Ediciones Universidad Complutense. Tesis Doctoral.* En prensa.
- Moscona, A. (1961). Rotation-mediated histogenetic aggregation of dissociated cells: A quantifiable approach to cell interactions in vitro. *Exp. Cell Res.* **22**:455-475.
- Müller, H. (1851). Zur histologie der Netzhaut. *Z. wiss. Zool.* **3**:234.

- Murphy, S. y Pearce, B. (1987). Functional receptors for neurotransmitters on astroglial cells. *Neurosci.* **22**:381-394.
- Nakazawa, T.; Tachi, S.; Aikawa, E. y Ihnuma, M. (1993). Formation of the myelinated nerve fiber layer in the chicken retina. *Glia.* **8**:114-121.
- Negishi, K.; Teranishi, T. y Kato, S. (1982). New dopaminergic and indoleamine-accumulating cells in the growth zone of goldfish retinas after neurotoxic destruction. *Science.* **216**:747-749.
- Newman, E.A. (1984). Regional specialization of retinal glial cell membrane. *Nature* **309**:155-157.
- Newman, E.A. (1985a). Membrane physiology of retinal glial (Müller) cells. *J. Neurosci.* **5**:2225-2239.
- Newman, E. A. (1985b). Voltage dependent calcium and potassium channels in retinal glial cells. *Nature* **317**:809-811.
- Newman, E.A. (1987). Distribution of potassium conductance in mammalian Müller (glial) cells: a comparative study. *J. Neurosci.* **7**:2423-2432.
- Newman, E.A. (1991). Sodium-bicarbonate cotransport in retinal Müller (glial) cells of the salamander. *J. Neurosci.* **11**:3972-3983.
- Newman, E.A. (1993). Inward-rectifying potassium channels in retinal glial (Müller) cells. *J. Neurosci.* **13**:3333-3345.
- Newman, E.A. (1994). A physiological measure of carbonic anhydrase in Müller cells. *Glia* **11**:291-299.
- Newman, E.A.; Frambach, D.A. y Odette, L.L. (1984). Control of extra cellular potassium levels by retinal glial cells K⁺ siphoning. *Science* **225**:1174-1175.
- Nilius, B. y Reichenbach, A. (1988). Efficient K⁺ buffering by mammalian retinal glial cells is due to cooperation of specialized ion channels. *Pflügers Arch.* **411**: 654-660.
- Nona, S.N.; Shehab, S.A.S.; Stafford, C.A. y Cronly-Dillon, J.R. (1989). Glial fibrillary acidic protein (GFAP) from goldfish: Its localisation in visual pathway. *Glia.* **2**:189-200.
- Ohanian, C. (1972). Histochemical studies on phosphorylase activity in the tissues of the albino rat under normal and experimental conditions. *Acta Histochem.* **44**:244-263.
- Parck, C.M. y Hollenberg, M.J. (1989). Basic fibroblast growth factor induces retinal regeneration *in vivo*. *Dev. Biol.* **134**:201-205.

Pfeiffer, B.; Grosche, J.; Reichenbach, A. y Hamprecht, B. (1994). Immunocytochemical demonstration of glycogen phosphorylase in Müller (glial) cells of the mammalian retina. *Glia* 12:62-67.

Philp, N.J. y Nachmias, V.T. (1985). Components of the cytoskeleton in the retinal pigmented epithelium of the chick. *J. Cell. Biol.* 101:358-362.

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

Poitry-Yamate, C. L. y Tsacopoulos, M. (1992). Glucose metabolism in freshly isolated Müller glial cell from a mammalian retina. *J. Comp. Neurol.* 320:257-266.

Pollenz, R.S. y McCarthy, K.D. (1986) Analysis of cyclic AMP-dependent changes in intermediate filament protein phosphorylation and cell morphology in cultured astroglia. *J. Neurochem.* 47:9-17.

Polyak, S.L. (1941). *The retina*. University of Chicago Press. Chicago.

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

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

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

Prada, C.; Puga, J.; Perez-Méndez, L.; López, R. y Ramírez, G. (1991). Spatial and temporal patterns of neurogenesis in the chick retina. *Europ. J. Neurosci.* 3:559-569.

