UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLOGICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OFTALMOLOGICAS
"RAMON CASTROVIEJO"

# *"ESTUDIO INMUNOHISTOQUIMICO DE LOS ASTROCITOS DE LA RETINA HUMANA"*

**TESIS DOCTORAL**

**ANA ISABEL RAMIREZ SEBASTIAN**

**MADRID, 1994**

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

# *"ESTUDIO INMUNOHISTOQUIMICO DE LOS ASTROCITOS DE LA RETINA HUMANA"*

## TESIS DOCTORAL

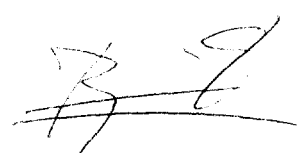
**ANA ISABEL RAMIREZ SEBASTIAN**

Dirigida por: **PROF. D. ALBERTO TRIVIÑO CASADO**
Profesor Titular de Oftalmología
Facultad de Medicina de la U.C.M.

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

Vº Bº

Prof. A. Triviño Casado



Prof. B. Fernández Ruiz

Ana I. Ramírez Sebastián

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
OFTALMOLOGICAS
«RAMON CASTROVIEJO»

**ALBERTO TRIVIÑO CASADO**, Profesor Titular de Oftalmología de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid, y

**BENJAMIN FERNANDEZ RUIZ,** Catedrático de Biología Celular de la Facultad de CC. Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid,

C E R T I F I C A N: Que **Dña. Ana Isabel Ramírez Sebastián** ha realizado bajo su dirección los trabajos de investigación correspondientes a su Tesis Doctoral titulada: "ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO DE LOS ASTROCITOS DE LA RETINA HUMANA"., que ha terminado con el mayor aprovechamiento.

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

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

Fdo. Prof. Alberto Triviño Casado

Fdo. Prof. Benjamin Fernández Ruiz

***Todo cuanto se haya descubierto en un dominio dado es casi nada en parangon con lo que se deja por descubrir.***

Santiago Ramón y Cajal.
(Discurso de Ingreso en la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. Madrid, 5 de diciembre de 1897)

*A JUANJO*

## AGRADECIMIENTOS

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

En segundo lugar, mi sincero agradecimiento a los **Profesores D. Alberto Triviño Casado y D. José Manuel Ramírez Sebastián**, quienes además de introducirme en el mundo de la investigación, han hecho posible que se desarrolle en mi la pasión por la histología ocular, pues sin su ayuda constante y sin su inestimable apoyo, dirección y consejos no hubiera sido posible la realización de este estudio.

Al **Prof. D. Benjamín Fernández Ruiz**, quien además de prestarse amablemente a codirigir este trabajo, me inculcó en mi época de estudiante el entusiasmo por la histología, haciendo de esta ciencia algo divertido y apasionante.

Para **Juan José Salazar Corral** no hay palabras de agradecimiento, ya que sin su ayuda y colaboración no hubiera sido posible la realización de este trabajo.

A la **Prof. Dña. Maite Solas Alados** y a **D. Agustín Fernández,** quienes además de introducirme en el mundo de la microscopía electrónica, siempre estuvieron dispuestos a prestarme su ayuda y en todo momento me animaron a seguir adelante incluso en las situaciones difíciles.

A mis compañeros del Instituto "Ramón Castroviejo" y en especial a **Viñas Andrés, Carmen Milla y Elvira Lázaro**, quienes en todo momento estuvieron dispuestos a prestarme su ayuda y apoyo.

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

Finalmente tengo que agradecer a mis padres y a toda mi familia todo lo que han hecho por mi.

1.- INTRODUCCIÓN.- . . . . . 1

1.1.- DESCUBRIMIENTO DE LAS ESTIRPES NEURÓGLICAS. . . . . 1

1.2.- LA NEUROGLIA RETINIANA. . . . . 5

1.2.1.- ESTUDIOS INICIALES EMPLEANDO IMPREGNACIONES ARGÉNTICAS. . . . . 5

1.2.2.- TÉCNICAS DE MICROSCOPÍA ELECTRÓNICA EN EL ESTUDIO DE LA ASTROGLIA RETINIANA. . . . . 15

1.2.3.- TÉCNICAS INMUNOHISTOQUÍMICAS EN EL ESTUDIO DE LA ASTROGLIA RETINIANA. . . . . 24

1.2.3.1.- CONCEPTOS GENERALES SOBRE LAS TÉCNICAS INMUNOHISTOQUÍMICAS. . . . . 24

1.2.3.2.- MARCADORES ASTROGLIALES . . . . . 27

* Proteína gliofibrilar ácida. . . . . 27

* La proteína S-100 como marcador astroglial. . . . . 32

* La vimentina como marcador astroglial. . . . . 34

* Otros marcadores astrogliales. . . . . 36

1.2.3.3.- LAS CÉLULAS ASTROGLIALES DE LA RETINA DE LOS MAMÍFEROS. . . . . 38

A) Morfología y distribución de los astrocitos retinianos de mamíferos no primates . . . . . 38

* Astrocitos de la retina del conejo. . . . . 39

* Astrocitos de la retina de la rata. . . . . 43

* Astrocitos de la retina del gato. . . . . 47

B) Morfología y distribución de los astrocitos retinianos de primates no homínidos. . . . . 52

1.3 - LOS ASTROCITOS DE LA RETINA HUMANA. . . . . 55

1.4.- PAPEL DE LOS ASTROCITOS EN EL FUNCIONAMIENTO DEL S.N.C. . . . . 63
1.4.1.- IMPLICACIÓN DE LOS ASTROCITOS EN EL METABOLISMO NEURONAL . . . . . 66
1.4.2.- INTERACCIONES GLIA-NEURONA EN EL DESARROLLO. . . . . 71
1.4.3.- ASTROCITOS Y FACTORES DE CRECIMIENTO NEURONAL. . . . . 72
1.4.4.- LOS ASTROCITOS EN LOS PROCESOS PATOLÓGICOS DEL SISTEMA NERVIOSO. . . . . 74
1.4.5.- PARTICIPACIÓN DE LOS ASTROCITOS EN LA FORMACIÓN DE LA BARRERA HEMATO-ENCEFÁLICA Y HEMATO-RETINIANA. . . . . 78

2.- JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS. . . . . 83

3.- MATERIAL Y MÉTODOS. . . . . 86

3.1.- CASUÍSTICA . . . . . 86

3.2.- FIJACIÓN Y PROCESAMIENTO DE LOS GLOBOS OCULARES. . . 88
3.2.1.- OBTENCIÓN DE CORTES HISTOLÓGICOS DE RETINA PARA MICROSCOPÍA ÓPTICA. . . . . 89
3.2.2.- REALIZACIÓN DE MONTAJES PLANOS DE RETINA . . 91

3.3.- PROCESAMIENTO DE LA RETINA PARA LA MICROSCOPÍA ELECTRÓNICA. . . . . 93
3.4.- TINCIONES HISTOLÓGICAS DE RUTINA . . . . . 96
3.4.1.- HEMATOXILINA-EOSINA . . . . . 96

3.4.2.- P.A.S. (REACCIÓN DEL ÁCIDO PERIODICO-SCHIFF). . 97
3.4.3.- AZUL DE TOLUOIDINA (al 1% en bórax). . . . . 98

3.5.- TECNICAS INMUNOHISTOQUÍMICAS. . . . . 99
3.5.1.- PAP . . . . . 100
A) PAP en montajes planos . . . . . 100
B) PAP en secciones verticales y horizontales. . . . . 102
3.5.2.- INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA. . . . . 103
A) En montajes planos . . . . . 103
B) En secciones verticales de retina: . . . . . 105

3.6.- OBSERVACIÓN DE LAS PREPARACIONES A MICROSCOPÍA ÓPTICA. . . . . 107

4.- RESULTADOS . . . . . 108

4.1.- MORFOLOGÍA Y DISTRIBUCIÓN DE LOS ASTROCITOS RETINIANOS MEDIANTE EL EMPLEO DE LA PROTEÍNA GFA. . . . . 108
4.1.1.- LOCALIZACIÓN DE LOS ASTROCITOS EN LA RETINA HUMANA. . . . . 111
4.1.2.- MORFOLOGÍA DE LOS ASTROCITOS RETINIANOS. . . . 115
4.1.2.1.- ASTROCITOS CON MORFOLOGÍA ALARGADA . . 116
* Subgrupo $A_1$. . . . . 118
* Subgrupo $B_1$. . . . . 119
* Subgrupo $C_1$. . . . . 119
* Subgrupo $D_1$. . . . . 120
4.1.2.2.- ASTROCITOS CON MORFOLOGÍA ESTRELLADA. 121
* Subgrupo $A_2$ . . . . . 124
* Subgrupo $B_2$. . . . . 126
* Subgrupo $C_2$. . . . . 127

4.1.3.- DISTRIBUCIÓN DE LOS ASTROCITOS RETINIANOS. . 127
4.1.3.1.- HACES ASTROGLIALES DE LA CAPA DE CÉLULAS GANGLIONARES. . . . . 128
4.1.3.2.- HACES ASTROGLIALES DE LA CAPA DE FIBRAS DEL NERVIO ÓPTICO. . . . . 134

4.2.- OBSERVACIONES A MICROSCOPIA ELECTRONICA. . . . . 138
4.2.1.- CARACTERÍSTICAS ULTRAESTRUCTURALES DE LOS ASTROCITOS RETINIANOS . . . . . 138
4.2.2.- PARTICIPACIÓN DE LOS ASTROCITOS EN LA FORMACIÓN DE LA MEMBRANA LIMITANTE INTERNA DE LA RETINA. . . . . 141
4.2.3.- PARTICIPACIÓN DE LOS ASTROCITOS EN LA FORMACIÓN DE LAS ENVUELTAS AXONALES Y NEURONALES . . . . . 143
4.2.3.1.- ASTROCITOS EN LA CAPA DE FIBRAS DEL NERVIO ÓPTICO. . . . . 143
4.2.3.2.- ASTROCITOS EN LA CAPA DE CÉLULAS GANGLIONARES. . . . . 144
4.2.4.- PARTICIPACIÓN DE LOS ASTROCITOS EN LAS LIMITANTES GLIALES DE LOS VASOS SANGUÍNEOS . . . . . 146

4.3.- FIGURAS . . . . . 148

5.- DISCUSIÓN. . . . . 178

5.1.- LOCALIZACIÓN DE LOS ASTROCITOS RETINIANOS HUMANOS. 178

5.2.- MORFOLOGÍA DE LOS ASTROCITOS RETINIANOS. . . . . 185

5.3.- RELACIONES DE LOS ASTROCITOS CON LAS DIFERENTES ESTRUCTURAS RETINIANAS. . . . . 196
5.3.1.- DISTRIBUCION DE LOS ASTROCITOS EN LA CAPA DE CELULAS GANGLIONARES. . . . . 196
5.3.2.- DISTRIBUCION DE LOS ASTROCITOS EN LA CAPA DE FIBRAS DEL NERVIO OPTICO . . . . . 200
5.3.3.- COMPARACION DE LA DISTRIBUCION DE LOS HACES ASTROGLIALES HUMANOS CON RESPECTO A LOS DE OTRAS ESPECIES . . . . . 202

6.- CONCLUSIONES. . . . . 204

7.- BIBLIOGRAFÍA . . . . . 207

# 1.- INTRODUCCIÓN

# 1.- INTRODUCCIÓN.-

## 1.1.- DESCUBRIMIENTO DE LAS ESTIRPES NEURÓGLICAS.

Desde que Rudolf VIRCHOW en 1846[256] definiera a las células localizadas entre las neuronas como "neuroglia", el estudio de estas células fue tomado con gran interés por los distintos neurohistólogos.

En una primera etapa, gracias al desarrollo de las impregnaciones argénticas, introducidas por GOLGI (1886[80]) y ANDRIEZEN (1893[10]), se pudo determinar la morfología general de las células neurogliales (ACHUCARRO, 1913[4]).

Además, en esa misma época, la utilización de la técnica de WEIGERT (1895[258]), basada en tinciones con diversas hematoxilinas, puso de manifiesto la fibra neuróglica (ACHUCARRO, 1913[4]). Esta técnica teñía las fibras con tal afinidad que condujo a pensar, a los investigadores de esa época, que este elemento era el único importante de la neuroglia (PENFIELD, 1924[172]; LÓPEZ ENRÍQUEZ, 1927[130]).

Sin embargo, con el empleo de las coloraciones protoplásmicas, introducidas por HELD (1903[84]) y desarrolladas posteriormente por ALZHEIMER (1910[9]), en las que se usaban anilinas, se obtuvieron imágenes muy claras del protoplasma celular. Estos autores afirmaron que las fibras neuróglicas estaban envueltas por protoplasma, siendo por tanto diferenciaciones intraprotoplásmicas. Esta técnica, sin embargo, no teñía las prolongaciones gliales más periféricas; lo que indujo a pensar en la existencia de una neuroglia difusa, es decir, ésta estaría constituida por un protoplasma neuróglico, que al abandonar la zona nuclear formaría una red continua o sincitio, en cuyo interior se encontrarían encerradas las fibras neuróglicas (ACHUCARRO, 1913[4]; PENFIELD, 1924[172]; LÓPEZ ENRÍQUEZ, 1927[130]).

Trabajos posteriores, realizados con técnicas argénticas perfeccionadas para la impregnación de la neuroglia (como p.ej. el método del formol urano de Cajal, técnica del tanino de plata amoniacal de Achucarro), pusieron en duda la existencia del sincitio neuróglico (RAMÓN Y CAJAL, 1913a,b[193,194]; ACHUCARRO,1909[2],1910[3],1915[5]).

Estas técnicas hicieron posible la impregnación de las prolongaciones celulares más periféricas, permitiendo que RAMÓN Y CAJAL (1913a,b[193,194]) y ACHUCARRO (1909[2],1910[3],1915[5]), pudieran observar con claridad que las

prolongaciones se cruzaban repetidamente pero sin una imagen de fusión o continuidad, quedando entre las fibras huecos para albergar a los plexos nerviosos y dendritas.

No obstante, la existencia del sincitio neuróglico no quedó totalmente descartada hasta que RAMÓN Y CAJAL (1913a[193]) desarrolló la técnica del oro sublimado, que permitió impregnar la neuroglia en su totalidad, observándose con gran claridad hasta las últimas prolongaciones celulares. Estas células además de poseer terminaciones libres en el plexo intersticial presentaban, casi de forma constante, pies vasculares dispuestos sobre los capilares próximos.

Este autor, por tanto, en 1913[190,191], estableció tres categorías principales de células neurogliales:

- Astrocitos de radiaciones largas. Localizados en la sustancia blanca (neuroglia fibrosa).
- Astrocitos de radiaciones cortas y vellosas. Localizados en la sustancia gris (neuroglia protoplásmica).
- El tercer elemento de Cajal, o corpúsculo adendrítico. Se correspondía con las células neuróglicas sin expansiones de Nissl.

El tercer elemento de Cajal, fue estudiado por DEL RÍO-HORTEGA (1919a,1920,1921a,b,1928[52,54-57]) mediante el método del carbonato de plata(1919b[53]), llegando este autor a la conclusión de que en realidad, el tercer elemento, estaba constituido por dos tipos celulares distintos: la microglia (de pequeño tamaño y de origen supuestamente mesodérmico), y la glia de escasas radiaciones u oligodendroglia (de origen ectodérmico).

Por tanto, como hemos podido advertir, a principios del siglo XX, y gracias a la escuela española de neurohistólogos (Achucarro, Del Río-Hortega, López Enríquez, Ramón y Cajal), quedó establecido que la neuroglia estaba constituida por (RAMÓN MOLINER, 1958[195]):

- Astrocitos fibrosos.
- Astrocitos protoplásmicos.
- Oligodendrocitos.
- Microglia.

## 1.2.- LA NEUROGLIA RETINIANA.

### 1.2.1.- ESTUDIOS INICIALES EMPLEANDO IMPREGNACIONES ARGÉNTICAS.

En 1782, FONTANA[73], observó que en la retina existía, además de los elementos nerviosos periféricos, unas estructuras que formaban un estroma o malla que mantenían en su lugar a estos elementos nerviosos.

Pero, el verdadero descubrimiento de la neuroglia retiniana es atribuido a Heinrich MÜLLER (1851[150]), quién determinó la presencia de "fibras radiales" en las retinas de todos los vertebrados. En un principio, antes de que se acuñase el terminó de neuroglia, este autor pensó que las fibras radiales eran de carácter neuronal al creer que eran continuación; de los conos y bastones por un lado, y de las fibras del nervio óptico por otro.

KÖLLIKER (1852[108]) apoyó estas primeras observaciones de MÜLLER[150], y además mencionó la existencia de células asteriformes en los tejidos retinianos más internos.

Pero, sin embargo, en 1854, REMAK[199], sugirió que las fibras radiales eran más semejantes al tejido conectivo encontrado en otros órganos.

La identificación definitiva de las "fibras radiales" como células neurogliales fue llevada a cabo por SCHULTZE (1866[226]). Este autor hizo una completa descripción de estas fibras radiales, determinando la presencia de una malla esponjosa constituida por estas células que dejaba huecos donde se encajaban los distintos elementos nerviosos de la retina, describiendo también las dos limitantes retinianas.

Además de la glia de Müller, SCHWALBE (1874[228]) observó células que se localizaban en la capa de fibras del nervio óptico, y a las que definió también como células neurogliales.

Sin embargo, el estudio más completo sobre la neuroglia retiniana, en las distintas especies de vertebrados, fue llevado a cabo por RAMÓN Y CAJAL (1889,1892,1904,1911[189-192]). Este autor, describió las oquedades que presentaba la glia de Müller en las capas granulares retinianas, donde se alojarían los núcleos neuronales; y las distintas prolongaciones que emitían estas células hacia las capas plexiformes.

Además, determinó que las membranas limitantes deberían ser consideradas como las terminaciones internas y externas de la glia de Müller, que se dispondrían las unas al lado de las otras.

RAMÓN Y CAJAL también fue el primer autor que identificó a las células neurogliales (que habían sido observadas en la capa de fibras del nervio óptico) como astrocitos fibrosos. Estas células se localizaban tanto en la capa de fibras del nervio óptico como en la capa de células ganglionares, estando ausentes en el resto de la retina. Morfológicamente, estos astrocitos, presentaban prolongaciones finas y delgadas pudiendo alguna de ellas introducirse hacia la plexiforme interna.

Contemporáneamente a Ramón y Cajal, DOGIEL (1895[62]) realizó un estudio extenso sobre la neuroglia retiniana humana utilizando el método argéntico de Golgi, afirmando, igual que RAMÓN Y CAJAL[190], que las fibras de Müller atravesaban todo el espesor retiniano entre las dos membranas limitantes, y sus prolongaciones formaban un soporte para todos los elementos nerviosos. Además, observó que en las zonas próximas a la papila óptica y en el nervio óptico existían células gliales asteriformes con numerosas prolongaciones finas y largas.

Otros autores, como GREEFF (1894[81]) y BACH (1895[11]), confirmaron las observaciones de RAMÓN Y CAJAL[190-192], y DOGIEL[62] sobre la morfología de

la glia de Müller y sobre la existencia de astrocitos en las capas de células ganglionares y fibras del nervio óptico. Además, MARENGHI (1900[137]) mencionó la presencia de células astrogliales a nivel de la capa plexiforme externa.

Las dos décadas siguientes estuvieron caracterizadas por la ausencia de interés de los investigadores por el estudio de la morfología de las células gliales retinianas. Sin embargo, MARCHESANI (1926[135]) estudió las células neurogliales retinianas basándose en los trabajos que DEL RÍO-HORTEGA (1919-1921[52-56]) realizó en el Sistema Nervioso Central (S.N.C.). Este autor distinguió en la retina los tres elementos principales de la neuroglia descritos anteriormente en el S.N.C.: astroglia, oligodendroglia y microglia. Las células astrogliales, según MARCHESANI se localizaban sólo en las proximidades de la papila óptica y posiblemente también en los tejidos más internos. Además apuntó que las células de Müller serían en realidad astrocitos modificados. Las células de oligodendroglia, raramente se teñían, pero las que lo hacían, poseían prolongaciones cortas relacionándose estrechamente con las células ganglionares. Las células de microglia (con propiedades ameboides y fagocíticas), se teñían de forma incompleta, localizándose en las capas nuclear interna, plexiforme interna, y ganglionar.

La presencia de células microgliales y oligodendrocitos en la retina de varios mamíferos (incluyendo mono y hombre) fue también determinada por LÓPEZ ENRÍQUEZ (1927[129,130]). Este autor observó estas células a nivel de las capas plexiforme interna, ganglionar, y de fibras del nervio óptico.

Sin embargo, BULAC (1931[28]), sólo observa los oligodendrocitos y la microglia en la capa de células ganglionares de los primates; siendo este autor incapaz de demostrar los astrocitos existentes en la capa de fibras del nervio óptico.

POLYAK (1941[177]), en un extenso estudio sobre la retina de los primates, establece que la neuroglia retiniana estaba constituida por las fibras radiales de Müller y por la neuroglia accesoria (astrocitos fibrosos, protoplásmicos y microglia); sin embargo, no encuentra oligodendrocitos, en contraposición a lo descrito por los anteriores autores (LÓPEZ ENRÍQUEZ, 1927[129]; BULÂC, 1931).

Los astrocitos fibrosos se localizaban en la papila, en la capa de fibras del nervio óptico y en la capa de células ganglionares, disminuyendo su número al alejarse de la papila. La morfología de estas células era equivalente a la de los astrocitos de otras regiones del S.N.C., aunque el grosor y la longitud de sus prolongaciones era menor. Las prolongaciones situadas en la capa de fibras del

nervio óptico presentaban escasos apéndices pudiendo llevar una dirección vertical u horizontal, sin embargo, otras prolongaciones podían extenderse hacia las capas nuclear interna y ganglionar, terminando de forma libre.

Los astrocitos protoplásmicos presentaban un cuerpo celular oval o irregular del que partían prolongaciones cubiertas de espinas hacia todas la direcciones. Algunas de estas prolongaciones podían relacionarse con la glia de Müller y con los vasos próximos. Los núcleos de estas células se localizaban en la plexiforme interna o en la capa ganglionar.

POLYAK, también observó astrocitos con morfología intermedia entre los dos tipos anteriores.

Por último, este autor, sólo encontró a las células microgliales en la capa plexiforme interna.

En 1952, FRIEDENWALD[74], manifestó que los estudios sobre la neuroglia retiniana a partir de la década de los 30 habían sido escasos, debido a que las técnicas histológicas convencionales o las impregnaciones argénticas existentes hasta ese momento no permitían una tinción completa de la neuroglia retiniana.

De tal forma, que SCHARENBERG (1952[213]), modificó el método del carbonato de plata de Del Río-Hortega, desarrollando una nueva variante para la

astroglia, que permitió una mejor impregnación de la neuroglia retiniana, tanto en condiciones normales como en patología.

Esta técnica fue modificada por WOLTER (1955a,1961[263,269]) para la realización de una serie de estudios muy extensos, enfocados únicamente en la astroglia de la retina humana (WOLTER, 1955-1961[263-269]). Este autor analizó los distintos tipos de astrocitos localizados en las diferentes capas retinianas, encontrando astrocitos bipolares (lemnocitos) en la capa de fibras del nervio óptico, y astrocitos estrellados en las capas ganglionar y plexiforme interna. Además, definió un nuevo tipo celular situado únicamente sobre los vasos sanguíneos al que denominó "glia perivascular".

LESSELL y KUWABARA (1963[120]) estudiaron los astrocitos retinianos de diferentes mamíferos (hombre, mono, rata, ratón, gato y conejo) utilizando diferentes técnicas argénticas, entre las que se encontraba la modificación de Scharenberg. Estos autores observaron, al igual que WOLTER[263,264], células bipolares o lemnocitos; sin embargo, además de en la capa de fibras del nervio óptico, también los describieron en la capa ganglionar y en la plexiforme interna.

Los astrocitos típicos del S.N.C. no fueron observados por LESSEL y KUWABARA, aunque en alguna ocasión encontraron alguna célula estrellada en

las retinas del hombre, gato y ratón, a nivel de la capa ganglionar y de fibras del nervio óptico, caracterizándose por sus escasas prolongaciones y por la ausencia de uniones vasculares. Sin embargo, determinaron un tipo celular cercano a las paredes de los vasos al que denominaron con el término de células "paravasculares", éstas presentaban únicamente una o dos prolongaciones, estando sus cuerpos celulares localizados muy próximos a los vasos.

Asimismo, observaron los astrocitos perivasculares descritos por WOLTER[265], únicamente en retinas patológicas humanas, por lo que pensaron, que estas células eran un rango de vejez o enfermedad.

Con respecto a la glia perivascular de Wolter, un nuevo autor, ERSKINE (1963[68]) se unió a la polémica de su existencia, al describirla sobre los vasos sanguíneos humanos, aunque advirtió que no se teñía selectivamente con el método del oro sublimado de Cajal. Además, contrariamente a lo expuesto por POLIAK (1942), sí observó oligodendroglia en la retina humana.

En 1968 WOLLF[262] realizó una clasificación de las células gliales retinianas considerando los siguientes tipos celulares:

- Fibras de Müller. Se extendían por toda la retina desde la limitante externa a la interna.

- Células en araña de Golgi. Localizadas en las proximidades del disco óptico.
- Glia perivascular. Situada sobre los capilares.
- Astrocitos: Células con morfología estrellada ubicadas en la capa ganglionar.
- Bandas horizontales de tejido glial. Localizadas en las capas de fibras del nervio óptico y nuclear interna.
- Microglia.

La glia "perivascular" de Wolter fue observada por DAICKER (1968[46]), en la retina humana patológica y, también por HONRUBIA y GRIJALBO (1970[93]) en la retina del gato. Estos últimos autores, al aplicar la tinción argéntica de GALLEGO (1953[75]), distinguieron dos tipos de células perivasculares: una que rodeaba los vasos de mayor calibre, y otra que se distribuía alrededor de los capilares.

OGDEN (1976[164]), al estudiar los astrocitos de la capa de fibras del nervio óptico de la retina de primates, utilizando la modificación de Colonier al método de Golgi-Kopsch (OGDEN, 1974[163]) observó dos tipos de células astrogliales: un tipo alargado, con prolongaciones que cruzaban los haces axonales sin mantener

contactos vasculares; y un tipo estrellado, con prolongaciones cortas que mantenían relaciones vasculares de forma ocasional. Además, este autor, detectó la presencia de abundante glia perivascular, pero no hizo mucha referencia a ella, ya que según él, era morfológicamente distinta a los astrocitos de la capa de fibras del nervio óptico sobre los que se centraba su estudio.

Finalmente, esta glia perivascular, también fue observada por TRIVIÑO y col. (1988[242]) sobre los vasos sanguíneos de la retina del conejo, empleando la misma tinción de plata utilizada inicialmente por WOLTER (1959a, 1961[263,269]) (la modificacón de Scharenberg al método del carbonato de plata de Del Río-Hortega).

El número de trabajos empleando las impregnaciones argénticas, se fue haciendo cada vez más escaso debido a la aparición de nuevos métodos histológicos como la microscopía electrónica o el marcaje inmunohistoquímico, que dieron un nuevo enfoque al estudio de la astroglia retiniana.

## 1.2.2.- TÉCNICAS DE MICROSCOPÍA ELECTRÓNICA EN EL ESTUDIO DE LA ASTROGLIA RETINIANA.

Los primeros trabajos realizados con microscopía electrónica sobre la neuroglia del S.N.C., estuvieron enfocados en el estudio de las características ultraestructurales que presentaban los distintos tipos de células neurogliales observadas mediante las impregnaciones argénticas. De tal forma, que los astrocitos fueron descritos como células que presentaban un núcleo ovoide con cromatina densa en las proximidades de la membrana nuclear, y citoplasma claro, con aparato de Golgi, retículo endoplásmico liso y rugoso, mitocondrias y partículas de glucógeno. Pero, la característica principal de estas células, era la presencia de un citoesqueleto constituido por escasos microtúbulos y abundantes filamentos intermedios gliales, distribuidos por todo el citoplasma hasta las prolongaciones. Además, también se puso de manifiesto los distintos rasgos ultraestructurales que diferenciaban a los astrocitos fibrosos y protoplásmicos. Los astrocitos fibrosos presentaban un citoplasma abundante, con numerosos gliofilamentos en el interior de sus prolongaciones anchas y rectilineas; mientras que, los astrocitos protoplásmicos poseían un citoplasma perinuclear escaso y los filamentos estaban más espaciados. También la heterocromatina delineaba la envuelta nuclear en los astrocitos protoplásmicos, estando más dispersa en los

astrocitos fibrosos. (LUSE, 1956[132]; DE ROBERTIS, 1959[51]; SCHULTZ, 1964[225]; VAUGHN, 1967[253]; WENDELL-SMITH, 1966[260]; SUAREZ, 1983[236]; PRIVAT, 1986[179]; ALVAREZ, 1991[8]).

A nivel retiniano, FINE (1961[70]), estudió la ultraestructura de la membrana limitante interna humana, observando que estaba constituida por una membrana basal de 0,5 $\mu$m., en la que se incrustaban las prolongaciones de la glia de Müller.

Sin embargo, en ese mismo año, COHEN (1961[34]), al realizar un estudio semejante en monos, observó que las prolongaciones gliales que constituían la membrana limitante interna, tenían una apariencia variable. Algunas prolongaciones eran bastante claras aunque presentaban un material fibroso en su interior y tenían pocas mitocondrias; mientras que, otras poseían gran cantidad de mitocondrias, una cantidad moderada de material fibroso y partículas densas numerosas.

Además, algunas de las prolongaciones gliales que formaban parte de esta membrana limitante interna tenían sus núcleos localizados a nivel de la capa de fibras del nervio óptico. Por lo tanto, este autor concluyó que a parte de la glia

de Müller existía otra variedad glial que también constituía esta membrana limitante.

Un año después, FINE y ZIMMERMAN (1962[71]), realizaron un estudio ultraestructural sobre la glia de Müller en la retina humana haciendo escasa referencia al resto de la astroglia retiniana, comentando únicamente que los astrocitos se localizaban en las zonas vascularizadas siendo menos numerosos que las células de Müller.

VILLEGAS (1964[255]), realizó un estudio sobre la astroglia retiniana humana, más exhaustivo que el anterior; observando como las prolongaciones gliales (tanto de astrocitos como de glia de Müller), se disponían rodeando por un lado a las fibras nerviosas, y por otro a los capilares.

Las más comunes eran largas y claras y pertenecían a la glia de Müller, mientras que otras, finas que terminaban en la membrana basal del capilar tenían su origen en células situadas a varias micras del vaso. Estas últimas prolongaciones parecían ser células gliales que presentaban un núcleo prominente rodeado de un anillo citoplasmático. Según este autor, las prolongaciones finas de estas células que terminaban a nivel vascular se correspondían con los pies vasculares observados en trabajos anteriores con microscopía óptica.

En este mismo año, 1964, MARCHESI y col.[136], al realizar un estudio sobre la actividad nucleosido fosfatasa en los vasos sanguíneos y glia de la retina de la rata, observaron que las células gliales se disponían casi directamente sobre la pared del vaso, existiendo un espacio extracelular muy escaso de 100 a 200 A entre ambos.

HOGAN en 1971[90] completó el estudio ultraestructural astroglial humano, centrándose en la determinación de las características de éstas células, describiendo que estaban constituidas por un núcleo con heterocromatina abundante y un citoplasma claro que contenía mitocondrias, retículo endoplásmico liso y rugoso, ribosomas y numerosas fibrillas finas que eran más abundantes en las prolongaciones celulares. Estas últimas podían terminar sobre los vasos sanguíneos, mientras que otras rodeaban a las neuronas, como ya expuso VILLEGAS (1964[255]).

Con respecto a la glia perivascular descrita por WOLTER[265,267,268] con impregnaciones metálicas, no observó ninguna diferencia ultraestructural entre los astrocitos retinianos que permitiensen hacer distinciones entre ellos.

En otras especies animales, como el conejo, TRIPATHI y ASHTON (1971[241]), observaron que a nivel de la membrana limitante interna existían

diferencias ultraestructurales con respecto a la de primates. Estos autores al estudiar las relaciones vaso-gliales en la retina de este animal encontraron que los vasos retinianos se localizaban a nivel del vítreo y estaban sujetos a la superficie retiniana por "tufos" de células gliales que hacían protusión hacia el vítreo. Estas prolongaciones presentaban fibrillas intracelulares semejantes al resto de las células gliales intrarretinianas.

WEIDMAN (1973[257]) determinó con estas técnicas que los cuerpos celulares de los astrocitos humanos se localizaban únicamente en la capa de fibras del nervio óptico y capa de células ganglionares, encontrándose, sin embargo, prolongaciones astrogliales en las capas nuclear interna y plexiforme interna, como ya había sido expuesto anteriormente por RAMÓN Y CAJAL (1911[192]) con impregnaciones argénticas.

Sin embargo, para IKUI y col. (1976[95]), los trabajos realizados hasta ese momento sobre la astroglia retiniana humana, usando la microscopía electrónica, sólo habían permitido un estudio detallado de la ultraestructura de los cuerpos celulares, fallando en la demostración de las relaciones citoarquitecturales que mantenían los astrocitos con otras estructuras retinianas.

Para solucionar este problema, estos autores, utilizaron el rutenio rojo para poder marcar selectivamente la glia de Müller distinguiéndola así de los astrocitos. Con este procedimiento, pudieron observar como los rasgos ultraestructurales generales de los astrocitos retinianos coincidían con los de los otros astrocitos del S.N.C. La principal característica de estas células era la presencia de prolongaciones que se empaquetaban densamente formando una malla interconectada que serviría para reforzar la malla capilar y sujetar a los elementos neuronales. Además, IKUI, al igual que HOGAN (1963b,1971[90,91]), no observó ningún tipo particular de célula astroglial que estuviera asociada únicamente con los capilares retinianos, teniendo todos los astrocitos los mismos rasgos ultraestructurales.

BÜSSOW (1980[29]), observa en las retinas del mono y del gato, la existencia de numerosas uniones tipo Gap entre los astrocitos.

OGDEN (1983[165]), al estudiar el contenido glial en la capa de fibras del nervio óptico del mono, observó que el área de haces nerviosos ocupados por glia era de un 20-30%, estando constituida la mayor parte de ella por células de Müller.

La ultraestructura de la capa de fibras del nervio óptico también fue estudiada en embriones humanos (RHODES, 1984[200]). Estos estudios pusieron de manifiesto que a las 13 semanas de gestación ya se podían observar prolongaciones gliales sobre los vasos sanguíneos cerca del disco óptico, y a las 20 semanas se podían diferenciar en su interior filamentos intermedios y glucógeno. Finalmente, a las 21 semanas de gestación, estas prolongaciones gliales se localizaban por todo el polo posterior.

Como podemos observar, la mayoría de los estudios ultraestructurales realizados sobre la astroglia retiniana han sido realizados en primates (incluido el hombre). Sin embargo, encontramos algunos trabajos centrados en el estudio de la capa de fibras del nervio óptico del conejo.

Este animal, como expuso TRIPATHI (1971[241]) tiene una capa de fibras del nervio óptico que difiere de la de primates. De JUAN y col. (1986[49]), al igual que TRIPATHI, observaron que los vasos intravítreos de la retina del conejo estaban rodeados por tejido glial. Además los "tufos" gliales no se observaban en las zonas avasculares de la retina. Estos autores en contraposición a los expuesto por TRIPATHI, si observaron vasos de localización intrarretinal en el área de los radios medulares de la retina del conejo.

Además REICHENBACH y col. (1988)[198] demostraron que en la capa de fibras del nervio óptico, en la zona de los radios medulares, las fibras nerviosas estaban mielinizadas encontrándose a parte de astrocitos, oligodendrocitos, prolongaciones vítreas de la glia de Müller y vasos sanguíneos. Estos autores expusieron que las prolongaciones de las células de Müller y de los astrocitos podían diferenciarse por el grosor y dirección de sus filamentos intermedios, que eran de $\approx$ 7 $\mu$m. en las células de Müller y de $\approx$ 10 $\mu$m. en los astrocitos.

Las prolongaciones de ambas células gliales participaban en especializaciones semejantes a los nodos de Ranvier en las fibras nerviosas; siendo, sin embargo, los astrocitos los que se encargaban principalmente de las relaciones con los vasos sanguíneos.

En la retina periférica REICHENBACH y col. observaron que desaparecían los astrocitos, los oligodendrocitos, y los vasos sanguíneos.

El equipo de PENFOLD, PROVIS y col. (PENFOLD, 1990[174]; PROVIS, 1991[180]) estudiaron la angiogénesis en el desarrollo de la retina humana, observando al igual que anteriormente RHODES (1984[200]), que los astrocitos se encontraban en relación con la superficie externa de la matriz del colágeno, tanto de los vasos maduros, como de los inmaduros, sugiriendo que las prolongaciones astrogliales formaban parte del desarrollo del complejo vascular

en una etapa temprana del desarrollo, coindiendo con la apertura del lumen capilar.

Por último, HOLLÄNDER y col. (1991[92]), realizaron un estudio sobre la estructura de los astrocitos y la glia de Müller de la retina del gato; observando que existían diferencias entre los astrocitos y las células de Müller en relación a la densidad de su citoplasma.

La glia de Müller presentaba un citoplasma oscuro y se orientaba radialmente, mientras que los astrocitos eran claros y su soma se localizaba en la superficie interna de la retina. Ambos tipos celulares participaban en la formación de la membrana limitante interna de la retina, en la constitución de las limitantes gliales vasculares, en el recubrimiento glial de los somas neuronales y en el recubrimiento glial de los segmentos iniciales y especializaciones equivalentes a los nodos de los axones.

La glia de Müller según estos autores contribuiría más en la formación de las limitantes gliales y en el recubrimiento de los somas neuronales, mientras que los astrocitos serían más abundantes en el recubrimiento de los segmentos inciales y en las especializaciones equivalentes a los nodos de los axones.

Además HOLLÄNDER y col. (1991[92]) observaron dos tipos de uniones celulares entre las células gliales. Las uniones adherentes que se encontraron entre

células de Müller, entre astrocitos y entre astrocitos y células de Müller, y las uniones gap que sólo se encontraron entre astrocitos.

Todo esto hizo pensar a estos autores, que los astrocitos y la glia de Müller tendrían en muchas ocasiones funciones semejantes por lo que sugirieron que ambos tipos celulares eran variantes macrogliales.

## 1.2.3.- TÉCNICAS INMUNOHISTOQUÍMICAS EN EL ESTUDIO DE LA ASTROGLIA RETINIANA.

### 1.2.3.1.- CONCEPTOS GENERALES SOBRE LAS TÉCNICAS INMUNOHISTOQUÍMICAS.

Los métodos tradicionales de tinción de la neuroglia (impregnaciones argénticas), además de incostantes, no eran totalmente selectivos; esto era debido a la gran cantidad de factores que influían sobre la impregnación, por ejemplo, el tiempo de fijación, el pH del fijador, la composición del reactivo argéntico y la temperatura (TOLIVIA, 1975[239]). Por lo tanto, estas técnicas fueron sustituidas

casi de forma exclusiva por otras, que permitían marcar de una forma más selectiva el objeto a estudiar.

Estas nuevas técnicas denominadas "inmunohistoquímicas" fueron introducidas por Coons en 1941 (ESQUERDA, 1991[69]), quién se basó en la especificidad de las reacciones antígeno-anticuerpo para marcar determinados antígenos tisulares mediante uso de anticuerpos acoplados a trazadores fluorescentes.

Posteriormente, NAKANE y PIERCE (1966[152]) y NAKANE (1968[153]), desarrollaron una variante de esta técnica al introducir un método inmunoenzimático, siendo la peroxidasa de rábano el trazador más usado.

En rasgos generales, el método inmunohistoquímico indirecto consiste (PRIESTLEY, 1987[178]) en la unión de un antígeno tisular con un anticuerpo obtenido específicamente contra éste en un determinado animal huésped (Anticuerpo primario, Ac.1). A su vez, se obtiene un anticuerpo secundario (Ac.2) mediante la inyección de proteína del animal huésped en otra especie animal diferente.

El Ac.1 reacciona con el antígeno, uniéndose específicamente a él, y posteriormente se une el Ac.2. En este punto, el antígeno puede ser puesto de manifiesto por dos métodos:

- *Método de inmunofluorescencia* (PRIESTLEY, 1987[178]): El Ac.2 se conjuga con un marcador fluorescente como por ejemplo la fluoresceína isocianato (FITC) o el tetrametil rodamina isocianato (TRICT), y el antígeno marcado puede observarse mediante un microscopio de fluorescencia.
- *Método de la peroxidasa-antiperoxidasa (P.A.P.)* (STERNBERGER, 1970[232]; PRIESTLEY, 1987[178]). Se necesita un anticuerpo terciario (Ac.3) o complejo P.A.P., que se consigue ligando peroxidasa a un anticuerpo contra la peroxidasa desarrollado en un animal de la misma especie en el que se desarrolló el Ac.1.

  La P.A.P. se unirá por lo tanto al Ac.2, poniéndose de manifiesto mediante la adición de un cromógeno (generalmente 3'3-diaminobencina (DAB)) que reacciona con la peroxidasa. El antígeno puede observarse, entonces, mediante un microscopio óptico.

## 1.2.3.2.- MARCADORES ASTROGLIALES.

En las células astrogliales se han encontrado distintos antígenos que pueden ser utilizados como marcadores celulares, mediante el uso de las técnicas inmunohistoquímicas, al desarrollar anticuerpos contra éstos. Los más importantes son, el anticuerpo contra la proteína gliofibrilar ácida (PGFA), anti proteína S100, anti glutamina-sintetasa, anti monoamino-oxidasa, y anti-GABA. Aunque también se han utilizado otros anticuerpos de forma más esporádica como los dirigidos contra las proteínas asociadas a microtúbulos (anti $MAP_2$, anti $MAP_4$), o como el anti A2B5, y el anti J1-31, entre otros.

### * Proteína gliofibrilar ácida.

Las fibras intracitoplásmicas, que se teñían de forma específica mediante métodos especiales de tinción, representan un rasgo distintivo de la mayoría de los astrocitos; y como ya se ha visto anteriormente, a microscopía electrónica estas fibras están constituidas por filamentos de 8-10 nm. de diámetro denominados "filamentos intermedios gliales" (LAZARIDES, 1980[118]).

Un rasgo característico de las células astrogliales es la capacidad para formar fibras bajo condiciones patológicas (gliosis reactivas). Aprovechando esta condición, ENG y col. en 1971[66], a partir de tejidos con gliosis fibrosa (placas de esclerosis múltiple) aislaron una proteína ácida de 42.000 dalton que era el componente principal de este tejido patológico, afirmando estos autores, que esta proteína ácida era el constituyente principal de los filamentos intermedios de los astrocitos.

Un año después, UYEDA, ENG y BIGNAMI (1972[248]), produjeron, en conejos, anticuerpos específicos contra esta proteína, observando que el anti-PGFA, reaccionaba con extractos de cerebro humano, tanto normales como patológicos, no estableciendo reacciones cruzadas con otros órganos y tejidos incluidos los nervios periféricos.

Posteriormente, al perfeccionarse los métodos de aislamiento de los filamentos del cerebro, se pudieron separar proteínas de 50.000 dalton (DAVISON, WILSON, 1974[48]). En un principio se asumió que esta proteína tenía un origen neuronal, ya que se obtuvo a partir de preparaciones de axones mielinizados, y además el peso molecular de esta proteína difería de la descrita por ENG y col. (1971[66]) en los filamentos gliales.

Sin embargo, la identificación de la proteína de 50.000 dalton como un neurofilamento fue cuestionada por las siguientes observaciones:

- En estudios sobre transporte axonal, observaron que las proteínas transportadoras eran la tubulina, la actina, y un triplete de proteínas de pesos moleculares de 70.000, 150.000 y 200.000 daltons (que se identificaron como neurofilamentos), pero no se encontró ningún polipéptido transportador de peso molecular de 50.000 (LAZARIDES, 1980[118]).
- Estudios posteriores, realizados sobre los filamentos gliales, revelaron que éstos tenían un peso molecular mayor que el que había sido definido previamente por ENG en 1971[66], y que mostraban grandes similitudes inmunológicas y bioquímicas con la proteína de los filamentos neuronales del cerebro (YENG, 1981[271]).
- Los anticuerpos producidos contra la proteína de 50.000 daltons no marcaban neuronas, lo que confirmaba la incorporación incorrecta de esta proteína dentro del grupo de los filamentos intermedios.

Por lo tanto, finalmente, se identificó a la proteína de 50 kd., como la subunidad constituyente de los filamentos gliales (LIEM, 1978,1981[122,123]).

Esta proteína gliofibrilar ácida tiene pocas variaciones a lo largo de la línea evolutiva de los vertebrados. El anticuerpo contra la PGFA desarrollado en humanos, reacciona con la PGFA del Sistema Nervioso de teleosteos, anfibios, reptiles y aves (SASSOE, 1992[211]); sin embargo, este antígeno no ha sido detectado en el S.N.C. de las lampreas, ni en los ganglios de los invertebrados (DAHL, 1985,1986[43,44]).

Como hemos podido observar, el anti-PGFA es un buen marcador de las células astrogliales, al teñir selectivamente los astrocitos de las distintas especies de mamíferos (BIGNAMI, 1972[16]; GHANDOUR, 1979[76]).

Sin embargo, otros estudios han encontrado inmunoreactividad PGFA(+) fuera del S.N.C. Así se ha observado que la glia periférica es PGFA(+) al encontrarse inmunoreactividad en los nervios periféricos (BIGNAMI, 1977[17]; YEN, 1981[271]; DAHL, 1982b[42]); en el sistema nervioso entérico (JESSEN, 1980,1984[97,98]; BJÖRKLUND, 1984b[20]); en el iris (BJÖRKLUND, 1984a,1985a[19,21]; RAMÍREZ, 1989[187]); en la coroides (RAMÍREZ, 1989,1990[187,188]; TRIVIÑO, 1989[243]); y en las células satélites del ganglio simpático (ALVAREZ, 1989[7]).

En general, la inmunoreactividad PGFA(+) en el Sistema Nervioso Periférico

(S.N.P.) está restringida a las células de Schwann no formadoras de mielina, que presentan un citoesqueleto con filamentos de 10 nm. semejantes a los de las células astrogliales del S.N.C. (JENSSEN, 1984; DAHL, 1982b[42]).

MOKUNO y col. (1989[146]) intentaron dar una explicación del por qué se marcaban las células de Schwann mediante el anti-PGFA. Estos autores observaron que el ARNm del "PGFA" de las células de Schwann del nervio ciático de la rata, era similar tanto en secuencia como en tamaño al ARNm del PGFA del S.N.C. Esta similitud entre ambos sugirió que estos péptidos estarían transcritos por el mismo gen, y que las diferencias inmunogénicas existentes entre ambos PGFAs serían el resultado de un patrón alternativo de fosforilación o de procesos translacionales de estos péptidos.

Además se ha encontrado inmunoreactividad PGFA(+) en el epitelio del cristalino (HATFIELD, 1984[83]; BJÖRKLUND, 1985b[22]), y en los condroblastos de los cartílagos fetales (KASPER, 1990[104]).

En el primer caso, la inmunoreactividad PGFA(+) es explicada porque las células del epitelio del cristalino son derivados ectodérmicos y tienen, al igual que los astrocitos, abundantes filamentos intermedios en su citoplasma; mientras que, en el segundo caso, puede ser debida a cambios en la expresión de los filamentos

intermedios durante la ontogénesis (KASPER, 1990[104]), o a la similitud de proteínas de la matriz extracelular del cartílago con la proteína GHA (proteína glial unida a hialuronatos) específica de la sustancia blanca, que presenta un patrón de tinción similar a la PGFA en la sustancia blanca, y que se ha sugerido que puede ser producida por los astrocitos.

*** La proteína S-100 como marcador astroglial.**

La proteína S-100 (denominada así por su solubilidad en sulfato amónico al 100%), es una proteína ácida que fue aislada de cerebros de vacas, y que es muy abudante en el Sistema Nervioso de mamíferos (TERENGHI, 1983[237])

En un principio se observó que presentaba un peso molecular de 23.000 y estaba constituida por dos polipéptidos; sin embargo, se ha establecido en la actualidad que en realidad está constituida por una familia de proteínas con diversos pesos moleculares (MOLNAR, 1985[148]) pertenecientes al grupo de proteínas relacionados con el calcio.

La similitud de la S-100 con la calmodulina ha conducido a pensar que esta proteína podría jugar un papel importante en la transducción de los efectos de las alteraciones de las concentraciones de calcio intracelulares (MATA, 1990[139]).

Los estudios inmunohistoquímicos realizados con anticuerpos contra esta proteína han demostrado que se localiza principalmente en el citoplasma de las células gliales (sobre todo de los astrocitos), en las membranas y núcleos de las neuronas, en las células de Schwann (MATA, 1990[139]); en las células de la médula suprarrenal, algunas células de la adenohipófisis (VAQUERO, 1987[251]); e incluso en las células de Langerhans (MADDOX, 1987[134]).

Además, como indican algunos autores (DAHL, 1986[44]), el anticuerpo contra la proteína S-100 marcaría mejor los cuerpos celulares de los astrocitos que el anti-PGFA, aunque, sin embargo, se visualizarían peor las prolongaciones (DAHL, 1986[44]).

A nivel retiniano, el anti S-100, marca selectivamente la glia de Müller en la rata, cobaya y hámster (COCCHIA, 1983[33]; TERENGHI, 1983[237]); mientras que en el conejo, además de las células de Müller también marca los astrocitos (MOLNAR, 1985[148]; SCHNITZER, 1987a[218]).

Sin embargo, en la retina humana no se ha podido detectar esta proteína en condiciones normales, pero ante una situación patológica inflamatoria (ej. uveitis), la glia de Müller se tiñe selectivamente con el anti S-100, por lo que esto puede indicar que esta proteína juega un posible papel en procesos retinianos inmunopatológicos (BenEZRA y CHAN, 1987[14]).

Además, también se ha encontrado en otras situaciones patológicas humanas, formando parte de inclusiones gliales en cerebros con malformaciones (KATO, 1992[105]); como también en tumores de células procedentes de la cresta neuronal, por lo que el anti S-100 es un marcador útil en determinadas situaciones patológicas (MESSMER, 1984[140]).

*** La vimentina como marcador astroglial.**

La vimentina fue caracterizada como un filamento intermedio de 52.000-55.000 de pm, aislado en los fibroblastos de embriones de pollo (LAZARIDES, 1980[118]).

El anticuerpo contra la vimentina reacciona contra antígenos localizados en diferentes clases de vertebrados (mamíferos, aves y anfibios), lo que indica que esta proteína está bastante conservada en la evolución.

Los filamentos de vimentina se agrupan en haces que se disponen rodeando al núcleo a modo de anillo, por lo que se piensa que tienen un papel de soporte mecánico (LAZARIDES, 1980[118]).

Esta proteína se ha encontrado en las células endoteliales, musculares, fibroblastos, macrófagos, condrocitos, células linfoides, células epiteliales y en los astrocitos (VAQUERO, 1987[251]).

Los filamentos de vimentina coexisten con los de PGFA en los astrocitos del cerebro, médula espinal (DAHL, 1981[40]), nervio óptico (CALVO, 1990[30]) y retina (ROBINSON, 1989[206]).

En el embrión, los astrocitos expresan principalmente vimentina, pero durante la ontogénesis existe una transición de la expresión de vimentina a PGFA, siendo ésta última la que se expresa mayoritariamente en el adulto (PIXLEY, 1984[176]; QUITSCHKE, 1985[183]; SCHNITZER, 1988a,c[220,222]).

Sin embargo, ante situaciones patológicas, como en la enfermedad de Alzheimer, esclerosis múltiple, enfermedad de Pick, etc., la expresión de vimentina aumenta considerablemente en los astrocitos cerebrales (fibrosos y protoplásmicos), los cuales se tiñen intensamente con anti-vimentina (YAMADA, 1992[270]).

Además de los astrocitos, en la retina existen otras dos células que se marcan con la anti-vimentina: por un lado las células horizontales de peces (VAUGHAN, 1990[252]), conejos (SCHNITZER, 1985[216]) y gatos (SHAW, 1984[230]); y por otro,

la glia de Müller.

Estas últimas, aunque son consideradas como células gliales, solamente expresan vimentina y no PGFA, tanto en el desarrollo como en el animal adulto (SHAW, 1984[230]; SCHNITZER, 1985,1988c[216,222]; ROBINSON, 1989,1990[206,207]; VAUGHAN, 1990[252]). Sin embargo, ante situaciones patológicas pueden expresar PGFA y vimentina (BIGNAMI, 1979[18]; ERICKSON, 1987[67]; EKSTRÖM, 1988[65]; OKADA, 1990[167]).

*** Otros marcadores astrogliales.**

Se han utilizado de forma minoritaria otros anticuerpos para marcar las células astrogliales. Así podemos destacar:

- Los anticuerpos contra las proteínas asociadas a microtúbulos (MAP 2 y MAP 4), que pueden marcar los astrocitos, además de los oligodendrocitos, la glia de Müller y glia de Bergman (PAPASOZOMENOS, 1986[169]; PARYSEK, 1985[170]).
- El anticuerpo J1-31, que se une a una proteína astrocítica de 30.000 dalton, que es específico para el marcaje de los astrocitos pineales (SCHRÖDER, 1987[224]).

- El anticuerpo contra desmina (que es un filamento intermedio de las células musculares) también puede marcar astrocitos y glia de Müller como han demostrado los estudios realizados por DAHL y col. (1982a,1989[41,45]).

Además se han utilizado anticuerpos contra determinadas enzimas implicadas en el metabolismo de neurotransmisores relacionados con los astrocitos como son:

- el anti glutamato-sintetasa, que marca selectivamente los astrocitos cerebrales (NORENBERG, 1979[161])
- el anti monoamino-oxidasa, que marca los astrocitos y las neuronas serotoninérgicas del cerebro (LEVITT, 1982[121])
- el anti-GABA (ácido GAMMA-amino-butírico), que marca los astrocitos del nervio óptico de la rata en desarrollo (SAKATANI, 1992[210]; LAKE, 1992a[112]), así como los astrocitos del hipocampo del jerbillo en situaciones patológicas como la isquemia cerebral (LIN, 1993[125]).

Y por último, se ha empleado el anticuerpo A2B5, derivado de la unión de células de mieloma de ratón con esplenocitos de ratones inmunizados con células retinianas de pollo, que se une a antígenos similares o idénticos a ganglíosidos (SCHNITZER, 1982[215]). Con este anticuerpo se ha podido marcar un tipo de

astrocito en cultivos de células de nervio óptico, permitiendo diferenciar dos estirpes astrocitarias en este tejido: los astrocitos tipo 1 (A2B5-) y los tipo 2 (A2B5+) (MILLER, 1984,1989[143,144]; RAFF, 1984[184]; MINTURN, 1990[145])

## 1.2.3.3.- LAS CÉLULAS ASTROGLIALES DE LA RETINA DE LOS MAMÍFEROS.

### A) Morfología y distribución de los astrocitos retinianos de mamíferos no primates.

Una vez caracterizados los mejores marcadores de las células astrogliales, se comenzaron a realizar estudios morfológicos de los astrocitos en las distintas regiones del Sistema Nervioso utilizando las técnicas inmunohistoquímicas.

