

Departamento de Fisiología Humana
Facultad de Medicina
Universidad Complutense
MADRID

DIFERENCIACION DE LA RETINA DE LOS VERTEBRADOS: CICLO CELULAR,
MORFOGENESIS Y DETERMINACION DEL CONTENIDO EN DNA DE LOS
FOTORRECEPTORES. ESTUDIO EN LA RATA.

Angela Morón Alejandre

Director: Carmen Prada Elena
Codirector: Rosario López López
Departamento de Fisiología
Facultad de Medicina
Universidad Complutense de Madrid

Madrid, Septiembre 1992

Departamento de Fisiología Humana
Facultad de Medicina
Universidad Complutense
MADRID

DIFERENCIACION DE LA RETINA DE LOS VERTEBRADOS: CICLO CELULAR,
MORFOGENESIS Y DETERMINACION DEL CONTENIDO EN DNA DE LOS
FOTORRECEPTORES. ESTUDIO EN LA RATA.

Trabajo realizado por Angela Morón Alejandre, en el Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid, bajo la dirección de la Dra. Carmen Prada Elena.

Fdo. Carmen Prada Elena
Profesora Titular de Biología
Facultad de Medicina

Fdo. Angela Morón Alejandre
Licenciada en Medicina

Madrid, septiembre de 1992



DEPARTAMENTO DE FISILOGIA

FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
CIUDAD UNIVERSITARIA
28040 MADRID

D. FRANCISCO J. RUBIA VILA, Catedrático de Fisiología y Director del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid

CERTIFICA: Que el trabajo de Dña. Angela Morón Alejandro, titulado: "Diferenciación de la retina de los vertebrados: ciclo celular, morfogénesis y determinación del contenido en DNA de los fotorreceptores. Estudio en la rata", ha sido realizado en este Departamento y cumple los requisitos necesarios para optar al grado de Doctor.

Para que conste, y a instancias de la interesada firmo el presente certificado en Madrid a veintiocho de septiembre de mil novecientos noventa y dos.

Fdo. F.J. Rubia Vila



DEPARTAMENTO DE FISILOGIA

FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
CIUDAD UNIVERSITARIA
28040 MADRID

Da. CARMEN PRADA ELENA, Profesora Titular del Departamento de Fisiología Humana de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid

CERTIFICA: Que la Tesis Doctoral titulada: "Diferenciación de la retina de los vertebrados: ciclo celular, morfogénesis y determinación del contenido en DNA de los fotorreceptores. Estudio en la rata", que presenta Da Angela Morón Alejandre para optar al grado de Doctor ha sido realizada bajo su dirección.

Madrid, veintiocho de septiembre de mil novecientos noventa y dos.

Fdo. Carmen Prada Elena

Esta investigación ha sido financiada a través del proyecto PS 87-0033 de la Dirección General de Investigación Científica y Técnica, y de los proyectos 88/1684 y 89/0063 del Fondo de Investigaciones Sanitarias (Investigador principal: Dña. Carmen Prada Elena)

Quisiera hacer constar mi agradecimiento a la Dr^a Carmen Prada, no sólo por aceptar la dirección de este trabajo, sino por su dedicación, apoyo y estímulo pues sin ellos no hubiese sido posible realizarlo.

A la Dr^a Rosario López por su colaboración en la dirección de este trabajo y porque en todo momento estuvo a mi lado para darme el apoyo que todos necesitamos tanto cuando empezamos a movernos en el mundo de la ciencia.

A Juan Ignacio Medina, Meritxell López y Rosa Vígara, por la estimable acogida y ayuda que me han brindado.

A la Dr^a Asunción Colino, porque sus consejos y ayuda han hecho posible mi permanencia en la investigación.

Finalmente quiero agradecer a mi familia y amigos la paciencia y comprensión que me han prestado.

En memoria de mi sobrino Carlos y mi amigo Pepe.

I N D I C E

I. INTRODUCCION	
I.1 LA RETINA DE LOS VERTEBRADOS: ESTRUCTURA Y FUNCION	2
I.2 ESTRUCTURA DE LOS FOTORRECEPTORES	14
I.2.1 Segmento externo	17
I.2.2 Cilio de conexión	19
I.2.3 Segmento interno	20
I.2.4 Membrana limitante externa	25
I.2.5 Soma	25
I.2.6 Fibra de conexión con el terminal sináptico	27
I.2.7 Terminal sináptico	27
I.3 FUNCION DE LOS FOTORRECEPTORES: FOTOTRANSDUCCION	29
I.4 DIFERENCIACION DE LAS CELULAS FOTORRECEPTORES	36
I.4.1 Neurogénesis	38
I.4.2 Morfogénesis	40
II. OBJETIVOS Y DISEÑO DE LOS EXPERIMENTOS	48
III. MATERIALES Y METODOS	
III.1 MATERIALES	55
III.1.1 Material biológico	55
III.1.2 Productos químicos y enzimas	55
III.1.3 Instrumentos	56
III.2 METODOS	57
III.2.1 Animales de experimentación	57
III.2.2 Nuevo método de disociación celular	57
III.2.3 Método de Golgi Colonnier	60
III.2.4 Método de determinación del contenido celular de DNA	61

IV. RESULTADOS	
IV.1 METODO DE DISGREGACION CELULAR DE LA RETINA	66
IV.2 COMPORTAMIENTO DE LOS NEUROBLASTOS DE LOS FOTORRECEPTORES	80
IV.2.1 Estudio del comportamiento de los neuroblas- de los fotorreceptores por disociación ce- lular	81
IV.2.1.1 Clasificación de las formas y cuantifi- cación de las mismas	90
IV.2.2 Estudio del comportamiento de los neuroblas- tos de los fotorreceptores por el método de Golgi	98
IV.3 ESTUDIO DEL CONTENIDO EN DNA DE LOS FOTORRECEP- TORES	108
V. DISCUSION	
V.1 Método de disociación celular	115
V.2 Comportamiento de los neuroblastos de los fo- torreceptores	122
V.3 Clasificación de las formas y cuantificación de de las mismas	131
V.4 Contenido en DNA de los fotorreceptores	134
VI. CONCLUSIONES	146
VII. BIBLIOGRAFIA	149

I. INTRODUCCION

I.1 LA RETINA DE LOS VERTEBRADOS: ESTRUCTURA Y FUNCION.

La retina de los vertebrados es una fina lámina de tejido nervioso de aproximadamente 0,4 mm de grosor, situada en el fondo del ojo. Su función es recibir las señales luminosas y transformarlas en una serie de impulsos nerviosos que inmediatamente son enviados al cerebro a través del nervio óptico. Su estructura es muy similar en todas las retinas de los vertebrados. Los somas (núcleo y citoplasma bordeante) de sus neuronas están dispuestos en tres capas nucleares (Fig. I.1): nuclear externa, nuclear interna y de células ganglionares. Sus prolongaciones forman dos capas plexiformes: plexiforme externa y plexiforme interna, y la capa de fibras ópticas, la más interna de todas. Es por lo tanto una estructura en capas, relativamente sencilla respecto a otras porciones del cerebro y que ofrece ventajas como modelo experimental en neurobiología.

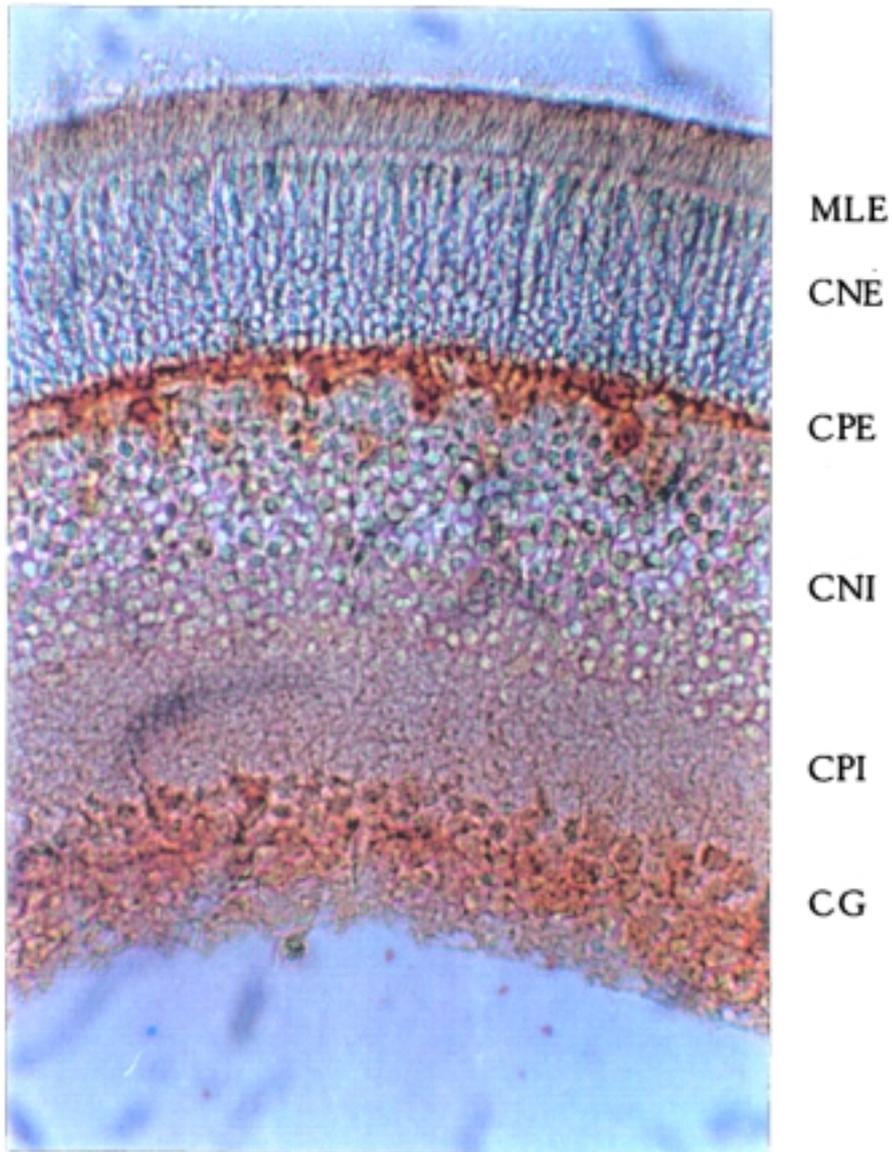


FIGURA I.1 Sección de retina de rata de 45 μ m de grosor en la que puede observarse las distintas capas celulares y determinadas células teñidas (marrón), por inmunohistoquímica, con un anticuerpo anti-calbindina. MLE, membrana limitante externa; CNE, capa nuclear externa; CPE, capa plexiforme externa; CNI, capa nuclear interna; CPI, capa plexiforme interna; CG, capa de células ganglionares.

La retina está formada por siete clases de neuronas (fotorreceptores, horizontales, bipolares, amacrinas, interplexiformes, ganglionares y ganglionares desplazadas, también llamadas células de Dogiel) y células de glía (Fig. I.2).

Gran parte del conocimiento que hoy tenemos sobre la estructura de la retina lo debemos a los trabajos de Cajal (1892), realizados en buen número de especies de vertebrados. Cajal descubrió y estudió ampliamente todas las clases de neuronas de la retina, menos las células interplexiformes, y dos tipos de células de glía (células de Müller y astrogλία). Además describió prácticamente todos los tipos y subtipos de células dentro de cada clase de neuronas. Sin embargo, en los últimos veinte años se han hecho aportaciones importantes, como son:

- 1) El descubrimiento de las células interplexiformes (Gallego 1971; Dowling y col. 1976; Kolb y West 1977).
- 2) El estudio en mayor profundidad de las células amacrinas desplazadas (Genis-Gálvez y col. 1977; Hughes y Wieniawa-Narkiewicz 1980; Ball y Dickson 1983) y de las células ganglionares desplazadas (Bunt y col. 1974; Bunt y Minckler 1977; Prada, y col. 1989; Prada y col. 1992).

- 3) La profundización en el conocimiento de la diversidad de células amacrinas y ganglionares (Kolb y col. 1981; Masland 1986).

La mayoría de las retinas de los vertebrados contienen dos tipos de células fotorreceptores: conos y bastones. Son células alargadas en dirección vítreo-pigmentaria, dispuestas en forma radial en la retina (Fig.I.2). Sus somas constituyen la capa nuclear externa (Fig. I.1). La porción más externa de estas células interactúa con las células de la retina pigmentaria, mientras que la porción más interna establece contactos sinápticos con las células horizontales y bipolares (Fig.I.3).

Dado que uno de los objetivos de esta tesis es el estudio del desarrollo de estas células, dedicamos el apartado 2 de esta introducción a una breve revisión de la estructura y función de las mismas, en diferentes especies y particularmente en la rata.

Las células horizontales tienen su soma formando parte de la primera fila (la más externa) de la capa nuclear interna (Fig. I.1). Sus dendritas se extienden lateralmente al soma en el plano horizontal de la retina y hacen contactos sinápticos con las prolongaciones internas de los fotorreceptores y con las dendritas de las células bipolares, a nivel de la capa plexiforme externa (Figs.I.2 y I.3). En los primates hay una única clase de célula

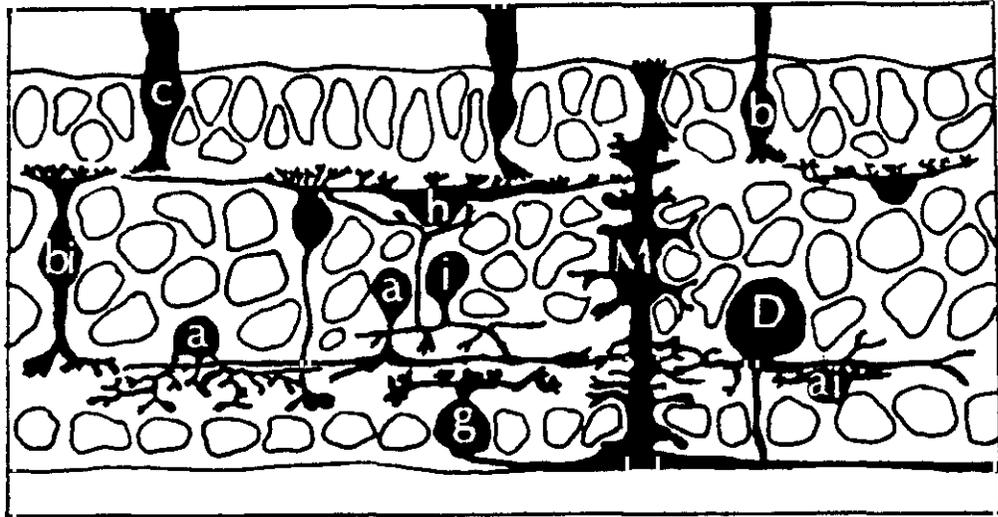


FIGURA 1.2 Esquema que muestra los tipos de células de la retina de los vertebrados, observados en preparaciones de Golgi. b, bastones; c, conos; bi, células bipolares; h, células horizontales; a, células amcrinas; ai, células amacrinas invertidas; g, células ganglionares; i, células interplexiformes; D, células de Dogiel ó células ganglionares desplazadas; M, células gliales de Müller. (Tomado de Dowling 1970 y modificado).

horizontal , la cual posee axón (Gallego y Sobrino 1975; Gallego 1976a,b). Sus dendritas sinaptan con los pedículos de los conos, mientras su axón parece sinaptar con las esférulas de los bastones. En el resto de los vertebrados existe esta clase de célula horizontal con axón y además otra que carece de axón (Leure-Dupree 1974). Las dendritas de las células horizontales sin axón se conectan entre sí mediante sinapsis eléctricas (gap-junctions), formando un plexo por toda la retina.

Las células bipolares tienen su soma en la capa nuclear interna (Fig. I.1), del que salen dos prolongaciones que se orientan verticalmente en la retina. La prolongación externa (Figs. I.2 y I.3) se ramifica a nivel de la capa plexiforme externa, dando dendritas que hacen conexiones con los fotorreceptores y células horizontales. Su prolongación interna se ramifica a nivel de la capa plexiforme interna, donde conecta con las células ganglionares y amacrinas. Su clasificación con criterios morfológicos permanece invariable desde que Cajal (1892) las clasificara en bipolares para conos y bipolares para bastones. Las bipolares para conos, conectan en la plexiforme externa exclusivamente con conos y en la plexiforme interna con ganglionares y amacrinas. Estos contactos los hacen en distintos estratos de la capa plexiforme interna. Las bipolares para bastones conectan en la capa plexiforme externa con bastones exclusivamente

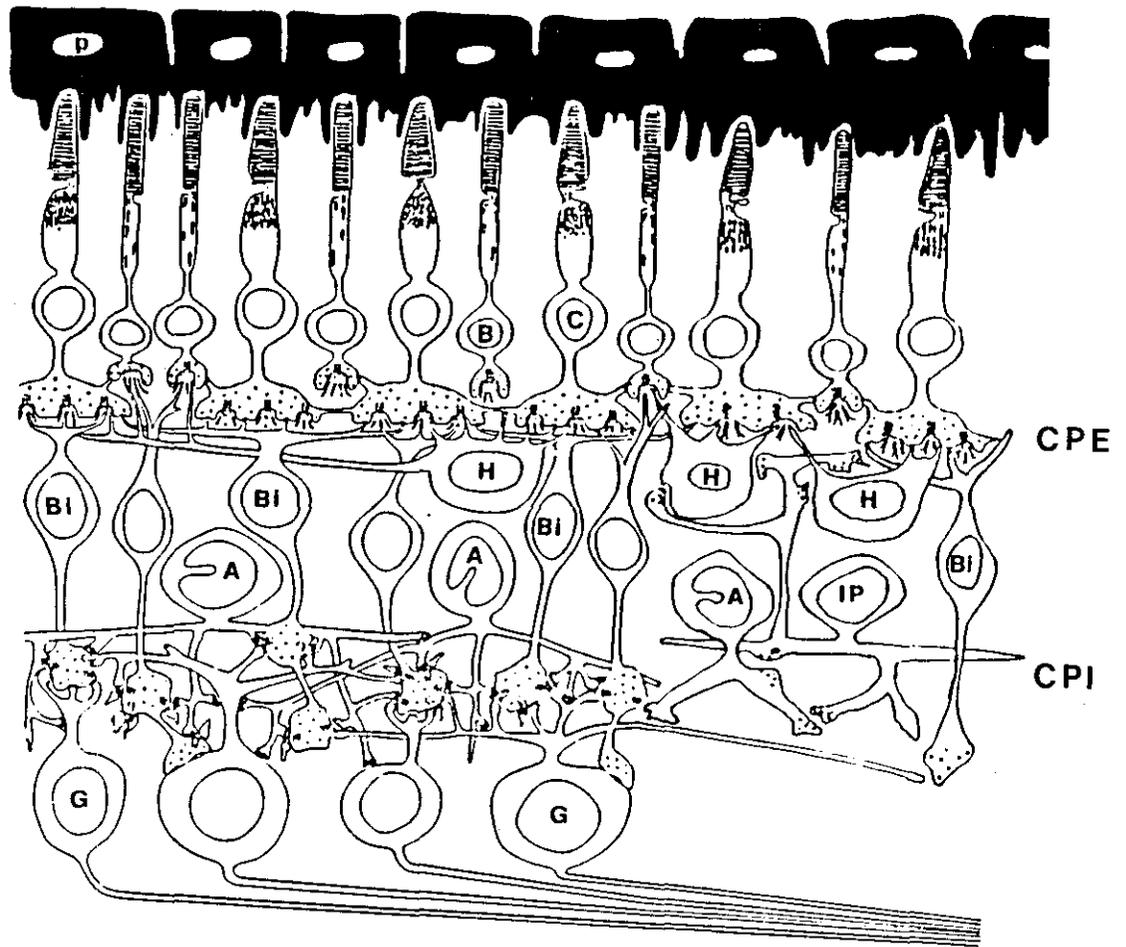


FIGURA I.3 Esquema que muestra las conexiones sinápticas entre las seis clases de neuronas de la retina de los vertebrados. B, bastones; C, conos; H, células horizontales; Bi, células bipolares; A, células amacrinas; G, células ganglionares; IP, células interplexiformes; p, células de la pigmentaria; CPE, capa plexiforme externa; CPI, capa plexiforme interna. (Tomado de Dowling 1970 y modificado).

y en la capa plexiforme interna con las llamadas células amacrinas del tipo AII. De modo que las bipolares para bastones no hacen contactos sinápticos directamente con las células ganglionares como lo hacen las bipolares para conos, sino a través de las amacrinas AII. Algunas de las bipolares, en vertebrados no mamíferos, se prolongan hasta la membrana limitante externa por una prolongación que se extiende desde el ramillete dendrítico de la capa plexiforme externa a la limitante; esta prolongación se conoce con el nombre de maza de Landolt, y su significado funcional se desconoce por el momento. Con frecuencia se encuentra que la prolongación externa de estas células se considera dendrita, mientras que la interna es considerada como axón aunque carece de cono axónico (característica ultraestructural que poseen todos los axones). En la rata, Leure-Dupree (1974) describió dos clases de células bipolares (Tipo I para bastones y Tipo II para conos) en función de la posición del soma, extensión del árbol dendrítico y longitud de la prolongación interna.

Las células amacrinas tienen sus somas colocados mayoritariamente en la capa nuclear interna. Generalmente se disponen ocupando el tercio interno de esta capa, aproximadamente (Fig. I.1). Sin embargo una población de células amacrinas tienen sus somas entre los de las células ganglionares y se las conoce con el nombre de células

amacrinas desplazadas ó invertidas (Fig. I.2). Las dendritas de las células amacrinas situadas normalmente, extienden sus dendritas en los distintos estratos de la capa plexiforme interna y hacen contactos sinápticos recíprocos con las células bipolares y contactos sinápticos convencionales con otras células amacrinas y con células ganglionares. Además algunas células amacrinas especialmente las de tipo AII (amacrinas que conectan con las bipolares para bastones, como hemos indicado anteriormente) conectan entre sí y con las células bipolares para conos mediante sinapsis eléctricas (Massey y Redburn, 1987; Leure-Dupree 1974). Las células amacrinas también hacen sinapsis con las células interplexiformes (Fig. I.3), las cuales a su vez devuelven información a la capa plexiforme externa a través de contactos sinápticos con las células horizontales y con las bipolares (Dowling 1979).

Cajal (1892) describió una gran diversidad de células amacrinas (hasta 14 tipos diferentes) usando criterios morfológicos. Hasta finales de la década de los años 60 se pensó que la diversidad morfológica de las células amacrinas eran meras variantes de un tipo celular homogéneo funcionalmente. Con las técnicas de neuroquímica hoy sabemos que prácticamente cada tipo de amacrina descrito por Cajal utiliza un neurotransmisor o un neuropéptido diferente (Masland 1986). Es más, la diversidad morfológica que describió Cajal se ha ampliado

recientemente; Kolb y col. (1981) han distinguido 22 tipos diferentes de células amacrinas en la retina del gato, basándose en el tamaño del campo dendrítico y el nivel en el que terminan sus prolongaciones en la capa plexiforme interna. En la rata Perry y Walker (1980) encontraron nueve tipos de células amacrinas morfológicamente distintos, siete de los cuales corresponden a células amacrinas desplazadas.

Las células interplexiformes tienen sus somas mezclados con los de las células amacrinas (Figs. I.2 y I.3). Su nombre se refiere al hecho de que estas células extienden prolongaciones en ambas capas plexiformes de la retina. En la capa plexiforme interna reciben contactos sinápticos convencionales únicamente de las células amacrinas (Dowling 1979). En la capa plexiforme externa tienen abundantes contactos sinápticos (presinápticos) con las células horizontales y algunos contactos sinápticos con las dendritas de las células bipolares. Las células interplexiformes constituyen, por lo tanto, una vía centrifuga del flujo de información en la retina, desde la capa plexiforme interna a la externa. Estas células no han sido descritas en la retina de las aves; sin embargo, su existencia en los peces teleósteos y en el mono del Nuevo Mundo (Dowling 1979), en el gato (Galligo 1971, Kolb y West 1977), y en la rata (Perry y Walker 1980), así como su especial sinaptología y su bien

conocida fisiología en el pez dorado (Dowling 1986), nos obligan a admitir que se trata de una clase de células existente en la retina de los vertebrados, con una función característica.

Las células ganglionares tienen sus somas formando una capa en el margen interno de la retina (Fig. I.1 y Figs. I.2 y I.3). Sus prolongaciones dendríticas salen del polo externo del soma y se extienden en la capa plexiforme interna, donde reciben contactos sinápticos de las células bipolares para conos y de las células amacrinas. Las células ganglionares transportan la información visual desde la retina al cerebro por medio de su axón. El tamaño de su soma y campo dendrítico es muy variable, sirviendo éstos en el gato y la rata como criterio para clasificarlas en tres tipos principales: α , β y γ , descritos por Boycott y Wässle (1974) en el gato, y que se corresponden con los tipos I, II y III de la rata (Perry 1979, 1981). Las células α tienen los somas y campos dendríticos más grandes, las γ son las más pequeñas y las β tienen somas intermedios. Más recientemente, los estudios de Kolb y col. (1981), también en el gato, han incrementado a 23 tipos el número de ganglionares morfológicamente diferentes. Esta diversidad morfológica está en consonancia con los 18 tipos de células ganglionares que se distinguen con criterios electrofisiológicos (Daw 1982). Una población de células ganglionares tiene sus somas co-

locados entre los de las células amacrinas que ocupan la fila más interna de la capa nuclear interna. Se conocen con el nombre de células ganglionares desplazadas o células de Dogiel (Fig. 1.2). Estas células han sido descritas prácticamente en todos los vertebrados. Las características morfológicas y ultraestructurales encontradas recientemente en el pollo por Prada, y col. (1989) y Prada, y col. (1992), junto con los estudios que muestran proyecciones específicas de estas células al núcleo de la raíz óptica basal, en el sistema óptico accesorio (Karten y col.1977), hacen pensar en un tipo de células ganglionares diferente a las normalmente localizadas, cuya función es por el momento desconocida.

Una parte de los resultados que presentamos en esta tesis son contribuciones a un mejor conocimiento de la estructura de la retina de los mamíferos, y abren nuevas perspectivas para el estudio de su estructura y función.

I.2 ESTRUCTURA DE LOS FOTORRECEPTORES.

Los fotorreceptores de la retina son las primeras células de la cadena que forma la vía visual y su función es la de transformar la energía luminosa en energía química. Son células alargadas en dirección vítreo-pigmentaria, y polarizadas: por un extremo reciben la energía luminosa y por el otro transmiten la información química. Además, estructural y funcionalmente están divididas en segmentos a lo largo del eje de la célula, el cual es paralelo a la dirección de los rayos luminosos que inciden sobre la retina.

Schultze (1866) clasificó los fotorreceptores por primera vez, con criterios morfológicos, en conos y bastones. Los bastones tienen segmentos externo e interno cilíndricos y de diámetros similares. Los conos tienen un segmento externo con forma cónica y un segmento interno

cilíndrico con un diámetro mayor que el segmento externo. Posteriormente, esta misma clasificación fue utilizada de forma general por Cajal (1892), quien además clasificó los conos de las aves en rectos, oblicuos y dobles. Trabajos de microscopía óptica posteriores a los de Cajal (Polyak 1957; Duke-Elder 1958), también coinciden en clasificar los fotorreceptores en conos y bastones. Las características ultraestructurales de las dos clases de fotorreceptores se conocieron más tarde, principalmente por los trabajos de Sjöstrand (1949, 1953a y 1953b, 1958), Pedler y Tansley (1963), Pedler y Tilly (1967) en la salamandrina. Sin embargo en el pollo los estudios realizados por Morris y Shorey (1967) y Morris (1970) muestran tres tipos de conos simples diferentes estructuralmente. Trabajos más recientes también en pollo (López, 1991) muestran que esta variedad es mucho mayor, distinguiendo claramente 12 tipos de conos y uno de bastones.

La estructura general de los fotorreceptores es constante en la mayoría de los vertebrados, aunque existen notables diferencias morfológicas (presumiblemente también funcionales) interespecíficas. Clásicamente se describe como fotorreceptor tipo, uno que incluye todas las estructuras descritas en los fotorreceptores de las diversas retinas de los vertebrados, independientemente de que sean conos o bastones. El fotorreceptor prototipo (Fig. 1.4) consta de los siguientes elementos desde la parte más ex-

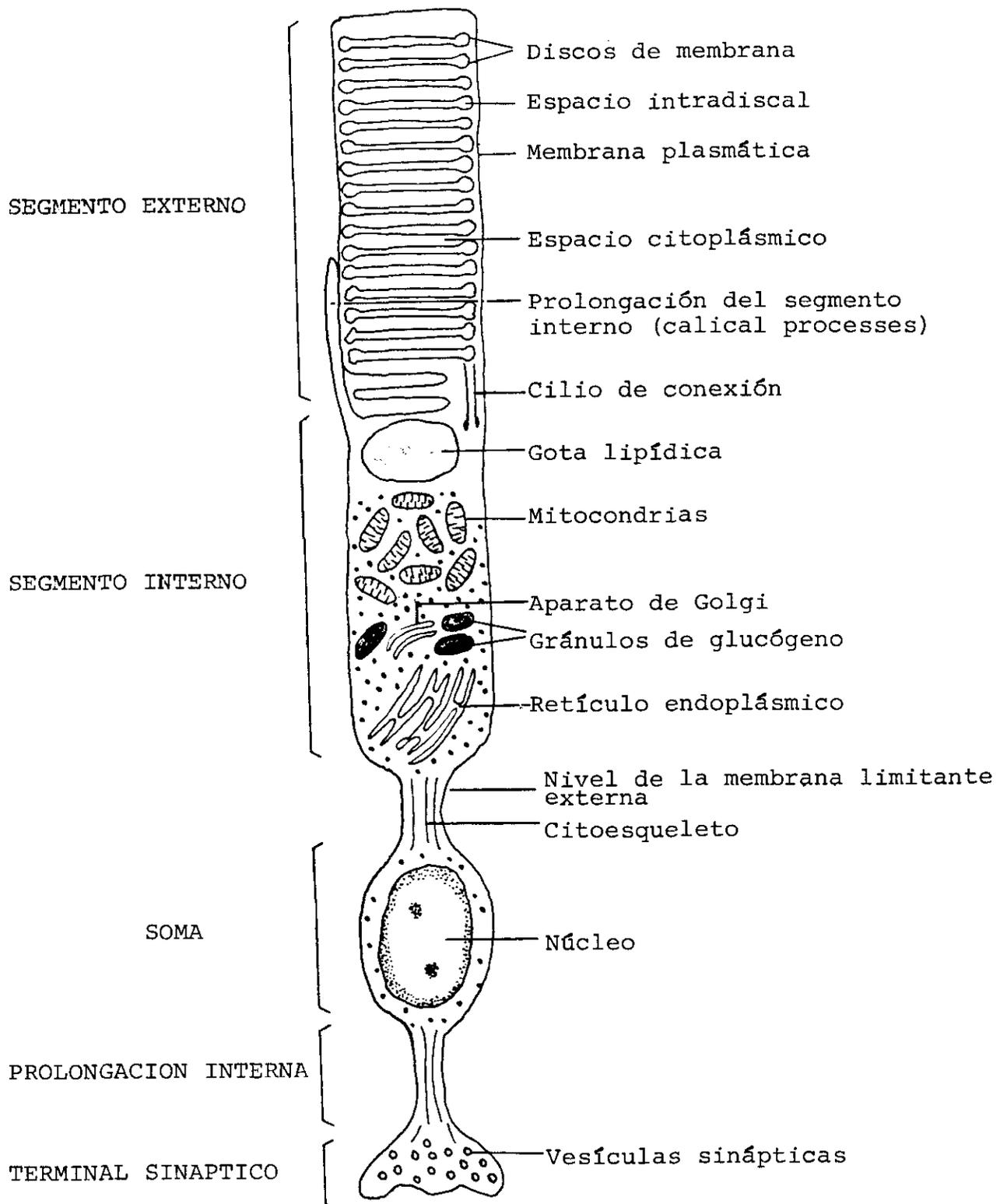


FIGURA 1.4 Estructura de un fotorreceptor ideal. Es una célula muy alargada en la que se distinguen compartimentos o segmentos que contienen orgánulos diferentes que les confieren funciones distintas. (Tomado de Stryer 1987 y modificado).

terna a la más interna de la célula:

- . Segmento externo
- . Cilio de conexión
- . Segmento interno, el cual incluye: Prolongaciones del mismo, Gota lipídica, Elipsoide, Paraboloide y Mioide.
- . Soma
- . Prolongación interna
- . Terminal sináptico

I.2.1 Segmento Externo

El segmento externo se localiza en la parte más escleral de la célula y se encuentra rodeado por las largas prolongaciones de las células de la pigmentaria. Está compuesto principalmente por los discos de membrana, en cuya bicapa lipídica se insertan los pigmentos fotosensibles: La rodopsina en los bastones y pigmentos similares a ésta en los conos.

Los segmentos externos de los bastones son cilíndricos, de mayor longitud y grosor que los de los conos; en éstos son más cortos y de forma cónica. En ambos casos los discos se disponen de forma perpendicular al eje principal del fotorreceptor, lo cual permite que la luz que no es capturada por un disco, sea capturada por el siguiente. Aunque existen excepciones en las que los discos se colocan de forma paralela (Fineran y Nicol 1978). En los

bastones los discos de membrana están desconectados de la membrana plasmática del segmento externo, excepto en la región más interna donde se forman continuamente a partir de la membrana basal del segmento externo (Nilsson 1964b, Steingberg y col.1980). En los conos los discos permanecen generalmente en contacto con la membrana plasmática (Morris y Shorey 1967; Cohen 1970, 1972; Bailey y Gouras 1985, Carter-Dawson y Lavail 1979a) por lo que también mantienen contacto con el medio extracelular.