Prada, C. y Ramirez, G. (1983). A Golgi study of the cell cycle and early neuron and glia differentiation in the chick retina. *Ramon y Cajal's contribution to the Neuroscience*. Elsevier Science Publis, B. V.

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

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

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

Prada, F.A.; Magalhães, M.M.; Coimbra, A. y Genis-Gálvez, J.M. (1989b). Morphological Differentiation of the Müller Cell: Golgi and Electron Microscopy Study in the Chick Retina. *J. Morphol.* **201**:11-22.

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

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

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

Ramón y Cajal, S. (1892). La retina des vertébrés. *La Cellule* **9**:119-225. Traducido en 1972 por Thorpe, S.A. y Glickstein, M. Charles C. Thomas Publisher. Springfield, USA.

Ramón y Cajal, S. (1909-1911). Histologie du système nerveux de l'home et des vertébrés. Reeditada en 1972 por Instituto Ramón y Cajal, C.S.I.C., Madrid.

Rasmussen, K.E. (1972). A morphometric study of the Müller cell cytoplasm in the rat retina. *J. Ultrastruct. Res.* **44**:96-112.

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

Rasmussen, K.E. (1974). The Müller cell: A comparative study of rod and cone retinas with and without retinal vessels. *Exp. Eye Res.* **20**:151-166.

Rasmussen, K.E. (1975). A morphometric study of the Müller cell in rod and cone retinas with and without retinal vessels. *Exp. Eye Res.* **20**:151-166.

Raviola, G. (1977). The structural basis of the blood-ocular barriers. *Exp. Eye Res.* **25**:27-63.

Reale, E.; Luciano, L. y Spitznas, M. (1978). Communicating junctions of the human sensory retina. *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* **192**:73-87.

Reh, T.A. (1987). Cell-specific regulation of neuronal production in the larval frog retina. *J. Neurosci.* **7**:3317-3324.

Reh, T.A. y Tully, T. (1986). Regulation of tyrosine hydroxylase-containing amacrine cell number in the larval frog retina. *Dev. Biol.* **114**:463-469.

Reichelt, W. y Pannicke, T. (1993). Voltage-dependent K⁺ currents in guinea pig Müller (glial) cells show different sensitivities to blockade by Ba²⁺. *Neurosci. Lett.* **155**:15-18.

- Reichenbach, A. (1987). Quantitative and qualitative morphology of rabbit retinal glia. A light microscopical study on cells both in situ and isolated by papaine. *J. Hirnforsch.* **28**:213-220.
- Reichenbach, A. (1989). Attempt to classify glial cells by means of their process specialization using the rabbit retinal Müller cell as an example of cytotopographic specialization of glial cells. *Glia* **2**:250-259.
- Reichenbach, A.; Baar, U.; Petter, H.; Schaff, P.; Osborne, N.N. y Buse, E. (1992). Neuronal ectopia in tiger retina. *J. Hirnforsch.* **33**:585-593.
- Reichenbach, A. y Birkenmeyer, G. (1984). Preparation of isolated Müller cells of the mammalian (rabbit) retina. *Z. Mikrosk.-anat. Forsch., Leipzig.* **5**•S:789-792.
- Reichenbach, A.; Dettmer, D.; Brückner, G.; Neumann, N. y Birkenmeyer, G. (1985). Morphological variability, lectin binding and Na⁺, K⁺-activated adenosine triphosphatase activity of isolated Müller (glial) cells from the rabbit retina. *Neurosci. Lett.* **55**:29-34.
- Reichenbach, A. y Eberhardt, W. (1986). Intracellular recordings from isolated rabbit retinal Müller (glial) cells. *Pflügers Arch.* **407**: 348-353.
- Reichenbach, A.; Frömter, C.; Engelmann, R.; Wolburg, H.; Kasper, M. y Schnitzer, J. (1995). Müller glial cells of the tree shrew retina. *J. Comp. Neurol.* **360**:257-270.
- Reichenbach, A.; Hagen, E.; Schippel, K.; Brückner, G.; Reichelt, W. y Leibnitz, L. (1988a). Cytotopographical specialization of enzymatically isolated rabbit retinal Müller cells: structure, ultrastructure, and ³H-ouabain binding sites. *Z. Mikrosk.-anat. Forsch., Leipzig.* **6**•S:897-912.
- Reichenbach, A.; Hagen, E.; Schippel, K. y Eberhardt, W. (1988b). Quantitative electron microscopy of rabbit Müller (glial) cells in dependence on retinal topography. *Z. Mikrosk.-anat. Forsch.* **102**:721-755.
- Reichenbach, A. y Reichelt, W. (1986). Postnatal development of radial glial (Müller) cells of the rabbit retina. *Neurosci. Lett.* **7**:125-130.
- Reichenbach, A. y Robinson, S.R. (1995). Ependymoglia and ependymoglia-like cells. In *Neuroglia* (Kettenman, H. y Ransom, B. eds.), Oxford University Press.
- Reichenbach, A.; Schippel, K.; Schümann, R. y Hagen, E. (1988c). Ultrastructure of rabbit retinal nerve fibre layer - Neuro-glial relationships, myelination, and nerve fibre spectrum. *J. Hirnforsch.* **29**:481-491.
- Reichenbach, A.; Schneider, H.; Leibnitz, L.; Reichelt, W.; Schaaf, P. y Schümann, R. (1989). The structure of rabbit retinal Müller cells is adapted to the surrounding retinal layers. *Anat. and Embryol.* **180**:71-79.