A nivel retiniano, la mayoría de los trabajos fueron hechos en animales de experimentación entre los que podemos destacar, el conejo, la rata y el gato.

*** Astrocitos de la retina del conejo.**

Aunque en 1984 SHAW y WEBER[230], utilizando el anti-PGFA no fueron capaces de teñir los astrocitos de la retina del conejo, se ha comprobado en trabajos posteriores realizados por diversos autores, que éstos son abundantes y que presentan una gran diversidad morfológica.

Así SCHNITZER (1985,1986,1988a,b[216,217,220,221]; SCHERER, SCHNITZER (1989[217])) estudia la astroglia de la retina del conejo, observando que estas células se localizaban sólo en dos zonas de la retina que se denominaban "radios medulares", únicas zonas vascularizadas.

Este autor, utilizando montajes planos de retina, encuentra dos grupos principales de astrocitos PGFA(+): unos, relacionados principalmente con los axones de las células ganglionares; y otros, asociados al sistema vascular.

Los astrocitos relacionados con los axones presentaban una gran diversidad de formas, que variaban entre dos tipos morfológicos extremos: uno, alargado y con alta inmunoreactividad PGFA(+); mientras que el otro tipo, era más estrellado, con una menor inmunoreactividad. Este grupo de células astrogliales alineaban sus prolongaciones con las de los axones de las células ganglionares, pudiendo, en ocasiones, hacer contactos con algunos capilares.

Los astrocitos relacionados con el sistema vascular presentaban dos formas

distintas. Unos tenían el cuerpo celular sobre la pared del vaso sanguíneo y poseían gruesas prolongaciones PGFA(+) que envolvían y abrazaban al vaso, siendo equivalentes a la glia perivascular descrita por WOLTER[265] con impregnaciones argénticas. Mientras que el segundo tipo era estrellado, y emitía prolongaciones finas hacia los vasos, estando su cuerpo celular situado a cierta distancia de éstos. Estas células tenían una escasa inmunoreactividad PGFA(+).

Además, al estudiar el desarrollo postnatal de los astrocitos retinianos en este animal (SCHNITZER, 1988a,c[220,222]), encontró células PGFA(+) antes de que aparecieran los vasos sanguíneos, por lo que sugiere que los astrocitos en el conejo no co-emigran con las células endoteliales de los vasos sanguíneos desde el nervio óptico; postulando, que estas células podrían derivar de progenitores neuroepiteliales o que podrían invadir la retina desde la cabeza del nervio.

STONE y DREHER (1987[235]), utilizando nuevamente anti-PGFA en montajes planos de retina, confirmaron que los astrocitos de la retina del conejo se localizaban únicamente en la región de los radios medulares; observando cómo los astrocitos mostraban una gran afinidad por los axones de las células ganglionares extendiéndose a lo largo de ellos. Además, rodeando los vasos de mayor calibre encontraron arcos de fibras PGFA(+), pero que debido a su gran densidad, no les fue posible localizar los cuerpos celulares, y contrariamente a lo

expuesto por SCHNITZER[220,221], no lograron confirmar la presencia de la glia perivascular.

REICHENBACH (1987[197]) también hizo referencia a la inexistencia de astrocitos fuera de los radios medulares, observando además, que la densidad astroglial aumentaba hacia las proximidades del disco óptico, y como consecuencia también la proporción glia-neurona.

Sin embargo, ROBINSON y DREHER (1989[206]), encontraron tres clases morfológicas de astrocitos, en vez de las dos descritas por SCHNITZER (1985[216]). En un primer grupo, al que denominaron clase A, englobaron a los astrocitos perivasculares, semejantes a los descritos por WOLTER[265,267]. La clase B estaba constituida por astrocitos territoriales que raramente contactaban con los vasos o con los axones. Finalmente, en la clase C, se englobaron cuatro poblaciones distintas de astrocitos, los cuales se asociaban principalmente con los axones.

Por último, TRIVIÑO y col. (1990,1992[244,246]), confirman la existencia de los dos grupos principales de astrocitos: los relacionados con los axones de las células ganglionares, y los relacionados con el sistema vascular o astrocitos

perivasculares.

Los astrocitos relacionados con los axones fueron divididos en tres subgrupos:

- Astrocitos con prolongaciones gruesas. Células que poseían una alta inmunoreactividad PGFA(+) y cuyas ramificaciones constituían haces de prolongaciones astrogliales.
- Astrocitos de prolongaciones delgadas: Células que presentaban baja inmunoreactividad y morfología estrellada.
- Astrocitos intermedios. Células con una apariencia intermedia entre las dos anteriores y una alta inmunoreactividad.

Con respecto a los astrocitos relacionados con el sistema vascular, describen tres tipos:

- Astrocitos tipo I. Células que se localizaban sobre los vasos de tamaño mediano y en los capilares, y que presentaban una alta inmunoreactividad PGFA(+). Estos astrocitos eran equivalentes a los "perivasculares" descritos por WOLTER[265] y a los observados por SCHNITZER (1985,1988b[216,221]) y ROBINSON (1989[206]).
- Astrocitos tipo II. Células estrelladas con un cuerpo celular que se alargaba formando un cono basal del que derivaban las prolongaciones que se dirigían hacia las paredes de los vasos medianos y grandes. Poseían una alta inmunoreactividad PGFA(+).

- Astrocitos tipo III. Células estrelladas, cuyas prolongaciones derivaban directamente del pericarion. Tenían una baja inmunoreactividad PGFA(+) y sus prolongacioes se conectaban entre sí para formar una malla dispuesta entre los capilares.

*** Astrocitos de la retina de la rata.**

Los trabajos puramente morfológicos realizados en este animal son escasos, centrándose la mayoría de ellos en el estudio del desarrollo de estas células y en los cambios que se producen después de una degeneración del nervio óptico.

Así, DIXON y ENG (1981[61]), al estudiar la distribución de la proteína GFA en el desarrollo del nervio de la rata, utilizando secciones transversales de retina, observaron que en el nacimiento, la inmunoreactividad era escasa y estaba confinada a unas células pobremente diferenciadas en los tejidos internos retinianos próximos al disco óptico. Entre los 0-30 días después del nacimiento, las células PGFA(+) se extendieron desde el disco óptico hacia la retina adquiriendo la apariencia de astrocitos fibrosos. A partir de los 30 días, los cuerpos celulares de estos astrocitos se localizaban casi de forma exclusiva en la región comprendida entre la capa de fibras del nervio óptico (F.N.O.) y la

membrana limitante interna (M.L.I.). Las prolongaciones de estas células terminaban en forma de pies vasculares sobre los vasos sanguíneos, o se extendían en una menor proporción hacía los fascículos axonales de la capa de fibras del nervio óptico (F.N.O.).

Además en esta etapa se encontró una segunda población de células PGFA(+), semejante a la glia perivascular de WOLTER[265], que se localizaron sobre los vasos próximos al disco óptico en los animales jóvenes, y se extendían hacia los vasos de la porción interna de la capa plexiforme interna en los animales adultos.

Trabajos similares realizados por SHAW y WEBER (1983,1984[229,230]), pusieron de manifiesto, al igual que los autores anteriores, que el PGFA se detectaba primero en el nacimiento en una zona de la M.L.I. próxima al disco óptico; mientras que, en el adulto estas células se localizaban paralelas a la M.L.I. Estos autores no hicieron referencia a la glia perivascular.

Sin embargo, BJÖRKLUND, BIGNAMI y DAHL (1985a[21]), al estudiar los astrocitos retinianos con anti PGFA en montajes planos y cortes histológicos, observaron que en el animal adulto los astrocitos se localizaban tanto en la capa de F.N.O. como en la capa de células ganglionares. En los cortes histológicos

pudieron poner de manifiesto que estas células mantenían relaciones con los vasos sanguíneos.

BAKER y PERRY (1985[12]), demostraron que los astrocitos formaban una malla regular a través de la superficie de la retina de la rata. Estas células se localizaban adyacentes a la M.L.I. y mandaban prolongaciones que acababan en pies vasculares sobre la superficie de los vasos.

Estos autores, además quisieron determinar si el patrón de distribución de los astrocitos dependían del de las células ganglionares, para ello, seccionaron el nervio óptico en el día del nacimiento, con lo que se produjo una rápida degeneración de las células ganglionares. Sin embargo, la pérdida de estas células no tenía efectos significativos sobre la distribución de los astrocitos o sobre el patrón vascular, observando únicamente que había una reducción en el número de capilares de la plexiforme interna; por el contrario, si se realizaban lesiones directamente en determinadas zonas retinianas sí se producían cambios dramáticos en la distribución de los astrocitos y sus prolongaciones, monstrándose inalterada la suplencia vascular.

En contraposición a lo expuesto por estos autores (BJÖRKLUND, 1985a,b[21,22]), STONE y DREHER (1987[235]) observaron que los astrocitos

únicamente se localizaban en la capa de F.N.O., extendiéndose desde el disco óptico (donde eran más abundantes) hacia la periferia (donde eran más escasos). Morfológicamente estas células presentaban un aspecto estrellado semejante a los de tipo fibroso descritos en el cerebro.

Además, las células astrogliales mostraban una afinidad por los vasos sanguíneos ya que mandaban prolongaciones hacia éstos para rodearlos. Estas prolongaciones eran más abundantes en los vasos de mayor tamaño que en los capilares, no existiendo diferencias entre arterias y venas. Sin embargo, los astrocitos no mostraban afinidad por los haces de axones, sólo en las proximidades del disco óptico, donde los haces de axones eran gruesos, existían cierta tendencia de los astrocitos por seguir el trayecto axonal. Además, tampoco rodeaban a las células ganglionares o a otras células nerviosas, y esto era debido a su confinamiento en la capa de F.N.O.

Por último, RUNGGER-BRÁNDLE y MESSERLI (1992[209]), confirmaron las descripciones anteriores sobre la morfología de los astrocitos retinianos de la rata utilizando la microscopía confocal. Estos autores determinaron que la interdigitación y superposición de las prolongaciones astrogliales formaban una malla. Sin embargo, sí observaron cierta afinidad de estas células por los axones, ya que encontraron que existían gran cantidad de astrocitos próximos a los vasos

sanguíneos que mandaban prolongaciones, por un lado al propio vaso, y por otro hacia los fascículos axonales alineándose con ellos, por lo que estas células comunicaban vasos y axones.

*** Astrocitos de la retina del gato.**

Los primeros trabajos morfológicos e inmunohistoquímicos sobre los astrocitos de la retina del gato fueron realizados por KASCHING, WÁSSLE y SCHNITZER (1986a,b[101,102]) y SCHNITZER (1988b[221]).

Estos autores observaron que los astrocitos PGFA(+) monstraban una gran variabilidad con respecto al patrón de ramificación de las prolongaciones dependiendo de su posición retiniana, por lo que describieron dos tipos morfológicos muy diferentes.

En la retina periférica, donde había una menor densidad astroglial, los astrocitos presentaban una forma muy estrellada; sin embargo, en la retina central, las prolongaciones de los astrocitos se alineaban en paralelo con los axones de las células ganglionares, siendo mucho más largos. También pudieron observar formas transicionales entre los dos tipos morfológicos anteriores. Las prolongaciones de los astrocitos alargados se alineaban en su mayor parte en

gruesos haces para formar una malla astroglial muy característica.

Con respecto a su distribución, los autores observaron que los astrocitos se disponían formando un mosaico muy regular en la retina periférica, mientras que en el área central formaban haces en arco que rodeaba la zona macular, estando ausentes en esta última región.

Los astrocitos eran más abundantes a nivel de la cabeza del nervio óptico, descendiendo su número hacia la ora serrata.

Para estudiar la correlación entre las fibras del nervio óptico y los astrocitos, KARSCHING y col. (1986b[102]), fotocoagularon las proximidades del disco óptico provocando la degeneración de las células ganglionares. En la retina dañada, las prolongaciones de los astrocitos perdían la alineación con los axones adquiriendo una morfología estrellada, semejante a la de los astrocitos de la retina periférica; además, la densidad astrocitaria descendía hasta un 50% en la zona de la lesión y un 80% en la periferia de ésta. Por todas estas razones, los autores concluyeron que la morfología y el número de astrocitos variaban en función de su proximidad a los axones de las células ganglionares y de la densidad de éstos.

Trabajos posteriores confirmaron las descripciones morfológicas de la retina del gato expuestas por estos autores (KARSCHING, 1986a,b[101,102]). Así, STONE

y DREHER (1987[235]) en un estudio comparativo de la astroglia retiniana de diferentes especies animales verificaron la existencia de dos tipos morfológicos extremos y la distribución de éstos en la retina del gato. Además estos autores añadieron que los astrocitos mandaban prolongaciones hacia los vasos de mayor tamaño, mientras que los capilares carecían de ellas. También, determinaron que los astrocitos se relacionaban con los haces axonales pero no con los cuerpos celulares de las células ganglionares.

La relación de los astrocitos con los vasos sanguíneos y con los haces axonales fue observada en el desarrollo embrionario por LING y STONE (1988[127]). Estos autores determinaron que en el gato, como ya se hizo con anterioridad en la rata, los astrocitos aparecían primeramente en el disco óptico (en el día embrionario 53), y de forma subsiguiente se extendían hacia la retina, localizándose en el margen de ésta en el día 35 postnatal. Durante el desarrollo, las células PGFA(+) que se situaban próximas al disco óptico se relacionaban, por un lado con los vasos, y por otro con los haces axonales.

En las zonas periféricas se asociaban con la, todavía inmadura, malla capilar. Por el contrario, estaban ausentes en el área central, como ya había sido observado en el animal adulto.

Como conclusión, estos autores, postularon que los astrocitos de la retina del

gato migraban desde el disco óptico, manteniendo una relación estrecha con la formación de la vascularización retiniana.

Posteriormente estos mismos autores realizaron un estudio para determinar si la migración de los astrocitos dentro de la retina dependía de los vasos sanguíneos o de los axones (CHAN-LING y STONE, 1991a[36]). Para ello provocaron la degeneración de los axones de las células ganglionares lesionando el nervio óptico en el nacimiento, observando que los astrocitos se extendían de forma normal en la retina, por lo que sugirieron que la extensión de los astrocitos no dependía de la supervivencia de los axones. Por otra parte examinaron las retinas de animales mantenidos en una atmósfera con un 70-80% de oxígeno, en donde los vasos sanguíneos no podían formarse, y observaron que el área de distribución de astrocitos era normal, postulando que la distribución de estas células no dependía de los vasos sanguíneos visibles.

Sin embargo, estos resultados negativos condujeron a que se comparara la distribución de las células precursoras de la vascularización (células en huso) y los astrocitos en desarrollo, observando una estrecha correspondencia en cuanto a localización y distribución de ambas células, por lo que los autores sugirieron que las células en huso serían los encargados de guiar la migración de los astrocitos.

Un estudio posterior (JIANG, 1993[99]), por el contrario ha sugerido que son los astrocitos los encargados de modular: el crecimiento, el fenotipo estructural y la producción de fibronectina de las células endoteliales microvasculares retinianas.

Los factores que podrían determinar la morfología y distribución de los astrocitos de la retina del gato fueron estudiados por CHAN-LING y STONE (1991a,b[36,37]). Estos autores propusieron, que la distribución de los astrocitos estaba determinada por su morfología, por los mecanismos en desarrollo y por una interacción entre los astrocitos que denominaron "contacto-espacio"; sin embargo, no estaba influenciada por la interacción con las neuronas.

La interacción "contacto-espacio" consistía en que los astrocitos próximos realizaban contactos a través de sus prolongaciones, a la vez que mantenían sus cuerpos celulares a parte. Según estos autores, estas interacciones forjarían las bases anatómicas para la formación de una malla de astrocitos que se extendería ininterrumpidamente por toda la retina e incluso a traves del S.N.C. (CHAN-LING, 1991b[37]).

Por último, CHAN-LING y STONE, en 1992[38], al estudiar los astrocitos en un modelo experimental de retinopatía del prematuro realizado en gatos,

observaron que:

1.- Los astrocitos de la retina del gato neonato degeneraban como respuesta a la hipoxia, incluso ante la supervivencia de las neuronas retinianas.

2.- Después de que los vasos proliferativos penetraran en la retina hipóxica desde el disco óptico, los astrocitos se extendían desde éste y recolonizaban la retina.

3.- La aparición de los astrocitos era posterior a la neovascularización.

Por consiguiente en base a estas observaciones, los autores propusieron que los astrocitos eran células que protegían a las neuronas de la hipoxia, y además, ante una muerte astroglial generalizada podían reconolizar la retina desde el disco óptico, realizando una función reparadora.

**B) Morfología y distribución de los astrocitos retinianos de primates no homínidos.**

Los estudios inmunohistoquímicos sobre la astroglia retiniana realizados en primates no homínidos son muy escasos, debido fundamentalmente a las

dificultades que conlleva el trabajar con este tipo de animales de experimentación.

Sin embargo, SCHNITZER (1987b,1988a,b,d[219-221,223]) realizó una serie de estudios morfológicos en los que comparaba la astroglia de retinas totalmente vascularizadas como las de los monos con otras con escasa vascularización (caballo, cobaya, conejo), describiendo cómo en el mono los astrocitos se distribuían por toda la retina excepto en la fovea (región avascular), y en los otros animales únicamente en las zonas donde existían vasos; por lo que afirmó que la vascularización retiniana podía ser un factor determinante de la distribución de los astrocitos (SCHNITZER, 1987b,1988a,d[219,220,223]).

En la retina del mono, la mayor densidad astroglial se daba a nivel del disco óptico decreciendo, sin embargo, hacia la fovea y hacia la ora serrata. Los cuerpos celulares de los astrocitos estaban ubicados en la capa de células ganglionares y en la capa de fibras del nervio óptico. Las prolongaciones astrogliales, podían alinearse con los axones de las células ganglionares, o bien, contactaban con los vasos sanguíneos de las capas ganglionar y de fibras del nervio óptico.

Sin embargo, los capilares profundos localizados a nivel de las capas plexiforme interna, nuclear interna y plexiforme externa, carecían de prolongaciones astrogliales.

Estos trabajos han sido confirmados por DIESTLER y col. (1993[59]), los cuales han realizado un estudio muy reciente utilizando montajes planos de retinas de monos macacos, teñidos con el anti-PGFA y analizándolos con un microscopio confocal.

Estos autores observan que la morfología de los astrocitos de la capa de fibras del nervio óptico, cambia gradualmente desde formas estrelladas en la periferia, a formas bipolares en las proximidades del disco óptico. Además, los astrocitos localizados en la capa de células ganglionares, mantienen su apariencia estrellada a lo largo de toda la retina.

Al igual que SCHNITZER[219-,221,223], determinan que estas células realizan numerosos contactos con los vasos, de formas variadas, aunque también los astrocitos que se localizan en la capa de fibras del nervio óptico presentan la misma ubicación que los axones, pudiendo un único astrocito contactar con varios axones.

## 1.3 - LOS ASTROCITOS DE LA RETINA HUMANA.

Gran parte de los estudios sobre los astrocitos retinianos humanos han sido realizados mediante el empleo de impregnaciones argénticas o con microscopía electrónica, como ya vimos anteriormente, siendo muy escasos los trabajos con técnicas inmunohistoquímicas.

La mayoría de los trabajos realizados empleando tinciones de plata, se localizan en un período de tiempo que abarca desde los trabajos de RAMÓN Y CAJAL (1892)[190] hasta los de OGDEN (1976[164]); y gracias a ellos se ha podido determinar que los astrocitos retinianos se ubican fundamentalmente a nivel de la capa de fibras del nervio óptico y capa de células ganglionares (RAMÓN Y CAJAL, 1892[190]; GREFF, 1894; BACH, 1895[11]; MARCHESANI, 1926[135]; POLYAK, 1941[177]; WOLTER, 1955-1961[263-269]; LESSELL, 1963[120]; WOLFF, 1968[261]; OGDEN, 1976[164]).

Sin embargo, algunos autores también encontraron cuerpos celulares de astrocitos en las capa plexiforme interna (WOLTER, 1955-1961[263-269]); LESSELL, 1963[120]) y nuclear interna (WOLFF, 1968[261]); mientras que, otros únicamente observaron prolongaciones celulares que se introducían hasta la plexiforme interna

(RAMÓN Y CAJAL, 1892[190]) y a la nuclear interna (POLYAK, 1941[177]).

En cuanto a la morfología astroglial, los primeros autores expusieron que estas células eran semejantes a los astrocitos fibrosos encontrados en el cerebro (RAMÓN Y CAJAL, 1892[190]; GREFF, 1894; BACH, 1895[11]). Sin embargo, POLYAK (1941[177]), también encontró astrocitos protoplásmicos en las capas plexiforme interna y ganglionar.

Los trabajos morfológicos más importantes sobre la astroglia humana fueron realizados por WOLTER entre los años 1955 y 1961[263-269]. Según este autor, la astroglia se disponía como un sistema divisorio entre las neuronas (tejido neuroectodérmico) y el conectivo de los vasos sanguíneos (tejido mesodérmico); localizándose sus cuerpos celulares a nivel de la capa de fibras del nervio óptico, ganglionar y plexiforme interna.

Los astrocitos ubicados en la capa de fibras del nervio óptico, tenían la morfología adecuada para la sujeción de los axones de las células ganglionares; eran células bipolares con un núcleo alargado y dos prolongaciones rectas que se unían a los axones amielínicos; una de estas prolongaciones podía presentar terminaciones vasculares. Según WOLTER, estas células eran idénticas a los "lemnocitos o elementos de Remark" de los ganglios nerviosos. Sin embargo,

también pudo observar formas transicionales más ramificadas en el límite entre la capa de fibras del nervio óptico y la capa ganglionar.

A nivel de las capas ganglionar y plexiforme interna, se encontraron los típicos astrocitos con morfología estrellada. Las prolongaciones de estas células formaban una malla en los tejidos internos retinianos, que a su vez se localizaba entre la malla formada por las fibras radiales de Müller. Algunas prolongaciones celulares podían rodear a las células ganglionares, mientras que otras realizaban contactos con los vasos sanguíneos. La malla astroglial en el adulto normal, tenía una morfología regular en panal de abeja.

En la nuclear interna solamente encontró prolongaciones de astrocitos que acompañaban a los vasos sanguíneos, mientras que en la plexiforme externa observó una malla de fibras gliales entrelazadas, sin encontrar en ningún momento cuerpos celulares, por lo que este autor sugirió que estas fibras en realidad pertenecían a la glia de Müller.

WOLTER, además, describió un nuevo tipo celular en la retina humana al que denominó "glia perivascular". Estas células presentaban un cuerpo celular, localizado sobre las paredes de los capilares, del que partían numerosas prolongaciones gruesas en forma anular o espiral que abrazan únicamente los vasos sanguíneos.

Estudios posteriores, sin embargo, no confirmaron las observaciones de WOLTER.

LESSELL y KUWABARA (1963[120]), encontraron lemnocitos en la retina humana, pero no sólo en la capa de fibras del nervio óptico, sino también, en las capas de células ganglionares y plexiforme interna. Además, los astrocitos estrellados sólo los observó en ocasiones y no sólo en la capa ganglionar sino también en la capa de fibras del nervio óptico. También encontraron unas células dispuestas sobre las paredes de los vasos, "células paravasculares", que poseían una o dos prolongaciones; estas células no habían sido observadas con anterioridad siendo muy poco numerosas.

Estos autores únicamente observaron la glia perivascular en retinas humanas patológicas, por lo que pensaron que es un producto de la degeneración celular.

WOLFF (1968[261]) tampoco encontró las estirpes gliales descritas por WOLTER[263-269], sino que observó unas células gliales pequeñas, a las que denominó "células en araña", localizadas en las proximidades del disco óptico, a nivel de las capas nuclear interna, ganglionar y fibras del nervio óptico. Estas células según el autor eran semejantes a las de la sustancia blanca del S.N.C. Sin embargo, admitió la presencia de células gliales estrelladas en la capa de células ganglionares (siendo más numerosas en las proximidades del disco óptico).

Además, describió unas bandas horizontales de fibras gliales en la capa de fibras del nervio óptico y nuclear interna, que se disponían solas o acompañando a los vasos precapilares y capilares; sin embargo, no las identificó con los lemnocitos de Wolter. Con respecto a la glia perivascular, este autor la encontró sobre los capilares, asemejándose sus prolongaciones a los tentáculos de un pulpo.

Por último, las descripciones morfológicas realizadas por OGDEN (1976[164]) sobre los astrocitos de la capa de fibras del nervio óptico de las retinas de primates entre los que se encontraba el hombre, no concordaban con las expuestas por Wolter. Esto era debido a que no encontró lemnocitos sino dos tipos morfológicos diferentes de astrocitos: alargados y estrellados.

Los astrocitos alargados se disponían paralelos a los haces de axones, y no realizaban contactos vasculares. Las células estrelladas, sin embargo, sí realizaban tales contactos.

Los trabajos realizados a M.E. han confirmado por un lado, la ubicación de los astrocitos en las capas de fibras del nervio óptico y ganglionar (IKUI, 1976[95]), y por otro, la localización de algunas prolongaciones astrogliales en las capas nuclear interna y plexiforme interna (WEIDMAN, 1973[257]).

Además han puesto de manifiesto la estrecha relación que mantienen estas

células con los vasos sanguíneos, ya que únicamente se encuentran en las zonas vascularizadas de la retina (estando ausente en la fovea y ora serrata) (IKUI, 1976[95], FINE, 1962[72]), manteniendo contactos con las paredes vasculares mediante sus prolongaciones (VILLEGAS, 1964[255]; HOGAN, 1971[91]; IKUI, 1976[95]; RHODES, 1984[200]).

Ultraestructuralmente, los astrocitos retinianos humanos se reconocen principalmente por la abundancia de partículas de glucógeno y la presencia de numerosos filamentos de aproximadamente 60 nm. de diámetro. Estas células presentan un núcleo normalmente esférico u oval, con heterocromatina abundante, mientras que el citoplasma que rodea al núcleo es fino y presenta organelas citoplasmáticas abundantes, entre las que se encuentran: retículo endoplásmico rugoso, aparato de Golgi, un par de centriolos y filamentos (HOGAN, 1971[91]; IKUI, 1976[95]).

Las prolongaciones celulares pueden ser irregulares ocupando los espacios entre las neuronas, mientras que, otras se agrupan en haces de prolongaciones finas dispuestas de forma paralela. Estos haces miden 10 $\mu$m. de diámetro, y pueden entrecruzarse formando una malla que se extiende paralela a los tejidos retinianos (IKUI, 1976[95]).

Las prolongaciones astrogliales pueden unirse entre sí mediante desmosomas. Por otra parte, algunos cuerpos celulares de astrocitos se localizan sobre la

superficie de los vasos sanguíneos (IKUI, 1976[95]).

Finalmente, con microscopía electrónica, no se ha encontrado ninguna diferencia ultraestructural entre los astrocitos situados sobre los vasos sanguíneos y los astrocitos que se encuentran a cierta distancia de éstos (HOGAN, 1971[91]; IKUI, 1976[95]).

Los trabajos inmunohistoquímicos referidos a las células astrogliales de la retina humana son muy escasos, y todos ellos han sido realizados en secciones verticales de retina.

En ninguno de ellos se menciona la morfología de los astrocitos, basándose únicamente en el estudio de la localización del marcador astroglial anti-PGFA, tanto en retinas normales como patológicas.

De tal forma, KUMPULAINEN y col. (1983[111]) determinaron que los cuerpos celulares de los astrocitos PGFA(+) se localizaban en la capa de células ganglionares, y desde ésta mandaban prolongaciones que se extendían internamente hacia la plexiforme interna. El resto de las capas carecían de señal PGFA(+).

HISCOTT y col. (1984[87]) añadieron que las células PGFA(+) (cuerpo celular y prolongaciones) no sólo se ubicaban en la capa de fibras del nervio óptico rodeando a los vasos sanguíneos, sino también en la capa de células ganglionares.

Sin embargo, MOLNAR y col., en ese mismo año (1984[147]), difieren de las observaciones anteriores, y afirman que la tinción PGFA(+) se encuentra en el pericarion y prolongaciones de astrocitos situados en la capa de fibras del nervio óptico.

Por último, TUCCARI y col. (1986[247]) coincidieron con las observaciones de HISCOTT (1984[87]), al afirmar que los astrocitos PGFA(+) se localizan únicamente en las capas de células ganglionares y capa de fibras del nervio óptico.

## 1.4.- PAPEL DE LOS ASTROCITOS EN EL FUNCIONAMIENTO DEL S.N.C.

El funcionamiento del Sistema Nervioso se ha atribuido de forma general a la actividad de las neuronas, las cuales han sido consideradas como "células nobles" encargadas del procesamiento de la información mediante el intercambio de señales eléctricas.

Sin embargo, una gran parte de las células del Sistema Nervioso no son neuronales sino neurogliales, y dentro de éstas, los astrocitos son las células más numerosas (WOLFF, 1970[262]; KIMELBERG, 1989[107]).

A los astrocitos, ya desde las primeras descripciones de VIRCHOW (1846[256]), se les atribuyeron varias funciones. En primer lugar se les adjudicó una función de sostén del tejido nervioso (VIRCHOW, 1846[256]; WEIGERT, 1895[258]; ACHUCARRO, 1913[4]; RAMÓN Y CAJAL, 1913a,b[193,194]).

Por otra parte, el hecho de que los astrocitos se interpusieran entre los vasos sanguíneos y las neuronas, manteniendo ambos estrechas relaciones, condujo a pensar en una función trófica por parte de los astrocitos (GOLGI, 1886[80]; WEIGERT, 1895[258]; ACHUCARRO, 1913,1915[4,5]; ANDRIEZEN, 1893[10];

RAMÓN Y CAJAL, 1913a,b[193,194]).

Por último, también se les atribuyó funciones de cicatrización del S.N., en condiciones patológicas (ACHUCARRO, 1913[4]; RAMÓN Y CAJAL, 1913a,b[193,194]).

En la actualidad, se ha descubierto que los astrocitos realizan múltiples funciones imprescindibles para el funcionamiento del S.N., manteniendo una colaboración estrecha y permanente con las neuronas (KUFFLER, 1976[109], KIMELBERG, 1989[107]; DYAN, 1991[64]).

Con respecto a la función de soporte, los astrocitos ocupan el 25% del volumen total del tejido nervioso, organizándose en dos niveles: por un lado, forman una red que recubre todas las superficies del tejido nervioso de forma ininterrumpida, separando los axones en fascículos, y por otro lado, las prolongaciones cortas y aplanadas rodean las superficies receptoras de las neuronas y las zonas sinápticas.

Estos dos niveles aseguran la selectividad de la transmisión nerviosa, evitando difusiones a superficies neuronales que no interesan (SOLE, 1992[231]; WOLFF, 1970[262]; KUFFLER, 1976[109]).

Además, los astrocitos, son el soporte de la vía neuronal siendo también los moduladores del metabolismo de la neurona, ya que intervienen después de la activación neuronal para restablecer el equilibrio iónico y los stocks de neurotransmisores.

Los astrocitos también presentan receptores de membrana capaces de responder, como los receptores neuronales, a las señales extracelulares (DYAN, 1991[64]).

Todo esto permite imaginar la respuesta del S.N.C. como un todo funcional compuesto por (SOLE, 1992[231]):

- la respuesta neuronal: inmediata, efectora, basada en fenómenos eléctricos;
- la respuesta astrocitaria: retardada, moduladora y restauradora, basada en fenómenos metabólicos.

## 1.4.1.- IMPLICACIÓN DE LOS ASTROCITOS EN EL METABOLISMO NEURONAL.

En los últimos años, se ha demostrado que los astrocitos restauran el equilibrio metabólico alterado por la actividad neuronal en todos los aspectos: metabolismo energético, metabolismo de neurotransmisores, y reparto iónico transmembrana; de tal forma que permiten que la actividad neuronal prosiga o pueda repetirse (DYAN, 1991[64]).

Así se ha comprobado, que los astrocitos almacenan glucógeno en su citoplasma y liberan glucosa a las neuronas cuando éstas la necesitan (RIPPS, 1985[203]).

Además, se ha detectado anhidrasa carbónica en las células gliales. Esta enzima hace que el dióxido de carbono formado en el metabolismo neuronal, y que difunde hacia las células gliales, se convierta en bicarbonato para su eliminación (MUSSER, 1973[151]; KUMPULAINEN,1980[110]). También esta enzima estimula la captura de glucosa por los astrocitos cerebrales (YU, 1993[272]).

Por otra parte, los astrocitos tienen un papel decisivo en el metabolismo y regulación de diferentes neurotransmisores:

El GABA y el glutamato, una vez que han sido vertidos al espacio sináptico, son capturados por los astrocitos, donde se metabolizan para formar glutamina (MARSHALL, 1974[138]; LAM, 1980[115]).

Esta transformación está catalizadas por la acción de la enzima glutamina sintetasa. La glutamina liberada puede difundir hacia las neuronas para transformarse de nuevo en glutamato y GABA (RIEPE, 1977[202]; NORENBERG, 1979[161]).

La captura de glutamato por parte de los astrocitos es dependiente de voltaje, de tal forma que por cada anión glutamato capturado se transportan al menos dos iones de sodio (BREW, 1987[25]).

Por lo tanto el GABA y el glutamato, abren canales iónicos en los astrocitos, de ahí la gran importancia de los receptores de estos dos neurotransmisores en el potencial de membrana en reposo de los astrocitos (CLARK, 1992[32]).

El GABA no se encuentra sólo en los astrocitos adultos sino que se ha detectado también en los precursores de las células gliales en el nervio óptico de la rata en desarrollo (LAKE, 1992[112]).

Los astrocitos también pueden capturar serotonina mediante un mecanismo dependiente de sodio (KIMELBERG, 1985[106]). Este neurotrasmisor también puede

actuar como un modulador de la glia regulando tanto su actividad funcional como la expresión de las proteínas del citoesqueleto (LE PRINCE, 1990[119]).

Por último, también se ha observado que los astrocitos pueden capturar otros neurotransmisores como la glicina (SATO, 1991[212]), el 3H-L aspartato (LÓPEZ-COLOME, 1991[131]), o la taurina (LAKE, 1992a,b,c[112-114]).

Esta captura de neurotransmisores es importante ya que protege a las neuronas de los efectos neurotóxicos que podrían producir las concentraciones elevadas de neurotransmisores en el espacio extracelular (DYAN, 1991[64]).

Por otra parte, se ha observado que el nivel de síntesis proteica es mayor en las células nerviosas que en las gliales (BLOMSTRAND, 1970[23]); mientras que, el nivel de acumulación de aminoácidos libres es mayor en las células gliales (HAMBERGER, 1971[82]). Estos resultados indican que las células gliales tienen la posibilidad de controlar el nivel de substrato disponible para la síntesis proteica neuronal.

También se sabe en la actualidad que las células gliales pueden estar relacionadas con el control del contenido iónico intercelular perineuronal, por lo tanto, otra función de los astrocitos sería la regulación de iones.

Este sistema de control es necesario para prevenir la despolarización contigua a las áreas sinápticas y a lo largo de la membrana axonal (WENDELL-SMITH, 1965[259]; FRIEDE, 1970[73]).

Se ha observado que los astrocitos retiran el potasio acumulado en el espacio extracelular como consecuencia de la actividad neuronal (TRACHTENBERG, 1970[240]; RIPPS, 1985[203]).

La concentración del $K^+$ extracelular debe ser regulada ya que un incremento en ésta produce la despolarización neuronal (WENDELL-SMITH, 1965[259]; ORKAND, 1973[168]); cuando esto ocurre los astrocitos captan este exceso de potasio. En la zona donde se ha localizado el incremento de este ión, la membrana del astrocito adquiere carga positiva; la diferencia de potencial eléctrico entre esta región y otras más distantes provoca un flujo en el interior de la célula glial que transporta el $K^+$ lejos de su lugar de liberación, donde la concentración es menor (NEWMAN, 1984a[154]; KARWOSKI, 1989[103]).

Sin embargo, se ha demostrado que la conductancia al $K^+$, no se distribuye uniformemente sobre la superficie celular, sino que ésta es mucho mayor a nivel de las terminaciones en pie vascular de las células astrogliales (NEWMAN, 1984b,1985a,b,1986a,b[155-159]; BREW, 1986[24]).

Estas zonas de alta conductancia del $K^+$ estarían localizadas a nivel de las

partículas intermembranosas con disposición ortogonal (OAP) que han sido observadas a M.E. mediante la técnica de criofactura en las terminaciones vasculares de las prolongaciones astrogliales (RICHTER, 1990[201]).

El $K^+$ captado por los astrocitos se elimina a través de los pies vasculares hacia los vasos sanguíneos (PAULSON, 1987[171]).

Existen dos tipos de canales iónicos que permiten la entrada de $K^+$ al interior de la célula: un canal iónico pasivo, que es el responsable del potencial de reposo de la célula (-75 mV.) y de su papel de tampón espacial; y canales iónicos activos, que permiten la entrada activa de iones $K^+$ mediante la activación de una bomba $Na^+/K^+$ ATPasa glial y de un cotransportador $K^+/Cl^-$ glial (HERTZ, 1965[86]; HENN, 1972[85]; RANSOM, 1986[196]; DIETZEL, 1989[60]).

Además el $K^+$ liberado por las neuronas realiza un papel accesorio, el de señal entre la neurona y la célula glial. El $K^+$ capturado por el astrocito tras la actividad neuronal podría actuar como señal de activación del metabolismo astrocitario del glucógeno (PENTREATH, 1982[175]).

Además de canales de $K^+$, se ha encontrado que las células gliales también presentan una gran variedad de canales iónicos semejantes a los encontrados en las neuronas, por tanto existen canales para el sodio, calcio, cloro, etc. (NEWMAN, 1985b[157]; BERWALD-NETTER, 1986[15]; MacVICAR, 1991[133]; RITCHIE, 1992[205]).

## 1.4.2.- INTERACCIONES GLIA-NEURONA EN EL DESARROLLO.

Como consecuencia de las investigaciones encaminadas a esclarecer el desarrollo del S.N., se ha demostrado que los astrocitos guían a las neuronas durante las etapas del desarrollo.

Los trabajos de RAKIC (1971,1981[185,186]) postularon que las interacciones entre la glia radial y las neuronas inmaduras podrían jugar un papel crucial en la orientación y emplazamiento de las neuronas en las cortezas cerebral y cerebelar.

Se ha demostrado que la glia radial no se divide durante el punto álgido de la neurogénesis, de tal forma que sus fibras alargadas sirven como guía para la migración de las neuronas y proporcionan las bases estructurales para la compartimentación del tejido nervioso en desarrollo (RAKIC, 1981[186]).

Una vez finalizada esta migración neuronal, la glia radial se transforma en astrocitos y oligodendrocitos directamente, o mediante un precursor celular (LAUDER, 1986[117]).

Además, se ha encontrado que la expresión de laminina en la superficie de las células gliales está correlacionada con el crecimiento axonal y la formación de

la vía nerviosa durante el desarrollo del nervio óptico y de otras partes del S.N.C. del ratón. Estos depósitos de laminina sobre las células gliales inmaduras preceden a la entrada de los primeros axones dentro del nervio óptico en desarrollo, estando implicados también posteriormente en el crecimiento de éstos (LIESI, 1988[124]).

### 1.4.3.- ASTROCITOS Y FACTORES DE CRECIMIENTO NEURONAL.

Los astrocitos, o sus precursores celulares, tienen la capacidad de secretar factores de crecimiento que ayudan a la supervivencia neuronal e inducen su crecimiento y diferenciación (THANO, 1990[238]).

Entre ellos destaca el factor de crecimiento neuronal que estimula a las neuronas favoreciendo el crecimiento axonal (VACA, 1992[249]).

Además otras sustancias como la laminina, fibronectina y otros constituyentes de la matriz extracelular favorecen y aceleran el crecimiento de las prolongaciones neuronales (LAUDER, 1986[117]; LIESI, 1988[124]).

No sólo existen factores que favorecen el crecimiento neuronal sino que se ha encontrado factores localizados en los oligodendrocitos constituidos por dos proteínas de membrana, que son inhibidores muy potentes del crecimiento de las fibras nerviosas. Estas proteínas están ausentes en el sistema nervioso periférico (SCHWAB, 1989[227]).

La morfología de una neurona y el modelo de ramificación y proyección de sus axones y dendritas va a venir determinado, por tanto, por una combinación de influencias intrínsecas y ambientales. De tal forma, que las células gliales ejercen un papel morfogenético sobre las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo. Esto ha sido demostrado en los trabajos de DENIS-DOMINI y col. (1984[58]), en los cuales colocaron neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo sobre monocapas de células gliales procedentes de la región estriada y sobre monocapas de la región mesencefálica. Las neuronas que se desarrollaron sobre glia mesencefálica presentaban gran cantidad de neuritas varicosas y muy ramificadas; mientras que, las que se desarrollaron sobre la glia de la región estriada solo poseían una neurita larga, fina y bastante lineal.

## 1.4.4.- LOS ASTROCITOS EN LOS PROCESOS PATOLÓGICOS DEL SISTEMA NERVIOSO.

Como ya describieron los primeros neurohistólogos, una de las funciones de los astrocitos sería la formación de cicatrices gliales y reparación del Sistema Nervioso.

Cuando se produce un daño en el Sistema Nervioso, y hay una destrucción neuronal, tiene lugar una proliferación de astrocitos (astrocitos reactivos), formando una cicatriz glial (LINDSAY, 1986[126]).

Los astrocitos reactivos presentan más prolongaciones y filamentos gliales que los normales, desarrollando una mayor actividad metabólica (COOK, 1973[35]; KIMELBERG, 1989[107]; DUSART, 1991[63]).

Esta proliferación astroglial puede inducirse por sustancias ya presentes en el cerebro sano (NIETO-SAMPEDRO, 1985[160]). Sin embargo, PURO y col. (1990[181]), postularon que la función de ciertos canales iónicos en las células gliales podría estar relacionada con la inducción de la proliferación glial. También otros autores, proponen que la proliferación glial se produce por una serie de factores liberados por la microglia ((GIULIAN y BAKER, 1985[77]).

Los astrocitos están implicados en diversas patologías del Sistema Nervioso.

Por ejemplo, en la enfermedad de Parkinson existe una muerte de neuronas dopaminérgicas, que se puede producir entre otras causas por la aparición de peróxido de hidrógeno y radicales oxi-citotóxicos. Se ha encontrado que los astrocitos poseen una enzima (glutatión peroxidasa) que protege de la acción del peróxido de hidrógeno; por lo tanto, un aumento en los niveles de esta enzima puede tener una acción protectora sobre la muerte neuronal (DAMIER, 1993[47]).

Ante un proceso isquémico existe una hinchazón astroglial. Bioquímicamente se inhibe la entrada de glutamato en el astrocito, lo que produce una acumulación de aminoácidos excito-tóxicos en el medio extracelular y como consecuencia se produce la muerte neuronal (VIBULSRETH, 1987[254]).

Las modificaciones precoces encontradas en los astrocitos en un período postisquémico pueden resumirse en un aumento del número de astrocitos, como también del volumen de núcleos, mitocondrias y retículo endoplásmico, lo que sugiere una mayor actividad metabólica (OHIRA, 1990[166]; DYAN, 1991[64]).

La proliferación de las células gliales se produce por la liberación de factores de crecimiento que activan la multiplicación astroglial (OHIRA, 1990[166]).

Se ha observado que los astrocitos son más sensibles a la hipoxia que las neuronas, ya que se ha encontrado que a ciertos niveles de hipoxia, se produce

una amplia muerte de células astrogliales sin que se produzca una muerte neuronal; lo que ha llevado a postular la función protectora que ejercen los astrocitos sobre las neuronas frente a la hipoxia.

Experimentos realizados in vitro han demostrado que las neuronas sobreviven mejor en un medio hipóxico en presencia de astrocitos. En estas situaciones, la células astrocitaria liberarían glucosa a las neuronas, vaciando sus almacenes de glucógeno, en prejuicio de su supervivencia. Esto tiene sentido ya que los astrocitos, como ya hemos visto, pueden multiplicarse y migrar para restablecer sus relaciones estructurales y funcionales, mientras que, un daño producido en las neuronas es más difícil de reparar (CHAN-LING, 1992[38]).

En la actualidad se está especulando que una hipotermia moderada reduce el daño producido por la isquemia. Se cree que la hipotermia reduce la liberación temprana de neurotransmisores excitadores, por lo que se inhibe la activación de los astrocitos y se previene la necrosis neuronal (CHENH, 1992[39]).

Los astrocitos también están implicados en diversas patologías retinianas. WOLTER, en 1955[263], ya observó que las células gliales retinianas, en un ojo glaucomatoso, estaban hipertrofiadas formando una cicatriz glial como respuesta a una gran destrucción neuronal.

Además, en las retinopatías en las que se produce una gran proliferación vascular (por ejemplo, retinopatía diabética, algunos desprendimientos de retina, etc.), las células gliales juegan un papel muy importante, encontrándose los dos tipos de células astrogliales retinianas (glia de Müller y astrocitos) formando parte de las membranas perirretinianas y epirretinianas que aparecen en estas patologías (CAMPOCHIARO, 1968[31]; VAN HORN, 1977[250]; LAQUA, 1975[116]; ALGVERE 1983[6]; MILLER, 1986[142]; NORK, 1987[162]; GOLDARACENA, 1992[78]; OHIRA, 1990[166]).

Se han propuesto distintas teorías para explicar qué factores pueden estimular la proliferación y migración de las células gliales desde la retina a estas membranas.

Por un lado, la aparición de ciertas moléculas del plasma (trombina, fibronectina), que podrían haber surgido por la ruptura de la barrera hemato-retiniana, o por hemorragias vítreas, estimularían la proliferación de las células gliales (De JUAN, 1988[50]; PURO, 1990,1991[181,182]).

Por otro lado, las células del epitelio pigmentario de la retina, sintetizan el factor de crecimiento fibroblástico, liberándolo a la retina y al vítreo, estimulando el crecimiento y migración de los astrocitos hacia este último medio ocular (ROWENS, 1985[208]; BRYAN, 1986[27]; PURO, 1991[182]).

Un segundo papel muy unido al anterior, es el de la acción fagocítica, desarrollada por los astrocitos al eliminar restos, en situaciones degradativas. Así, en las células de Müller y en los astrocitos se han observado residuos picnóticos en los fagosomas (HOGAN, 1963a[89]; MUCHNICK, 1981[149]; PENFOLD, 1986[173]) lo que denotaría su papel fagocítico. La microglia (principales células fagocíticas en el S.N.) sólo se movilizarían cuando los restos acumulados en el tejido nervioso son muy numerosos (HOGAN, 1963a[89]; COOK, 1973[35]).

La idea de esta función degradativa está apoyada también por los estudios de HOF y KIMELBERG (1985[88]), en los que encuentran una alta actividad de hidrolasas lisosomales (**beta**-glucosidasa y **beta**-galactosidasa) en los astrocitos.

### 1.4.5.- PARTICIPACIÓN DE LOS ASTROCITOS EN LA FORMACIÓN DE LA BARRERA HEMATO-ENCEFÁLICA Y HEMATO-RETINIANA.

Una función más que se atribuye a los astrocitos en la actualidad es la de inducir la formación de la barrera hemato-encefálica y hemato-retiniana.

Las células endoteliales de los capilares del cerebro y de la retina están conectadas mediante uniones estrechas, que son las responsables de la función de barrera (BRIGHTHAN, 1969[26]; STEWART, 1986[234]; GOLDSTEIN, 1986[79]; ABBOTT, 1987[1]). Estas células tienen unos rasgos morfológicos y bioquímicos especiales que las hacen diferentes a otras células endoteliales del cuerpo. Estas características permiten un control preciso de las sustancias que abandonan o entran al cerebro (KILMERBERG, 1989).

Esta barrera fisiológica protege al cerebro o a la retina de las altas concentraciones de $K^+$ y de sustancias neurotóxicas presentes en la sangre (ej, glutamato, glicina) cuyos niveles en sangre son 1000 veces más elevados que en el espacio extracelular del S.N.C.

Por otra parte, en las células endoteliales existen unos sistemas transportadores específicos que permiten controlar el intercambio de sustancias entre la sangre y el S.N. (ej. difusión de glucosa). También pueden metabolizar o modificar sustancias para el mantenimiento de la homeostasis del microambiente neuronal.

Además, a través de la barrera pueden difundir sustancias en virtud a su carácter lipofílico, pero a nivel de las células endoteliales existen mecanismos que exportan de forma activa moléculas lípidas que ha entrado en el cerebro mediante

difusión (GOLDSTEIN, 1986[79]; STEWART, 1986[234]; KILMERBERG, 1989).

La barrera está formada por un sistema celular complejo constituido por células endoteliales, pericitos, microglia perivascular y astrocitos.

Mientras que las células endoteliales forman la propia barrera (STEWART, 1986[234]), es necesaria la interacción de todas las células para la inducción o mantenimiento de todas las funciones especiales de la barrera (GOLDSTEIN, 1986[79]; RISAU, 1990[204]).

Ya, desde los trabajos de JANZER y RAFF (1987[96]) se evidenció un papel inductivo de los astrocitos en la formación de la barrera hemato-encefálica.

Los pies vasculares de los astrocitos se localizan muy próximos a la membrana plasmática de las células endoteliales, estando separados únicamente por medio de la membrana basal del vaso (PENFOLD, 1990[174]; PROVIS, 1991[180]; DYAN, 1991[64]). Esta vaina astroglial perivascular es un rasgo único de los capilares del S.N.C., formándose al mismo tiempo que se produce la permeabilidad de la barrera (RISAU, 1990[204]).

La homeostasis del $K^+$ es crucial para la función cerebral, siendo un aspecto importante para la barrera hemato-encefálica. La concentración de $K^+$ en sangre

es mayor que en el cerebro, y la barrera hemato-encefálica es la encargada de evitar la difusión de éste al cerebro (RISAU, 1990[204]).

El $K^+$ producido durante la actividad neuronal, como ya se vio con anterioridad, es eliminado del medio extracelular por los astrocitos (RIPPS, 1985[203]), a través de canales de alta conductancia (que se cree corresponden a las OAPs de $K^+$ localizados en la zona de los pies vasculares (NEWMAN, 1986a,b[158,159]; RICHTER, 1990[201]). El $K^+$ liberado en las terminaciones vasculares puede ser transportado por la $Na^+/K^+$-ATPasa presente en la membrana basal de las células endoteliales para ser eliminado del cerebro (RISAU, 1990[204]).

Se cree que estas partículas OAPs están muy relacionadas con la barrera, ya que no se encuentran en las terminaciones vasculares astrogliales de las zonas en donde no existe barrera hemato-encefálica. Además, estas partículas aparecen durante la ontogénesis cuando madura la barrera hemato-encefálica (RISAU, 1990[204]).

Estudios realizados "in vitro" han demostrado que en los co-cultivos de astrocitos y células endoteliales se incrementan las uniones, así como la expresión y polaridad de los marcadores celulares superficiales en las células endoteliales; como también, un aumento de la densidad de las OAPs astrocitarias (BECK, 1984[13]; RISAU, 1990[204]).

Además los astrocitos secretan factores solubles que son capaces de inducir las propiedades de barrera en células endoteliales de origen no neuronal (STEWART, 1981[233]; JANZER, 1987[96]; LOBRINUS, 1992[128]).

Como conclusión, podemos decir que las OAPs de los astrocitos, los factores liberados por éstos, las uniones estrechas de las células endoteliales, y los transportadores en sus membranas, son un conjunto de características que se encuentran asociadas de forma específica con el establecimiento de una barrera funcional hemato-encefálica y hemato-retiniana en los mamíferos.

# 2.- JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS

## 2.- JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS.

Desde las primeras descripciones de la neuroglia, el estudio de estas células ha sido tomado con gran interés por los distintos autores, apareciendo trabajos morfológicos y fisiológicos que descubrieron el importante papel que juegan estas células en el perfecto funcionamiento del sistema nervioso.

A nivel retiniano, si bien los trabajos morfológicos, utilizando las impregnaciones argénticas, aparecidos entre finales del siglo pasado y mediados del presente siglo son relativamente abundantes, la disparidad y controversia en los hallazgos hacen que este tema no esté concluido en la actualidad.

La aparición de nuevos métodos histológicos como las técnicas de inmunohistoquímica, en las cuales se utilizan distintos antígenos que pueden ser utilizados como marcadores celulares específicos, abre un nuevo campo para el estudio de la morfología y distribución de las células astrogliales, utilizando para ello distintos marcadores celulares, entre los que destaca la proteína gliofibrilar ácida (PGFA) como uno de los más específicos.

Con la utilización de estas técnicas (anti-PGFA), se han realizado numerosos trabajos en diferentes especies animales (rata, conejo, gato, mono), pero por contra, los enfocados en el estudio de la astroglia humana han sido muy escasos, y en ninguno de ellos se describe la morfología de estas células, limitándose únicamente a mencionar la localización de la astroglia en el espesor retiniano, con resultados contradictorios entre los distintos autores.

Con la utilización de impregnaciones argénticas, WOLTER (1955-1961[263-269]) en sus extensos trabajos sobre la astroglia humana, observó tres tipos morfológicos de células astrogliales, entre las que destacaba un tipo que denominó "glia perivascular", que únicamente se relacionaba con los vasos sanguineos, a los que abrazaba con sus prolongaciones a modo de tentáculos de un pulpo.

Sin embargo, en los estudios realizados a microscopía electrónica no se encontraron diferencias entre los astrocitos situados sobre los vasos sanguíneos y los alejados de éstos.

Los trabajos inmunohistoquímicos realizados en otras especies animales como el conejo, pusieron de manifiesto estas células gliales "perivasculares", afirmándose implícitamente su existencia en la retina humana. Si bien, en otras especies animales como el gato y el mono, cuyas retinas son semejantes a la

humana, ningún autor ha hecho referencia a esta "glia perivascular" de Wolter.

Animados por la escasez de estudios morfológicos inmunohistoquímicos sobre la astroglia humana, y por la controversia suscitada sobre la existencia de los astrocitos perivasculares en esta retina, pretendemos realizar un estudio inmunohistoquímico, utilizando el anti-PGFA como marcador de los astrocitos retinianos humanos, para determinar la localización, distribución y morfología de estas células, además de intentar esclarecer la existencia o no de "glia perivascular".

Por último, pretendemos apoyarnos en la microscopía electrónica, para poder determinar la ultraestructura y las relaciones estrechas que mantienen estas células con las distintas estructuras retinianas.

# 3.- MATERIAL Y MÉTODOS

# 3.- MATERIAL Y MÉTODOS.

## 3.1.- CASUÍSTICA.

Para la realización de este trabajo hemos utilizado 38 ojos de personas fallecidas que los habían donado previamente. Los globos oculares fueron enucleados para la obtención de las córneas que posteriormente fueron utilizadas en trasplantes.