Los discos más externos son fagocitados por las células de la pigmentaria cada 24 horas. En los bastones la fagocitosis se produce por la mañana a través de un mecanismo desencadenado por la luz. En los conos ocurre por la noche y el mecanismo lo desencadena la obscuridad (Young 1967, 1971; Bailey y Gouras 1985; Lavail 1976, 1980). La renovación de los discos de membrana se produce a partir de la membrana plasmática de la porción basal del segmento externo, a nivel del cilio de conexión, a una velocidad de 3-4 discos cada hora (Bailey y Gouras 1985). En monos, ratas y ratones, los discos son completamente reemplazados en el segmento externo cada 9 a 13 días (Lavail 1976). El proceso de la formación de nuevos discos de membrana aún no se conoce con profundidad, mientras unos autores piensan que se produce por invaginación de la membrana plasmática (Nilsson 1964b), otros piensan que es por evaginación (Steingber y col. 1980; Anderson y col. 1978).

En algunas especies, como en la rana (Nilsson 1964b), monos (Boewein y col. 1980), ovejas (Braekevelt 1983a) y ratón (Carter-Dawson y Lavail 1979a), los segmentos externos de los bastones presentan incisuras que dividen los discos de membrana. A veces son utilizadas como distintivo ultraestructural, pues los conos en general no las muestran, aunque también se han observado en algunos casos (Braekevelt 1983a; Carter-Dawson y Lavail 1979). Algunos autores piensan que estas incisuras podrían aumentar el perímetro de los discos y por tanto de la superficie de membrana.

En algunas especies de peces (guppy: Yacob y col. 1977), adosada al segmento externo se halla una estructura que contiene microtúbulos, formando una especie de cilio. Esta estructura se une al segmento externo por medio de un fino puente citoplásmico. Su función se desconoce, aunque se ha propuesto que podría constituir un canal de metabolitos para el segmento externo (Yacob y col. 1977). En otras especies no se ha descrito esta estructura.

I.2.2 Cilio de Conexión.

Tanto en conos como en bastones, un estrecho puente citoplásmico conecta el segmento externo con el interno. Este puente contiene un cilio modificado con nueve pares de microtúbulos que han perdido el par central, característico de otros cilios. El cuerpo basal de este cilio es uno

de los centriolos de la célula. Generalmente se encuentra lateralizado y constituye el eje principal del segmento externo (Rodieck 1973; Greiner y col. 1981; Bailey y Gouras 1985). El cilio de conexión es una característica constante en todos los fotorreceptores (Sjostrand 1953a; Cohen 1972; Rodieck 1973; Morris y Shorey 1967).

1.2.3 Segmento Interno.

El segmento interno de los fotorreceptores es la región comprendida entre el estrechamiento citoplásmico que contiene el cuerpo basal del cilio de conexión y la membrana limitante externa. Contiene la mayor parte de los orgánulos celulares: mitocondrias, aparato de Golgi y retículo endoplásmico liso, acúmulos de glucógeno, gotas de lípidos, microtúbulos ,etc. Es una porción de citoplasma por la que circulan las moléculas que viajan desde el soma al segmento externo y las que lo hacen en sentido inverso. Se tienen evidencias de que es una porción de la célula con una gran actividad metabólica.

Las distintas regiones del segmento interno se describen a continuación de forma ordenada desde la parte más externa a la más interna.

Prolongaciones

El segmento interno de los fotorreceptores presenta prolongaciones citoplásmicas ascendentes que salen a nivel

del cilio de conexión y ascienden abrazando el segmento externo, aproximadamente en su tercio inferior (Fig. I.4). Estas prolongaciones también se han denominado procesos calicales ("calical processes"). En la rata su presencia es ocasional (Galbavy y Olson 1979).

Ultraestructuralmente están formadas por microfilamentos longitudinales (Cohen 1963a, Morris y Shorey 1967). El número de estas prolongaciones citoplásmicas varía según la especie. En el pollo existe una única prolongación (Morris and Shorey 1967), pero en otras especies como en la rana (Nilsson 1964a, Borwein y col.1980) y los quelonios (Pérez Arroyo 1978) hay varias. Su función es desconocida, pero se ha propuesto que podrían servir de soporte al segmento externo para evitar su giro sobre el segmento interno (Cohen 1963a). También se ha propuesto una función de protección del segmento externo (Reme y Young 1977), o también que podrían tener algún efecto en la refracción de la luz que incide sobre los discos de membrana (Borwein y col. 1980). Estas hipótesis no pasan de ser meras suposiciones.

En algunas especies de vertebrados (reptiles: Dunn 1966a; tortugas: Yamada 1960a; primates: Borwein y col. 1980 y aves: Cohen 1963a) se han encontrado otro tipo de prolongaciones citoplásmicas a nivel de la membrana limitante externa que han sido denominadas aletas, aristas o crestas laterales. Estas prolongaciones bordean la base del

segmento interno aumentando considerablemente la superficie de la membrana celular. En cortes transversales, estas aletas dan al segmento interno una imagen de "rueda dentada" (Pedler y Tansley 1963). Se presume que su función está relacionada con el transporte de agua y metabolitos (Yamada 1960b, Pedler y Tansley 1963, Dunn 1966a). En la rata no se ha descrito este tipo de prolongaciones citoplásmicas.

Gotas Lipídicas

Los segmentos internos de los conos de algunas especies de vertebrados, poseen en su parte más escleral gotas lipídicas. Estas se encuentran en retinas de peces óseos, cartilagosos, dipnoos, anfibios, reptiles, aves, monotremas y marsupiales, pero no existen en mamíferos placentarios (Rodieck 1973). Están rodeadas por una membrana y a su alrededor se disponen las mitocondrias del elipsoide.

En anfibios, reptiles y aves, las gotas son coloreadas y los porcentajes de cada tipo varían según la especie. El color de las gotas se debe a los carotenoides que las constituyen. Cada tipo de gotas tiene un espectro de absorción característico. Hasta el momento, no existe consenso respecto a la función de las gotas lipídicas. La idea que parece estar mejor sustentada, con alguna experimentación, es que actúan como filtros. Se ha demostrado

que las aves poseen fotorreceptores sensibles a la luz ultravioleta (Graf y Norren 1974; Goldsmith 1986). Otros autores piensan que pueden estar implicadas en la corrección de la aberración cromática (Bowmaker 1980). Las lentes (cristalino) amarillas de muchos animales, incluido el hombre, reducen esta aberración a cambio de perder sensibilidad a la radiación ultra-violeta.

En lo que se refiere a su origen, la proximidad de éstas con las mitocondrias del elipsoide, ha dado lugar a que se postule que se forman a partir de las mitocondrias (Berger 1965; Ishikawa y Yamada 1969; Gayoso y col. 1978). Otros opinan que la gota aparece como producto de secreción mitocondrial (Pedler y Tansley 1963). Ninguna de las dos propuestas ha sido aclarada experimentalmente.

Elipsoide

Tradicionalmente se llama elipsoide al gran acúmulo de mitocondrias situado en la porción más externa del segmento interno.

La estructura y densidad de las mitocondrias varían según las especies, así como entre los mismos fotorreceptores de una especie. En los mamíferos (Borwein y col. 1980) son alargadas y al igual que en algunos anfibios se colocan de forma paralela al eje longitudinal del fotorreceptor (Nilsson 1964a). Pueden estar más o menos compactadas en el elipsoide o dispersas por el citoplasma (Braekvelt 1983a).

La función de las mitocondrias es de sobra conocido que es la de generar la energía que la célula necesita. Su especial concentración en el segmento interno, responde al gran aporte energético que requiere la elevada actividad metabólica de esa porción de citoplasma y el intenso tráfico de moléculas hacia el polo externo de la célula.

Paraboloide

El paraboloide es una estructura granular que aparece inmediatamente por debajo del elipsoide. Estudios de microscopía electrónica demuestran que está formado por membranas de retículo endoplásmico liso cargadas de gránulos de glucógeno (Dunn 1965, 1966a y 1966b; Morris and Shorey 1967). En reptiles también puede formar una cisterna de glucógeno, y curiosamente no aparece en todos los fotorreceptores. En el pollo se encuentra únicamente en los bastones y conos accesorios. En los anfibios sólo el cono accesorio tiene paraboloide y en quelonios únicamente los bastones (Nilsson 1964a). En mamíferos no se ha descrito esta estructura.

Mioide

Se denomina mioide a la región más interna (vitreal) del segmento interno comprendida entre la base del elipsoide, (o del paraboloide en aquellos fotorreceptores que lo poseen) y la membrana limitante externa (no rotulado en

la Fig. I.4). Su nombre se debe a la capacidad contráctil que presenta en respuesta a la luz (Rodieck 1973). En esta zona, se realiza una gran parte de la actividad metabólica celular (Young y Droz 1968), pues en ella se encuentran las partículas de ribonucleoproteínas de forma aislada o agrupadas, retículo endoplásmico y numerosos microtúbulos. También se observan vesículas o vacuolas granulosas autofágicas, presumiblemente implicadas en el metabolismo de la célula (Morris and Shorey 1967; Rene and Knop 1980; Braekevelt 1983a).

I.2.4 Membrana Limitante Externa

Se entiende como membrana limitante externa, la línea densa que se observa con microscopía óptica en cortes transversales de retina. Realmente está formada por las uniones, de tipo "zonula adherens" de los fotorreceptores a las células de Müller y las mazas de Landolt de las células bipolares en las especies que las poseen, (Cohen, 1963a; Morris y Shorey 1967; Dowling 1970; Uga y Smelser 1973; Braekevelt 1983a y 1983b).

I.2.5 Soma

El soma en los fotorreceptores está formado principalmente por el núcleo rodeado de una delgada capa de citoplasma que contiene ribosomas, microtúbulos y retículo endoplásmico.

Generalmente presenta forma oval o redondeada y se encuentra situado por debajo de la membrana limitante externa. El conjunto de somas de todos los fotorreceptores, como ya hemos dicho, forman la capa nuclear externa. La posición del soma respecto a la membrana limitante externa varía según se trate de conos o bastones y de los diferentes grupos de vertebrados. Así en mamíferos, peces teleósteos, anfibios y aves nocturnas, el soma de los bastones se sitúa a distintos niveles dentro de la capa nuclear externa, mientras que los de los conos suelen ocupar el estrato más escleral; sin embargo en reptiles y aves diurnas, son los bastones los que mantienen el soma siempre en el nivel más interno, mientras que los somas de los conos se distribuyen en los estratos medio y externo de la capa nuclear externa (Cajal 1892, 1972; Morris y Shorey 1967; Gallego 1975 y 1976; Gayoso 1978; Carter-Dawson y Lavail 1979a; López, R. 1991). En la porción de citoplasma que une el soma con la membrana limitante externa (también llamada prolongación externa o escleral) se aloja el aparato de Golgi. En los fotorreceptores que no tienen esta prolongación porque el soma descansa inmediatamente por debajo de la membrana limitante externa, el aparato de Golgi aparece escleral al núcleo, en la base del segmento interno.

I.2.6 Fibra de conexión con el terminal sináptico.

Es la fina prolongación de citoplasma que existe entre el soma y el terminal sináptico. También se conoce simplemente como prolongación interna. Su longitud varía en función de la posición que ocupe el núcleo de los fotorreceptores, pudiendo no existir si el soma ocupa la posición más interna dentro de la capa nuclear externa, como ocurre en el caso de los bastones y conos principales del pollo (Morris y Morey 1967; López, R. 1991). En los fotorreceptores de algunos mamíferos alcanzan hasta una longitud de 100 μm (Cohen 1972), lo que ha conducido a ciertos autores a considerarlo como axón.

En su interior se encuentran neurofilamentos, microtúbulos y vesículas sinápticas, éstas más abundantes en la proximidad del cuerpo sináptico.

I.2.7 Terminal sináptico

Los terminales sinápticos son las terminaciones internas de los fotorreceptores. Establecen conexiones sinápticas con las dendritas de las células horizontales y bipolares en la capa plexiforme externa. Se denomina "esférula" al terminal de los bastones y "pedículo" al de los conos, en base a sus formas redondeadas y cónicas o triangulares respectivamente. Los cuerpos sinápticos alcanzan distintos niveles en la capa plexiforme externa, según se

trate de conos o bastones. Generalmente las terminaciones de los bastones ocupan el estrato más escleral, mientras que las de los conos sinaptan en los niveles medio e interno. En peces teleósteos, en mamíferos y en aves nocturnas, sólo existen dos niveles, el más externo al que llegan los bastones y el más interno al que llegan los conos. Sin embargo, en aves diurnas los fotorreceptores tienen tres niveles de terminación, el más externo formado por las prolongaciones de los bastones y conos dobles; el nivel medio formado por las terminaciones de los conos rectos y el nivel interno formado por las terminaciones de conos oblicuos (Cajal 1892; Gallego 1975 ; Gallego y col. 1975a).

Los pedículos de los conos contienen numerosas vesículas sinápticas de 300-600 Å de diámetro, una o dos largas mitocondrias y escasas bandas sinápticas. Las esférulas de los bastones tienen vesículas sinápticas de 400 a 900 Å de diámetro, pequeñas mitocondrias y las bandas sinápticas que son más numerosas (Leure-Dupree 1974; Morris y Shorey 1967).

1.3 FUNCION DE LOS FOTORRECEPTORES: FOTOTRANSDUCCION.

Los fotorreceptores son capaces de captar un solo fotón, la menor cantidad de luz posible. Una cascada de reacciones amplifica esta pequeñísima información hasta transformarla en señal útil para el sistema nervioso (Stryer 1987). La captura de la luz ocurre en los segmentos externos. La membrana de los discos de los segmentos externos y la membrana externa (plasmática) exhiben funciones distintas, aunque íntimamente relacionadas. Los discos contienen las moléculas proteicas que absorben la luz e inician la respuesta de excitación. La membrana externa convierte la señal química en eléctrica, generando un impulso nervioso que se transmite como señal química a las interneuronas de la retina; éstas transmiten la información a las células ganglionares, y éstas la llevan hasta los centros cerebrales de la visión.

En las membranas que constituyen los discos de los

bastones se encuentra una molécula proteica llamada rodopsina, con una estructura y disposición específicas dentro de la bicapa lipídica (Fig.I.5). La rodopsina absorbe un fotón y genera la respuesta inicial de una cascada de reacciones (Fig.I.6). Esta proteína tiene dos componentes que son: el 11-cis retinal, que es una molécula orgánica derivada de la vitamina A, y la opsina, que es una proteína capaz de desempeñar funciones enzimáticas.

Cuando el 11-cis retinal absorbe un fotón, adopta la configuración 11-trans retinal e induce un cambio de conformación en la molécula de opsina, quedando así activada la molécula de rodopsina. Seguidamente, la rodopsina activada interactúa con la proteína transducina, formada por tres subunidades proteicas (alfa, beta y gamma), la cual constituye un intermediario clave en la cascada excitadora. Esta interacción provoca la conversión del GDP en GTP, en la subunidad alfa de la transducina, y determina también que la subunidad alfa se separe de la porción enzimática formada por el complejo beta-gamma. El complejo GTP-subunidad alfa de la transducina, activa una fosfodiesterasa específica (también formada por tres subunidades: alfa, beta y gamma), retirándole la subunidad inhibidora gamma. La fosfodiesterasa así activada empieza entonces a escindir gran número de moléculas de GMP cíclico. Debido a que el GMPC mantiene abiertos los canales de sodio de la membrana plasmática del segmento

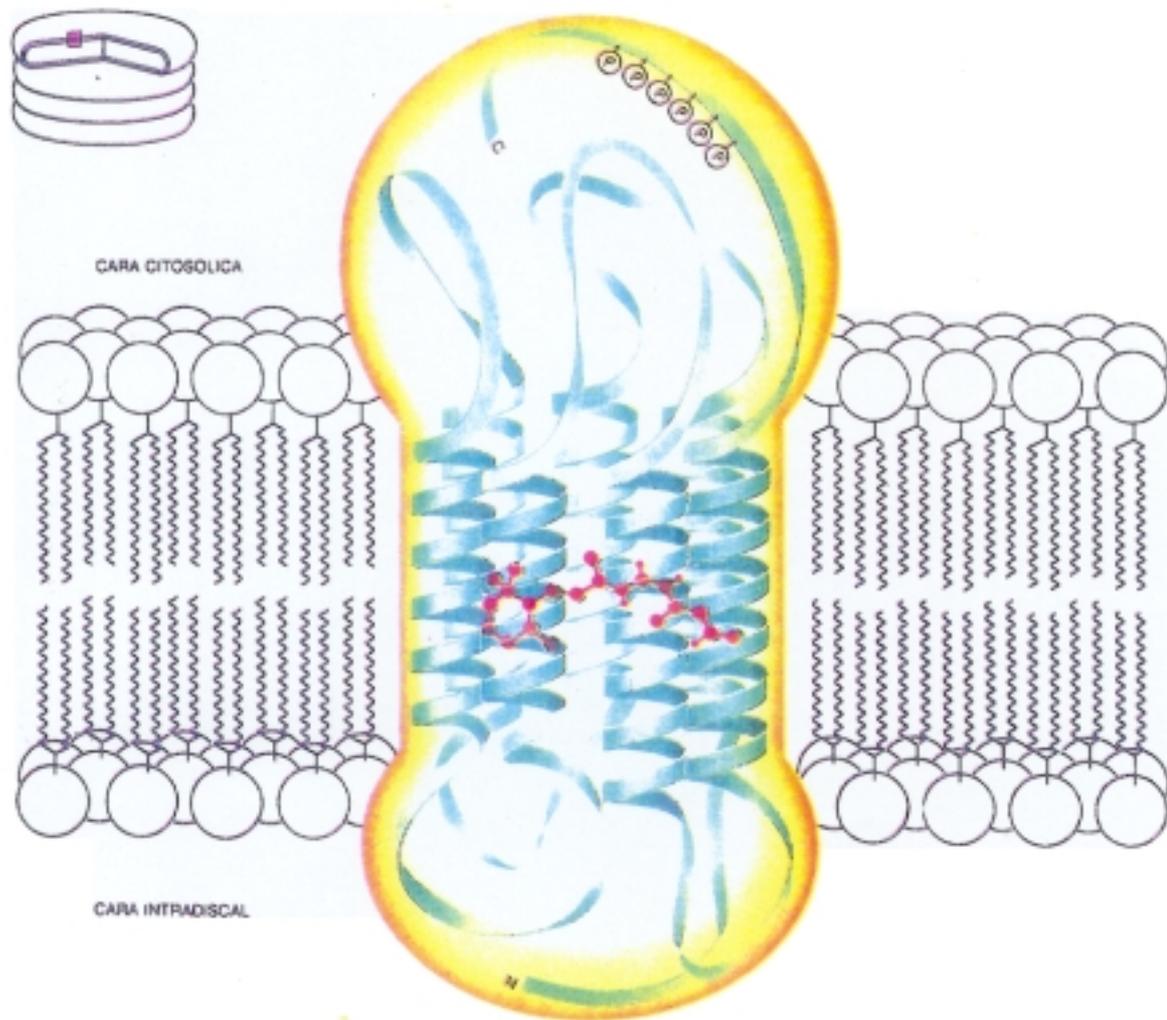


FIGURA 1.5 Molécula de Rodopsina. Embebida en la membrana del disco, recibe la luz e inicia la cascada excitadora. Igual que la membrana plasmática, de la que procede, la membrana del disco es una bicapa de moléculas lipídicas (grasas). La rodopsina presenta dos componentes: El 11-cis retinal y la opsina, proteína ésta configurada en siete estructuras helicoidales, arrolladas dentro de la membrana y conectadas por cortos segmentos lineales. El 11-cis retinal (rojo) se encuentra cerca del centro de la membrana, unido a una de las hélices. La absorción de un fotón (un cuanto de luz) por parte del retinal altera su configuración y activa la rodopsina. (Tomado de Stryer 1987).

externo cuando no incide la luz sobre el bastón, la disminución de GMPC (por acción de la luz) provoca el cierre de estos canales; por lo tanto, se bloquea la entrada de Na^+ al interior de la célula. Esto hace más negativo el interior del bastón que el exterior, produciéndose una diferencia de potencial negativa denominada hiperpolarización. Esta hiperpolarización responde pues al descenso de la permeabilidad de la membrana a los iones Na^+ . La hiperpolarización se transmite a lo largo de la membrana externa, hasta el terminal sináptico en el otro extremo de la célula.

La subunidad alfa de la transducina (la cual tiene actividad ATPasa) hidroliza el GTP en GDP. La subunidad alfa se reasocia con la unidad beta-gamma y se reensambla la fosfodiesterasa. Se inactiva la rodopsina, para recuperarse luego la configuración que presentaba antes de la activación (Fig.I.6). Por tanto, el mediador que lleva la señal desde los discos del bastón hasta la membrana externa, es la molécula de GMP cíclico, 3', 5' guanosín monofosfato.

En esta cascada de reacciones existen dos pasos fundamentales que contribuyen a la amplificación que se requiere para que la absorción de un único fotón, genere un impulso nervioso:

- 1) Por parte de una única molécula de rodopsina, se producen centenares de complejos activos alfa-trans-

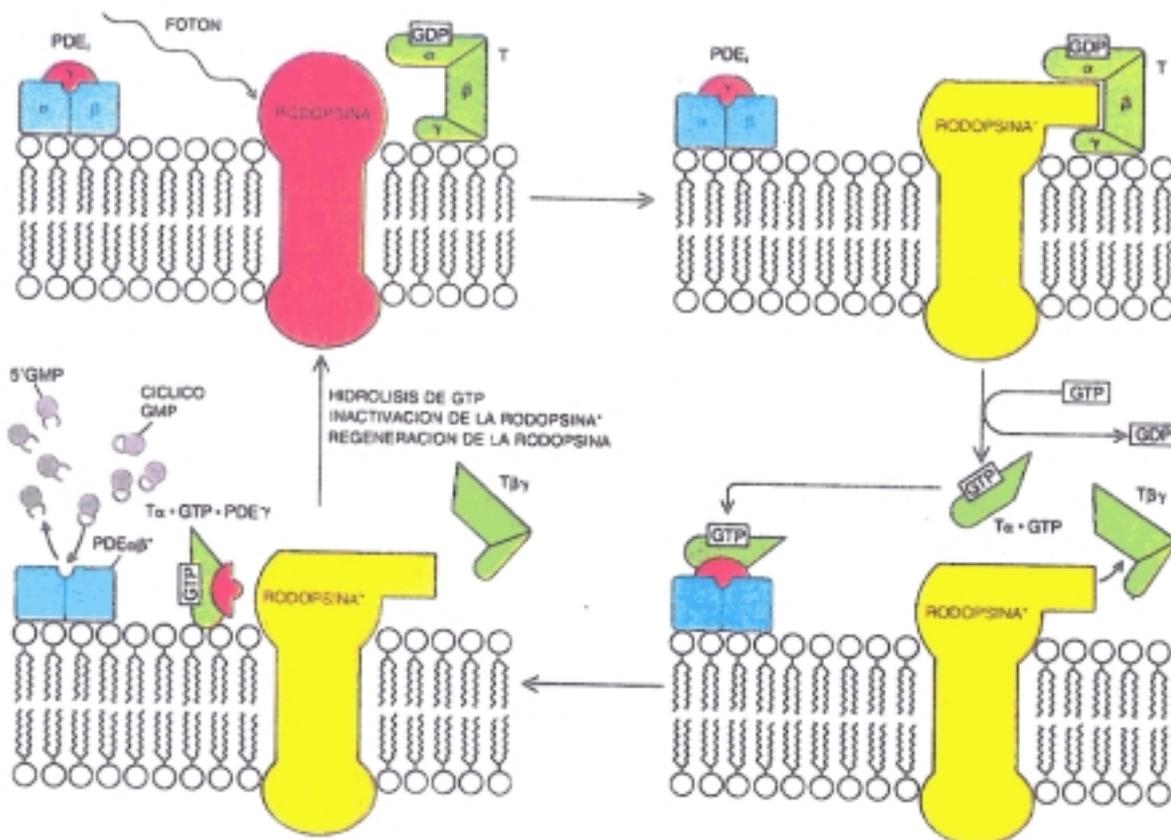


FIGURA 1.6 Cascada Excitadora que forma parte del ciclo mediado por la transducina. El ciclo comienza con la absorción de un fotón por parte de la rodopsina (arriba, a la izquierda). Seguidamente, la rodopsina activada (rodopsina*) interactúa con la transducina (T), como se indica arriba, a la derecha. Esa interacción provoca la sustitución del GDP por GTP en la subunidad alfa de la transducina: determina también que la subunidad alfa se separe de la porción enzimática formada por el complejo beta-gamma (abajo, a la derecha). La transducina libera a la fosfodiesterasa inactiva (FDEI) de la inhibición a que está sometida, quizás retirándole su subunidad gamma. La fosfodiesterasa activada empieza entonces a escindir gran número de moléculas de GMP cíclico (abajo, a la izquierda). Al instante, un temporizador adosado a la subunidad alfa de la transducina hidroliza el GTP en GDP. La subunidad alfa se reasocia con la unidad beta-gamma y se reensambla la fosfodiesterasa. Se inactiva la rodopsina, para recuperarse luego la configuración que presentaba antes de la activación (Tomado de Stryer 1987).

ducina-GTP, lo que constituye el primer paso de la amplificación.

- 2) Cuando la alfa-transducina-GTP desencadena la actividad de la fosfodiesterasa, no se produce amplificación, pues cada unidad alfa-transducina se une y activa una sola fosfodiesterasa, pero cada molécula de fosfodiesterasa activada es capaz de hidrolizar 4.200 moléculas de GMP cíclico por segundo, lo que provoca el cierre de millones de canales de Na+.

Los conos poseen un sistema de transducción parecido al de los bastones. Se sabe desde hace tiempo que los conos contienen tres pigmentos visuales (análogos a la rodopsina) que responden a la luz roja, verde y azul, y que presentan la misma arquitectura fundamental que la rodopsina. La transducina, la fosfodiesterasa y el canal controlado por GMP cíclico en los conos se asemejan a sus correspondientes en los bastones, pero el ciclo completo de transducción aún no se conoce en detalle. Tanto conos como bastones no generan potenciales de acción. Son por tanto una excepción en el modelo general de la transmisión sináptica.

Hemos querido hacer este resumen de la fisiología de los fotorreceptores, aun no entrando la fisiología de éstos en los objetivos de esta tesis, para llamar la atención de que si bien se conoce con bastante detalle la fisiología de una porción de las células bastones, el

segmento externo, muy poco sabemos de las particularidades funcionales del segmento interno; poco sabemos de la fisiología de los conos y de las diferencias funcionales entre las distintas clases de ellos; ni qué significan funcionalmente los patrones espaciales de distribución de los fotorreceptores en algunas especies; ni de la función de las gotas lipídicas de los conos en las especies donde las hay. El estudio de la fisiología de los fotorreceptores tiene limitaciones técnicas. El conseguir preparaciones puras de cada tipo de fotorreceptor es una de ellas. En este sentido, esta tesis aporta un método nuevo de disgregación celular que permite obtener todos los tipos de fotorreceptores, y pensamos que supone un avance para lograr purificar poblaciones de cada tipo y estudiar su fisiología.

I.4 DIFERENCIACION DE LAS CELULAS FOTORRECEPTORES.

La transformación del tubo neural en las distintas porciones del sistema nervioso central de los vertebrados, sigue una misma serie de sucesos en todas ellas, que enumeramos a continuación:

- 1) Proliferación de las células neuroepiteliales.
- 2) Neurogénesis o salida del ciclo celular.
- 3) Emigración de los neuroblastos hasta que alcanzan sus posiciones definitivas.
- 4) Formación de las prolongaciones celulares y contactos específicos entre ellas.
- 5) Muerte celular.
- 6) Síntesis de neurotransmisores y moléculas específicas de cada tipo de neurona.

Las células precursoras de cada población de neuronas primero proliferan, después dejan el ciclo (se llaman entonces neuroblastos) y salvo excepciones, después tienen que emigrar desde las proximidades del ventrículo hasta su posición definitiva. Los neuroblastos después emiten las prolongaciones definitivas y establecen contactos sinápticos con sus dianas. Llegado este momento, si se han producido más neuronas de las que las células diana pueden recibir conexiones, mueren aquellas células que no han podido hacer contactos sinápticos. Finalmente las jóvenes neuronas sintetizan el (o los) neurotransmisores, neuromoduladores, y demás moléculas específicas de cada tipo de neurona (Jacobson 1979). Sin embargo no todas las células precursoras de un tipo de neuronas experimentan esos sucesos a la vez, es decir, no lo hacen de forma sincrónica, de modo que a lo largo del desarrollo, en una población celular dada, esos sucesos se solapan.

La retina, por ser una porción del Sistema Nervioso Central, pasa por las etapas (sucesos) anteriormente referidas. Para entender cómo se construye la retina durante el desarrollo, es pues necesario llegar a conocer en detalle cada una de esas etapas. Información bastante amplia sobre el desarrollo de la retina de los vertebrados, se encuentra en la revisión de Grün (1982). En el caso particular de las células fotorreceptores, se conoce en numerosas especies de vertebrados el periodo de tiempo del

desarrollo durante el cual abandonan el ciclo celular (período de neurogénesis), pero poco se conoce de las restantes etapas del desarrollo. Hemos agrupado la información existente al respecto en dos apartados: neurogénesis y diferenciación morfológica. Esta última parte engloba información relativa a las etapas tres y cuatro, enumeradas al comienzo de este apartado.

I.4.1 Neurogénesis.

La neurogénesis de los fotorreceptores ocurre en diferentes etapas según la especie; en las aves y anfibios es embrionaria (Fujita y Horii 1963; Morris 1973; Khan, 1974; Prada y col. 1991); mientras que en mamíferos es embrionaria y postnatal (Denham 1967; Carter-Dawson y Lavail 1979b; Grün 1982; Braekevelt y Hollenberg 1970; Kuwabara y Weidman 1974; Reh 1992).

Numerosos estudios en retinas de distintas especies de vertebrados (Sidman 1961; Fujita y Horii 1963; Jacobson 1968; Hollyfield 1968; Braekevelt y Hollenberg 1970; Kahn 1973, 1974; Fujita y Mishima 1975; Carter-Dawson y Lavail 1979b; Branchek 1984; Young 1985; Holt y col. 1988; Zimmerman y col. 1988) han revelado que la neurogénesis de cada uno de los tipos de células y por tal la de los fotorreceptores, comienza en el polo posterior de la retina, y desde allí se extiende hacia la periferia. Por tanto está descrito un gradiente de neurogénesis centro-periférico.

Holt y col. (1988) han observado en la retina de *Xenopus* un gradiente decreciente de neurogénesis dorso-ventral. Recientemente, Prada y col. (1991) han demostrado que en la retina de pollo, la neurogénesis de la mayoría de los tipos celulares, excepto las células ganglionares desplazadas (Prada y col. 1992), sigue tres patrones espaciales de neurogénesis: Uno desde retina central a periférica (gradiente decreciente centro-periférico), otro desde retina dorsal a ventral (gradiente decreciente dorso-ventral, y por último desde retina temporal a nasal (gradiente decreciente temporo-nasal).

Por otro lado, la duración de la neurogénesis en toda la retina difiere de unas especies a otras; en *Xenopus*, la neurogénesis ocurre en 25 horas aproximadamente (Holt y col. 1988), es decir, todas las células de la retina se generan en ese tiempo, mientras que en el pollo, gato, rata y ratón tiene una duración de varios días (Denham 1967; Kahn 1974; Grün 1982; Wals y col. 1983; Young 1985; Zimmerman 1988; Prada y col. 1991; Reh 1992). Consecuentemente, la duración de la neurogénesis de los fotorreceptores puede durar horas (*Xenopus*), días (pollo, rata, ratón y gato), o toda la vida como sucede en algunos peces, en los que ocurre durante toda la etapa adulta (Branckek y Bremiller 1984; Raymond y Rivlin 1987).

La duración de la neurogénesis de cada tipo celular de la retina, es bien conocida en retina de pollo (Prada

y col. 1991), xenopus (Holt y col. 1988), ratón (Sidman 1961; Carter-Dawson y Lavail 1979b; Young 1985) y rata (Reh 1992). Estudios autorradiográficos muestran que en la retina de rata, la actividad mitótica comienza en el día E13, alcanzando la máxima producción celular en los días E20-P1. En el día P2 el ciclo celular tiene una duración de 28 horas y solamente 1/3 de las células del neuroepitelio están en proliferación. Entre los días P2-P5 el índice mitótico disminuye bruscamente, lo que indica que la mayor parte de las células han abandonado el ciclo, convirtiéndose en neuroblastos de los distintos tipos celulares de la retina (Denham 1967). En el día P7 ya no se observan mitosis en toda la retina (Braekevelt y Hollenberg 1970; Kuwabara y Weidman 1974).

I.4.2. Morfogénesis.

Son muy pocos los estudios sobre diferenciación morfológica de fotorreceptores, realizados en estadios tempranos de diferenciación. Cajal (1892,1972), con el método de Golgi, identificó como neuroblastos jóvenes de fotorreceptores células monopolares (sólo con prolongación ventricular) y células bipolares con prolongación vítrea corta, en la retina embrionaria de perro, conejo y ratón. En ratas de un día de vida Morest (1970) observó, también con el método de Golgi, neuroblastos de fotorreceptores monopolares y bipolares, algunos con filopodios cortos

saliendo alrededor del soma, los cuales presentan un esbozo del segmento interno. En el ratón Hinds y Hinds (1979), en un estudio al microscopio electrónico en retinas de embriones jóvenes (E15 a E17 días), identificaron como neuroblastos jóvenes de fotorreceptores células simples bien monopolares o bien bipolares, en base a la presencia de un esbozo de segmento interno más o menos desarrollado y a la distribución de los orgánulos citoplásmicos. En el pollo López (1991) ha observado que los bastones dejan el ciclo en forma simple y prácticamente la mantienen mientras crecen sucesivamente los segmentos interno y externo. Los conos, en cambio, dejan el ciclo en formas simples, pasan por una fase multipodial, en la que ya presentan gota lipídica, después polarizan las prolongaciones, a continuación crecen el segmento interno y la prolongación interna o vítrea (adoptando de nuevo una forma simple) y finalmente crecen el segmento externo, los pedículos sinápticos y las prolongaciones sinápticas.