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

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

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

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

Rhodes, R.H. (1984). Ultrastructure of Müller cells in the developing human retina. *Graefe's Arch. Ophthalmol.* **221**:171-178.

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

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

Río-Hortega, P. del. (1919). El tercer elemento de los centros nerviosos. I. La microglía normal. II. Intervención de la microglía en los procesos patológicos. III. Naturaleza probable de la microglía. *Bol. Soc. Esp. Biol.* **9**:69-129.

Robinson, S.R. y Dreher, Z. (1990). Müller Cells in Adult Rabbit Retinae: Morphology, Distribution and Implications for Function and Development. *J. Comp. Neurol.* **292**:178-192.

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

Rodieck, R.W. (1973). *The vertebrate retina: principles of structure and function.* W.H. Freeman and Company, San Francisco, pp. 338-368.

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

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

- Salm, A.K.; Smithson, K.G. y Hatton, G.I. (1985). Lactation-associated redistribution of the glial fibrillary acidic protein within the supraoptic nucleus. *Cell Tissue Res.* **242**:9-15.
- Sarthy, P.V. (1982). The uptake of [³H] gamma-aminobutyric acid by isolated glial (Müller) cells from the mouse retina. *J. Neurosci. Meth.* **5**:77-82.
- Sarthy, P.V. (1983). Release of [³H] gamma-aminobutyric acid from glial (Müller) cells of the rat retina: effects of K⁺, veratridine, and ethilendiamine. *J. Neurosci.* **3**:2494-2503.
- Sarthy, P.V. (1985). Establishment of Müller cell cultures from adult rat retina. *Brain Res.* **337**:138-141.
- Sarthy, P.V.; Bridges, C.D.; Kretzer, F.L. y Lam, D.M.K. (1981). Lectin receptors on cells isolated from the turtle retina. *J. Comp. Neurol.* **202**:561-569.
- Sarthy P. V. y Bunt, A. H. (1982). The ultrastructure of isolated glial (Müller) cells from the turtle retina. *Anat. Rec.* **202**:275-283.
- Sarthy P. V. and Lam D. M. K. (1978). Biochemical studies of isolated glial (Müller) cells from turtle retina. *J. Comp. Neurol.* **202**:561-569.
- Sauer, F.C. (1935). Mitosis in the neural tube. *J. Comp. Neurol.* **62**:377-405.
- Sauer, F. C. y Walker, B. E. (1959). Radioautographic studies of interkinetic nuclear migration in the neural tube. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **101**:557-560.
- Schlosshauer, B.; Grauer, D.; Dotting, D. y Vanselow, J. (1991). Expression of a novel Müller glia specific antigen during development and after optic nerve lesion. *Development* **111**:789-799.
- Schnitzer, J. (1985). Distribution and immunoreactivity of glia in the retina of the rabbit. *J. Comp. Neurol.* **240**:128-142.
- Schnitzer, J. (1988). Immunocytochemical studies on the development of astrocytes, Müller (glial) cells, and oligodendrocytes in the rabbit retina. *Dev. Brain Res.* **44**:59-72.
- Schnitzer, J.; Franke, W.W. y Schachner, M. (1981). Immunocytochemical demonstration of vimentin in astrocytes and ependymal cells of the developing and adult mouse nervous system. *J. Cell Biol.* **90**:435-447.
- Schnitzer, J. y Karschin, A. (1986). The shape and distribution of astrocytes in the retina of the adult rabbit. *Cell Tissue Res.* **246**:91-102.
- Schulze, E. y Neuhoff, V. (1983). Uptake, autoradiography and release of taurine and homotaurine from retinal tissue. *Int. J. Neurosci.* **18**:253-268.