Las edades estaban comprendidas entre los 20 a los 60 años, siendo eliminados todos aquellos ojos que presentaban algún tipo de patología que hubiera podido modificar la morfología normal de la astroglia retiniana.

De los 38 ojos, 35 fueron empleados para la realización de las técnicas inmunohistoquímicas (30 en montajes planos, y 5 en secciones verticales y

horizontales de retina), y los 3 restantes, se utilizaron para su estudio a microscopía electrónica.

Además, se utilizaron técnicas histológicas rutinarias de tinción en las secciones verticales y horizontales de retina, para la selección de los cortes que posteriormente serían teñidos inmunohistoquímicamente.

## 3.2.- FIJACIÓN Y PROCESAMIENTO DE LOS GLOBOS OCULARES.

Los ojos fueron enucleados de 2 a 4 horas después del fallecimiento, y mantenidos en frío (4°C) hasta que se procedió al tallado corneal (1-3 horas).

Inmediatamente después, los ojos fueron fijados, por inmersión:

- en paraformaldehido al 4% en tampón fosfato pH=7,4, (0,1M), durante 4 horas a 4°C; si se iban a emplear para su estudio a microscopía óptica;
- en glutaraldehido-Millonig al 1%, o en paraformaldehido al 2,5% - glutaraldehido al 0,1%, en tampón fosfato pH=7,4 (0,1M), durante 5 horas a 4°C, postfijándose en tretóxido de osmio al 2% durante 1-3 horas, si se iban a emplear para su estudio a microscopía electrónica.

Posteriormente, los globos oculares, o bien fueron incluidos en parafina y seccionados vertical u horizontalmente; o bien, fueron disecados separándose las retinas para: hacer montajes planos, o para procesarlas para microscopía electrónica.

### 3.2.1.- OBTENCIÓN DE CORTES HISTOLÓGICOS DE RETINA PARA MICROSCOPÍA ÓPTICA.

Para realizar las secciones verticales y horizontales, se eliminó la porción anterior del globo ocular (iris, procesos ciliares y cristalino), quedando únicamente la porción posterior del ojo.

Este tejido (previamente fijado y lavado) fue sometido a una deshidratación mediante pasos sucesivos en alcoholes de concentración creciente (60°, 70°, 80°, 96° y Absoluto), inmersión en tolueno (como líquido intermedio, miscible tanto en alcohol como en parafina), y finalmente incluido en parafina plástica Paraplast (Sherwood Medical).

Los segmentos posteriores fueron orientados en el bloque de parafina de tal forma que los lados superior, inferior, nasal y temporal de la retina, estaban perfectamente localizados.

El protocolo detallado, seguido para la inclusión fue:

1.- Inmersión en alcohol etílico de 60°

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

2.- Inmersión en alcohol etílico de 70°

- 1º paso: 1 hora.

- 2º paso: 1/2 hora.

3.- Inmersión en alcohol etílico de 80°

- 1º paso: 1 hora.

- 2º paso: 1/2 hora.

4.- Inmersión en alcohol etílico de 96°

- 1º paso: 1 hora.

- 2º paso: 1/2 horas.

5.- Inmersión en alcohol etílico absoluto

- 1º paso: 1 hora.

- 2º paso: 1/2 hora.

6.- Inmersión en líquido intermedio: tolueno

- 1º paso: 10 min.

- 2º paso: 10 min.

- 3º paso: 5 min.

7.- Baño en parafina (En estufa a 57-58 ºC)

- 1º paso: 1-2 horas.

- 2º paso: 1/2-1 horas.

8.- Inclusión en el bloque de parafina nueva.

Los bloques de parafina, así obtenidos fueron tallados y montados sobre un soporte para su colocación en un microtomo de rotación Reichert-Jung, donde se realizaron cortes de 6 y 20 $\mu$m..

Las secciones fueron estiradas en un baño de agua a 35°C, y recogidos en portaobjetos que habían sido tratados previamente con alumbre de cromo-gelatina.

### 3.2.2.- REALIZACIÓN DE MONTAJES PLANOS DE RETINA.

Una vez fijado el globo ocular, se procedió a la separación de la retina del resto de las túnicas oculares. En esta fase se utilizó un estereomicroscopio JENAVAL (Carl Zeiss Jena), para una disección cuidadosa de los tejidos oculares.

Los globos oculares fueron introducidos en un recipiente que contenía PBS 0,1 M a pH=7,4 a 4°C, antes y durante todo el procesamiento de éstos, de tal forma que la separación de la retina se realizó en frío.

Primeramente se hizo un corte alrededor del limbo esclerocorneal a 1-2 mm. de éste, en el lado escleral, extirpando en bloque el iris, cristalino y cuerpo ciliar, quedando únicamente la retina unida a la coroides y la esclera. Posteriormente se

disecó la retina de la coroides mediante un pincel fino.

Para poder realizar un aplanamiento de la retina se hicieron cuatro cortes equidistantes, respetando la zona macular (situada temporalmente), siendo más profundo el de la zona inferior para ayudar a la orientación de la pieza.

En otras ocasiones, para una mayor comodidad en el manejo y montaje de la retina, se dividió ésta en la zona nasal y la zona temporal, mediante un corte supero-inferior, de tal forma que el disco óptico y la mácula estaban incluidos en el lado temporal.

Una vez aisladas la retina del resto de los tejidos oculares, se procedió a la retirada del humor vítreo, mediante pinzas y tijeras muy finas (Tipo Westcott).

Finalmente las retinas se introdujeron en un recipiente que contenía PBS y se introdujeron en nevera (4°C) hasta su procesamiento inmunohistoquímico.

## 3.3.- PROCESAMIENTO DE LA RETINA PARA LA MICROSCOPÍA ELECTRÓNICA.

Los globos oculares que habían sido fijados en glutaraldehido-Millonig, o en paraformaldehido (2,5%) - glutaraldehido (0,1%) en tampón fosfato, fueron procesados de la misma forma que para la realización de montajes planos; sin embargo, la disección en vez de realizarse en PBS se hizo en tampón fosfato.

Una vez separadas las retinas, se seleccionaron pequeñas zonas de diferentes regiones (nasal, temporal, superior e inferior) para su posterior inclusión en la resina.

Las piezas fijadas y postfijadas en tetróxido de osmio al 1% se deshidrataron en acetonas de concentración creciente y finalmente fueron incluidas en araldita. Los bloques una vez tallados se procesaron para la realización de cortes semifinos y finos mediante un ultramicrotomo Reichert OM-V3.

Los cortes semifinos se tiñeron con azul de toluidina-borax, utilizándose para la observación y posterior selección de las zonas retinianas que presentan una mayor abundancia de astrocitos y vasos sanguíneos.

Los cortes finos obtenidos de las zonas previamente seleccionadas fueron contrastados con acetato de uranilo y citrato de plomo, para su posterior observación en el Microscopio Electrónico ZEISS 902 del Centro de Microscopía Electrónica de la Universidad Complutense de Madrid.

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

A).- Fijación y postfijación:

1.- Fijación de las piezas durante 4-5 horas en glutaraldehido-Millonig, o en paraformaldehido 2,5 % con glutaraldehido 0,1 % en tampón fosfato a 4°C.

2.- Lavado en Millonig-glucosa y renovación cada media hora (4 pasos).

3.- Postfijación en tetróxido de osmio al 2% en agua, a temperatura ambiente, en campana, durante 1 a 3 horas.

B) Deshidratación e inclusión:

Todos los pasos que constituyen este proceso se realizaron en oscuridad

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

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

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

3.- Pasos por la mezcla acetona / araldita:

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

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

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

C) Contraste de los cortes finos:

Una vez realizados, los cortes finos se recogieron en rejillas de cobre, seguidamente éstos se contrastaron con acetato de uranilo al 1% en agua destilada y con citrato de plomo.

## 3.4.- TINCIONES HISTOLÓGICAS DE RUTINA.

### 3.4.1.- HEMATOXILINA-EOSINA.

Esta tinción ha sido utilizada en las secciones verticales y horizontales realizadas en parafina, para determinar las mejores zonas retinianas y así poder seleccionar determinados cortes para la realización de las técnicas inmunohistoquímicas.

Además, también se ha utilizado la hematoxilina (que tiñe los núcleos celulares de azul-malva) como tinción de contraste de las técnicas inmunohistoquímicas.

El protocolo usado fue:

1.- Desparafinado de los cortes en xilol, durante 1/2 hora.

2.- Hidratación de los cortes mediante pasos en alcoholes de concentración descendiente (Absoluto, 96°, 80°).

3.- Lavado en agua.

4.- Tinción en hematoxilina, durante 5-6 min.

5.- Lavado en $H_2O$, dos pasos de 10 min.

6.- Tinción en eosina, durante 1-1,5 min.

7.- Lavado en $H_2O$, dos pasos de 5 min.

8.- Deshidratación de los cortes en alcoholes de concentración creciente (80°, 96°, Absoluto), aclaramiento en xilol y montaje en DpX.

### 3.4.2.- P.A.S. (REACCIÓN DEL ÁCIDO PERIODICO-SCHIFF).

Se ha utilizado esta tinción en las secciones verticales de retina para obtener la localización de los vasos sanguíneos en el espesor retiniano.

El protocolo usado fue:

1.- Los cortes se introdujeron en xilol para eliminar la parafina, durante 1/2 hora.

2.- Se hidrataron mediante su introducción en alcoholes de concentración decreciente (Absoluto, 96°, 80°).

3.- Lavado de los cortes en $H_2O$ destilada.

4.- Tratamiento con ácido periódico durante 5 min.

5.- Lavado en $H_2O$ destilada.

6.- Baño en ácido sulfuroso durante 6 minutos.

7.- Lavado rápido en $H_2O$ destilada.

8.- Deshidratación en alcoholes, aclaramiento y montaje en DpX.

Los resultados que se obtienen con esta tinción son: las membranas basales y la reticulina se tiñen de color púrpura.

### 3.4.3.- AZUL DE TOLUOIDINA (al 1% en bórax).

Se realizó esta tinción para la selección de los cortes ultrafinos que se utilizarían para microscopía electrónica.

El protocolo seguido fue:

1.- Introducción de los cortes semifinos en azul de tolouidina al 1% en borax precalentado a 60°, durante 1 min.

2.- Lavado en $H_2O$ corriente, durante 1-2 min.

3.- Deshidratación de los cortes y montaje en DpX.

## 3.5.- TÉCNICAS INMUNOHISTOQUÍMICAS.

Para la demostración de los astrocitos retinianos hemos utilizado el anticuerpo contra la proteína gliofibrilar ácida (PGFA). Esta proteína, constituyente del citoesqueleto de los astrocitos, se encuentra casi exclusivamente en estas células, de tal forma que el anticuerpo desarrollado contra ésta marca selectivamente los astrocitos.

El anti-PGFA fue puesto de manifiesto, tanto mediante la técnica de la peroxidasa anti-peroxidasa (PAP) desarrollada por STERNBERGER (1970[232]), como con la técnica de inmunofluorescencia indirecta.

Los anticuerpos utilizados han sido:

- Anticuerpo monoclonal contra la proteína gliofibrilar ácida desarrollado en ratón (anti-PGFA, clon GA-5) (Biomakor, Israel; Sigma, USA).
- Anticuerpo contra IgG de ratón, desarrollado en cabra (anti-mouse IgG; Sigma).
- Anticuerpo contra IgG conjugado a fluoresceína, desarrollado en cabra (FITC-antimouse IgG; Sigma).
- Complejo peroxidasa anti-peroxidasa, desarrollado en ratón (PAP de ratón) (Sigma).

A continuación describiremos con detalle los protocolos utilizados en cada una de las técnicas inmunohistoquímicas:

### 3.5.1.- PAP

#### A) PAP en montajes planos.

El protocolo seguido fue:

1.- Lavado en tampón fosfato salino (PBS).

2.- Paso por alcohol de 80°, durante 15 min.

3.- Paso por alcohol de 96°, durante 15 min.

4.- Paso por alcohol absoluto, durante 30 min.

5.- Aclarado en xilol durante 1 hora.

6.- Paso por alcohol absoluto, durante 30 min.

7.- Paso por alcohol de 96°, durante 15 min.

8.- Paso por alcohol de 80°, durante 15 min.

Estos pasos por los alcoholes se realizaron para la eliminación de lípidos de las membranas celulares formándose huecos que ayudan a la penetración de los anticuerpos.

9.- Lavado en PBS (2 x 5 min.)

10.- Bloqueo de la peroxidasa endógena en $H_2O_2$ al 0,3%, durante 30 min. a temperatura ambiente.

11.- Lavado en PBS (3 x 10 min.)

12.- Incubación en suero normal de cabra (NGS) al 10% a 4°C, durante 24 horas, para la eliminación de la señal de fondo (background).

13.- Incubación en la 1ª capa (anti-PGFA), durante 3-4 días a 4°C (dilución 1/250).

14.- Lavado en PBS (3 x 3 horas)

15.- Incubación en la 2ª capa (anti-IgG de ratón), durante 2 días a 4°C (dilución 1/100).

16.- Lavado en PBS (3 x 3 horas).

17.- Incubación en PAP durante 24 horas a 4°C (dilución 1/700).

18.- Lavado en PBS (3 x 3 horas).

19.- Tratamiento con 3'3'-diaminobencidina tetrahidroclórico (DAB, Sigma) en PBS al 0,03%, durante 5 min.

20.- Revelado en DAB (0,03%) / $H_2O_2$ (0,01%) en PBS, durante 7 min.

21.- Lavado en PBS (3 x 10 min.)

22.- Montaje de las retinas sobre portaobjetos bañados en alumbre de cromo-gelatina, dejándolas secar.

23.- Lavado en $H_2O$ destilada.

24.- Deshidratación en alcoholes de 96°, absoluto, y aclaramiento en xilol.

25.- Montaje usando bálsamo de Canada (Merck, Alemania).

**B) PAP en secciones verticales y horizontales.**

El protocolo seguido fue:

1.- Desparafinado de los cortes en xilol.

2.- Hidratación de los cortes mediante su introducción en alcoholes de concentración decreciente (absoluto, 96°, 80°).

3.- Lavado en PBS, durante 5 min.

4.- Bloqueo de la peroxidasa endógena en $H_2O_2$ al 0,3%, durante 30 min. a temperatura ambiente.

5.- Lavado en PBS (2 x 5 min.)

6.- Incubación en la NGS al 10%, durante 1 hora.

7.- Incubación en la 1ª capa (anti-PGFA), durante 4 horas a 4° (dilución 1/250).

8.- Lavado en PBS (3 x 15 min.)

9.- Incubación en la 2ª capa (anti-IgG de ratón), durante 2 horas a

temperatura ambiente (dilución 1/100).

10.- Lavado en PBS (3 x 15 min.)

11.- Incubación en el complejo PAP, durante 2 horas a temperatura ambiente (dilución 1/700).

12.- Lavado en PBS (3 x 15 min.)

13.- Tratamiento con DAB al 0,03% en PBS, durante 5 min.

14.- Revelado en DAB (0,03%) / $H_2O_2$ (0,01%) en PBS, durante 5 min.

15.- Lavado en PBS (3 x 10 min.)

16.- Algunas secciones fueron contrastadas con hematoxilina, durante 5 min., para poner de manifiesto los núcleos celulares.

17.- Lavado en $H_2O$ destilada.

18.- Deshidratación, aclaramiento y montaje con DpX.

### 3.5.2.- INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA.

#### A) En montajes planos.

El protocolo seguido fue:

1.- Lavado en PBS.

2.- Paso por alcohol de 80°, durante 15 min.

3.- Paso por alcohol de 96°, durante 15 min.

4.- Paso por alcohol absoluto, durante 30 min.

5.- Paso por xilol, durante 1 hora.

6.- Paso por alcohol absoluto, durante 30 min.

7.- Paso por alcohol de 96°, durante 15 min.

8.- Paso por alcohol de 80°, durante 15 min.

9.- Lavado en PBS (2 x 15 min.)

10.- Incubación en NGS al 10%, a 4°C, durante 24 horas.

11.- Incubación en la 1ª capa (anti-PGFA), a 4°C, durante 3-4 días, (dilución 1/150).

12.- Lavado en PBS (3 x 3 horas).

13.- Incubación en la 2ª capa (anti-IgG de ratón conjugado con FITC), a 4°C, durante 24 horas (dilución 1/50). Previamente este anticuerpo había sido incubado a 37°C en polvo de cerebro para ayudar a eliminar las señales de fondo.

14.- Lavado en PBS (3 x 3 horas).

15.- Montaje de las retinas usando Citifluor (Agar, U.K.).

**B) En secciones verticales de retina:**

El protocolo seguido fue:

1.- Desparafinado de los cortes en xilol.

2.- Hidratación de las secciones en una serie de alcoholes de concentración decreciente (absoluto, 96°, 80°).

3.- Lavado en PBS, durante 5 min.

4.- Incubación en NGS al 10%, durante 1 hora.

5.- Incubación en la 1ª capa (anti-PGFA), a 4°C, durante 4 horas (dilución 1/150).

6.- Lavado en PBS (3 x 15 min.)

7.- Incubación en la 2ª capa (anti-IgG de ratón conjugado con FITC; previamente preincubada con polvo de cerebro a 37°C), a 4°C, durante 2 horas.

8.- Lavado en PBS (3 x 15 min.)

9.- Montaje de las secciones utilizando Citifluor.

Las diluciones de los sueros, utilizados en las diferentes técnicas inmunohistoquímicas descritas, se realizaron en PBS conteniendo: NGS al 1% y Triton X-100 al 0,2%; excepto para la PAP que se diluyó sólo en PBS.

En todos los inmunomarcajes se realizaron los correspondientes controles, eliminando la incubación en el anti-PGFA, sustituyéndolo por suero normal de cabra (NGS), para demostrar que el anticuerpo secundario se une solamente a su correspondiente anticuerpo primario.

## 3.6.- OBSERVACIÓN DE LAS PREPARACIONES A MICROSCOPÍA ÓPTICA.

Para el estudio de las preparaciones teñidas con las diferentes técnicas se empleó un microscopio óptico Jenaval (Carl Zeiss Jena) equipado con contraste de fase interferencial (óptica de Nomarski), contraste de fase en campo claro y oscuro, así como con fluorescencia.

Este microscopio estaba también dotado de equipo fotográfico complementario; realizándose micrografías de las distintas preparaciones de retina, seleccionándose a partir de ellas, las presentes en este estudio.

Los registros fotográficos fueron realizados empleando las siguientes películas:

- para microscopía óptica: Ektachrome 100 y 200, Ektar 25 y 100.
- para microscopía óptica con fluorescencia: Ektachrome 400 y Tri-X-pan 400

# 4.- RESULTADOS

# 4.- RESULTADOS.

## 4.1.- MORFOLOGÍA Y DISTRIBUCIÓN DE LOS ASTROCITOS RETINIANOS MEDIANTE DETECCIÓN DE LA PROTEÍNA GFA.

Para la determinación de la distribución y localización de las células astrogliales, y facilitar la comprensión de los resultados que se exponen a continuación, hemos considerado conveniente realizar una división de la retina en diferentes áreas, en las cuales la distribución de los astrocitos sufre variaciones (Fig.1).

Macroscópicamente hemos dividido la retina en tres sectores principales:

1) retina peripapilar

2) área macular

3) retina periférica.

Consideramos como **retina peripapilar** una región de unos 7-10 mm. que rodea al disco óptico (bordeando el área macular). En esta zona nos encontramos con una gran densidad de axones de células ganglionares que se dirigen al disco óptico, para posteriormente constituir el nervio.

Además, en esta región, existe una abundante aportación sanguínea debido a la entrada de los vasos retinianos centrales que tras su ramificación ulterior irrigarán las distintas zonas de la retina. Por lo tanto, en este sector, se localizan los troncos temporales (superior e inferior) y nasales (superior e inferior) de la arteria central de la retina y sus diferentes ramas arteriolares que darán posteriormente los plexos capilares localizados en esta región:

- un plexo capilar interno de trayectoria longitudinal (acompañante de los axones), ubicado en la capa de fibras del nervio óptico. Estos capilares se denominan capilares peripapilares radiales;
- y un plexo capilar más externo, que se ramifica en los distintos tejidos retinianos (capa de células ganglionares, plexiforme interna, y nuclear interna).

También en esta región existen vasos venosos que se distribuyen de la misma forma que los del sistema vascular arterial.

El **área macular** es una zona circular de 5-6 mm. de diámetro, cuyo centro está situado a 4 mm. temporalmente y a 0,8 mm. inferiormente, con respecto al disco óptico. En el centro de esta región se observa una pequeña excavación de 1,5 mm. de diámetro denominada fovea.

A nivel de la fovea, la retina se encuentra muy adelgazada debido a una progresiva reducción del número de capas, persistiendo únicamente a nivel de la foveola los fotorreceptores, representados sólo por conos.

La suplencia sanguínea de esta región es llevada a cabo por arteriolas y capilares que forman arcadas alrededor del área macular. Sin embargo, algunos capilares pueden penetrar en la fovea, pero desaparecen totalmente dejando una zona de 0,4-0,5 mm. totalmente avascular.

También cabe destacar, cómo en esta región, los axones de las células ganglionares, que se dirigen hacia el disco óptico van a tener una trayectoria diferente con respecto a los de la parte nasal, superior e inferior de la retina, que llevan una trayectoria bastante recta hacia el disco óptico.

Las fibras nerviosas que se originan en el lado nasal (respecto a la fovea) al dirigirse hacia el disco presentan una trayectoria rectilinea formando el denominado *"haz papilomacular"*. En el lado temporal a la fovea nos encontramos con una estructura llamada *"rafe medio"*, que es una banda estrecha situada en el meridiano horizontal en la cual los axones de ambos lados se entrecruzan: los

axones que derivan de las células ganglionares localizadas en una zona ligeramente superior al rafe realizan una curva dirigiéndose hacia la zona inferior del disco, mientras que los originados en la zona ligeramente inferior van hacia la zona superior del disco.

Por último, hemos definido como **retina periférica**, la región comprendida desde los bordes de la retina peripapilar y la zona macular hasta la *Ora Serrata*. Es una región muy amplia en la cual el tejido se va adelgazando progresivamente, llegando a desaparecer la mayoría de las capas celulares a nivel de la Ora serrata, y a partir de este punto nos encontramos con la denominada *"retina ciega"*.

El número de vasos sanguíneos también decrece progresivamente hacia las zonas más periféricas, observándose los últimos capilares retinianos en las proximidades de la Ora serrata.

### 4.1.1.- LOCALIZACIÓN DE LOS ASTROCITOS EN LA RETINA HUMANA.

Para determinar la localización de los astrocitos en las distintas regiones, hemos utilizado montajes planos de retina, marcados con el anticuerpo contra la

proteína GFA.

Estas preparaciones nos han permitido constatar que todas las regiones retinianas presentan señal PGFA(+), con la excepción de la zona avascular de la fovea y la retina más periférica próxima a la Ora serrata.

La señal PGFA(+) más intensa se detecta en la región peripapilar (Fig.2) decreciendo paulatinamente hacia la periferia de la retina (Fig. 3); como también en la zona macular donde la señal disminuye hacia la fovea (Fig. 4).

Al analizar la distribución de los astrocitos con respecto a los vasos sanguíneos vemos que ambos siguen un patrón semejante: los astrocitos son muy numerosos en la retina peripapilar (Fig. 2), donde existe una gran densidad vascular, decreciendo paulatinamente, al igual que el número de vasos, hacia la retina periférica (Fig. 3), llegando a desaparecer junto con los vasos en las proximidades de la Ora serrata (Fig. 4).

Además, es de destacar, que en la zona avascular de la fovea también desaparecen los astrocitos, interrumpiéndose bruscamente la señal PGFA(+) de la misma forma que el plexo capilar macular (Fig. 5).

Para la determinación de la ubicación de los astrocitos en las diferentes capas retinianas hemos estudiado secciones transversales de retina, marcadas con anti-PGFA.

La señal PGFA(+) la observamos a nivel de la capa de fibras del nervio óptico, capa de células ganglionares, plexiforme interna, y nuclear interna; si bien, la señal más intensa se encuentra a nivel de capa de F.N.O. y capa de células ganglionares (Fig. 6).

Al estudiar secciones transversales de retina teñidas con la técnica del PAS encontramos que los vasos sanguíneos se localizan de forma mayoritaria en la capa de F.N.O. y capa de células ganglionares, introduciéndose capilares hasta las capas plexiforme interna y nuclear interna (Fig. 7).

Esta distribución de los vasos sanguíneos coincide con la de los astrocitos mencionada anteriormente, confirmándose lo hallado en los montajes planos.

La mayoría de los cuerpos celulares de los astrocitos se ubican en la capa de F.N.O. y capa de células ganglionares; no obstante, hemos localizado en algunas ocasiones astrocitos y prolongaciones (pertenecientes a células situadas en la capa de células ganglionares) acompañando a los capilares retinianos más externos, que

se introducen en el parénquima hasta las capas plexiforme y nuclear internas (Fig.8).

La localización de los astrocitos en las cuatro capas retinianas (F.N.O., células ganglionares, plexiforme interna, nuclear interna) no es homogénea en los diferentes sectores en los que inicialmente dividimos la retina.

En la retina peripapilar, donde el espesor retiniano es grande, los astrocitos se disponen en los cuatro estratos (Figs. 6 y 8); sin embargo, hacia la retina periférica, los astrocitos se localizan fundamentalmente en la capa ganglionar (Fig.9), ya que la capa de F.N.O. se va haciendo progresivamente más fina. Aunque hemos de constatar, que en la zona de la retina periférica próxima al sector peripapilar siguen observándose astrocitos en la capa de F.N.O.

Por último, en el área macular, también se produce una disminución progresiva del espesor retiniano a nivel de la fovea, desapareciendo la capa de fibras del nervio óptico, por lo tanto, en este punto, las células astrogliales se disponen en la capa de células ganglionares al igual que los capilares, desapareciendo totalmente la señal PGFA(+) a nivel de la zona avascular de la fovea (Fig. 10).

## 4.1.2.- MORFOLOGÍA DE LOS ASTROCITOS RETINIANOS.

Al observar un montaje plano de retina marcado con anti-PGFA podemos afirmar que la inmunoreactividad viene determinada por la sumación de señales procedentes de unidades celulares individuales.

El producto de la reacción se localiza en las prolongaciones gliales y en la región citoplasmática perinuclear; sin embargo, el núcleo es PGFA negativo, aunque la señal circundante del pericarion hace que éste se destaque y no necesitemos tinción nuclear de contraste para su identificación.

Todos los astrocitos encontrados en la retina humana presentan unos rasgos morfológicos comunes, como el pequeño tamaño del cuerpo celular, y la disposición prominente del núcleo; pero, también poseen una serie de rasgos distintivos entre ellos, como el tamaño y orientación de sus prolongaciones.

En base a la diferente orientación de las prolongaciones celulares, hemos clasificado a los astrocitos retinianos humanos en dos grandes grupos:

- astrocitos alargados,
- astrocitos estrellados.

Dentro de cada grupo podemos encontrarnos con distintas morfologías, pero todas tienen en común la orientación de sus prolongacionales principales como rasgo definitorio.

### 4.1.2.1.- ASTROCITOS CON MORFOLOGÍA ALARGADA.

Los astrocitos pertenecientes a este grupo presentan una serie de características comunes: son células con una inmunoreactividad PGFA(+) que puede variar entre media y alta; el cuerpo celular es pequeño y oval y la inmunoreactividad que presenta hace que el núcleo, pequeño y ovoideo, resalte (Figs. 11, 12, 13 y 14).

De cada polo del pericarion derivan de dos a cuatro prolongaciones primarias, de una gran longitud, que van a seguir el curso de los axones de las células ganglionares, por lo que son prolongaciones con una trayectoria bastante rectilinea (Figs. 11, 12, 13 y 14).

Asimismo, del pericarion de estos astrocitos también van a poder partir prolongaciones cortas que, o bien, se introducen en el parénquima retiniano hacia

la capa de células ganglionares, o bien, adoptan una dirección perpendicular a los axones dirigiéndose hacia otros astrocitos próximos, donde posteriormente se dispondrán paralelos a las prolongaciones de estos últimos (Figs. 12 y 13).

El cuerpo celular de los astrocitos pertenecientes a este grupo, se localiza en la capa de F.N.O. Estas células se sitúan entre los haces de axones de las células ganglionares, entre los capilares peripapilares radiales de trayectoria longitudinal, así como entre los distintos vasos arteriales o venosos que se disponen en esta capa (Fig. 15).

Las prolongaciones pertenecientes a estos astrocitos no se suelen disponer aisladas, sino que tienden a unirse unas con otras alineándose en paralelo para formar haces de prolongaciones astrogliales, los cuales delimitan los haces de axones de las células ganglionares que se dirigen hacia el disco óptico (Figs. 11, 12, 13 y 14).

Estas prolongaciones no sólo se van a relacionar con los axones, sino que también van a mantener contactos con los vasos sanguíneos ubicados en la capa de F.N.O. (Fig. 15).

Dentro de este grupo astroglial nos podemos encontrar con células de morfología variada pero siempre manteniendo los rasgos morfológicos comunes descritos.

Seguidamente realizaremos una descripción de los astrocitos cuya morfología se repite de forma más común, subdividiendo los astrocitos alargados en 4 subgrupos: $A_1$, $B_1$, $C_1$, y $D_1$.

*** Subgrupo $A_1$.**

En este subgrupo hemos englobado a los astrocitos que se caracterizan por presentar dos prolongaciones primarias que derivan de cada polo de la célula. Estas prolongaciones, a una corta distancia del núcleo, se dividen de forma dicotómica dando lugar a dos prolongaciones secundarias en forma de horquilla, de gran longitud (Figs. 11 y 59).

Estas ramificaciones se disponen en el mismo plano que el cuerpo celular, siguiendo una trayectoria bastante rectilínea; sin embargo, en ocasiones, pueden abrirse para dirigirse hacia otro haz de prolongaciones astrogliales de localización próxima.

*** Subgrupo $B_1$.**

En este subgrupo hemos incluido astrocitos que presentan una morfología semejante a los del grupo anterior, aunque en ellos, podamos resaltar algunas diferencias.

Son células, como las del grupo A1, con dos prolongaciones primarias, que se dividen en otras secundarias, de gran longitud, en las proximidades del núcleo. Sin embargo, y a diferencia de los anteriores, estos astrocitos se van a caracterizar por la presencia de prolongaciones cortas que derivan radialmente del pericarion (Figs. 12 y 59).

Estas últimas van a poder introducirse en el parénquima retiniano hacia la capa de células ganglionares, o bien, en otras ocasiones pueden dirigirse hacia otro haz de prolongaciones astrogliales de localización muy próxima.

*** Subgrupo $C_1$.**

Las células pertenecientes a este subgrupo tienen como característica principal el presentar una prolongación celular primaria que se dirige hacia otro haz astroglial próximo; por tanto, podemos decir que en este grupo nos encontramos

con células de unión de dos haces astrogliales.

La prolongación celular que va a formar parte de otro haz astroglial próximo puede llevar la misma trayectoria que cursaba, o bien, puede girar 180° para seguir la dirección de las prolongaciones del otro polo celular (Fig.13).

Dentro de este grupo, nos encontramos con astrocitos que además de poseer las prolongaciones primarias que giran 180°, presentan prolongaciones cortas que derivan del polo celular a modo de penacho (Figs. 13 y 59).

Estas últimas, sin embargo, pueden introducirse en el parénquima retiniano, o bien, pueden disponerse en el mismo plano que el resto de las prolongaciones.

*** Subgrupo $D_1$.**

La característica principal de las células que constituyen este subgrupo es su morfología intermedia entre los astrocitos alargados y estrellados. También, cabe destacar, que al igual que las células del subgrupo anterior, son astrocitos de unión entre diferentes haces de prolongaciones astrogliales.

Estas células gliales, emiten de cada polo celular de dos a cuatro prolongaciones primarias de gran longitud, que siguen la dirección de los axones de las células ganglionares (Fig. 14). Éstas posteriormente, pueden dividirse en otras prolongaciones secundarias de menor calibre.

Las prolongaciones primarias, originadas en un polo celular pueden formar parte de haces astrogliales diferentes, lo que determina el aspecto más estrellado de estas células (Fig. 59).

### 4.1.2.2.- ASTROCITOS CON MORFOLOGÍA ESTRELLADA.

Los astrocitos con morfología estrellada van a presentar una serie de características comunes que han hecho posible englobar a estas células en este grupo.

Son células con una alta inmunoreactividad PGFA(+). Presentan un cuerpo celular pequeño y alargado, del que protuye un núcleo ovoide PGFA negativo.

Normalmente, del pericarion de la célula parten de cuatro a ocho prolongaciones primarias que posteriormente pueden dividirse en otras secundarias de menor calibre (Figs. 16, 17, 19, 20 y 22).

En la mayoría de las células de este grupo, las prolongaciones astrogliales parten radialmente del pericarion, dándole a la célula un aspecto estrellado. Estas prolongaciones pueden ser de gran longitud, y contactan con otros astrocitos o con los vasos sanguíneos formando un plexo astroglial con una morfología en "panal de abeja" (Fig. 18).

Las prolongaciones de estos astrocitos van a presentar una relación muy estrecha con los vasos sanguíneos. En la retina periférica, en donde existe una menor densidad de astrocitos y por tanto es más sencillo verlos aislados, hemos podido constatar como algunas de las prolongaciones de una célula se disponen sobre el vaso sanguíneo llevando una trayectoria paralela a éste; de esta prolongación normalmente de gran longitud, pueden partir prolongaciones secundarias cortas, que terminan sobre el vaso a modo de pies vasculares (Figs. 19 y 20).

En otras ocasiones, la prolongación del astrocito al llegar a un vaso sanguíneo, puede dividirse en otras secundarias que se abren en abanico para

unirse posteriormente al vaso (Fig. 19).

También hemos observado como prolongaciones secundarias en forma de gancho, pueden abrazar a un vaso sanguíneo (Fig. 20).

Realmente, no todas las prolongaciones de un astrocito situado próximo a un vaso van a mantener contactos con éste, sino que muchas veces pueden pasar de largo para dirigirse hacia otro vaso próximo y allí realizar los contactos (Fig. 19), o por el contrario pueden unirse a otras prolongaciones de astrocitos para formar parte de un haz astroglial (Fig. 20).

Hemos observado que los astrocitos mantienen este tipo de contactos vasculares tanto con arterias, venas o capilares, constituyendo una envuelta astroglial que los rodea y hace muy sencilla su visualización (Fig. 21).

El cuerpo celular de estos astrocitos puede localizarse en el interior de las celdillas (Figs. 16 y 17), sobre o muy próximos a los vasos sanguíneos (Figs. 19 y 20), o bien formando parte de los haces de prolongaciones astrogliales (Fig.22). En este último caso, los cuerpos celulares de los astrocitos se entremezclan entre los haces astrogliales formando puentes de unión entre los vasos sanguíneos que se encuentran situados a una mayor distancia.

Los astrocitos pertenecientes a este grupo se encuentran fundamentalmente en la capa de células ganglionares, si bien, puede observarse con cierta regularidad prolongaciones que se introducen verticalmente en el parénquima retiniano hasta la capa plexiforme interna, o incluso hasta la nuclear interna, acompañando a los capilares retinianos más externos (Figs. 6 y 8).

Estas células se distribuyen de una forma regular por los distintos sectores retinianos con la excepción de la zona avascular de la fovea (Fig. 10) y de la zona próxima a la ora serrata (Fig. 3), constituyendo una malla bastante densa de disposición horizontal ubicada en la capa de células ganglionares (Figs. 18 y 21).

Por último, también debemos reseñar, que hemos encontrado este tipo celular estrellado en la capa de fibras del nervio óptico del rafe medio (Fig.23).

De acuerdo a la localización del cuerpo celular hemos dividido a los astrocitos estrellados en tres subgrupos: $A_2$, $B_2$, $C_2$.

*** Subgrupo $A_2$.**

En el subgrupo $A_2$ englobamos a las células cuyo pericarion se sitúa próximo a un vaso sanguíneo, en el interior de una celdilla constituyente del plexo

astroglial de la capa de células ganglionares (Figs. 16, 17 y 60).

Estos astrocitos presentan una morfología estrellada. Del pericarion parten de cuatro a ocho prolongaciones radiales que se dirigen hacia los vasos sanguíneos próximos, o también hacia los haces astrogliales de localización más cercana (Figs. 16, 17 y 60).

Las prolongaciones primarias originan otras secundarias de menor calibre. Las primarias pueden dividirse, o bien, dicotómicamente (a modo de horquilla), o bien, en forma de abanico dando lugar a las prolongaciones secundarias que van a realizar los contactos tanto con los vasos como con los haces astrogliales (Figs. 16, 17 y 60).

Algunas prolongaciones secundarias de calibre más fino, originadas en las zonas más próximas al cuerpo celular del astrocito, se disponen en el interior de las celdillas del plexo astroglial, sin contactar aparentemente con ninguna estructura; sin embargo, en algunas ocasiones estas prolongaciones se introducen en el parénquina retiniano, dirigiéndose hacia otras capas (plexiforme y nuclear interna).

*** Subgrupo $B_2$.**

En este subgrupo incluimos a los astrocitos cuyo cuerpo celular se dispone directamente sobre la pared de los vasos sanguíneos o muy cerca de ellos (Figs. 19, 20 y 60).

Estas células presentan una morfología un poco menos estrellada que la del subgrupo anterior.

Del pericarion parten prolongaciones que se distribuyen sobre las paredes de vaso (en el cual esta situado), formando parte de la envuelta astroglial vascular; mientras que, otras prolongaciones pueden dirigirse hacia otro vaso sanguíneo próximo, o hacia un haz astroglial, para formar parte de él (Figs. 19, 20 y 60).

Las células pertenecientes a este subgrupo son muy numerosas, destacando que en muchas ocasiones hemos observado como en algunas zonas de los vasos, los cuerpos celulares de estos astrocitos se agrupan formando estructuras a modo de *"racimos"* (Fig. 24 A y B).

En estos racimos, las prolongaciones celulares que no se dirigen hacia el vaso en el que se localizan, se unen entre sí para formar un pequeño haz astroglial, que posteriormente se unirá a otro haz astroglial de posición cercana, o se abrirá en

abanico para contactar con un vaso sanguíneo (Fig. 24 A y B).

*** Subgrupo $C_2$.**

A este subgrupo pertenecen aquellos astrocitos cuyo pericarion se dispone formando parte de un haz astroglial (Figs. 22 y 60).

Estas células van a presentar una morfología algo menos estrellada, ya que muchas de sus prolongaciones van a participar en la formación del haz donde se encuentran situadas; sin embargo, otras prolongaciones que parten de forma más radial del pericarion, pueden dirigirse hacia un vaso sanguíneo próximo para formar parte de la envuelta glial vascular, como también se van a dirigir hacia el interior de una celdilla constituyente del plexo axtroglial de la capa de células ganglionares (Figs. 22 y 60).

### 4.1.3.- DISTRIBUCIÓN DE LOS ASTROCITOS RETINIANOS.

Las prolongaciones de los astrocitos, como hemos visto anteriormente, tienden a unirse unas con otras para constituir haces.

Es importante resaltar aquí, que la distribución de estos haces varía dependiendo de la capa retiniana en que se encuentran ubicados.

Por tanto, hemos diferenciado por un lado los haces astrogliales de la capa de células ganglionares, y por otro, los haces astrogliales de la capa de fibras del nervio óptico.

### 4.1.3.1.- HACES ASTROGLIALES DE LA CAPA DE CÉLULAS GANGLIONARES.

Los astrocitos con morfología estrellada, localizados en la capa de células ganglionares, tienden a unir sus prolongaciones celulares formando haces que se van a distribuir de una forma regular a través de toda la retina, con la excepción de la zona avascular de la fovea y las proximidades de la Ora serrata, como ya vimos con anterioridad.

Estos haces se van a interconectar formando un plexo, cuya morfología recuerda a un panal de abejas (Figs. 18 y 25).

Este plexo va a rodear a los distintos vasos sanguíneos disponiéndose entre ellos.

Los vasos sanguíneos, se encuentran tapizados totalmente por las prolongaciones astrogliales que forman el plexo, de tal forma, que podemos seguir con una gran nitidez la trayectoria de todos los vasos localizados en esta capa, ya sean arterias, venas o capilares (Fig. 25).

Además, no hemos encontrado ninguna diferencia en cuanto a la distribución de estas prolongaciones astrogliales en los diferentes tipos de vasos (arteriales o venosos) (Figs. 18 y 25).

Los haces de prolongaciones astrogliales van a ir conectando los distintos vasos sanguíneos siguiendo una trayectoria más o menos paralela al curso de los axones de las células ganglionares situados en la capa de fibras del nervio óptico, de tal forma que cuando llegan a un vaso sanguíneo, las prolongaciones que constituyen los haces se abren en abanico, algunas de éstas giran 90° originando unas estructuras paralelas a las paredes de los vasos en forma de cayado, que van a constituir parte de la malla astroglial que rodea a éstos; el resto de las prolongaciones rodearan el vaso, uniéndose a otras prolongaciones astrogliales

para constituir un nuevo haz astroglial que se dirigirá hacia otro vaso sanguíneo próximo (Fig. 26).

Por consiguiente, los distintos haces astrogliales formarán una estructura de prolongaciones interconectadas dispuestas entre los vasos sanguíneos, con una morfología en panal de abeja o celdillas, como hemos expuesto con anterioridad.

Entre los huecos de las celdillas van a poder ubicarse los somas de las células ganglionares (Fig. 27).

En este plexo astroglial los cuerpos celulares de los astrocitos estrellados se disponen mayoritariamente sobre, o muy cerca, de los vasos sanguíneos, formando en muchas ocasiones agrupaciones a modo de racimos; sin embargo, como ya hemos indicado en el apartado referido a la morfología de los astrocitos, éstos también se disponen en el interior de los panales, o bien, formando parte de los haces astrogliales.

El plexo astroglial de la capa de células ganglionares va a presentar una serie de variaciones dependiendo del sector retiniano.

El plexo astroglial de la **retina peripapilar** es muy compacto, estando constituido por panales de tamaño muy pequeño (Fig. 28).

En este sector, como ya vimos anteriormente, existe una gran densidad de vasos sanguíneos, por lo que los haces astrogliales tienen que correr distancias muy cortas para alcanzar el vaso sanguíneo más próximo, y por tanto, las celdillas que constituyen el plexo presentan un tamaño pequeño (Fig. 28).

En la **retina periférica**, los panales que constituyen el plexo astroglial de la capa ganglionar van a ir aumentando de tamaño progresivamente (Fig. 29) hacia las proximidades de la Ora serrata, donde desaparece.

Esto es debido al descenso progresivo en el número de vasos sanguíneos que se produce en este sector, razón por la cual, las distancias que tendrán que recorrer los haces astrogliales hasta alcanzar los vasos sanguíneos, cada vez serán mayores, y por tanto, también aumentará el tamaño de las celdillas (Fig. 29).

En las proximidades de la *Ora Serrata*, nos vamos a encontrar con que únicamente van llegar escasos capilares; además, en esta región, también existe un número muy reducido de astrocitos, por lo que las comunicaciones entre los vasos se van a realizar mediante prolongaciones aisladas de astrocitos (cuando los vasos se sitúan próximos), o mediante hileras de astrocitos dispuestos unos detrás

de otros (comunicando los vasos que se sitúan más lejanos) (Fig. 30).

Por estos motivos, resulta más difícil distinguir en esta zona la morfología en panal de abeja del plexo astroglial de la capa ganglionar (Fig. 30).

Por último, en el **área macular**, también existe una disminución del número de vasos, los cuales desaparecen de forma abrupta. Los capilares existentes forman arcadas alrededor de la fovea, por lo que el plexo astroglial es más difícil de identificar (Figs. 4 y 31). En el límite entre las zonas avascular y vascular de la fovea, existen escasos capilares, y los astrocitos estrellados localizados en esta zona se disponen de forma más aislada debido al descenso del número de células (Figs. 5 y 32).

Los astrocitos estrellados de la capa de células ganglionares, no sólo van a constituir el plexo astroglial de esta capa, sino que además emiten prolongaciones que se introducen en el parénquima retiniano incluso hasta la capa nuclear interna (Figs. 6, 8, y 33).

Las prolongaciones astrogliales, y algunos cuerpos celulares que se encuentran desplazados en estas capas, van a acompañar a los capilares retinianos más externos en su recorrido (Fig. 8).

Los vasos, junto con las prolongaciones, van a cursar inicialmente una trayectoria bastante vertical, para luego, disponerse horizontalmente en las capas retinianas internas (plexiforme y nuclear), constituyendo un plexo de morfología irregular (Fig. 33).

Este plexo se observa con gran claridad en las secciones verticales de retina (Figs. 6, 8 y 33), si bien también lo hemos podido detectar en los montajes planos, aunque con mayor dificultad debido a su localización más intraparenquimatosa (Fig. 34 A y B).

En la Fig. 34 A, observamos un montaje plano de retina en el que el foco está a nivel de la capa de células ganglionares, y por lo tanto, no se observa este plexo superficial; sin embargo, si en esa misma zona, enfocamos las capas retinianas internas (plexiforme y nuclear) (Fig. 34 B), podemos apreciar con nitidez un plexo con morfología irregular constituido por prolongaciones celulares escasas que van a formar una maraña, y que siguen el curso tortuoso de los capilares retinianos externos.

### 4.1.3.2.- HACES ASTROGLIALES DE LA CAPA DE FIBRAS DEL NERVIO ÓPTICO.

Los astrocitos con morfología alargada de la capa de fibras del nervio óptico, presentan prolongaciones que derivan de los polos celulares. Estas prolongaciones de gran longitud van a unirse, unas con otras, de forma paralela entre sí para constituir haces astrogliales que sigue la trayectoria de los axones de las células ganglionares (Figs. 35 y 36).

Estos haces van a unirse mediante prolongaciones que derivan perpendicularmente de los cuerpos celulares de los astrocitos, y que se dirigen del haz donde se encuentra situado su pericarion hacia el haz próximo, como ya describimos anteriormente (Figs. 13 y 14).

Los haces astrogliales se disponen entre los haces axonales, fasiculándolos; sin embargo, los astrocitos alargados que forman parte del haz, también van a poder mandar prolongaciones hacia los vasos sanguíneos próximos, ya sean los capilares peripapilares radiales, o vasos de mayor calibre (Fig. 15).

Los haces astrogliales de esta capa, no van a tener una disposición regular a lo largo de toda la retina, como sucedía con el plexo astroglial de la capa ganglionar, sino que, se van a distribuir únicamente en un área de 175 $mm^2$ centrada en el disco óptico (Fig. 37).

Esta superficie comprende toda la retina peripapilar y gran parte del área macular (con la excepción de las zonas próximas a la fovea).

En la **retina peripapilar** existe una gran densidad de haces astrogliales en esta capa, debido por un lado, a la gran cantidad de axones que se dirigen hacia el disco óptico, y por otro, a la gran abundancia de vasos sanguíneos existentes (capilares del plexo longitudinal de las fibras nerviosas, así como vasos arteriales y venosos).

A medida que nos aproximamos hacia la **retina periférica**, la capa de fibras del nervio óptico disminuye en espesor: ya que desciende el número de axones y desaparece el plexo capilar de las fibras nerviosas. En correlación con esta situación, también observamos una disminución en cuanto a la densidad de haces astrogliales en este sector. Estos, cada vez son más difíciles de observar hacia la retina periférica, ya que las prolongaciones astrogliales se hunden en el parénquima retiniano fundiéndose con el plexo astroglial de la capa de células

ganglionares (Fig. 37).

A nivel **macular**, los haces astrogliales van a llevar la misma trayectoria que los axones de las células ganglionares, y al igual que los capilares perimaculares se disponen de una forma más o menos concéntrica a la fovea (Fig. 38).

Sin embargo, debemos destacar, que en la *región del haz papilomacular*, los haces astrogliales longitudinales son muy numerosos, disponiéndose unos a lado de los otros formando hileras muy compactas, con una trayectoria bastante rectilinea, al igual que los axones de las células ganglionares (Fig. 39).

Estos haces astrogliales longitudinales, desaparecen a nivel de la fovea, cuando también se produce una disminución del espesor de la capa de FNO.

Por último, cabe reseñar, que los haces astrogliales que se localizan en la zona del *rafe medio*, se disponen concéntricos a la fovea, si bien, los astrocitos que los constituyen van a tener una morfología más estrellada, asemejándose a los astrocitos estrellados de la capa de células ganglionares (Fig. 40).

Los resultados de las observaciones realizadas a microscopía óptica se encuentran representados de forma esquemática en las figuras 61, 62 y 63, en las

cuales se ha realizado una reconstrucción tridimensional de la distribución de los astrocitos en las tres regiones en las que hemos dividido la retina para este estudio:

- retina peripapilar: Fig. 61
- área macular: Fig. 62
- y retina periférica: Fig. 63

## 4.2. OBSERVACIONES A MICROSCOPÍA ELECTRÓNICA.

Como complemento a nuestros resultados obtenidos con las técnicas inmunohistoquímicas, hemos realizado un estudio ultraestructural de los astrocitos así como de las estrechas relaciones que mantienen con las diferentes estructuras retinianas (glia de Müller, células ganglionares y sus axones, vasos sanguíneos), que resultaban difíciles de observar a microscopía óptica.

Además, hay que tener en cuenta, que el marcador utilizado en las técnicas inmunohistoquímicas, el anti-PGFA, se une a los filamentos intermedios gliales, y por tanto era de interés determinar la abundancia de estos filamentos en estas células así como su localización.

### 4.2.1.- CARACTERÍSTICAS ULTRAESTRUCTURALES DE LOS ASTROCITOS RETINIANOS.

Hemos podido observar a microscopía electrónica la existencia de dos tipos principales de células macrogliales en la retina humana: los astrocitos y las células de Müller.

Ambos tipos celulares pueden ser fácilmente diferenciados por la distinta densidad a los electrones que presentan sus citoplasmas: la glia de Müller es una célula muy electrodensa (Fig. 41), mientras que, el astrocito presenta una menor densidad a los electrones (Fig. 42).

Como ya pudimos constatar a microscopía óptica, encontramos que los núcleos de los astrocitos se localizan fundamentalmente a nivel de las capas de fibras del nervio óptico y células ganglionares (Fig. 43). Sin embargo, en ocasiones, se han detectado algunos núcleos a nivel de las capas plexiforme y núclear internas; si bien, en estos estratos retinianos, son mucho más abundantes las prolongaciones astrocitarias que se interponen y relacionan con las distintas estructuras retinianas.

La glia de Müller, además de por su electrodensidad, se distingue de los astrocitos, por la localización de sus núcleos únicamente en la capa nuclear interna, así como por su disposición radial con respecto a la retina constituyendo las dos limitantes retinianas: la membrana limitante externa (Fig. 43) y la membrana limitante interna (Figs. 43 y 44).

Estas células poseen un núcleo poligonal con una morfología más o menos triangular. El citoplasma es muy oscuro debido a la presencia de abundante

material filamentoso y de numerosas partículas de glucógeno, lo que hace que sea muy difícil diferenciar los orgánulos celulares (Fig. 41). Hemos de destacar, que este material filamentoso está constituido por filamentos de 6-8 nm. de diámetro que se orientan paralelos entre sí (Fig. 45) y también por microtúbulos.

Ultraestructuralmente, los astrocitos presentan un núcleo relativamente oscuro, en el que se distingue una cromatina abundante y acúmulos de heterocromatina (Figs. 42 y 45). La morfología de estos núcleos puede variar encontrándonos formas alargadas o redondeadas (Fig. 46).

Una característica importante de estos astrocitos, es la baja densidad a los electrones que presenta su citoplasma celular. En él, destacan diferentes orgánulos citoplasmáticos como: retículo endoplásmico rugoso, ribosomas libres, mitocondrias, aparato de Golgi, además de partículas de glucógeno y de filamentos intermedios gliales, de 10 nm., que forman densos paquetes (Figs. 42 y 45).

Estos filamentos gliales son muy abundantes y se localizan, tanto en el pericarion, como en las prolongaciones, lo que facilita enormemente el reconocimiento de estas células.

En las prolongaciones celulares disminuyen el número de orgánulos citoplasmáticos permaneciendo fundamentalmente los filamentos intermedios que llenan la mayor parte de la prolongación, y algunas mitocondrias (Fig. 47).

En las preparaciones obtenidas de individuos de mayor edad, hemos observado en su citoplasma, además de los orgánulos típicos y de los filamentos intermedios, cuerpos densos y lipofuchsina (Figs. 42 y 45).

### 4.2.2.- PARTICIPACIÓN DE LOS ASTROCITOS EN LA FORMACIÓN DE LA MEMBRANA LIMITANTE INTERNA DE LA RETINA.

Ultraestructuralmente, la membrana limitante interna de la retina está constituida por una membrana basal clara, con un aspecto liso hacia la cara del vítreo, mientras que, hacia la cara retiniana presenta numerosas invaginaciones y evaginaciones (Figs. 43, 44 y 48).

Además, también está constituida por las prolongaciones terminales de la glia de Müller que se acoplan entre las interdigitaciones de la membrana basal. Estas prolongaciones se distinguen claramente por su carácter electrodenso (Figs. 44 y 48).

Sin embargo, y en menor número, también observamos prolongaciones con un aspecto claro en cuyo interior encontramos numerosos filamentos gliales paralelos entre sí y algunas mitocondrias, pertenecientes a células astrocitarias.

Estas prolongaciones se intercalan entre las prolongaciones de la glia de Müller formando también parte de la membrana limitante interna (Fig. 48).

Cabe destacar, que en ocasiones los cuerpos celulares de los astrocitos también pueden formar parte de esta limitante retiniana.

Hemos encontrado uniones celulares estrechas entre las distintas prolongaciones gliales que forman esta membrana; de tal forma que observamos desmosomas uniendo las prolongaciones de las células de Müller entre sí (Fig. 49), entre éstas y las prolongaciones astrocitarias, así como entre prolongaciones astrogliales.

Finalmente, cabe destacar algunas uniones celulares de tipo "gap" únicamente entre las prolongaciones de los astrocitos.

## 4.2.3.- PARTICIPACIÓN DE LOS ASTROCITOS EN LA FORMACIÓN DE LAS ENVUELTAS AXONALES Y NEURONALES.

### 4.2.3.1.- ASTROCITOS EN LA CAPA DE FIBRAS DEL NERVIO ÓPTICO.

La capa de fibras del nervio óptico está constituida fundamentalmente por los axones de las células ganglionares. Éstos, ultraestructuralmente son amielínicos, presentando un citoplasma con neurofibrillas, microtúbulos, mitocondrias y algunas vesículas de retículo endoplásmico liso (Fig. 49).

Los axones, de distintos tamaños, pueden estar unidos unos a otros agrupándose en haces delimitados por prolongaciones gliales: oscuras (glia de Müller), o claras (astrocitos); distinguiéndose por la presencia de filamentos gliales (Fig. 49).