Sin embargo, hay numerosos estudios realizados con el microscopio electrónico, en diferentes especies, que tratan del desarrollo de los segmentos externo e interno y del terminal sináptico (peces: Berger 1964; Rohrscheider 1975; Grün 1975; Wise y Kunz 1977; Branchek y Bremiller 1984; anfibios: Carasso 1958; Nilsson 1964b; pollo: Meller 1968; Olson 1972, 1973; Meller y Tetzlaff 1976; Mishima y Fujita 1978; ratón: De Robertis 1956; Feeney 1973; Carter-

Dawson y Lavail 1979a; rata: De Robertis 1960; Weidman y Kuwabara 1968, 1969; Kuwabara y Weidman 1974; Galbavy y Olson 1978; Nir, Cohen y col. 1984; perro: Hebel 1971; oveja: Braekevelt 1983a,b; primates: Smelser y col. 1974; humanos: Yamada y Ishikawa 1965; Hollenberg y Spira 1973). Estos estudios han revelado que los neuroblastos de los fotorreceptores en estadios más avanzados, experimentan en todas las especies la misma secuencia de transformaciones morfológicas y estructurales.

En una primera fase, los neuroblastos de fotorreceptores desplazan los dos centriolos del diplosoma hacia el polo más escleral de la célula, disponiéndolos en ángulo recto en las proximidades de la membrana limitante externa. En las especies que poseen gota lipídica comienza la síntesis de los carotenos que las componen, aunque las gotas aún no son visibles. También se observan las primeras uniones de tipo gap junction con las células vecinas.

En una segunda fase, la prolongación ventricular sobrepasa la membrana limitante externa y crece en longitud con los centriolos en posición apical y rodeada por numerosos microvilli. Al mismo tiempo las mitocondrias se disponen de forma paralela al eje del fotorreceptor y se acumulan en la zona más escleral del segmento interno. El polo opuesto de la célula se va estrechando y alargando hacia la futura capa plexiforme externa.

Posteriormente, el segmento interno se pone repleto

de mitocondrias y vesículas, procedentes del aparato de Golgi. Las membranas del retículo endoplásmico son muy numerosas y la mayor parte de los orgánulos celulares adoptan su posición definitiva. Para cuando han ocurrido estos acontecimientos, las gotas lipídicas de los conos de las aves ya se observan claramente (12 días de incubación en el pollo).

Después que el segmento interno adquiere una determinada longitud, comienza el desarrollo del segmento externo. Los dos centriolos se sitúan lateralmente en el segmento interno, uno de ellos (el cuerpo basal) emite unas fibrillas de anclaje que se asocian a la membrana plasmática produciendo en ella pequeñas invaginaciones. Al mismo tiempo el centriolo crece hacia el epitelio pigmentario y produce un verdadero cilio pero sin el par de túbulos centrales (Greiner y col.1981). Una vez se ha formado el cilio de conexión comienza la formación de los discos de membrana.

Los primeros estudios de microscopía electrónica sobre el desarrollo de los fotorreceptores (De Robertis 1956) mostraban que los discos de membrana podían formarse a partir de túbulos y vesículas. Parecían derivar del cilio que crece a partir del segmento interno. Este origen de los discos, también fue asumido para el pollo (Meller 1964,1968), la rata (Weidman y Kuwabara 1969) y la vaca (Mason y col. 1973). Pero pronto surgieron nuevas

investigaciones que mostraron que son las sucesivas invaginaciones de la membrana plasmática de la porción basal del segmento externo las que origina los discos de membrana (Eakin y Westfall 1961; Nilsson 1964; Yamada y Ishikawa 1965; Govardovsky y Kharkeevich 1965 y 1966; Olney 1968; La Vail y Hild 1971; Spira 1975; Mcdarle y col. 1977). Sin embargo, Steingberg (1980) explica la formación de los discos por evaginación (no por invaginación) de la membrana plasmática a nivel del cuerpo basal del cilio de conexión. Ambas interpretaciones del proceso pueden explicar la orientación específica de las moléculas de rodopsina en la bicapa lipídica de los sáculos de membrana (Stryer 1987). Como dato curioso, en algunos peces teleósteos, así como en el hombre, pueden encontrarse segmentos externos accesorios, cuyo desarrollo es idéntico a los normales, excepto en que no desarrollan los discos de membrana (Young y col. 1977, Grün 1982).

Al mismo tiempo que se forman los segmentos externos, en el polo interno del fotorreceptor va creciendo la prolongación interna que unirá el soma con el futuro terminal sináptico. Al principio los terminales son una simple lámina en posición vitreal al núcleo. Contienen principalmente ribosomas libres o formando polisomas. En algunas especies (pollo: Meller 1964, rata: Weidman and Kuwabara 1969, gato: Vogel 1978, monos : Smelser y col. 1974) este proceso está precedido por el crecimiento de

prolongaciones transitorias que salen del extremo vitreal de la célula. El número y ramificaciones de estas prolongaciones aumenta a medida que penetran en la capa plexiforme externa, donde establecen los primeros contactos con las células horizontales y bipolares. Dos dendritas de células horizontales invaginan la membrana del terminal sináptico del fotorreceptor formando las "diadas" sinápticas. Después una prolongación dendrítica de una célula bipolar se coloca en posición central, formando la configuración sináptica en "triadas" (Meller 1964; Nilsson y Crescitelli 1969; Blanks y col. 1974; Smelser 1974; McLaughlin 1976; McArdle y col. 1977; Chen y Witkovsky 1978; Linberg y Fisher 1978; Vogel 1978; Grün 1982). En la mayoría de las especies las vesículas aparecen en los terminales sinápticos alrededor de las lamelas, cintas o bandas sinápticas, una vez que éstas se han diferenciado.

En una fase posterior los segmentos internos muestran todas sus estructuras definitivas, salvo el paraboloides que es el último orgánulo en formarse. Los segmentos externos crecen en longitud y aumentan considerablemente el número de los discos de membrana, en los que ya pueden detectarse los pigmentos visuales. La opsina hace presencia en el segmento externo y la diaforasa en el interno. Para entonces las primeras sinapsis parecen maduras. Las vesículas sinápticas adquieren el número y

distribución definitivas. En las últimas fases del desarrollo, el segmento externo continúa creciendo en longitud, el paraboloides aparece ya repleto de gránulos de glucógeno y los fotorreceptores establecen nuevas uniones con las células de Müller.

Resulta llamativa la escasez de trabajos tanto a nivel celular como molecular, dedicados en profundidad al estudio de la diferenciación inicial de los fotorreceptores. Motivo por el cual nosotros planteamos como uno de los objetivos de esta tesis, el estudio del comportamiento (cambios en la forma y posición) de los neuroblastos de los fotorreceptores en las etapas iniciales de su desarrollo. Por otro lado, Cajal (1972) interpretó como neuroblastos de fotorreceptores, en la retina embrionaria del perro, células con formas similares a las de las células neuroepiteliales de la retina en fase G2 del ciclo celular, descubiertas en el pollo por Prada C. y col. (1981). Esto nos indujo a plantear la posibilidad de que los fotorreceptores dejaran el ciclo al final de la fase G2 y de que, por lo tanto, tuviesen un contenido 4C de DNA; (otras neuronas del sistema nervioso central parecen tener también 4C de DNA, damos referencias en discusión). Por lo tanto, otro objetivo de esta tesis fue determinar el contenido en DNA de los fotorreceptores.

II. OBJETIVOS Y DISEÑO DE LOS
EXPERIMENTOS.

II. OBJETIVOS Y DISEÑO DE LOS EXPERIMENTOS.

Los objetivos del presente trabajo de tesis doctoral han sido tres:

- 1) Testar la hipótesis de que algunos fotorreceptores podrían abandonar el ciclo celular al final de la fase G2.
- 2) Estudiar el comportamiento de los neuroblastos de los fotorreceptores desde que abandonan el ciclo celular hasta que adoptan su forma, tamaño y posición definitivas.
- 3) Profundizar en el estudio de la estructura de la retina de la rata adulta.

Para conseguir estos objetivos se diseñaron una serie de experimentos, que detallamos a continuación.

EXPERIMENTOS PARA CONSEGUIR EL OBJETIVO Nº 1.

El cumplimiento del objetivo nº 1 suponía conseguir disgregar íntegros los fotorreceptores de la rata, para poder medir por citofotometría el contenido de DNA por fotorreceptor. Un contenido 2C (diploide) de DNA implicaría el abandono del ciclo celular en G1, mientras que un contenido 4C (tetraploide) implicaría el abandono del ciclo al final de G2. Para conseguir disgregar íntegros los fotorreceptores de la retina adulta se diseñaron una serie de experimentos en los que se varió la concentración de proteasa, la temperatura y el tiempo de incubación.

A una serie de ratas adultas, de más de 21 días, se les extrajeron las retinas completas, es decir retina central más periférica, después se disgregaron, se extendieron sobre portaobjetos y se procesaron para la determinación del contenido de DNA por célula.

Como controles se utilizaron eritrocitos de pollo, porque su contenido 2C (2,5 pg) de DNA es clásicamente utilizado como contenido standard de referencia (Rasch y col. 1971; Rasch 1974 y 1985; Navarrete y col. 1983; López, 1991). Aunque se pueden utilizar como controles de referencia eritrocitos de trucha (5,2 pg DNA), *Xenopus laevis* (6,3 pg DNA), ó sapo (*Bufo terrestris*, 11 pg DNA) (Rasch y col. 1971; Bachmann 1972; Rasch 1974, 1985; Thieband, Fischberg 1977; Coulson y col. 1977; Coulson, Tyndal 1978; Vindelov y col 1980; Lee y col. 1984); dado

que en nuestro laboratorio también utilizamos el pollo como material biológico de experimentación, la disponibilidad de eritrocitos de pollo resultó una comodidad. Los eritrocitos siempre se extendieron sobre el mismo porta en el que se extendieron las células disgregadas.

Para las determinaciones por citofotometría del contenido de DNA por fotorreceptor utilizamos el método de Feulgen, el cual se basa en la hidrólisis parcial ácida del DNA con ClH 5N a temperatura ambiente, o bien ClH 1N a 60°C, seguida de reacción con la base de Schiff. Como resultado de la hidrólisis, se deshace el enlace hemiacetal entre el carbono C-1' y C-4' del anillo de furano de la 2-desoxirribosa y después se rompe el enlace B-glicosídico entre las bases púricas y las 2-desoxirribosas, formando un grupo aldehído libre en el carbono C-1' del azúcar. El reactivo de Schiff (fucsina básica decolorada con anhídrido sulfuroso) reacciona con los grupos aldehídos libres y genera una macromolécula coloreada insoluble, la cual queda unida covalentemente al DNA (Fig. II.1). La tinción se realiza estequiométricamente, y es específica de DNA, puesto que si a las células se las trata previamente con DNAsas no se tiñen. Además está ampliamente demostrado (en una variedad muy amplia de tipos celulares) que existe una correlación directa entre las estimaciones citofotométricas del contenido de DNA y las que se obtienen para los mismos tipos de células por métodos bioquímicos.

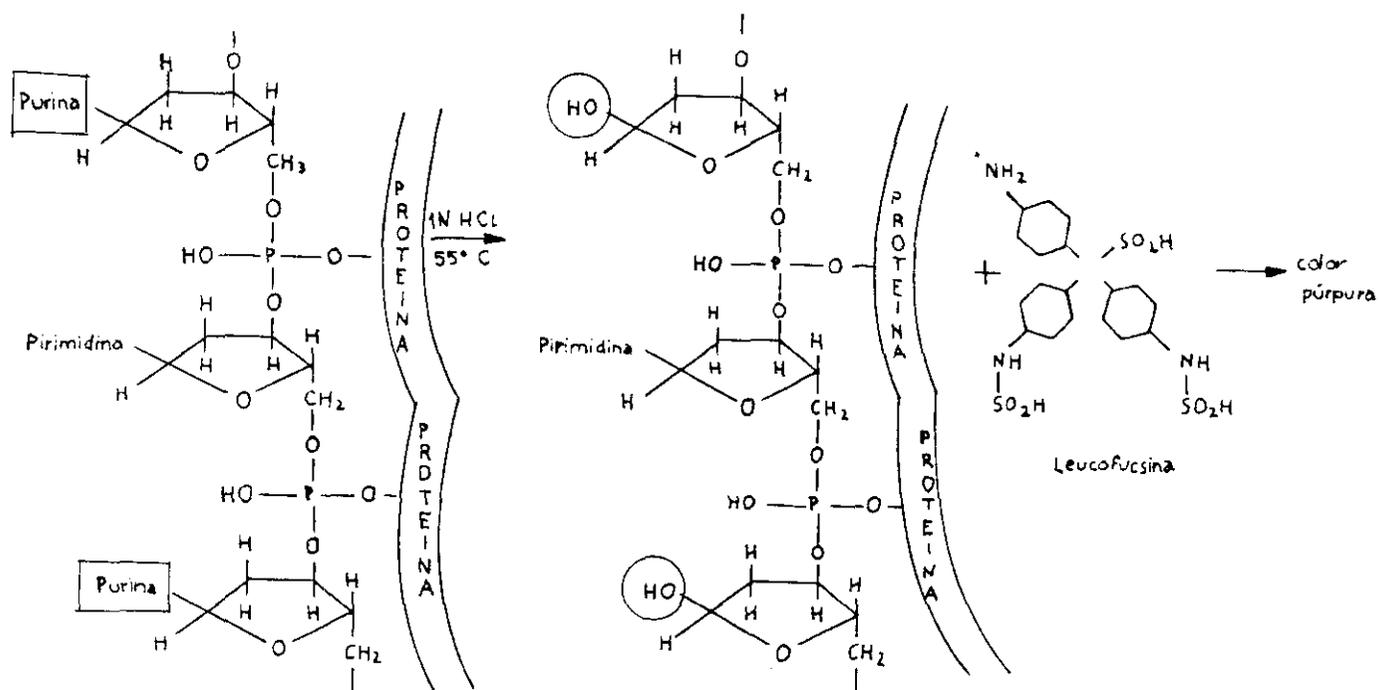


FIGURA II.1 Química de la reacción que tiene lugar en el núcleo de la célula al realizar la tinción de Feulgen. La hidrólisis ácida extrae las purinas (en recuadros) y deja en libertad los grupos aldehídos (en círculos) que reaccionan con la leucofucsina (reactivo de Schiff) para dar el color púrpura. En el esquema, el tamaño de la desoxipentosa está muy exagerado en relación con el de la proteína. (Tomado de De Robertis 1981).

cos directos (Allison y col. 1981; Lee y col. 1984; Rasch 1974; Vindelov y col. 1983).

EXPERIMENTOS PARA CONSEGUIR EL OBJETIVO Nº 2.

Para estudiar los cambios en la forma de los neuroblastos de los fotorreceptores hemos utilizado retinas de una serie de ratas en edades comprendidas entre E18±1 (días embrionarios) y P10 (días postnatales), a las que se les hizo tinción de Golgi. A otra serie de ratas comprendidas entre el día P3 y 12 meses postnatal se les extrajeron las retinas completas y se disgregaron por el mismo procedimiento que en los experimentos anteriores. Se estudiaron por ambos métodos las formas diferentes que adoptan los neuroblastos de los fotorreceptores durante su diferenciación.

La tinción de Golgi se basa en la fijación con soluciones que contienen osmio, ó bien dicromato potásico, seguida de impregnación con una solución de nitrato de plata. El nitrato de plata penetra sólo en aproximadamente un 10% de las células, y las rellena uniéndose a la membrana plasmática y sistemas de membranas intracitoplásmicas. Así proporciona una imagen, en negro, de toda la forma celular sobre fondo amarillo.

Hemos estudiado, in vivo, por contraste de fase, las células disgregadas de la retina porque:

1. El procedimiento de disgregación utilizado en nuestro laboratorio, extrae los neuroblastos con sus prolongaciones más finas, que a veces no tiñe el Golgi.
2. Se obtienen mayor cantidad y variedad de neuroblastos para observar.
3. El desarrollo de los segmentos interno y externo de los fotorreceptores no se puede observar con el método de Golgi ya que están incluidos parcialmente en la retina pigmentaria, también de color negro.

EXPERIMENTOS PARA CONSEGUIR EL OBJETIVO Nº 3.

Para estudiar la estructura general de la retina de la rata, se ha utilizado el mismo material y metodología que para el objetivo Nº 2, debido a que nuestro método de disgregación también extrae todos los tipos celulares de la retina adulta observados con la tinción de Golgi. Además, en los disgregados se puede observar mayor número de células que en preparaciones de Golgi, lo cual da mayor fiabilidad al estudio.

I I I. M A T E R I A L E S Y M E T O D O S.

III.1 MATERIALES

III.1.1 Material biológico.

En nuestros experimentos hemos utilizado:

1) Ratas albinas de la raza Winstar, de distintas camadas, procedentes del animalario del departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid. La edad de las ratas varió desde el día E18±1 hasta varios meses de vida adulta.

2) Pollos adultos de la raza White Leghorn (Gallus domesticus), estirpe Shaver, procedente del animalario del Centro de Biología Molecular de Madrid.

III.1.2 Productos químicos y enzimas.

Proteasa extraída de Estreptomices, facilitada por Fermentaciones y Síntesis Española SA (FYSE).

El resto de los reactivos químicos se obtuvieron de empresas especializadas. La mayoría de ellos fueron de la firma Merck. Las características relevantes de algunos de estos productos se describen en las secciones correspondientes.

III.1.3 Instrumentos.

Microtomo, para cortar celoidina, marca "MSE".

Estereomicroscopio "Zeiss", modelo SR.

Fotomicroscopio "Zeiss", modelo Universal.

Microdensitómetro "Vickers", modelo M-85.

III. 2 METODOS.

III.2.1 Animales de experimentación.

Las ratas estuvieron ubicadas en el animalario a una temperatura constante de 18-20 °C, con ciclos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad y con acceso libre, en todo momento, al agua y la comida. Las ratas embrionarias de E18±1 días se obtuvieron tras sacrificar a la madre.

III.2.2 Nuevo método de disociación celular.

Para obtener las células de la retina aisladas, hemos utilizado una proteasa no comercializada, amablemente facilitada por Fermentaciones y Síntesis Española SA (FYSE), de actividad enzimática 24134 uA/mg.

El procedimiento general seguido en este método de disociación celular está indicado en el esquema de la

figura III.1. Las retinas se extrajeron del globo ocular y se trocearon finamente en 200 μ l de una solución de sacarosa al 10,6% para ratas de 3 a 10 días y al 6% para el resto de las ratas. Después se incubaron en una solución stock (1 mg de proteasa/2,4 ml de agua milliporizada) preparada diariamente. La concentración final de proteasa varió entre 15-20 $\times 10^{-3}$ mg/ml, según el día de desarrollo de las ratas cuyas retinas se sometían a digestión. Este proceso se realizó siempre a 34° C y fue seguido visualmente cada 10 minutos en un fotomicroscopio Zeiss con contraste de fase. La digestión fue detenida entre los 45 y los 60 minutos, igualmente dependiendo del material a digerir, añadiendo un volumen de sacarosa igual al existente en el tubo de incubación o poniendo la solución a temperatura ambiente.

La suspensión celular obtenida se utilizó: 1) para la observación y estudio de los neuroblastos y formas adultas de los fotorreceptores recién extraídos; 2) para la determinación de cantidades de DNA por fotorreceptor; 3) para estudiar la morfología de los restantes tipos de las células de la retina adulta.

Tanto los neuroblastos precursores de fotorreceptores, como los distintos tipos de células adultas han sido dibujados a 40x, utilizando cámara lúcida. Las fotografías fueron tomadas con película Kodak Tmax 400 a 25x y 40x y en contraste de fase.

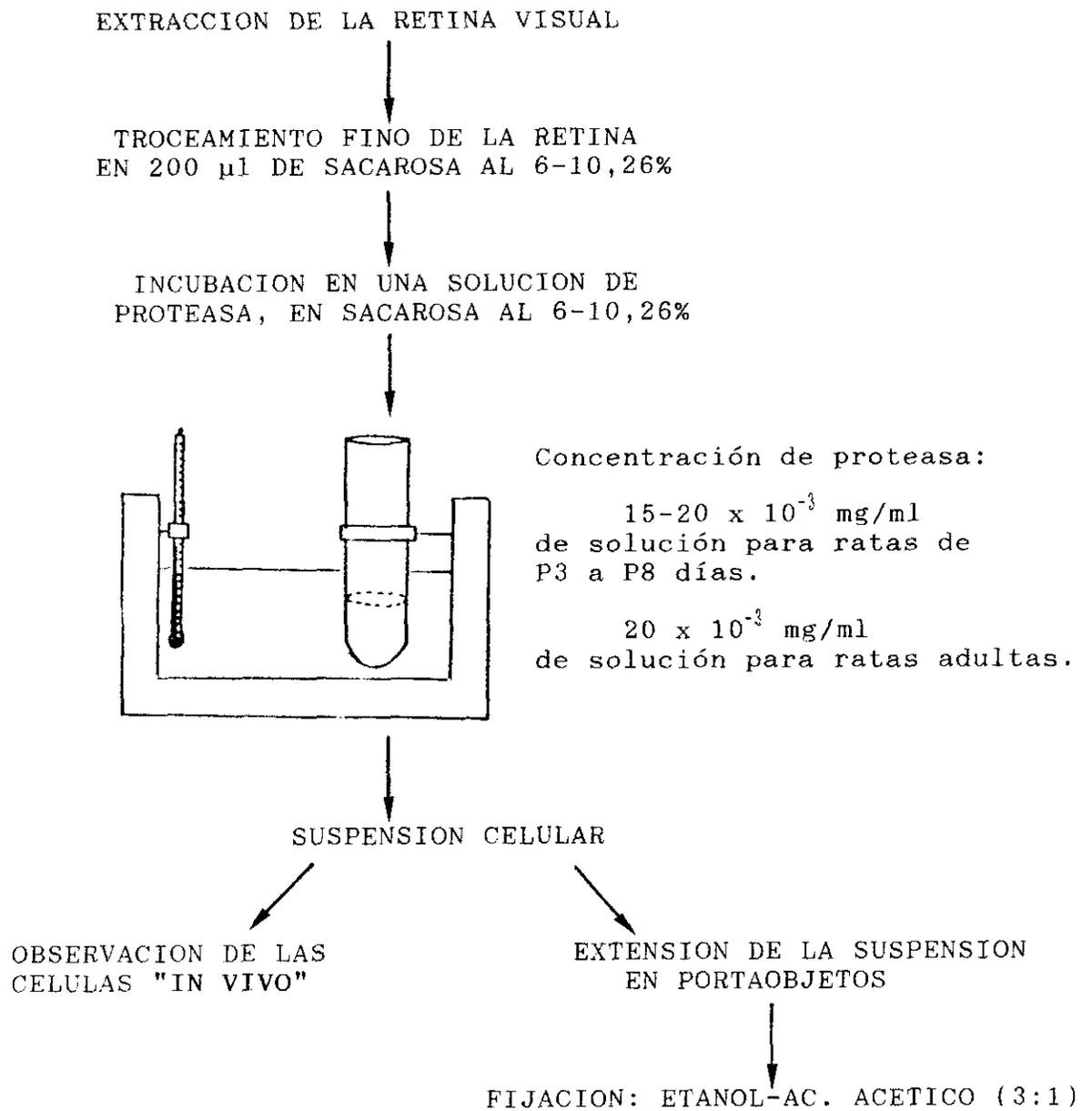


FIGURA III.1 Metodología general utilizada en el proceso de disociación celular. P, postnatal.

III.2.3 Método de Golgi Colonnier.

Los ojos de ratas de E18±1 días y entre P1 y P10 días, se sumergieron en fijador, según Colonnier (1964), tras extraerles la córnea. El tiempo de fijación varió entre 5 y 10 días, al objeto de obtener la mayor variedad posible de células teñidas. Tras la fijación, las piezas se lavaron 5 minutos en agua corriente, seguido de varios lavados más en solución de nitrato de plata al 0,75% (p/v), hasta que la solución de lavado era completamente transparente. A continuación las piezas se dejaron en un volumen de nitrato de plata al 0,75%, 75 veces superior al suyo, durante un periodo de tiempo variable, entre 7 y 10 días. Tras la impregnación argéntica las piezas se lavaron 3 veces durante 10 minutos en agua destilada y se repitió dos veces más el proceso de fijación y tinción con nitrato de plata en las mismas condiciones.

Finalizado todo el proceso de tinción, las piezas se deshidrataron en una serie creciente de alcoholes (50%-100%), después se pusieron en una mezcla de alcohol-éter (1:1). y finalmente pasaron a través de soluciones crecientes de nitrocelulosa 24 horas en cada una de ellas. Los ojos se incluyeron en nitrocelulosa del 20%, orientándolos para ser cortados en un plano paralelo al eje rostro caudal del animal. Los bloques se almacenaron en cloroformo, a 4° C, hasta el momento de seccionarlos.

Los bloques fueron tallados y puestos 1-2 horas en

aceite de cedro antes de ser seccionados. Las secciones se realizaron a 80-100 μm de grosor, utilizando un microtomo MSE, y se recogieron también en aceite de cedro, después se montaron con resina Dammar siguiendo el procedimiento publicado por Prada y López Mascaraque (1985).

Las retinas bien teñidas se observaron en un fotomicroscopio Zeiss, con cámara lúcida incorporada, siempre asegurándonos de que las células observadas estaban totalmente incluidas dentro de la sección, enfocando los límites superiores e inferiores de la misma.

De cada retina observada se dibujaron, a cámara lúcida, todas las distintas células de la retina. Los dibujos fueron realizados a 40x y luz transmitida. Las fotografías fueron tomadas con película Copex Ahu Pan a 20x y 40x.

III.2.4 Método de determinación del contenido celular de DNA.

Sobre la mitad de portaobjetos gelatinados, se extendieron las células disociadas de retina obtenidas por el procedimiento indicado anteriormente. Sobre la otra mitad se extendieron eritrocitos de pollo recién extraídos por el procedimiento indicado en el punto III.2.4.1. De esta forma ambas poblaciones de células se sometieron al mismo protocolo de tinción. Las extensiones se secaron rápidamente con aire seco y continuaron durante 12 a

16 horas a temperatura ambiente. Después se fijaron en etanol 100%-ácido acético glacial (3:1), durante un tiempo mínimo de 2 horas. Transcurrido este tiempo, se lavaron durante 10 a 15 minutos en agua destilada y se sometieron a hidrólisis ácida, con ClH 5N a $19\pm 1^{\circ}\text{C}$ de temperatura durante 45 minutos. A continuación se hicieron lavados de 15 minutos cada uno, en agua destilada fría (4°C), a temperatura ambiente, e inmediatamente se aplicó sobre las células el reactivo de Schiff al 1%, preparado según el método de Lillie (tomado de Martoja 1970) durante 2,5 horas en cámara húmeda. Finalmente se hicieron 3 lavados de 2 minutos cada uno en agua sulfurosa (5 ml ClH 1N y 5 ml de metabisulfito sódico 10% en 90 ml de agua destilada), preparada en el momento de su utilización, y un lavado final en agua destilada durante 5 a 10 minutos. Las extensiones se dejaron secar a temperatura ambiente y se almacenaron en oscuridad (para evitar la pérdida de tinción de las células) hasta la valoración de su contenido en DNA. En el momento de hacer la lectura del DNA las extensiones se montaron provisionalmente, utilizando agua destilada y colocando un cubreobjetos, el cual se selló al portaobjeto con laca de uñas.

La lectura de las cantidades de DNA se realizó con un microdensitómetro integrador Vickers M-85. Se utilizó un objetivo de 100x, con máscaras que dejan un campo entre 10 y 30 micras de diámetro, bajo luz de 550 nm de longitud de

onda, con una anchura de banda de 30 nm (de 520 a 580 nm) y utilizando un ojo lector (o "spot") de 0,4 micras de diámetro.

La selección de los núcleos, para medir su contenido en DNA, se realizó al azar; tomando la lectura de cualquier núcleo que nos encontráramos recorriendo el porta y aplicando los siguientes criterios:

1) Identificación inequívoca del tipo de fotorreceptor (cono o bastón) al que pertenecía el núcleo cuya cantidad de DNA se iba a determinar.

2) Selección de la máscara de tamaño más conveniente en relación al tamaño del núcleo.

3) Ajuste de la transmitancia a 100%, colocándo el ojo lector fuera del núcleo pero dentro del campo delimitado por la máscara.

4) Cada lectura se obtuvo hallando la media de dos lecturas del mismo núcleo.

Un mínimo de 30 fotorreceptores y 30 eritrocitos fueron medidos por cada portaobjeto estudiado. Las lecturas integradas que nos proporciona el microdensitómetro se expresan en unidades arbitrarias de DNA (U.A.). Los valores absolutos de DNA expresados en pg que se muestran en los resultados, se obtienen comparando el contenido medio en DNA en U.A. de los eritrocitos de pollo, que tienen una cantidad 2C de DNA = 2,5 pg (Rasch 1985), con

el contenido medio en DNA en U.A. de los fotorreceptores de la rata.

III.2.4.1 Obtención de eritrocitos de pollo.

Los pollos se sacrificaron por decapitación, recogiendo la sangre en un tubo debidamente heparinizado. A continuación una gota de sangre se dispuso en cada portaobjetos, previamente gelatinado, y se extendió.

III.2.4.2 Medición del crecimiento de los fotorreceptores.

Se eligieron al azar y se dibujaron a 40 aumentos al menos 20 bastones y todos los conos (entre 3 y 24) de los disgregados en fresco de retinas completas entre P3 y 12 meses postnatal. Con un curvímeter se midió la longitud de cada uno de ellos, desde el pedículo a la base del cilio de conexión. La media de longitud en centímetros se representó, por separado para conos y bastones, respecto al estadio de desarrollo.

I V. R E S U L T A D O S.

IV.1 METODO DE DISGREGACION CELULAR DE LA RETINA.

Para estudiar el desarrollo de los fotorreceptores en disgregados de retinas en desarrollo fue necesario realizar numerosos experimentos hasta establecer las concentraciones óptimas de proteasa con las que obtener el mayor número de fotorreceptores integros. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla IV.1, en la que se detalla el número de animales utilizados y las condiciones idóneas de disgregación para cada día del desarrollo.

La concentración óptima de proteasa para obtener las células precursoras de fotorreceptores en retinas de rata entre P3 y P7 (3 y 7 días postnatal), resultó ser de $15-17 \times 10^{-3}$ mg/ml (Tabla IV.1), mientras que para retinas de P8 en adelante hasta el estadio de adulto, la concentración óptima de proteasa fué de 20×10^{-3} mg/ml (Tabla IV.1). Un hecho que consideramos en nuestra experimentación fue que la estructura y consistencia de la retina se modifican a medida que avanza el desarrollo, y que en cada día las condiciones de extracción de las células podrían variar. Así obtuvimos, que para disociar retinas entre P3 y P10 necesitamos emplear una solución de sacarosa al 10,26%, mientras que para las retinas de P11 en adelante utilizamos una solución al 6% (Tabla IV.1). Por otro lado, el volumen de tejido por volumen total de solución de dis-

TABLA IV.1 Condiciones óptimas para la disociación de la retina de rata.

EDAD EN DIAS POSTNATALES	Nº DE ANIMALES	PROTEASA mg/ml $\times 10^{-3}$	SACAROSA mg/100ml	Nº RETINAS POR DISOCIACION
3	4	15	10,26	2
4	3	15	10,26	2
5	13	15	10,26	2
6	21	16	10,26	2
7	6	17	10,26	2
8	6	20	10,26	2
9	5	20	10,26	2
10	6	20	10,26	2
11	7	20	6	2
12	5	20	6	2
13	5	20	6	2
14	4	20	6	2
15	2	20	6	2
16	2	20	6	1
17	2	20	6	1
18	1	20	6	1
19	2	20	6	1
20	2	20	6	1
Adulto	52	20	6	1

En todos los casos el volúmen final de disociación fue de 0,4 ml.
Adulto: ratas desde 21 días postnatales hasta 7-8 meses.

gregación también resultó ser importante. Por ello en los estadios más jóvenes (entre P3 y P15), fue necesario utilizar 2 retinas por cada experimento, mientras que a partir de P16 una única retina fue suficiente para obtener el número de células adecuado. Estos resultados demuestran, pues que dependiendo del grado de desarrollo del tejido, se requieren determinadas condiciones de experimentación.

Para evaluar la eficacia del método, en cada disgregación celular se contaron las células en 6 campos ópticos, elegidos al azar. En cada campo se contaron: 1) el número total de células de cualquier tipo, 2) el número de fotorreceptores totales, y 3) el número de fotorreceptores íntegros respecto al total de los mismos. Consideramos fotorreceptor íntegro aquel que presentaba su estructura completa; es decir, el soma, la prolongación interna, el terminal sináptico y los segmentos interno y externo. Para obtener el número de fotorreceptores totales contamos además de los fotorreceptores íntegros, aquellos identificados de forma inequívoca por poseer segmentos externo e interno, puesto que ninguna otra célula de la retina posee estas estructuras. El número medio de células contadas por cada retina disociada fue siempre superior a 100, siendo el promedio de 125. Consideramos como disgregaciones óptimas aquellas en las que el porcentaje final de fotorreceptores completos superaba el 50%, y disgregaciones no óptimas aquellas en las que el

TABLA IV.2 Evaluación de la eficacia del método de disociación. A, corresponde a disociaciones consideradas óptimas, mientras que B corresponde a disociaciones consideradas no óptimas (veáse texto).