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

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

Shain, W.; Bausback, D.; Fiero, A.; Madelian, V. y Turner, J.N. (1992). Regulation of receptor-mediated shape change in astroglial cells. *Glia* 5:223-238.

Shain, W.; Forman, D.S.; Madelian, V. y Turner, J.N. (1987). Morphology of astroglial cells is controlled by beta-adrenergic receptors. *J. Cell Biol.* 105:2307-2314.

Shao, Y.; Enkvist, M.O.K. y McCarthy, K.D. (1994). Glutamate blocks astroglial stellation: effect of glutamate uptake and volume changes. *Glia* 11:1-10.

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

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

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

Sinha, U.; Wolz, S.A. y Lad, P.J. (1991). Two new extracellular serine proteases from *Streptomyces fradiae*. *Int. J. Biochem.* 23:979-984.

Skatchkov, S.N.; Vyklický, L. y Orkand, R.K. (1995). Potassium currents in endfeet of isolated Müller cells from the frog retina. *Glia* 15:54-64.

Skene, J.H.P.; Jacobson, R.D.; Snipes, G.J.; McGuire, C.B.; Norden, J.J. y Freeman, J.A. (1986). A protein induced during nerve growth (GAP-43) is a major component of growth-cone membranes. *Science* 233:783-786.

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

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

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

- Stirling, C.E. y Sarthy, P.V. (1985). Localization of the Na-K pump in turtle retina. *J. Neurocytol.* **14**:33-47.
- Stone, J. y Dreher, Z. (1987). Relationship between astrocytes, ganglion cells and the vasculature of the retina. *J. Comp. Neurol.* **255**:35-49.
- Stone, J.; Holländer, H. y Dreher, Z. (1991). "Sunbursts" in the inner plexiform layer: a spectacular feature of Müller cells in the retina of the cat. *J. Comp. Neurol.* **303**:400-411.
- Szaro, B.G. y Gainer, H. (1988). Immunocytochemical identification of non-neuronal intermediate filament proteins in the developing *Xenopus laevis* nervous system. *Dev. Brain Res.* **43**:207-224.
- Tachibana, M. (1981) Membrane properties of solitary horizontal cells isolated from goldfish retina. *J. Physiol.* **321**:141-161.
- Thanos, S. (1992). Sick photoreceptors attract activated microglia from the ganglion cell layer: a model to study the inflammatory cascades in rats with inherited retinal dystrophy. *Brain Res.* **588**:21-28.
- Theele, D.P. y Streit, W.J. (1993). A chronicle of microglial ontogeny. *Glia.* **7**:5-8.
- Torrelli, S.; Sogos, V.; Marzilli, M.A.; D'Atri, M. y Gremo, F. (1989). Developmental expression of intermediate filament proteins in the chick embryo retina: *in vivo* and *in vitro* comparison. *Exp. Biol.* **48**:187-196.
- Torres-Alemán, I.; Rejas, M.T.; Pons, S. y García-Segura, L.M. (1992). Estradiol promotes cell shape changes and glial fibrillary acidic protein redistribution in hypothalamic astrocytes *in vitro*: a neuronal-mediated effect. *Glia* **6**:180-187.
- Tout, S.; Chan-Ling, T.; Holländer, H. y Stone, J. (1993). The role of Müller cells in the formation of the blood-retinal barrier. *Neurosci.* **55**:291-301.
- Trachtenberg, M.C. y Packey, D.J. (1983). Rapid isolation of mammalian Müller cells. *Brain Res.* **261**:43-52.
- Triviño, A.; Ramírez, J.M.; Ramírez, A.I.; Salazar, J.J. y García-Sánchez, J. (1992). Retinal perivascular astroglia: an immunoperoxidase study. *Vision Res.* **32**:1601-1607.
- Turner, R.W.; Borg, L.L. y Syed, N.I. (1995). A technique for the primary dissociation of neurons from restricted regions of the vertebrate CNS. *J. Neurosci. Methods* **56**:57-70.
- Turner, D.L. y Cepko, C.L. (1987). A common progenitor for neurons and glia persists in rat retina late in development. *Nature* **328**:131-136.
- Turner, D.L.; Snyder, E.Y. y Cepko, C.L. (1990). Lineage-independent determination of cell type in the embryonic mouse retina. *Neuron* **4**:833-845.