Estas prolongaciones gliales pueden ser muy finas, mientras que, en ocasiones son más gruesas adquiriendo prácticamente el tamaño del axón. En este último caso, hemos observado, en una ocasión, como en el interior de la prolongación astrocitaria los filamentos gliales adquieren una estructura muy característica formando unos paquetes densos de filamentos paralelos, que se disponen en el

centro de la prolongación a modo de herradura rodeando a una mitocondria (Fig.50).

Los núcleos de los astrocitos se disponen entre los axones, localizándose en ocasiones próximos a los vasos sanguíneos, presentando una morfología alargada (Fig. 51).

Al analizar las uniones celulares encontradas entre las distintas prolongaciones gliales, observamos que son muy semejantes a las encontradas a nivel de la membrana limitante interna.

Existen uniones estrechas de tipo desmosoma entre las prolongaciones de la glia de Müller, entre glia de Müller y astrocito, y entre astrocito y astrocito; sin embargo, en estos últimos, también encontramos uniones tipo "Gap" (Fig. 50).

### 4.2.3.2.- ASTROCITOS EN LA CAPA DE CÉLULAS GANGLIONARES.

La capa de células ganglionares está constituida fundamentalmente por estas neuronas, cuyo tamaño es variable desde células muy voluminosas hasta otras más pequeñas.

Ultraestructuralmente las células ganglionares se caracterizan por presentar un núcleo redondeado y claro con una cromatina dispersa (Figs. 52 y 53). El citoplasma celular es poco electrodenso encontrándonos en él gran cantidad de ribosomas libres, retículo endoplásmico rugoso, mitocondrias y aparato de Golgi (Figs. 52 y 53).

Estas células normalmente se disponen adyacentes entre sí, pero se encuentran en la mayoría de las ocasiones separadas por prolongaciones gliales, que son fundamentalmente de células de Müller, y forman una línea divisoria continua bastante recta y estrecha entre las neuronas, aunque hay tramos en los que podemos observar evaginaciones e invaginaciones (Figs. 44 y 52).

Los cuerpos celulares de los astrocitos de esta capa se disponen próximos a los vasos sanguíneos, interpuestos entre las células ganglionares (Fig. 52); si bien, en ocasiones también encontramos prolongaciones astrocitarias localizadas entre las neuronas pero sin formar una envuelta continua (Fig. 53).

También, y al igual que en las capas anteriores, observamos desmosomas entre las prolongaciones de la glia de Müller, entre glia de Müller y astrocitos, así como entre astrocito y astrocito (Figs. 54 y 55A,B); aunque también, en

alguna ocasión hemos encontrado desmosomas entre una célula ganglionar y un astrocito (Fig. 55 A y B)

Además, hay uniones tipo Gap entre prolongaciones astrogliales.

### 4.2.4.- PARTICIPACIÓN DE LOS ASTROCITOS EN LAS LIMITANTES GLIALES DE LOS VASOS SANGUÍNEOS.

La participación de los astrocitos en la formación de las limitantes vasculares gliales observada a microscopia óptica con las técnicas inmunohistoquímicas es confirmada a microscopía electrónica.

Todos los vasos sanguíneos retinianos (grandes, medianos y capilares), están rodeados de prolongaciones gliales, pertenecientes tanto a las células de Müller como a los astrocitos (Figs. 56 y 57).

En los capilares retinianos (constituidos por células endoteliales y pericitos rodeados por la membrana basal), las prolongaciones gliales se disponen sobre la membrana basal. Ésta última, en los individuos de más edad, está muy engrosada

y con gran cantidad de cavitaciones (Fig. 56).

Las prolongaciones gliales separan totalmente la membrana basal del resto del tejido nervioso, formando capas en las que se alternan prolongaciones de Müller con prolongaciones astrocitarias (Fig. 56).

Asimismo, hemos observado como en ocasiones los cuerpos celulares de los astrocitos y la glia de Müller se disponen muy próximos a los vasos (Figs. 51, 52, 56 y 57).

En los vasos de mayor calibre podemos distinguir, además de a las células endoteliales y su membrana basal, células musculares lisas que se disponen en capas con abundantes miofibrillas en su interior (Figs. 58 A y B). Sobre éstas nos encontramos con la adventicia del vaso constituida por fibras de colágeno orientadas circularmente sobre ésta última (Figs. 58 A y B).

Las prolongaciones de las células gliales se disponen directamente sobre la adventicia del vaso. En estos, al igual que en los capilares hay una alternancia entre las prolongaciones de Müller y la de los astrocitos en la formación de la limitante vascular glial (Figs. 58 A y B).

# FIGURAS

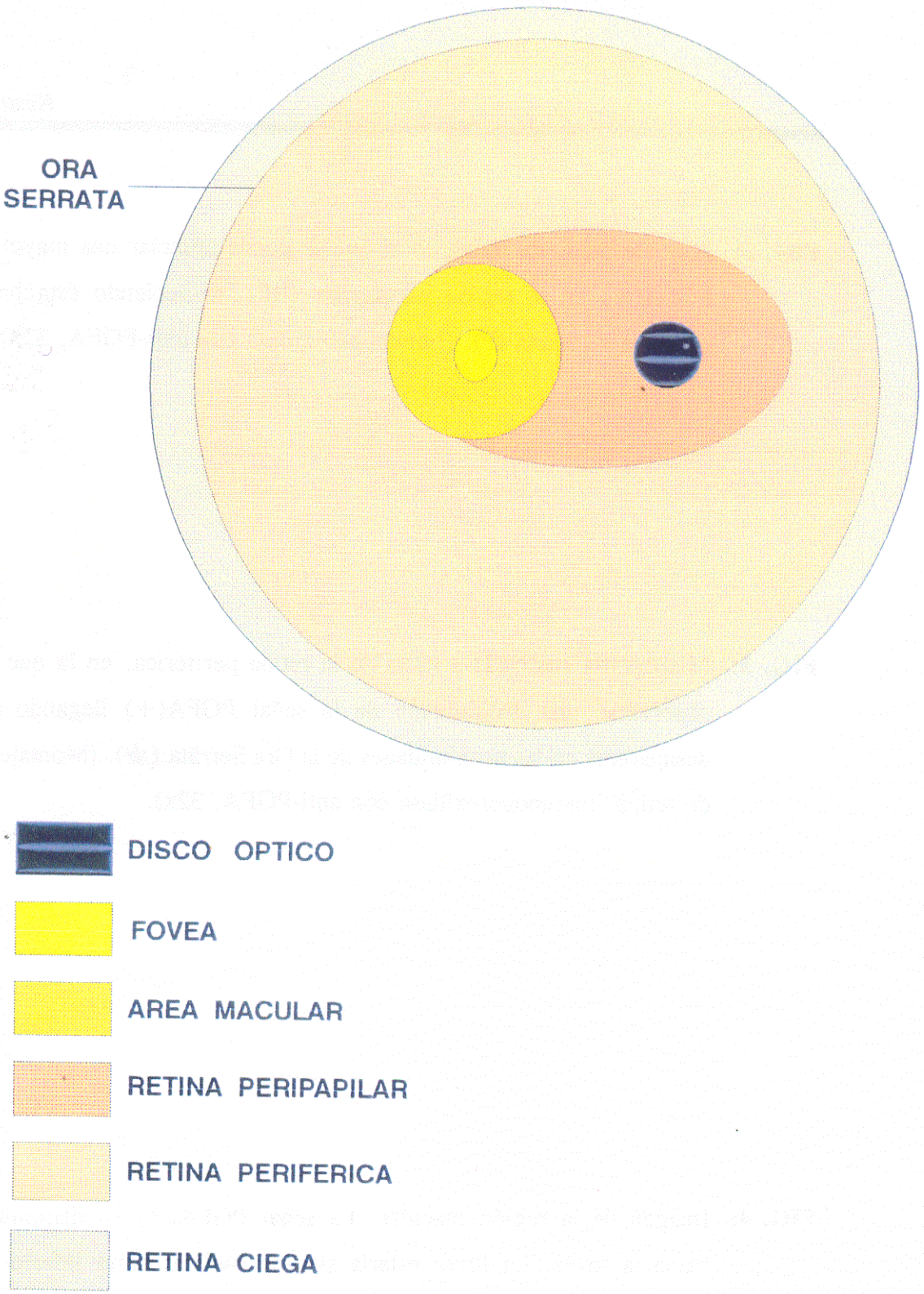



**Fig. 1- ESQUEMA QUE REPRESENTA LOS DIFERENTES SECTORES EN LOS QUE SE HA DIVIDIDO LA RETINA HUMANA**

**FIG. 2:** Montaje plano de retina en el que se puede apreciar una mayor señal PGFA(+) en la región peripapilar (RP), decreciendo ésta hacia la periferia retiniana (P). (Inmunoperoxidasa con anti-PGFA, 32x).

**FIG. 3:** Micrografía realizada a nivel de la retina periférica, en la que puede observarse una disminución de la señal PGFA(+) llegando ésta a desaparecer en las proximidades de la Ora Serrata (★). (Montaje plano de retina, inmunoperoxidasa con anti-PGFA, 32x).

**FIG. 4:** Imagen de la región macular. La señal PGFA(+) va disminuyendo hacia la fovea. La fovea estaría situada hacia la parte inferior de la micrografía. (Montaje plano de retina, inmunoperoxidasa con anti-PGFA, 125x).

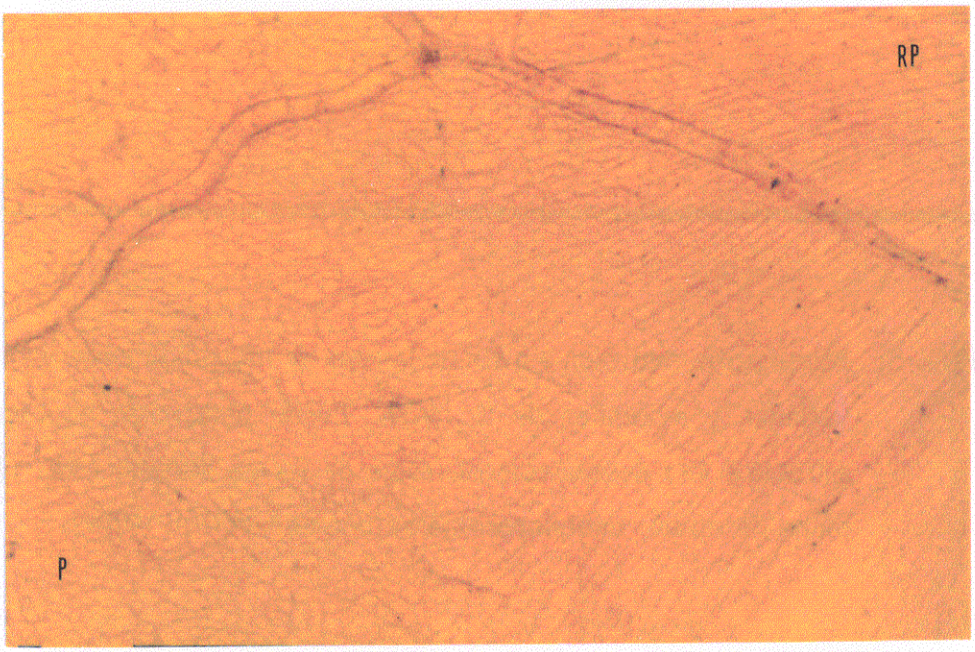



FIG. 2

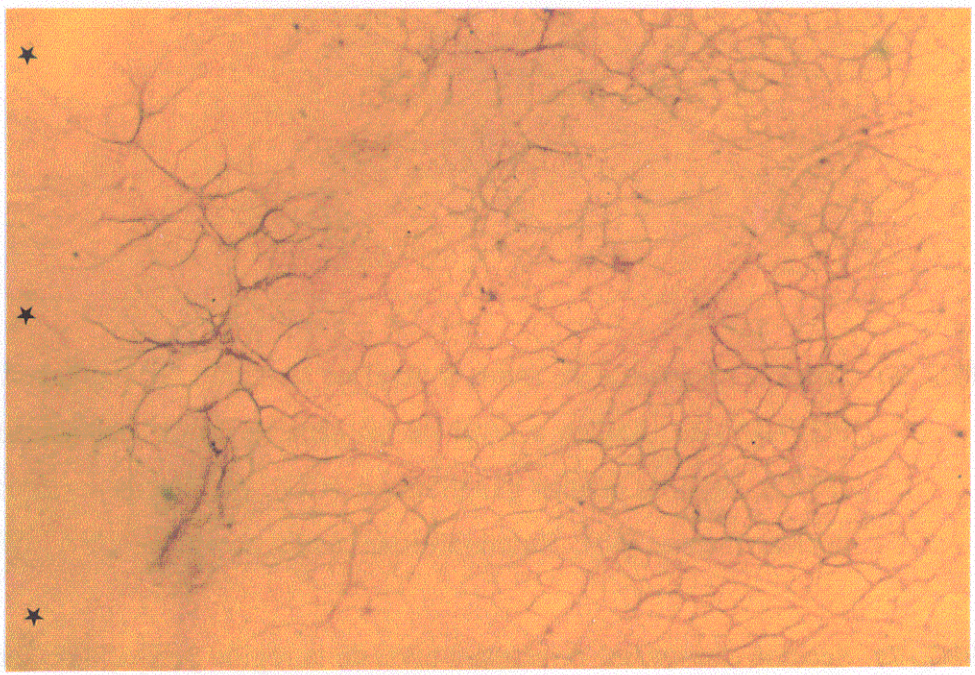


FIG. 3

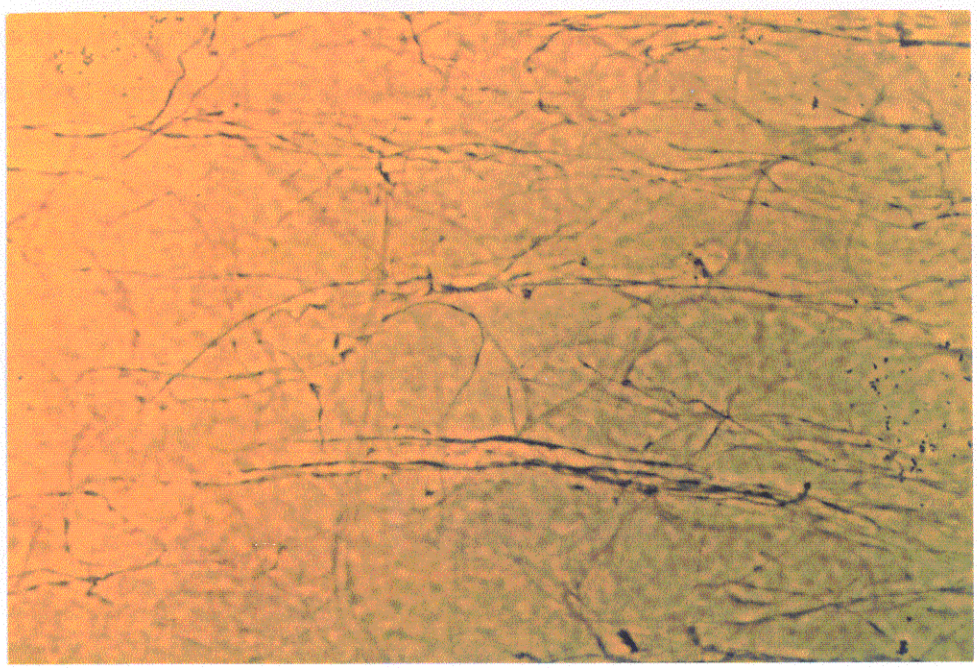


FIG. 4

**FIG. 5:** Micrografía realizada a nivel de la zona de transición entre las regiones vascular y avascular de la fovea. Puede observarse la escasez de astrocitos (►) desapareciendo éstos de forma abrupta (★). (Montaje plano de retina, inmunoperoxidasa con anti-PGFA, 400x).

**FIG. 6:** Sección transversal de retina a nivel de la región peripapilar. La señal PGFA(+) se localiza a nivel de las capa de fibras del nervio óptico (FNO), capa de células ganglionares (CG), plexiforme externa (PI) y nuclear interna (NI). (Inmunofluorescencia con anti-PGFA, 250x).

**FIG. 7:** Sección transversal de retina a nivel de la región peripapilar. Los vasos sanguíneos (►) se distribuyen en la capa de fibras del nervio óptico (FNO), capa de células ganglionares (CG), plexiforme externa (PI) y nuclear interna (NI). (Tinción PAS, 250x).

FIG. 5

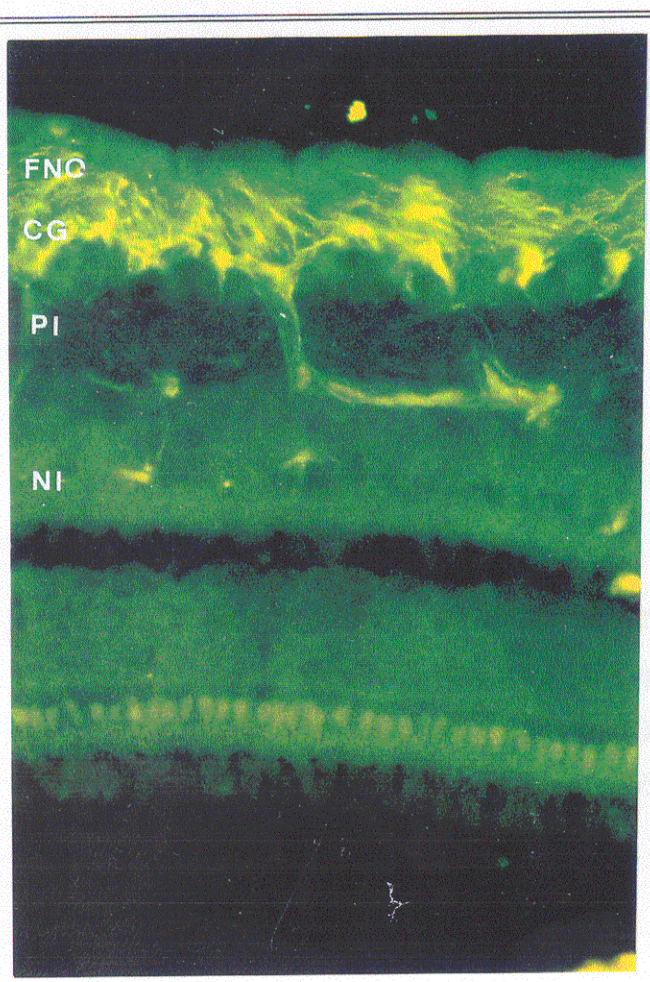



FIG. 6

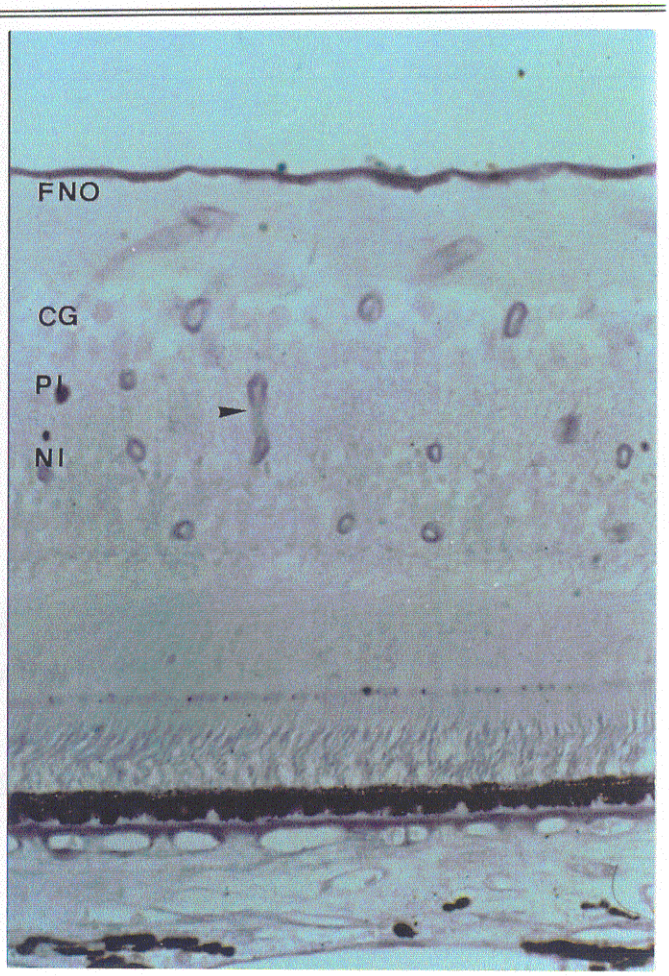



FIG. 7

**FIG. 8:** Astrocito situado en la capa nuclear interna (→). Las prolongaciones de los astrocitos de la capa de células ganglionares acompañan a los capilares retinianos externos (▸). [Capa de fibras del nervio óptico (FNO), capa de células ganglionares (CG), plexiforme externa (PI) y nuclear interna (NI)]. (Inmunofluorescencia con anti-PGFA, 250x).

**FIG. 9:** Sección vertical a nivel de la retina periférica. La señal PGFA(+) se observa a nivel de la capa de células ganglionares (▸). (Inmunoperoxidasa con anti-PGFA contrastada con hematoxilina, 250x)

**FIG. 10**: Sección vertical de retina a nivel de la fovea (▾). La señal PGFA(+) desaparece al igual que las capas de fibras del nervio óptico y de células ganglionares. (Inmunoperoxidasa con anti-PGFA, contrastada con hematoxilina, 125x)

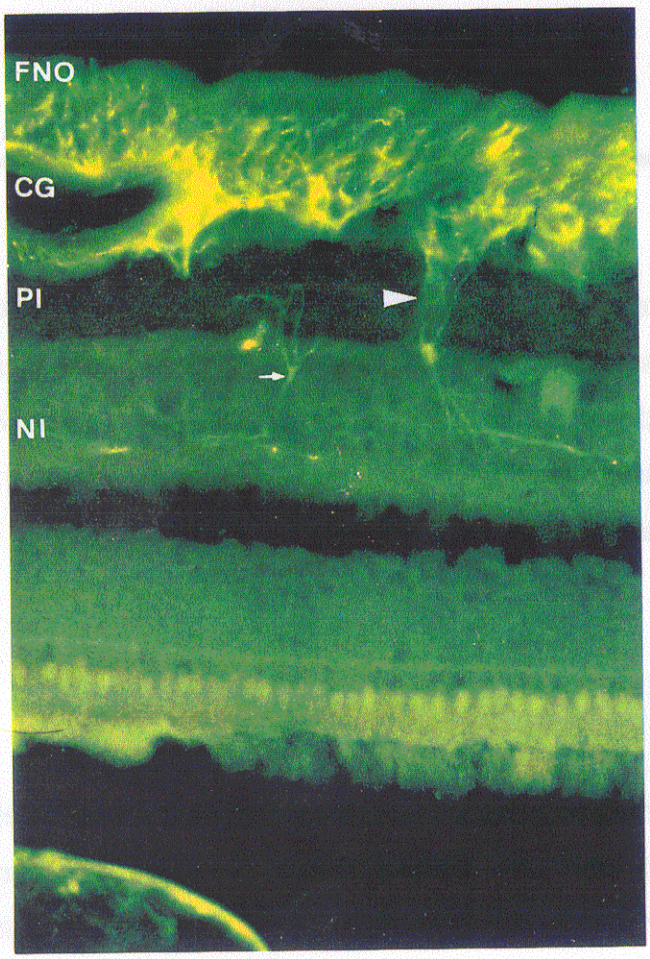



FIG. 8

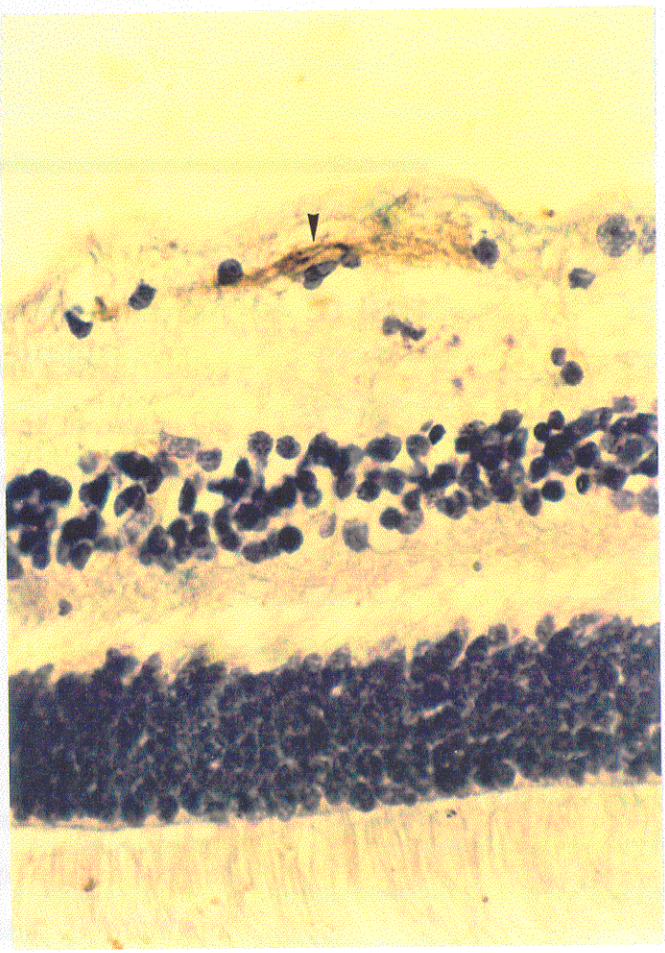


FIG. 9

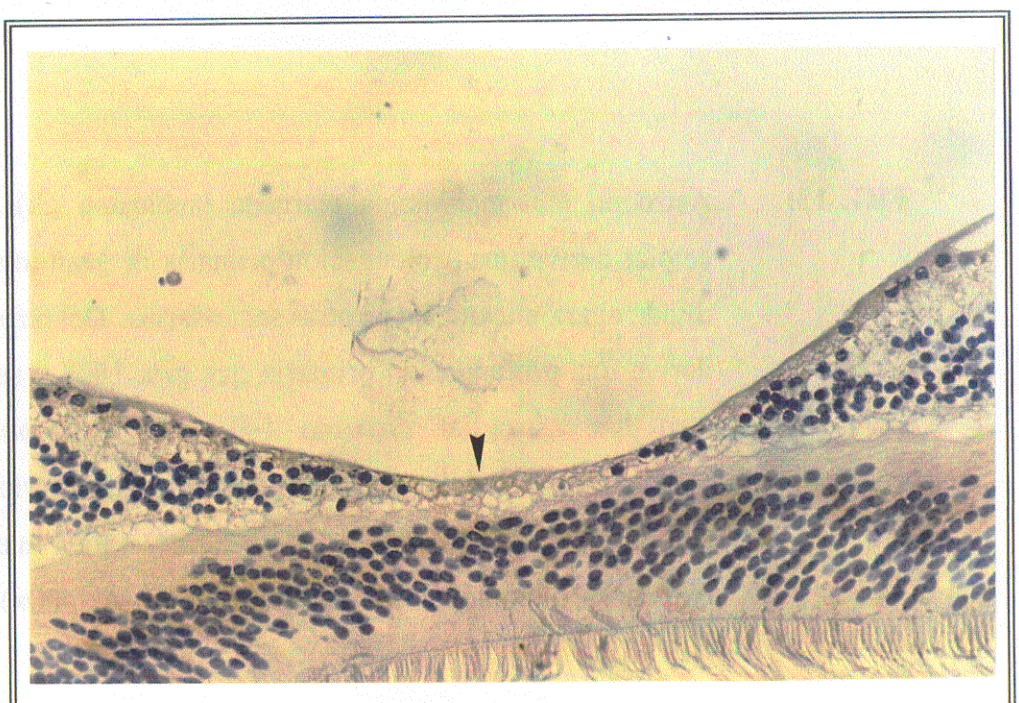


FIG. 10

**FIG. 11:** Astrocitos con morfología alargada (subgrupo $A_1$). De cada polo celular deriva una prolongación primaria que en las proximidades del núcleo se divide dicotómicamente en dos secundarias. (Montaje plano de retina, microscopía interferencial con óptica de Nomarski, inmunoperoxidasa con anti-PGFA, 400x).

**FIG. 12:** Astrocito con morfología alargada (subgrupo $B_1$). De cada polo del cuerpo celular derivan dos prolongaciones primarias de gran longitud (→). Además presentan prolongaciones cortas que parten de forma radial del pericarion celular (▸). (Montaje plano de retina, óptica interferencial de Nomarski, inmunoperoxidasa con anti-PGFA, 400x).

**FIG. 13:** Astrocito con morfología alargada (subgrupo $C_1$). De un polo celular deriva una prolongación primaria de gran longitud, que se divide dicotómicamente en otras secundarias. Del otro polo celular, deriva una prolongación primaria que gira 180° y se dirige hacia otro haz astroglial próximo (→); además también presenta prolongaciones celulares cortas que emergen del pericarion a modo de penacho (▸). (Montaje plano de retina, óptica interferencial de Nomarski, inmunoperoxidasa con anti-PGFA, 400x).

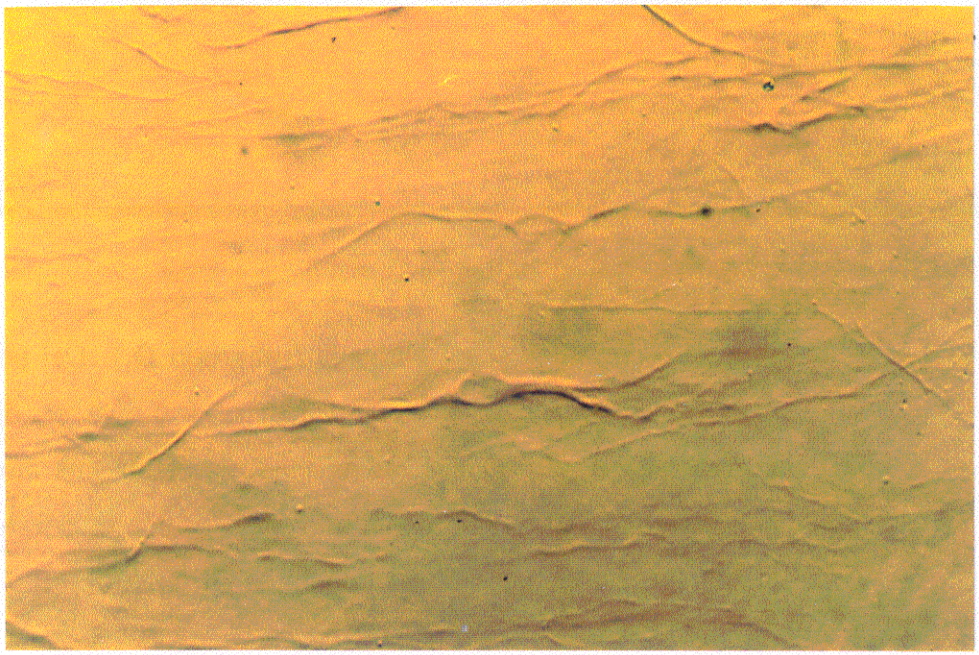


FIG. 11

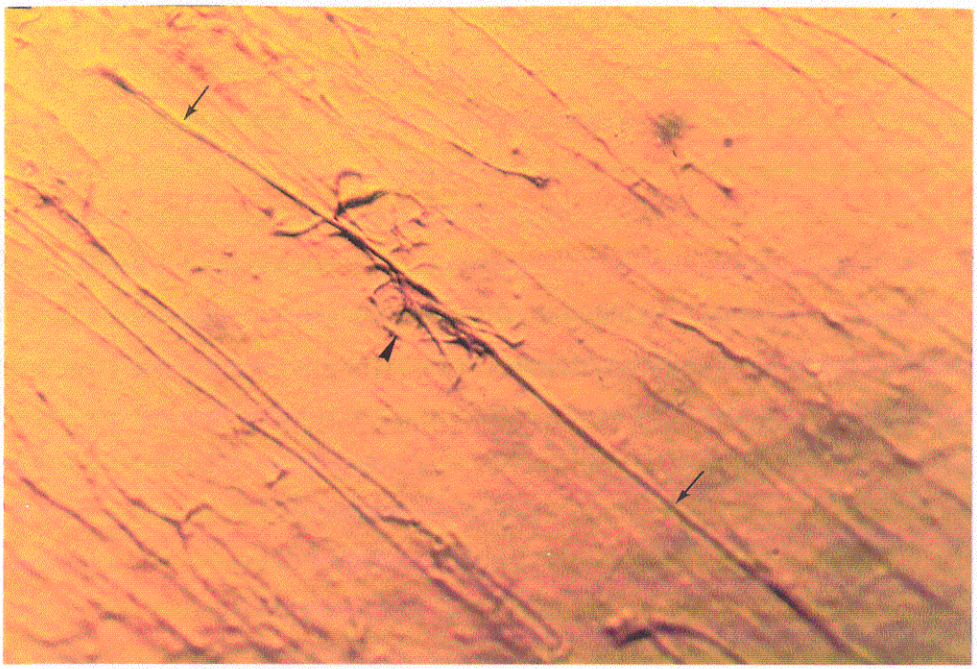


FIG. 12

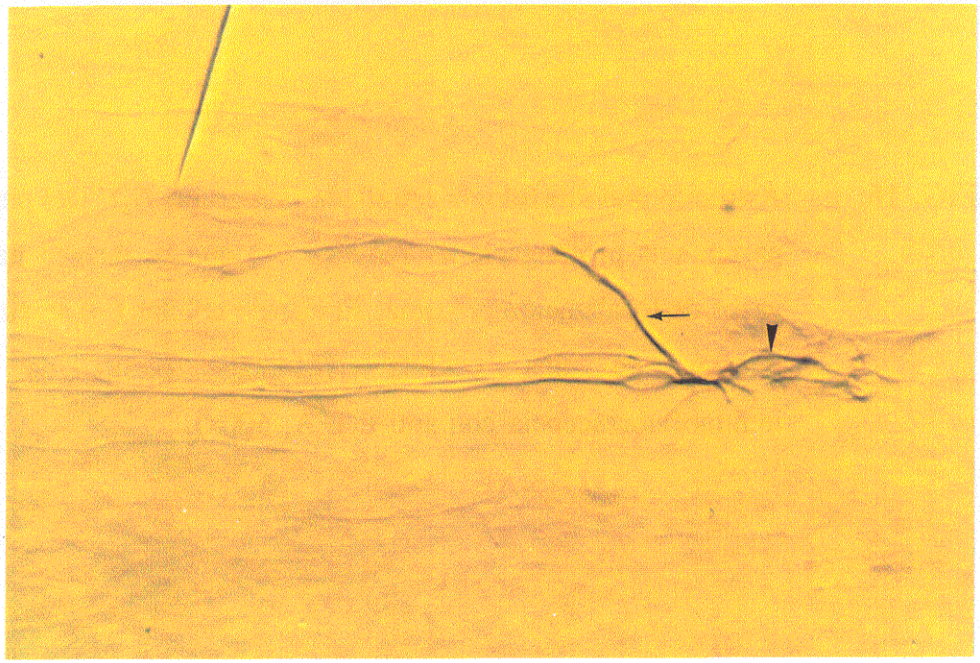


FIG. 13

**FIG. 14:** Astrocito con morfología alargada (subgrupo $D_1$). Del pericarion derivan varias prolongaciones primarias (→) que se dirigen a distintos haces astrogliales, adquiriendo la célula una morfología más estrellada. (Montaje plano de retina, óptica interferencial de Nomarski, inmunoperoxidasa con anti-PGFA, 400x).

**FIG. 15 :** Corte horizontal a nivel de la capa de fibras del nervio óptico. Los astrocitos pertenecientes a esta capa, se situan entre los haces de axones y mandan prolongaciones que abrazan a los capilares peripapilares radiales (▸). (Inmunoperoxidasa con anti-PGFA, contrastada con hematoxilina, 250x).

**FIG. 16:** Astrocito con morfología estrellada (subgrupo $A_2$). Del pericarion parten seis prolongaciones radiales (▸) que se dirigen hacia dos vasos de localización próxima. El cuerpo celular (→) se sitúa en el interior de una celdilla. (Montaje plano de retina, inmunofluorescencia con anti-PGFA, 500x).

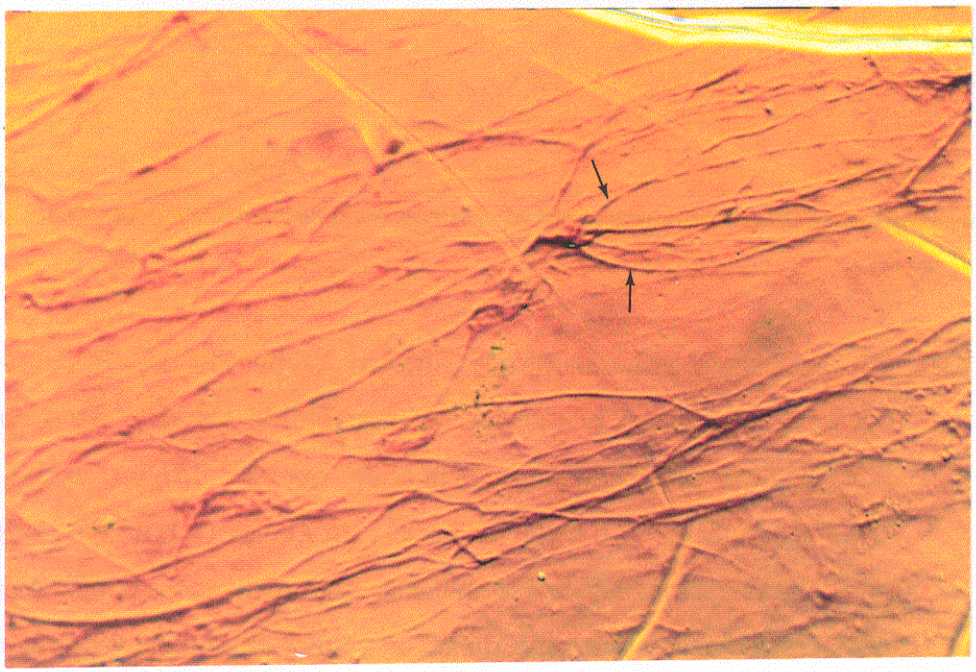


FIG. 14

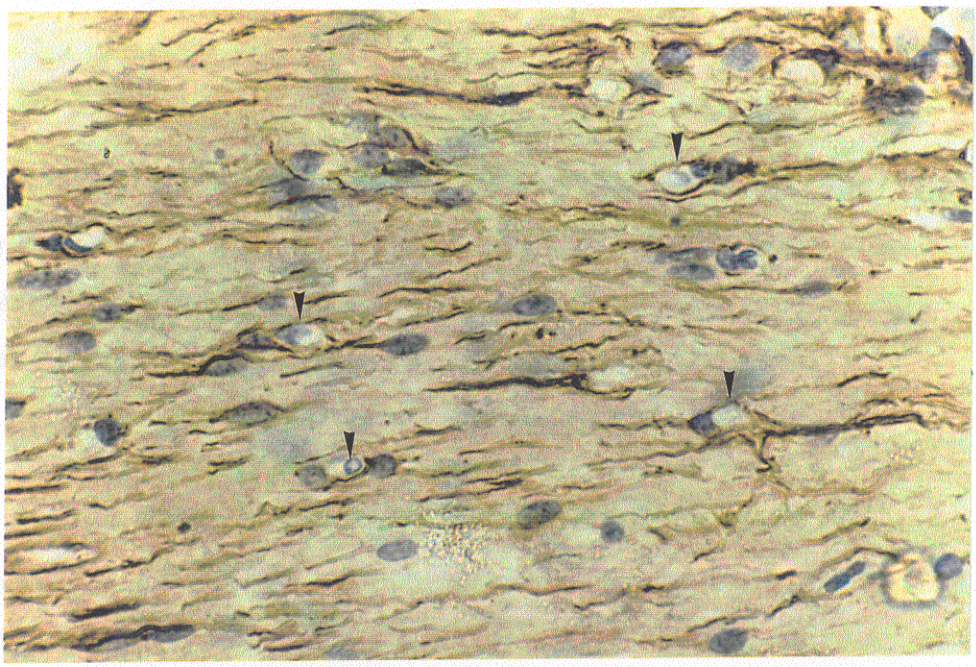


FIG. 15

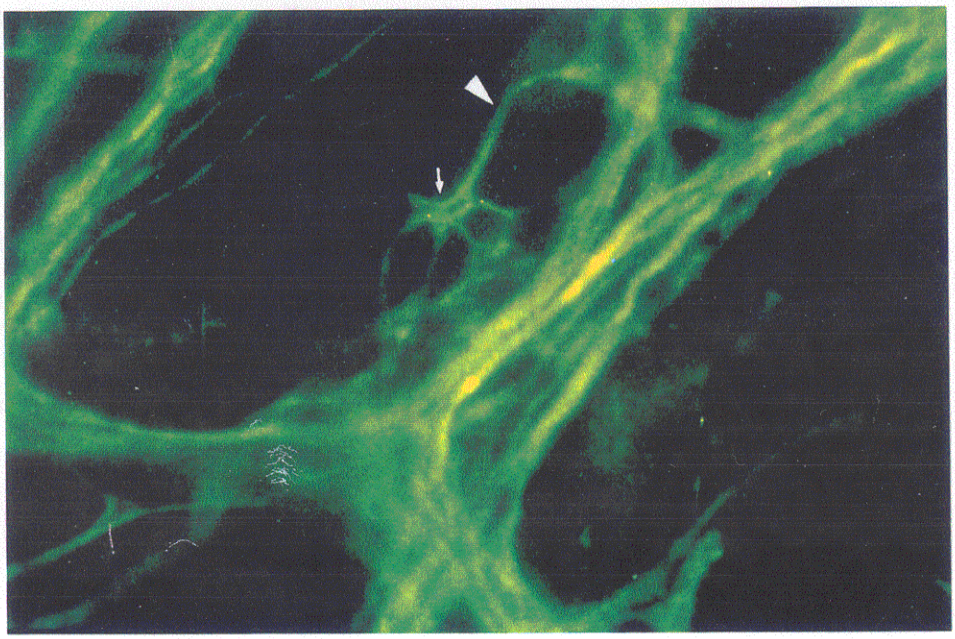


FIG. 16

**FIG. 17:** Astrocito con morfología estrellada (subgrupo $A_2$). El cuerpo celular se localiza en el interior de una celdilla (⊖). Del perikaion parten cuatro prolongaciones primarias que se dirigen hacia un vaso sanguíneo (→) o hacia los haces astrogliales (▸), donde se dividen en otras prolongaciones secundarias para realizar los contactos con estas estructuras. (Montaje plano de retina, inmunoperoxidasa con anti-PGFA, 250x).

**FIG. 18:** Astrocitos con morfología estrellada de la capa de células ganglionares (→). Las prolongaciones celulares contactan unas con otras o con los vasos sanguíneos (⊕) constituyendo un plexo astroglial con morfología en panal de abeja. (Montaje plano de retina, inmunoperoxidasa con anti-PGFA, 200x).

**FIG. 19:** Astrocito con morfología estrellada (subgrupo $B_2$). El cuerpo celular del astrocito (⊖) se dispone sobre la pared del vaso sanguíneo (⊕). Algunas prolongaciones (▸) se localizan sobre la pared del vaso y siguen una trayectoria paralela a éste. Otras prolongaciones de menor longitud, se dividen en prolongaciones secundarias para realizar los contactos vasculares (→). A la derecha de la micrografía, puede observarse una prolongación (▲) que no realiza contactos con el vaso sanguíneo donde se encuentra situado el astrocito y se dirige hacia otro vaso de localización más lejana. (Montaje plano de retina, óptica interferencial de Nomarski, inmunoperoxidasa con anti-PGFA, 400x).

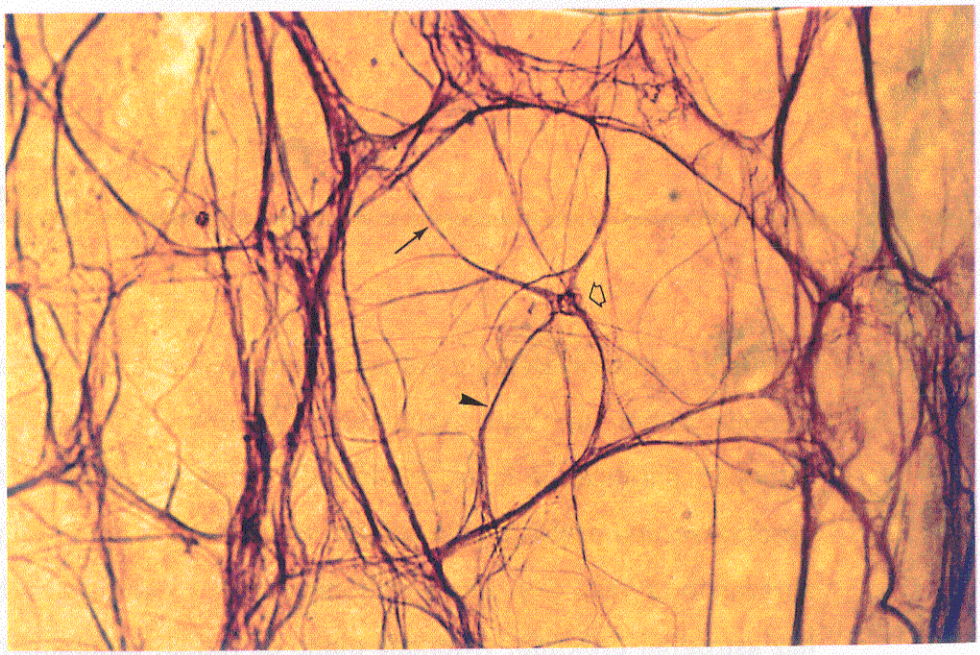


FIG. 17

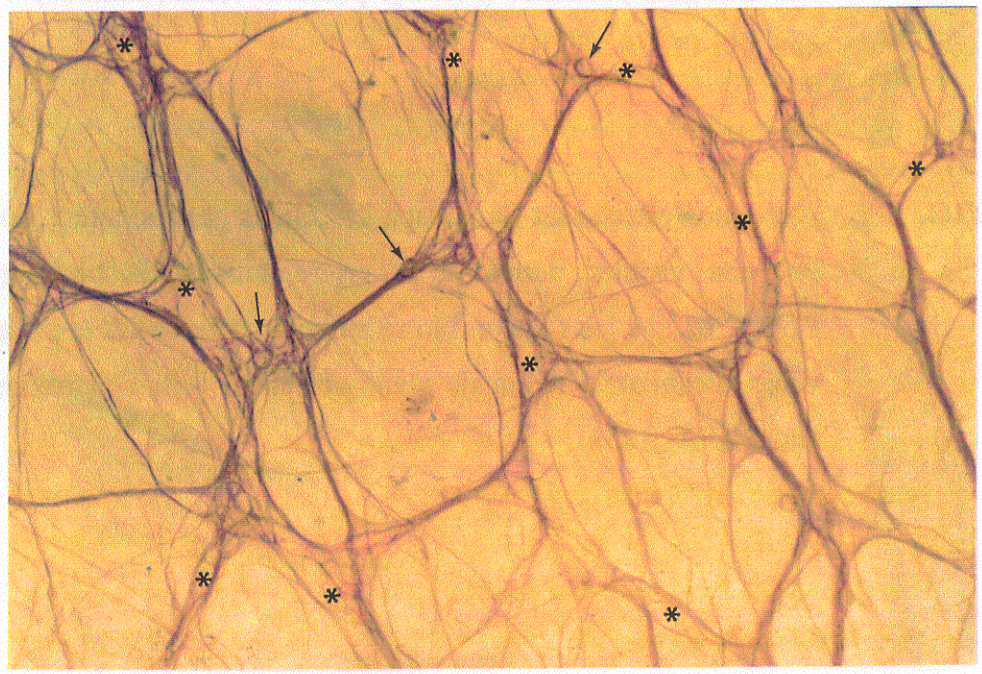


FIG. 18

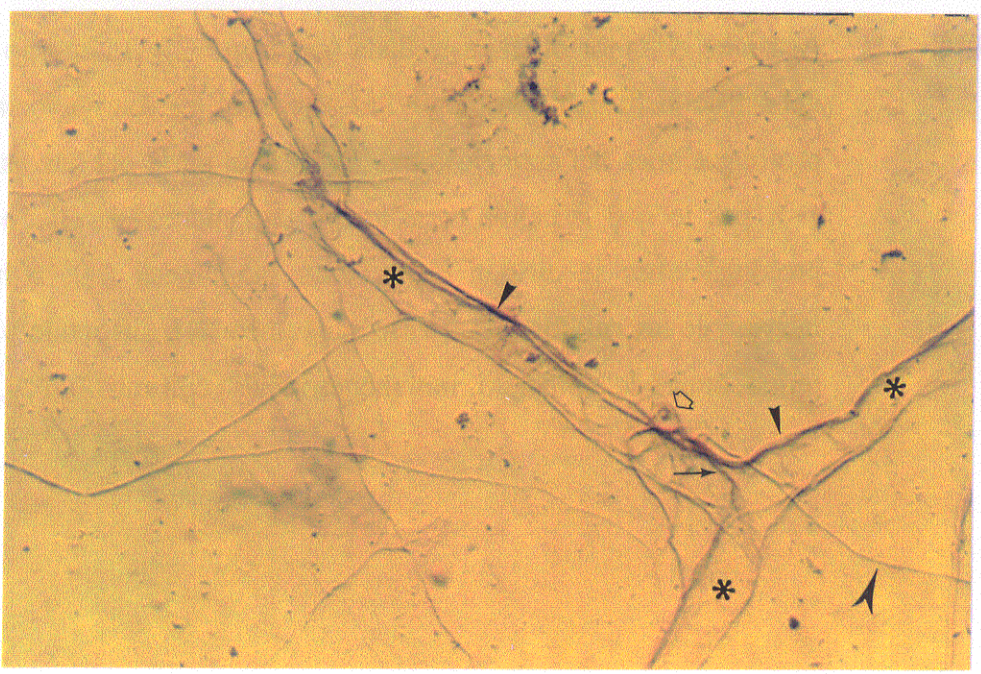


FIG. 19

**FIG. 20:** Astrocito con morfología estrellada (subgrupo $B_2$). El perikarion se dispone sobre un vaso sanguíneo. Algunas prolongaciones se disponen paralelas a la trayectoria del vaso (▸). También puede observarse una prolongación celular secundaria, a modo de gancho, abrazando al vaso (→). Otras prolongaciones (⊖) se dirigen hacia un haz astroglial próximo. (Montaje plano de retina, inmunoperoxidasa con anti-PGFA, 500x).

**FIG. 21:** Astrocitos estrellados de la capa de células ganglionares. Los vasos (*) son visibles debido a la gran cantidad de prolongaciones PGFA(+) que los rodean. No se aprecian diferencias entre arterias, venas o capilares. (Montaje plano de retina, inmunoperoxidasa con anti-PGFA, 125x).

**FIG. 22:** Astrocito con morfología estrellada (subgrupo $C_2$). El cuerpo celular del astrocito forma parte de un haz astroglial (⊖). La mayoría de las prolongaciones del astrocito también forman parte del haz astroglial (▸), por lo que la célula tiene un aspecto menos estrellado. Otras prolongaciones se dirigen hacia vasos sanguíneos (→), o hacia el interior de las celdillas (⋀). [Vaso sanguíneo (⊛)]. (Montaje plano de retina, óptica de Nomarski, inmunoperoxidasa con anti-PGFA, 400x).

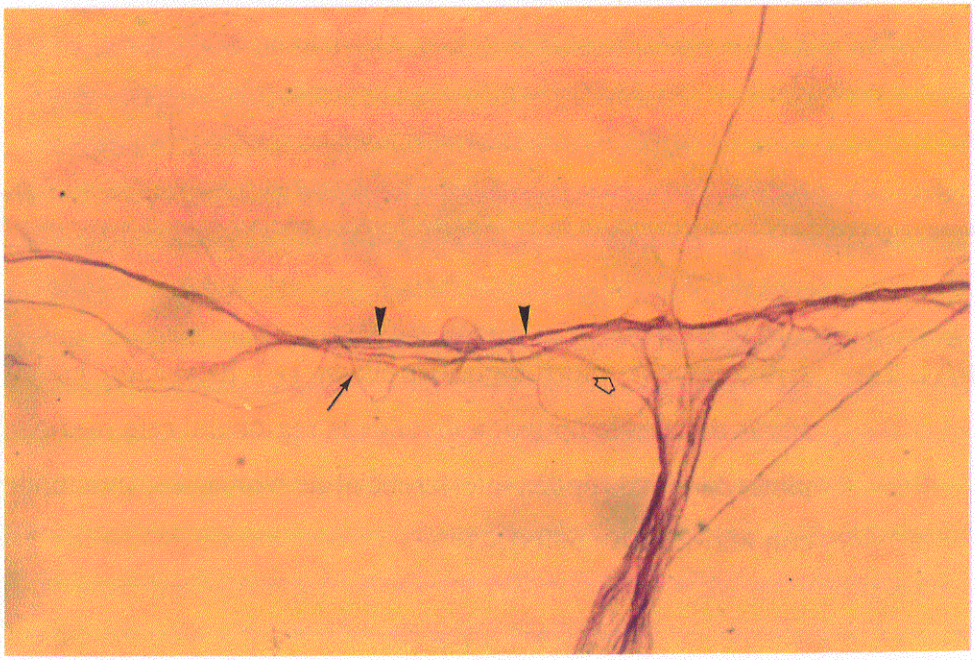


FIG. 20

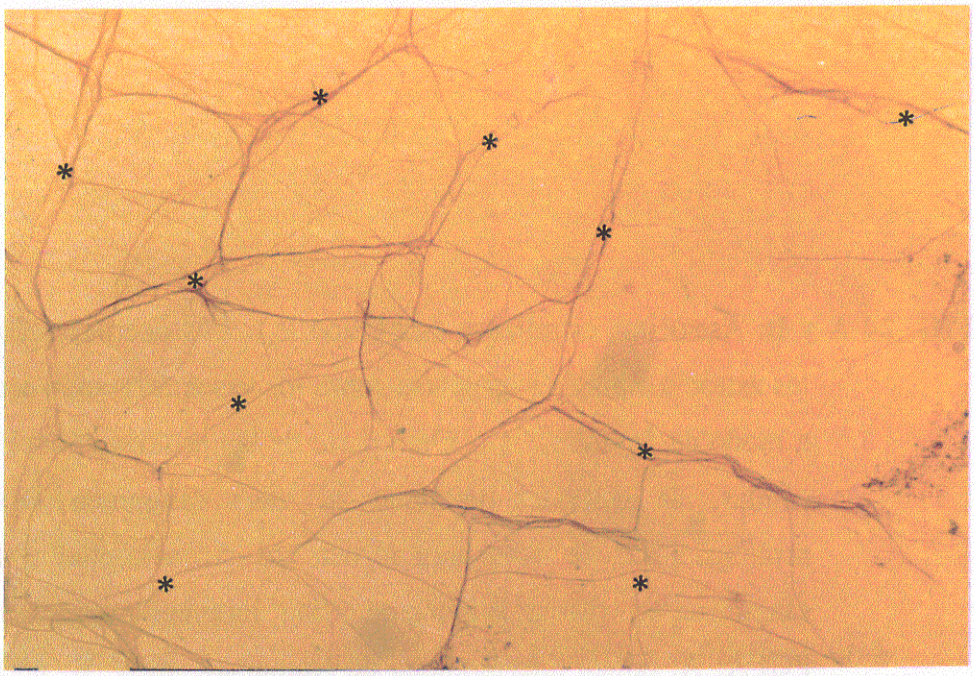


FIG. 21

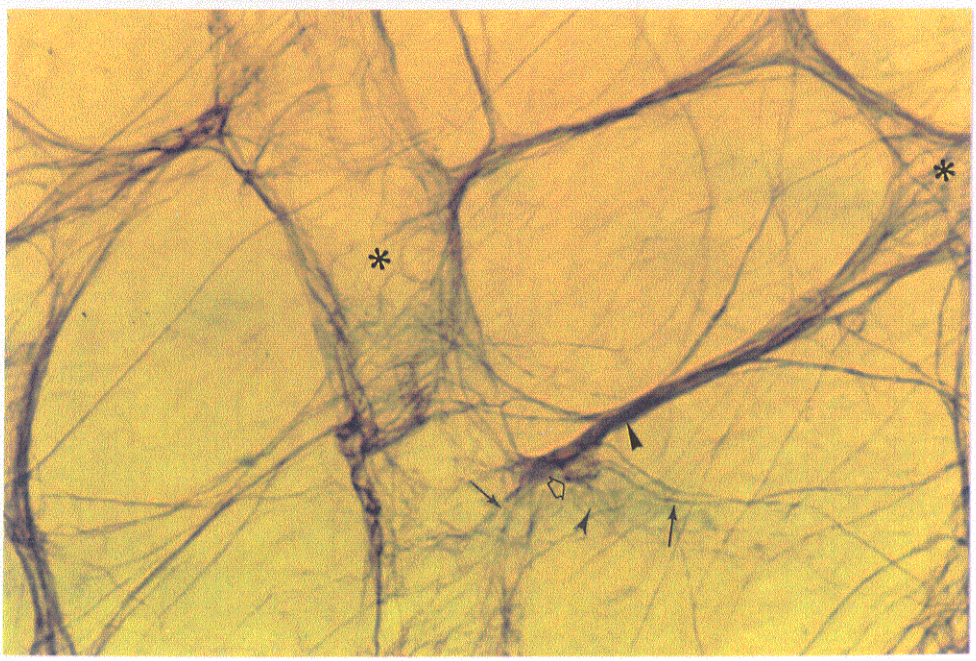


FIG. 22

**FIG. 23:** Astrocito con morfología estrellada (▸) localizado en la capa de fibras del nervio óptico, a nivel de la región del rafe medio. (Montaje plano de retina, óptica interferencial de Nomarski, inmunoperoxidasa con anti-PGFA, 600x).