	Nº DE ANIMALES	Nº TOTAL CELULAS OBSERVADAS	Nº DE FOTORRECEPTORES			
			TOTALES	% RESPECTO A CELULAS TOTALES	% DE INTEGROS RESPECTO A LOS TOTALES	
A	11	1380	1191	86,30	818	68,68
B	7	982	834	84,92	283	33,93

porcentaje de fotorreceptores íntegros quedaba por debajo del 50%. En la tabla IV.2 mostramos los resultados obtenidos en 18 retinas de ratas adultas (más de 21 días postnatal). Cuando las condiciones son óptimas (línea A de la tabla) se obtiene, como promedio, que el 86,30% del número total de células disgregadas son fotorreceptores, y además que el 68,68% de ellos se extraen íntegros. Un estudio de la viabilidad de estas células en disgregaciones óptimas demostró que el 100% de los fotorreceptores íntegros excluyen el trypan blue, es decir son células vivas; además el 98% de las células no completas también excluyó el colorante. Sólo un 2% de células (somitas sin prolongaciones) incorporó el colorante, indicando su inviabilidad.

Como se dijo anteriormente, nuestro estudio está centrado en el desarrollo de los fotorreceptores. Sin embargo, con el método de disociación que hemos utilizado, ha sido posible obtener además de fotorreceptores todos los restantes tipos celulares de la retina, como son: distintos tipos de células bipolares y amacrinas, horizontales, ganglionares y células de Müller, tanto en retinas en desarrollo (Fig. IV.1) como en adultas (véase Fig. IV.3). La figura IV.1 muestra los distintos tipos de neuroblastos de una retina de P12 (12 días postnatal). La mayoría de ellos ya presentan formas similares a las adul-

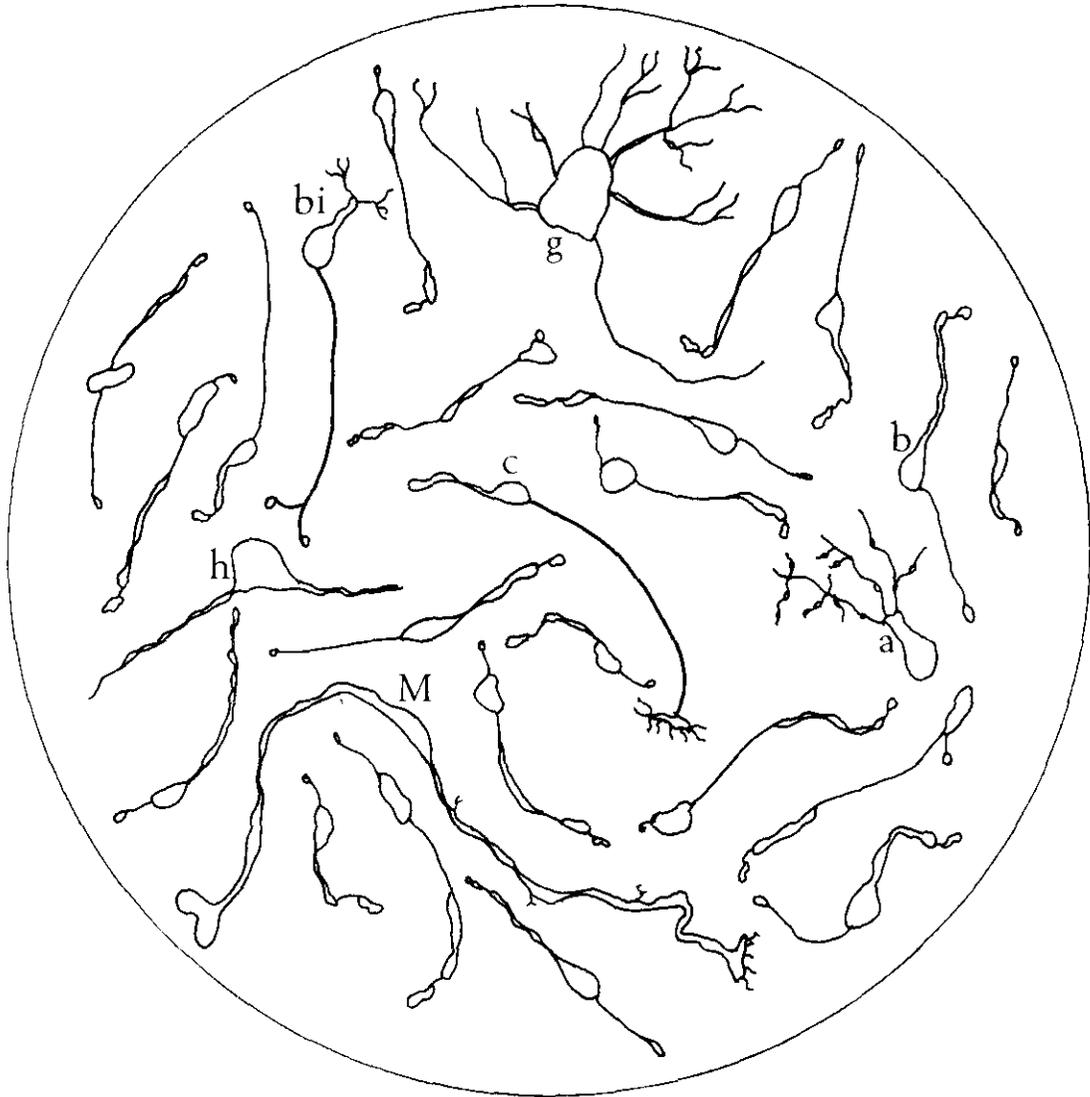


FIGURA IV.1 Dibujos a cámara lúcida de neuroblastos de las distintas células obtenidas por disociación celular de una retina P12. Las células se han dispuesto al azar, tal y como se observan en un campo microscópico de los disgregados. c, cono; b, bastón; h, célula horizontal; bi, célula bipolar; a, célula amacrina; g, célula ganglionar; M, célula de Müller (glia). 460 x

tas, aunque todavía no han alcanzado su tamaño y estructuración dendrítica definitivas. En el campo microscópico mostrado en esta figura podemos observar células bipolares (bi), células amacrinas (a), células ganglionares (g), células horizontales (h), células de Müller (M), y fotorreceptores (conos, c y bastones, b) en muchísima mayor proporción que el resto de tipos celulares. Nótese que además los conos son escasísimos en los disgregados, en concordancia con los estudios que han demostrado que la retina de la rata tiene un pequeño número de estas células.

La identificación de los distintos tipos de células en los disgregados se hizo por comparación con las formas observadas en preparaciones de Golgi. En la figura IV.2 mostramos por composición microfotográfica la estructura de una retina P8 teñida por este método, que utilizamos como referencia para el estudio de los disgregados desde P8 en adelante.

En la figura IV.3 se muestra una selección de neuronas disgregadas de la retina de rata adulta. En ella podemos apreciar cómo nuestro método de disociación es capaz de extraer las neuronas de la retina íntegras, con sus prolongaciones más finas. Por lo tanto, el método nos ha permitido estudiar las diferencias en las formas y posición del soma de las células fotorreceptores, que explicamos con detalle en el apartado IV.2.1, y de las restantes clases de células de la retina,

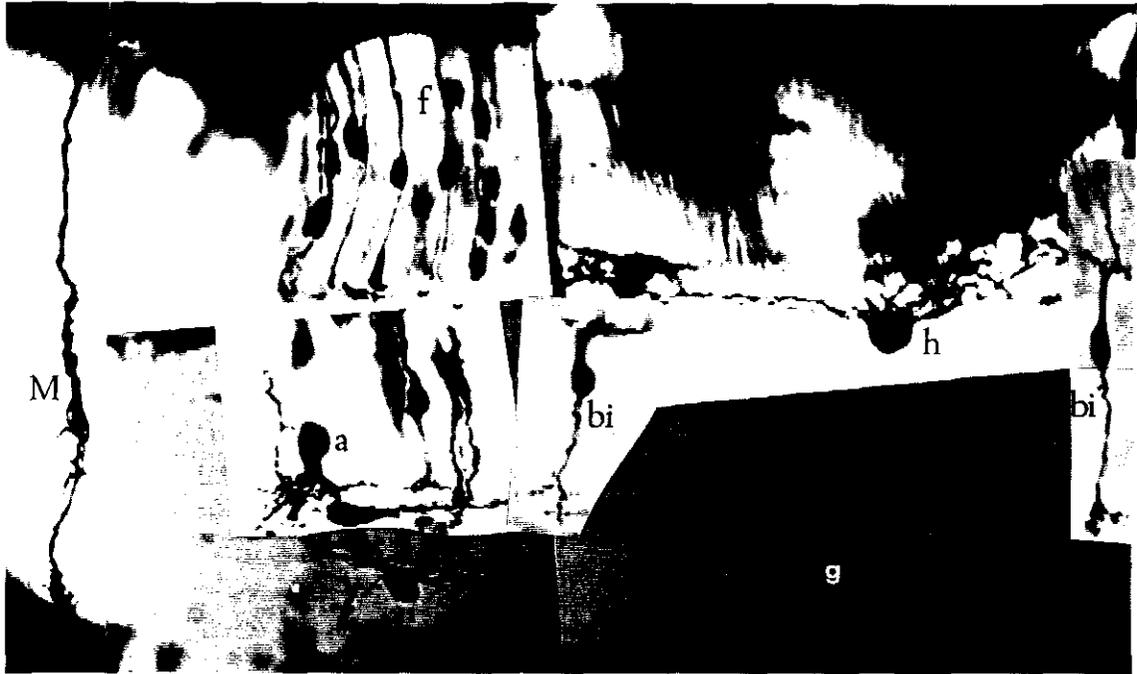


FIGURA IV.2 Composición de una retina de rata de P8 mediante microfotografías de los diferentes tipos de células teñidas por el método de Golgi. f, fotorreceptores; bi, célula bipolar; h, célula horizontal; a, célula amacrina; ai, célula amacrina invertida; g, célula ganglionar; M, célula de Müller (glia). Nótese que las células ya ocupan su capa definitiva en este estadio. 300 x

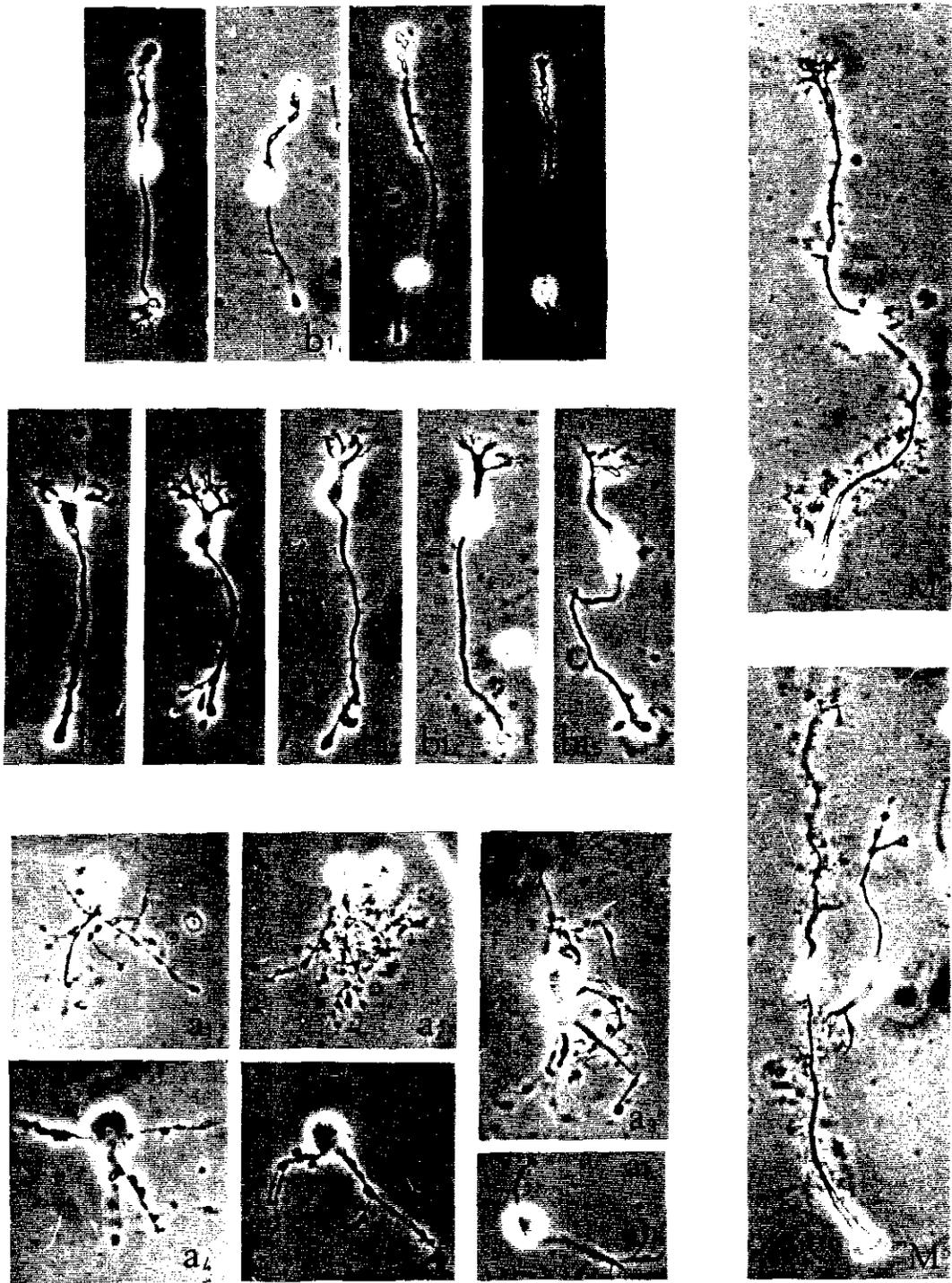


FIGURA IV.3 Microfotografías de los diferentes tipos celulares de la retina adulta (más de 21 días postnatal). c, cono; b1-b3, bastones; b11-b15, bipolares; a1-a6, amacrinas; M, células de Müller. 550 x

cuyos hallazgos más interesantes resumimos a continuación.

Las células bipolares muestran gran diversidad morfológica. Sus somas tienen diferentes tamaños y formas; mientras unos son pequeños y ovalados (Fig. IV.3, bi4, bi5), otros son de mayor tamaño, triangulares o piriformes (Fig. IV.3, bi1, bi2, bi3). Las que tienen el soma ovalado presentan una prolongación externa gruesa, de longitud variable, que termina en las ramificaciones dendríticas que se extienden en la capa plexiforme externa (Fig. IV.3, bi4, bi5). Las que tienen el soma triangular o piriforme carecen de prolongación externa. Su árbol dendrítico parte directamente del soma y suele ser bifurcado (Fig. IV.3, bi1, bi2, bi3). Todas las bipolares presentan una prolongación interna más fina ó axón que une el soma con el terminal sináptico, el cual puede ser único (Fig. IV.3, bi1), bifurcado en dos (Fig. IV.3, bi3, bi5) o ramificado en 3 ó 4 terminales axónicos (Fig. IV.3, bi2, bi4).

Entre las células amacrinas también hemos encontrado una gran diversidad morfológica. Sus somas muestran grandes diferencias en tamaño y forma. Unos son redondeados, de tamaño medio con una única prolongación interna de longitud y grosor variable, que se ramifica en numerosas dendritas finas y varicosas (Fig. IV.3, a1, a2), otros son redondeados, de gran tamaño con una prolongación interna gruesa que se ramifica en numerosas dendritas con aspecto varicoso (Fig. IV.3, a3), y otros

son redondeados, de diferentes tamaños y con pocas dendritas, gruesas y varicosas, saliendo del soma directamente (Fig. IV.3, a4-a6).

Las células de Müller son las de mayor longitud de toda la retina (Fig. IV.3, M), puesto que se extienden desde una limitante a otra. Presentan un soma pequeño y ovalado en posición media. Una prolongación externa gruesa y con pequeñas espículas citoplásmicas se extiende desde el soma hasta el nivel de la membrana limitante externa, donde se observan las pequeñas prolongaciones citoplásmicas ó microvilli que se internan en la retina pigmentaria. La prolongación interna, también gruesa, une el soma con los "pies de unión" en la limitante vítrea. A lo largo de esta prolongación también se observan pequeñas espículas citoplásmicas. Estas células no presentan más de 3-4 pies de unión.

Las células ganglionares se caracterizan por un soma grande del que emerge en su extremo escleral ó externo, un gran árbol dendrítico. Del extremo interno sale el axón (Fig. IV. 1, g). Estas células han sido extraídas en días jóvenes del desarrollo hasta P12. Sin embargo, las condiciones utilizadas para la disociación de los fotorreceptores adultos no permiten la extracción de células ganglionares; por ésto carece de células ganglionares la fig. IV. 4 que comentaremos más adelante. Una interpretación para el hecho de que en las mismas

condiciones de experimentación se disocian todas las células de la retina menos las ganglionares, a partir de un determinado estadio, es que a medida que avanza el desarrollo desaparece algún tipo de molécula sobre la que actúa el complejo enzimático utilizado. Esta interpretación será discutida en el apartado correspondiente.

En la figura IV. 4 mostramos una reconstrucción de la retina de la rata adulta a base de dibujos, a cámara lúcida, de todos los tipos de células obtenidos por disociación. Al ordenar y orientar las células aisladas, resulta una imagen de la estructura de la retina que difícilmente puede obtenerse mediante las técnicas clásicas de microscopía óptica ó electrónica. Compárese la figura IV.4 con las figuras IV.2 y IV.5, y obsérvese por ejemplo los detalles estructurales en fotorreceptores y células de Müller en la fig. IV.4 que no pueden evidenciarse en las figs. IV.2 y IV.5.

Resumiendo: Hemos puesto a punto un método de disgregación que resulta muy eficaz para extraer íntegros los fotorreceptores de la retina. Además permite disociar el resto de tipos celulares de la retina tanto embrionaria como adulta. Estos resultados, como veremos, nos han permitido hacer un estudio "in vivo" del desarrollo y la estructura adulta no sólo de los fotorreceptores, sino también de las otras clases de células de la retina de la rata.

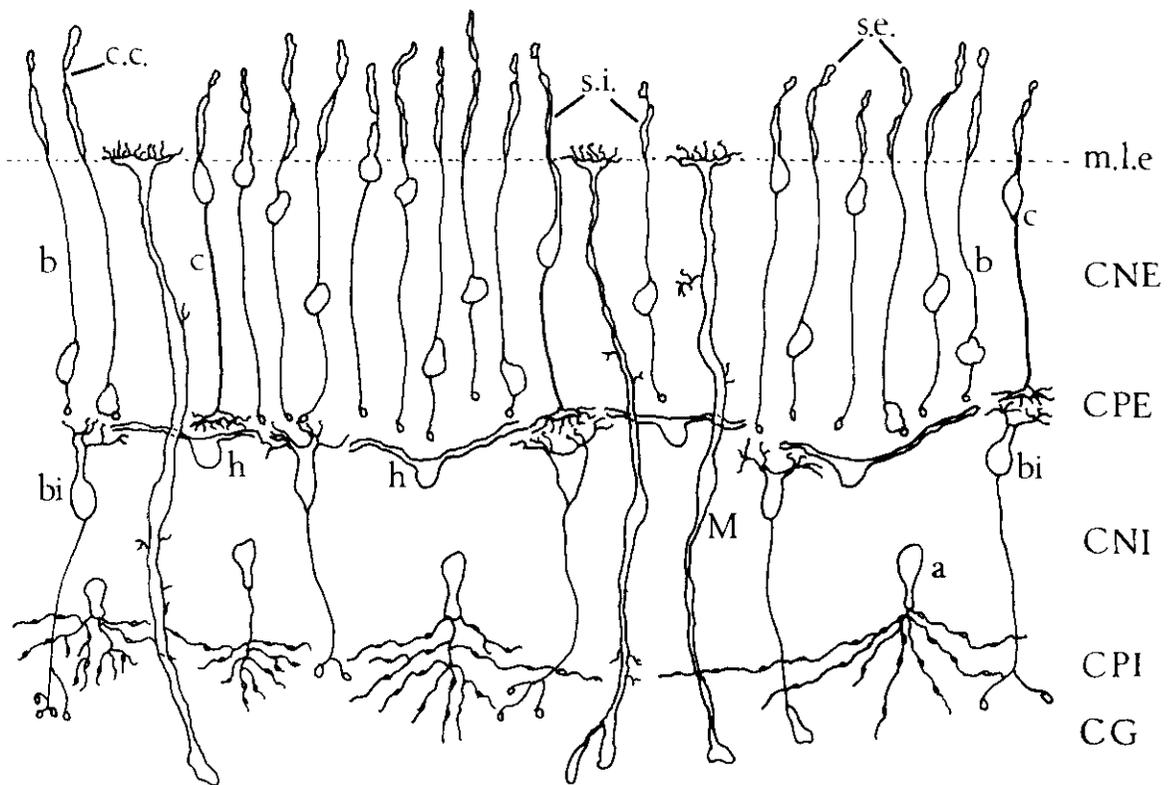


FIGURA IV.4 Reconstrucción de la retina de la rata adulta a base de dibujos a cámara lúcida de los distintos tipos de neuronas obtenidas por disgregación celular. m.l.e, membrana limitante externa; CNE, capa nuclear externa; CPE, capa plexiforme externa; CNI, capa nuclear interna; CPI, capa plexiforme interna; CG, capa de células ganglionares; c, cono; b, bastón; h, célula horizontal; bi, célula bipolar; a, célula amacrina; M, célula de Müller (glia); s.i, segmento interno; s.e., segmento externo; c.c, cilio de conexión. Las células ganglionares no han sido incluidas en este esquema por dificultad de su extracción en retinas adultas. 380 x



CNE

CPE

CNI

CPI

CG

FIGURA IV.5 Microfotografía de retina de rata de P8 teñida por el método de Golgi. En este día del desarrollo se identifican claramente todas las capas de la retina debido a que los distintos tipos de neuronas ocupan su posición definitiva. CNE, capa nuclear externa; CPE, capa plexiforme externa; CNI, capa nuclear interna; CPI, capa plexiforme interna; CG, capa ganglionar. 300 x

IV.2 COMPORTAMIENTO DE LOS NEUROBLASTOS DE LOS FOTORRE- CEPTORES.

El comportamiento de los neuroblastos de los fotorreceptores (cambios en la posición y la forma) ha sido estudiado hasta el día P20 (postnatal) mediante dos métodos diferentes: 1) un nuevo método de disociación celular (apartado III.2.3.), 2) método de Golgi (apartado III.2.2.).

Comenzamos en el día E18±1, porque trabajos previos de microscopía electrónica (Kuwabara y Weidman 1974) indican que es precisamente en este estadio cuando comienza a observarse cómo los cilios de los neuroblastos de los fotorreceptores atraviesan la membrana limitante externa y se extienden hacia el espacio que circunda los microvilli (pequeñas prolongaciones citoplásmicas) de las células de la retina pigmentaria.

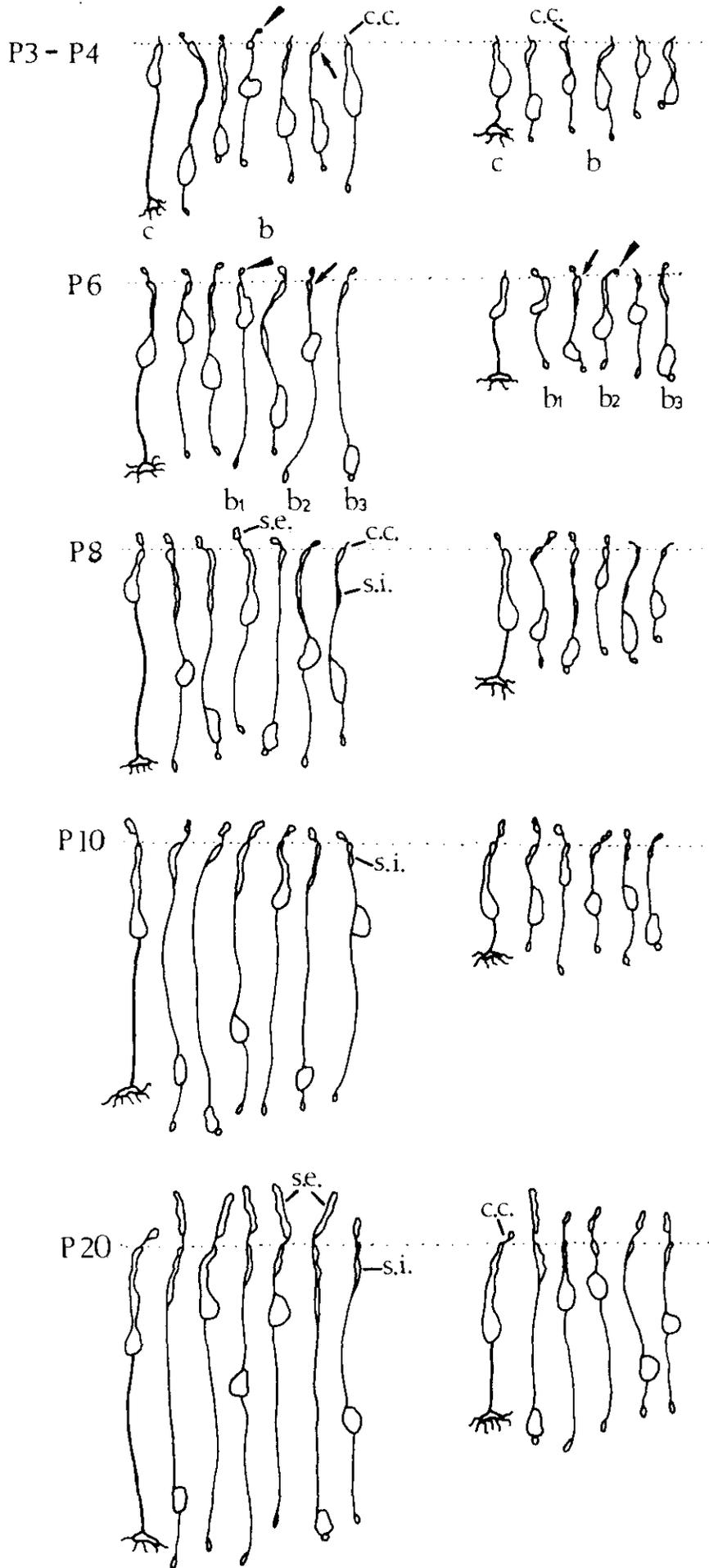
IV.2.1 Estudio del comportamiento de los neuroblastos de los fotorreceptores por disociación celular.

Por disgregación celular hemos estudiado el desarrollo de los fotorreceptores desde P3 hasta P20, estadio éste en el que las ratas ya se consideran adultas. Las diferentes formas de los neuroblastos obtenidos en cada día se estudiaron en contraste de fase y se dibujaron a cámara lúcida.

Los resultados presentados en la figura IV.6 muestran que en el estadio P3-P4 todos los neuroblastos de fotorreceptores, tanto en retina central (grupo de la izquierda) como en periférica (grupo de la derecha), tienen formas bipolares similares a las de algunos neuroblastos de células amacrinas ó las formas G1 de las células en ciclo

FIGURA IV.6 Dibujos a cámara lúcida de neuroblastos de fotorreceptores, obtenidos por disociación celular de retinas comprendidas entre los días P3 y P20. En cada estadio el grupo de células a la izquierda corresponde a neuroblastos de retina central y el de la derecha a retina periférica. Para su alineación se ha tomado como referencia la base del cilio de conexión. En cada grupo, la primera célula de la izquierda representa a un neuroblasto de cono (c) y las restantes constituyen una muestra representativa de los neuroblastos de bastones (b), con los somas en distintas posiciones en la capa nuclear externa (b1-b3 en P6). Flecha, esbozo de segmento interno; s.i, segmento interno; cabeza de flecha, esbozo de segmento externo; s.e., segmento externo; c.c., cilio de conexión. Obsérvese que desde las primeras fases de morfogénesis (P3-P4) los neuroblastos de fotorreceptores muestran formas similares a las adultas. 380x

FIGURA IV.6



(Hinds y Hinds 1983, Prada y col. 1983). Sin embargo, los precursores de fotorreceptores mostrados poseen una pequeña prolongación, la cual emerge de un pequeño abultamiento citoplásmico (futuro segmento interno) en el extremo escleral de la célula e incluye en su interior el futuro cilio de conexión (Fig. IV.6, P3-P4, c.c). Esta pequeña prolongación es un marcador incuestionable de los fotorreceptores, puesto que a partir de ella se forma el esbozo del segmento externo (Figs. IV.6, P6 y Fig. IV.7, cabeza de flecha). En este estudio, ya se distinguen claramente los neuroblastos de las dos clases de fotorreceptores clásicamente conocidos: 1) conos, algunos de los cuales ya muestran un pedículo sináptico bien desarrollado (Fig. IV.6, P3-P4, c) y 2) bastones, con una esférula sináptica incipiente en su extremo interno (Fig. IV.6, P3-P4, b).

Los neuroblastos de bastones muestran sus somas a distintos niveles, ya desde las primeras fases de su diferenciación. Hemos considerado como nivel externo ó más escleral al formado por aquellos somas que estarían próximos a la membrana limitante externa (Fig. IV.6, P6, b1) y que, en secciones, ocupan el nivel más externo de la futura capa nuclear externa. El nivel interno o vitreal, formado por los somas que ocupan el nivel más interno de la futura capa nuclear externa (Fig. IV.6, P6, b3). Por último, el nivel ocupado por los somas en posiciones

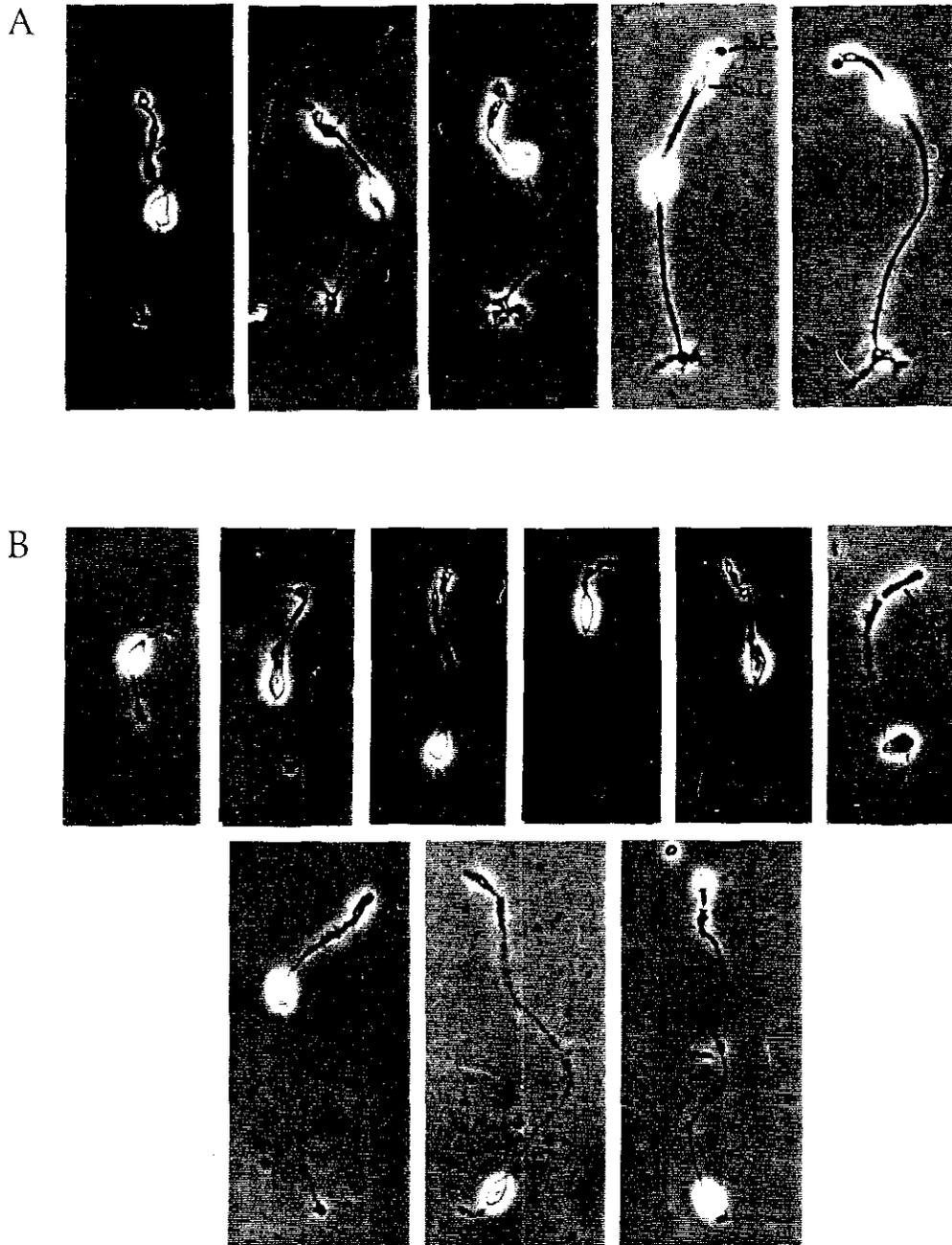


FIGURA IV.7 Microfotografías de algunos neuroblastos de fotorreceptores disgregados de retinas en distintos estadios del desarrollo. Serie A, neuroblastos de conos. Serie B, neuroblastos de bastones. Ambas series se han dispuesto en orden creciente de diferenciación. flecha, esbozo del segmento interno; s.i, segmento interno; cabeza de flecha, esbozo del segmento externo; s.e, segmento externo; c.c., cilio de conexión. 550x

intermedias entre los anteriores (Fig. IV.6, P6, b2).