- Uchihori, Y. y Puro, D.G. (1993). Glutamate as a neuron-to-glial signal for mitogenesis: role of glial N-methyl-D-aspartate receptors. *Brain Res.* **613**:212-220.
- Uga, S. y Smelser, G.K. (1973a). Comparative study of the fine structure of retinal Müller cells in various vertebrates. *Invest. Ophthalmol.* **12**:295-307.
- Uga, S. y Smelser, G.K. (1973b). Electron microscopic study of the development of retinal Müllerian cells. *Invest. Ophthalmol.* **12**:295-307.
- Ulloa, L. y Avila, J. (1996). Involvement of β and γ -actin isoforms in neuroblastoma differentiation. *Europ. J. Neurosci.* **En prensa**.
- Van Harreveld, A. (1982). Swelling of the Müller fibers in the chicken retina. *J. Neurobiol.* **13**:519-536.
- Vandekerckhove, J. y Weber, J. (1978). Mammalian cytoplasmic actins are the products of at least two genes and differ in primary structure in at least 25 identified positions from skeletal muscle actins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **75**:1106-1110.
- Walls, G.L. (1942). *The vertebrate eye and its adaptive radiation*. Michigan: Cranbook Press.
- Watanabe, T.; Mio, Y; Hoshino, F.B.; Nagamatsu, S.; Hirose, K. y Nakahara, K. (1994). GLUT2 expression in the rat retina: localization at the apical ends of Müller cells. *Brain Res.* **655**:128-134.
- Watanabe, T. y Raff, M.C. (1988). Retinal astrocytes are immigrants from the optic nerve. *Nature* **332**:834-837.
- Watanabe, T. y Raff, M.C. (1992). Rod photoreceptor development *in vitro*: intrinsic properties of proliferating neuroepithelial cells change as development proceeds in the rat retina. *Neuron* **2**:461-467.
- Way, M. y Weeds, A. (1990). Cytoskeletal ups and downs. *Nature* **344**:292-294.
- Waymouth, C. (1974). To disaggregate or not to disaggregate, injury and cell disaggregation, transient or permanent?. *In vitro* **10**:97-111.
- Waymouth, C. (1982). Methods for obtaining cells in suspensions from animal tissues. In *Cell separation methods and selected applications* (Pretlow Th. G. and Pretlow Th. P. eds.). Vol 1, pp. 1-29. Academic Press, Inc. New York.
- Weiler, R. y Janssen-Bienhold, U. (1993). Spinule-type neurite outgrowth from horizontal cells during light adaptation in the carp retina: an actin-dependent process. *J. Neurocytol.* **22**:129-139.

Weinstein, D.E.; Shelanski, M.L. y Liem, R.K.H. (1991). Suppression by antisense mRNA demonstrates a requirement for the glial fibrillary acidic protein in the formation of stable astrocytic processes in response to neurons. *J. Cell. Biol.* **112**:1205-1213.

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

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

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

Wolburg, H. y Berg, K. (1987). Heterogeneity of Müller cell endfeet in the rabbit retina as revealed by freeze-fracturing. *Neurosci. Lett.* **82**:273-277.

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

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

Wolburg, H.; Reichelt, W.; Stolzenburg, J.-U.; Richter, W. y Reichenbach, A. (1990). Rabbit retinal Müller cells in cell culture show gap and tight junctions which they do not express in situ. *Neurosci. Lett.* **111**:58-63.

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