**FIG. 24 A y B:** Astrocitos estrellados (subgrupo $B_2$). Los cuerpos celulares de los astrocitos pueden agruparse sobre los vasos formando estructuras a modo de "racimos" (⊖). Gran parte de las prolongaciones de estas células, se disponen paralelas al vaso sanguíneo (▸). Otras prolongaciones se unen para formar un haz astroglial (→). [Vaso sanguíneo (⊛)]. (Montaje plano de retina, inmunoperoxidasa con anti-PGFA; A: óptica interferencial de Nomarski, 400x; B: 600x).

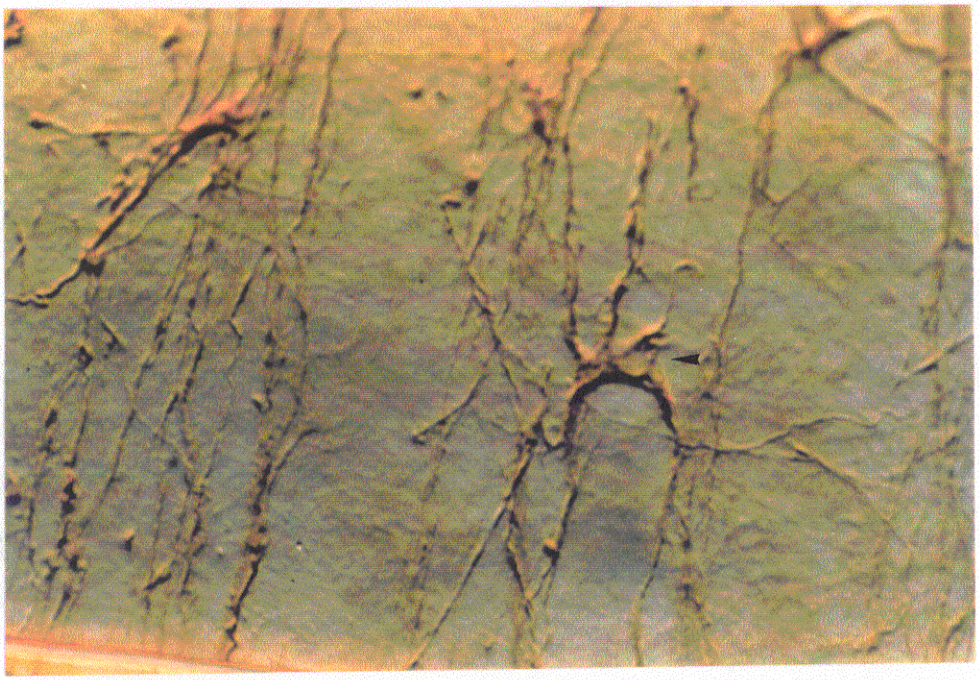


FIG. 23

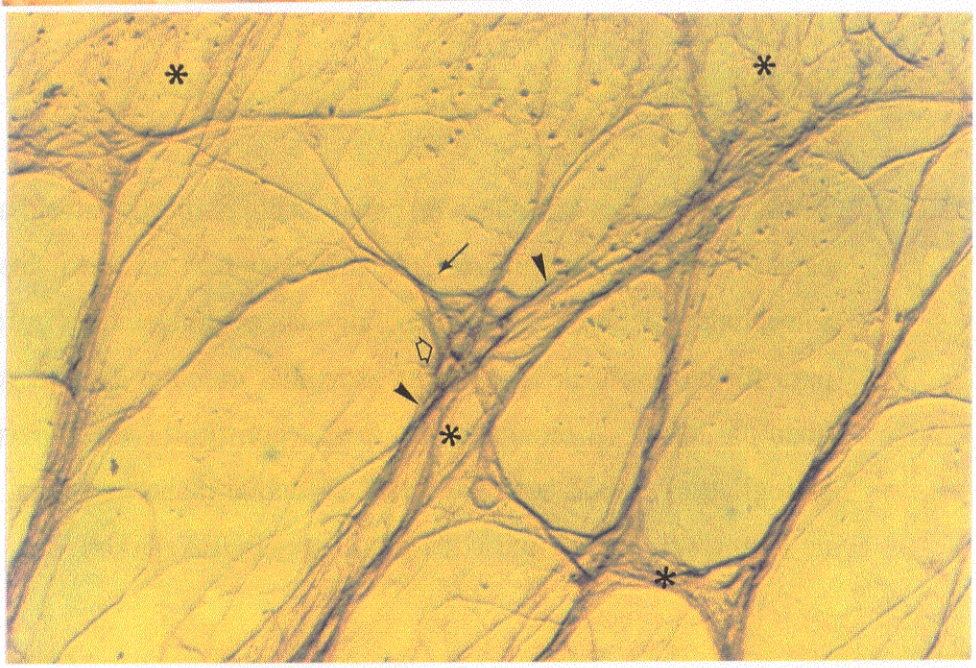


FIG. 24 A

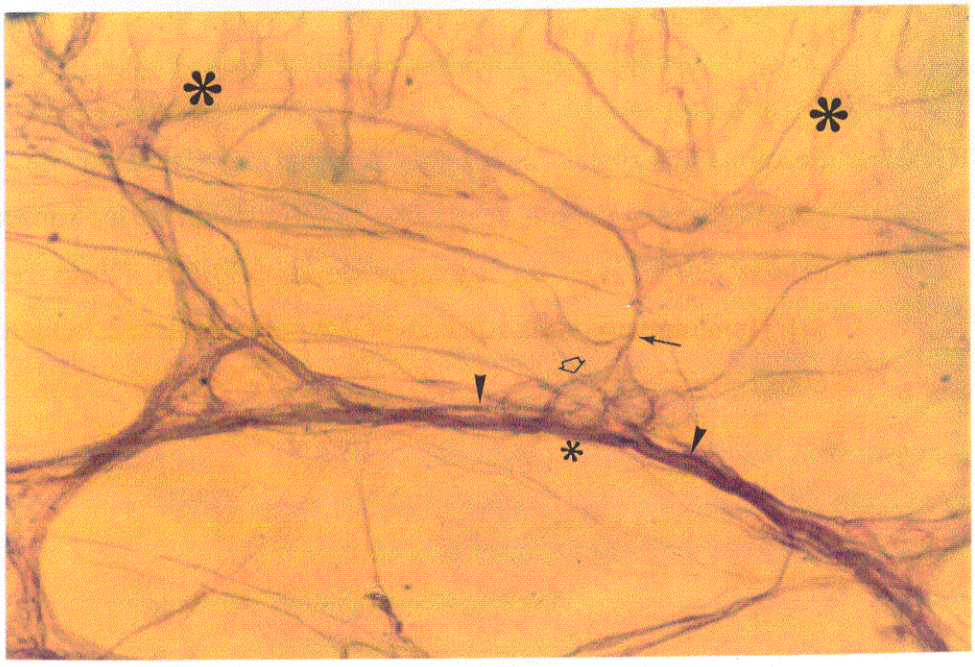


FIG. 24 B

**FIG. 25:** Plexo astroglial de la capa de células ganglionares. Los distintos haces astrogliales van a interconectar los vasos sanguíneos formando un plexo con morfología en panal de abeja. Los vasos sanguíneos (✻) se encuentran totalmente tapizados por prolongaciones astrogliales. (Montaje plano de retina, óptica interferencial de Nomarski, inmunoperoxidasa con anti-PGFA, 125x).

**FIG. 26:** Formación de una estructura en panal de abeja (plexo astroglial de la capa de células ganglionares). Cuando alcanzan un vaso, los haces astrogliales se abren en abanico, algunas prolongaciones giran 90° para formar parte de la envuelta astroglial vascular (▸), el resto se unen a otras prolongaciones para constituir un nuevo haz astroglial(→). [Vaso sanguíneo ⊛]. (Montaje plano de retina, óptica de Nomarski, inmunoperoxidasa con anti-PGFA, 300x).

**FIG. 27:** Sección horizontal de retina a nivel de la capa de células ganglionares, en el que se observa la disposición de los somas de las células ganglionares en el interior de las celdillas. [Vaso sanguíneo ⊛]. (Inmunoperoxidasa con anti-PGFA contrastada con hematoxilina, 600x).

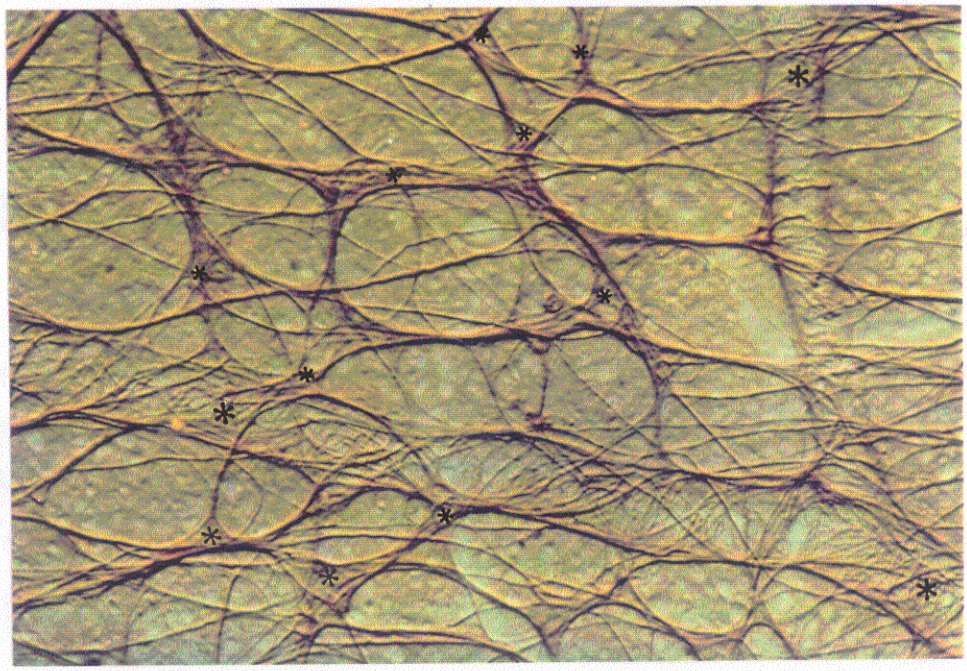


FIG. 25

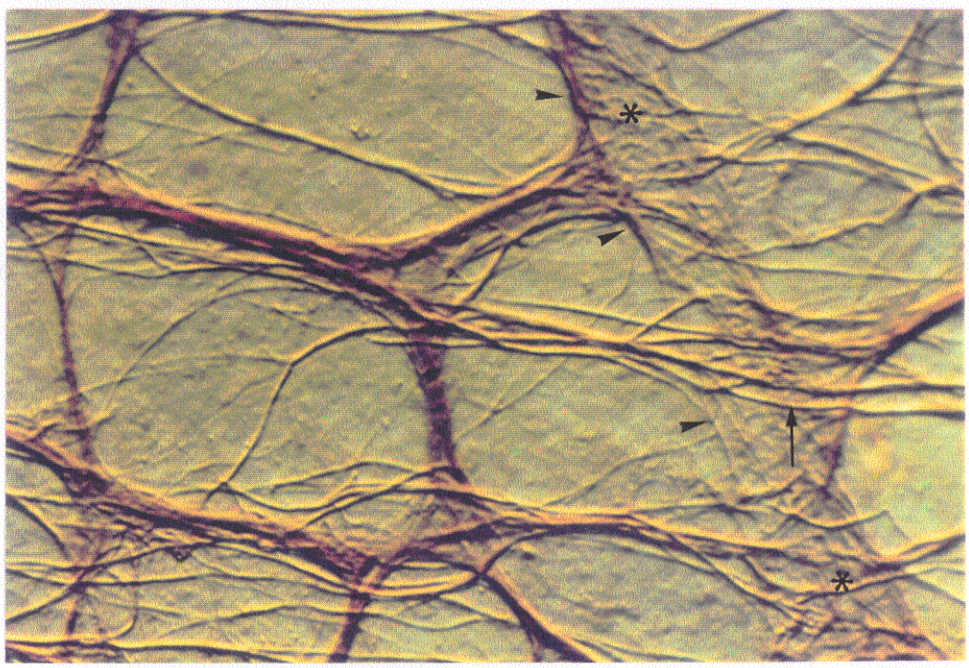


FIG. 26

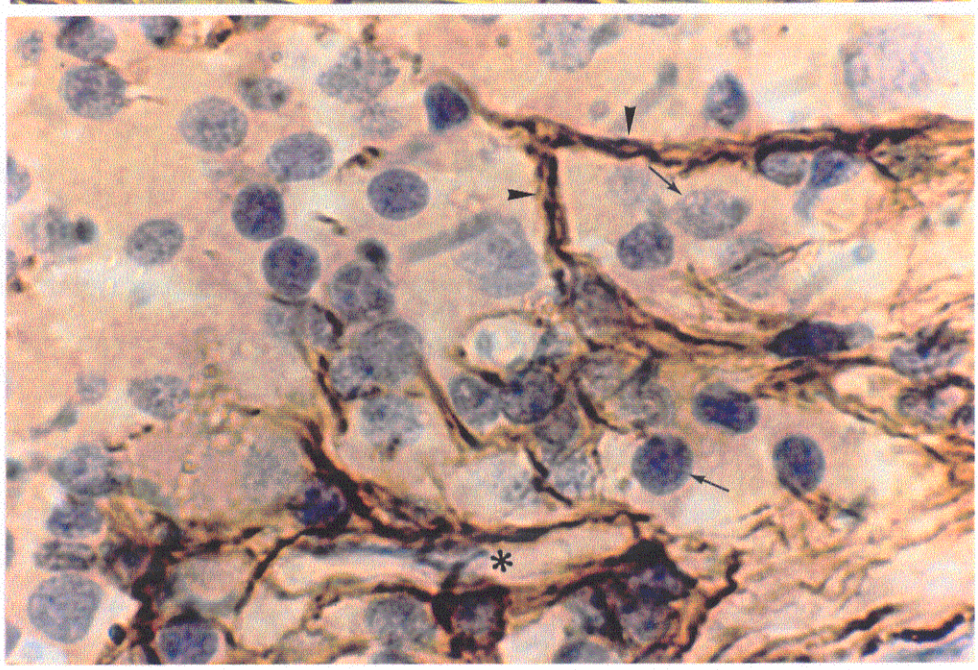


FIG. 27

**FIG. 28:** Plexo astroglial de la capa de células ganglionares a nivel de la retina peripapilar. El plexo es muy compacto y las celdillas presentan un tamaño pequeño. (Montaje plano de retina, inmunoperoxidasa con anti-PGFA, 50x).

**FIG. 29:** Plexo astroglial de la capa de células ganglionares a nivel de la retina periférica. Las celdillas que constituyen la estructura en panal presentan un mayor tamaño. (Montaje plano de retina, inmunoperoxidasa con anti-PGFA, 50x).

**FIG. 30:** Plexo astroglial de la capa de células ganglionares a nivel de la retina periférica en las proximidades de la Ora Serrata. El número de astrocitos y de vasos sanguíneos es muy escaso, resultando difícil distinguir la estructura en panal. (Montaje plano de retina, inmunoperoxidasa con anti-PGFA, 125x).

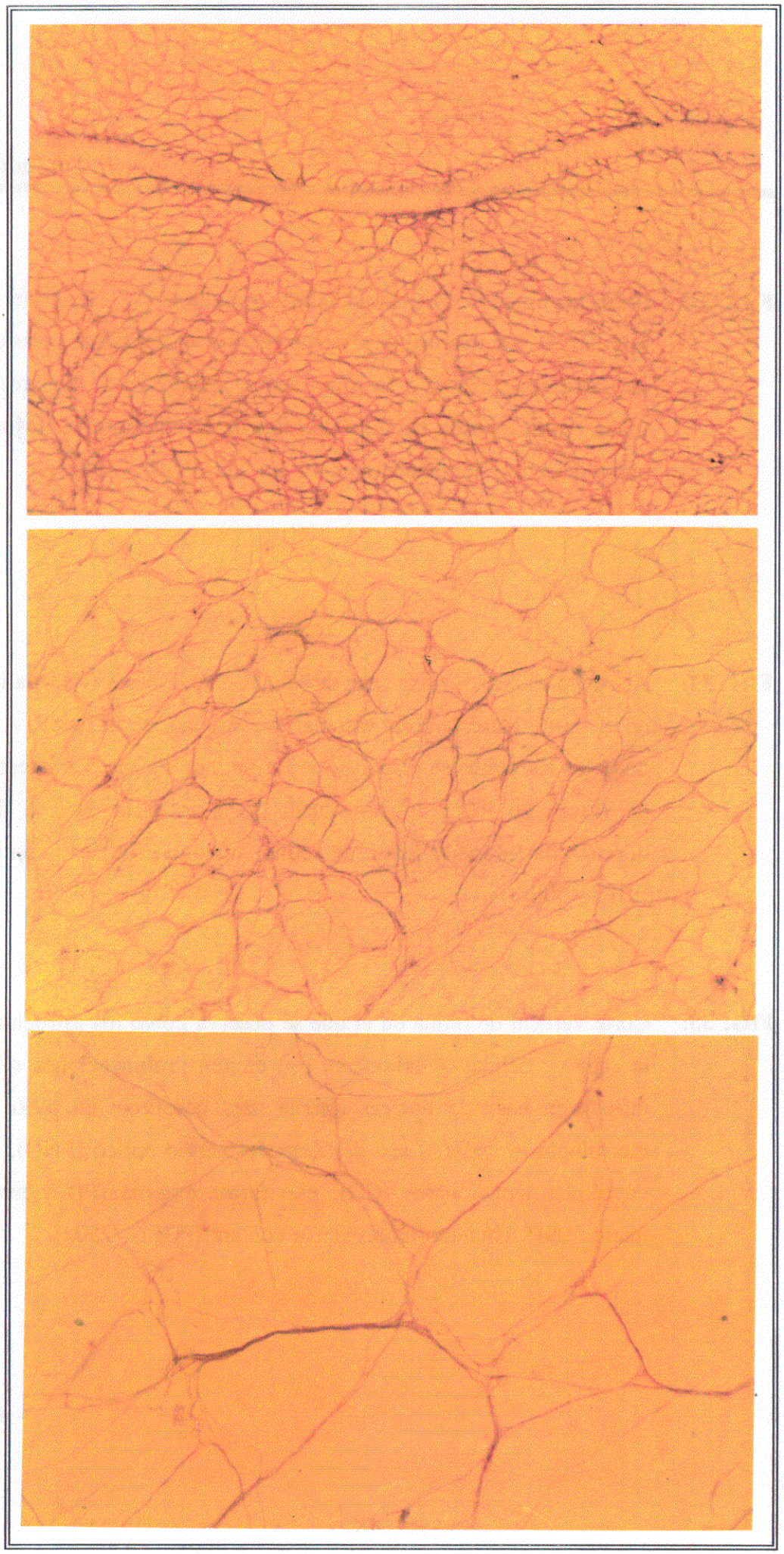


FIG. 28

FIG. 29

FIG. 30

**FIG. 31:** Plexo astroglial de la capa de células ganglionares a nivel del área macular. Existe una disminución progresiva de astrocitos, y éstos se disponen concéntricos a la fovea acompañando a los capilares. La fovea estaría situada hacia la derecha de la micrografía. (Montaje plano de retina, inmunoperoxidasa con anti-PGFA, 125x).

**FIG. 32:** Astrocito estrellado de la capa de células ganglionares (▸) localizado en el límite entre la zona vascular y avascular de la fovea. A este nivel los astrocitos se disponen de forma mas aislada por la escasez de vasos. La fovea estaría situada hacia la parte derecha de la micrografía.(Montaje plano de retina, inmunoperoxidasa con anti-PGFA, 500x).

**FIG. 33:** Corte vertical de retina en el que se observa como los astrocitos de la capa de células ganglionares (→) emiten prolongaciones que se introducen hasta la nuclear interna para constituir un plexo con morfología irregular. Capa de fibras del nervio óptico (FNO), capa de células ganglionares (CG), plexiforme externa (PI) y nuclear interna (NI). (Inmunofluorescencia con anti-PGFA, 250x).

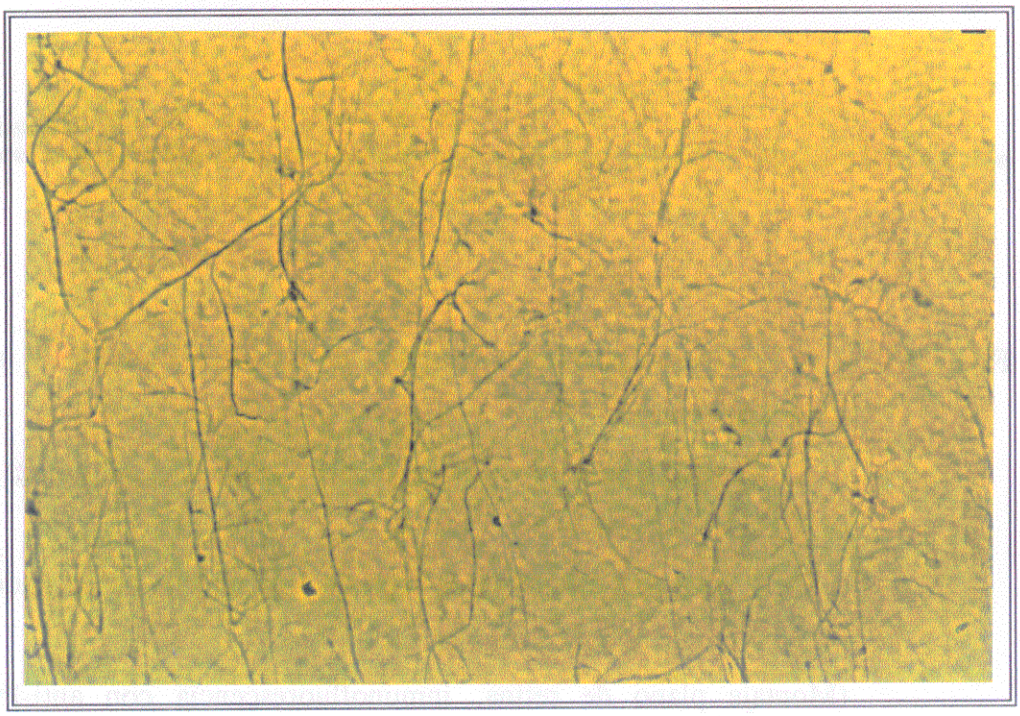


FIG. 31

FIG. 32

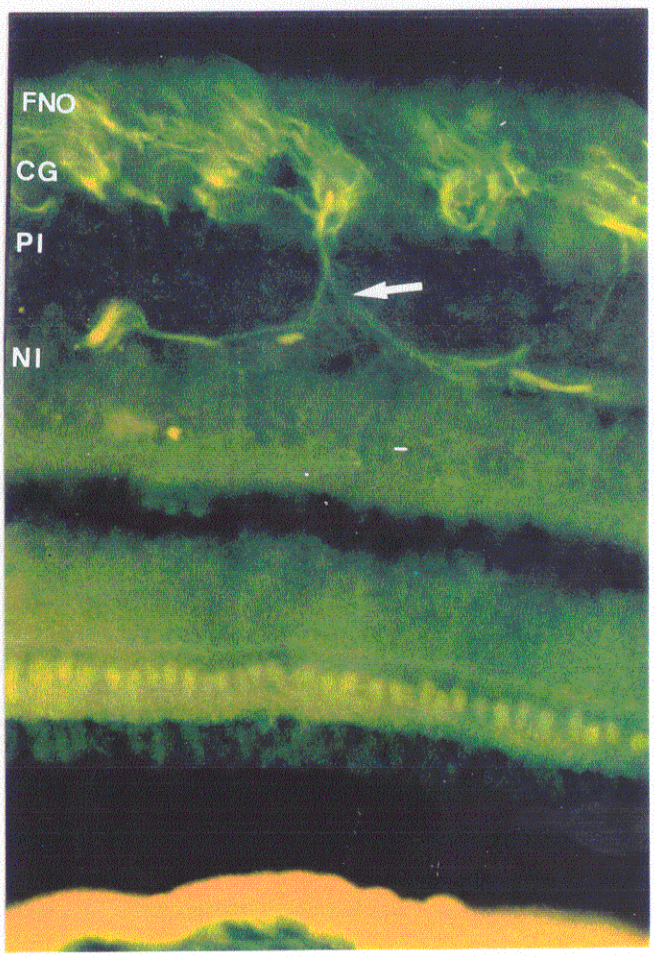



FIG. 33

**FIG. 34 A y B:** Plexo con morfología irregular de las capas plexiforme interna y nuclear interna.

A) El foco está a nivel de la capa de células ganglionares, y el plexo no es visible.

B) El foco está a nivel de la capa nuclear interna observándose el plexo con morfología irregular (►).

(Montaje plano de retina, inmunofluorescencia con anti-PGFA, 200x).

**FIG. 35:** Sección vertical de retina en la que se observa la disposición paralela y recta de los astrocitos alargados de la capa de fibras del nervio óptico (FNO) (→), y la estructura en panal de abeja del plexo astroglial de la capa de células ganglionares (CG) (►). [Vítreo (★), Vaso sanguíneo (✹)]. (Inmunofluorescencia con anti-PGFA, 250x).

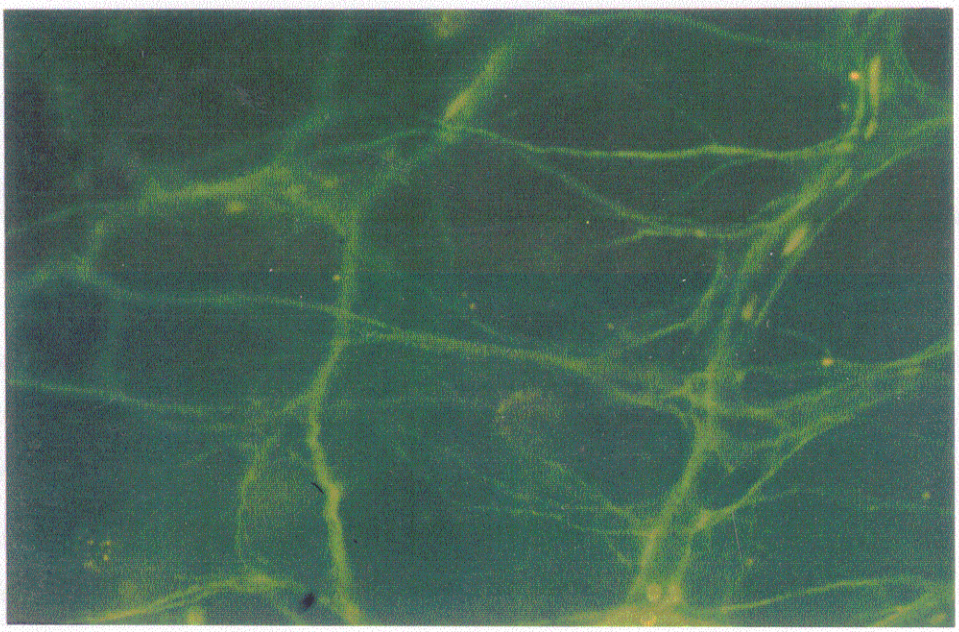


FIG. 34 A

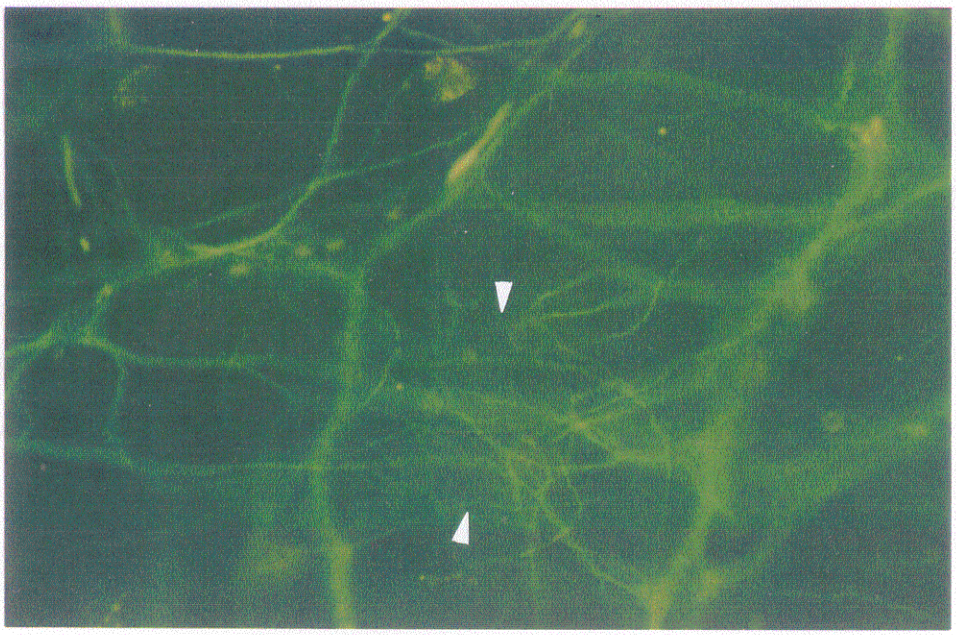


FIG. 34 B

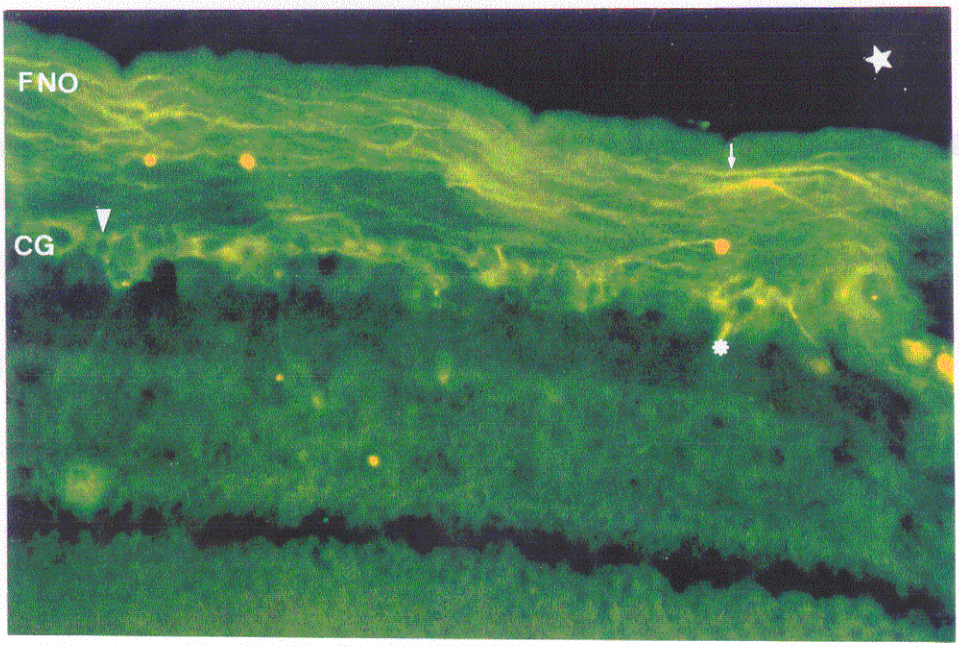



FIG. 35

**FIG. 41:** Célula de Müller. El citoplasma presenta gran cantidad de filamentos y es muy electrodenso (▸) en comparación con el citoplasma de un astrocito (→). [Núcleo (N)]. (30000x).

**FIG. 42:** Características ultraestructurales de los astrocitos retinianos: Núcleo (N) con cromatina abundante y heterocromatina. Citoplasma perinuclear con diferentes orgánulos citoplasmáticos [mitocondrias, retículo endoplásmico rugoso (→), ribosomas (▸), glucógeno, filamentos gliales (F)]. [Cuerpos densos (◓)]. (50000x).

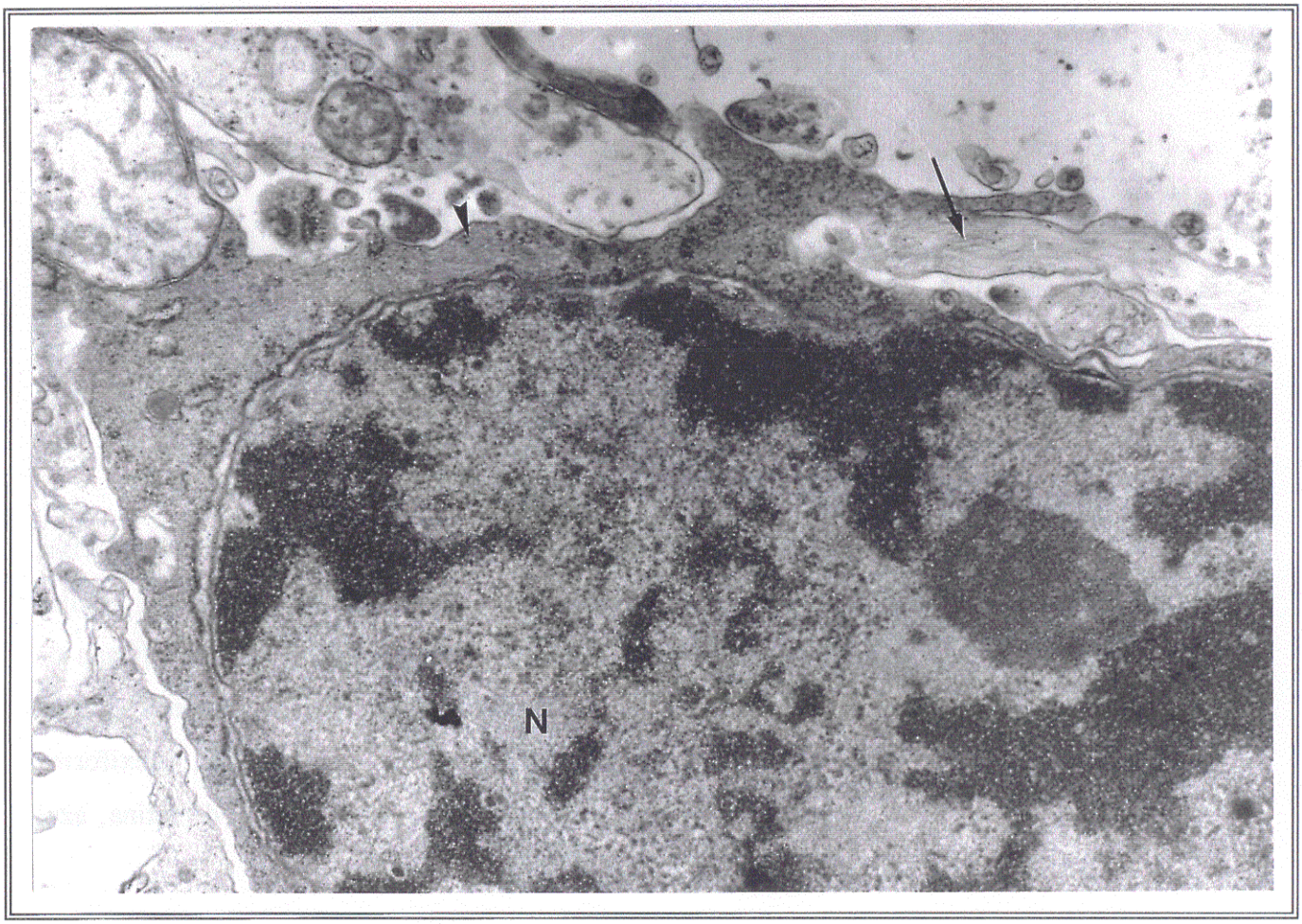



FIG. 41

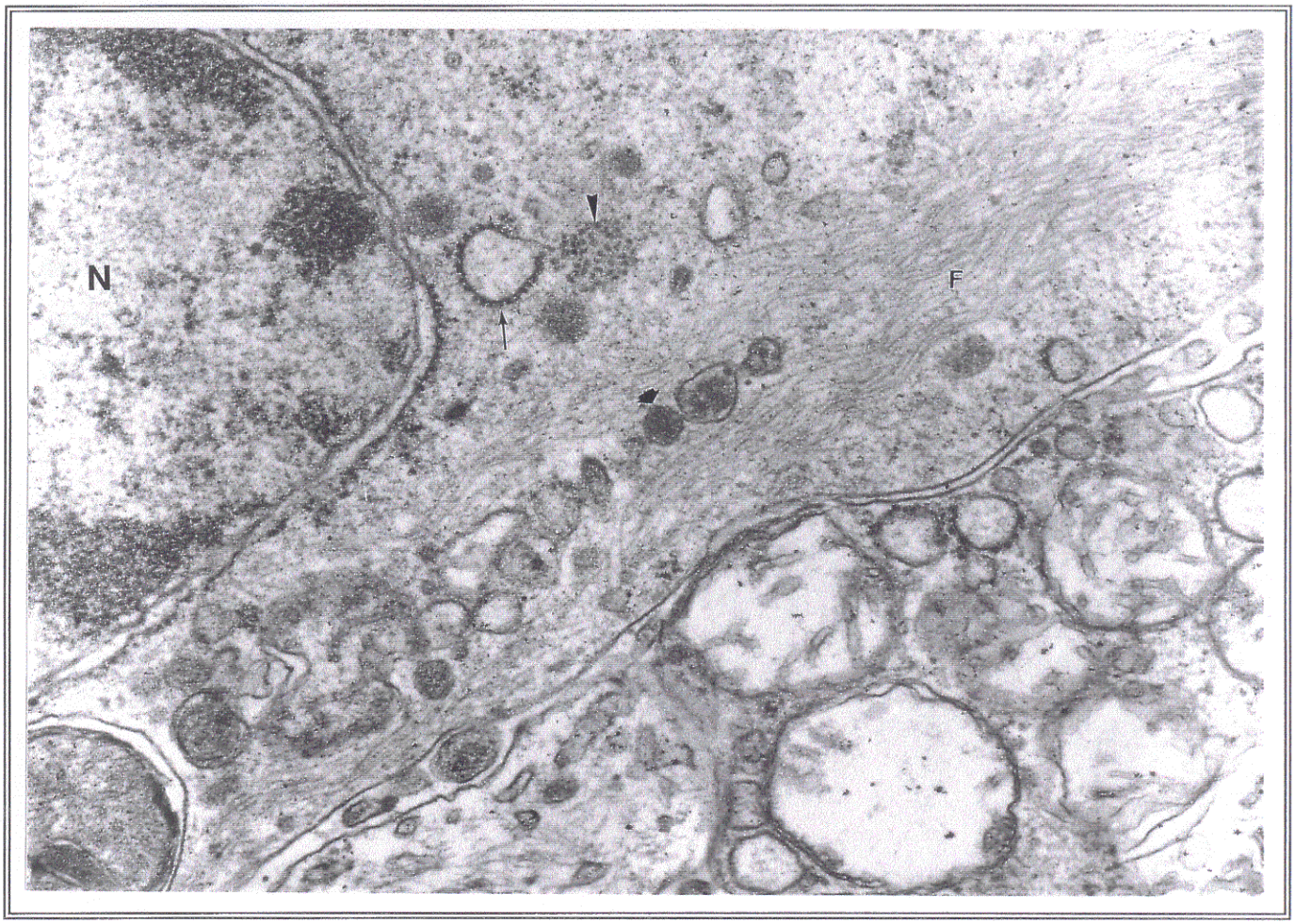



FIG. 42

**FIG. 43:** Sección semifina de una retina humana. Los núcleos de los astrocitos se localizan mayoritariamente a nivel de las capas de células ganglionares (CG), y fibras del nervio óptico (FNO) (▸).[Capa de conos y bastones (CB), limitante externa (MLE), nuclear externa (NE), plexiforme externa (PE), nuclear interna (NI), plexiforme interna (PI), limitante interna (MLI)]. (Corte vertical de retina, azul de toloudina, 125x).

**FIG. 44:** Panorámica de la capa de fibras del nervio óptico y membrana limitante interna. La MLI está constituida por una membrana basal (▸) y por las prolongaciones terminales de la glia de Müller (M). [Célula ganglionar (CG), astrocito (A)]. (1980x).

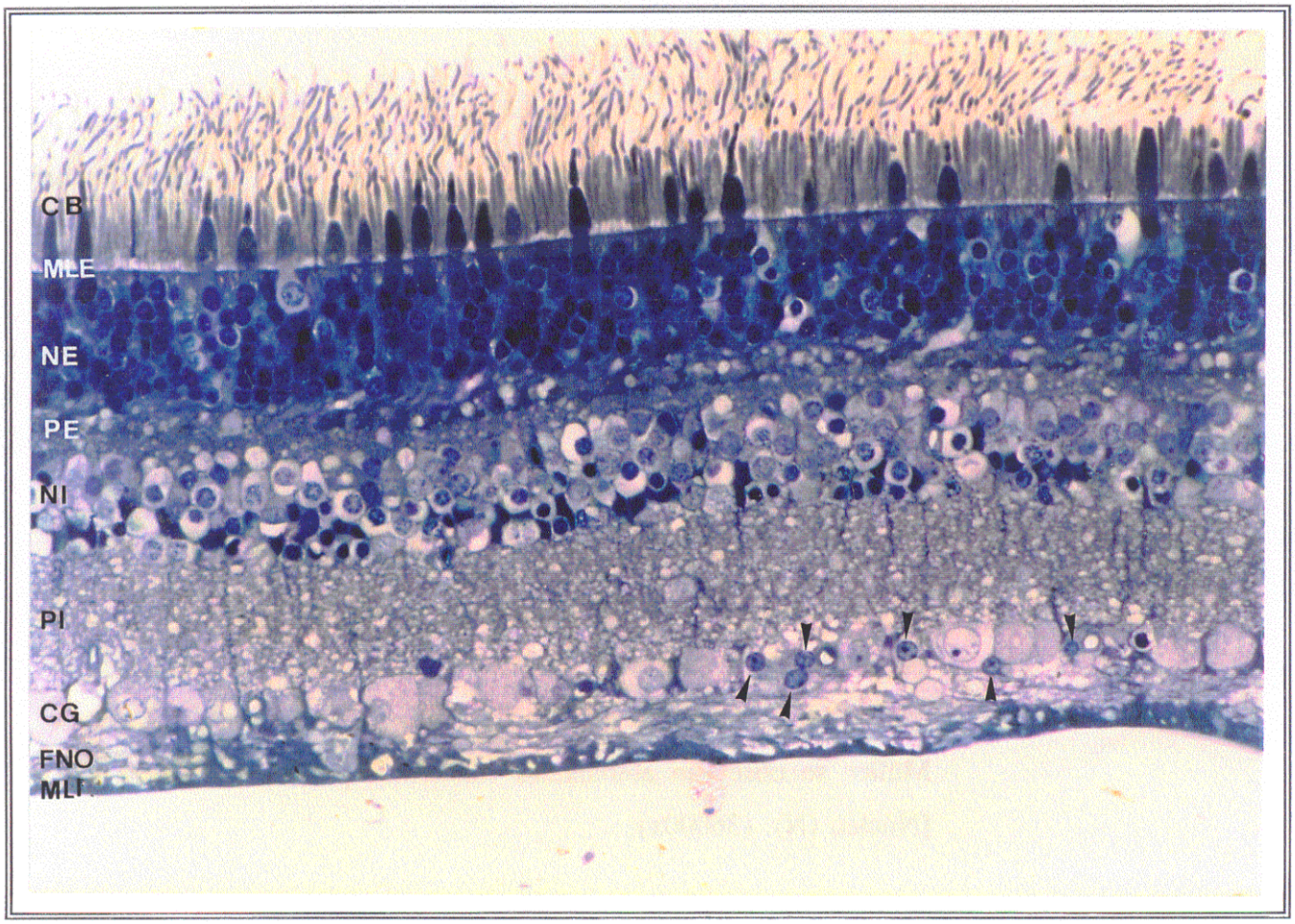



FIG. 43

FIG. 44

**FIG. 45:** Detalle en el que se observa una prolongación de la glia de Müller (M) interpuesta entre la membrana basal de un capilar (Mb) y un astrocito (A); en este último se distinguen mitocondrias (m), cuerpos densos (c) y filamentos gliales (F). En la prolongación de la glia de Müller se observan abundantes filamentos paralelos entre sí (►). [Núcleo (N). (36000x).

**FIG. 46:** Sección semifina en la que se puede apreciar que los núcleos de los astrocitos pueden adoptar formas alargadas (►) o formas más redondeadas (→). [Nuclear interna (NI), plexiforme interna (PI), capa de células ganglionares (CG), capa de fibras del nervio óptico (FNO), membrana limitante interna (MLI)]. (Corte vertical de retina, azul de toloudina, 250x).

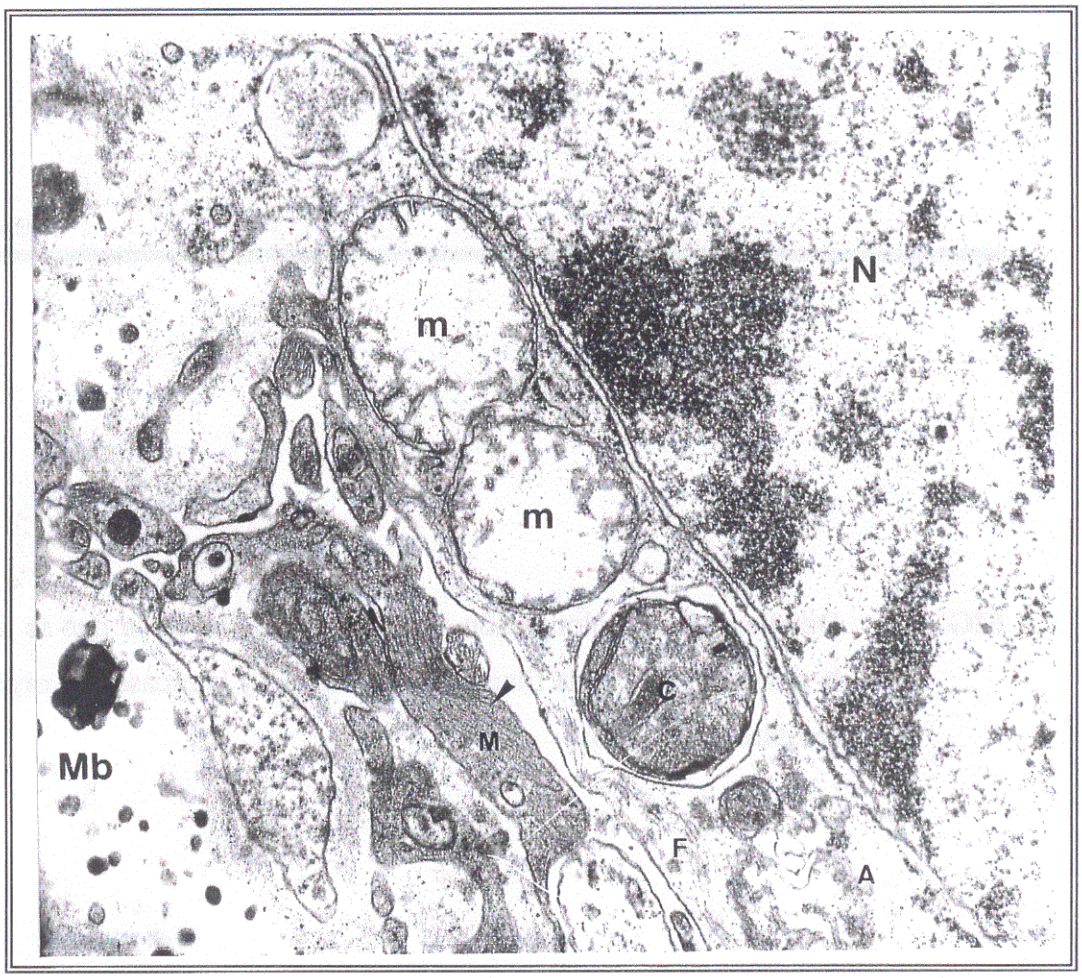



FIG. 45

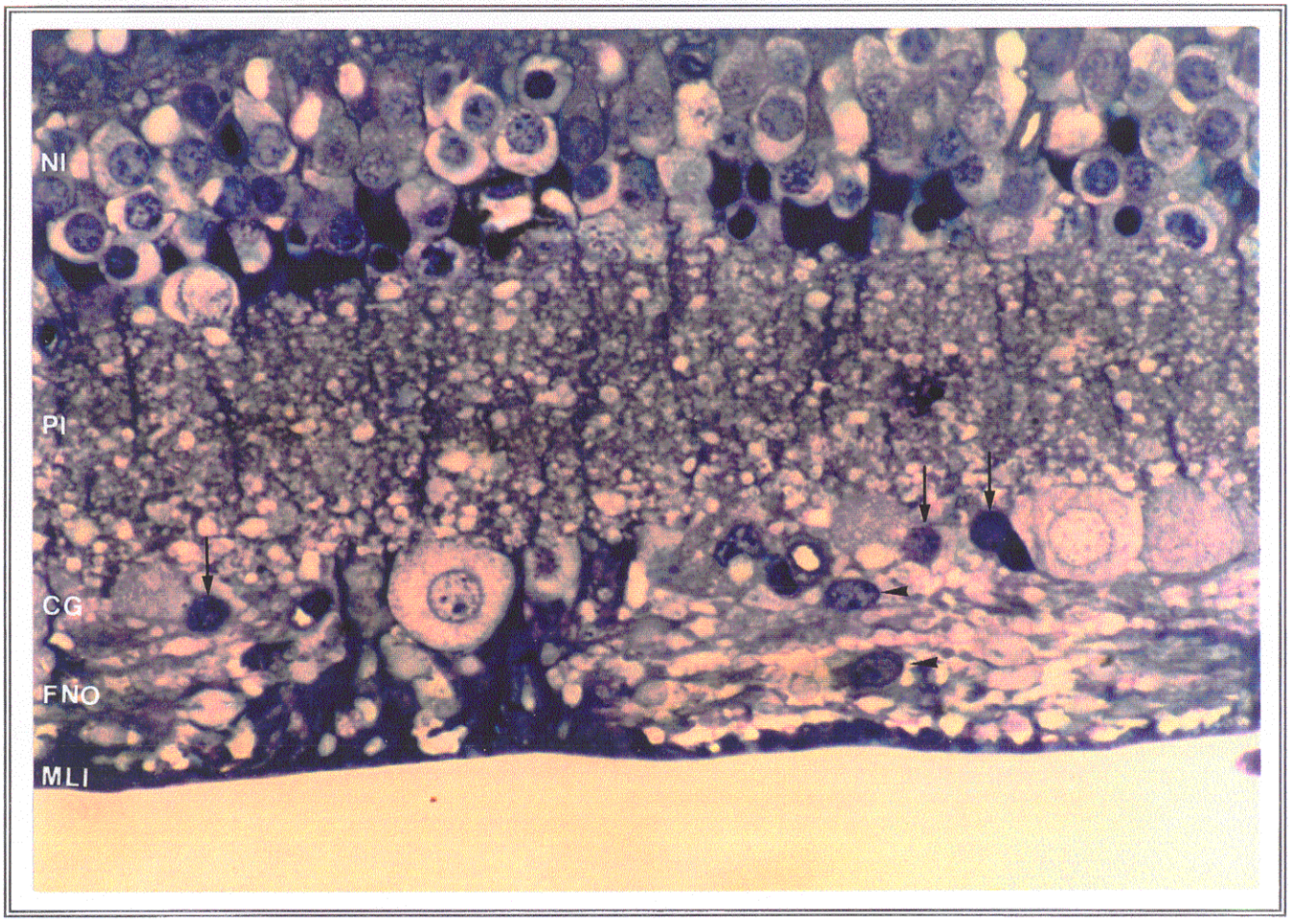



FIG. 46

**FIG. 47:** Detalle de una prolongación de un astrocito (►) en la que se aprecia la gran abundancia de filamentos gliales (F) y la escasez de orgánulos celulares. (125000x).

**FIG. 48:** Membrana limitante interna de la retina. Está constituida por una membrana basal (Mb), hacia la que se introducen las prolongaciones terminales de la glia de Müller (M), y prolongaciones de astrocitos(►). (5400x).