Obsérvese que los neuroblastos de bastones que tienen el soma en posición más externa (Fig. IV.6, P6, b1) presentan una única prolongación vitreal ó interna muy fina al final de la cual se observa la esférula sináptica. Los que tienen el soma en posición más interna, muestran una única prolongación escleral o externa que se extiende hasta el comienzo del segmento interno; y su terminal sináptico se encuentra directamente unido al soma en su parte vitreal (Fig. IV.6, P6, b3). Los que tienen el soma en posiciones medias, presentan una prolongación fina interna que termina en la esférula sináptica y otra escleral ligeramente más gruesa que los une al segmento interno; en ambas la longitud varia dependiendo de la posición del soma (Fig. IV.6, P6, b2).

En un mismo estadio los neuroblastos de conos muestran mayor grado de diferenciación que los de los bastones y son muy similares a los conos adultos. Sus somas, de forma ovalada, ocupan sólo los niveles medio y externo de la futura capa nuclear externa. Los que tienen el soma en posición media tienen una prolongación gruesa que les une al segmento interno y otra más fina, interna, que termina en el pedículo sináptico bien diferenciado (Fig. IV.6, P3-P4, c). Los que tienen el soma en posición externa muestran sólo prolongación vítrea, que termina igualmente en un pedículo. En ambos casos las prolongaciones son de ma-

yor grosor que las de los bastones.

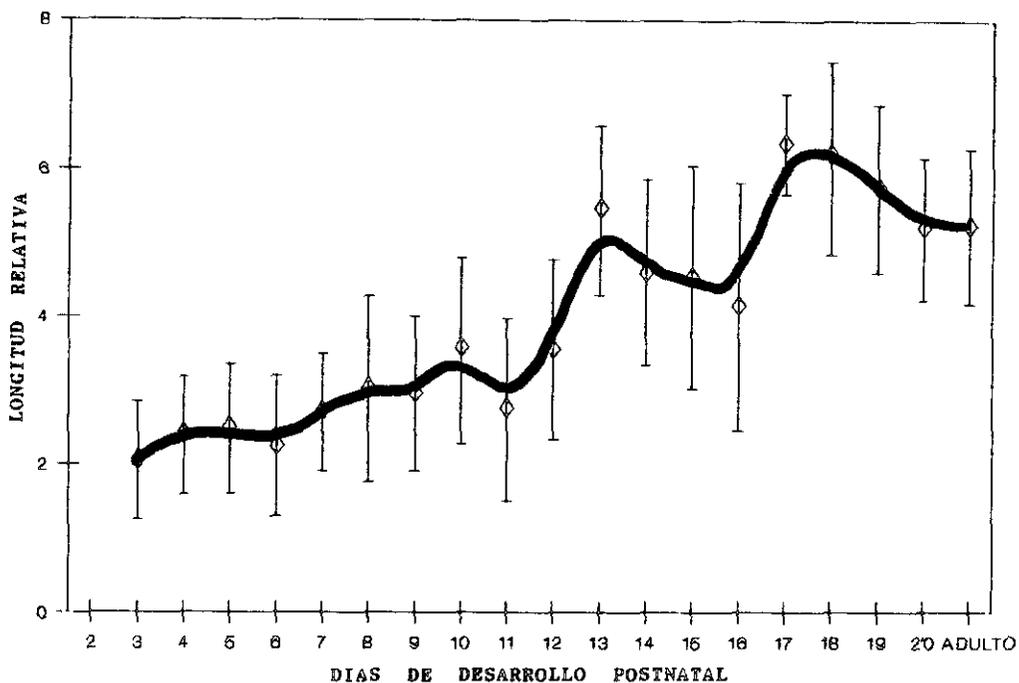
Desde los primeros días del desarrollo hemos observado dos grupos de neuroblastos de fotorreceptores en cada estadio. Uno formado por neuroblastos de mayor tamaño y grado de diferenciación, que corresponden sin duda a la retina central (Fig. IV.6, grupo de la izquierda en todos los estadios), y otro formado por neuroblastos de pequeño tamaño y menos diferenciados que pertenecen a la retina periférica (Fig. IV.6, grupo de la derecha). El estudio de ambos grupos nos permite afirmar que la diferenciación de los fotorreceptores de la retina periférica se produce con un retraso de dos días, aproximadamente, respecto a los de la retina central. Obsérvese (Fig. IV.6, P4, P6, cabeza de flecha) que por ejemplo el esbozo del segmento externo de los fotorreceptores de retina periférica a P6 tiene un grado de desarrollo similar al de los fotorreceptores de retina central de P4. Este retraso se mantiene a lo largo de todo el desarrollo y las diferencias de tamaño entre los fotorreceptores de retina central y periférica se mantienen en el adulto (Fig. IV.6, P20).

Un hecho notable es que el cilio de conexión, que en el adulto se encuentra en el extremo externo del segmento interno, se forma antes de que el segmento interno inicie su formación (Fig. IV.6, P3-P4, neuroblastos de bastones de retina periférica a la derecha). Por lo tanto el cilio de conexión se va desplazando durante el

desarrollo, alejándose del soma de la célula, a medida que crece el segmento interno. Este desplazamiento se puede explicar por la agregación de nuevas moléculas (de membrana y/o del citoesqueleto) en posición más interna al cilio de conexión. Es pues evidente que el crecimiento del segmento interno se produce entre la unión del fotorreceptor a la membrana limitante externa (no indicada en la figura IV.6) y el cilio de conexión. Además hemos observado que el crecimiento del segmento interno ocurre a la vez que el segmento externo; interesantemente éste emerge del extremo libre del cilio de conexión y se dirige hacia la pigmentaria (Fig. IV.6, cabezas de flecha, s.e).

Las disgregaciones de retinas de P5 días en adelante, nos han revelado que tanto los neuroblastos de conos como los de bastones presentan formas muy semejantes a las adultas desde días muy tempranos de su desarrollo. La transformación que experimentan consiste por lo tanto en la formación de los segmentos interno y externo, y la elongación progresiva hasta que alcanzan el tamaño definitivo (Fig. IV.6 y Fig. IV.7), sin que ocurra transformación global alguna de las formas. La elongación (ó crecimiento máxima de los bastones se produce entre los días P12 y P17, periodo en el que duplican su longitud como muestra la figura IV.8. A partir del día P17 hasta el estadio de adulto, los bastones experimentan una ligera reducción de tamaño. Los conos tienen mayor longitud que

BASTONES



CONOS

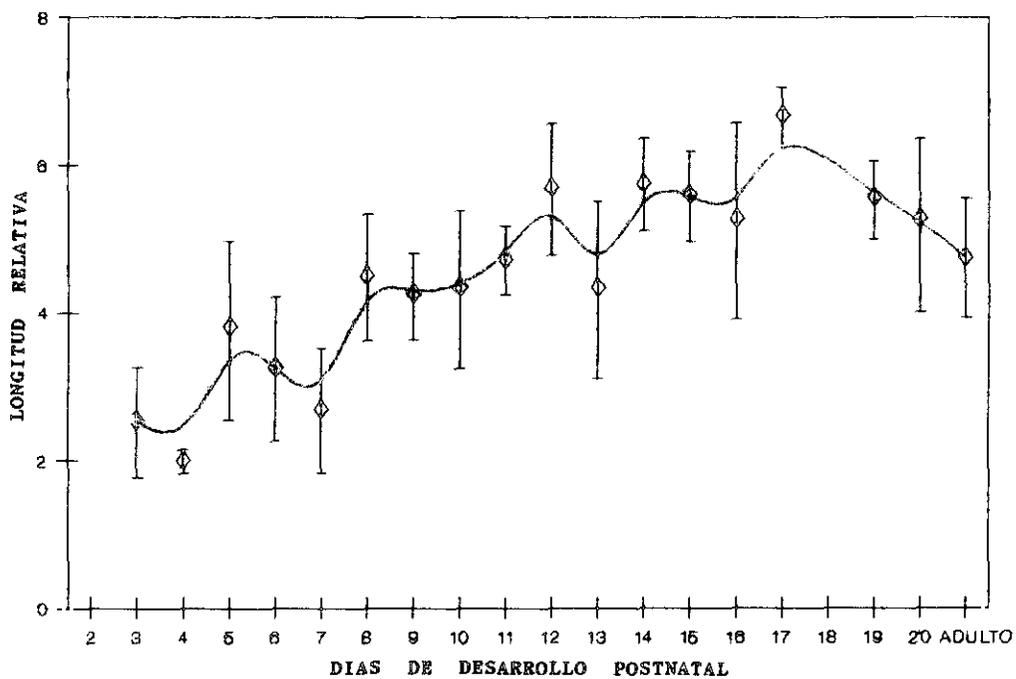


FIGURA IV.8 Curvas de crecimiento de los neuroblastos de los fotorreceptores: bastones y conos. Cada punto representa la longitud media de 20 ó más fotorreceptores, elegidos al azar (véase metodología en el apartado correspondiente).

los bastones desde P0 a P18, y su curva de crecimiento indica que éste es progresivo (Fig. IV.8).

Nuestros resultados evidencian que el soma de los fotorreceptores adopta su posición relativa muy pronto (P3-P4), antes de que la morfogénesis ocurra. Esto lo evidencian las formas b3 de la fig. IV.6, las cuales presentan el pedículo sináptico unido directamente al soma desde los primeros estadios, igual que ocurre en las formas adultas. Por lo tanto, estas formas se elongan únicamente por el polo externo del soma. En cambio, los bastones que poseen el soma adyacente a la membrana limitante externa (formas b1 de fig. IV.6) se elongan únicamente por el polo interno del soma, creciendo así la prolongación interna. Los bastones que poseen el soma en posiciones intermedias se elongan por ambos polos del soma. Esto indica que el programa de crecimiento de cada tipo de bastón es diferente y que está determinado desde muy temprano.

A partir de los días P9-P10 el cambio morfológico más significativo en el desarrollo de los fotorreceptores es el crecimiento progresivo del segmento externo, hasta que alcanza el tamaño del adulto a P20 (Fig. IV.6, P10-P20, s.e). Por otro lado los somas de los bastones van adquiriendo una forma más redondeada y regular, y los pedículos de los conos van adquiriendo prolongaciones sinápticas como en el adulto.

Resumiendo, desde los primeros días del desarrollo postnatal tanto los conos como los bastones presentan formas simples similares a las del adulto y prácticamente las mantienen mientras crecen paulatinamente los segmentos interno y externo, la prolongación interna y los terminales sinápticos. Su crecimiento alcanza el máximo a P17; a partir de P17 disminuyen ligeramente de tamaño debido posiblemente a una reestructuración de las restantes capas de la retina. Aunque los bastones no cambian sustancialmente sus formas durante la morfogénesis, lo cual da una aproximación de homogeneidad entre ellos, sus somas adoptan la posición relativa definitiva antes de que la morfogénesis ocurra, lo cual implica programas de crecimiento diferentes para los segmentos funcionalmente distintos de la célula.

IV.2.1.1 Clasificación de las formas y cuantificación de las mismas.

Clásicamente se han descrito dos clases de células fotorreceptores adultas en la rata: bastones y conos. Sin embargo, atendiendo a la posición del soma dentro de la capa nuclear externa nosotros hemos clasificado cada una de estas poblaciones y hemos cuantificado las células con somas en la misma posición (Figs. IV.9, IV.10, Tabla IV.3).

Nuestros resultados muestran que los somas de los conos son comparativamente de mayor tamaño que los de los

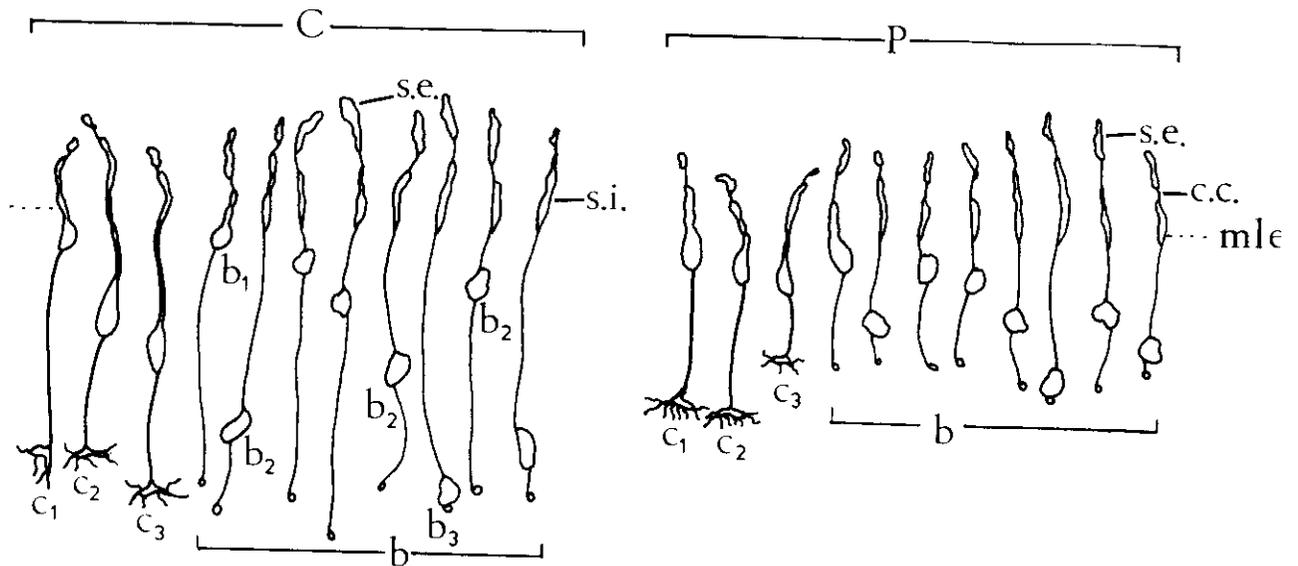


FIGURA IV.9 Dibujos a cámara lúcida de fotorreceptores adultos, obtenidos por disociación celular de retinas de ratas entre P21 a adultas. El grupo de fotorreceptores de la izquierda corresponden a retina central, C, y los del grupo de la derecha a retina periférica, P; m.l.e, nivel tentativo de la membrana limitante externa; c1-c3, conos; b, bastones. Obsérvese que los bastones presentan el soma en posición externa (b1), media (b2) e interna (b3), mientras que los conos sólo en posiciones externa (c1) y media (c2 y c3); s.e, segmento externo; c.c, cilio de conexión; s.i, segmento interno. 350x

bastones, tienen forma ovalada y están distribuidos en la mitad externa de la capa nuclear externa (Fig. IV.9). Cabe destacar que no fue encontrado cono alguno con el soma en la mitad interna de la capa nuclear externa. Los conos que tienen el soma en posición externa, tangente a la membrana limitante externa, tienen una única y larga prolongación interna que termina en un pedículo sináptico cónico con finas terminaciones sinápticas (Fig. IV.9 y IV.10, c1). Los que tienen el soma en posiciones medias tienen una prolongación escleral gruesa y otra vitreal más fina, ambas de longitudes variables según que el núcleo esté situado más o menos alejado de la membrana limitante externa (Figs. IV.9 y IV.10, c2 y c3). Podemos pues distinguir, conos con el soma en posición externa y conos con el soma en posición media.

Los resultados de cuantificación de los conos (Tabla IV.3) muestran que éstos constituyen el 2,69% de todos los fotorreceptores de la retina. Los conos con el soma en posición externa son el 41,02% de todos los conos y los que tienen el soma en posición media son el 58,97% del total también. Estos resultados llamaron nuestra atención, puesto que esperábamos mucho menor porcentaje de conos en posición externa y mucho mayor en posición media, dado que el espacio a ocupar por los conos en posición media es mayor que el que tienen para ocupar los de posición externa. Los bastones tienen sus somas en cualquiera de los

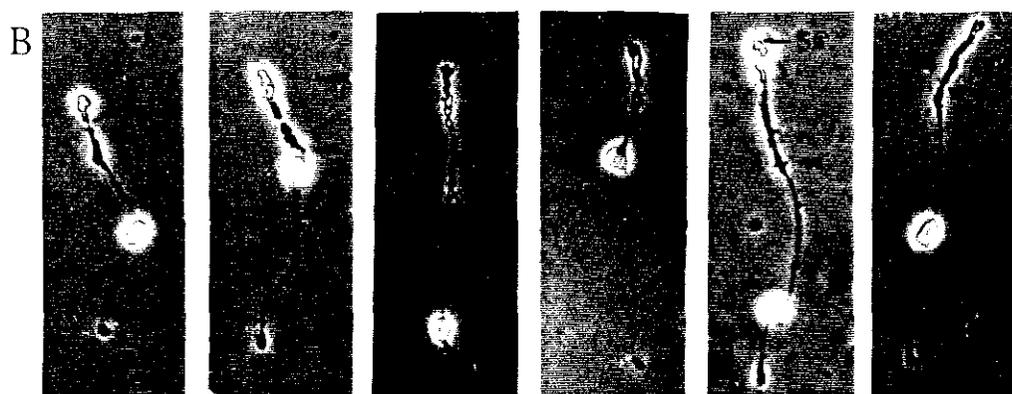
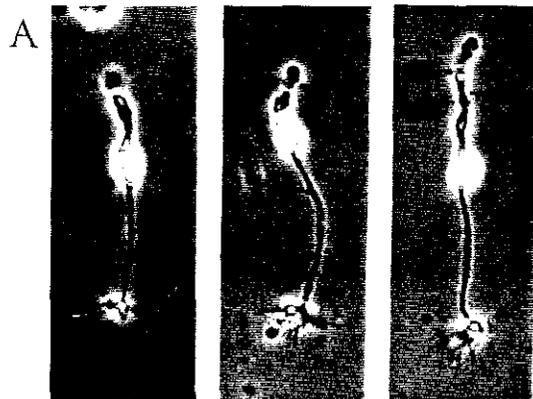


FIGURA IV. 10 Microfotografías de fotorreceptores adultos obtenidas por disociación de retinas de ratas entre P21 y adultas. **Serie A**, conos; **Serie B**, bastones; s.e, segmento externo; c.c; cilio de conexión; s.i; segmento interno; cabeza de flecha, nivel de la membrana limitante externa. *, pedículos y esférulas. Obsérvese la variación en la posición del soma de los bastones. 550x

TABLA IV. 3 Clasificación y cuantificación de los fotorreceptores.

CLASE DE FOTORRECEPTOR	POSICION DEL SOMA	Nº	A	B
Conos	Externa	16	41,02	2,69
	Media	23	58,97	
Bastones	Externa	237	16,80	97,31
	Media	994	70,49	
	Interna	179	12,29	
Número total de fotorreceptores: 1449				

Nº : Número de fotorreceptores de cada tipo.

A : Porcentaje de cada tipo de fotorreceptor respecto al total de cada clase de fotorreceptor.

B : Porcentaje de cada clase de fotorreceptor respecto al total de fotorreceptores.

tres niveles de la capa nuclear externa considerados, y son células muy alargadas y delgadas (Fig. IV.9 y IV.10). Los bastones con el soma en posición externa (tangente a la membrana limitante externa), tienen una única y fina prolongación vítrea que termina en una pequeña esférula sináptica (Figs. IV.9 y IV.10, b1). Los que tienen el soma en cualquier posición en el nivel medio, tienen una prolongación escleral y otra vitreal de longitudes variables según la posición del soma (Fig. IV.9 y IV.10, b2). A diferencia con los conos que ocupan el nivel medio, los bastones tienen el soma en cualquier posición entre el nivel externo y el interno. Los bastones con el soma en posición interna tienen una única prolongación escleral y su esférula sináptica sale directamente del soma.

No hemos encontrado prolongaciones citoplásmicas o "calicial processes" en el segmento interno de los fotorreceptores de la retina de la rata.

La cuantificación del número de bastones (Tabla IV.3) indica que éstos constituyen el 97,31% de todos los fotorreceptores. Los bastones con somas en posición externa son el 16,8% de todos los bastones; los que tienen el soma en posición media son el 70,49% y los que tienen el soma en posición interna son el 12,29%. Estos resultados eran esperados puesto que el espacio a ocupar por los bastones en posición media es mucho mayor que el que ocupan los que tienen sus somas en posición externa e in-

terna. Además, puesto que los bastones en estas últimas posiciones ocupan espacios similares, los porcentajes son similares, indicando una distribución homogénea.

En la tabla IV.4 mostramos la distribución de todos los fotorreceptores en los tres niveles de la capa nuclear externa. En posición externa hay un 17,46% de fotorreceptores, de los cuales 1,10% son conos y 16,36% bastones. En posición media están el 70,18% de fotorreceptores, de los cuales 1,76% son conos y el 68,6% bastones. En posición interna sólo hay bastones y son el 12,35% de los fotorreceptores.

En resumen, nuestro método de disgregación nos ha permitido clasificar las formas de los fotorreceptores en base a la posición del soma y cuantificarlas. Los resultados obtenidos indican que 1) en la retina de la rata predominan los bastones, puesto que los conos no llegan a ser el 3% de fotorreceptores, 2) la posición de los conos es restrictiva, puesto que ocupan sólo la mitad externa de la capa nuclear externa, y 3) los bastones no tienen posición restrictiva sino que ocupan cualquier nivel en la capa nuclear externa.

TABLA IV. 4 Distribución de los somas de los fotorreceptores en la capa nuclear externa de la retina.

	POSICION DEL SOMA	Nº	%	
	Fotorreceptores	Externa	253	17,46
Media		1017	70,18	1,76 c 68,5 b
Interna		179	12,35	12,35 b
Número total de fotorreceptores: 1449				

Nº : número de somas encontrados en cada nivel (externo, medio e interno) de la capa nuclear externa.

% : porcentaje de somas respecto al total de fotorreceptores. La columna última a la derecha muestra los porcentajes de conos (c) y bastones (b) en cada nivel.

IV.2.2 Estudio del comportamiento de los neuroblastos de los fotorreceptores por el método de Golgi.

Este estudio se realizó en ratas de 18 ± 1 día de gestación ($E18 \pm 1$) y de 1 a 10 días postnatales (P1-P10). Se interrumpió en P10, debido a que en este día los fotorreceptores muestran formas similares a las adultas, aunque todavía no han alcanzado su tamaño definitivo (ver apartado IV.2.1). Además, a partir del día 10 postnatal (P10) el cambio morfológico más significativo que experimentan los fotorreceptores es el crecimiento de sus segmentos interno y externo, cuyo seguimiento no puede hacerse con el método de Golgi, pues al crecer éstos entre la retina pigmentaria de color negro por la tinción, no permite su observación. El número de animales estudiados en cada día del desarrollo se presenta en la Tabla IV.5. Para el seguimiento de la morfogénesis de los fotorreceptores, se dibujaron a cámara lúcida todas las distintas formas conectadas al ventrículo o superficie escleral de la retina, en cada día del desarrollo. El estudio ha sido realizado en retina central debido a que es bien conocido que hay un gradiente de diferenciación de retina central a periférica (Prada y col. 1991), de forma que a lo largo del desarrollo la retina central va más avanzada que la periférica.

TABLA IV.5 Número de retinas satisfactoriamente teñidas por el método de Golgi. E, embrionario; P, postnatal.

<u>DIAS DE DESARROLLO</u>	<u>Nº DE RETINAS</u>
E18±1	6
P1	4
P2	4
P4	2
P5	2
P6	2
P7	4
P8	6
P10	2

En E18±1 (Fig. IV.11), se observa que aproximadamente el tercio interno de la retina está formado por la capa de células ganglionares claramente diferenciadas y por una incipiente capa plexiforme interna observable tanto en retina central como en periférica (Fig. IV.11, g). En los dos tercios restantes hemos podido identificar, en base a los trabajos previos en retina de pollo de Prada y col. (1981) y Prada y col. (1987 y en retina de ratón de Hinds y Hinds 1979), células neuroepiteliales (en ciclo celular), conectadas al ventrículo (Fig. IV.11, serie izquierda); neuroblastos de células ganglionares y de células amacrinas en proceso de emigración (Fig. IV.11, na, ng); neuroblastos de fotorreceptores, también conectados a la limitante ventricular (Fig. IV. 11, células nr), y glioblastos precursores de células de Müller (Fig. IV.11, nM).

Como muestra la figura IV.11, las células identificadas como neuroblastos de fotorreceptores, tienen en su mayoría formas simples, monopolares o bipolares, algunas más parecidas a células en las fases G1 y G2 del ciclo celular que a fotorreceptores. Aunque a E18±1 entre las células de pequeña longitud y conectadas al ventrículo hay precursores de células horizontales y amacrinas (Reh, 1992), que recién han abandonado el ciclo y no han comenzado a emigrar, constituyen una pequeñísima proporción frente al número de bastones que han abandonado y están abandonado el ciclo en este estadio. Esto indica,

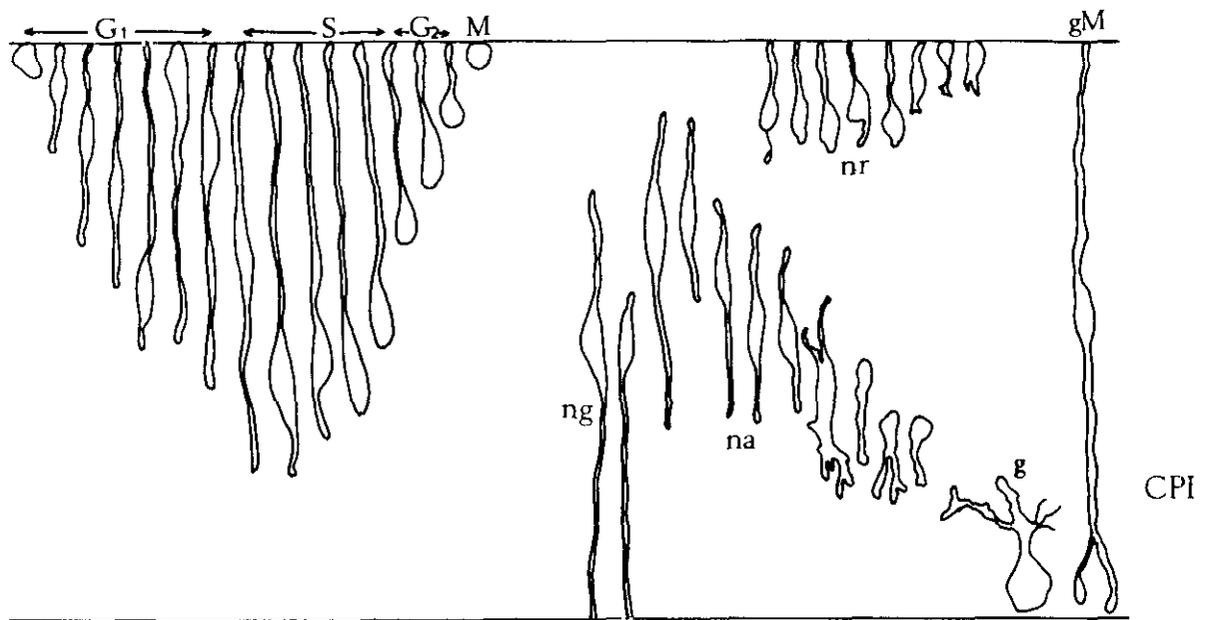


FIGURA IV.11 Dibujos a cámara lúcida de diferentes tipos de células observadas en preparaciones de Golgi, en la retina de rata de $E18 \pm 1$. La línea inferior horizontal representa la membrana limitante interna. La línea superior representa la superficie escleral de la retina o nivel de la membrana limitante externa; M, G1, S, G2, células ventriculares en las distintas fases del ciclo celular; g, célula ganglionar; gM, neuroblasto de célula de Müller; na, neuroblastos de células amacrinas; ng, neuroblastos de células ganglionares; nr, neuroblastos de fotorreceptores; CPI, prospectiva capa plexiforme interna. 237x

por lo tanto, que la mayoría de las células nr de la figura IV.11 son neuroblastos de bastones.

En ratas de 1 día postnatal (P1) se diferencian tres capas en la retina, la capa de células ganglionares que ocupa menos del tercio interno de la retina, la capa plexiforme interna todavía incipiente, y la capa de células neuroblásticas que ocupa los dos tercios más externos. En esta día las células ganglionares, amacrinas y Müller muestran mayor grado de diferenciación. Como en E18±1, aparecen numerosas células en ciclo conectadas al ventrículo, además de neuroblastos de precursores de células bipolares y horizontales.

La población de células que en E18±1 describimos como posibles neuroblastos precursores de fotorreceptores (Fig. IV.11, células nr), en P1 (Fig. IV.12, P1) ya presentan formas que se asemejan a las de los fotorreceptores, idénticas a las obtenidas por disociación celular en los primeros días de vida postnatal (véase Figs. IV.6, P3-P4 y IV.7). Los precursores de los fotorreceptores están mezclados con las células en ciclo y entre ellos se distinguen claramente los neuroblastos de conos (c) (raramente observables) y los de bastones (b), muy numerosos. Los precursores de conos, muestran mayor grado de diferenciación que los de los bastones, debido sin duda a que abandonan el ciclo celular antes que aquellos. Además

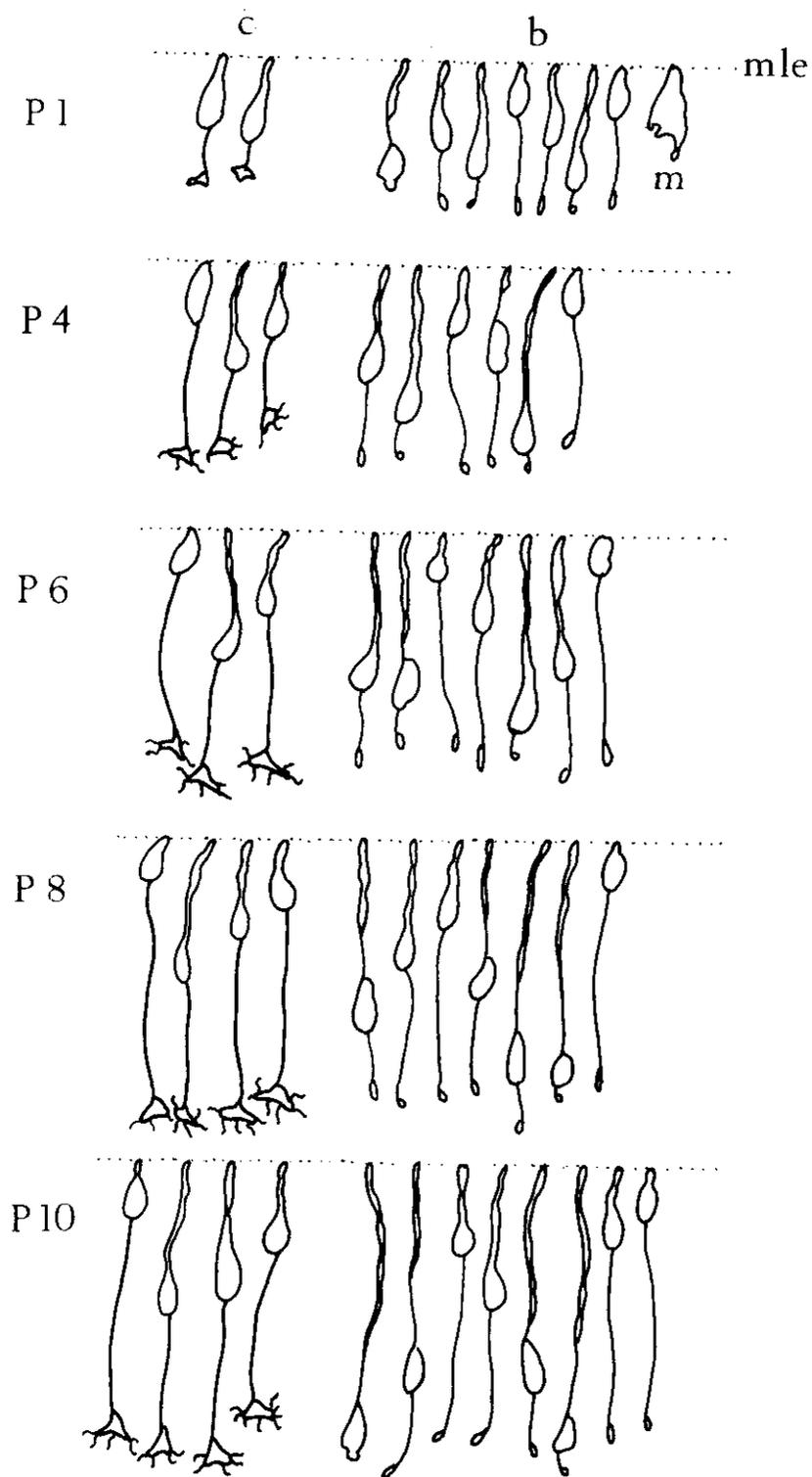


FIGURA IV.12 Dibujos a cámara lúcida de fotorreceptores de retina central de ratas entre P1 y P10 teñidas por el método de Golgi. Para su alineación se ha tomado como referencia la membrana limitante externa (m.l.e.). En cada grupo las primeras células de la izquierda, (c), representan a los neuroblastos de los conos y las de la derecha, (b), los neuroblastos de los bastones. Obsérvese que desde las primeras fases del desarrollo, los neuroblastos de fotorreceptores muestran formas similares a las adultas, y ocasionalmente formas multipodiales, (m). 380x

hemos corroborado que los núcleos de los conos ya aparecen situados en los niveles medio y externo respecto de la capa nuclear externa, como ya habíamos visto por nuestros resultados en disgregados. Esta posición relativa la mantendrán durante todo el desarrollo (Fig. IV.12, P1-P10, c y Fig. IV.13, A1,2). Su pedículo sináptico incipiente, es de forma irregular. Rara vez observamos formas como la marcada con m en la figura IV.12, P1, y que por su parecido a los numerosos neuroblastos multipodiales encontrados por (López 1991) en retinas de pollo son con toda probabilidad neuroblastos de conos.

Los neuroblastos precursores de bastones ya muestran sus somas dispuestos en los tres niveles descritos anteriormente (externo, medio e interno) en la capa nuclear externa (Fig. IV.12, P1, b). Los más avanzados ya presentan una esférula sináptica incipiente en el polo más interno de la célula.

Entre los días P4 y P10, los fotorreceptores se elongan progresivamente por crecimiento de sus prolongaciones, sin cambio llamativo alguno en las formas. Los somas adquieren su forma, tamaño y posición definitivos y los pedículos sinápticos de los conos y las esférulas de los bastones, adoptan progresivamente sus formas maduras (Fig. IV.12, P4-P10 y Fig. IV.13, A).

Queremos llamar la atención de que desde P3, estadio en el que ya se distingue la capa plexiforme externa,

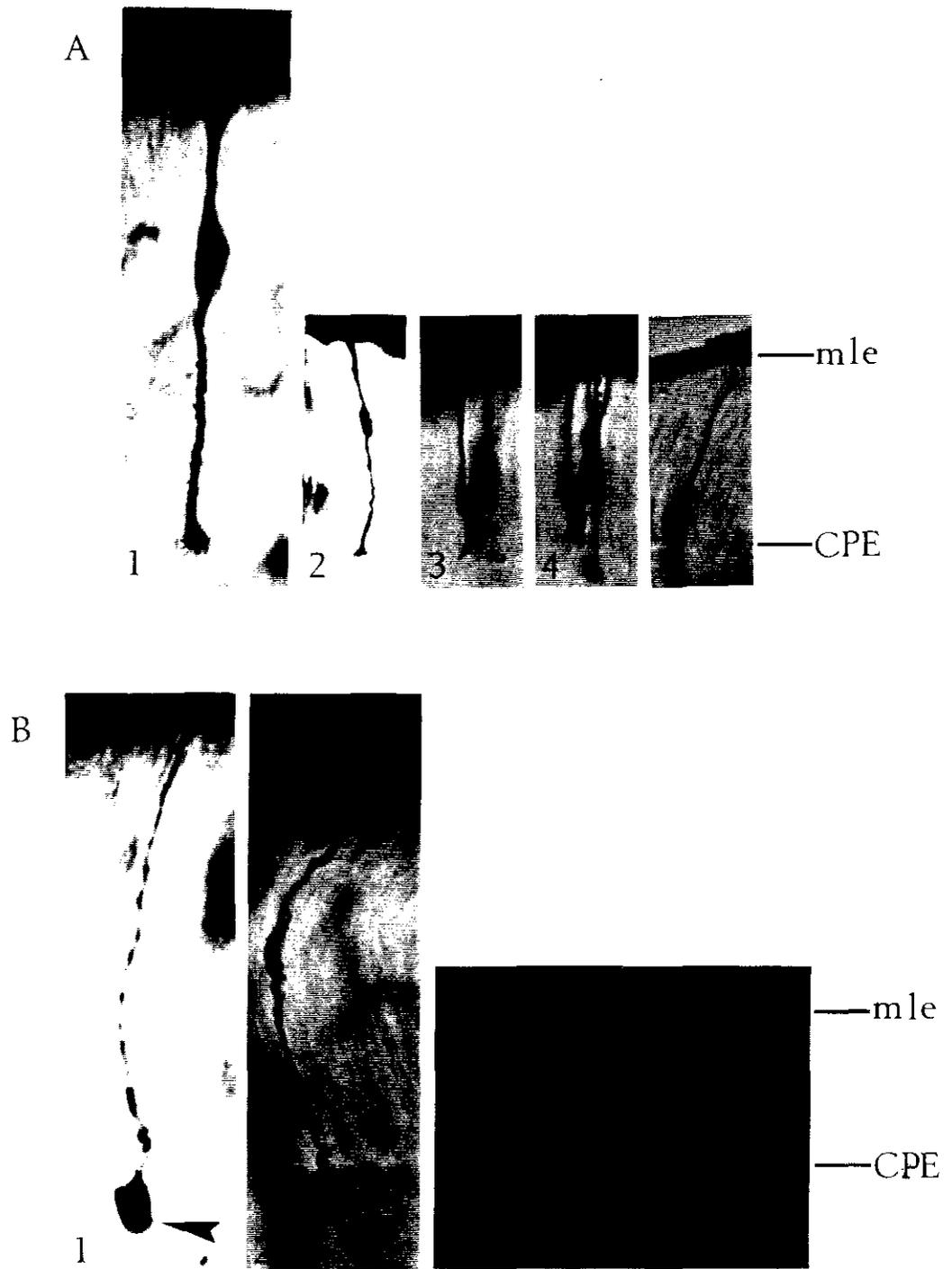


FIGURA IV.13 Microfotografías de células teñidas por el método de Golgi. A: fotorreceptores de retinas de 5 a 10 días postnatal; 1-2, conos a diferentes aumentos; 3-5 bastones con los somas en distintas posiciones. B: células en "botella", posibles neuroblastos de bastones ó células G2 (cabeza de flecha) de retinas PB; m.l.e., membrana limitante externa; CPE, capa plexiforme externa. A1, B1-B2 600x, A2-A5, B3 300x.

hasta P8, se observa un pequeño número de células que denominamos en "botella", cuyos somas redondeados se encuentran a distintos niveles de la retina y poseen una única prolongación ventricular (Fig. IV.13, B, cabezas de flecha), careciendo por tanto de prolongación interna o vítrea. Estas células son muy similares a las formas jóvenes de los bastones que presentan el núcleo en posición más interna (Fig. IV.13, A5), e idénticas a las formas G2 del ciclo celular (véase Fig. IV.11). Sin embargo, descartamos que sean precursores de fotorreceptores, dado que nuestros experimentos en los que hemos medido las cantidades de DNA evidencian que se trata de células en la fase G2 del ciclo celular. Se trata pues de células en los últimos ciclos de división que ocurren en la retina (véase discusión).

Por último, el método de Golgi nos ha permitido conocer cuándo aparecen claramente visibles las diferentes capas de la retina (dibujos no mostrados). En P1, la capa plexiforme interna está formada por las dendritas de las células amcricas y ganglionares, algunas bien diferenciadas. En P3 aparece la capa plexiforme externa de forma incipiente, en retina central, y las células horizontales comienzan a visualizarse en su capa definitiva. A partir de P4, la retina ya está estructurada en todas sus capas que aumentan, paulatinamente, su grosor a medida que avanza el desarrollo.

.op

Resumiendo: Los precursores de fotorreceptores presentan formas simples, muy similares a las adultas, desde los primeros días del desarrollo postnatal, y sus núcleos se localizan, desde muy pronto, en la posición relativa definitiva. Después comienzan a incrementar su longitud, elongando las prolongaciones externa e interna, al tiempo que el soma adopta su forma redondeada (en el caso de los bastones) u ovalada (en el caso de los conos), y desarrollan las terminaciones sinápticas definitivas. Por otro lado, las preparaciones de Golgi nos han permitido observar por primera vez formas G2 (células en botellas) del ciclo celular en la rata, y muestran que las formas adoptadas por las células en ciclo son muy similares, si no idénticas, a las encontradas por Prada y col. (1981) en retina de pollo.

IV.3 ESTUDIO DEL CONTENIDO EN DNA DE LOS FOTORRECEPTORES

Hemos determinado por primera vez el contenido en DNA de las células fotorreceptoras disgregadas de la retina de la rata, utilizando el método de Feulgen.

Para ello extendimos eritrocitos de pollo en una porción del portaobjetos y en la otra se extendió una mezcla de células disgregadas de la retina en la que el 86,30% son fotorreceptores (véase apartado IV.1). El tiempo de hidrólisis fué de 45 minutos a temperatura de 19 ± 1 °C, determinado previamente en nuestro laboratorio por López (1991) para eritrocitos y células de la retina de pollo, y el tiempo de incubación en el reactivo de Schiff fué de 2,5 horas.

Al iniciar las mediciones del contenido en DNA hicimos distinción entre conos y bastones, esperando que su contenido fuera diferente. Sin embargo, después de realizar numerosas lecturas comprobamos que el contenido era igual en ambos, por lo que decidimos agruparlos teniendo además en cuenta el pequeño porcentaje que los conos representan sobre el total de fotorreceptores.

Los resultados de medir el contenido de DNA en los fotorreceptores y células control se presentan en la figura IV.14 y ejemplos de fotorreceptores aislados a los que medimos su contenido en DNA se muestran en la figura IV.15. Analizando los histogramas se observa que

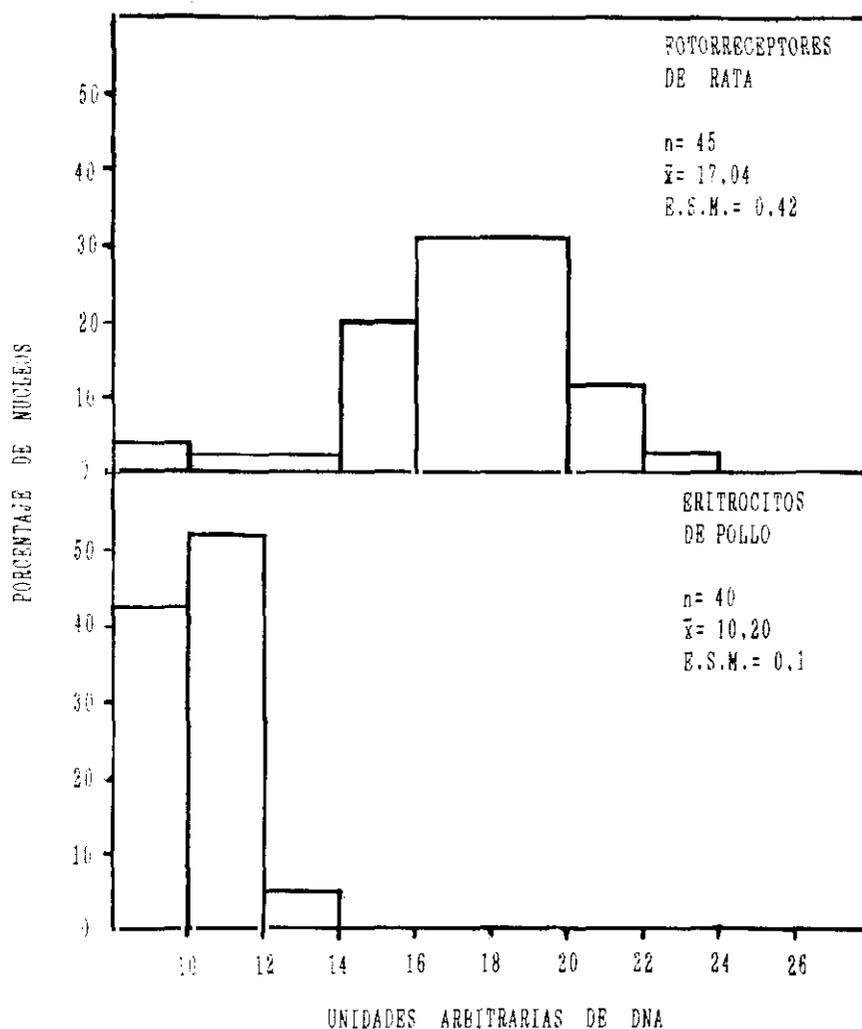


FIGURA IV.14 Contenido de DNA por núcleo de fotorreceptor y de eritrocitos de pollo (control). Los histogramas corresponden a sólo una de las preparaciones utilizadas, y son representativos de los resultados obtenidos. n, número de células leídas; \bar{x} , media del contenido de DNA/célula en unidades arbitrarias; E.S.M. error standard de la media.

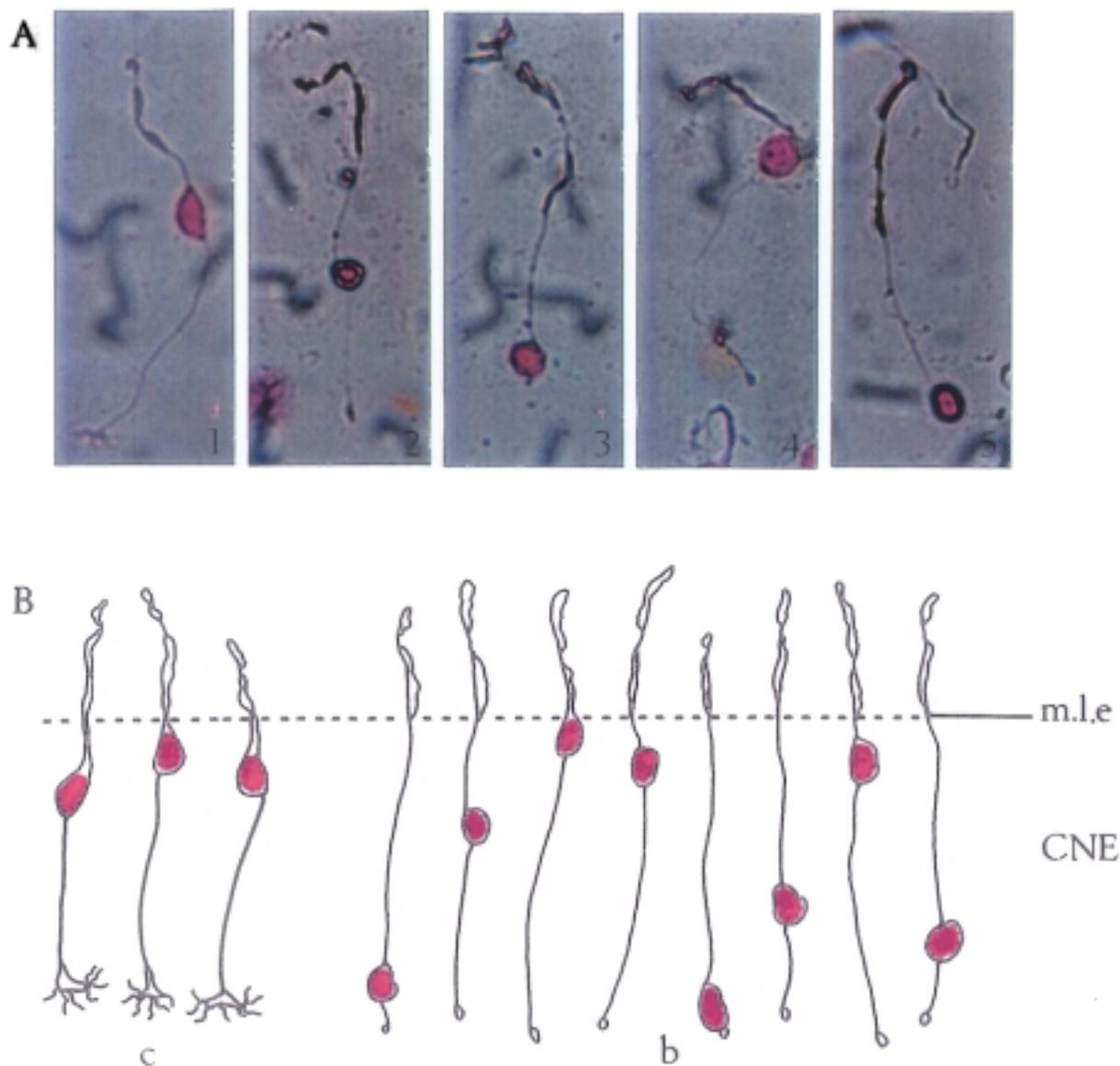


FIGURA IV.15 A: Microfotografías de fotorreceptores, disgregados de la retina de rata adulta, cuyos núcleos aparecen coloreados por el reactivo de Schiff. Obsérvese que el núcleo de los conos es ovalado, mientras el de los bastones es completamente esférico. 1, cono; 2-5, bastones. B: Reconstrucción de la capa de fotorreceptores a base de dibujos a cámara lúcida de células aisladas y procesadas por el método de Feulgen (como en A). m.l.e., membrana limitante externa; CNE, capa nuclear externa. Obsérvese que los núcleos de los conos (c) ocupan aproximadamente la mitad externa de la capa nuclear externa, en contraste con la variabilidad de la posición de los núcleos de los bastones (b). A 500x. B 585x.

los fotorreceptores tienen un contenido en DNA superior al de los eritrocitos de pollo. La media del contenido de DNA de los fotorreceptores en unidades arbitrarias es de 17,04, frente a 10,20 eritrocitos. Hallando la relación entre las lecturas medias de ambas poblaciones se obtiene que es 1,7:1, es decir casi dos veces mayor el contenido de DNA de los fotorreceptores que el de los eritrocitos. Dado que los eritrocitos son de pollo y los fotorreceptores son de rata y que es bien conocido que el contenido de DNA de las células 2C es muy diferente en estas especies, la relación obtenida entre unidades arbitrarias no indica "per se" que los fotorreceptores tengan 4C de DNA. La transformación de unidades arbitrarias en unidades absolutas la presentamos en la tabla IV.6. Los fotorreceptores tienen 4,26 picogramos (pg) de DNA, en base al contenido de 2,5 pg de los eritrocitos de pollo. Esta cantidad de 4,26 picogramos obtenida para fotorreceptores contrasta con los 8 pg de DNA que Bachman (1972) indica para los hepatocitos 2C de la rata. Sin embargo, nuestras lecturas medias de DNA son similares a las obtenidas por Lapham (1968) (también por el método de Feulgen) en hepatocitos de rata de tamaño pequeño (2C) en secciones de hígado, lo cual nos permite pensar que los fotorreceptores tienen un contenido 2C DNA y que, por lo tanto, abandonan el ciclo celular durante G1.

TABLA IV.6 Contenido de DNA de los fotorreceptores de la rata.

TIPO DE CELULAS	CONTENIDO DE DNA EN U.A.		Nº DE NUCLEOS LEIDOS	CONTENIDO DE DNA EN U. ABSOLUTAS
	X±	E.S.M.		
Fotorreceptores (rata)	17,04	0,42	45	4,26
Eritrocitos (pollo)	10,20	0,16	40	2,5

U.A., unidades arbitrarias; X, media del contenido de DNA; E.S.M., error standard de la media; las unidades absolutas de la media están en picogramos.

El método de Feulgen aplicado a células aisladas permite visualizar la forma y tamaño de los núcleos completos, así como la distribución de la cromatina. En la figura IV.15 A y B se puede ver cómo los núcleos de los conos son ovalados, mientras los de los bastones son esféricos. El tamaño del núcleo de los conos es ligeramente superior al de los bastones y la distribución de la cromatina es muy similar (datos obtenidos por citifotometria, no mostrados). Estas observaciones están en concordancia con el hecho de que ambos tipos de células tienen los mismos valores de DNA. La figura IV. 15, B da una idea muy precisa de la estructura real de la capa de fotorreceptores puesto que en ella se observa no sólo la forma de las células sino también la forma y tamaño de sus núcleos completos y la posición de los somas.

En resumen: hemos medido por primera vez el contenido de DNA de los fotorreceptores aislados, utilizando células de referencia y condiciones de experimentación similares a las utilizadas por otros autores para determinar cantidades de DNA en células del Sistema Nervioso Central de otros tejidos. Nuestros resultados muestran un contenido de DNA por fotorreceptor superior al contenido del eritrocito. El valor medio en Unidades Arbitrarias de contenido de DNA obtenido en fotorreceptores aislados, es similar al encontrado por otros autores en hepatocitos 2C de rata, en secciones; aunque el valor absoluto difiere del asumido por Bachman (1972) para los hepatocitos 2C.

V. D I S C U S I O N .

V.1 METODO DE DISOCIACION CELULAR

Son varios los métodos de aislamiento de células del sistema nervioso central descritos; la mayoría de ellos muy complejos, laboriosos y no del todo eficaces (ver Althaus y Newhoff, 1982, y Sachaffer y Schnaar 1983, para revisión). Sin embargo, en los últimos años se han obtenido mejores resultados mediante el empleo combinado de técnicas mecánicas y enzimáticas, habiéndose aislado células nerviosas libres de sus envueltas gliales, manteniendo relativamente intacta su morfología y propiedades electrofisiológicas.

En el caso de la retina, se ha conseguido aislar ciertos tipos de células en determinadas especies como es el caso de los fotorreceptores de la retina de conejo (Townes-Anderson y col. 1988), las células ganglionares de la retina de conejo (Dana Giulian 1980) y las células de Müller del conejo (Reichenbach y Birkenmeyer 1984, Reichenbach y Reichelt 1986). Los procedimientos utilizados no extraen conjuntamente los diferentes tipos de células

de la retina, sino un solo tipo y en cantidad muy pequeña. En cambio nuestros resultados muestran que el método de disgregación celular que hemos utilizado extrae íntegras y en cantidad las distintas células de la retina de la rata tanto en embriones como en animales adultos. Además es posible purificar cualquiera de las poblaciones celulares de la retina variando las condiciones de experimentación. Así, puesto que la retina está estructurada en capas y los fotorreceptores están constituyendo una capa externa y son células de morfología sencilla sin intrincadas conexiones entre ellos, un tiempo corto (20 minutos) de incubación con la proteasa proporciona prácticamente una suspensión pura de fotorreceptores. Por el contrario las células de Müller, que se extienden de una limitante a otra de la retina, que están unidas entre sí y con la células vecinas a ambos niveles, y cuyas prolongaciones se entremezclan con los restantes tipos celulares, se extraen a tiempos de incubación largos (más de 45 minutos).

En los experimentos en que valoramos la eficacia del método (Tabla IV.2) utilizamos tiempos de incubación con la proteasa entre 20 y 45 minutos, con objeto de obtener una suspensión celular compuesta por una mezcla de todas las clases de células de la retina. Los resultados muestran que en disociaciones óptimas el 86,30% de las células disociadas son fotorreceptores y de éstos el

97,31% son bastones y el 2,69% conos (Tabla IV.3). Aunque no hay estudio alguno que haya cuantificado por algún otro procedimiento los fotorreceptores de la rata, los trabajos realizados en ratón (especie muy próxima) indican resultados similares (Carter-Dawson y La Vail, 1979), indicando que nuestro método de disociación extrae ambos tipos de fotorreceptores con la misma eficacia. En favor de esta afirmación está el hecho de que con una modificación del mismo método, López (1991) disgregó todos los tipos de fotorreceptores de la retina de pollo (bastones y 9 tipos de conos) con la misma eficacia, pues el porcentaje de fotorreceptores de cada tipo resultó ser idéntico al obtenido por contaje de los mismos en retinas en plano, "in vivo". La tabla IV.2 también indica que el 68,68% de los fotorreceptores disociados están completos, como se muestra en las figuras IV.9, IV.10 y IV.15. Hasta donde sabemos, no tenemos constancia de un método de disociación que extraiga los fotorreceptores de la rata con semejante eficacia. El trabajo de Townes-Anderson y col. (1988) en retina de conejo no cuantifica la eficacia del método empleado para extraer los fotorreceptores adultos, por lo que los resultados no pueden ser comparados.

Un resultado sorprendente con el que nos encontramos es que a partir de P12 las células ganglionares no se extraen íntegras, en las mismas condiciones en que las demás células se disgregan intactas. Esto mismo ocurre

cuando disociamos retina de pollo (resultados todavía no publicados); las células ganglionares acompañan a las demás células en los disgregados hasta E18±1, a partir de cuyo estadio estas células no se observan. Una explicación fácil a este hecho es que la (ó las) molécula (s) que son digeridas por la proteasa disminuyan, a partir de un determinado estadio en la matriz extracelular de la capa de células ganglionares. Sin embargo, existen otras posibilidades, y como primer objetivo tendremos que demostrar si lo que sucede es que no son disgregadas, sino dañadas, o bien que son disgregadas sin sus prolongaciones, con lo cual no pueden ser identificadas. El uso de un marcador incuestionable de células ganglionares, Thy-1 (Johnson 1986), será utilizado para buscarlas en los disgregados, antes de considerar otras posibilidades.

Son muy pocos los trabajos que han utilizado la retina adulta de la rata. Quizás sea la única especie en la que Cajal (1892) no estudió la retina, aunque sí la estudió en el ratón como especie más próxima. Las células fotorreceptoras y las células de Müller no han sido estudiadas al microscopio óptico por método alguno que permitiese observar su forma completa, sin embargo las células bipolares han sido estudiadas con el método de Golgi por Leure Depree (1974), y las células ganglionares, amacrinas, amacrinas invertidas y las interplexiformes por Perry (1979, 1981) y Perry y Walker (1980). En nuestros

disgregados hemos observado células bipolares idénticas a las mostradas por Leeure Depree (1974) y células amacrinas idénticas a las de las preparaciones de Golgi de Perry (1980). Comparando nuestros resultados con los obtenidos por esos autores, se evidencia que el método de digregación utilizado en nuestros experimentos es también muy eficaz extrayendo los otros tipos de células de la retina que no son fotorreceptores, abriéndose así nuevas posibilidades para el estudio "in vivo" de estas células disgregadas.

Teniendo en cuenta que la principal causa de ceguera en los países industrializados está relacionada con la pérdida de las células fotorreceptores de la retina (Sarks y Sarks 1989), y que la destrucción de los fotorreceptores no conduce necesariamente a la pérdida del resto de la retina o su conexión al cerebro (Silverman y col. 1992), actualmente se trabaja sobre la posibilidad de conseguir cierto grado de visión en el caso de que los fotorreceptores fuesen reemplazados y se reestructurase la retina apropiadamente. En base a lo anterior se han realizado diversos trabajos consistentes en el transplante de fotorreceptores, bien de forma aislada (Del Cerro y col. 1988) o en fragmentos de la capa nuclear externa (Silverman y col. 1992). Los resultados de los trabajos de Del Cerro y col. (1988) indican que el transplante de células disociadas tiene una serie de ventajas sobre los trasplantes de

fragmentos sólidos de tejido de la retina. Algunas de las ventajas son: 1) el contacto más íntimo y mejor integración de las células transplantadas en el tejido huésped, 2) la posibilidad de realizar el contaje de las células transplantadas, y 3) el poder determinar la distribución y supervivencia de las células transplantadas marcándolas por fluorescencia. A pesar de estas ventajas, los mismos autores reconocen que su procedimiento de transplante de fotorreceptores aislados constituye sólo un "intento" de solución del problema.

El método de disgregación usado por Del Cerro y col. (1988) no extrae los fotorreceptores íntegros, lo cual podría ser una de las causas, sino la principal, por las que la reinserción de estas células no concluye con la perfecta reestructuración de la capa fotorreceptores. Por otra parte, los experimentos en pollo del grupo de Adler (1986, 1987) demuestran que "in vitro" se puede conseguir con relativo éxito la diferenciación de los fotorreceptores a partir de los precursores embrionarios, e indican que los fotorreceptores tienen un programa genético de diferenciación que resulta difícilmente alterable por el medio. Los precursores de los fotorreceptores usados por Adler y col. (1986, 1987) fueron células redondas, resultantes de la disgregación con tripsina, la cual rompe las prolongaciones de las células. En base a que nuestro método de disgregación extrae íntegros no sólo los

fotorreceptores adultos sino tambien los embrionarios y no sólo los de la retina de rata, sino también los de retina de pollo (López 1991), pensamos que los resultados obtenidos en este trabajo de tesis doctoral abren nuevas perspectivas para intentar mejorar los transplantes de células de la retina. Además, la posibilidad de extraer íntegros los neuroblastos de los fotorreceptores constituye en nuestra opinión un paso previo para mejorar los cultivos de estas células y realizar nuevos estudios sobre el mecanismo de diferenciación celular.

V.2 COMPORTAMIENTO DE LOS NEUROBLASTOS DE LOS FOTORRECEPTORES.

Uno de los objetivos de nuestro trabajo era estudiar cómo se comportan las células fotorreceptoras de la retina de rata desde que dejan el ciclo celular hasta que son adultas. Es decir, nos propusimos estudiar cómo se transforman las células postmitóticas en adultas. Puesto que las células en mitosis e inmediatamente postmitóticas son redondeadas y las células en G1 son sucesivamente monopolares y bipolares (Hinds y Ruffet, 1971; Hinds y Hinds, 1974; Prada y col. 1981), pensamos que si los fotorreceptores dejasen el ciclo en G1 tendríamos que observar la transformación de estas formas en fotorreceptores. En el caso de que los fotorreceptores dejasen el ciclo al final de G2 (la otra posibilidad) tendríamos que observar la transformación de formas G2 en fotorreceptores. Prada y col. 1981, 1983, descubrieron en

retina de pollo en los primeros estadios de diferenciación (2,5-8,5) células monopolares conectadas al ventrículo, con una única prolongación (la ventricular) y el soma en cualquier posición en el grosor de la retina, a las que llamaron células "en botella" y dedujeron que son las formas que adoptan las células en ciclo durante la fase G2. Ninguno de los trabajos anteriormente realizados en los estadios iniciales de diferenciación de la retina de ratón (Hinds y Hinds, 1974), o de la corteza cerebral del mismo animal (Hinds y Ruffet 1971), con microscopía electrónica, dieron cuenta de estas células, por lo que nos propusimos buscarlas en preparaciones de Golgi de retina de rata, como paso previo al estudio del comportamiento de los neuroblastos de los fotorreceptores.

La retina embrionaria no fué posible teñirla por el método de Golgi-Stensaas y el Golgi-Colonnier realizado según protocolo original tampoco resultó útil; hubo de ser modificado (véase material y métodos). Nuestras preparaciones de Golgi de E18 a P8 muestran células en botella con los somas a distintos niveles en el grosor de la retina desde la zona ventricular hasta la capa de células pigmentarias. En E18±1 (Fig. IV.11, G2) los somas de las formas en botella que observamos más próximos a la limitante vítrea se encuentran por encima de la capa de células ganglionares. No se observó ninguna célula en botella con el soma metido entre las células ganglionares,

ni contactando la limitante vítrea. Estos resultados son similares a los obtenidos en pollo por Prada y col. (1981) en retinas de 6 a 8 días de incubación, en las cuales también la capa de células ganglionares está separada de la zona matriz (o mesotelio) por una incipiente capa plexiforme interna. Las formas en botella observadas desde P0 a P8 tienen sus somas más alejados todavía de la capa de células ganglionares (Fig. IV.13, B), lo cual está en consonancia con los resultados de ciclo celular obtenidos por Denham (1967). Este investigador introdujo un pulso de timidina tritiada en ratas de 2, 3 y 4 días postnatales, y sacrificó cada 2 horas hasta las 60 horas, para determinar la duración del ciclo celular. Además de determinar la duración de cada una de las fases del ciclo, encontró que a P2 la zona S queda delimitada por una banda de marcaje, externa a la incipiente capa nuclear interna, la cual se acerca a la nuclear externa durante P3 y P4. Por lo tanto, las células sintetizan DNA cada vez más próximas a la limitante ventricular (donde realizan la mitosis) y es ésta la razón por lo que las células G2 van alejando los somas de la limitante vítrea a medida que avanza el desarrollo.

Los resultados de Denham (1967) indican que en P2-P5 el ciclo celular dura en la retina 28h. M= 0,8h, G1= 13' G2= 1,5 y S=12,5h. En estadio prenatales se piensa que el ciclo dura menos y G1 y S también, en base a los

resultados de Fujita (1962) en retina de pollo. Sin embargo, la larga duración del ciclo en los primeros días postnatales implica que las células pasan mayor tiempo en sus fases, especialmente en G1 y S, lo cual pensamos que ha aumentado la probabilidad de tinción de estas formas por el método de Golgi. Esta podría ser la explicación para el elevado número de células G2, como ejemplo, que pueden observarse en la fig. IV. 13, B. Teniendo en cuenta nuestros resultados sobre ciclo celular, que muestran las formas que adoptan las células en cada una de las fases del ciclo, y la duración de cada una de las fases, determinada por Denham (1967), esquematizamos el ciclo celular en la retina de rata en la figura V.1. Este muestra que en la fase M, las células se dividen en las proximidades del ventrículo y tienen formas esféricas. Durante la fase G1, las células pasan de formas esféricas a bipolares, formando un cono de crecimiento y una prolongación vítrea por la que progresivamente va desplazando el núcleo a la zona de síntesis, situada próxima a la limitante vítrea en los estadios más jóvenes. Durante S las células adoptan formas monopolares "en botella", que mantienen durante G2.