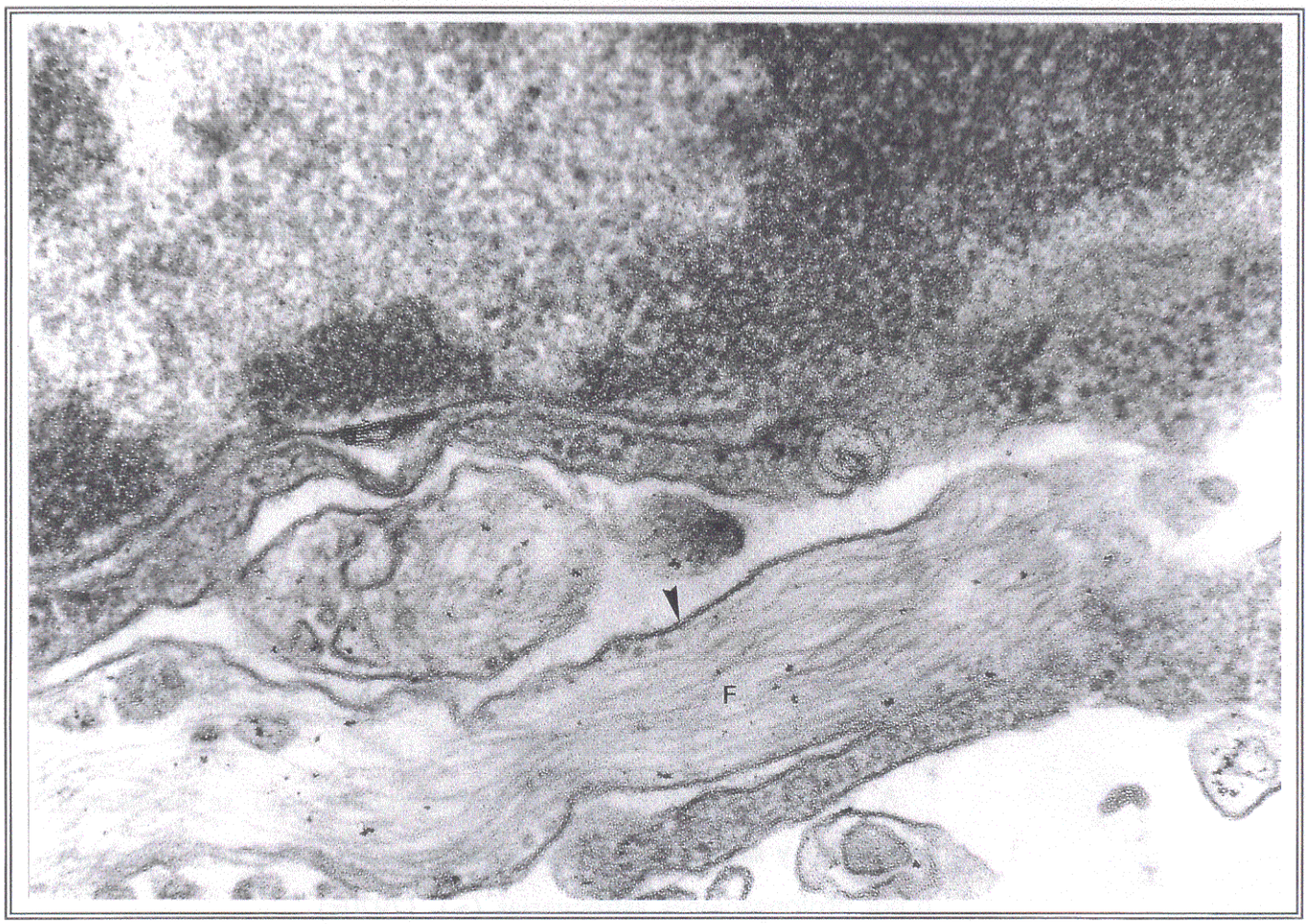



FIG. 47

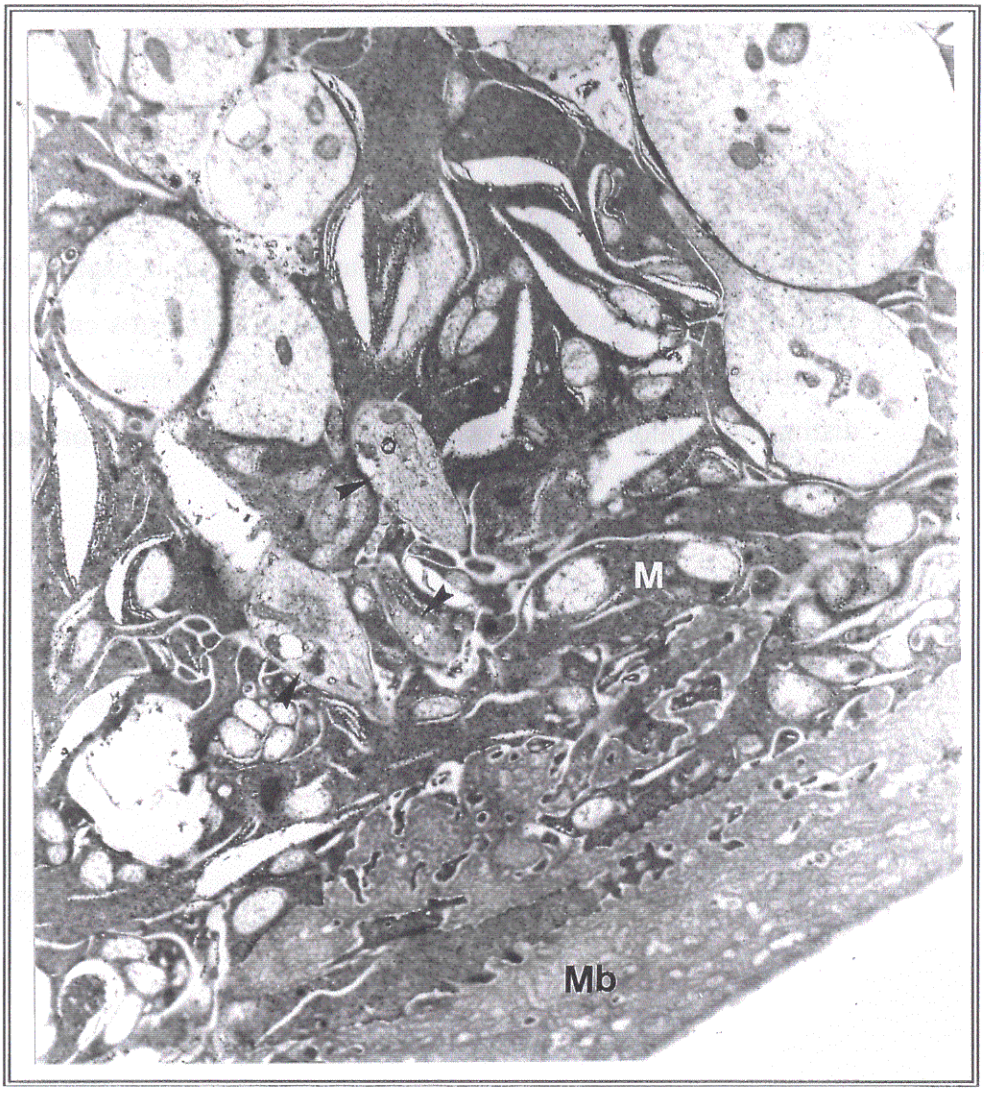



FIG. 48

**FIG. 49:** Micrografía de la capa de fibras del nervio óptico y membrana limitante interna. En la imagen se puede apreciar que los cuerpos celulares de los astrocitos (A) también pueden participar en la formación de la MLI.[membrana basal (Mb)].

A nivel de la capa de FNO, los axones (ax) se encuentran agrupados y separados por prolongaciones de la glia de Müller (→), o por prolongaciones astrocitarias (►). (7920x).

**FIG. 50:** Detalles de prolongaciones de astrocitos a nivel de la capa de FNO. En la micrografía se observan gliotubulos (G) dispuestos en forma de herradura alrededor de una mitocondria (m). Además también se distinguen uniones tipo GAP (►) entre las prolongaciones astrocitarias. (26400x).

FIG. 49

FIG. 50

**FIG. 51:** Astrocito (A) de la capa de FNO localizado en las proximidades de un vaso sanguíneo (V). (5400).

**FIG. 52:** Panorámica de la capa de células ganglionares. Las células ganglionares (CG) se encuentran separadas unas de otras fundamentalmente por las prolongaciones de la glia de Müller (→). En la imagen se puede apreciar un astrocito (A) próximo a un vaso (V). El vaso se encuentra rodeado por prolongaciones astrocitarias(▸) y por prolongaciones de la glia de Müller (→). (2600x).

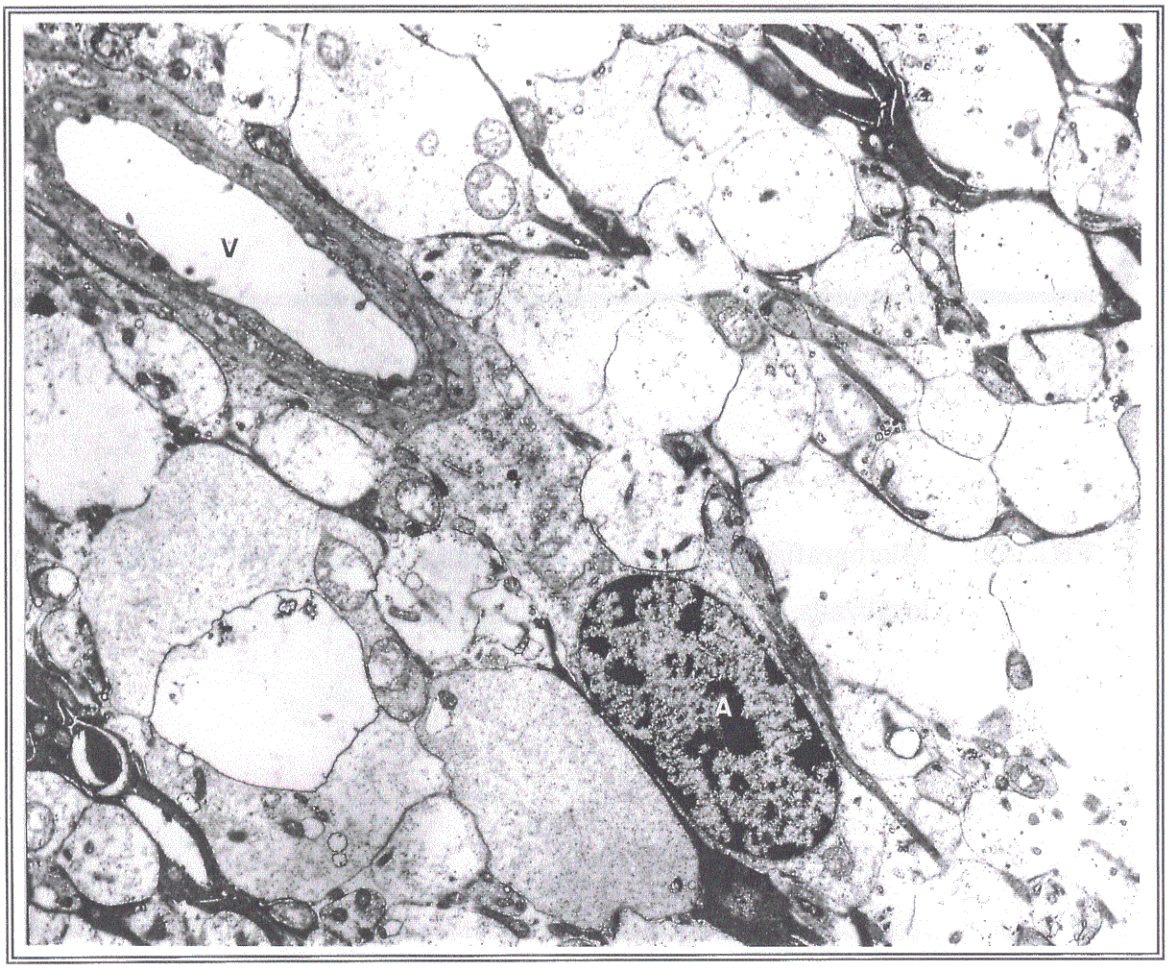



FIG. 51

FIG. 52

**FIG. 53:** Micrografía en la que se observa una prolongación de un astrocito(►) localizada entre dos células ganglionares (CG). (21600x).

**FIG. 54:** Imagen en la que puede observarse uniones de tipo desmosoma entre las prolongaciones de los astrocitos (►), y entre prolongaciones de astrocitos y prolongaciones de glia de Müller (→). (21600x)

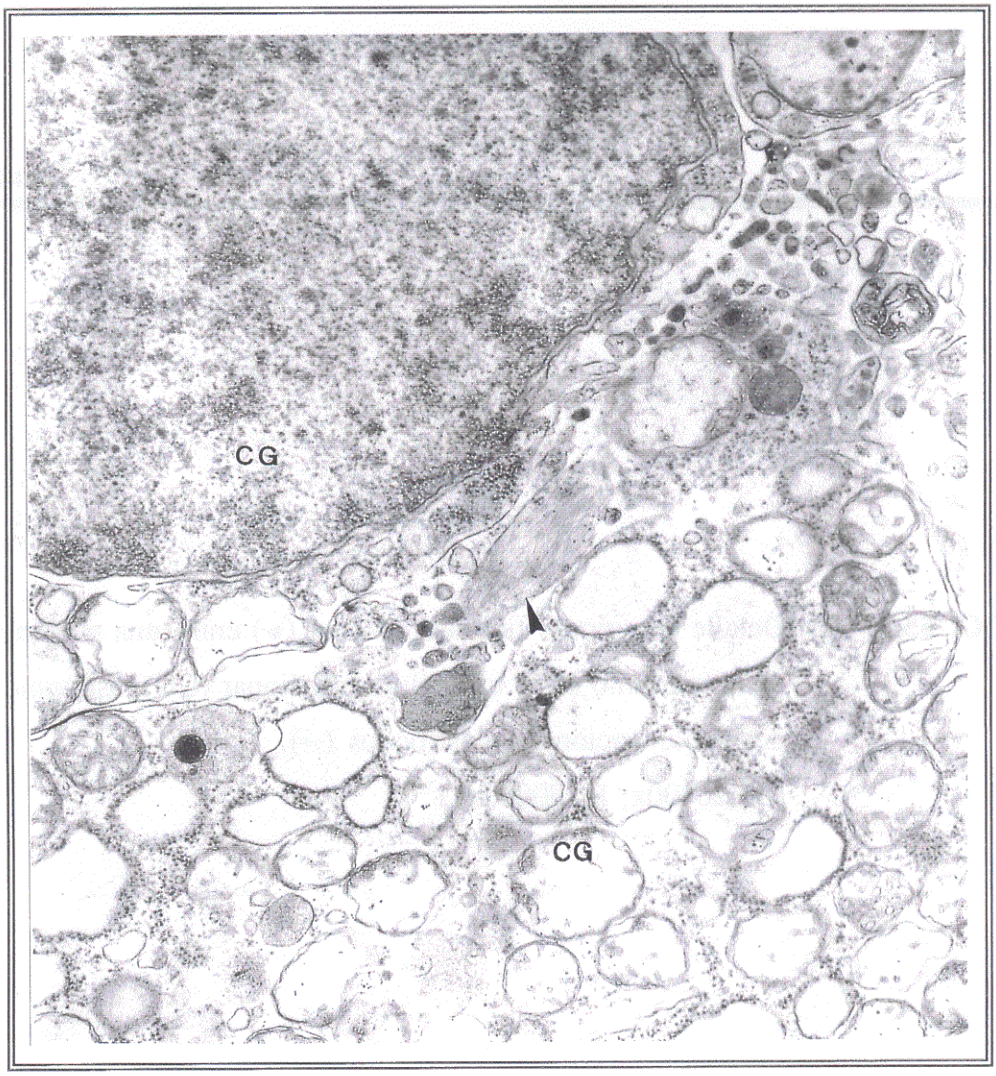



FIG. 53

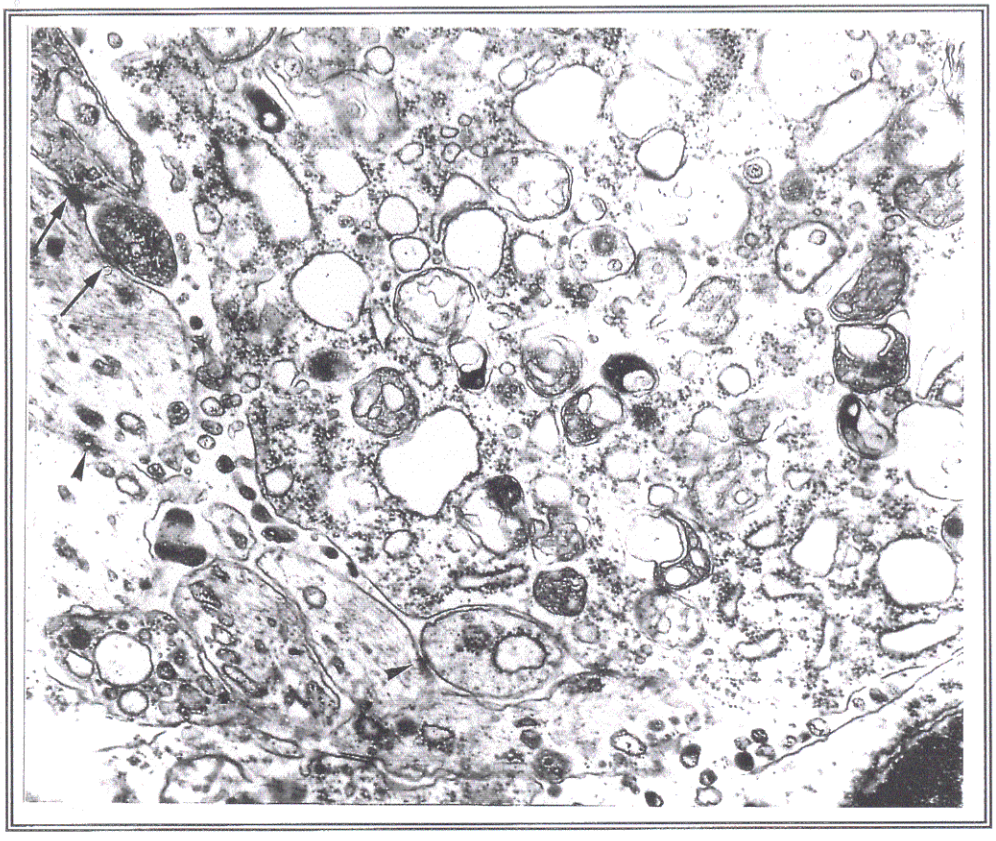


FIG. 54

**FIG. 55 A y B:** Detalle de uniones tipo desmosoma (▸) entre una prolongación de un astrocito (A) y una célula ganglionar (CG), así como entre dos prolongaciones de astrocitos (→).
(A: 26400x; B: 90000x).

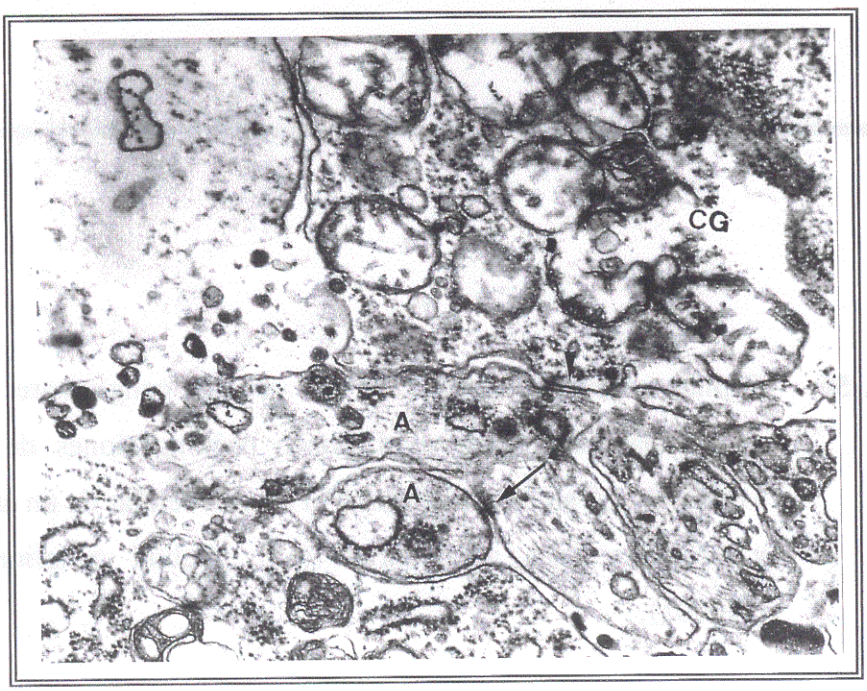



FIG. 55 A

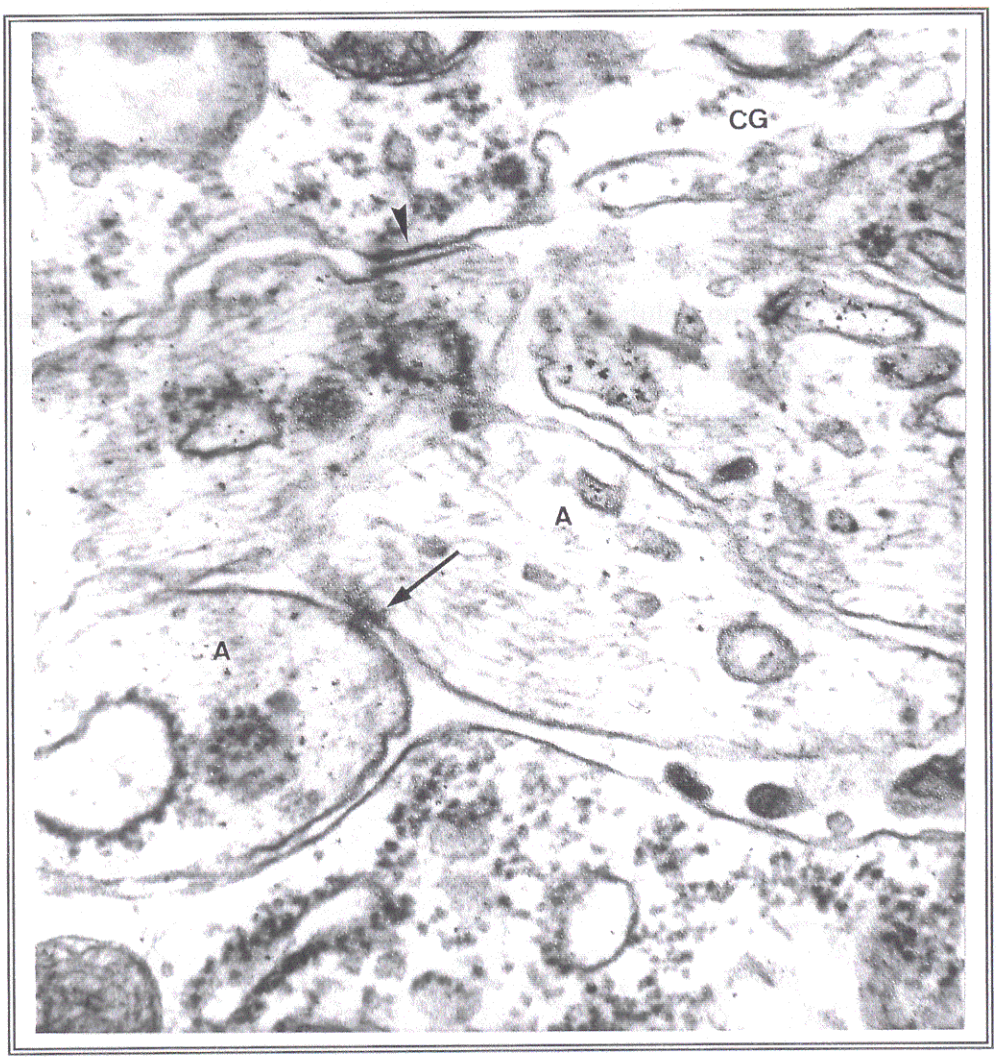



FIG. 55 B

**FIG. 56:** Capilar retiniano de la capa de células ganglionares. Sobre la membrana basal (Mb) se disponen prolongaciones de la glia de Müller (M). También se observa el cuerpo celular de un astrocito (A) y prolongaciones astrocitarias (►). [Celula ganglionar (CG)]. (21600x).

**FIG. 57:** Cuerpo celular de la glia de Müller (M) sobre la membrana basal (Mb) de un capilar a nivel de la capa nuclear interna. [Pericito (P).] (15400).

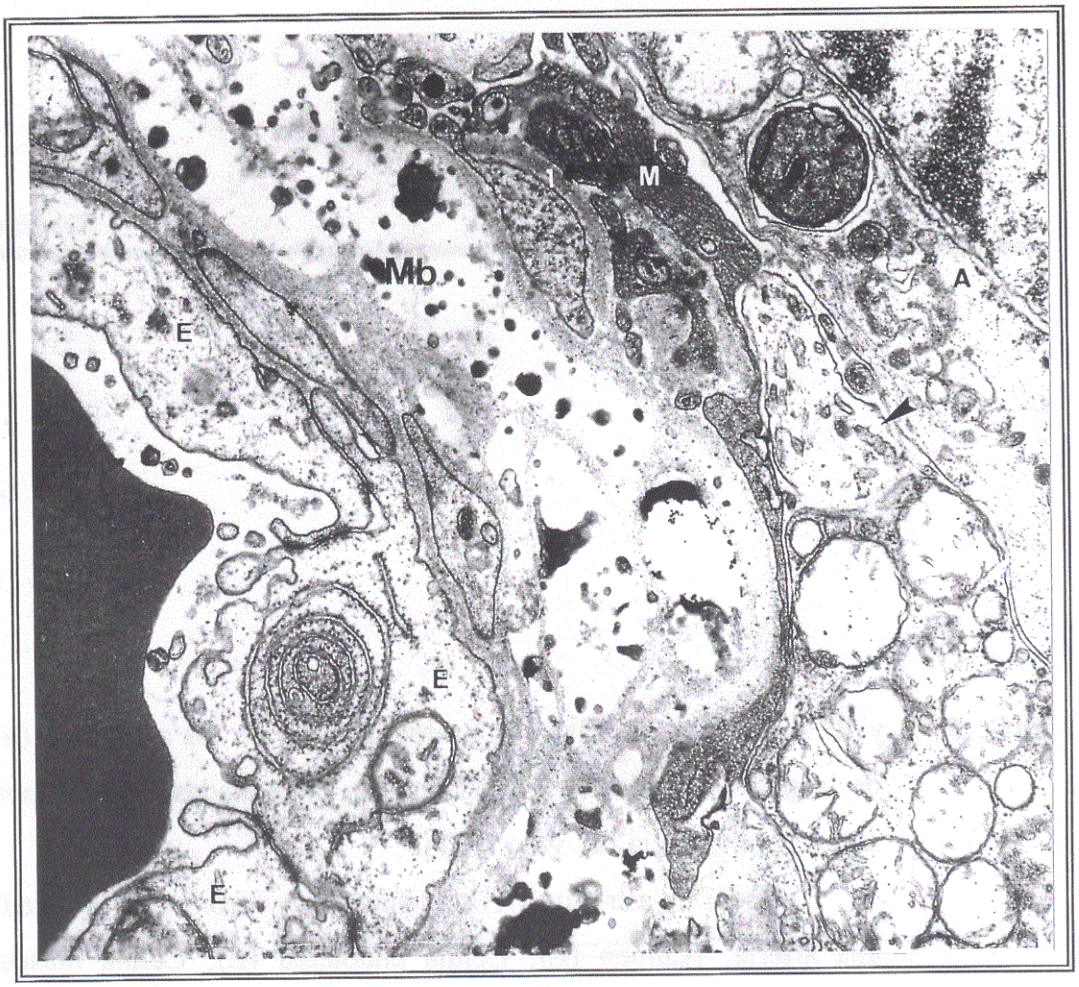



FIG. 56

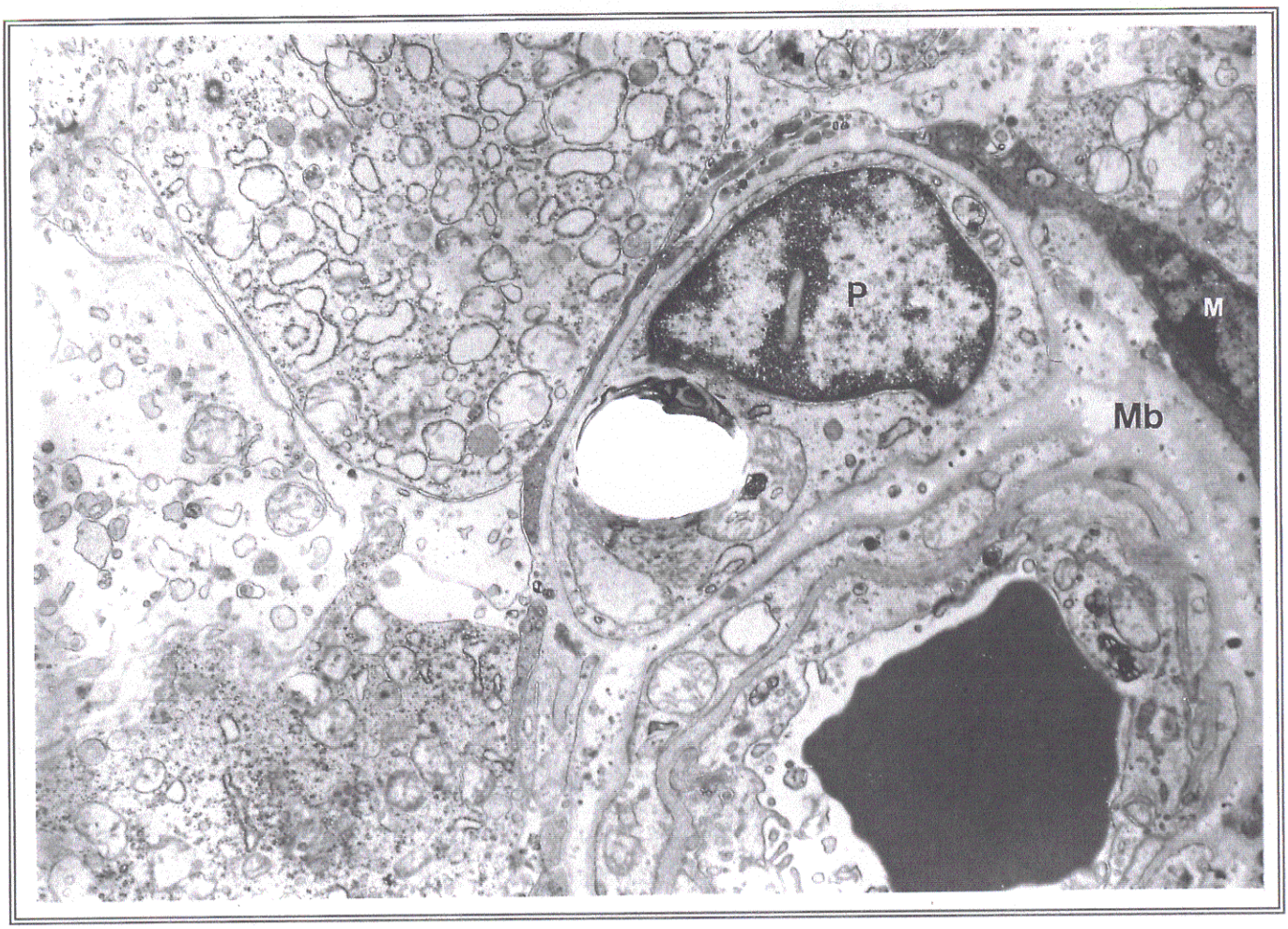



FIG. 57

**FIG. 58 A y B:** Arterias retinianas. Las prolongaciones de los astrocitos (►) y de la glia de Müller (→) se encuentran intercaladas, y se disponen sobre la adventicia del vaso (AD).

En B) un astrocito (A) se dispone muy próximo a la pared de una arteria. [Lumen (L), Célula endotelial (E), Célula muscular (Mu)].

(A: 7500x; B: 7950x).

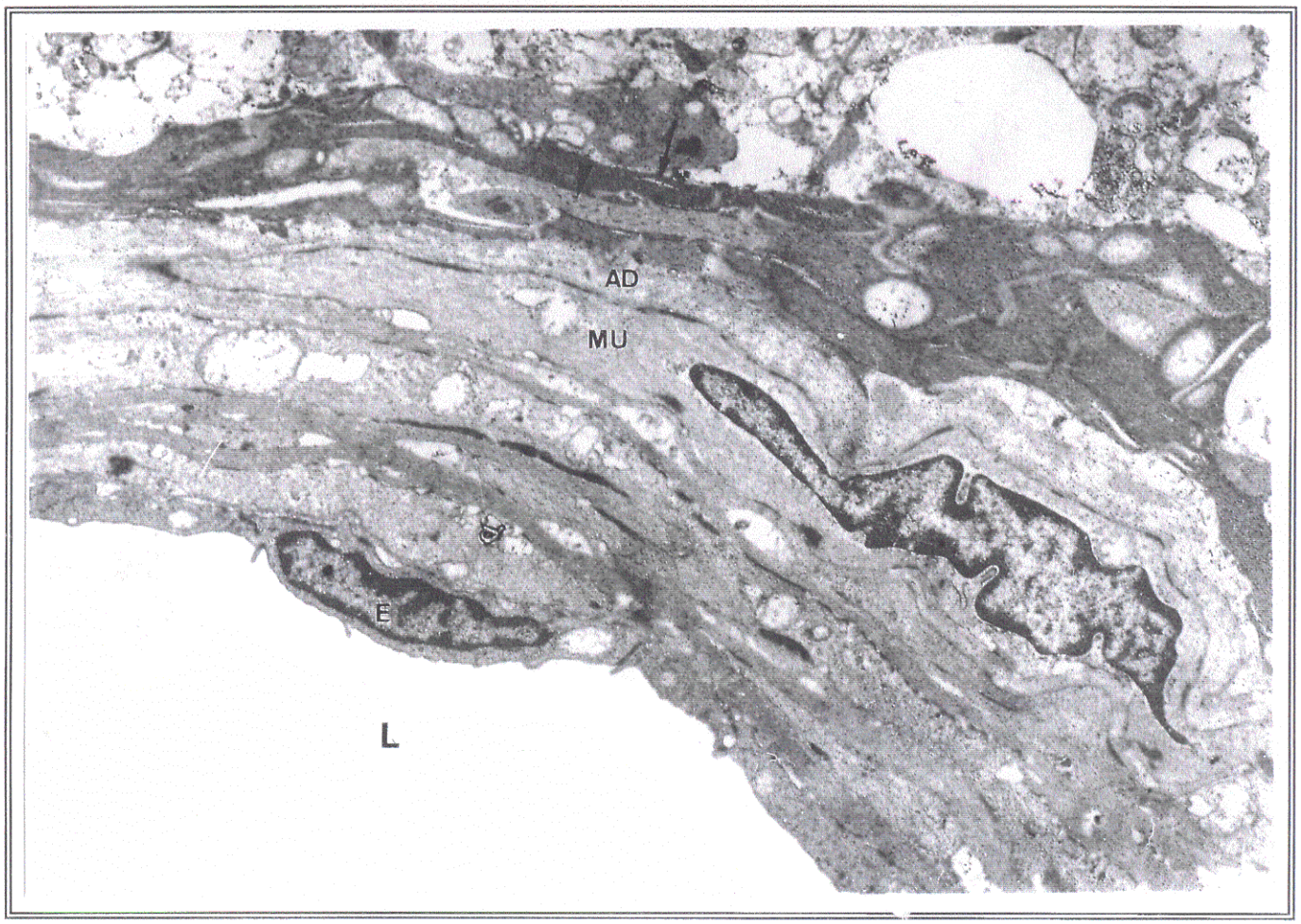



FIG. 58 A

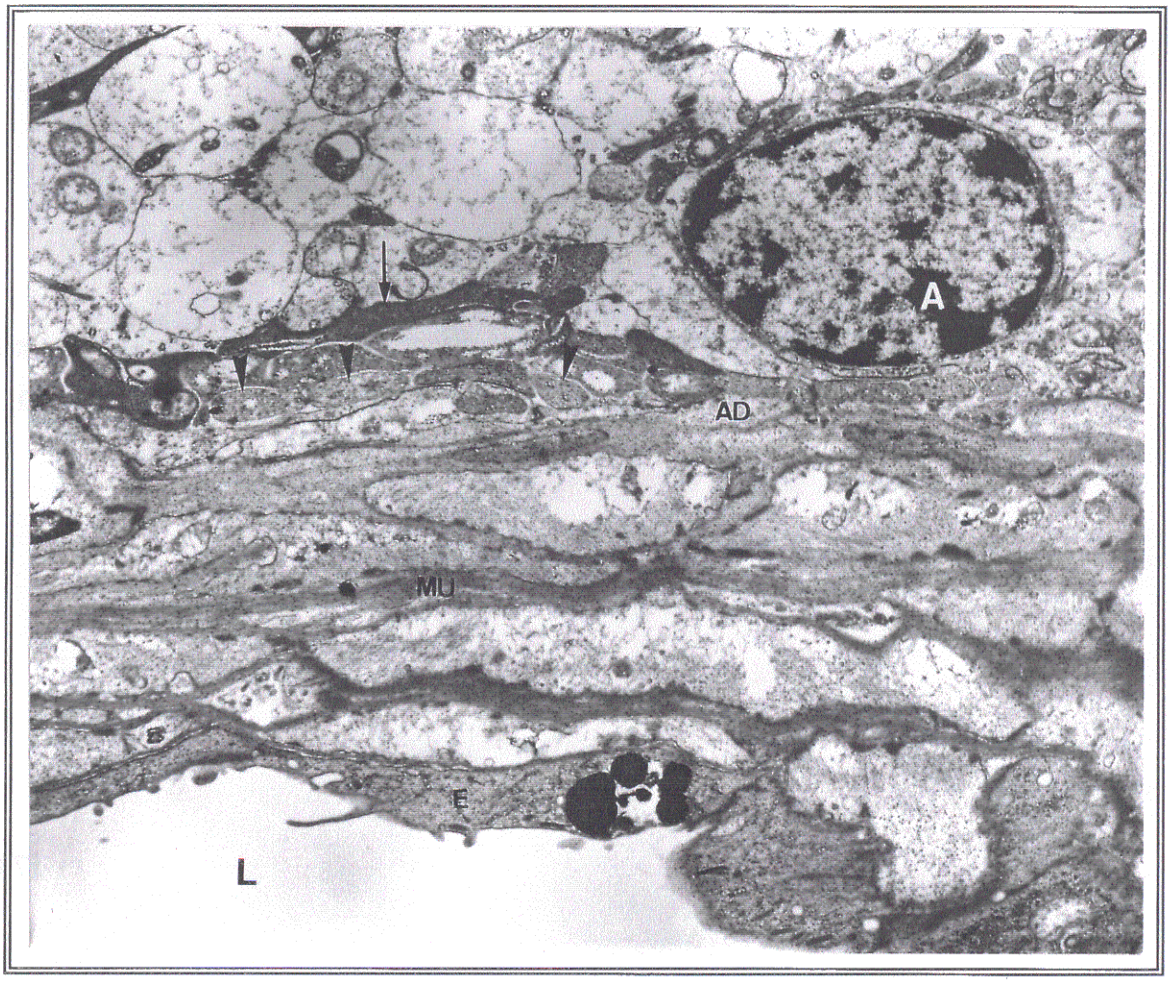
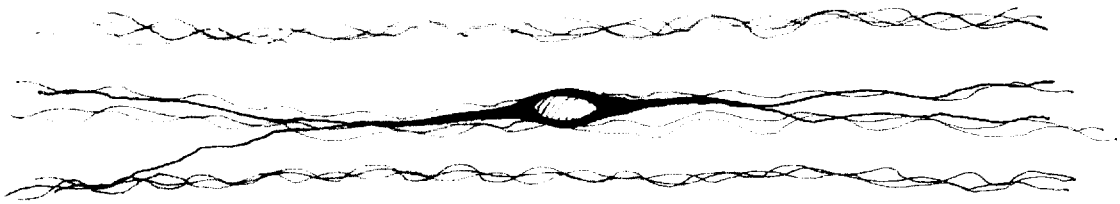
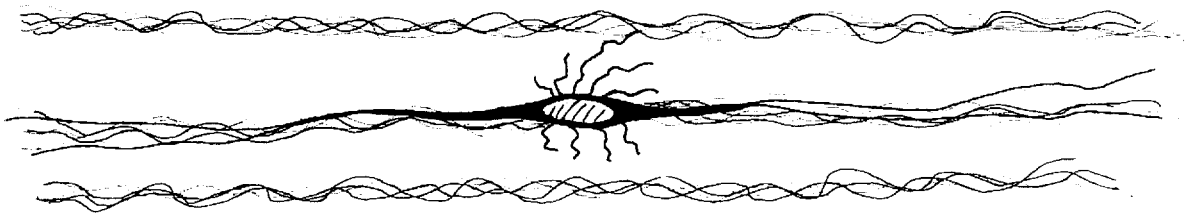



FIG. 58 B

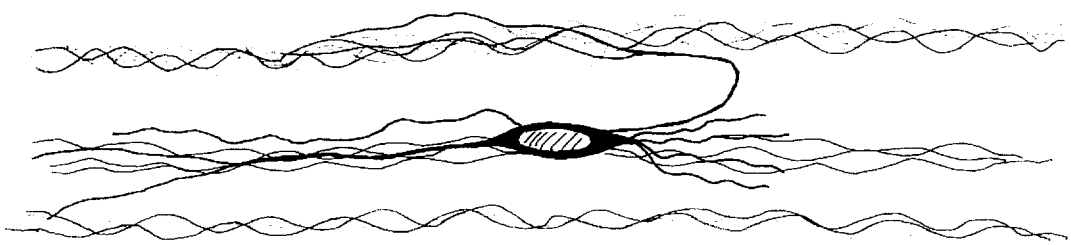
**FIG. 59:** Dibujos representativos de los diferentes subgrupos en los que se ha dividido a los astrocitos con morfología alargada: $A_1$, $B_1$, $C_1$, $D_1$.



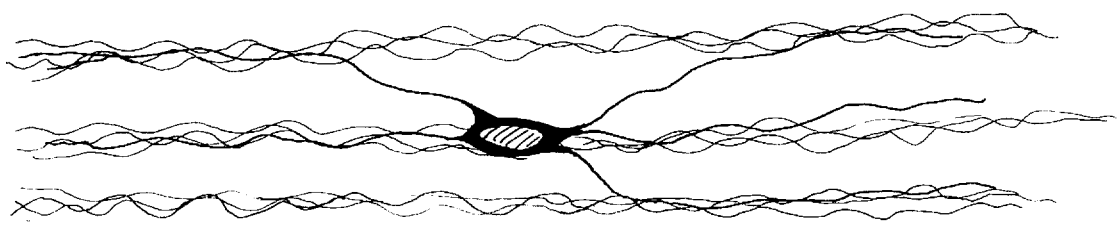
$A_1$



$B_1$

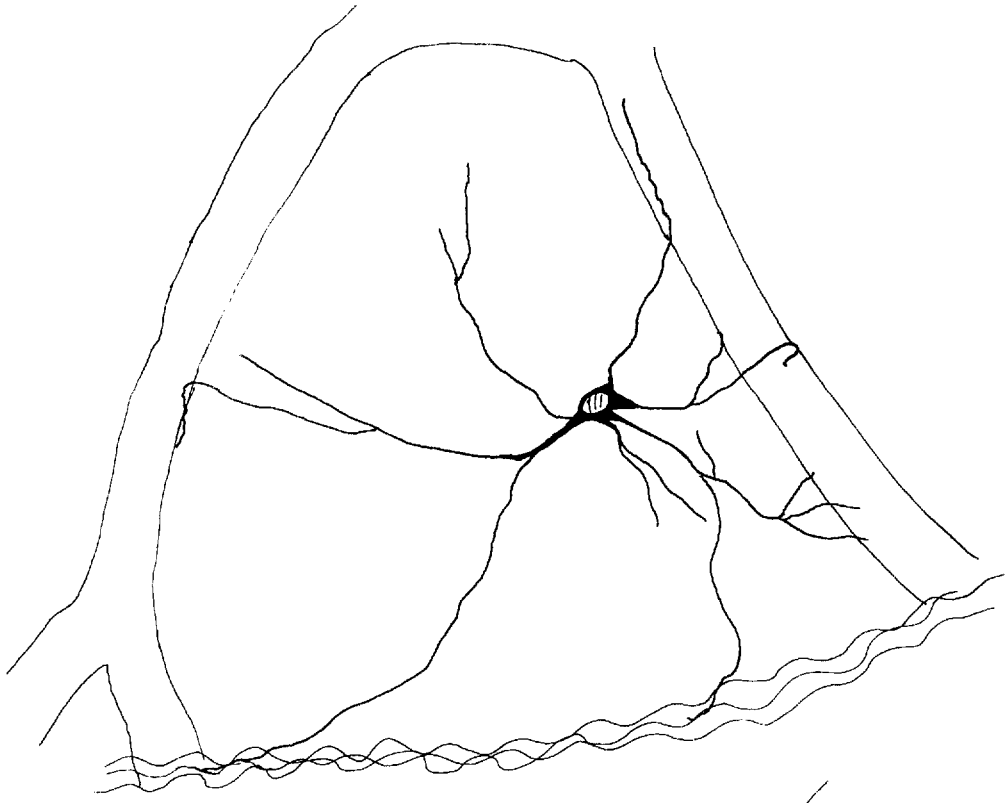


$C_1$

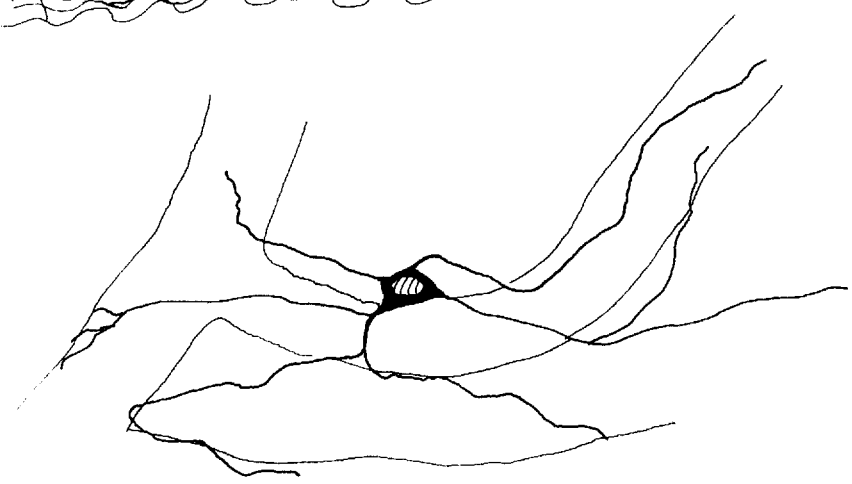


$D_1$

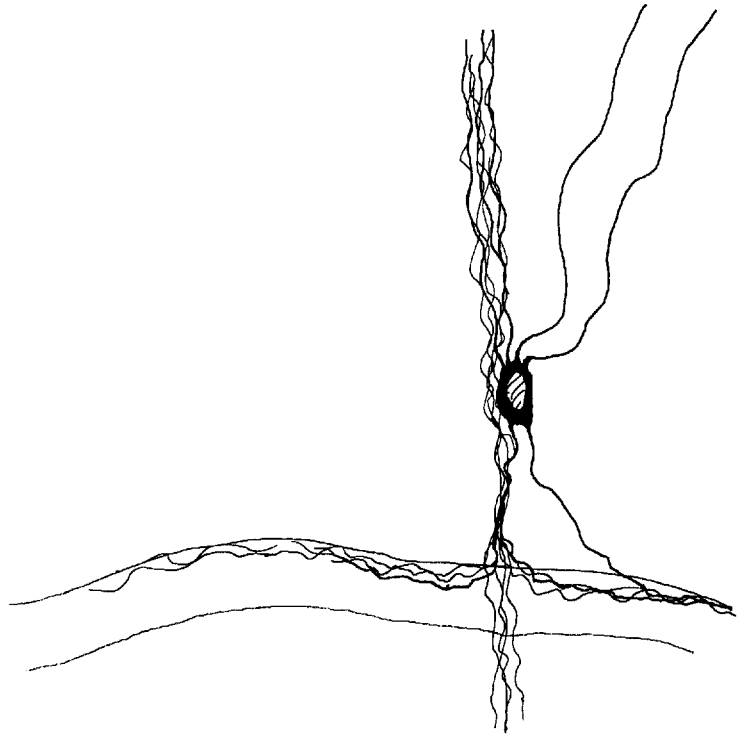
**FIG. 60:** Dibujos representativos de los diferentes subgrupos en los que se ha dividido a los astrocitos con morfología estrellada: $A_2$, $B_2$, $C_2$.



$A_2$



$B_2$



$C_2$

**FIG. 61:** Esquema tridimensional de la distribución de los astrocitos en la retina peripapilar. Los astrocitos se localizan a nivel de la capa de fibras del nervio óptico (FNO), capa de células ganglionares (CG), plexiforme interna (PI) y nuclear interna (NI). En la capa de FNO, los astrocitos son alargados y sus prolongaciones se unen para formar haces, que se disponen entre los haces de axones y los capilares peripapilares radiales (1). En la CG los astrocitos son estrellados, sus prolongaciones se dirigen haca otras prolongaciones de astrocitos, o hacia los vasos sanguíneos y forman un plexo astroglial con morfología en panal de abeja (2). Las prolongaciones de los astrocitos de la CG acompañan a los capilares hasta la NI, y forman un plexo astroglial con morfología irregular (3). Disco óptico (DO).

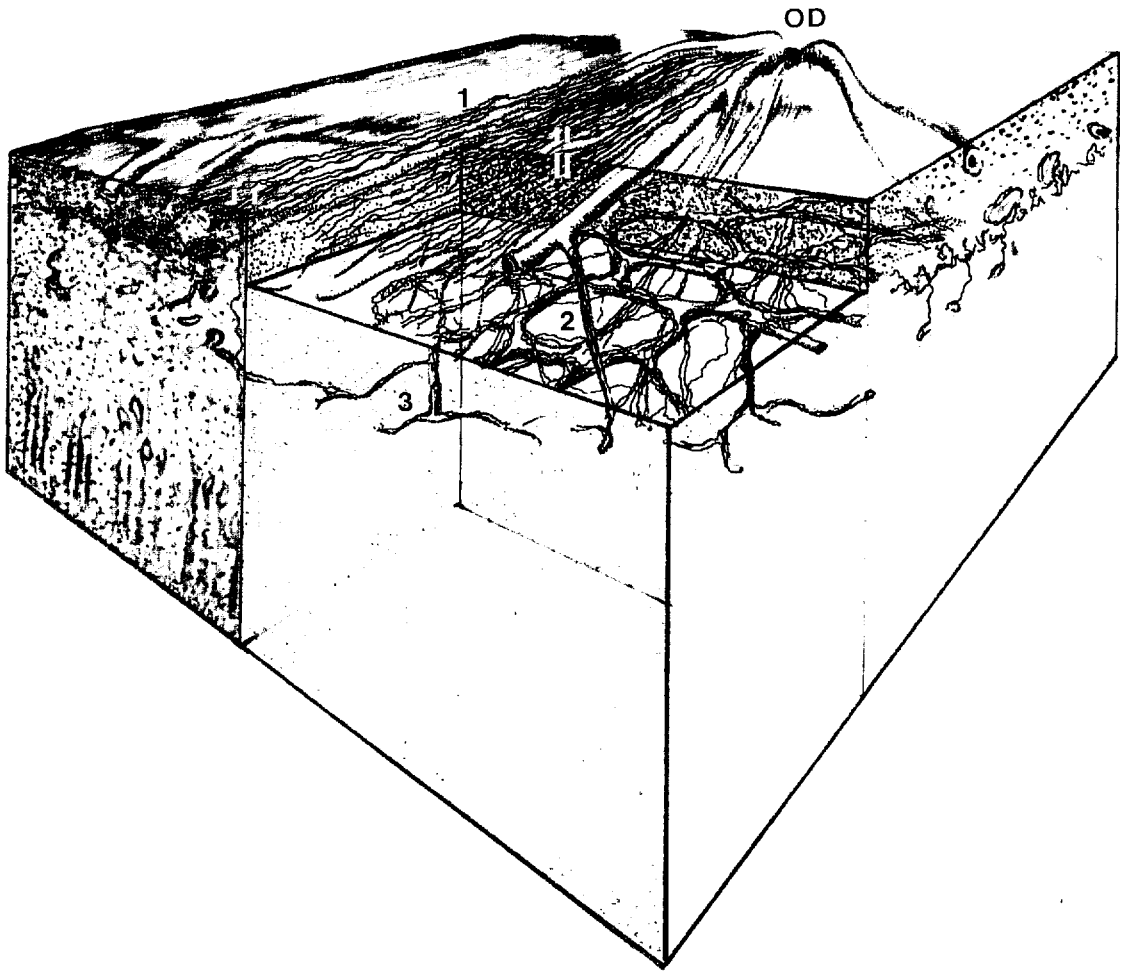



FIG.61

**FIG. 62:** Esquema tridimensional de la distribución de los astrocitos en el área macular, a nivel del haz papilo macular. En la región perifoveal (1), los astrocitos se encuentran en las cuatro capas retinianas: FNO, CG, PI, NI. En la capa de FNO, las prolongaciones de los astrocitos forman haces paralelos y compactos, que se disponen entre los haces axonales del haz papilo macular. En la CG, los astrocitos estrellados y sus prolongaciones forman un plexo en panal de abeja alrededor y entre los vasos sanguíneos. Los capilares, que desde la CG se dirigen hacia la nuclear interna, también están acompañados por prolongaciones de los astrocitos estrellados. En la región foveal (2), donde algunas capas retinianas se adelgazan o desaparecen, no se encuentran los astrocitos alargados de la capa de FNO, permaneciendo únicamente un número reducido de astrocitos estrellados de la CG, que acompañan a los capilares. A 0,4 mm del centro de la fovea, desaparecen los capilares y también los astrocitos. Disco óptico (DO).

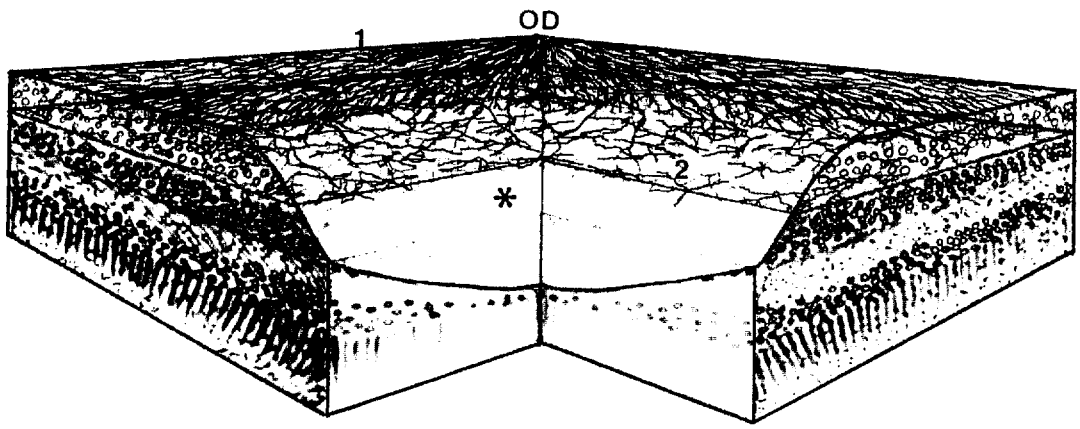



FIG.62

**FIG. 63:** Esquema tridimensional de la distribución de los astrocitos en la retina periférica. A este nivel la capa de FNO es bastante fina, y los haces astrogliales longitudinales han desaparecido (►). Existen un número escaso de astrocitos entre los capilares de la CG (→). El descenso en el número de astrocitos y de vasos sanguíneos, hace difícil distinguir el plexo astroglial en panal de abeja.

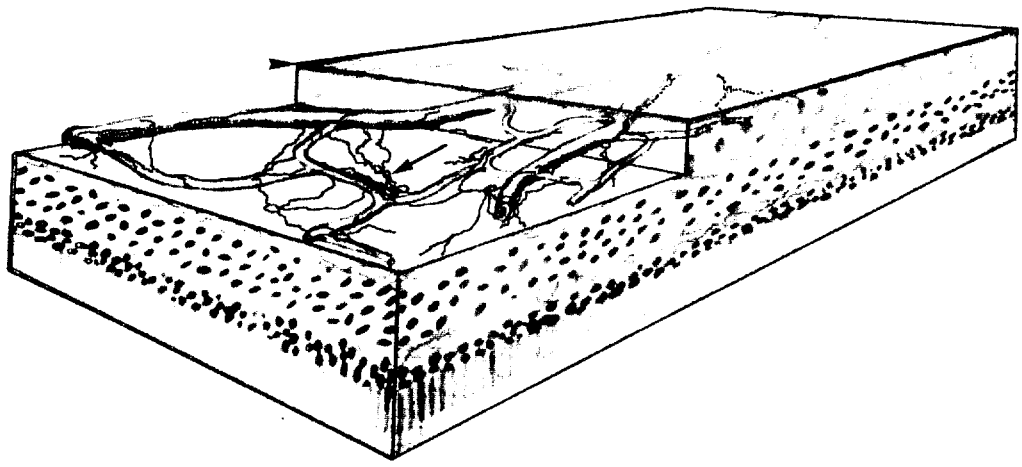


FIG. 63

# 5.- DISCUSIÓN

# 5.- DISCUSIÓN.

## 5.1.- LOCALIZACIÓN DE LOS ASTROCITOS RETINIANOS HUMANOS.

La localización de los astrocitos en la retina humana ha sido un tema discutido desde que KÖLLIKER en 1852[108] mencionara la existencia de células asteriformes en los tejidos retinianos internos.

Con la utilización de las técnicas de plata ha habido una gran discrepancia en cuanto a la ubicación de los astrocitos en las distintas capas de la retina.

Si bien, la mayoría de los autores coinciden en observar astrocitos, tanto en la capa de células ganglionares, como en la capa de F.N.O. (RAMÓN Y CAJAL, 1892[190]; GREEF, 1894[81]; BACH, 1895[11]; MARCHESANI, 1926[135]; POLYAK, 1941[177]; WOLTER, 1955-1961[263-269]; LESSEL, 1963[118]; WOLFF, 1968[261], OGDEN, 1976,1983[164,165]); otros, por el contrario, sólo los encuentran en la capa de F.N.O. (SCHWALBE, 1874[228]), o en la capa plexiforme interna (MARENGHI, 1900[137]).

El principal problema radica a la hora de afirmar la existencia, tanto de cuerpos celulares, como de prolongaciones de astrocitos en las capas plexiforme y nuclear interna.

RAMÓN Y CAJAL (1892[190]), además de los cuerpos celulares de los astrocitos localizados en las capas de F.N.O. y capa de células ganglionares,

observa prolongaciones celulares escasas que se introducen hasta la plexiforme interna.

Sin embargo, POLYAK (1941[177]), distingue dos tipos de astrocitos que presentan una localización distinta: los astrocitos fibrosos, que se ubican en las capas de F.N.O. y células ganglionares, y mandan prolongaciones hacia la capa nuclear interna; y los astrocitos protoplásmicos cuyos cuerpos celulares se disponen en las capas plexiforme interna y ganglionar.

Además, WOLTER (1955-1961[263-269]) y LESSELL (1963[120]) encuentran cuerpos celulares de astrocitos en la capa plexiforme interna; si bien, WOLTER también observa prolongaciones celulares incluso en la nuclear interna.

Estas discrepancias se hacen extensivas a los autores posteriores que utilizaron otros métodos de estudio citológicos e histológicos, como la microscopía electrónica o la inmunohistoquímica.

Así, WEIDMAN (1973[257]) e IKUI (1976[95]), en sus estudios ultraestructurales confirman la ubicación prioritaria de los astrocitos en las capas de F.N.O. y de células ganglionares, aunque, WEIDMAN también describe ramificaciones astrocitarias en las capas nuclear y plexiforme interna.

Con la utilización de la inmunohistoquímica, empleado anti-PGFA como marcador, los autores tampoco llegan a un acuerdo con respecto a la localización de los astrocitos en las diferentes capas retinianas.

HISCOTT (1984[87]), y TUCCARI (1986[247]), observan reacción PGFA(+) en las capas de F.N.O. y células ganglionares, lo que indicaría una localización de los astrocitos a esos niveles.

Sin embargo, KUMPULAINEN y col. (1983[111]), sólo encuentran señal

PGFA(+) en la capa de células ganglionares, donde se sitúan los cuerpos celulares de los astrocitos y en la capa plexiforme interna, hacia la que se extienden las prolongaciones gliales; mientras que, MOLNAR (1984[147]) sólo detecta inmunoreactividad PGFA(+) en la capa de F.N.O.

Nosotros, al estudiar las secciones verticales de retina marcadas con anti-PGFA, hemos podido constatar, al igual que gran parte de los autores anteriores (RAMÓN Y CAJAL, 1892,1911[190,192]; GREFF, 1894; BACH, 1895[11]; MARCHESANI, 1926[135]; POLYAK, 1941[177]; WOLTER, 1955-1961[263-269]; LESSELL, 1963[120], WOLFF, 1968[261], WEIDMAN, 1973[257]; IKUI, 1976[95]; HISCOTT, 1984[87]; TUCCARI, 1986[247]), que los astrocitos se localizan fundamentalmente en la capa de F.N.O. y capa de células ganglionares, ya que en estos niveles la inmunoreactividad PGFA(+) es muy intensa.

Sin embargo, como RAMÓN Y CAJAL (1892[190]), POLYAK (1941[177]), WOLTER (1955-1961[263-269]), LESSELL (1963[120]); WEIDMAN (1973[257]), y KUMPULAINEN (1983[111]), hemos encontrado prolongaciones astrogliales a nivel de la plexiforme interna, y también, como ya expusieron WOLTER (1955-1961[263-269]), WOLFF (1968[261]) y WEIDMAN (1973[257]), en la nuclear interna.

Aunque la mayoría de los cuerpos celulares se localizan en estas dos capas (capa de F.N.O. y capa de células ganglionares), en las inmunodetecciones contrastadas con hematoxilina, y en las preparaciones de microscopía electrónica, hemos podido observar algunos núcleos, muy escasos, en la capa plexiforme interna, como ya indicaron MARENGUI (1900), WOLTER (1955-1961[263-269]), LESSELL (1963[120]), aunque estos autores observaron una mayor cantidad de cuerpos celulares que la encontrada por nosotros.

La localización de los astrocitos en la retina de otras especies animales coincide en cierta forma con la observada en el hombre, ya que en la mayoría de los casos, los astrocitos se encuentran restringidos a la capa de F.N.O. y capa de células ganglionares, no observándose salvo excepciones en las capas retinianas más externas. Así, esta situación ha sido encontrada en la retina del mono (OGDEN, 1976[164]; BÜSSOW, 1980[29]; SCHNITZER, 1987b,1988,d[219,223]; DIESTLER, 1993[59]), y del gato (BÜSSOW, 1980[29]; STONE, 1987[235]; SCHNITZER, 1988b[221]; CHAN-LING, 1991b[37]); si bien, en este último animal, KARSCHIN y col. (1986a,b[101,102]) observan prolongaciones astrogliales hasta la nuclear externa, además de algunos cuerpos celulares en la nuclear interna.

Sin embargo, en la rata, hay una mayor discrepancia en cuanto a la localización de estas células. DIXON (1981[61]) y BJÖRKLUND (1985a,b[21,22]), observan estas células en la capa de F.N.O y capa de células ganglionares; sin embargo, DIXON también encuentra señal PGFA(+) a nivel de la plexiforme interna. Por el contrario, STONE y DREHER (1987[235]), sólo observaron estos astrocitos en la capa de F.N.O.

En el conejo, los astrocitos sólo se van a localizar en la capa de F.N.O., pudiéndose encontrar también estas células gliales sobre los vasos localizados en el vítreo (SCHNITZER, 1985,1986,1988a,b,c[216,217,220-222]; STONE, 1987[235]; ROBINSON, 1989[206]; TRIVIÑO, 1988,1990,1992[242,244,246]).

Como ya indicamos en nuestros resultados, todas las regiones, en las que habíamos dividido previamente la retina, presentan inmunoreactividad PGFA(+), con la excepción de la zona avascular de la fovea y la retina periférica próxima a la Ora Serrata. Esto concuerda con las observaciones de IKUI (1976[95]) en retinas humanas con microscopía electrónica.

También, hay que añadir, que en la retina de los primates no homínidos, los

astrocitos van a estar ausentes también de estas zonas (BÜSSOW, 1980[29]; SCHNITZER, 1987b,1988d[219,223]; DIESTLER (1993[59]); al igual que en algunas retinas de animales no primates como el gato (KARSCHING, 1986a,b[101,102]; SCHNITZER, 1988b[221]; LING, 1988[127]; CHAN-LING, 1991a,b[36,37]).

Además, hemos constatado, que los astrocitos se localizan en las zonas vascularizadas de la retina, de tal forma que son mas numerosos cerca del disco óptico (donde hay una mayor suplencia sanguínea), y decrecen paulatinamente en número hacia la periferia (lo mismo que ocurre con el número de vasos).

Los astrocitos desaparecen a 0,4 mm. del centro de la fovea, al igual que el plexo capilar macular; y en las proximidades de la Ora Serrata, a donde llegan los últimos capilares retinianos. (MICHAELSON, 1954).

Del mismo modo, los astrocitos acompañan a los vasos en el espesor de la retina, localizándose en la capa de F.N.O. y capa de células ganglionares mayoritariamente, e introduciéndose sus prolongaciones hasta la plexiforme y nuclear interna siguiendo el curso de los capilares retinianos externos.

La coexistencia astrocito-vaso sanguíneo, ha sido expuesta anteriormente por diversos autores. IKUI y col. (1976[95]) ya observaron a microscopía electrónica, la ausencia de los astrocitos en las zonas avasculares de la retina humana (fovea y Ora serrata) sugiriendo una relación entre la distribución de los astrocitos y la vascularización.

Esta teoría ha sido apoyada por las observaciones llevadas a cabo en otras especies animales que presentan un patrón diferente de vascularización.

De tal forma, que en las retinas anangióticas o avasculares, como las del hipopótamo, rinoceronte y algunos marsupiales (KALT, 1905[100]), los astrocitos sólo se localizan en el disco óptico (SCHNITZER, 1987b,1988b[219,221]).

En las retinas panangióticas, que presentan una vascularización muy restringida al existir vasos únicamente alrededor del disco óptico (p. ej. caballo y cobaya) (KALT, 1905[100]), los astrocitos sólo se encuentran en una pequeña superficie adyacente al disco óptico (SCHNITZER, 1988b[221]).

En las retinas merangióticas o de vascularización parcial, típica de los lagomorfos (conejo) (KALT, 1905[100]), los vasos sanguíneos se encuentran únicamente en dos zonas en forma de alas denominadas radios medulares (HYVÄRINEN, 1967[94]; TRIVIÑO, 1988,1991[242,245]), y los astrocitos, igualmente, sólo se localizan en estas zonas estando ausentes en el resto de la retina (SCHNITZER, 1985,1986, 1988a,b,c[216,217,220-223]; STONE, 1987[235]; REICHENBACH, 1987[197]; TRIVIÑO, 1988,1990,1992[242,244,246]; ROBINSON, 1989[206]).

Y por último, en las retinas holoangióticas, o de vascularización total (KALT, 1905[100]), los vasos se distribuyen por toda la retina, con la excepción de la fovea y la zona próxima a la ora serrata, como sucede con la distribución de las células astrogliales (OGDEN, 1976[164]; BÜSSOW, 1980[29]; KARSCHIN, 1986a,b[101,102]; STONE, 1987[235]; SCHNITZER, 1987b,1988,b[219,221]; CHAN-LING, 1991a,b[36,37]; HOLLÄNDER, 1991[92]). A este grupo pertenecen la mayor parte de los mamíferos (p. ej. rata, ratón, gato y primates).

La relación entre los astrocitos y los vasos sanguíneos va a venir determinada desde el desarrollo embrionario. De tal forma, STONE y DREHER (1987[235]), sugirieron que los astrocitos de la retina del gato penetraban desde el nervio óptico con la vascularización.

DIXON (1981[61]) en sus estudios sobre el desarrollo de los astrocitos de la rata, y LING (1988[127]) en sus trabajos realizados en embriones de gato, determinaron que durante el desarrollo los astrocitos aparecían primeramente en

la zona del disco óptico, y posteriormente, se extendían hacia el resto de la retina. Estas células PGFA(+) mantenían relaciones con los vasos, tanto con los de la zona próxima al disco, como con los de la periferia, estando ausentes en la zona de la fovea. Por tanto, estos autores postularon que los astrocitos retinianos migraban desde el disco óptico manteniendo una relación estrecha con la formación de la vascularización retiniana.

Esta relación astrocito-vaso, en el desarrollo embrionario, ha sido apoyada también en los estudios posteriores de CHAN-LING y STONE (1991a[36]), quienes sugirieron que los astrocitos en el desarrollo penetraban en la retina desde el disco óptico migrando gracias al estímulo de las células en huso ("*spindle cells*"), precursoras de la vascularización retiniana.

Además, la ausencia de los astrocitos en el área de la fovea parece tener su origen en el desarrollo, ya que los astrocitos no podrían penetrar en esta región debido probablemente a la ausencia de las células en huso (CHAN-LING, 1991a[36]).

Sin embargo, JIANG y col. (1993[99]), postulan que son los astrocitos los que inducen el crecimiento de las células endoteliales precursoras de la vascularización retiniana.

## 5.2.- MORFOLOGÍA DE LOS ASTROCITOS RETINIANOS.

Ultraestructuralmente, los astrocitos retinianos humanos son semejantes a otros astrocitos del S.N.C., presentando las características propias descritas en estas células como un citoplasma claro en el que abundan las partículas de glucógeno y los filamentos intermedios gliales de 10nm. (LUSE, 1956[132]; DE ROBERTIS, 1959[51]; VAUGHN, 1967[253], SCHULTZ, 1964[225]; WENDELL-SMITH, 1966[260]; SUAREZ, 1983[236]; PRIVAT, 1986[179]; ALVAREZ, 1991[8]).

Estas células, coincidiendo con las observaciones de HOGAN (1971[91]) e IKUI (1976[95]), se diferencian de la otra estirpe glial retiniana, las células de Müller, por su menor densidad a los electrones. Además, presentan un núcleo esférico u oval con una heterocromatina abundante. En su citoplasma se distinguen diferentes orgánulos como: ribosomas libres, mitocondrias, aparato de Golgi, retículo endoplásmico rugoso, además de partículas de glucógeno y filamentos intermedios gliales de 10 nm. Estos gliofilamentos, son muy abundantes y se localizan tanto en el pericarion como en las prolongaciones.

Los filamentos gliales están compuestos por una proteína de 50 Kd (proteína gliofibrilar ácida) (LIEM, 1978,1981[122,123]). El anticuerpo contra la proteína GFA se une selectivamente a los filamentos gliales de los astrocitos, siendo, un buen marcador de las células astrogliales (BIGNAMI, 1972[16]; GHANDOUR, 1979[76]).

Por tanto, para el estudio de la morfología y distribución de los astrocitos retinianos humanos, hemos utilizado este anticuerpo como marcador.

Los filamentos gliales son tan abundantes en el pericarion y en las prolongaciones de los astrocitos, que las inmunodetecciones con el anti-PGFA nos

van a permitir obtener unas imágenes bastante semejantes a la morfología real de las células gliales.

El núcleo de los astrocitos es PGFA(-), por lo que la señal positiva circundante del pericarion, hace que éste destaque observándose con gran claridad sin necesidad de tinciones de contraste.

En los montajes planos de retina humana hemos encontrado dos grandes grupos de astrocitos PGFA(+) con una diferente localización retiniana: astrocitos estrellados situados fundamentalmente en la capa de células ganglionares, y astrocitos alargados situados en la capa de F.N.O.

Estos dos grupos celulares no habían sido caracterizados anteriormente empleando inmunodetecciones, ya que los trabajos existentes que utilizan estas técnicas en la retina humana son muy escasos, y los que existen están enfocados únicamente en la determinación de la inmunoreactividad PGFA(+) en el espesor retiniano (KUMPULAINEN, 1983[111]; HISCOTT, 1984[87]; MOLNAR, 1984[147]; TUCCARI, 1986[247]).

Los trabajos sobre la morfología de los astrocitos retinianos humanos basados en el empleo de las impregnaciones metálicas son más abundantes.

RAMÓN Y CAJAL (1892[190]), GREFF (1894), y BACH (1895[11]) expusieron que los astrocitos retinianos eran semejantes a los astrocitos fibrosos del cerebro; aunque POLYAK (1941[177]), no sólo observó astrocitos fibrosos, sino que también menciona la presencia de astrocitos protoplásmicos en las capas plexiforme interna y de células ganglionares.

El estudio más importante sobre la morfología astroglial retiniana humana fue realizado por WOLTER (1955-1961[263-269]). Este autor, observó en la capa de

F.N.O. células bipolares con un núcleo alargado y dos prolongaciones rectas que se unían a los axones amielínicos, identificándolas con los *"lemnocitos"* o *"elementos de Remark"* de los ganglios nerviosos.

A parte de estas células puramente bipolares, encontró formas transicionales más ramificadas entre las capas de células ganglionares y F.N.O.

En las capas de células ganglionares y plexiforme interna, observó células con morfología estrellada. Estos astrocitos se relacionaban con los vasos sanguíneos y rodeaban a las células ganglionares, formando una malla en panal de abeja en los tejidos retinianos internos.

Este autor, también observó, un nuevo tipo astroglial, al que denominó *"glia perivascular"*. Estas células se localizaban únicamente sobre los vasos sanguíneos, a los que dirigían numerosas prolongaciones en forma anular o espiral, abrazándolos.

Otros trabajos posteriores, sin embargo, no confirman las observaciones de WOLTER; y así, aunque LESSEL y KUWABARA (1963[118]) observaron los lemnocitos en la retina humana, afirmaron que los astrocitos estrellados eran muy escasos y se encontraban no sólo en la capa de células ganglionares sino también en la capa de F.N.O. Por el contrario, describieron células con una o dos prolongaciones dispuestas sobre las paredes de los vasos (*"células paravasculares"*), mientras que la glia perivascular sólo era observada en retinas patológicas.

Tampoco WOLFF (1968[261]) encontró los tipos gliales anteriormente expuestos. Sólo observó células en araña en las proximidades del disco, células estrelladas en la capa de células ganglionares, y unas fibras gliales en la capa de F.N.O. y nuclear interna, además de glia perivascular sobre los capilares.

OGDEN (1976[164]), por el contrario, en la capa de F.N.O., observó dos tipos de astrocitos: alargados y estrellados. Los primeros se relacionaban únicamente con los axones, y los segundos, con los vasos sanguíneos.

Nosotros, estamos de acuerdo con las observaciones de WOLTER[263-269] sobre la existencia de dos tipos principales de astrocitos en la retina humana (alargados y estrellados). Si bien, en ninguna de las preparaciones estudiadas hemos podido encontrar los astrocitos perivasculares.

Los astrocitos bipolares descritos por WOLTER[264], no son exactos a los observados en nuestras preparaciones. Este autor define a estas células como astrocitos con dos únicas prolongaciones emergiendo cada una de ella de un polo celular; por el contrario, nosotros, encontramos que estas células van a poder tener un mayor número de prolongaciones, normalmente de dos a cuatro, que derivan de cada polo de la célula siguiendo la trayectoria rectilínea de los axones de las células ganglionares. Además, de estas células también pueden derivar prolongaciones cortas que, o bien, pueden introducirse en el parénquima retiniano, o bien, adoptan una dirección perpendicular a los axones dirigiéndose hacia otros astrocitos próximos. Las prolongaciones largas, también pueden ir hacia otro astrocito situado paralelamente.

Los astrocitos alargados unen sus prolongaciones formando haces que van a fascicular los axones de las células ganglionares, pudiendo también mantener contactos con los vasos sanguíneos de esta capa, tanto con los de mayor calibre como con los capilares peripapilares radiales.

Las formas transicionales observadas por WOLTER[263-269] en el límite entre la capa de células ganglionares y la capa de F.N.O., han sido encontradas por nosotros en todo el espesor de la capa de F.N.O., alternándose con las formas más bipolares; si bien, estas formas, algo más estrelladas, van a ser células de

unión entre haces astrogliales próximos, que como ya describimos en los resultados, los englobamos en los subgrupos $C_1$ y $D_1$.

Por tanto, como podemos ver, no estamos de acuerdo con los resultados expuestos en 1976 por OGDEN[164], quién observaba dos tipos astrogliales en la capa de F.N.O., cuyas relaciones con los axones (astrocitos alargados) o con los vasos (astrocitos estrellados) dependía de su morfología celular.

Nosotros, hemos encontrado, que cualquiera de los astrocitos ubicados en la capa de F.N.O. puede relacionarse tanto con los axones como con los vasos, si bien, su morfología alargada va a venir determinada por la relación que mantienen estas células con los axones de las células ganglionares.

Tampoco observamos las células paravasculares descritas por LESSELL (1963[120]), aunque pensamos que estas células pertenecen al grupo de los astrocitos estrellados observados por WOLTER[263-269] en la capa de células ganglionares, que no se han impregnado totalmente con la plata.

Al igual que WOLTER[263,268], observamos la existencia de abundantes astrocitos, con morfología estrellada, en la capa de células ganglionares. Estas células presentan un soma pequeño y alargado, del que parten de cuatro a ocho prolongaciones radiales largas que pueden dividirse en otras secundarias de menor calibre. Estas células pueden contactar con otros astrocitos o con los vasos sanguíneos, formando un plexo astroglial con morfología en panal de abeja.

Fundamentalmente, hemos encontrado estos astrocitos estrellados, en la capa de células ganglionares, aunque en ocasiones, los hemos podido observar desplazados hacia la plexiforme interna, acompañando a los capilares retinianos externos. Esto también fue referido por WOLTER[263,267-269], ya que encontró

astrocitos en la capa plexiforme interna, si bien, este autor afirmó que eran muy abundantes en esta capa. Sin embargo, nosotros sólo los encontramos esporádicamente y pensamos que WOLTER al realizar secciones horizontales de retina podría no haber separado perfectamente la capa de células ganglionares de la plexiforme interna, encontrando astrocitos en esta última capa que en realidad podrían pertenecer a la capa de células ganglionares.

Este tipo celular estrellado, también lo hemos encontrado en la capa de F.N.O. en la región del rafe medio. Como vimos con anterioridad, la morfología de los astrocitos de la capa de F.N.O. viene determinada por los axones de las células ganglionares, y en este sector éstos se disponen entremezclados (HOGAN, 1971[91]), por lo tanto, los astrocitos del rafe medio mantendrán relaciones con distintos axones mandando prolongaciones a varios de ellos, lo que va a poder determinar la morfología estrellada de estas células.

En base a la localización del cuerpo celular de los astrocitos estrellados, los hemos dividido en subgrupos. Ninguno autor, anteriormente, ha hecho referencia a la diferente localización que pueden tener los cuerpos celulares de los astrocitos en la retina humana.

En el subgrupo $A_2$, englobamos a los astrocitos que se sitúan en el interior de una celdilla constituyente del plexo astroglial de la capa de células ganglionares.

En el subgrupo $B_2$, incluimos a los astrocitos cuyo soma se dispone directamente sobre las paredes de los vasos sanguíneos, o muy cerca de ellos. Las células pertenecientes a este subgrupo son las más numerosas, pudiendo constatar, cómo en determinadas ocasiones, los cuerpos celulares de estos astrocitos se agrupan formando racimos, hecho que únicamente había sido indicado con anterioridad por IKUI (1976[95]) con microscopía electrónica al referir cómo

algunos núcleos astrocitarios podían agruparse sobre la superficie de los vasos sanguíneos.

Por último, en el subgrupo $C_2$, se encuentran aquellos astrocitos cuyo cuerpo celular forma parte de un haz de prolongaciones astrogliales de la capa ganglionar.

Las prolongaciones de los astrocitos estrellados se unen unas con otras formando haces astrogliales que van a ir uniéndose con los distintos vasos sanguíneos de la capa de células ganglionares, formando un plexo con morfología en panal de abeja. De estos haces derivan prolongaciones hacia los vasos, constituyendo una envuelta astroglial vascular, que hace muy fácil la visualización de éstos. Además, también mandan prolongaciones que se introducen hacia las capas plexiforme y nuclear interna acompañando a los capilares externos para constituir un plexo con morfología irregular. Ambos plexos, que serán discutidos posteriormente, ya fueron observados por WOLTER (1955-1961[263-269]).

Los tipos morfológicos astrogliales encontrados en la retina humana, también han sido observados en otras especies animales.

DIESTLER y col. (1993[59]) en un estudio realizado en montajes planos de retina de primates, utilizando el anticuerpo contra la PGFA, observan en la capa de F.N.O. astrocitos estrellados y astrocitos alargados; mientras que, en la capa de células ganglionares sólo observan astrocitos estrellados.

Ambos tipos celulares tambíen se han descrito en la retina del gato, si bien, también aparecen formas transicionales entre ambos tipos celulares. (KARSCHING, 1986a,b[101,102]; SCHNITZER, 1988b[221]; CHAN-LING, 1991a,b[36,37]).

Sin embargo, en la retina de la rata (STONE, 1987[235]; RUNGGER-BRÄNDLE, 1992[209]), los astrocitos presentan principalmente una morfología

estrellada, aunque en las proximidades del disco óptico, donde los haces de axones son más gruesos, pueden presentar cierta tendencia a seguir el trayecto axonal.

La mayor variedad con respecto a la morfología de las células astrogliales retinianas se observa en el conejo. Este animal presenta dos grandes grupos de astrocitos: uno relacionado con los axones de las células ganglionares, y otro, asociado al sistema vascular (SCHNITZER, 1985,1986,1988a[216,217,220]; TRIVIÑO, 1988,1990,1992[242,244,246]).

Entre los astrocitos asociados con los axones se pueden distinguir tres subgrupos: astrocitos con prolongaciones gruesas que constituyen los haces astrogliales, astrocitos con prolongaciones delgadas, y astrocitos intermedios; no alineándose estos dos últimos con los haces axonales.

Dentro del grupo de los astrocitos asociados al sistema vascular, SCHNITZER (1985,1986,1988a[216,217,220]), solamente encontró dos tipos diferenciables morfológicamente; mientras que TRIVIÑO y col. (1992[246]) describen tres tipos celulares: los astrocitos Tipo I, equivalentes a los perivasculares descritos por WOLTER (1955-1961[263-269]), y localizados sobre los vasos medianos y los capilares; los astrocitos Tipo II, con morfología estrellada y un cono basal del que derivan prolongaciones que se dirigen hacia los vasos medianos y grandes; y los astrocitos Tipo III, que son células estrelladas, cuyas prolongaciones derivan directamente del pericarion, y que se disponen entre los capilares formando una malla.

Por el contrario, ROBINSON y DREHER (1989[206]), realizan una clasificación distinta de estas células, de tal forma, que en la clase A engloban a los astrocitos perivasculares, en la clase B incluyen a los que no contactan ni con los vasos ni

con los axones, y en la clase C agrupan a los astrocitos relacionados con los axones.

La morfología que van a presentar los astrocitos retinianos en las distintas especies de animales, va a venir determinada por la adaptación de sus prolongaciones a las estructuras que los rodean (CHANG-LING, 1991b[37]; HOLLÄNDER, 1991[92]). Así los astrocitos localizados en la capa de F.N.O., que se relacionan fundamentalmente con los axones de las células ganglionares de disposición longitudinal, tendrán una morfología alargada; mientras que, los astrocitos localizados en la capa de células ganglionares, que van a interconectar los distintos vasos sanguíneos, presentarán un aspecto más estrellado.

BÜSSOW (1980[29]) para explicar la morfología alargada de los astrocitos de la capa de F.N.O., propuso que la astroglia de la retina del mono y del gato, sería un tipo celular especial para los axones de las células ganglionares.

KARSCHIN, WÄSSLE y SCHNITZER (1986b[102]) apoyaron esta teoría al observar que los astrocitos alargados de la retina del gato, después de provocar una degeneración axonal, se volvían estrellados.

Estos hallazgos sugirieron a CHAN-LING (1991b[37]) que la típica morfología estrellada de los astrocitos, en realidad, es una "falta de forma" que las células adoptan en ausencia de otras estructuras.

Según HOLLÄNDER (1991[92]), la fuerza que determina la morfología alargada de los astrocitos de la capa de F.N.O. es la afinidad que entre las prolongaciones astrocitarias y las especializaciones axonales equivalentes a los nodos. Esto concuerda con lo encontrado en la retina de la rata, cuyos astrocitos de la capa de F.N.O. son estrellados (STONE, 1987[235]), ya que las relaciones con las estructuras equivalentes a los nodo axonales son llevadas a cabo por la glia de Müller (HOLLÄNDER, 1991[92]).

Nosotros pensamos, al igual que CHAN-LING (1991b[37]), que todos los astrocitos retinianos serían variaciones o subclases de un mismo tipo astroglial con diferentes grados de especialización, de tal forma, que los astrocitos alargados estarían más especializados para relacionarse con los axones, mientras que los estrellados estarían más implicados en la asociación vascular.

Como ya hemos mencionado con anterioridad, WOLTER (1955-1961[263-269]), describió en la retina humana un tipo especial de célula astroglial que únicamente se relacionaba con los vasos sanguíneos, la glia perivascular. Estas células se situaban sobre los vasos sanguíneos, rodeándolos con sus prolongaciones, sin mantener contactos con otras estructuras.

La existencia de estas células en la retina humana fue asumida por la mayoría de los autores posteriores (ERSKINE, 1963[68]; WOLFF, 1968[261]), e incluso fueron observados, utilizando impregnaciones argénticas en otras especies animales como el gato (HONRUBIA, 1970[93]).

No obstante, HOGAN (1971[91]) e IKUI (1976[95]), no observaron diferencias ultraestructurales entre los astrocitos humanos situados sobre los vasos y los astrocitos alejados de estos, poniendo en duda su existencia.

Sin embargo, estudios posteriores realizados con técnicas inmunohistoquímicas en la retina del conejo, detectan la presencia de glia perivascular (SCHNITZER, 1985;1986,1988a,b[216,217,220,221]; STONE, 1987[235]; ROBINSON, 1989[206]; TRIVIÑO, 1988,1992[242,246]); apoyando implícitamente su existencia en la retina humana.

Nosotros, como HOGAN (1971[91]) e IKUI (1976[95]), no observamos diferencias ultraestructurales entre los astrocitos situados próximos a los vasos y los astrocitos alejados de ellos. Además, en los montajes planos de retina inmunomarcados con el anti-PGFA, no encontramos los "astrocitos

perivasculares" de WOLTER[265], en ninguna de las preparaciones estudiadas. Pensamos, que las impregnaciones argénticas utilizadas por WOLTER (1955-1961[263-269]), que teñirían la superficie celular, podrían haber marcado el entramado de prolongaciones gliales localizadas sobre los vasos sanguíneos, adquiriendo éstas un aspecto celular que podrían haberle conducido a su interpretación de las imágenes.

Además, en las retinas con una distribución astroglial semejante a la humana (p. ej. gato, mono), utilizando las técnicas inmunohistoquímicas, ningún autor ha observado la glia perivascular de Wolter (STONE, 1987[234]; SCHNITZER, 1988b,d[221,223]; CHAN-LING, 1991b[37]; HOLLÄNDER, 1991[92]).

La presencia de estas células, únicamente en la retina del conejo, podría ser explicada fácilmente por la disposición de sus vasos sanguíneos. Esta retina presenta una localización epirretiniana de los vasos (HYVÄRINEN, 1967[94]; TRIVIÑO, 1988,1991[242,245]), mientras que en el hombre, mono, gato, los vasos están localizados intrarretinalmente (MICHAELSON, 1954[141]). Esta disposición vascular epirretiniana favorece la aparición de tipos gliales especializados en el anclaje de los vasos al parénquima retiniano (ROBINSON, 1990[207]; TRIVIÑO, 1992[246]). Así, en trabajos realizados en retinas de conejo, se han encontrado tres tipos de células astrogliales asociadas con el sistema vascular (TRIVIÑO, 1992[246]). Los astrocitos tipo I y tipo II que serían los encargados del anclaje de los vasos sanguíneos, localizados en el vítreo, a la retina, y por tanto los verdaderos perivasculares; y los astrocitos tipo III, localizados en el parénquima retiniano, que establecerían los contactos con los capilares retininanos intraparenquimatosos. Este último tipo celular sería el equivalente a los astrocitos estrellados de la capa de células ganglionares de la retina humana.

Por tanto, en las retinas con vascularización intrarretiniana, la existencia de "glia perivascular", como células de anclaje vascular, carecería de sentido.

## 5.3.- RELACIONES DE LOS ASTROCITOS CON LAS DIFERENTES ESTRUCTURAS RETINIANAS.

Al igual que IKUI (1976[95]) hemos observado que las ramificaciones de los astrocitos retinianos humanos tienden a unirse unas con otras formando haces de prolongaciones astrogliales.

La distribución de estos haces va a variar dependiendo de la capa retiniana en la que se encuentren ubicados.

### 5.3.1.- DISTRIBUCIÓN DE LOS ASTROCITOS EN LA CAPA DE CÉLULAS GANGLIONARES.

A nivel de la capa de células ganglionares, los haces astrogliales van a interconectar los distintos vasos sanguíneos formando un plexo horizontal con morfología en panal de abeja, que ya fue descrito por WOLTER (1955-1961[263-269]) utilizando las impregnaciones argénticas. En el interior de las celdillas van a poder ubicarse los somas de las células ganglionares.

Con la ayuda de la microscopía electrónica, hemos constatado, como ya observó HOLLÄNDER (1991[92]) en la retina del gato, que las células ganglionares pueden disponerse adyacentes entre sí, pero van a estar rodeadas por prolongaciones gliales, pertenecientes fundamentalmente a la glia de Müller, que forman una línea divisoria estrecha entre esas neuronas. Sin embargo, también observamos, al igual que HOGAN (1971[91]) prolongaciones de naturaleza astroglial, localizadas entre las neuronas, pero sin formar una envuelta continua.

Las prolongaciones astrocitarias que constituyen los haces, van a poder estar unidas entre sí mediante desmosomas, como ya constató IKUI (1976[95]) en retinas humanas, o mediante uniones tipo Gap, observadas también en la retina del gato (BÜSSOW, 1980[29]; HOLLÄNDER, 1991[92]) y del mono (BÜSSOW, 1980[29]). Además, los astrocitos también mantienen contactos con la glia de Müller, observándose desmosomas entre ambos tipos celulares; uniones que también han sido referidas en la retina del gato (HOLLÄNDER, 1991[92]).

Por tanto, como ya sugirió IKUI (1976[95]), las prolongaciones astrogliales forman unas estructuras interconectadas entre sí, además de con la glia de Müller, que podrían servir para reforzar la malla capilar y soportar las neuronas interpuestas en la malla.

Los astrocitos localizados en esta capa van a mantener una relación muy estrecha con los vasos sanguíneos. En los montajes planos, es sencillo observar el trayecto de los vasos, debido a que su contorno está perfectamente perfilado por las prolongaciones procedentes de células astrogliales.

Como ya describió WOLTER (1955-1961[263-269]), las prolongaciones rodean los vasos formando una malla densa, constituyendo estructuras en forma de cayado paralelas a los vasos.

Estas prolongaciones pueden contactar de distinta forma con los vasos, circunstancia que también ha sido observada en la retina del mono por DIESTLER y col. en 1993[59]. Las prolongaciones pueden disponerse sobre el vaso llevando una trayectoria paralela a él, también pueden dividirse en prolongaciones secundarias que se unen al vaso con un aspecto digitiforme, o bien, pueden terminar en forma de ganchos que rodean al vaso. Tales contactos han sido observados con arterias, venas y capilares, no existiendo diferencias en la relación que mantienen las prolongaciones con los distintos tipos vasculares. Además, las

terminaciones vasculares de los astrocitos también son semejantes en los vasos situados en la capa de F.N.O. o en los localizados en capas retinianas más externas.

Con microscopía electrónica hemos observado como todos los vasos sanguíneos (grandes, medianos y capilares) están rodeados por prolongaciones gliales (células de Müller y/o astrocitos).

Esta relación tan estrecha ya fue indicada por MARCHESANI (1926[135]), VILLEGAS (1964[255]), HOGAN (1971[91]), IKUI (1976[95]), RHODES (1984[200]), PENFOLD (1990[174]) y PROVIS (1991[180]).

En los capilares retinianos, las prolongaciones, tanto de la glia de Müller como de los astrocitos, se disponen sobre la membrana basal alternándose ambos tipos gliales; HOLLÄNDER (1991[92]), señala lo mismo en la retina del gato.

Como ya indicó IKUI (1976[95]), los somas astrocitarios pueden disponerse muy próximos o sobre la pared del vaso, lo que viene a apoyar las observaciones realizadas con la ayuda de los métodos inmunohistoquímicos, en las que encontrábamos que el pericarion del astrocito podía disponerse directamente sobre la pared vascular.

En los vasos de mayor calibre, tanto las prolongaciones de los astrocitos, como las provenientes de la glia de Müller, van a participar en la realización de contactos vasculares; pero en esta ocasión van a estar en relación con la adventicia de estos vasos, constituida por colágeno (HOGAN, 1971[91]; PENFOLD, 1990[174]; PROVIS, 1991[180])

El plexo astroglial de la capa de células ganglionares es muy compacto en la retina peripapilar, observándose a este nivel, celdillas de pequeño tamaño ya que en este sector existe una gran densidad astroglial debido a la gran abundancia de

vasos sanguíneos.

En la zona periférica, los panales que constituyen el plexo, presentan un mayor tamaño, ya que disminuye el número de astrocitos y de vasos sanguíneos.

En las proximidades de la fovea, desciende el número de vasos, y por consiguiente el de astrocitos, encontrándonos, como ya expusimos en los resultados, con escasos astrocitos localizados en el límite entre la zona vascular y avascular de la fovea.

En otras especies animales, como la rata (STONE, 1987[235]), el gato (KARSCHIN, 1986a,b[101,102]; CHAN-LING, 1991a,b[36,37]), y el mono (SCHNITZER, 1987b,1988b,d[219,221,223]; DIESTLER, 1993[59]), también se ha observado que la mayor densidad astroglial se da a nivel del disco óptico decreciendo su número hacia la fovea y la Ora serrata.

Los astrocitos localizados en esta capa (capa de células ganglionares), emiten prolongaciones que se dirigen hacia las capas plexiforme y nuclear interna formando un plexo de morfología irregular que acompaña a los capilares retinianos de localización más externa. Este plexo, que sigue el trayecto tortuoso de los capilares, presenta un aspecto de maraña en los montajes planos de retina.

Este plexo astroglial superficial también fue descrito por WOLTER (1955-1961[263-269]) al estudiar secciones horizontales de retina teñidas con impregnaciones argénticas, pero a diferencia con nuestros resultados, este autor observa una mayor proporción de somas astrocitarios.

En la retina del gato no ha sido definido este plexo, descrito por WOLTER y observado por nosotros, siendo referido únicamente por algunos autores, que las prolongaciones astrocitarias pueden introducirse hasta la plexiforme externa, observándose algún soma en la nuclear interna (KARSCHIN, 1986[101,102]).

En la retina del mono, sin embargo, los astrocitos y sus prolongaciones quedan confinados a las capas de células ganglionares y F.N.O. (OGDEN, 1976,1983[164,165]; BÜSSOW, 1980[29]; DIESTLER, 1993[59]); mientras que, en la del conejo, únicamente a la capa de F.N.O. (ROBINSON, 1989[206]; TRIVIÑO, 1988, 1990,1992[242,244,246]).

## 5.3.2.- DISTRIBUCIÓN DE LOS ASTROCITOS EN LA CAPA DE FIBRAS DEL NERVIO ÓPTICO.

A nivel de la capa de F.N.O., las prolongaciones celulares de los astrocitos alargados tienden a agruparse formando haces que fasciculan los axones, disponiéndose también entre los vasos localizados a este nivel.

Con el empleo de la microscopía electrónica, hemos podido constatar que en la formación de la membrana limitante interna de la retina, no sólo van a participar las prolongaciones de la glia de Müller, sino que interponiéndose entre éstas hemos encontrado ramificaciones pertenecientes a astrocitos, lo cual había sido observado con anterioridad en retinas humanas por HOGAN (1971[91]), en el mono por COHEN (1961[34]) y BÜSSOW (1980[29]), y en el gato por BÜSSOW (1980[29]) y HOLLÄNDER (1991[92]); e incluso también algún cuerpo celular de este tipo glial, coincidiendo con las descripciones de BÜSSOW (1980[29]) en la retina del mono.

Las prolongaciones astrogliales y las pertenecientes a las células de Müller, se diponen rodeando los haces de axones de las células ganglionares que constituyen la capa de F.N.O., tanto en el hombre (HOGAN, 1971[91]), como en

el mono (BÜSSOW, 1980[29]), y en el gato (BÜSSOW, 1980[29]; HOLLÄNDER, 1991[92]).

Al igual que ocurría en la capa de células ganglionares, estas prolongaciones de naturaleza astroglial, se unen entre sí mediante desmosomas y uniones tipo Gap. Estando descrito además, en la retina de los primates (BÜSSOW, 1980[29]) y el gato (BÜSSOW, 1980[29]; HOLLÄNDER, 1991[92]), la existencia de desmosomas entre la glia de Müller y las prolongaciones de astrocitos.

Los haces astrogliales de la capa de F.N.O. no tienen una disposición regular a lo largo de toda la retina, sino que se distribuyen únicamente en un área de 175mm$^2$ cuyo centro se situaría en el disco óptico, que comprende la región peripapilar y parte del área macular.

La desaparición de estos haces en el resto del tejido retiniano, se debe a la progresiva disminución del espesor de la capa de F.N.O., como consecuencia de la desaparición del plexo capilar de las fibras nerviosas y al descenso del número de axones que se dirigen hacia el disco; por tanto, existe un punto en el que los astrocitos de la capa de F.N.O. son difíciles de observar al fundirse con los de la capa de células ganglionares.

A nivel macular, los haces astrogliales se disponen concéntricos a la fovea como ya observaron DIESTLER (1993[59]) en la retina del mono, y KARSCHIN (1986a,b[101,102]), SCHNITZER (1988b[221]) en la del gato.

Por el contrario, en la zona del haz papilomacular, los haces astrogliales son rectilineos y están densamente empaquetados, debido a la gran densidad de axones existentes a ese nivel (POLLOCK, 1986).

En las inmediaciones de la fovea desaparecen los haces astrogliales de la capa de F.N.O., por lo que los astrocitos que se observan pertenecen a la capa de las

células ganglionares.

Los astrocitos en el rafe horizontal, presentan una morfología estrellada, debido a que se encuentran en una zona de entrecruzamiento axonal como ya expusimos con anterioridad (POLLOCK, 1986).

### 5.3.3.- COMPARACIÓN DE LA DISTRIBUCIÓN DE LOS HACES ASTROGLIALES HUMANOS CON RESPECTO A LOS DE OTRAS ESPECIES.

La existencia de una malla astroglial distribuida por todas las zonas vascularizadas retinianas también ha sido observada en otras especies animales (KARSCHIN, 1986a,b[101,102]; STONE, 1987[235]; SCHNITZER, 1987b,1988b[219,221]; CHAN-LING, 1991b[37]; HOLLÄNDER, 1991[92]), aunque con notables diferencias con respecto a lo encontrado en el humano.

En el mono, DIESTLER y col. (1993[59]), observan dos capas de células astrogliales a lo largo de toda la retina; pero que difieren de las encontradas en el hombre, ya que según estos autores, los astrocitos de la capa de F.N.O. son alargados en las proximidades del disco óptico, volviéndose estrellados hacia la periferia de la retina; mientras que, los astrocitos de la capa de las células ganglionares mantienen su apariencia estrellada a lo largo de toda la retina.

Nosotros, por el contrario, en la retina humana, encontramos que en la capa de F.N.O. los astrocitos son alargados, y lo que ocurre hacia la periferia no es un cambio de forma de estas células, sino una desaparición de los astrocitos alargados de la capa de F.N.O., observándose por lo tanto desde ese punto y hasta la periferia, los astrocitos de la capa ganglionar, que de acuerdo a lo

observado por estos autores, no cambian de forma a lo largo de toda la extensión retiniana.

En la retina del gato, existe una única malla astroglial continua, en la cual los astrocitos van cambiando de forma (de estrellados a alargados) a medida que nos aproximamos al disco óptico (SCHNITZER, 1986[217]).

CHAN-LING y STONE (1991b[37]) propusieron una teoría para explicar la formación de la malla astroglial en la retina del gato, de tal forma que la distribución de estas células estaría determinada por una interacción "contacto-espacio" entre los astrocitos próximos mediante sus prolongaciones, pero manteniendo sus somas distanciados. Esta interacción implicaría fuerzas repulsivas que separarían los somas de los astrocitos, y fuerzas adhesivas que mantendrían en contacto unas prolongaciones con otras formando una malla.

Sin embargo, esta teoría no podría ser aplicada a la retina humana ya que, como se ha descrito anteriormente, los cuerpos celulares de los astrocitos en numerosas ocasiones se agrupan formando racimos en distintas zonas vasculares.

# 6.- CONCLUSIONES

## 6.- CONCLUSIONES.

I.- Los astrocitos retinianos humanos se localizan en la capa de fibras del nervio óptico, capa de células ganglionares, plexiforme interna y nuclear interna. Estas células se distribuyen por toda la retina con la excepción de la zona avascular de la fóvea y las proximidades de la ora serrata, coincidiendo con la localización y distribución de los vasos sanguíneos.

II.- Dependiendo de la orientación de las prolongaciones celulares, clasificamos a los astrocitos de la retina humana en estrellados y alargados.

III.- Los astrocitos estrellados son células con un cuerpo celular pequeño, del que parten radialmente de cuatro a ocho prolongaciones primarias; estas prolongaciones pueden juntarse formando haces, que se relacionan con los distintos vasos sanguíneos, constituyendo un plexo en forma de panal de abeja en la capa de células ganglionares.

IV.- El cuerpo celular de los astrocitos estrellados puede localizarse en el interior de los panales, formando parte de un haz astroglial, o sobre los vasos sanguíneos. En este último caso, los cuerpos celulares pueden agruparse formando estructuras a modo de racimo.

V.- Algunas prolongaciones de los astrocitos estrellados de la capa de células ganglionares y escasos cuerpos celulares, pueden acompañar a los capilares retinianos hasta la capa nuclear interna, constituyendo un plexo con morfología irregular.

VI.- Los astrocitos alargados presentan de dos a cuatro prolongaciones primarias de gran longitud, que derivan de cada polo de la célula. Las prolongaciones se unen formando haces astrogliales, que se disponen entre los haces axonales fasciculándolos, y entre los capilares peripapilares radiales, a nivel de la capa de fibras del nervio óptico.

VII- Los astrocitos alargados solo se distribuyen en un área de $175mm^2$ centrada en el disco óptico. En la periferia de este sector, desciende el número de axones y desaparecen los capilares peripapilares radiales, por lo que las prolongaciones astrogliales se hunden en el parénquima retiniano, fundiéndose con el plexo astroglial de la capa de células ganglionares.

VIII- En el área macular, los haces astrogliales se disponen concéntricos a la fovea, con la excepción de la zona del haz papilo-macular, donde cursan de forma rectilinea. En la región del rafe medio, los astrocitos de esta capa son estrellados, por encontrarse en una zona en la que se entremezclan los axones. Los haces astrogliales de esta capa desaparecen a nivel de la fovea, observándose escasos astrocitos pertenecientes a la capa de células ganglionares, en la zona vascular de la fovea.

IX.- En la periferia de la retina, solo se encuentra el plexo astroglial de la capa de células ganglionares, cuya estructura en panal de abeja es difícil de distinguir debido al reducido número de astrocitos y vasos existentes a este nivel.

X.- Ultraestructuralmente, observamos que los astrocitos retinianos mantienen relaciones con distintas estructuras. Participan en la formación de la membrana limitante interna de la retina; intervienen en la constitución de las envueltas axonales y neuronales, así como en la formación de las limitantes vasculares gliales, junto con la glia de Müller. Además se han encontrado desmosomas entre astrocitos y entre astrocitos y glia de Müller, así como uniones tipo Gap entre astrocitos.

XI.- No se observan diferencias ultraestructurales entre los astrocitos situados sobre los vasos y los alejados de estos.

XII.- En ninguna de las preparaciones inmunohistoquímicas estudiadas encontramos los astrocitos perivasculares descritos por Wolter.

# 7.- BIBLIOGRAFÍA

## 7.- BIBLIOGRAFÍA.


1.- ABBOTT N.J. (1987): *"Glia and the blood-brain barrier"*. Nature, 325: 195.

2.- ACHUCARRO N. (1909): *"Cellules allongées et stäbchenzellen, cellules néurogliques et cellules granulo-adipeuses á la corne d'amon du lapin"*. Trabajos del Laboratorio de Investigaciones Biológicas de la Universidad de Madrid, 7: 201-215.

3.- ACHUCARRO N. (1910): *"Algunos datos relativos a la naturaleza de las células en bastoncillo de la corteza cerebral humana obtenidos con el método de Cajal"*. Trabajos del Laboratorio de Investigaciones Biológicas de la Universidad de Madrid, 8: 169-176.

4.- ACHUCARRO N. (1913): *"Notas sobre la estructura y funciones de la neuroglia y en particular de la neuroglia de la corteza cerebral humana"*. Trabajos del Laboratorio de Investigaciones Biológicas de la Universidad de Madrid, 11: 187-217.

5.- ACHUCARRO N. (1915): *"De l'evolution de la néuroglie, et spécialement de ses relations avec l'appareil vasculaire"*. Trabajos del Laboratorio de Investigaciones Biológicas de la Universidad de Madrid, 13: 169-212.

6.- ALGVERE P., KOCK E. (1983): *"Experimental epiretinal membranes induced by intravitreal carbon particles"*. American Journal of Ophthalmology, 96: 345-353.

7.- ALVAREZ M.P., SOLAS M.T., SUAREZ I., FERNÁNDEZ B. (1989): *"Glial fibrillary acidic protein-like immunoreactivity in cat satellite cells of sympathetic ganglia"*. Acta Anatomica., 136: 9-11.

8.- ALVAREZ M.P., SOLAS M.T., SUAREZ I., FERNÁNDEZ B. (1991): *"Variaciones morfológicas del citoesqueleto en la diferenciación de astrocitos en cultivo"*. Boletín de la Real Sociedad Española de Historia Natural (Sección Biología), 87: 267-275.

9.- ALZHEIMER A. (1910): *"Beiträge zur Kenntnis der pathologischen Neuroglia und iher Beziehungen zu den Abbauvorgängen im Nervengewebe"*. Histologischen und Histopathologischen Arbeiten (Nills u. Alzheimer), v. 3 (3), págs: 401. (Citado por Achucarro 1913[4])

10.- ANDRIEZEN (1893): British Medical Journal, 28 (Citado por Ramón y Cajal, 1913[193]).

11.- BACH L. (1895): *"I.- Die Nervenzellenstructur der Netzhaut in normalen und pathologischenzuständen. II.- Die menschliche Netzhaut nach Untersuchungen mit der Golgi-Cajal'schen Methode"*. Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology, 41: 62-80.

12.- BAKER B.J., PERRY V.H. (1985): *"The effect of ganglion cell depletion on the development of astrocytes and the blood vessels distributions in the retina"*. Neuroscience Letters, 21 (Supplement): 68.

13.- BECK D.W., VINTERS H.V., HART M.N., CANCILLA P.A. (1984): *"Glial cells influence polarity of the blood-brain barrier"*. Journal of Neuropathology and Experimental Neurology, 43: 219-224.

14.- BenEZRA D., CHAN C.C. (1987): *"S-100 antigenic determinants in human retina"*. Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology, 225: 151-153.

15.- BERWALD-NETTER Y., KOULAKOFF A., NOWAK L., ASCHER P. (1986): *"Ionic channels in glial cells"*. En: Astrocytes (S. Fedoroff, A. Vernadakis, Eds.). Vol. 2: Biochemistry, physiology, and pharmacology of astrocytes; págs: 51-75. Academic Press INC, Orlando, USA.

16.- BIGNAMI A., ENG L.F., DAHL D., UYEDA C.T. (1972): *"Localization of the glial fibrillary acidic protein in astrocytes by immunofluorescence"*. Brain Research, 43: 429-435.

17.- BIGNAMI A., DAHL D. (1977): *"Specificity of the glial fibrillary acidic protein for astroglia"*. Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 25: 466-469.

18.- BIGNAMI A., DAHL D. (1979): *"The radial glia of Müller in the rat retina and their response to injury. An immunofluorescence study with antibodies to the glial fibrillary acidic (GFA) protein.* Experimental Eye Research, 28: 63-69.

19.- BJÖRKLUND H., DAHL D., OLSON L., SEIGER A. (1984a): *"Glial fibrillary acidic protein-like immunoreactivity in the iris: development, distribution, and reactive changes following transplantation"*. Journal of Neuroscience, 4: 978-988.