Nuestras preparaciones de Golgi, de retinas P0-P4, así como las disgregaciones de estos estadios, muestran que los conos tienen formas más maduras que los bastones. Esto está en concordancia con los resultados de autorra-

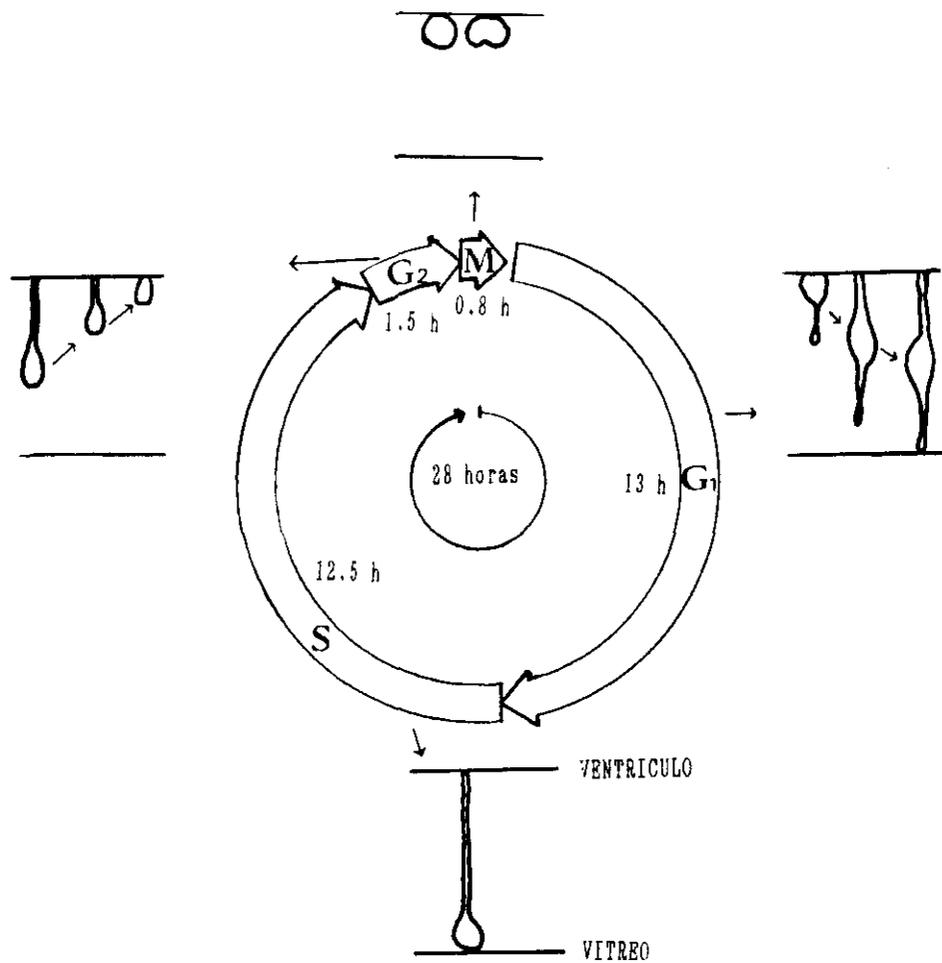


FIGURA V.1 Ciclo celular en la retina de rata en estadio P2. Obsérvense las distintas fases del ciclo y las formas que las células adoptan en cada fase. **M**, fase de mitosis; **G₁**, fase G₁; **S**, fase de síntesis; **G₂** fase G₂. **T**, tiempo total del ciclo celular.

diografía de Reh (1992) en rata, los cuales indican que la neurogénesis de los conos es prenatal (E10-E18), mientras que la mayoría de los bastones se generan en los primeros días de vida, siendo su periodo de neurogénesis de E16 a P8. Los resultados obtenidos sobre la morfogénesis inicial de los conos son muy pobres porque, debido a que su neurogénesis es prenatal, a su pequeño número (menos del 3%) y a que la tinción de Golgi sólo tiñe un 10% de las células, en nuestras pocas preparaciones de material embrionario no ha sido posible obtener la secuencia de transformación inicial de las formas postmitóticas. Sin embargo, los conos de la rata podrían seguir el mismo proceso de transformación que los del pollo (López 1991), los cuales abandonan el ciclo celular al comienzo de G1, adoptan una fase multipodial en la que emiten varias prolongaciones citoplásmicas cortas alrededor del soma, que posteriormente van perdiendo a medida que emiten la prolongación interna definitiva. Nosotros hemos encontrado algunas formas multipodiales en los días E18 y P1 (véase Figs. IV.11, formas nr última a la derecha y IV. 12, P1.m). Cajal también muestra una única célula multipodial en su dibujo de la retina embrionaria de ratón (lámina VII del trabajo de 1972), de la que no hace comentario alguno, y que podría corresponder a un neuroblasto de cono. Teniendo en cuenta que estos neuroblastos multipodiales los hemos observado a E18 y P1, que la neurogénesis de los conos

concluye a E18 (Reh 1992) y que la proporción de ellos en la retina de la rata es muy pequeña (menos del 3%), lo cual explica el pequeño número observado, pensamos que las formas multipodiales son precursores de conos. Estas formas también son adoptadas por determinadas células amacrinas durante el proceso de emigración (Hinds y Hinds 1983 y Prada y col. 1983) y podría argumentarse que en realidad las formas multipodiales que hemos observado en la rata son células amacrinas. Sin embargo, a P1 las células amacrinas las hemos observado con las formas y posición definitivas, y por lo tanto difícilmente se puede pensar que en este estadio las formas multipodiales corresponden a estas células.

Las formas más jóvenes de bastones, hemos visto que son muy parecidas, a veces indistinguibles, de las formas G1 y G2 del ciclo celular (Fig. IV.11, IV.12) en preparaciones de Golgi. Sin embargo, en los disgregados de P3-P4 éstas formas de fotorreceptores llevan un cilio en el extremo de su prolongación ventricular orientado hacia la pigmentaria que los diferencia como tales. Estas formas son muy parecidas a las observadas por Morest (1970) en preparaciones de Golgi de ratas de P1 y a las obtenidas por Hinds y Hinds (1979) reconstruyendo secciones ultrafinas de retinas de ratón entre E15 y E17. De estos resultados se evidencia que al menos parte de los fotorreceptores dejan el ciclo celular durante G1, puesto

que hay formas de neuroblastos de fotorreceptores que lo único que las diferencia de G1 es el cilio. Sin embargo, las formas de neuroblastos de fotorreceptores similares a G2, podrían indicar que tienen estas formas precisamente por abandonar el ciclo en G2. Aunque esto no ha sido considerado anteriormente por autor alguno, Cajal (1892) sí señaló formas G2 en la retina del ratón como precursores de bastones. Las determinaciones del contenido de DNA que hemos realizado en bastones indican que su contenido es 2C y por lo tanto dejan el ciclo en G1, quedando excluida la otra posibilidad.

Pensamos que los neuroblastos de fotorreceptores que tienen formas G2 podrían dejar el ciclo inmediatamente después de la mitosis y adoptar estas formas por crecimiento de la prolongación interna, hasta convertirse en bastones adultos. La coexistencia de estas formas con las similares a formas G1 hasta los primeros estadios postnatales, nos hace pensar que los neuroblastos de fotorreceptores con formas G2 son los precursores de los bastones que tienen el soma en posición más interna (b3 en nuestras ilustraciones). Esta hipótesis estaría apoyada por el hecho de que estos bastones están diferenciados desde P0 y hasta P17 están elongándose a base de elongar la prolongación externa única que poseen, indicando su única capacidad de crecimiento en este segmento que une el núcleo a la limitante ventricular. Esta capacidad podría

ser adquirida por el hecho de abandonar el ciclo inmediatamente después de mitosis, de manera análoga a las distintas formas de emigración que adoptan los neuroblastos de células amacrinas por el hecho de abandonar el ciclo celular en distintos momentos de G1 (Prada y col. 1983).

VI.3 CLASIFICACION DE LAS FORMAS Y CUANTIFICACION DE LAS MISMAS.

Los trabajos previos que han estudiado los fotorreceptores en la retina de rata adulta han sido realizados con microscopia electrónica e inmunohistoquímica, como ya dijimos en apartados anteriores. Las secciones ultrafinas utilizadas para la observación al microscopio no permiten obtener una idea exacta de la forma de las células, a no ser que las secciones se obtengan seriadamente y con ellas se reconstruyan las mismas; esto no ha sido realizado en el caso de los fotorreceptores de la rata. En las secciones utilizadas para inmunohistoquímica se distinguen las capas celulares pero tampoco se pueden observar las formas completas de las células, sino los perfiles de sus secciones. Por tanto, nuestro estudio es el primero en mostrar la morfología completa de conos y bastones, en

preparaciones de Golgi y en disgregados en fresco. De nuestros resultados se deduce que los fotorreceptores de la rata tienen un aspecto muy similar a los del ratón (Cohen A. 1972, Carter-Dawson y LaVail 1979), y el hombre (Missotén 1965, Hogan y col. 1971).

Nuestros resultados muestran que los conos tienen sus somas en la mitad externa de la capa nuclear externa, que el 42,02% de ellos están tangentes a la membrana limitante externa y que el resto (59%) ocupan posiciones intermedias, sin sobrepasar en ningún caso la mitad interna, de la capa nuclear externa. En cambio los bastones están distribuidos más ó menos homogéneamente en la capa . Estos resultados son muy parecidos a los encontrados en ratón por Carter-Dawson y LaVail (1979). Otros vertebrados que podrían tener una distribución similar de los fotorreceptores son los peces (Raymond y Rivlin 1987), el ratón (Carter-Dawson y LaVail 1979), la rana (Nilsson 1964a), las tortugas (Pérez Arroyo 1978), las ovejas (Braekevelt 1983a) y los monos (Borwerin y col. 1980), puesto que en sus retinas también los bastones tienen los somas a distintos niveles, mientras los conos los tienen en posición más externa. Sin embargo, la distribución y porcentaje de cada tipo de fotorreceptor en el pollo es diferente. En esta especie son los conos los que presentan gran variabilidad en la posición de los somas, mientras que los bastones están restringidos a la posición más interna únicamente (Cajal

1892, Morris y Shorey 1967, Gallego y col. 1975a, Gallego 1976b, López 1991). El significado biológico de estas diferencias entre especies no se conoce por el momento.

En los últimos años se han obtenido numerosas evidencias experimentales sobre las diferencias moleculares entre los bastones, en las especies bastón-dominantes (Bunt y Klock 1980, Falt 1981, Hollyfield y col. 1982 y 1984, Araki y col. 1984, Szel y col. 1985, Ishikawa y col. 1989). Por otro lado, la diversidad morfológica de las células ganglionares y amacrinas ha sido correlacionada de forma incuestionable con diversidad funcional (Daw y col. 1990). Por tanto, la diversidad en la posición del núcleo de los fotorreceptores, que determina las diferencias estructurales entre ellos, podría entrañar diversidad funcional muy superior a la que hoy conocemos, punto de vista éste muy coherente con la diversidad molecular que ya se ha demostrado. Esta hipotética diversidad funcional entre los bastones, estaría en consonancia con la enorme diversidad morfofuncional que presentan las otras poblaciones celulares de la retina, ya mencionadas. El conocimiento en el futuro de las diferencias moleculares entre cada una de las formas de los fotorreceptores descritos en nuestro trabajo supondrá, sin duda alguna, un avance considerable en el conocimiento de la fisiología de la visión.

V.4 CONTENIDO EN DNA DE LOS FOTORRECEPTORES

El método de Feulgen ha sido ampliamente utilizado en una gran variedad de organismos para el estudio del contenido de DNA de las células. En el sistema nervioso central de los vertebrados, los resultados obtenidos en secciones han sido a veces controvertidos. Herman y Lapham (1969) fueron los primeros en encontrar que ciertas neuronas del cortex cerebral poseen un contenido de DNA próximo a 4C. Las células piramidales del hipocampo también parecen ser tetraploides (Herman y Lapham 1968, Nováková y col. 1970). En cambio las células de la médula espinal son diploides para Nováková y col. (1970) y Fujita (1974), hiperploides para Böhm y col. (1981), y una mezcla de diploides y tetraploides para Herman y Lapham (1968). Una situación similar se da respecto a las células de Purkinje del cerebelo. Algunos investigadores han encontrado que son todas diploides (Morselt y col. 1972; Cohen y col. 1973; Fujita y col. 1974; Mann y col. 1978;

Kaplan 1981; Mares y col. 1985), otros han encontrado porcentajes variables de células hiperploides dentro de una población básicamente diploide (Bernocchi y Scherini 1981; Böhm y col. 1981; Swartz y Bhatnagar 1981; Scherini 1982), mientras un tercer grupo afirma que todas ellas son tetraploides (Lapham 1968, Lentz y Lapham 1969, Nováková y col. 1970, Kuenzle y col. 1978, Bregnard y col. 1979). Esta controversia en los resultados parece deberse a la dificultad de medir el contenido de DNA de los núcleos en secciones (ver las discusiones de los trabajos mencionados, en especial Hobi y col. 1984). La discusión mayor se centra en la variación de los valores de DNA como consecuencia de una mayor o menor cantidad de citoplasma por encima y por debajo del núcleo.

Denham (1967) realizó mediciones del contenido de DNA de los fotorreceptores de la rata por el método de Feulgen en secciones de 2 μ y en preparaciones de núcleos de la retina, indicando un contenido 2C. Sin embargo, sus resultados pueden ser cuestionados de la misma manera que los de los demás investigadores, que han obtenido los resultados en secciones y además porque no indica el haber utilizado células de referencia, ni las condiciones de hidrólisis, ni temperatura, ni muestra los valores de DNA (ni en unidades arbitrarias, ni en absolutas) obtenidos en secciones y en núcleos aislados. Tampoco demuestra que los núcleos aislados correspondan a fotorreceptores.

Nuestro trabajo ha tenido como objetivo determinar el contenido de DNA de los fotorreceptores de la rata mediante un procedimiento original, en el que la aplicación del método de Feulgen a células disgregadas pensamos ha obviado los problemas que presenta la valoración del contenido de DNA por citofotometría en secciones, como veremos más adelante.

El método de Feulgen exige gran meticulosidad en su realización (Decosse y Aiello, 1980; Fox 1969; Duijndam y Duijin 1973; Kjellstrand 1977; Navarrete y col. 1983; Rasch 1985) pues son varios los factores (preparación del material, fijación, tiempo de hidrólisis, temperatura, etc) que pueden alterar los resultados. Por otra parte, numerosos trabajos (Decosse y Aiello 1966; Fox 1969; Kjellstrand 1977 y 1980; Mares y Van der Floeg 1980; Navarrete y col. 1983; Rasch 1985) indican la conveniencia de que la hidrólisis se realice a baja temperatura (ambiental) y concentración elevada de CLH (5N), ya que de este modo se consigue una meseta de tiempo óptimo de hidrólisis, lo suficientemente amplio como para que pequeñas variaciones del tiempo de hidrólisis no modifiquen la lectura de DNA. Cuando la hidrólisis se realiza a alta temperatura y baja concentración de CLH, el tiempo óptimo resulta ser muy corto, y pequeñas modificaciones en el tiempo de hidrólisis introducen grandes variaciones en la lectura del DNA. Además a alta

temperatura se produce hidrólisis rápida y pérdida importante de DNA (Kjellstrand 1980).

Por tratarse nuestro estudio de la determinación de cantidades de DNA en células de retina, tomamos como óptimas las condiciones establecidas previamente en nuestro laboratorio, por López (1991) para retina de pollo (45 minutos de hidrólisis con ClH 5N, a $19\pm 1^\circ$ C y 2,5 horas de reactivo de Schiff). Estas condiciones resultaron muy similares a las utilizadas en la mayoría de los estudios realizados en secciones ó células de otros tejidos diferentes a la retina (Lapham 1968; Lentz y Lapham 1969; Mayall 1969; Bachman 1972; Mares y Van der Ploeg 1980; Navarrete y col. 1983; entre otros). Los factores anteriormente considerados como importantes se controlaron cuidadosamente en cada uno de nuestros experimentos.

La rehidratación después de la fijación, así como los lavados con agua destilada después de la hidrólisis clorhídrica y los lavados en agua sulfurosa, se realizaron de forma rigurosa, pues son extremadamente importantes para el mantenimiento de la morfología celular y para que sólo el reactivo de Schiff que se une al DNA estequiométricamente quede en el núcleo (Navarrete y col. 1983, entre otros). Ciertos autores recomiendan sustituir el lavado final con agua destilada por tampón fosfato-citrato a pH 5,6 antes de la deshidratación y montaje,

pues así se conseguirían valores más altos de absorbancia y mayor estabilidad de los preparados (Duijndam y Duijin 1973; Mares y Van der Ploeg 1980). Sin embargo, nuestras preparaciones no fueron sometidas a deshidratación e inclusión en medio de montaje, al comprobarse que los perfiles celulares se perdían. Nuestras muestras después de ser lavadas consecutivamente con agua sulfurosa y destilada, se secaron con aire seco y se almacenaron en oscuridad hasta la lectura de DNA. Este procedimiento ha sido ampliamente utilizado por otros autores (véase Navarrete y col. 1983).

En el proceso de disociación utilizamos una proteasa de la que se podría pensar que distorsiona de alguna manera la estructura del DNA, de tal forma que podría alterar las lecturas. Esta posibilidad queda descartada por los resultados obtenidos en un trabajo previo realizado en nuestro laboratorio por López (1991). En un mismo portaobjetos se extendieron eritrocitos de pollo control (recién extraídos, sin tratamiento alguno), eritrocitos incubados durante 30 minutos a 34° C en sacarosa a concentración isotónica, y eritrocitos incubados 30 minutos a 34° C en sacarosa a concentración isotónica más proteasa a la concentración utilizada para extraer las células nerviosas. Este experimento se realizó igualmente para 45 y 60 minutos de incubación. El resultado es que el valores de DNA son similares en todas las condiciones (fi-

gura V.2) y la forma de los eritrocitos tampoco altera en ninguna de las condiciones, siendo indistinguibles de los control.

Existen ciertos factores que cuestionarían la determinación por citofotometría del contenido de DNA por célula en secciones (Lentz y Lapham 1969; Goldstein 1970; Mares y Van der Ploeg 1980; Kaplan 1981). Entre ellos está 1) la dispersión de la luz por la reflexión, difracción y refracción al incidir sobre orgánulos citoplásmicos y fragmentos de células por encima y por debajo del núcleo considerado, 2) el grosor del tejido y el tipo de citofotómetro utilizado en la medición. En nuestro trabajo hemos utilizado células completamente aisladas, con despreciable cantidad de citoplasma alrededor del soma, perfectamente identificables, en las que se puede ceñir la máscara al máximo alrededor del núcleo, no quedando por su forma esférica prácticamente citoplasma por encima y por debajo que pueda alterar las lecturas. Se utilizó siempre la misma máscara de lectura. Se hicieron lecturas de absorbancia sobre el citoplasma celular y el background del porta, comprobando que no se modificaba la lectura, y siempre se utilizó el mismo aparato, un Vickers M85. Este modelo de citofotómetro integra por una parte la densidad óptica y por otra el área del campo con densidad óptica superior a una seleccionada, con lo que es posible medir diferentes niveles de absorción dentro de una misma

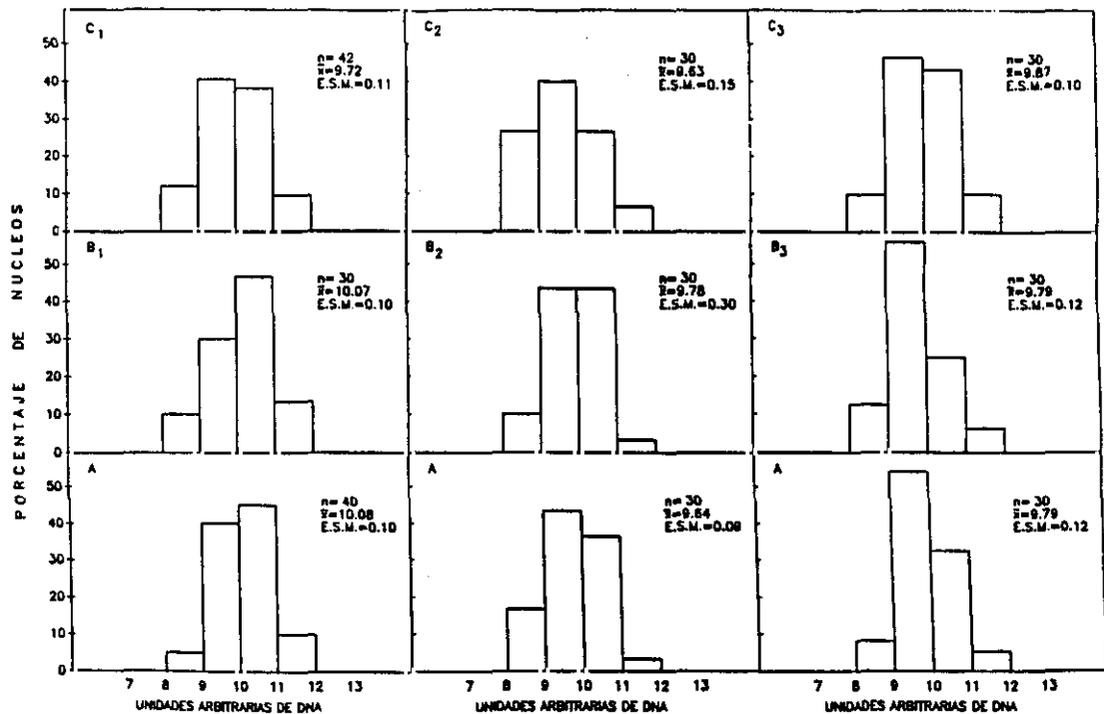


FIGURA V.2. Contenido de DNA por núcleo de eritrocito. Hidrólisis durante 30 minutos a 23 ± 1 °C y 2,5 horas en el reactivo de Schiff. Los histogramas de cada columna corresponden al mismo porta. A, eritrocitos control; B1, eritrocitos incubados 30 minutos en solución de sacarosa 19,8%; C1, eritrocitos incubados 30 minutos en una solución de sacarosa 19,8% más proteasa (0,138 mg/ml); B2, eritrocitos incubados 45 minutos en solución de sacarosa 19,8%; C2, eritrocitos incubados 45 minutos en solución de sacarosa 19,8% más proteasa; B3, eritrocitos incubados 60 minutos en solución de sacarosa 19,8%; C3, eritrocitos incubados 60 minutos en solución de sacarosa 19,8%; n, número de células leídas; \bar{x} , media del contenido de DNA de cada población; E.S.M., error standard de la media. (Tomado de López 1991).

célula, correspondientes a áreas con distinto grado de condensación de la cromatina. La fiabilidad y precisión del método pone en evidencia por el hecho de que ha sido utilizado para seleccionar las bandas de los cromosomas de *Drosophila* y medir su contenido de DNA, e incluso cuantificar el grado de condensación de la cromatina (véase Rasch, 1971 y Navarrete y col., 1983)

El valor de cantidad de DNA por fotorreceptor obtenido en el presente trabajo (4,26 pg) es diferente a los 8 pg asumidos por Bachmann (1972) para hepatocitos diploides (2C) de rata. Sin embargo, nuestras lecturas medias en unidades arbitrarias son similares a las obtenidas por Lapham (1968) y Lentz y Lapham (1969) en hepatocitos de tamaño pequeño, células en cesto y células grano de cerebelo, consideradas por estos autores como células control, es decir con 2C de DNA. Puesto que no encontramos causa alguna en la metodología empleada que pudiese inducir a desconfianza hacia nuestros resultados, pensamos que los fotorreceptores de la rata tienen cantidades 2C de DNA y que por lo tanto abandonan el ciclo celular en G1 como Denham (1967) indicó. Por otra parte, esta interpretación de nuestros resultados es coherente con los resultados obtenidos por López (1991) en fotorreceptores de pollo, los cuáles tienen cantidades 2C de DNA. Sin embargo, es necesaria experimentación complementaria a la realizada en este trabajo de tesis doctoral para resol-

ver la discrepancia anteriormente mencionada. La utilización de hepatocitos de rata como células 2C de rata como control será imprescindible en nuestra próxima experimentación.

La observación por contraste de fase de las preparaciones obtenidas por el método de Feulgen (Fig.15, A y B), nos ha permitido estudiar por primera vez la forma de los núcleos, y su posición dentro de unas células que como hemos visto no son simétricas. Hemos encontrado que los conos tienen núcleos ovalados y su posición es restrictiva, es decir están distribuidos sólo por parte de la capa nuclear externa; ocupan la mitad externa de la capa. Los bastones en cambio, tienen forma esférica y se distribuyen a todos los niveles de la capa. Aunque no se conoce el significado biológico de esta diferencia entre conos y bastones, sí es bien conocido que la posición del núcleo está controlada genéticamente (Alberts y col. 1983). La evidencia más simple de que esto es así es que cuando una célula que tiene su núcleo en posición excéntrica muere (sus genes dejan de controlar la actividad celular), el núcleo se coloca en el centro geométrico de la célula. Por lo tanto, es razonable pensar que las diferencias en la posición del núcleo de conos y bastones al menos significan diferencias genéticas en el control de la posición del mismo, y que los bastones no son una población homogénea de células, dada la varia-

ción en la posición de su núcleo.

Hay otros hechos que apoyan nuestra interpretación del significado funcional de la posición del núcleo. Como hemos visto en el apartado de resultados, comportamiento de los neuroblastos de los fotorreceptores, estas células inmediatamente después de abandonar el ciclo se alargan y disponen el núcleo en posición definitiva. De este modo, ya en los primeros estadios de diferenciación de los fotorreceptores (E18-P4), los bastones se observan con los núcleos en cualquier posición en la capa nuclear externa, mientras que los conos se observan en la mitad externa de la capa (Figs. IV.6 y IV.7, A). Esto indica que la posición del núcleo está determinada genéticamente desde el comienzo de la diferenciación. Las consecuencias de la determinación temprana de la posición del núcleo son que los fotorreceptores que fijan el núcleo en posición más externa crecen y diferencian una prolongación interna más larga que los que tienen el soma en posiciones más internas, y carecen de prolongación interna, como vimos en resultados. Los fotorreceptores que fijan el núcleo en posiciones medias, crecen y diferencian una prolongación externa y otra interna, de longitudes variables dependiendo de la posición del núcleo. Los fotorreceptores (sólo bastones) que fijan el núcleo en posición más interna, crecen y diferencian sólo la prolongación externa (Fig. IV.6, P6, b3), carecen de prolongación interna y las

esférulas sinápticas salen directamente del soma. Nuestros resultados, pues, evidencian que las diferencias en posición del núcleo a su vez determinan las diferencias estructurales entre los fotorreceptores.

Finalmente, otro hecho a favor de la determinación genética de la posición del núcleo, es que los fotorreceptores de determinadas especies como el pollo, tienen posiciones opuestas a las de los fotorreceptores de la rata y otras especies. En el pollo los bastones son los que tienen el núcleo en posición restrictiva, ocupando la posición más interna de la capa; mientras que los núcleos de los conos están distribuidos a todos los niveles. Además comparando los porcentajes de conos y bastones en pollo (Morris, 1970; López, 1991) y rata, se evidencia que los porcentajes son característicos de distintas especies y por lo tanto podrían también estar determinados genéticamente.

V I. C O N C L U S I O N E S .

VI. CONCLUSIONES.

Primera.-

El método de disgregación celular que hemos puesto a punto para aislar los fotorreceptores íntegros de la rata es el más eficaz de los que se han utilizado hasta ahora, y podría utilizarse para purificar no sólo estas células sino cualquier otra clase de células de la retina, con la excepción de las células ganglionares de retinas mayores de 12 días postnatales.

Segunda.-

El estudio del desarrollo de los fotorreceptores, indica que la posición del soma se determina muy pronto después de que las células abandonan el ciclo celular, y que además las variaciones en la posición del soma determinan las variaciones estructurales entre estas células, debido a que desarrollan programas de crecimiento diferentes.

Tercera.-

Los bastones de la rata, desde que abandonan el ciclo celular tienen formas simples muy similares a las formas adultas, por lo que su morfogénesis se reduce al crecimiento ó elongación de la célula desde P0 a P17. La elongación máxima ocurre desde P12 a P17, periodo en el que duplican su longitud.

Cuarta.-

El estudio del contenido en DNA de los fotorreceptores indica que tienen un contenido 2C. Por lo tanto, estas células abandonan el ciclo celular durante G1 y no al final de G2; posibilidad ésta última que habíamos considerado en base a las formas más jóvenes adoptadas por los neuroblastos.

Quinta.-

Nuestro trabajo es el primero que estudia "in vivo" y con el método de Golgi las formas de los fotorreceptores de la rata adulta, y pone en evidencia la variabilidad en la posición del soma de los bastones, así como las diferencias estructurales entre ellos y con los conos.

Sexta.-

Nuestro trabajo relativo al aislamiento de los fotorreceptores íntegros, podría dar un impulso a la experimentación que trata de conseguir, mediante el trasplante de fotorreceptores aislados, la regeneración de la capa de fotorreceptores, en retinas en las que ha sido dañada únicamente esta capa.

V I I . B I B L I O G R F I A .

BIBLIOGRAFIA

- ADLER R. (1986). Development Predetermination of Structural and Molecular Polarization of Photoreceptors Cells. *Developmental Biology* 117, 620-527.
- ADLER R. (1987). Nature and nurture in the differentiation of retinal photoreceptors and neurons. *Cell. Differentiation*. 20: 183-188.
- ALLISON, DC.; RIDOLPHO, PF.; RASCH, EM.; RASCH. RW. AND JHONSON, TS. (1981). Increased accuracy of absorption cytophotometric DNA values by control of stain intensity. *J Histochem Cytochem*. 29:1219.
- ALBERTS, D.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K. AND WATSON, J.D. (1983). *Biología Molecular de la Célula*. ED. Omega. Barcelona.
- ALTHAUS, H.H. AND NEUHOFF V. (1982) Isolation and culture of brain cells and their experimental use. In I. R. Brown (E. D.) *Molecular Approaches to neurobiology*. Academic Press. New York, 341-403.
- ANDERSON, DH.; FISHER, SK. Y STEINBERG, RH. (1978). Mammalian cones: Disc shedding phagocytosis, and renewal. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 17:117-133.
- ARAKI M.; WATANABE K. AND YASUDA K. (1984). Immunocytochemical localization of rhodopsin-like immunoreactivity in the outer segments of rods and single cones of the chick retina. *Cell Struct and Function* 9:1-12.
- BACHMANN, K. (1972). Genome size in mammals. *Chromosoma*. 37:85.
- BAILEY, C.H. AND GOURAS, P. (1985). *Principles of Neuroscience*. 2 Ed., Eds. E.R. Kandel and J.H. Schwartz. Ed. Elservier. New York- Amsterdam-Oxford.
- BALL, A.K. AND DICKSON, D..H. (1983). Displaced amacrine and ganglion cells in the newt retina. *Exp. Eye. Res*. 36: 199-213.
- BERGER, E.R. (1964). Mitochondria genesis in the retinal photoreceptor inner segment. *J. Ultrastruct. Res*. 11: 90-111.

- BERGER, E.R. (1965). Mitochondria genesis: The "de novo" formation and differentiation of mitochondria in "Lebistes" photoreceptor inner segments. Dissertation Abstr., 26:7.
- BERNOCCHI, G. AND SCHERINI, E. (1981). Cytochemical study of chromatin changes in Purkinje cell population as markers of rat cerebellar histogenesis. Acta Histochem. 69: 206-216,
- BLANKS, J.C.; ADINOLFI, A.M. AND LOLLEY, R.N. (1974). Synaptogenesis in the photoreceptor terminal of the mouse retina. J. Comp. Neurol. 156: 81-94.
- BOHM, N.; KRONER, B. AND KAISER, E. (1981). Cytophotometric evidence of non-S-phase extra DNA in human neuronal nuclei. Cell Tiss. Kinet. 14: 433-444.
- BORWEIN, B.; BORWEIN, D.; MEDEIROS, J. AND MCGOWAN, J.W. (1980). The ultrastructure of monkey foveal photoreceptors, with special reference to the structure, shape, size and spacing of foveal cones. Am. J. of Anat. 159: 125-146.
- BOYCOTT, B.B. AND WASSLE, H. (1974). The morphological types of ganglion cells of the domestic cat's retina. J. Physiol. 240: 397-419.
- BOWMAKER, J. K. (1980). Colour vision in birds and the role of oil droplets. Trends in Neurosci. August. pp. 196-199.
- BRAEKEVELT, C.R. AND HOLLENBERG, M.J. (1970). Development of the Retina of the Albino Rat. Am. J. Anat. 127: 281-302.
- BRAEKEVELT, C.R. (1973). Fine structure of the retinal pigment epithelium and photoreceptor cells of an australian marsupial, *Senotix brachyurus*. Can. J. Zool., 51: 1093-1100
- BRAEKEVELT, C.R. (1983)a. Retinal photoreceptor fine structure in the domestic shepp. Acta Anat. 116:265-275.
- BRAEKEVELT, C.R. (1983)b. Photoreceptor fine structure in the domestic ferret. Anat. Anz. 153: 33-44.
- BRANCHEK, T. AND BREMILLER, R. (1984). The development of photereceptor in the zebrafish, *Brachydamio rerio*. I. Structure. J. Comp. Neuro. 224: 107-115.

- BUNT, A.H.; LUND, R.D. AND LIND, J.S. (1974). Retrograde axonal transport of horseradish peroxidase by ganglion cells of albino rat retina. *J. Comp. Neurol.* 73: 215-228.
- BUNT, A.H. AND MINCKLER, D.S. (1977). Displaced ganglion cells in the retina of the monkey. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 16: 95-98.
- BUNT A. H. AND KLOCK J. B. (1980). Comparative study of ³H-Fucose incorporation into vertebrate photoreceptor outer segments. *Vision Res.* 20: 739-747.
- CAJAL, S.R. (1892). La retina des vertebres. *La Cellule* 9: 119-225.
- CAJAL, S.R. (1972). The structure of the retina. Compiled and Translated by S.A.Thorpe and M. Glickstein. Charles C. Thomas, Publisher. Springfield, Illinois U.S.A.
- CARASSO, N. (1958). Ultrastructure des cellules visuelles de larves d'amphibiens. *C. R. Acad. Sci. D. Paris* 247: 527-531.
- CARTER-DAWSON, L.D. AND LAVAIL, M.M. (1979)a. Structural analysis using light and electron microscopy. *J. Comp. Neur.* 188: 245-262.
- CARTER-DAWSON, L. AND LAVAIL, M. (1979)b. Rods and cones in the mouse retina. Autoradiographic analysis of cell generation using Tritiated Thymidine. *J. Comp. Neur.* 188: 263-272.
- CHEN, F. AND WITKOVSKY, P. (1978). Formation of photoreceptor synapses in retina of larval *Xenopus*. *J. Neurocytol.* 7: 721-740.
- COHEN, A.I. (1963)a. Vertebrate retinal cells and their organization. *Biol. Rev.* 38: 427-459.
- COHEN, A.I. (1970). Further studies on the question of the patency of saccules in outer segments of vertebrate photoreceptors. *Vision Res.*, 10: 445-453.
- COHEN, A.I. (1972). Rods and Cones. *Handbook of Sensory Physiology VII/2* 63-100 Fuortes, M.G. (Edit.) Springer-Verlag Berlin.
- COHEN, J.; MARES, V. AND LOSIN, Z. (1973). DNA content of purified preparations of mouse Purkinje neurons isolated by a velocity sedimentation technique. *J. Neurochem.* 20:651-657.