20.- BJÖRKLUND H., DAHL D., SEIGER A. (1984b): *"Neurofilament and glial fibrillary acid protein-related immunoreactivity in rodent enteric nervous system"*. Neuroscience, 12: 277-287.

21.- BJÖRKLUND H., BIGNAMI A., DAHL D. (1985a): *"Immunohistochemical demonstration of glial fibrillary acidic protein in normal rat Müller glia and retinal astrocytes"*. Neuroscience Letters, 54: 363-368.

22.- BJÖRKLUND H., DAHL D. (1985b): *"Glial fibrillary acidic protein (GFAP)-like immunoreactivity in the rodent eye. Comparison between peripheral glia of the anterior uvea and central glia of the retina"*. Journal of Neuroimmunology, 8: 331-345.

23.- BLOMSTRAND C., HAMBERGER A. (1970): *"Amino acid incorporation in vitro into protein of neuronal and glial cell-enriched fractions"*. Journal of Neurochemistry, 17: 1187-1195.

24.- BREW H., GRAY P.T.A., MOBBS P., ATTWELL D. (1986): *"Endfeet of retinal glial cells have higher densities of ion channels that mediate $K^+$ buffering"*. Nature, 324: 466-468.

25.- BREW H., ATTWELL D. (1987): *"Electrogenic glutamate uptake is a major current carrier in the membrane of axolotl retinal glial cells"*. Nature, 327: 707-709.

26.- BRIGHTHAN H.W., REESE T.S. (1969): *"Junctions between intimatel y apposed cell membranes in the vertebrate brain"*. Journal of Cell Biology, 40: 648-677.

27.- BRYAN J.A., CAMPOCHIARO P.A. (1986): *"A retinal pigment epithelial cell- derived growth factor(s)"*. Archives of Ophthalmology, 104: 422-425.

28.- BULAC (1931): *"Zur Morphologie der Neuroglia im Nervus Opticus und in der Retina nach Methoden der spanischen Schule (Ramón y Cajal)"*. Zeitschorift fur Augenheilkunde, 74: 248 (Citado por Polyak, 1941[177]).

29.- BÜSSOW H. (1980): *"The astrocytes in the retina and optic nerve head of mammals: a special glia for the ganglion cell axons"*. Cell and Tissue Research, 206: 367-378.

30.- CALVO J.L., CARBONELL A.L., BOYA J. (1990): *"Coexpression of vimentin and glial fibrillary acidic protein in astrocytes of the adult rat optic nerve"*. Brain Research, 532: 355-357.

31.- CAMPOCHIARO P.A., GLASER B.M. (1968): *"A retina-derived stimulator(s) of retinal pigment epithelial cell and astrocyte proliferation"*. Experimental Eye Research, 43: 449-457.

32.- CLARK B., MOBBS P. (1992): *"Transmitter-operated channels in rabbit retinal astrocytes studied in situ by whole-cell patch clamping"*. Journal of Neuroscience, 12: 664-673.

33.- COCCHIA D., POLAK J.M., TERENGHI G., BATAGLIA F., STOLFI V., GANGITANO C., MICHETTI F. (1983): *"Localization of S-100 protein in Müller cells of the retina. 2.- Electron microscopical immunocytochemistry"*. Investigative Ophthalmology and Visual Science, 24: 980-984.

34.- COHEN A.I. (1961): *"Electron microscopic observations of the internal limiting membrane and optic fiber layer of the retina of the Rhesus monkey (M. mulatta)"*. American Journal of Anatomy, 108: 179-197.

35.- COOK R.D., WISNIEWSKI H.M. (1973): *"The role of oligodendroglia and astroglia in Wallerian degeneration of the optic nerve"*. Brain Research, 61: 191-206.

36.- CHAN-LING T., STONE J. (1991a): *"Factors determining the migration of astrocytes into the developing retina: migration does not depend on intact axons or patent vessels"*. Journal of Comparative Neurology, 303: 375-386.

37.- CHAN-LING T., STONE J. (1991b): *"Factors determining the morphology and distribution of astrocytes in the cat retina: a 'contact-spacing' model of astrocyte interaction"*. Journal of Comparative Neurology, 303: 387-399.

38.- CHAN-LING T., STONE J. (1992): *"Degeneration of astrocytes in feline retinopathy of prematurity causes failure of the blood-retinal barrier"*. Investigative Ophthalmology and Visual Science, 33: 2148-2159.

39.- CHENH., CHOPP M., JIANG Q., GARCIA J.H. (1992): *"Neuronal damage, glial response and cerebral metabolism after hypothermic forebrain ischemia in the rat"*. Acta Neuropathologica, 84: 184-189.

40.- DAHL D., BIGNAMI A., WEBER K., OSBORN M. (1981): *"Filament proteins in rat optic nerves undergoing Wallerian degeneration: localization of vimentin, the fibroblastic 100-Å filament protein, in normal and reactive astrocytes"*. Exerimental Neurology, 73: 496-506.

41.- DAHL D., BIGNAMI A. (1982): *"Immunohistological localization of desmin, the muscle-type 100 Å filament protein, in rat astrocytes and Müller glia"*. Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 30: 207-213.

42.- DAHL D., CHI C.H., MILES L.E., NGUYEN B.T., BIGNAMI A. (1982): *"Glial fibrillary acidic (GFA) protein in Schwann cells; fact or artifact?* Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 30: 912-918.

43.- DAHL D., CROSBY C.J., SETH J.S., BIGNAMI A. (1985): *"Glial fibrillary acidic (GFA) protein in vertebrates: immunofluorescence and immunoblotting study with monoclonal and polyclonal antibodies"*. Journal of Comparative Neurology, 239: 75-88.

44.- DAHL D., BJÖRKLUND H., BIGNAMI A. (1986): *"Immunological markers in astrocytes"*. En: Astrocytes (S. Fedoroff, A. Vernadakis, Eds.); Vol III: Cell biology and pathology of astrocytes; págs: 1-19. Academic Press, INC. London.

45.- DAHL D., CROSBY C.J., BIGNAMI A. (1989): *"Intermediate filament protein immunologically related to desmin in astrocytes: a study of chicken spinal cord by two-dimensional gel electrophoresis and immunoblotting"*. Neurochemical Research, 14: 1013-1016.

46.- DAICKER B. (1968): *"Proliferative und degenerative veränderungen von perivaskulären glia und astroglia der netzhaut"*. Klinische Monastblatter für Augenheilkunde, 153: 697-704.

47.- DAMIER P., HIRSCH E.C., ZHANG P., AGID Y., JAVOY-AGID F. (1993): *"Glutathione peroxidase, glial cells and Parkinson's disease"*. Neuroscience, 52: 1-6.

48.- DAVISON P.F., WINSLOW (1974): *"The protein subunit of calf brain neurofilament"*. Journal of Neurobiology, 5: 119-127.

49.- de JUAN E. Jr.., CHANDLER DB., HIDA T., MACHEMER R. (1986): *"Glio-vascular architecture in the rabbit retina"*. Investigative Ophthalmology and Visual Science, 27: 1602-1608.

50.- de JUAN E. Jr., DICKSON J.S., HJELMELAND L. (1988): *"Serum is chemotactic for retinal-derived glial cells"*. Archives of Ophthalmology, 106: 986-990.

51.- DE ROBERTIS E., GERSCHENFELD H.M., WALD F. (1960): *"Ultrastructure and function of glial cells"*. En: Structure and function ofthe cerebral cortex (D.B. Tower, J.P. Schadé, Eds.) Págs: 69-80. Elsevier Publishing Company. Amsterdam.

52.- DEL RÍO-HORTEGA, P. (1919a): *"El tercer elemento de los centros nerviosos. 1.- La microglia en estado normal"*. Boletín de la Sociedad Española de Biología, 8-9: 68-82.

53.- DEL RÍO-HORTEGA, P. (1919b): *"Noticia de un nuevo y fácil método para la coloración de la neuroglia y del tejido conjuntivo"*. Trabajos del Laboratorio de Investigaciones Biológicas de la Universidad de Madrid, 15: 367-378.

54.- DEL RÍO-HORTEGA, P. (1920): *"Estudios sobre la neuroglia. La microglia y su transformación en células en bastoncito y cuerpos gránulo-adiposos"*. Trabajos del Laboratorio de Investigaciones Biológicas de la Universidad de Madrid, 18: 37-82.

55.- DEL RÍO-HORTEGA, P. (1921a): *"Estudios sobre la neuroglia: La glia de escasas radiaciones (oligodendroglia)"*. Boletín de la Sociedad Española de Historia Natural, 21: 63-92.

56.- DEL RÍO-HORTEGA, P (1921b): *"El tercer elemento de los centros nerviosos. Histogénesis y evolución normal: éxodo y distribución regional de la microglia"*. Memorias de la Real Sociedad Española de Historia Natural, 11: 213-268.

57.- DEL RÍO-HORTEGA, P. (1928): *"Tercera aportación al conocimiento morfológico e interpretación funcional de la oligodendroglia"*. Memorias de la Real Sociedad Española de Historia Natural, 14: 1-122.

58.- DENIS-DONINI S., GLOWINSKI J., PROCHIANTZ A. (1984): *"Glial heterogeneity may define the three-dimensional shape of mouse mesencephalic dopaminergic neurones"*. Nature, 307: 641-643.

59.- DIESTLER C., WEIGEL H., HOFFMANN K.P. (1993): *"Glia cells of the monkey retina. I.- Astrocytes"*. Journal of Comparative Neurology, 333: 134-147.

60.- DIETZEL I., HEINEMANN U., LUX H.D. (1989): *"Relations between slow extracellular potential changes, glial potassium buffering, and electrolyte and cellular volume changes during neuronal hyperactivity in cat brain"*. Glia, 2: 25-44.

61.- DIXON R.G., ENG L.F. (1981): *"Glial fibrillary acidic protein in the retina of the developing albino rat: an immunoperoxidase study of paraffin-embedded tissue"*. Journal of Comparative Neurology, 195: 305-321.

62.- DOGIEL A.S. (1895): *"Ein besonderer Typus von Nervenzellen in der Mittleren Gangliösen schicht der Vogel-retina"*. Anatomischer Anzeiger, 10: 750 (Citado por Ramón y Cajal, 1904[191]).

63.- DUSART I., MARTY S., PESCHANSKI M. (1991): *"Glial changes following and excitotoxic lesion in the CNS. II.- Astrocytes"*. Neuroscience, 45: 541-549.

64.- DYAN A. (1991): *"Pour la practique l'astrocyte cerebral"*. En: Practique quotidienne en neurologie nº 14. Publication médicale des Laboratoires Servier. Artem 27 Ed. Paris.

65.- EKSTRÖM P., SANYAL S., NARFSTRÖM K.,CHADER G.J., VAN VEEN T. (1988): *"Accumulation of glial fibrillary acidic protein in Müller radial glia during retinal degeneration"*. Investigative Ophthalmology and Visual Science, 29: 1363-1371.

66.- ENG L.F., VANDERHAEGHEN J.J., BIGNAMI A., GERSTL B. (1971): *"An acidic protein isolated from fibrous astrocytes"*. Brain Research, 28: 351-354.

67.- ERICKSON P.A., FISHER S.K., GUERIN C.J., ANDERSON D.H., KASKA D.D. (1987): *"Glial fibrillary acidic protein increases in Müller cells after retinal detachment"*. Experimental Eye Research, 44: 37-48.

68.- ERSKINE C.A. (1963): *"Neuroglial relationships in the human retinal capillary network"*. British Journal of Ophthalmology, 47: 601-610.

69.- ESQUERDA J.E. (1991): *"Estrategias generales en los métodos de inmunomarcage ultraestructural"*. En: Técnicas de inmunocitoquímica en microscopía electrónica (M. Durfort, S. Vilaró, J. Renau, J. Serratosa, Eds.); págs.: 23-32. Publications Universitat de Barcelona. Barcelona.

70.- FINE B.S. (1961): *"Limiting membranes of the sensory retina and pigment epithelium"*. Archives of Ophthalmology, 66: 847-860.

71.- FINE B.S., ZIMMERMAN L.E. (1962): *"Müller's cells and the "middle limiting membrane" of the human retina. An electronmicroscopic study"*. Investigative Ophthalmology, 1: 304-326.

72.- FONTANA F. (1782): *"Treatise on the venom of the viper"*. J. Cuthell. London. (Citado por Polyak, 1941[177]).

73.- FRIEDE R.L. (1970): *"Papel de los pies gliales en el equilibrio electrolítico del cerebro"*. Triángulo, 9: 165-173.

74.- FRIEDENWALD J.S., WILDER H.C., MAUMENEE A.B. (1952): *"Ophthalmic pathology: an atlas and textbook"*. Pág.: 10. Saunders. Philadelphia, U.S.A (Citado por Wolter, 1955[263]).

75.- GALLEGO A. (1953): *"Procedimiento de impregnación de la retina entera"*. Anales del Instituto de Farmacología Española, 2: 171-186.

76.- GHANDOUR M.S., LANGLEY O.K., VINCENDON G., GOMBOS G. (1979): *"Double labeling immunohistochemical technique provides evidence of the specificityof glial cell markers"*. Journal Histochemistry and Cytochemistry, 27: 1634-1637.

77.- GIULIAN D., BAKER T.J. (1985): *"Peptides released by ameboid microglia regulate astroglial proliferation"*. Journal of Cell Biology, 101: 2411-2415.

78.- GOLDARACENA M.B., GARCIA A., DE LA FUENTE L.F., PASTOR J.C. (1992): *"Estudio inmunocitoquímico de las membranas perirretinianas en un modelo experimental de vitreoretinopatía proliferante (VRP)"*. Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología, 63: 519-524.

79.- GOLDSTEIN G.W., BETZ A.L. (1986): *"La barrera hematoencefálica"*. Investigación y Ciencia, 122: 46-55.

80.- GOLGI C. (1886): *"Sulla fina anatomía degli organi centrali del sistema nervoso"*. Milano. (Citado por Ramón y Cajal, 1889[189])

81.- GREEF R. (1894): *"Die spinnenzellen im sehnerv und in der retina"*. Archives fur Augenheilkunde, 29: 324. (Citado por Ramón y Cajal, 1904[191]).

82.- HAMBERGER A. (1971): *"Amino acid uptake in neuronal and glial cell fractions from rabbit cerebral cortex"*. Brain Research, 31: 169-178.

83.- HATFIELD J.S., SKOFF R.P., MAISEL H., ENG L. (1984): *"Glial fibrillary acidic protein is localized in the lens epithelium"*. Journal of Cell Biology, 98: 1895-1898.

84.- HELD (1903): *"Ueber den Bau der Neuroglia und die Wand der Lymphgefässe in Haut u Schleimbaut"*. Abh. d. Math. Phys. Klasse der Kön Sachs. Gessels der Wissensch. Bd. XXVIII. Leipzig. (Citado por Ramón y Cajal, 1913[194]).

85.- HENN F.A., HALJAMÄE H., HAMBERGER A. (1972): *"Glial cell function: active control of extracellular $K^+$ concentration"*. Brain Research, 43: 437-443.

86.- HERTZ L. (1965): *"Possible role of neuroglia: a potassium-mediated neuronal-neuroglial-neuronal impulse transmission system"*. Nature, 206: 1091-1094.

87.- HISCOTT P.S., GRIERSON I., TROMBETTA C.J., RAHL H.S., MARSHALL J., McLEOD D. (1984): *"Retinal and epiretinal glia: an immunohistochemical study"*. British Journal of Ophthalmology, 68: 698-707.

88.- HOF L. , KIMELBERG H.K. (1985): *"β-glucosidase and β-galactosidase in primary cultures of rat astrocytes. Comparison to the brain enzymes"*. Journal of Neurochemistry, 44: 274-277.

89.- HOGAN M.J., FEENEY L. (1963a): *"Ultrastructure of Müller cells and perivascular glia"*. Investigative Ophthalmology, 2: 101

90.- HOGAN M.J., FEENEY L. (1963b): *"The ultrastructure of retinal vessels. III.- Vascular-glial relationships"*. Journal of Ultrastructure Research, 9: 29-46.

91.- HOGAN M.J., ALVARADO J.A., WENDELL J.E. (1971): *"Histology of the human eye: an atlas and textbook"*. Págs: 523-606. W.B. Saunders Company Ed. Toronto, Canada.

92.- HOLLÄNDER H., MAKAROV F., DREHER Z., van DRIEL D., CHAN-LING TL., STONE J.(1991): *"Structure of the macroglia of the retina: sharing and division of labour between astrocytes and Müller cells"*. Journal Comparative of Neurology, 313: 587-603.

93.- HONRUBIA F.M., GRIJALBO M.P. (1970): *"Estudio de la glia perivascular de la retina"*. Archivos de Oftalmología Hispano-Americana, 30: 197-202.

94.- HYVÄRINEN L. (1967): *"Vascular structures of the rabbit retina"*. Acta Ophthalmologica, 45: 852-861.

95.- IKUI H., UGA S., KOHNO T. (1976): *"Electron microscope study on astrocytes in the human retina using ruthenium red"*. Ophthalmic Research, 8: 100-110.

96.- JANZER R.C., RAFF M.C. (1987): *"Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cells"*. Nature, 325: 253-257.

97.- JESSEN K.R., MIRSKY R. (1980): *"Glial cells in the enteric nervous system contain glial fibrillary acidic protein"*. Nature, 286: 736-737.

98.- JESSEN K.R., THORPE R., MIRSKY R. (1984): *"Molecular identity and heterogeneity of glial fibrillary acidic protein: an immunoblotting and immunohistochemical study of Schwann cells, satellite cells, enteric glia and astrocytes"*. Journal of Neurocytology, 13: 187-200.

99.- JIANG H., LIOU G., CALDWELL R.H. (1993): *"Astrocytes modulate endothelial cell growth differentiation and fibronectin expression"*. Investigative Ophthalmology and Visual Science, 34 (ARVO Abstracts): 899 (P987).

100.- KALT M.E. (1905): *"Anatomie et physiologie comparées de l'appareil oculaire"*. En: Encyclopédie française d'ophtalmologie (F. Lagrange, E. Valude, Eds.), Tome II, págs: 685-933. Octave Doin, Paris.

101.- KARSCHIN A., WÄSSLE H., SCHNITZER J. (1986): *"Shape and distribution of astrocytes in the cat retina"*. Investigative Ophthalmology and Visual Science, 27: 828-831.

102.- KARSCHIN A., WÄSSLE H., SCHNITZER J. (1986): *"Immunocytochemical studies on astroglia of the cat retina under normal and pathological conditions"*. Journal of Comparative Neurology, 249: 564-576.

103.- KARWOSKI C.J., LU H-K., NEWMAN E.A. (1989): *"Spatial buffering of light-evoked potassium increases by retinal Müller (glial) cells"*. Science, 244: 578-580.

104.- KASPER M., STOSIEK P. (1990): *"Detection of GFAP in vertebral fibrocartilage in human fetal and newborn tissue"*. Acta Histochemistry, 88: 25-27.

105.- KATO S., HIRANO A., UMAHARA T., HERZ F., SHIDDA K., MINAGAWA M. (1992): *"Immunohistochemical studies on the new type of astrocytic inclusions identified in a patient with brain malformation"*. Acta Neuropathologica, 84: 449-452.

106.- KIMELBERG H.K., KALTZ D.M. (1985): *"High-affinity uptake of serotonin into immunocytochemically identified astrocytes"*. Science, 228: 889-891.

107.- KIMELBERG H.K., NORENBERG M. (1989): *"Astrocytes"*. Scientific American, 260: 44-52.[a]

[a] Publicado también en la Ed. Española: Investigación y Ciencia, 153 (1989): 44-55. También puede encontrarse en la recopilación: Función Cerebral (Libros de Investigación y Ciencia, págs: 18-27. Prensa Científica, Barcelona (1991).

108.- KÖLLIKER A., MÜLLER H. (1852): *"Zur Anatomie und Physiologie der Retina"*. Verhandlungen der dphysiken Medical Gesselchaft Würzburg, 3: 316 (Citado por Polyak, 1941[177]).

109.- KUFFLER S.W., NICHOLLS J.G. (1976): *"Physiology of neuroglial cells"*. En: From neuron to brain: a cellular approach of the nervous system; págs: 255-263. Sinauer Associates, INC. Sunderland, Massachusetts.

110.- KUMPULAINEN T. (1980): *"Carbonic anhydrase isoenzime C in the human retina. An immunohistochemical study"*. Archives of Ophthalmology, 58: 397-405.

111.- KUMPULAINEN T., DAHL D., KORHONEN L.K., NYSTRÖM H.M. (1983): *"Immunolabelin of carbonic anhydrase isoenzime C and glial fibrillary acidic protein in paraffin-embedded tissue sections of human brain and retina"*. Journal Histochemistry and Cytochemistry, 31: 879-886.

112.- LAKE N. (1992a): *"Taurine, GABA and GFAP immunoreactivity in the developing and adult rat optic nerve"*. Brain Research, 596: 124-132.

113.- LAKE N. (1992b): *"Localization of taurine and glial fibrillary acidic protein in human optic nerve using immunocytochemical techniques"*. Advances in Experimental Medicine and Biology, 315: 303-307.

114.- LAKE N., VERDONE-SMITCH C., BROWNSTEIN S. (1992c): *"Immunocytochemical localization of taurine and glial fibrillary acidic protein in human optic nerve"*. Visual Neuroscience, 8: 251-255.

115.- LAM D.M.K., HOLLYFIELD J.G. (1980): *"Localization of putative amino acid neurotransmitters in the human retina"*. Experimental Eye Research, 31: 729-732.

116.- LAQUA H., MACHEMER R. (1975): *"Glial cell proliferation in retinal detachment (massive periretinal proliferation)"*. American Journal of Ophthalmology, 80: 602-618.

117.- LAUDER J., McCARTHY K. (1986): *"Neuronal-glial interactions"*. En: Astrocytes (S. Fedoroff, A. Vernadakis, Eds.). Vol. 2: Biochemistry, physiology, and pharmacology of astrocytes; págs: 295-314. Academic Pres INC, Orlando, USA.

118.- LAZARIDES E. (1980): *"Intermediate filaments as mechanical integrators of cellular space"*. Nature, 283: 249-256.

119.- LE PRINCE G., COPIN M.C., HARDIN H., BELIN M.F., BOUILLOUX J.P., TARDY M. (1990). *"Neuron-glia interactions: effect of serotonin on the astroglial expression of GFAP and of its encoding message"*. Developmental Brain Research, 51: 295-298.

120.- LESSELL S., KUWABARA T. (1963): *"Retinal neuroglia"*. Archives of Ophthalmology, 70: 671-678.

121.- LEVITT P., PINTAR J.E., BREAKEFIELD X.O. (1982): *"Immunocytochemical demonstration of monoamine oxidase B in brain astrocytes and serotonergic neurons"*. Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America,79: 6385-6389.

122.- LIEM R.K.H., YEN S.H., SOLOMON G.D., SHELANSKI M.L. (1978): *"Intermediate filaments in nervous tissues"*. Journal of Cell Biology, 79: 637-645.

123.- LIEM R.K.H., KEITH C.H., LETERRIER J.F., TRENKNER E., SHELANSKI M.L. (1981): *"Chemistry and biology of neuronal and glial intermediate filaments"*. Cold Spring Harbour Symposia on Quantitative Biology, 46:341-350.

124.- LIESI P., SILVER J. (1988): *"Is astrocyte laminin involved in axon guidance in the mammalian CNS?"*. Developmental Biology, 130: 774-785.

125.- LIN R.C.S., POLSKYK., MATESIC F. (1993): *"Expression of* $\gamma$-aminobutyric acid immunoreactivity in the adult forebrain". Brain Research, 600: 1-8.

126.- LINDSAY R.M. (1986): *"Reactive gliosis"*. En: Astrocytes (S. Fedoroff, A. Vernadakis, Eds.). Vol 3: Cell biology and pathology of astrocytes; págs: 231-262. Academic Press INC., Orlando. USA.

127.- LING T.L., STONE J. (1988): *"The development of astrocytes in the cat retina: evidence of migration from the optic nerve"*. Developmental Brain Research, 44: 73-85.

128.- LOBRINUS J.A., JUILLERAT-JEANNERET L, DAREKAR P., SCHLOSSHAVER B., JANZER R.C. (1992): *"Induction of the blood-brain barrier specific HT7 and neurothelin epitopes in endothelial cells on the chick chorioallantoic vessels by a soluble factor derived from astrocytes"*. Developmental Brain Research, 70: 207-211.

129.- LÓPEZ ENRÍQUEZ M. (1926): *"Existencia de células de Hortega: "microglia" en la retina y vías ópticas"*. Boletín de la Real Sociedad Española de Historia Natural, 26: 294-301.

130.- LÓPEZ ENRÍQUEZ M. (1927): *"Las células de Hortega de la retina y vías ópticas en estado normal y patológico"*. Archivos de Oftalmología Hispano-Americana, 27: 322-349.

131.- LÓPEZ-COLOME A.M., ROMO-DE-VIVAR M. (1991): *"Excitatory amino acid receptors in primary cultures of glial cells from the retina"*. Glia, 4: 431-439.

132.- LUSE S.A. (1956): *"Electron microscopic observations of the central nervous system"*. Journal of Biophysical and Biochemical Cytology, 2: 531-541.

133.- MacVICAR B.A., HOCHMAN D., DELAY M.J., WEISS S. (1991): *"Modulation of intracellular Ca++ in cultured astrocytes by influx through voltage-activated Ca++ channels"*. Glia, 4: 448-455.

134.- MADDOX P.H., TAY S.K., JENKINS D. (1987): *"A new fixed cryosection technique for the simultaneous immunocytochemical demonstration of T6 and S-100 antigens"*. Histochemical Journal, 19:35-38.

135.- MARCHESANI O. (1926): *"Die Morphologie der Glia im Nervus Opticus und in der Retina, dargestellt nach den neuesten Untersuchungsmethoden und Untersuchungsergebnissen"*. Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology, 117: 575-605.

136.- MARCHESI V.T., SEARS M.L., BARRNETT R.J. (1964): *"Electron microscopic studies of nucleoside phosphatase activity in blood vessels and glia of the retina"*. Investigative Ophthalmology, 3: 1-21.

137.- MARENGHI G. (1900): *"Contributo alla fina organizzazione della retina"*. Anatomischer Anzeiger (Suppl.), 18: 12. (Citado por Polyak, 1941[177]).

138.- MARSHALL J., VOADEN M. (1974): *"An investigation of the cells incorporating ($^3$H)GABA and ($^3$H)Glycine in the isolated retina of the rat"*. Experimental Eye Research,18: 367-370.

139.- MATA M., ALESSI D., FINK D.J. (1990). *"S-100 is preferentially distributed in myelin-forming Schwann cells"*. Journal of Neurocitology, 19: 432-442.

140.- MESSMER E.P., FONT R.L. (1984): *"Application of immunohistochemistry to ophthalmic pathology"*. Ophthalmology, 91: 701-707.

141.- MICHAELSON I.C. (1954): *"Retinal circulation in man and animals"*. Charles C. Thomas, Springfield.

142.- MILLER B., MILLER H., PATTERSON R., RYAN S.J. (1986): *"Retinal wound healing. Cellular activity at the vitreoretinal interface"*. Archives of Ophthalmology, 104: 281-285.

143.- MILLER R.H., RAFF M.C. (1984): *"Fibrous and protoplasmic astrocytes are biochemically and developmentally distinct"*. Journal of Neuroscience, 4: 585-592.

144.- MILLER R.H., FFRENCH-CONSTANT C., RAFF M.C. (1989): *"The macroglial cells of the rat optic nerve"*. Neuroscience, 12: 517-534.

145.- MINTURN J.E., BLACK J.A., ANGELIDES K.J., WAXMAN S.G. (1990). *"Sodium channel expression detected with antibody 7493 in A2B5+ and A2B5- astrocytes from rat optic nerve in vitro.* Glia, 3: 358-367.

146.- MOKUNO K., KAMHOLZ J., BEHRMAN T., BLACK C., SESSA M., FEINSTEIN D., LEE V., PLEASURE D. (1989): *"Neuronal modulation of Schwann cell glial fibrillary acidic protein (GFAP)"*. Journal of Neuroscience Research, 23: 396-405.

147.- MOLNAR M.L., STEFANSSON K., MARTON L.S., TRIPHATI R.C., MOLNAR G.K. (1984): *"Distribution of S-100 protein and glial fibrillary acidic protein in normal and gliotic human retina"*. Experimental Eye Research, 38: 27-34.

148.- MOLNAR M.L., STEFANSSON K., MOLNAR G.K., TRIPATHI R.C., MARTON L.S. (1985): *"Species variations in distribution of S100 in retina. Demonstration with a monoclonal antibody and a polyclonal antiserum"*. Investigative Ophthalmology and Visual Science, 26: 283-288.

149.- MUCHNICK N., OBERDORFER (1981): *"Neuronal and neuroglial responses following retinal lesions in the neonatal rats"*. Journal of Comparative Neurology, 202: 493-504.

150.- MÜLLER H. (1851): *"Zur Histologie der Netzhaut"*. Z. Wiss. Zool., 3: 234-237. (Citado por Newman, 1986[159])

151.- MUSSER G.L., ROSEN S. (1973): *"Localization of carbonic anhydrase activity in the vertebrate retina"*. Experimental Eye Research, 15: 105-119.

152.- NAKANE P.K., PIERCE G.B. (1966): *"Enzyme labeled antibodies for the light and electron microscopie localization of tissue antigens"*. Journal of Cell Biology, 33: 307.

153.- NAKANE P.K. (1968): *"Simultaneous localization of multiple tissue antigens using the peroxidase-labeled antibody method: a study on pituitary glands of the rat"*. Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 16: 557-560.

154.- NEWMAN E.A. (1984): *"Control of extracellular potassium levels by retinal glial cell $K^+$ siphoning"*. Science, 225: 1174-1175.

155.- NEWMAN E.A. (1984b): *"Regional specialization of retinal glial cel membrane"*. Nature, 309: 155-157.

156.- NEWMAN E.A. (1985a): *"Regulation of potassium levels by glial cells in the retina"*. Trends in Neuroscience, 8: 156-159.

157.- NEWMAN E.A. (1985b): *"Voltage-dependent calcium and potassium channels in retinal glial cells"*. Nature, 317: 809-811.

158.- NEWMAN E.A. (1986a): *"High potassium conductance in astrocyte endfeet"*. Science, 233: 453-454.

159.- NEWMAN E.A. (1986b): *"The Müller cell"*. En: Astrocytes (S. Fedoroff, A. Vernadakis, Eds.). Vol I: Development, morphology and regional specialization of astrocytes, págs: 149-171. Academic Press INC., Orlando, USA.

160.- NIETO-SAMPEDRO M., SANETO P.R., DE VELLIS J., COTMAN C.W. (1985): *"The control of glial populations in brain: changes in astrocytes mitogenic and morphogenic factors in response to injury"*. Brain Research, 343: 320-328.

161.- NORENBERG M., MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ A. (1979): *"Fine structural localization of glutamine synthetase in astrocytes of rat brain"*. Brain Research, 161: 303-310.

162.- NORK T.M., WALLOW I.H.L., SRAMIEK S.J., ANDERSON G. (1987): *"Müller's cell involvement in proliferative diabetic retinopathy"*. Archives of Ophthalmology, 105: 1424-1429.

163.- OGDEN T.E., GREEN J.D., PETERSON R.G. (1974): *"Graded impregnation of nervous tissue stained by the Golgi procedure"*. Stain Technology, 49: 81-83.

164.- OGDEN T.E. (1976): *"Nerve fiber layer astrocytes of the primate retina: morphology, distribution, and density"*. Investigative Ophthalmology and Visual Science, 17: 499-510.

165.- OGDEN T.E. (1983): *"Nerve fiber layer of the primate retina: thickness and glial content"*. Vision Research, 23: 581-587.

166.- OHIRA A., de JUAN E. Jr. (1990): *"Characterization of glial involvement in proliferative diabetic retinopathy"*. Ophthalmologica, 201: 187-195.

167.- OKADA M., MATSUMURA M., OGINO N., HONDA Y. (1990): *"Müller cells in detached human retina express glial fibrillary acidic protein and vimentin"*. Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology, 228: 467-474.

168.- ORKAND P.M., BRACHO H., ORKAND R.K. (1973): *"Glial metabolism: alteration by potassium levels comparable to those during neuronal activity"*. Brain Research, 55: 467-471.

169.- PAPASOZOMENOS S. CH., BINDER L.I. (1986): *"Microtubule-associated protein 2 (MAP2) is present in astrocytes of the optic nerve but absent from astrocytes of the optic trat"*. Journal of Neuroscience, 6: 1748-1756.

170.- PARYSEK L.M., DEL CERRO M., OLMSTED J.B. (1985): *"Microtubule-associated protein 4 antibody: a new marker for astroglia and oligodendroglia"*. Neuroscience, 15: 869-875.

171.- PAULSON O.B., NEWMAN E.A. (1987): *"Does the release of potassium from astrocyte endfeet regulate cerebral blood flow?* Science, 237: 896-898.

172.- PENFIELD W. (1924): *"Oligodendroglia and its relation to clasical neuroglia"*. Brain, 47: 430-452.

173.- PENFOLD P.L., PROVIS J.M. (1986): *"Cell death in the development of the human retina: phagocytosis of pyknotic and apoptotic bodies by retinal cells"*. Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology, 224: 549-553

174.- PENFOLD P.L., PROVIS J.M., MADIGAN M.C., van DRIEL D., BILLSON F.A. (1990): *"Angiogenesis in normal human retinal development: the involvement of astrocytes and macrophages"*. Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology, 228: 255-263.

175.- PENTREATH V.W., KAI-KAI M.A. (1982): *"Significance of the potassium signal from neurones to glial cells"*. Nature, 295: 59-61.

176.- PIXLEY S.K.R., De VELLIS J. (1984): *"Transition between immature radial glia and mature astrocytes studied with a monoclonal antibody to vimentin"*. Developmental Brain Research, 15: 201-209.

177.- POLYAK S.L. (1941): *"The retina. The anatomy and the histology of the retina in man, ape, and monkey, incluiding the consideration of visual functions, the history of physiological optics, and the histological loaboratory technique"*. The University of Chicago Press, Chicago.

178.- PRIESTLEY J. (1987): *"Immunocytochemical techniques for the localization of neurochemically characterized nerve pathways"*. En: Neurochemistry a practical approach (A.J. Turner, H.S. Bachelard, Eds.); Págs: 65-112. IRL Press Limited. Oxford.

179.- PRIVAT A., RATABOUL P. (1986): *"Fibrous and protoplasmic astrocytes"*. En: Astrocytes (S. Fedoroff, A. Vernadakis, Eds.), Vol. I: Development, morphology and regional specialization of astrocytes; págs: 105-129. Academic Press INC, Orlando, USA.

180.- PROVIS J.M., PENFOLD P.L., MADIGAN M.C., van DRIEL D., BILLSON F.A. (1991): *"Angiogenesis in human retinal development: astrocytes, macrophages and early lumen formation"*. En: New frontiers in Ophthalmology (C.Y. Khoo, B.C. Ang, W.M. Cheah, P.T.V. Chew, A.S.M. Lim, Eds.) Págs.: 608-612. Excerpta Medica. Amsterdam.

181.- PURO D.G., MANO T., CHAN C.C., FUKUDA M., SHIMIDA H. (1990). *"Thrombin stimilates the proliferation of human retinal glial cells"*. Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology, 228: 169-173.

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

183.- QUITSCHKE W., JONES P.S., SCHECHTER N. (1985): *"Survey of intermediate filament proteins in optic nerve and spinal cord: evidence for differential expression"*. Journal of Neurochemistry, 44: 1465-1476.

184.- RAFF M.C., MILLER R.H. (1984): *"Glial cell development in the rat optic nerve"*. Trends in Neuroscience, 7: 469-472.

185.- RAKIC P. (1971): *"Neuron-glia relationship during granule cell migration in developing cerebellar cortex. A golgi and electronmicroscopic study in macacus rhesus"*. Journal of Comparative Neurology, 141. 283-312.

186.- RAKIC P. (1981): *"Neuronal-glial interaction during brain development"*. Trends in Neuroscience, 4: 184-187.

187.- RAMÍREZ J.M., TRIVIÑO A., RAMÍREZ A.I., GARCÍA-SÁNCHEZ J. (1989). *"Study of the choroidal inervation throung immunocytochemical"*. En: II[nd] International Symposium on the Choroid (R.W. Flower, Eds.), Págs: 32-42. Maryland, USA.

188.- RAMÍREZ J.M., DE HOZ R., SALAZAR J.J., RAMÍREZ A.I., TRIVIÑO A., GARCÍA-SÁNCHEZ J. (1990): *"Fibras amielínicas coroideas. Estudio inmunohistoquímico"*. Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología, Invest, 3: 77-82.

189.- RAMÓN Y CAJAL, S. (1889): *"Manual de histología normal y técnica micrográfica"*. Ed. Libreria de Pascual Aguilar. Valencia.)

190.- RAMÓN Y CAJAL, S. (1892): *"La rétine des vertébres"*. La Cellule, 9: 121-225.[b]

[b] También es posible consultar la reedición que se publicó con motivo del XIV Concilium Ophthalmologicum de 1933 en Madrid, revisado por el propio Cajal: "La rétine des vértebres". Actas del XIV Concilium Ophthalmologicum, T.II-3. Blass, S.A. (1933)

191.- RAMÓN Y CAJAL, S. (1904): *"Sistema Visual: Órgano receptor de la excitación visual o retina"*. En: Textura del sistema Nervioso del hombre y de los vertebrados. Estudios sobre el plan estructural y composición histológica de los centros nerviosos adicionados de consideraciones fisiológicas fundadas en los nuevos descubrimientos". Tomo II (Primera parte), Cap. XIX; págs: 582-608. Imprenta y Libreria de Nicolás Moya, Madrid.[c]

192.- RAMÓN Y CAJAL, S. (1911): *"Histologie du Système Nerveux de l'homme et des vertébrés"*. Vol. 2, Chapitre XV: Appareil visuel, Rétine ou organe récepteur de l'excitation visuelle; págs: 298-367. Maloine. Paris.

193.- RAMÓN Y CAJAL, S. (1913a): *"Sobre un nuevo proceder de impregnación de la neuroglia y sus resultados en los centros nerviosos del hombre y los animales"*. Trabajos del Laboratorio de Investigaciones Biológicas de la Universidad de Madrid, 11: 219-237.

194.- RAMÓN Y CAJAL, S. (1913b): *"Contribución al conocimiento de la neuroglia del cerebro humano"*. Trabajos del Laboratorio de Investigaciones Biológicas de la Universidad de Madrid, 11: 255-315.

195.- RAMÓN MOLINER E. (1958): *"A study on neuroglia: the problem of transitional forms"*. Journal of Comparative Neurology, 110: 157-171.

[c] La obra consultada para la realización de este trabajo fue la Edición Fascimil publicada en 1993 por el Instituto de Neurociencias de la Universidad de Alicante, Gráficas Vidal-Leuka, Alicante.

196.- RANSOM B.R., CARLINI W.G. (1986): *"Electrophysiological properties of astrocytes"*. En: Astrocytes (S. Fedoroff, A. Vernadakis, Eds.). Vol. 2: Biochemistry, physyology, and pharmacology of astrocytes, págs: 1-49. Academic Press INC., Orlando, USA.

197.- REICHENBACH A. (1987): *"Quantitative and qualitative morphology of rabbit retinal glia. A light microscopical study on cells both in situ and isolated by papaine"*. Journal für Hirnforschung, 28: 213-220.

198.- REICHENBACH A., SCHIPPEL K., SCHUMANN R., HAGEN E. (1988): *"Ultrastructure of rabbit retinal nerve fibre layer neuro-glial relationships, myelination, and nerve fibre spectrum"*. Journal für Hirnforschung. 29: 481-491.

199.- REMAK R. (1854): *"Ueber den Bau der Retina und der Ganglien"*. Deutsche Klinische, 6: 177. (Citado por Polyak, 1941).

200.- RHODES R.H. (1984): *"Ultraestructure of Müller cells in the developing human retina"*. Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology, 221: 171-178.

201.- RICHTER W., REICHENBACH A., REICHELT (1990): *"Orthogonal arrays of intramembranous particles in the Müller cells and astrocyte endfoot membrane of rabbit retina. Postnatal development and adulthood"*. Journal of Neurocytology, 19: 127-139.

202.- RIEPE R.E., NORENBURG M.D. (1977): *"Müller cell localization of glutamine synthetase in rat retina"*. Nature, 268: 654-655.

203.- RIPPS H., WITKOVSKY P. (1985): *"Neuron-glia interaction in the brain and retina"*. Progress in Retinal Research, 4: 181-219.

204.- RISAU W., WOLBURG H. (1990): *"Development of the blood-brain barrier"*. Trends in Neuroscience, 13: 174-178.

205.- RITCHIE J.M. (1992): *"Voltage-gatedion channels in Schwann cells and glia"*. Trends in Neuroscience, 15: 345-351.

206.- ROBINSON S.R., DREHER Z. (1989): *"Evidence for three morphological classes of astrocyte in the adult rabbit retina: functional and developmental implications"*. Neuroscience Letters, 106: 261-268.

207.- ROBINSON S.R., DREHER Z. (1990): *"Müller cells in adult rabbit retinae: morphology, distribution and implications for function and development"*. Journal of Comparative Neurology, 292: 178-192.

208.- ROWENS.L., GLASSER B.M. (1985): *"Retinal pigment epithelial cells release a chemoattractant for astrocytes"*. Archives of Ophthalmology, 103: 704-707.

209.- RUNGGER-BRÄNDLE E., MESSERLI J.M. (1992): *"Une analyse par microscopie confocale à balayage de la relation spatiale entre astrocytes et vaiseaux sanguins de la rétine"*. Ophtalmologie, 6: 136-142.

210.- SAKATANI K., BLACK J.A., KOCSIS J.D. (1992): *"Transient presence and functional interaction of endogenous GABA and GABA-A receptors in developing rat optic nerve"*. Proceedings of The Royal Society of Medicine London (Biology), 247: 155-161.

211.- SASSOE M., PANZANELLI P., ARTERO C., FASOLO A., CANTINO D. (1992): *"Comparative study of glial fibrillary acidic protein (GFAP)-like immunoreactivity in the retina of some representative vertebrates"*. European Jounral of Histochemistry, 36: 467-477.

212.- SATO K., YOSHIDA S., FUJIWARA K., TADA K., TOHYAMA M. (1991): *"Glycine cleavage system in astrocytes"*. Brain Research, 567: 64-70.

213.- SCHARENBERG K., ZEMAN W. (1952): *"Zur Leistungsfähigkeit und zur Technik der Hortegaschen Silberkarbonatmethoden"*. Arch. F. Psychiat.u. Zsch. Neurol., 188: 430-439. (Citado por Wolter, 1961[269]).

214.- SCHERER J., SCHNITZER J. (1989): *"The rabbit retina: a suitable mammalian tissue for obtaining astroglia-free Müller cell cultures"*. Neuroscience Letters, 9: 51-56.

215.- SCHNITZER J., SCHACHNER M. (1982): *"Cell type specificity of a neural cell surface antigen recognized by the monoclonal antibody A2B5"*. Cell Tissue Research, 224: 625-636.

216.- SCHNITZER J. (1985): *"Distribution and immunoreactivity of glia in the retina of the rabbit"*. Journal of Comparative Neurology, 240: 128-142.

217.- SCHNITZER J., KARSCHIN A. (1986): The shape and distribution of astrocytes in the retina of the adult rabbit. Cell Tissue Research, 246: 91-102.

218.- SCHNITZER J. (1987a): *"Immunocytochemical localization of S-100 protein in astrocytes and Muller cells in the rabbit retina"*. Cell Tissue Research, 248: 55-61.

219.- SCHNITZER J. (1987b): *"Retinal astrocytes: their restricition to vascularized parts of the mammalian retina"*. Neuroscience Letter, 78: 29-34.

220.- SCHNITZER J. (1988a): *"The development of astrocytes and blood vessels in the postnatal rabbit retina"*. Journal of Neurocytology, 17: 433-449.

221.- SCHNITZER J. (1988b): *"Atrocytes in mammalian retina"*. Progress in Retinal Research, 7: 209-231.

222.- SCHNITZER J. (1988c): *"Immunocytochemical studies on the development of astrocytes, Müller (glial) cells, and oligodendrocytes in the rabbit retina"*. Developmental Brain Research, 44: 59-72.

223.- SCHNITZER J.(1988d): *"Astrocytes in the guinea pig, horse, and monkey retina: their occurrrence coincides with the presence of blood vessels"*. Glia, 1: 74-89.

224.- SCHRÖDER H., MALHOTRA S.K. (1987): *"Characterization of rodent pineal astrocytes by immunofluorescence microscopy using a monoclonal antibody (J1-31)"*. Cell Tissue Research, 248: 607-610.

225.- SCHULTZ R.L. (1964): *"Macroglial identification in electron micrographs"*. Journal of Compartive Neurology, 122: 281-295.

226.- SCHULTZE M. (1866): *"Zur Anatomie und Physiologie der Retina"*. Arch. f. Mikrosk. Anat., 2: 165-175. (Citado por Polyak, 1941[177]).

227.- SCHWAB M. (1989): *"Neurite growth inhibitors in the mammalian central nervous system"*. International Brain Research Organization NEWS, 17: 7.

228.- SCHWALBE G. (1874): *"Mikroskopische Anatomie der Sehnerven, der Netzhaut und des Glaskörpers"*. Graefe und Saemisch Handb. d. Ges. Aungenheilk, 1: 321. (Citado por Polyak, 1941[177]).

229.- SHAW G., WEBER K.(1983): *"The structure and development of the rat retina: an immunofluorescence microscopical study using antibodies specific for intermediate filament proteins"*. European Journal of Cell Biology, 30: 219-232.

230.- SHAW G., WEBER K. (1984): *"The intermediate filament complement of the retina: a comparison between different mammalian species"*. European Journal of Cell Biology, 33: 95-104.

231.- SOLE P, DALENS H., GENTOU C. (1992): *"Biophtalmologie"*. Libro VI: Le Système Nerveux. Chapitre I: Generalites sur le système nerveux; págs: 3-72. Masson, París.

232.- STERNBERGER L.A., HARDY P.H., CUCULIS J.J., MEYER H.G. (1970): *"The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry. Preparation and properties of soluble antigen antibody complex (horseradish peroxidase-antihorseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes"*. Journal Histochemistry and Cytochemistry, 18: 315-333.

233.- STEWART P.A., WILEY M.J. (1981): *"Developing nervous tissue formation of blood-brain barrier characteristics in invading endothelial cells: a study using quail-chick transplatation chimeras"*. Developmetal Biology, 84: 183-192.

234.- STEWART P.A., COOMBER B.L. (1986): *"Astrocytes and the blood-brain barrier"*. En: Astrocytes (S. Fedoroff, A. Vernadakis, Eds.); Vol. I: Development, morphology and regional specialization of astrocytes; págs: 311-328. Academic Press INC, London.

235.- STONE J., DREHER Z. (1987): *"Relationship between astrocytes, ganglion cells and vasculature of the retina"*. Journal of Comparative Neurology, 255: 35-49.

236.- SUAREZ I., FERNÁNDEZ B. (1983): *"Structure and ultrastructure of the external glial layer in the hypothalamus"*. Journal für Hirnsforschung., 24: 99-109.

237.- TERENGHI G., COCCHIA D., MICHETTI P., DIANI A.R., PETERSON T., COLE D.F., BLOOM S.R., POLAK J.M. (1983): *"Localization of S-100 protein in Müller cells of the retina. 1.- Light microscopical immunohistochemistry"*. Investigative Ophthalmology and Visual Science, 24: 976-980.

238.- THANO S., THIEL H-J. (1990): *"Regenerative and proliferative capacity of adult human retinal cells in vitro"*. Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology, 228: 369-376.

239.- TOLIVIA D. (1975): *"Un nuevo método sencillo y constante para la impregnación argéntica de la glia astrocitaria y una variante del mismo aplicable a la rápida y segura demostración de fibras reticulares"*. Trabajos del Instituto Cajal de Investigaciones Biológicas, 67: 247-258.

240.- TRACHTENBERG M.C., POLLEN D.A. (1970): *"Neuroglia: biophysical properties and physiologic function"*. Science, 167: 1248-1252.

241.- TRIPATHI B., ASHTON N. (1971): *"Vaso-glial connections in the rabbit retina"*. British Journal of Ophthalmology, 55: 1-11.

242.- TRIVIÑO A., RAMÍREZ A.I., RAMÍREZ J.M., SALAZAR J.J., RIVERA M., GARCÍA-SÁNCHEZ J. (1988): *"Estudio de las relaciones vaso-gliales en la retina del conejo albino (*Oryctolagus cuniculus*)"*. Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología, Invest, 1: 103-110.

243.- TRIVIÑO A., RAMÍREZ J.M. (1989): *"Anatomofisiología de la coroides"*. En: La Circulación Coroidea (F. Gómez-Ulla, F. Marín, J.M. Ramírez, A. Triviño, Eds.). Cáp. 1, págs: 7-29. Edika Med. S.A., Barcelona.

244.- TRIVIÑO A., RAMÍREZ A.I., SALAZAR J.J., RAMÍREZ J.M., GARCÍA-SÁNCHEZ J. (1990): *"Astrocitos retinianos relacionados con los axones de las células ganglionares. Estudio inmunohistoquímico"*. Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología, Invest, 3: 87-92.

245.- TRIVIÑO A., RAMÍREZ A.I., RAMÍREZ J.M., SALAZAR J.J., GARCÍA-SÁNCHEZ J. (1991): *"Estudio mediante el método de diafanización de la vascularización retiniana del conejo"*. Studium Ophthalmologicum, 10 (3): 13-18.

246.- TRIVIÑO A., RAMÍREZ J.M., RAMÍREZ A.I., SALAZAR J.J., GARCÍA-SÁNCHEZ J. (1992): *"Retinal perivascular astroglia: an immunoperoxidase study"*. Vision Research, 32: 1601-1607.

247.- TUCCARI G., TROMBETTA C., GIARDINELLI M.M., ARENA F., BARRESI G. (1986): *"Distribution of glial fibrillary acidic protein in normal and gliotic human retina"*. Basic and Applied Histochemistry, 30: 425-432.

248.- UYEDA C.T., ENG L.F., BIGNAMI A. (1972): *"Immunological study of the glial fibrillary acidic protein"*. Brain Research, 37: 81-89.

249.- VACA K., WENDTE. (1992): *"Divergent effects of astroglial and micoglial secretions on neuron growth and survival"*. Experimental Neurology, 118: 62-72.

250.- VAN HORN D.L., AEBERG T.M., MACHEMER R. (1977): *"Glial cell proliferation in human retinal detachment with massive periretinal proliferation"*. American Journal of Ophthalmology, 84: 383-393.

251.- VAQUERO J., COCA S. (1987): *"Diagnóstico inmunopatológico de los tumores cerebrales"*. Tiempos Médicos, Anuario 1987: 118-123.

252.- VAUGHAN D.K., LASATER E.M. (1990): *"Glial and neuronal markers in bass retinal horizontal and Müller cells"*. Brain Resarch, 537: 131-140.

253.- VAUGHN J.E., PEASE D.C. (1967): *"Electron microscopy of classically stained astrocytes"*. Journal of Comparative Neurology,131: 143-154.

254.- VIBULSRETH S., HEFTI F., GINSBERGM.D., DIETRICH W.D., BUSTO R. (1987): *"Astrocytes protect cultured neurons from degeneration induced by anoxia"*. Brain Research, 422: 303-311.

255.- VILLEGAS G.M. (1964): *"Ultrastructure of the human retina"*. Journal of Anatomy, 98: 501-513.

256.- VIRCHOW R. (1846): *"Über der Granulierte ansehen der Wanderungen der Gehirnventrikel"*. Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie. und ihre Grenzgebiete, 3: 242-250. (Citado por Wendell-Smith, 1966[260]).

257.- WEIDMAN T.A. (1973): *"The retina"*. En: Ocular fine structure for the clinician (K.M. Zinn, Ed.). International Ophthalmology Clinics, vol. 13: 205-227. Little, Brown and Company. Boston.

258.- WEIGERT F. (1895): *"Beiträge zur Kermtnis der Normalen menschlichen Neuroglia"*. Pág. 20. Weisbrod, Frankfurt am Main. (Citado por Achucarro, 1913[4]).

259.- WENDELL-SMITH C.P., BLUNT M.J. (1965): *"Possible role of neuroglia"*. Nature, 208: 600-601.

260.- WENDELL-SMITH C.P., BLUNT M.J., BALDWIN F. (1966): *"The ultrastructural characterization of macroglial cell types"*. Journal of Comparative Neurology, 127: 219-240.

261.- WOLFF E. (1968): *"The retinal neuroglia". En:* Anatomy of the eye and orbit (Including the central connections, development, and comparative anatomy of the visual apparatus). Sixth Edition. (Revised by R.J. Last); págs.: 135-138. W.B. Saunders Company. Philadelphia.

262.- WOLFF J.R. (1970): *"El astrocito, elemento de enlace entre el capilar y la célula nerviosa"*. Triángulo, 9: 153-164.

263.- WOLTER J.R. (1955a): *"The astroglia of the human retina: and other glial elements of the retina under normal and pathologic conditions"*. American Journal of Ophthalmology, 40: 88-100.

264.- WOLTER J.R. (1955b): *"The cells of Remark and the astroglia of the normal human retina"*. Archives of Ophthalmology, 53: 832-838.

265.- WOLTER J.R. (1956a): *"Perivascular glia of the blood vessels of the human retina"*. American Journal of Ophthalmology, 44: 766-773.

266.- WOLTER J.R. (1956b): *"Reactions of the elements of retina and optic nerve. In common morbid entities of the human eye"*. American Journal of Ophthalmology, 42 (pt. II): 10-27.

267.- WOLTER J.R. (1956c): *"Über Besondere Astroglia an der Innenfläche der Retina"*. Klinische Monasblatter fur Augenheilkunde, 129: 224-230.

268.- WOLTER J.R. (1959): *"Glia of the human retina"*. American Journal of Ophthalmology, 48 (pt. II): 370-393.

269.- WOLTER J.R. (1961): *"Silver carbonate techniques for the demonstration of ocular histology"*. En: The structure of the eye (G.K. Smelser, Ed.). Págs: 117-138. Academic Press. New York.

270.- YAMADA T., KUWAMATA T., WALKER D.G., Mc GEER P.L. (1992): *"Vimentin immunoreactivity in normal and pathological human brain tissue"*. Acta Neuropathologica, 84: 157-162.

271.- YEN S.H., FIELDS K.L. (1981): *"Antibodies to neurofilament, glial filament, and fibroblast intermediate filament protein bind to different cell types of the nervous system"*. Journal of Cell Biology, 88: 115-126.

272.- YU N., MARTIN J.L., STELLA N., MAGISTRETTI P.J. (1993): *"Arachidonic acid stimulates glucose uptake in cerebral cortical astrocytes"*. Proceedings of The National Academic of Sciences of the United States of America, 90: 4042-4046.