- COLONNIER, M. (1964). The tangencial organization of visual cortex. *J. Anat.* 98, 327-344.
- COULOMBRE, A.J. (1955). Correlations of structural and biochemical changes in the developing retina of the chick *Am. J. Anat.* 96: 153-190.
- COULSON, P.B.; BISHOP, A.D. AND LENARDUZZI, R. (1977). Quantitation of cellular deoxyribonucleic acid flow microfluorometry. *J. Histochem Cytochem* 25: 1147.
- COULSON, P.B. AND TYNDALL, E. (1978). Quantitation by flow microfluorometry of total cellular DNA in *Acanthamoeba*. *J. Histochem Cytochem* 26:713.
- DANA GIULIAN (1980). Isolated from the adult rabbit retina. *Brain Research* 189:135-155.
- DAW, N.W. (1982). Function of neurotransmitters in the retina. *Retina* 2: 322-331.
- DAW, N.W.; JUNSEN, R.J. AND BRUNKEN, W. J. (199). Rod pathways in mammalian retinae. *Trends in Neurosci.* 13:110-115.
- DE ROBERTIS, E. (1956). Morphogenesis of the retinal rods. An electron microscope study. *J. Biophys. Biochem. Cytol. Supl.* 2: 209-218.
- DE ROBERTIS, E. (1960). Some Observations on the Ultrastructure and Morphogenesis of Photoreceptors. *J. General Physiology* 43 (2 Part.2): 1-13 (suppl.).
- DE ROBERTIS, E.D.P. AND DE ROBERTIS E.M.F. (1981). *Biología Molecular y Celular*. Ed. El Ateneo, S.A. 10 Ed.
- DENHAM, S. (1967). A cell proliferation of the neural retina in the two-day rat. *J. Embryol. exp. Morph.* Vol. 18, 1, pp. 53-66, August.23.
- DEL CERRO M. AND COL. (1988). Intraretinal transplantation of fluorescently labeled retinal cell suspensions. *Neuroscience Letters*, 92:21-26.
- DOWLING, J.E. (1970). Organization of vertebrate retina. *Invest. Ophthalmol.*, 9: 655-680.
- DOWLING, J.E.; EHINGER, B. AND HEDDEN, W.L. (1976). The interplexiform cell: a new type of retinal neuron. *Invest. Ophthalmol.* 15: 916-926.
- DOWLING, J.E. (1979). A new retinal neurone the interplexiform cell. *Trends. in Neurosci.* August 189-191.

- DOWLING, J.F. (1986). Dopamine: a retinal neuromodulator. *Trends in Neurosci.* 9: 236-240.
- DUIJNDAM, W.A.L. AND DUIJIN, P. (1973). The dependence of the absorbance of the final chromophore in the Feulgen-Schiff reaction on the pH of the medium. *Histochemie* 35: 373-375.
- DUKE-ELDER, S. (1958). System of ophthalmology, vol.1. The eye in evolution. London: Kimpton.
- DUNN, R.F. (1965). Electron microscopy studies on the photoreceptor cells of the gecko *Coleonyx variegatus*. Ph. D Thesis University of California. Los Angeles.
- DUNN, R.F. (1966)a. Studies on the retina of the gecko *Coleonyx variegatus*. I. The visual cell classification. *J. Ultrastr. Res.*, 16: 651-671.
- DUNN, R.F. (1966)b. Studies on the retina of the gecko *Coleonyx variegatus*. II. The rectilinear visual cell mosaic. *J. Ultrastr. Res.* 16: 672-684.
- EAKIN, R.M. AND WESTFALL, J.A. (1961). The development of photoreceptors in the stirnorgan of the tree frog *Hyla regilla*. *Embryology (Nagoya)* 6: 84-98.
- FATT P. (1981). Proteins of vertebrate rod outer segments: possible role for multiple forms of rhodopsin. *Exp. Eye Res.* 33:31-46.
- FEENEY, L. (1973). The interphotoreceptor space. I. Postnatal ontogeny in mice and rats. *Dev. Biol.* 32: 101-115.
- FINERAN, B.A. and NICOL, J.A.C. (1978). Studies on the photoreceptors on *Anchoa mitchilli* and *A. hepsetus* (Engraulidae) with particular reference to the cones. *Phil. Trans. R. Soc. B* 283: 25-60.
- FOX, D.F. (1969). Some characteristics of the cold hydrolysis technique for staining plant tissues by the Feulgen reaction. *J. Histochem.* 17: 266-272.
- FREDERIKSEN K. AND MCKAY R.D.G. (1988). Proliferation and differentiation of rat neuroepithelial precursor cells in vivo. *The Journal Neuroscience*, April 8(4): 1144-1151.
- FUJITA, S. AND HORII, M. (1963). Analysis of cytogenesis in chick retina by tritiated thymidine autoradiography. *Arch. Histol. (Japan)*, 23:359-366.

- FUJITA, S. (1974). DNA constancy in neurons of the human cerebellum and spinal cord as revealed by Feulgen cytophotometry and cytofluorometry. *J. Comp. Neur.* 155: 195-202.
- FUJITA, S.; HATTORI, T.; FUKUDA, M. AND KITAMURA, T. (1974). DNA contents in purkinje cell and inner granule neurons in the developing rat cerebellum. *Develop. Growth. Differ.* 16: 205-211.
- GALBAVY, E.S.J. AND OLSON, M.D. (1978). Fine structure of developing photoreceptors in the postnatal rat. *Anat. Rec.* 190:398.
- GALBAVY, E.S.J. AND OLSON, M.D. (1979). Morphogenesis of Rod Dells in the Retina of the Albino Rat: A Scanning Electron Microscopic Study. *Anat. Rec.* 195:707-718.
- GALLEGO, A. (1971). Horizontal and amacrine cells in the mammal's retina. *Vision Res., Supplement n 3*, 33-50
- GALLEGO, A. (1975). Las células horizontales de la retina de los vertebrados. *Real Aca. Nac. de Medicina.*
- GALLEGO, A. AND SOBRINO, J.A. (1975). Short-axon horizontal cells of the monkeys retina. *Vision Res.* 15: 747-748 Instituto España.
- GALLEGO, A.; BARON, M. AND GAYOSO, M. (1975)a. Horizontal cells of the avian retina. *Vision Res.* 15: 747-748. Instituto de España.
- GALLEGO A., BARON M. AND GAYOSO M. (1975)b. Organization of the outer plexiform layer of the diurnal and nocturnal birds retinae. *Vision. Res.* 15: 1037-1028.
- GALLEGO, A. (1976)a. The horizontal cells of the terrestrial vertebrate retina: I. mammals and birds. *The estructure of the Eye III.* Eds. Yamada and Mishima pp. 273-280.
- GALLEGO, A. (1976)b. Comparative study of the horizontal cells in the vertebrate retina, mammals and birds. *Neural principles in vision.* Edited by F. Zettler and R. Weiler. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- GAYOSO, M.J.; DIAZ-FLORES, L. Y GARRIDO, M. (1978). Gotas lipídicas de los fotorreceptores de la retina de los vertebrados. *Morfol. Normal y Patol.* 2:1-28.

- GENIS-GALVEZ, J.M.; PUELLES, L. AND PRADA, C. (1977). Inverted (displaced) retinal amacrine cells and their embryonic development in the chick. *Exp. Neurology* 56: 151-157.
- GENIS-GALVEZ, J.M.; PRADA, F. AND ARMENGOL, J.A. (1979). Evidence for three types of horizontal cells in the chick retina. *Jap. J. of Ophthalmol.* 23: 378-387.
- GOLDSTEIN, D.J. (1970). Aspect of scanning microdensitometry A straight light. *J. Microscopy.* 92:1-16.
- GOLDSMITH, T.H. (1986). Interpreting transretinal recording of spectral sensitivity. *J. Comp. Physiol. A.* 159: 481-487.
- GOVARDOVSKY, V.J. AND KHARKEEVICH, T.A. (1965). Histochemical and electron microscopical study of photoreceptive cell development under conditions of tissue culture. (In Russian) *Arkh. Anat. Gistol. Embriol.* 49: 50-56.
- GOVARDOVSKY, V.J. AND KHARKEEVICH, T.A. (1966). Embryological development of photoreceptors. In: Academy of Sciences USSR (ed) *Nervous processes in receptor elements of sense organs.* (In Russian) Moscow, Leningrad, pp 4-22.
- GRAFT, V. AND NORREN, D.V. (1974). A blue sensitive mechanism in the pigeon retina: λ_{max} 400 nm. *Vision Res.* 14: 1203-1209.
- GREINER, J.V.; WEIDMAN, T.A.; BODLEY, H.D. AND GREINER C.A.M. (1981). Ciliogenesis in photoreceptor cells of the retina. *Exp. Eye Res.* 33: 433-446.
- GRUN, G. (1975). Structural basis of the functional development of the retina in the cichlid *Tilapia leucosticta*. *J. Embryol Exp. Morphol.* 33:243-257.
- GRUN, G. (1982). The development of the vertebrate retina: a comparative study. *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol* 78: 1-85.
- GUTIERREZ-TARRES, M.A. (1984). Organización de la capa plexiforme externa de la retina de las aves: fotorreceptores y células horizontales. Tesis doctoral. U.C.M. 1-129.
- HEBEL, R. (1971). Entwicklung und struktur der retina und des tapetum lucidum des hundes. *Ergeb. Anat. Entwicklungsgesch* 45: 1-93.

- HERMAN, C.J. AND LAPHAM, L.W. (1968). DNA content of neurons in the cat hippocampus. *Science* 160:537.
- HERMAN, C.J. AND LAPHAM, L.W. (1969). Neural polyploidy and nuclear volumes in the cat central nervous system. *Brain Res.* 15: 35-48.
- HINDS J.W. AND RUFFET (1971). Cell proliferation in the neural tube: an electron microscope and Golgi analysis in the mouse cerebral vesicle. *Dev. Biol.* 37:381-416.
- HINDS J. W. AND HINDS P. L. (1974). Early ganglion cell differentiation in the mouse retina: an electron microscopic analysis utilising serial sections. *Dev Biol* 37:381-416.
- HINDS, J.W. AND HINDS, P.L. (1979). Differentiation of photoreceptors and horizontal cells in the embryonic mouse retina: An electron microscopic, serial section analysis. *J. Comp. Neurol.* 187: 495-512.
- HINS, J.W. AND HINDS P.L. (1983). Development of retinal amacrine cells in the mouse embryo: Evidence for two modes of formation. *The Journal of Comparative Neurology* 213: 1-23.
- HOGAN M. J.; ALVARADO J. A. AND WEDDELL J. E. (1971). *Histology of Human Eye.* Saunders. Philadelphia.
- HOLLENBERG, M.J. AND SPIRA, A.W. (1973). Human retinal development: ultrastructure of the outer retina. *Am. J. Anat.* 137: 357-386.
- HOLLYFIELD, J.G. (1968). Differential addition of cells to the retina in *Rana pipiens* tadpoles. *Dev. Biol.* 18: 163-179.
- HOLLYFIELD J. G.; RAYBORN M. E.; VERNER G. E.; MAUDE M. B. AND ANDERSON R. R. (1982). Membrane addition to photoreceptor outer segments: light stimulates membrane assembly in the absence of increased membrane biosynthesis. *Invest. Ophthalmol. and Visual Sci.* 22:417.
- HOLLYFIELD J. G.; RAYBORN M.E. AND ROSENTHAL J. (1984). Two populations of rod photoreceptors in the retina of *xenopus laevis* identified with ³H-Fucose autoradiography. *Vision Res.* 24: 777-782.
- HOLT, C.E.; BERTSCH, T.W.; ELLIS, H.M. AND HARRIS, W.A. (1988). Cellular determination in the xenopus re-

tina is independent of lineage and birth date.
Neuron 1:15-26.

HUGHES, A. AND WIENIAWA-NARKIEWICZ, E. (1980). A newly identified population of presumptive microneurons in the cat retinal GC layer. *Nature* 284: 468-470.

ISHIKAWA, T. AND YAMADA, E. (1969). Atypical mitochondria in the ellipsoid of photoreceptor cells of vertebrate retinas. *Invest. Ophthalmol.*, 8: 302.

ISHIKAWA M.; WATANABE H.; KOIKE Y., HISATOMI O., TOUNAGA F. AND TONOSAKI A. (1989). Demonstration by lectin cytochemistry of rod and cone photoreceptors in the lamprey retina. *Cell Tissue Res.* 256:227-232

JACOBSON, M. (1968). Development of neural specificity in retinal ganglion cells of *Xenopus*. *Dev. Biol.* 17: 202-218.

JACOBSON, M. (1979). *Developmental Neurobiology*. Segunda Edición. Plenum Press. New York- London.

JOHNSON, J. E.; BARDE, Y.; SCHWAB, M. AND THOENEN, H. (1986). Brain-derived neurotrophic factor supports the survival of cultured rat retinal ganglion cells *The Journal of Neuroscience*. October. 6 (10): 3031-3038.

KAHN, A.J. (1973). Ganglion cell formation in the chick neural retina. *Brain Res.* 63: 285-290.

KAHN, A.J. (1974). An autoradiographic analysis of the time of appearance of neurons in the developing chick retina. *Dev. Biol.* 38:30-40.

KAPLAN, M.S. (1981). Neurogenesis in the 3-month-old rat visual cortex. *J. Comp. Neurol.* 195: 323-338.

KARTER, H.J.; FITE, K.V. AND BREDCHA, N. (1977). Specific projection of displaced ganglion cells upon accessory optic system in the pigeon (*Columba livia*). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 1753-1756.

KJELLSTRAND, P.T. (1977). Temperature and acid concentration in the search for optimum Feulgen hydrolysis conditions. *J. of Histochem. Cytochem.* 25:129-134.

KJELLSTRAND, P.T. (1980). Mechanisms of the Feulgen acid hydrolysis. *J. of Microscopy* 119: 391-396.

- KOLB, H. AND WEST, R.W. (1977). Synaptic connections of the interplexiform cell in the retina of the cat. *J. Neurocytol.* 6: 155-170.
- KOLB, H. NELSON, R. AND MARIANI, A. (1981) Amacrine cells, bipolar cells and ganglion cells in the cat retina: A Golgi study. *Vision Res.* 21: 1081-1114.
- KUENZLE, C.C.; BREGNARD, A.; HUBSCHER, V. AND RUCH, F. (1978). Extra DNA in forebrain cortical neurons. *Exp. Cell Res.* 113: 151-160.
- KUWABARA, T. AND WEIDMAN, T.A. (1974). Development of the prenatal rat retina. *Invest Ophthalmol.* 13: 725-739.
- LAPHAM, L.W. (1968). Tetraploid DNA content of Purkinje neurons of human cerebellar cortex. *Science* 159: 310-311.
- LA VAIL, M.M. AND HIL, W. (1971). Histotypic organization of the rat retina in vitro. *Z. Zellforsch* 114: 557-579.
- LA VAIL, M.M. (1976). Rod Outer Segment Disk Shedding in Rat Retina: Relationship to Cyclic Lighting. *Science* Vol. 194, N 4269: 1071-1074.
- LA VAIL, M.M. (1980). Circadian nature of rod outer segment disc shedding in the rat. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 407-411.
- LEE, GM.; THORNTWHAITE, J. T. AND RASCH, EM. (1984). Pico-gram per cell determination of DNA by flow cytometry. *Anal Biochem.* 137:221.
- LENTZ, R.D. AND LAPHAM, L.W. (1969). A quantitative cytochemical study of the DNA content of neurons of rat cerebellar cortex. *J. of Neurochem.* 16:379-384.
- LEURE-DUPREE, A. (1974). Observations on the Synaptic Organization of the Retina of Albino Rat: A Light and Electron Microscopic Study.
- LINBERG, K. A. AND FISHER, S. F. (1978). Ultrastructural changes in the outer retina during cone synaptogenesis in humans. ARVO Spring Meeting Sarasota, Fla. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. Suppl.* p. 116.
- LOPEZ, R. (1991). Neurogénesis y diferenciación de los fotorreceptores de la retina. Estudio en el embrión de pollo. Tesis Doctoral . U.C.M.

- MANN, D.M.A.; YATES, P.D. AND BARTON, C.M. (1978). The DNA content of Purkinje cells in mammals. *J. Comp. Neurol.* 180: 345-348.
- MARES, V. AND VAN DER PLOEG, M. (1980). Cytophotometric reinvestigation of DNA content in Purkinje cell of the rat cerebellum. *Histochemistry* 69: 161-167.
- MARES, V.; CRKOVSKA, J; MARSÁK, TL. AND STIPEK, S. (1985). DNA content in nerve-cell nucleus. A Biochemical and cytophotometric study of the rat cerebellum. *Neuroscience* 16: 45-47.
- MARTOJA, R. AND MARTOJA, M. (1970). *Técnicas de Histología animal*. EDS. Masson et Cie, Paris. Primera Edición. Ed. Toray-Masson S.A.
- MASLAND, R.H. (1986). The functional architecture of the retina. *Scientific Am.* 255,6: 102-112.
- MASLIM J. AND COL. (1986). Stages in the structural differentiation of retinal ganglion cells. *The Journal of Comparative Neurology* 254:382-402.
- MASON, W.T.; FAGER, R.S.; ABRAHAMSON, E.W. (1973). Ultrastructure of the receptor and epithelial layers of the bovine retina. *J. Anat.* 115: 289-308.
- MASSEY, S. C. AND REDBURN, D. A. (1987). Transmitter circuits in the vertebrate retina. *Progress in Neurobiol.* 28: 55-96.
- MAYALL, B.H. (1969). Deoxyribonucleic acid cytophotometry of stained human leukocytes. I. Differences among cell types. *J. of Histochem. Cytochem.* 17: 249-257.
- McDARLE, C.B.; DOWLING, J.E. AND MASLAND, R.H. (1977). Development of outer segments and synapses in the rabbit retina. *J.Comp. Neurol.* 175: 253-274.
- McLAUGHLIN, B.J. (1976). A fine structural and E-PTA study of photoreceptor synaptogenesis in the chick retina. *J. Comp. Neur.* 170: 347-364.
- MELLER, K. (1964). Elektroinmikroskopische befunde zur differenzierung der rezeptorzellen und bipolarzellen der retina und ihrer synaptischen verbindungen. *Z. Zellforsch* 64: 733-750.
- MELLER, K. (1968). Histo und zytogenese der sich entwickelnden retina: eine elektronenmikroskopische studie. Fisher Stuttgart.

- MELLER, K. AND TETZLAFF, W. (1976). Scanning electron microscopic studies on the development of the chick retina. *Cell Tissue Res.* 170: 145-160.
- MISHIMA, H. AND FUJITA, H. (1978). Studies on the cytodifferentiation of the neuroblasts and visual cell in the chick embryo retina, using the electron microscopic autoradiography of ³H-Thymidine. *Albrecht Von Graefes Arch. Klin. Exp. Ophthalmol.* 206: 1-10.
- MISSOTTEN I. (1965). The Ultrastructure of the Human Retina. *Arscia Vitgaren N.V. Brussels.*
- MOREST, D.K. (1970). The pattern of neurogenesis in the retina of the rat. *Z. Anat. Entwicklungsgesch* 131:45-67.
- MORRIS, V.B. (1970). Symmetry in a receptor mosaic demonstrated in the chick from the frequencies, spacing and arrangement of the types of retinal receptor. *J. Comp. Neurol.* 140: 359-398.
- MORRIS, V.B. and SHOREY, C.D. (1967). An electron microscope study of types of receptor in the chick retina. *J. Comp. Neurol.*, 129: 313-339.
- MORSELT, A. W. F.; BRAAKMAN, D. J. AND JAMES, J. (1972). Feulgen-DNA and fast-green histone estimations in individual cell nuclei of cerebellum of young and old rats. *Acta Histochem.* 42: 281-286.
- NAVARRETE, M.H.; SAECADAS CAMPOS, Y MARTIN HURTADO, S.; (1983). Análisis citofotométrico de las condiciones óptimas de la tinción de Feulgen. *Morfología Normal y Patológica. Sec. A, Vol. 7/2: 239-247.*
- NILSSON, S.E.G. (1964)a. An electron microscopic classification of the retinal receptors of the Leopard Frog (*Rana pipiens*). *J. Ultrastr. Res.*, 10: 390-416
- NILSSON, S.E.G. (1964)b. Receptor outer segment development and ultrastructure of the disk membranes in the retina of the tadpole (*Rana Pipens*). *J. Ultrastr. Res.* 11: 581-620.
- NILSSON, S.E.G. AND CRESCITELLI, F. (1969). Changes in ultrastructure and electroretinogram of bullfrog retina during development. *J. Ultrastr. Res.* 27: 45-62.

- NOVAKOVA, V.; SANDRITTER, W. AND SCHLUETER, G. (1970). DNA content of neurons in rat central nervous system. *Exp. Cell. Res.* 60: 454-456.
- OLNEY, J.W. (1968). An electron microscopic study of synapse formation, receptor outer segment development and other aspects of developing mouse retina. *Invest Ophthalmol.* 7: 250-268.
- OLSON, M.D. (1972). Fine structural development of the chick retina: early morphogenesis of photoreceptors. *Anat. Rec.* 172: 441.
- OLSON, M.D. (1973). Fine structural organization of photoreceptors in the chick: centrioles and ciliary development. *Anat. Rec.* 175: 402.
- PEDLER, C. AND TANSLEY, K. (1963). The fine structure of the cone of a diurnal gecko (*Phelsuma inunguis*). *Exp. Eye Res.*, 2: 39-47.
- PEDLER, C. AND TILLY, R. (1967). The fine structure of photoreceptor discs. *Vision Res.* 7: 829-836.
- PEREZ ARROYO, M. (1978). Estudio topográfico y funcional de la retina de la tortuga, *Clemmys caspica*. Tesis Doctoral. U.C.M.
- PERRY, V.H. (1979). The ganglion cell layer of the retina of the rat: a Golgi study. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 204: 363-375.
- PERRY, V.H. (1981). Evidence for an amacrine cell system in the ganglion cell layer of the rat retina. *Neuroscience Vol. 6. N 5*, 931-944.
- PERRY, V. H. AND WALKER, M. (1980). Amacrine cells, displaced amacrine cells and interplexiform cells in the retina of the rat. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 208: 415-431.
- POLIAK, S. L. (1957). The vertebrate visual system. Chicago: Univ. Chicago Press.
- PRADA, C.; FUELLES, L.; GENIS-GALVEZ, J.M. (1981). A Golgi study on the early sequence of differentiation of ganglion cells in the chick embryo retina. *Anat. Embryol.* 161: 305-317.
- PRADA, C. AND LOPEZ-MASCARAQUE, L. (1985). Dammar resin prevents the fading of celloidin sections of Golgi impregnated embryonic central nervous system. *Mikroskopie* 42: 146-147.

- PRADA, C.; PUELLES L.; GENIS-GALVEZ, J.M. AND RAMIREZ G. (1987). Two modes of free migration of amacrine cell neuroblasts in the chick retina. *Anat. Embryol.* 175:281-287.
- PRADA, F.A.; CHMIELEWSIKI, C.E.; DORADO, M.E.; PRADA, C. AND GENIS-GALVEZ, J.M. (1989). Displaced ganglion cells in the chick retina. *Neurosci. Res.* 6: 329-339.
- PRADA, C.; PUGA, J.; PEREZ-MENDEZ, L.; LOPEZ, R. AND RAMIREZ, G. (1991). Spatial and Temporal Patterns of Neurogenesis in the Chick Retina. *European J. of Neuroscience*, Vol. 3, pp. 559-569.
- PRADA, C.; MEDINA, J.I.; LOPEZ, R.; GENIS-GALVEZ, J.M. AND PRADA F.A. (1992). Development of retinal displaced ganglion cells in the chick: neurogenesis and morphogenesis. *The Journal of Neuroscience*.
- QUESADA A.; PRADA F.; ARMENGOL, J.A. AND GENIS-GALVEZ J. M. (1981). Early morphological differentiation of the bipolar neurons in the chick retina. A Golgi analysis. *Zbl. Vet. Med. C. Anat. Histol. Embryol.* 10:328-341.
- RAEDLER A. AND SIEVERS J. (1975). The development of visual system of the albino rat. *Adv Anat Embryol* 50:1-88.
- RASCH, EM.; (1974). The DNA content of sperm and hemocyte nuclei of the silkworm *Bombyx mori*. *Chromosoma* 45:1.
- RASCH, EM.; (1985). DNA "standards" and the range of accurate DNA estimates by Feulgen absorption microspectrophotometry. *Advances in Microscopy*, 137-166.
- RASCH, EM.; BARR, HJ.; RASCH, RW.; (1971). The DNA content of sperm of *Drosophila melanogaster*. *Chromosoma* 33:1.
- RAYMOND, P. Y RIVILIN, P. K. (1987). Germinal cells in the goldfish retina that produce rod photoreceptors. *Dev. Biol.* 122: 120-138.
- REH, T.A. (1992). Cell proliferation and neuronal differentiation of retinal progenitor cells in vitro. *International Journal of Development Neuroscience* 9th biennial meeting of the ISDN, 48.

- REICHENBACH A. AND BIRKENMEYER (1984). Preparation of isolated Müller cells of the mammalian (rabbit) retina. *Z. Mikrosk-Anat. Forsch. Leipzig* 98, 5, S, 789-792.
- REICHEMBACH A. AND REICHEL T W. (1986). Postnatal development of radial glial (Müller) cells of rabbit retina. *Neuroscience Letters*. 125-130.
- REICHENBACH A.; SCHNEIDER H.; LEIBNITZ L.; REICHEL T W.; SCHAAF P. AND SCHUMANN (1989). The structure of rabbit retinal Müller (glial) cells is adapted to the surrounding retinal layers. *Anat. Embryol* 180: 71-79.
- REME, C.E. AND YOUNG, R.W. (1977). The effects of hibernation on cone visual cells in the ground squirrel. *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.* 16: 815-840.
- REME, C.E. AND KNOP, M. (1980). Autophagy in frog visual cells in vitro. *Investve. Ophtal. Vis. Sci.* 19: 439-456.
- RODIECK, R. W. (1973). The vertebrate retina. Principles of structure and function. Eds. Donald Kenedy y Roderic B. Park. W.H. Freeman and Company. San Francisco.
- ROHRSCHEIDER, I. (1975). Licht und elektronenmikroskopische untersuchung an der sich entwickelnden retina des blauen zwergmaulbrüters haplochomis burtoni (Cichlidae, teleostei). *Verh. Anat. Ges.* 69: 659-663.
- SARKS, S. H. AND SARKS J. P. (1989). Age-related macular degeneration: Atrophic form. In *Retina* (S. Ryan, Ed.). C. V. Mosby, St. Louis.
- SCHAFFER A. E. AND SCHNAAR R.L. (1983). The isolation and purification of neurons from the vertebrate central nervous system. In J.L. Banker J. F. Mckelvy (Eds). *Current methods in cellular neurobiology*. Vol. IV, Wiley. New York 131-187.
- SCHERINI, E. (1982). Hiperdiploidy in the Purkinje neuron population: chromatin status or extra DNA. The influence of fixatives on Feulgen-DNA. *Bas. Appl. Histochem.* 26: 173-183.
- SCHULTZE, M. (1866). Zur anatomie und physiologie der retina. *Arch. Mikr. Anat.* 2:175-286.

- SIDMAN, R. (1961). Histogenesis of mouse retina studied with thymidine H . In the "structure of eye". (G.K. Smelser, ed) 487-506 Academic Press N. Y.
- SILVERMAN M.S. AND COL. (1982). Photoreceptor Transplantation: Anatomic, Electrophysiologic, and Behavioral Evidence for the Functional Reconstruction of Retinas Lacking Photoreceptors. *Experimental Neurology* 115, 87-89.
- SJOSTRAND, F. S. (1949). An electron microscope study of the retinal rods of guinea pig eye. *J. Cell. Comp. Physiol.* 33: 383-403.
- SJOSTRAND, F. S. (1953)a. The ultrastructure of the outer segments of rods and cones of the eye as revealed by the electron microscopy. *J. Cell. Comp. Physiol.* 42: 15-44.
- SJOSTRAND, F. S. (1953)b. The ultrastructure of the inner segments of the retinal rods of the guinea pig eye as revealed by electron microscopy. *J. Cell. Comp. Physiol.* 42: 45-70.
- SJOSTRAND, F. S. (1958). Ultrastructure of the retinal rod synapses of guinea pig eye as revealed by three-dimensional reconstructions from serial sections. *J. Ultrastr. Res.* 2: 122-170.
- SMELSER, G.K.; OZANICS, V.; RAYBORN, M. AND SAGUN, D. (1974). Retinal synaptogenesis in the primate. *Invest. Ophthalmol.* 13: 340-362.
- SPIRA, A.W. (1975). In utero development and maturation of the retina of a non primate mammal. A light and electron microscope study of the guinea pig. *Anat. Embryol.* 146: 279-300.
- STEINBERG, R. H.; FISHER, S. K. AND ANDERSON, H. (1980). Disc morphogenesis in vertebrate photoreceptors. *J. Comp. Neurol.* 190: 501-518.
- STENSAAS L. J. AND STENSAAS S. (1968). An electron microscope study of cells in the matrix and intermediate lamina of cerebral hemisphere of the 45 mm rabbit embryo. *Z. Zellforsch Mikrosk Anat* 91: 341-365.
- STRYER, L. (1987). Moléculas de excitación visual. *Invest. y Ciencia Sep.* 87: 18-27.

- SZEL A.; TAKACS L.; MONOSTORI E.; VIGH-TEICHMANN I. AND ROHLICH P. (1985). Heterogeneity of chicken photoreceptors as defined by hybridoma supernatants. *Cell Tissue Res.* 240: 735-741.
- THIEBAUD, C. AND FISCHBERG, M.; (1977). DNA content in the genus *Xenopus*. *Chromosoma.* 59:253.
- TOWNES-ANDERSON E., DACHEUX R. F. AND RAVIOLA E. (1988). Rod photoreceptors dissociated from the adult rabbit retina. *The Journal of Neuroscience*, January, 8(1):320-331.
- UGA, S. AND SMELSER, G.K. (1973). Comparative study of the fine structure of retinal Müller cells in various vertebrates. *Invest. Ophthalmol.* 12:434-448.
- VINDELOV, LL.; CHRISTENSEN, I. J. AND JENSEN, J.; (1980). High resolution ploidy determination by flow cytometric DNA analysis with two internal standards. *Basic Appl Histochem.* 24:271.
- VINDELOV, LL.; CHRISTENSEN, IL. AND NISSEN NI. (1983). Standardization of high resolution flow cytometric DNA analysis by the simultaneous use of chicken and trout red blood cells as internal reference standards. *Cytometry* 3:328.
- VOGEL, M. (1978). Postnatal development of the cat's retina. *Adv. Anat. Embryol.* 54: 1-66.
- WEIDMAN, T.A. AND KUWABARA, T. (1968). Postnatal Development of the Rat Retina. *Arch Ophthalmol.* Vol. 79: 470-484. April.
- WEIDMAN, T.A. AND KUWABARA, T. (1969). Development of the rat retina. *Invest. Ophthalmol.* 8: 60-69.
- WISE, C. AND KUNZ, Y.M. (1977). Ultrastructural morphogenesis of cones and rods in the teleost *Poecilia reticulata* P. In.: 8th Int. Congress Int. Soc. Develop. Biol. Tokyo abstract C 0202.
- YACOB, A; WISE, CH.; KUNZ, Y.W. (1977). The accessory outer segment of rods and cones in the retina of the Guppy *Poecilia Reticulata*. P. (Teleostei). An electron microscopical study. *Cell. and Tissue Res.*, 177:181-194.
- YAMADA, E. (1960). The fine structure of the paraboloid in the turtle retina as revealed by electron microscopy. *Anat. Rec.*, 136:352.

- YAMADA, E. AND ISHIKAWA, T. (1965). Some observations on the submicroscopic morphogenesis of the human retina. In, Rohen J (ed) The structure of the eye. Schattauer, Stuttgart 5-16.
- YOUNG, R. W. (1967). The renewal of photoreceptor cell outer segments. *J. Cell. Biol.*, 33: 61-72.
- YOUNG, R. W. (1985). Cell differentiation in the retina of the mouse. *Anat. Rec.* 212: 199-205.
- YOUNG, R. W. AND DROZ, B. (1968). Cell birthdays and rate of differentiation of ganglion and horizontal cells of developing cat's retina. *J. Comp. Neurol.* 274: 77-79.
- ZIMMERMAN, R.P.; POLLEY, E.H. AND FORTNEY, R. (1988). Cell birthdays and rate of differentiation of ganglion and horizontal cells of the developing cat's retina. *J. Comp. Neurol.* 274:77-90.

VERIFICADA EN EL DIA DE HOY LA LECTURA DE LA TESIS

TITULADA Diferenciación de la retina

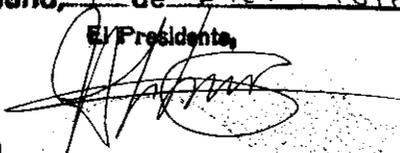
de los vertebrados: Ciclo celular

DE LA QUE ES AUTOR DONI Angela Marom

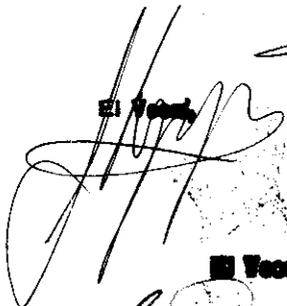
OBTUVO POR ~~LA CALIFICACION DE~~ LA CALIFICACION DE (1) APTO CUM LAUDE

Madrid, 18 de Diciembre de 1992

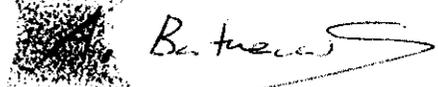
El Presidente,



El Vocal,



El Vocal,



El Vocal,



El Vocal Secretario,

